



African Food Tradition rEvisited by Research
FP7 n°245025

Start date of project: **01/09/2010**

Duration: **45 months**

Deliverable number: Deliverable 1.2.3.11

Title of deliverable: SOPs for Biochemical and nutritional analysis for Group 1

Deliverable type (Report, Prototype, Demonstration, Other): Report

Dissemination level (PU, PP, RE, CO)*: PU

Contractual date of delivery: February 2011

Actual date of delivery: October 2011

Work-package contributing to the deliverable: WP1

Organisation name of lead contractor for this deliverable: CIRAD

Authors: are indicated on the appropriate SOPs.

This document has been send to:

The coordinator by WP Leader	Date: September 2011
To the Commission by the Coordinator	Date: October 2011

* PU: Public; PP: Restricted to other programme participants (including the Commission Services); RE: Restricted to a group specified by the consortium (including the Commission Services); CO: Confidential, only for members of the consortium (including the Commission Services)

Methodology for the development of SOPs for this deliverable.

This deliverable consists of several SOPs related to the chemical analysis for products of Group 1.

The SOP's come from four sources:

1. The literature that gives procedures on products similar to the African fermented products of the project. In this case several articles can be combined according to their precisions.
2. Standard procedures from the International Standardization Organization (ISO) or the AACC (American Association of Cereal Chemists). In this case, the method is used like it or after minor modifications. Only a brief summary and the modifications (if any) are detailed in the document, with the reference procedure (ISO or AACC) annexed to the SOP. To be in agreement with intellectual property rules, the project coordination purchased and distributed to partners all hard copies of the reference procedures annexed in the SOPs
3. The SOPs can come from the laboratory that developed the methods for the specific analysis.

After writing, the SOP's are approved by the Work Package Leader (WPL) related to the group of product concerned (Group 1: WP2; Group 2: WP3; Group 3: WP4).

The WPL is in charge to send the SOP's to the concerned partners for validation. Each partner, according to his laboratory facilities, validates the method and informs one of the following alternatives in his laboratory:

- The laboratory makes the analysis in routine (coded "R" in the joined table)
- The laboratory is able to make this analysis (coded "P", possible)
- The laboratory can make the analysis after buying equipment (coded "B")
- The laboratory can't make the analysis (coded "blank").

The WPL decides the end of the validation step. He accepts the final SOP version. He completes the table with the last revision date.

The specific procedure can be directly viewed by clicking on the SOP number (link). It should be noticed that Vitamin (B type) determination will be sub-contracted.

Type	Character	CIRAD	UAC	FRI	NRC	FAAU	Principle	SOP/fr	SOP/en
Nutritional factors	Minerals (Mg, Fe, Ca, Na, Cu, Zn)		P	R	P		Atomic Spectroscopy after incineration	Nutri-Cere-004-fr	Nutri-Cere-004-en
	Iron Fe				P		Colorimetric reaction with orthophenanthroline.		Nutri-Cere-005-en
	Total amino acids	R	P				Proteins are hydrolyzed with methan-sulfoxid, and aminoacids assessed by HPLC with ninhydrine colorimetric reaction	Nutri-Cere-003-fr	
	Free amino acids	R	P	R*			Extraction with citrate buffer followed by HPLC with ninhydrine colorimetric reaction	Nutri-Cere-002-fr	
	Vitamins						Sub-contracted		
	Total phosphorus				R	R	Colorimetric reaction with ammonium molybdate.		Nutri-Cere-006-en
Anti-nutritional factors	Phytate (IP6)	P					Acid extraction followed by HPIC	Anti-Nutri-Cere-001	
	Total Phenolic compounds	P	P		P		spectrophotometry after reaction with Follin-Ciocalteu reagent; interfering compounds are subtracted	Anti-Nutri-Cere-002-fr	
	Phenolic acid compounds	P	P				Cinnamic compounds are extracted by saponification then assessed by HPLC	Anti-Nutri-Cere-003-fr	
	Tannins	R	P				Tannins are extracted with Dimethylformamide the assessed after reaction with feric ammonium citrate	Anti-Nutri-Cere-004-fr	
	Cyanids	R	P				Cyanids are extracted in Phosphoric acid solution, hydrolyzed with β -glucosidase and assessed by colorimetry	Anti-Nutri-Cere-005-fr	



African Food Tradition rEvisited by Research

FP7 n°245025



Deliverable D.1.2.3.11: SOP for Biochemical and nutritional analysis for Group 1

Détermination du plomb, cadmium, zinc, cuivre, fer et chrome par spectrométrie d'absorption atomique (AAS) après calcination à sec

SOP : Nutri-Cere-04-fr

Date : **1/06/2011**

Version: **1**

Ecrit par : Noël AKISSOE

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Christian MESTRES (christian.mestres@cirad.fr) / WP2 Leader
- Noël AKISSOE (noel.akis@yahoo.fr)
-

Ce document a été approuvé par :

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD	Christian MESTRES	19/01/2012
UAC	Noël AKISSOE	1/06/2011
CSIR		
FAAU		
ESB		
FRI		
NRC		

**Détermination du plomb, cadmium, zinc, cuivre, fer et chrome par spectrométrie
d'absorption atomique (AAS) après calcination à sec**

SOP : Nutri-Cere-004-fr

Date: 19/1/2012

Version : 1

Table des matières

1	Domaine et application	3
2	Références	3
3	Définitions	3
4	Principe	3
5	Réactifs	3
6	Appareillage	3
7	Procédure	3
8	Expression des résultats	4
8.1	Mode de calcul et formules	4
8.2	Répétabilité.....	4
9	Points critiques et Note sur la procedure.....	4
10	Rapport d'essai	4
11	Enregistrement des Révisions	4
12	Annexe	5

Détermination du plomb, cadmium, zinc, cuivre, fer et chrome par spectrométrie d'absorption atomique (AAS) après calcination à sec

SOP : Nutri-Cere-004-fr

Date: 19/1/2012

Version : 1

1 DOMAINE ET APPLICATION

Le présent document décrit une méthode de référence pour la détermination du plomb, cadmium, zinc, cuivre, fer et chrome par spectrométrie d'absorption atomique (AAS) après calcination à sec. Cette méthode s'applique à divers types de produits alimentaires dont les repas composés, les céréales, le poisson, les fruits, le foie et le lait.

2 REFERENCES

Norme NF EN 14082 Juin 2003 (cf annexe).

3 DEFINITIONS

4 PRINCIPE

Les échantillons sont calcinés à sec à 450 °C. Les cendres sont reprises avec de l'acide chlorhydrique, puis la solution obtenue est complètement évaporée. Le résidu final est dissout à nouveau dans l'acide nitrique et la teneur en minéraux est déterminée par les techniques de la spectrométrie d'absorption atomique (AAS).

5 REACTIFS

Cf annexe

6 APPAREILLAGE

Cf annexe

7 PROCÉDURE

Cf annexe

Détermination du plomb, cadmium, zinc, cuivre, fer et chrome par spectrométrie d'absorption atomique (AAS) après calcination à sec

SOP : Nutri-Cere-004-fr

Date: 19/1/2012

Version : 1

8 EXPRESSION DES RÉSULTATS

8.1 Mode de calcul et formules

Cf annexe

8.2 Répétabilité

La différence acceptable entre deux déterminations réalisées simultanément par le même analyste pour un échantillon ne devra pas excéder une valeur limite spécifiée dans le tableau 3 de la norme

9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

- Augmenter la température du four de façon progressive jusqu'à 450 °C,
- Utiliser les solutions-étalons certifiées. Sinon, bien s'appliquer pour leur préparation
- Assurer la linéarité de la courbe de calibration entre 0 et 1 (valeur d'extinction) ; sinon, il diluer les standard ou les échantillons
- Utiliser la verrerie propre

10 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

Le rapport d'essai doit inclure tous les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon.

11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	Personne responsable	Description de la modification

**Détermination du plomb, cadmium, zinc, cuivre, fer et chrome par spectrométrie
d'absorption atomique (AAS) après calcination à sec**



SOP : Nutri-Cere-004-fr

Date: **19/1/2012**

Version : **1**

12 ANNEXE

La Norme NF EN 14082 Juin 2003 sera annexé à ce document

	<u>African Food Tradition rEvisited by Research</u> <u>FP7 n°245025</u>	
Deliverable D.1.2.3.11: SOP for Biochemical and nutritional analysis for Group 1		
Determination of lead, cadmium, zinc, copper, iron and chromium by atomic absorption spectrometry (AAS) after dry ash		
SOP: Nutri-Cere-004-en		
Date: 01/06/2011	Release: 1	
<p>Written by : Noël AKISSOE</p> <p>For information on this SOP please contact :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Christian MESTRES (christian.mestres@cirad.fr) / WP2 Leader • Noël AKISSOE (noel.akis@yahoo.fr) • 		
This document has been approved by :		
Partner	Name of the person who approved	Date DD/MM/YY
CIRAD	Christian MESTRES	19/01/2012
UAC	Noël AKISSOE	1/06/2011
CSIR		
FAAU		
ESB		
FRI		
NRC		

Determination of lead, cadmium, zinc, copper, iron and chromium by atomic absorption spectrometry (AAS) after dry ash

SOP: Nutri-Cere-004-en

Date: 01/06/2011

Release: 1

Table of contents

1	Scope and application	3
2	References	3
3	Définitions	3
4	Principle	3
5	Reagents	3
6	Apparatus.....	3
7	Procedure.....	3
8	Expression of résultats.....	4
8.1	Method of calculation and formulae	4
8.2	Repeatability.....	4
9	Critical points or Note on the procedure.....	4
10	Test report	4
11	Revision record.....	4
12	Appendix.....	5

Determination of lead, cadmium, zinc, copper, iron and chromium by atomic absorption spectrometry (AAS) after dry ash

SOP: **Nutri-Cere-004-en**

Date: **01/06/2011**

Release: **1**

1 SCOPE AND APPLICATION

This document describes a routine reference method for the determination of lead, cadmium, zinc, copper, iron and chromium content by atomic absorption spectrometry (AAS) after dry ashing. The method is applicable to many foodstuffs such as composed meals, cereals and cereal-based products, fish, fruits, liver and milk.

2 REFERENCES

Standard NF EN 14082 June 2003 (cf appendix).

3 DEFINITIONS

4 PRINCIPLE

Samples are burned to ashes at 450°C. The ashes are recaptured/collected using chlorhydric acid, and then the solution is evaporated. The resulted residue is dissolved in nitric acid; then, the minerals' contents were determined by the techniques of atomic absorption spectrometry (AAS)

5 REAGENTS

See appendix

6 APPARATUS

See appendix

7 PROCEDURE

See appendix

Determination of lead, cadmium, zinc, copper, iron and chromium by atomic absorption spectrometry (AAS) after dry ash

SOP: Nutri-Cere-004-en

Date: 01/06/2011

Release: 1

8 EXPRESSION OF RESULTS

8.1 Method of calculation and formulae

See appendix

8.2 Repeatability

The acceptable difference between two determinations carried out simultaneously by the same analyst on the same sample shall not exceed value indicated in table 3 of the standard.

9 CRITICAL POINTS OR NOTE ON THE PROCEDURE

- It is necessary to increase temperature progressively during the ashing.
- It is important to use certified standard solutions, otherwise, they shall be prepared with many care.
- Be sure of the linearity of calibration curve between 0 and 1 (extinction value). If not, it is necessary to dilute the the standard solutions or the samples.
- Use very clean glassware

10 TEST REPORT

The test report shall indicate the method used and the results obtained. In addition, it shall mention all operating conditions not specified in the international procedure, or regarded as optional, as well as any circumstances that may have influenced the results.

The test report shall include all details necessary for the complete identification for the sample.

11 REVISION RECORD

Date	Responsible person	Description of change

Determination of lead, cadmium, zinc, copper, iron and chromium by atomic absorption spectrometry (AAS) after dry ash

SOP: Nutri-Cere-004-en

Date: **01/06/2011**

Release: **1**

12 APPENDIX

The text of Standard NF EN 14082 June 2003 will be annexed to this document



African Food Tradition rEvisited by Research

FP7 n°245025



Deliverable D.1.2.3.11: SOP for Biochemical and nutritional analysis for Group 1

Determination of Iron content in cereal fermented foods

SOP: Nutri-Cere-005-en

Date : **26/05/2011**

Release: **1**

Written by : Zahra AHMED

For information on this SOP please contact :

- Christian MESTRES (christian.mestres@cirad.fr) / WP2 Leader
- Zahra AHMED (zahra3010@hotmail.com) / NRC-Egypt.
-

This document has been approved by :

Partner	Name of the person who approved	Date DD/MM/YY
CIRAD	Christian MESTRES	06/05/2011
UAC	Noël AKISSOE	16/05/2011
CSIR		
FAAU		
ESB		
FRI		
NRC	Zahra AHMED	26/05/2011

Determination of iron content in cereal fermented foods

SOP: Nutri-Cere-005-en

Date 26/05/2011

Release: 1

Table of contents

1. Scope and application.....	3
2. References.....	3
3. Definitions	3
4. Principle.....	3
5. Reagents.....	3
Orthophenanthroline solution.....	3
Iron standard solution (10 µg Fe/ml).....	4
Hydroxylamine hydrochloride solution.	4
Acetate buffer solution.	4
Ashing aid	4
6. Apparatus	4
7. Procedure	5
8. Expression of results	6
Method of calculation and formulae	6
Repeatability.....	6
9. Critical points or Note on the procedure	6
10. Test report.....	7
11. Revision record	7
12. Appendix	7

Determination of iron content in cereal fermented foods

SOP: **Nutri-Cere-005-en**

Date **26/05/2011**

Release: **1**

1. SCOPE AND APPLICATION

This document describes a routine reference method for the determination of total iron content of cereals (raw and processed) using AACC International Method 40-41.03. This method determines iron content by reaction with orthophenanthroline and spectrophotometric measurement. It is applicable to cereals and cereal-based products.

2. REFERENCES

AACC International Method 40-41.03.

3. DEFINITIONS

For the purpose of this SOP the following definition applies:

- Ashing: the process of disintegrating organic constituents of food to produce oxides of inorganic elements (minerals). Dry ashing at high temperatures in a muffle furnace or wet ashing with concentrated acids and oxidizing agents are commonly used in mineral analyses.

4. PRINCIPLE

Organic constituents in a food sample are broken down by dry or wet ashing at a high temperature and the inorganic constituents are dissolved in a mildly acidic solution. Solubilized ferrous iron is then reacted with a chromogenic reagent, orthophenanthroline, in the presence of a reducing agent (such as hydroxylamine hydrochloride), resulting in a pink-colored complex. The concentration of iron is determined by its spectrophotometric absorbance at 510 nm.

The method used in this experiment detects iron by measuring the amount of light absorbed by the highly colored complex formed between iron (II) or ferrous ion (Fe^{2+}) in the sample and o-phenanthroline.

5. REAGENTS

Orthophenanthroline solution

Dissolve 0.1 g o-phenanthroline in about 80 ml water at 80°C, cool, and dilute to 100 ml. Store in amber bottle in refrigerator for up to several weeks.)

Determination of iron content in cereal fermented foods

SOP: Nutri-Cere-005-en

Date **26/05/2011**

Release: **1**

Iron standard solution (10 µg Fe/ml)

- a) Dissolve 0.1 g analytical grade Fe wire in 20 ml HCl and 50 ml water, and dilute to 1 liter. Dilute 100 ml of this solution to 1 liter; or
- b) dissolve 3.512 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in water, add 2 drops HCl, and dilute to 500 ml. Dilute 10 ml of this solution to 1 liter.

Hydroxylamine hydrochloride solution.

Dissolve 10 g $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ in water and dilute to 100 ml. Store in amber bottle in refrigerator. (This solution is stable for several weeks.)

Acetate buffer solution.

Dissolve 8.3 g anhydrous sodium acetate (previously dried at 100°C) in water, add 12 ml acetic acid, and dilute to 100 ml.

It may be necessary to redistill acetic acid and purify sodium acetate by recrystallization from water, depending on amount of Fe present.

Ashing aid

- a. Magnesium nitrate solution. Dissolve 50 g $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in water and dilute to 100 ml or
- b. Redistilled HNO_3 .

6. APPARATUS

- Muffle furnace capable of maintaining 550°C.
- Platinum, silica, or porcelain crucible, approximately 60 mm diameter, 35 ml capacity.
- Spectrophotometer or colorimeter.
- Eppendorf pipettes
- Analytical balance
- Vortex mixer
- Hot plate

Determination of iron content in cereal fermented foods

SOP: Nutri-Cere-005-en

Date **26/05/2011**

Release: **1**

7. PROCEDURE

Preparation of iron standards solutions

- Place aliquots of 10 µg/ml standard solution according to table below into 100 ml volumetric flasks, add 2 ml concentrated HCl to each, and dilute to volume.

<i>Aliquot of 10 µg/ml solution taken (ml)</i>	<i>Final Fe Concentration (ppm)</i>
0	0
2	0.2
5	0.5
10	1.0
15	1.5
20	2.0
25	2.5
30	3.0
35	3.5
40	4.0
45	4.5

- Mix thoroughly by inverting flask 10–20 times. Using 10 ml of each of these standard solutions, continue under procedure beginning with step 8.

Procedure

- Accurately weigh 2–10 g of sample (depending on concentration of iron expected) into clean crucible. (Begin to prepare blank solution at this point in same manner as sample.)
- Char on hot plate or under infrared lamp (optional).
- Ash overnight in muffle furnace at $\leq 550^{\circ}\text{C}$. See Note.
- Remove crucible from furnace and cool to room temperature.
- Carefully add 5 ml concentrated HCl, letting acid rinse upper portion of crucible; evaporate to dryness on steam bath.
- Dissolve residue by adding 2 ml concentrated HCl, accurately measured; cover with watch glass and heat 5 min on steam bath.
- Rinse watch glass with water, filter quantitatively into 100-ml volumetric flask, dilute to volume, and mix thoroughly.
- Pipet 10-ml aliquot into 25-ml volumetric flask, and add 1 ml hydroxylamine HCl solution. Mix thoroughly.
- After 5 min, add 5 ml buffer solution and 1 ml o-phenanthroline; dilute to volume. Mix thoroughly.

Determination of iron content in cereal fermented foods

SOP: Nutri-Cere-005-en

Date **26/05/2011**

Release: **1**

- Let stand 30 min, then measure absorbance of samples, standards, and blank solutions in spectrophotometer at 510 nm. Note:
 - a. If color intensity is too great, make appropriate dilution of ash solution and continue beginning at step 8.
 - b. Color produced is permanent for several hours. Keep out of direct sunlight.

8. EXPRESSION OF RESULTS

Method of calculation and formulae

- Plot absorbance versus concentration (in ppm) for standard solutions.
- Obtain concentration of sample solutions from standard curve, subtracting blank value from each.

$$\text{Iron content (mg/100 g)} = \frac{C \times DF \times 10}{W}$$

Where: C = concentration of sample solution (in ppm),

DF = dilution factor (if any) from step 10,

W = sample weight in grams.

Repeatability

If the coefficient of variation (standard deviation over mean value) between duplications performed in short time interval exceed 5%, rerun the analysis.

9. CRITICAL POINTS OR NOTE ON THE PROCEDURE

- Do not use flat-bottom ashing dishes greater diameter than 60 mm.
- To diminish ashing time, or for samples that do not burn practically carbon free, use one of the following ashing aids:
 - a. 0.5–1.0 ml magnesium nitrate solution *or*
 - b. Redistilled HNO₃. Dry contents and carefully ignite in muffle to prevent spattering. (A white ash with no carbon results in most cases.)
- Do not add these ashing aids to self-rising flour (products containing NaCl) in platinum dish, because of vigorous action on dish.
- All glassware must be soaked in dilute nitric or hydrochloric acid, thoroughly rinsed with deionized distilled water, and dried in an oven.
- All reagents must be of analytical grade suited for mineral analyses and must be stored in the refrigerator.

Determination of iron content in cereal fermented foods

SOP: **Nutri-Cere-005-en**

Date **26/05/2011**

Release: **1**

10. TEST REPORT

The test report shall indicate the method used and the results obtained. In addition, it shall mention all operating conditions not specified in the international procedure, or regarded as optional, as well as any circumstances that may have influenced the results. The test report shall include all details necessary for the complete identification for the sample.

11. REVISION RECORD

Date	Responsible person	Description of change
06/05/2011	Christian MESTRES	Edition
26/05/2011	Zahra SALEH	Repeatability

12. APPENDIX

Text of AACC International Method 40-41.03.

Iron—Spectrophotometric Method

Final approval May 5, 1960; Reapproval November 3, 1999

Objective

This method determines iron content by reaction with orthophenanthroline and spectrophotometric measurement. It is applicable to cereals and cereal-based products.

Apparatus

1. Muffle furnace capable of maintaining 550°.
2. Platinum, silica, or porcelain crucible, approximately 60-mm diameter, 35-ml capacity. Porcelain evaporating dishes of about 25-ml capacity are satisfactory. Do not use flat-bottom dishes of greater diameter than 60 mm.
3. Spectrophotometer or colorimeter.

Reagents

1. Orthophenanthroline solution. Dissolve 0.1 g *o*-phenanthroline in about 80 ml water at 80°, cool, and dilute to 100 ml. Store in amber bottle in refrigerator for up to several weeks.)

2. Iron standard solution, 10 µg Fe/ml. a) Dissolve 0.1 g analytical grade Fe wire in 20 ml HCl and 50 ml water, and dilute to 1 liter. Dilute 100 ml of this solution to 1 liter; *or* b) dissolve 3.512 g Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O in water, add 2 drops HCl, and dilute to 500 ml. Dilute 10 ml of this solution to 1 liter.

3. Hydroxylamine hydrochloride solution. Dissolve 10 g NH₂OH·HCl in water and dilute to 100 ml. Store in amber bottle in refrigerator. (This solution is stable for several weeks.)

4. Acetate buffer solution. Dissolve 8.3 g anhydrous sodium acetate (previously dried at 100°) in water, add 12 ml acetic acid, and dilute to 100 ml. (It may be necessary to redistill acetic acid and purify sodium acetate by recrystallization from water, depending on amount of Fe present.)

5. Prepare working standards as follows: Place aliquots of 10 µg/ml standard solution according to table below into 100-ml volumetric flasks, add 2 ml concentrated HCl to each, and dilute to volume.

<i>Aliquot of 10 µg/ml solution taken (ml)</i>	<i>Final Fe Concentra- tion (ppm)</i>	<i>Aliquot of 10 µg/ml solution taken (ml)</i>	<i>Final Fe Concentra- tion (ppm)</i>
0	0	25	2.5
2	0.2	30	3.0
5	0.5	35	3.5
10	1.0	40	4.0
15	1.5	45	4.5
20	2.0		

Mix thoroughly by inverting flask 10–20 times. Using 10 ml of each of these standard solutions, continue under procedure beginning with step 8.

Iron—Spectrophotometric Method (continued)

6. Ashing aid

- a. Magnesium nitrate solution. Dissolve 50 g $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in water and dilute to 100 ml *or*
- b. Redistilled HNO_3 .

Procedure

1. Accurately weigh 2–10 g of sample (depending on concentration of iron expected) into clean crucible. (Begin to prepare blank solution at this point in same manner as sample.)

2. Char on hot plate or under infrared lamp (optional).

3. Ash overnight in muffle furnace at $\leq 550^\circ$. See Note.

4. Remove crucible from furnace and cool to room temperature.

5. Carefully add 5 ml concentrated HCl, letting acid rinse upper portion of crucible; evaporate to dryness on steam bath.

6. Dissolve residue by adding 2 ml concentrated HCl, accurately measured; cover with watch glass and heat 5 min on steam bath.

7. Rinse watch glass with water, filter quantitatively into 100-ml volumetric flask, dilute to volume, and mix thoroughly.

8. Pipet 10-ml aliquot into 25-ml volumetric flask, and add 1 ml hydroxylamine HCl solution. Mix thoroughly.

9. After 5 min, add 5 ml buffer solution and 1 ml *o*-phenanthroline; dilute to volume. Mix thoroughly.

10. Let stand 30 min, then measure absorbance of samples, standards, and blank solutions in spectrophotometer at 510 nm. Note:

- a. If color intensity is too great, make appropriate dilution of ash solution and continue beginning at step 8.
- b. Color produced is permanent for several hours. Keep out of direct sunlight.

Calculation

1. Plot absorbance versus concentration (in ppm) for standard solutions.

2. Obtain concentration of sample solutions from standard curve, subtracting blank value from each.

3. Iron content (mg/100 g) =
$$\frac{C \times DF \times 10}{W}$$

where C = concentration of sample solution (in ppm), DF = dilution factor (if any) from step 10, note a, W = sample weight in grams.

Note

To diminish ashing time, or for samples that do not burn practically carbon-free, use one of the following ashing aids: Moisten ash with a) 0.5–1.0 ml magne-

Iron—Spectrophotometric Method (continued)

sium nitrate solution *or* b) redistilled HNO₃. Dry contents and carefully ignite in muffle to prevent spattering. (A white ash with no carbon results in most cases.) Do not add these ashing aids to self-rising flour (products containing NaCl) in platinum dish, because of vigorous action on dish.

References

1. Andrews, J. S., and Felt, C. 1941. The iron content of cereals. *Cereal Chem.* 18:819.
2. AOAC International. 1998. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th ed., 4th rev. Method 944.02. The Association, Gaithersburg, MD.
3. Howe, M. 1944. Report of the 1943–44 methods of analysis subcommittee on the determination of iron in cereal products. *Cereal Chem.* 21:412.



African Food Tradition rEvisited by Research

FP7 n°245025



Deliverable D.1.2.3.11: SOP for Biochemical and nutritional analysis for Group 1

**Procédure pour la détermination des acides aminés totaux dans les produits
céréaliers fermentés**

SOP : Nutri-Cere-003-fr

Date : **18/08/2011**

Version: **1**

Ecrit par : Gilles MOREL

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Christian MESTRES (christian.mestres@cirad.fr) / WP2 Leader
- ...
-

Ce document a été approuvé par :

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD	Christian MESTRES	18/08/2011
UAC		
CSIR		
FAAU		
ESB		
FRI		
NRC		

Procédure pour la détermination des acides aminés totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-Cere-003.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

Table des matières

1	Domaine et application	3
2	Références	3
3	Définitions	3
4	Principe	3
5	Réactifs et consommables	4
6	Appareillage	4
7	Procédure	4
7.1	Pesée et dégazage	4
7.2	Hydrolyse des protéines.....	5
7.3	Dosage des acides aminés totaux	6
8	Expression des résultats	6
8.1	Mode de calcul et formules	6
8.2	Répétabilité.....	6
9	Points critiques et Note sur la procédure.....	6
10	Rapport d'essai	6
11	Enregistrement des Révisions	7
12	Annexe.....	7

Procédure pour la détermination des acides aminés totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-Cere-003.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

1 DOMAINE ET APPLICATION

Cette procédure vise à la détermination des teneurs en acides aminés libres dans les produits végétaux secs, et en particulier les produits céréaliers fermentés.

2 REFERENCES

SOP : Nuri-Cere-002.FR

3 DEFINITIONS

Lorsque les acides aminés ne sont pas liés ensemble comme peptides ou comme protéines, ils sont appelés "forme libre" ou "acides aminés "libre"

4 PRINCIPE

Les protéines sont hydrolysées à l'aide d'acide Méthane sulfoxide 4N à 150°C pendant 2h. Ce protocole d'hydrolyse est rapide, facile à mettre en œuvre et protège certains acides aminés.

A noter que :

- L'Asparagine et la Glutamine ne peuvent pas être quantifiés tels quels car pendant l'hydrolyse ils sont respectivement convertis en Acide Aspartique et en Acide Glutamique (Ozols, 1990). De même, la Cystéine est oxydée en cystine lors d'une hydrolyse acide : 2 moles de Cystéine sont oxydées en 1 mole de Cystine. C'est donc la Cystine qui sera dosée.
- Certains acides aminés sont très labiles : tyrosine (Blackburn,1976; Chiou, 1988; Ozols, 1990), sérine et thréonine. Ils sont détruits pendant une incubation prolongée (Chiou, 1988)
- Certains acides aminés sont difficilement quantifiables car certaines liaisons sont difficiles à hydrolyser : ILE-ILE, VAL-VAL, VAL-ILE (Ozols, 1990 ; Fountoulakis, 1998). Une hydrolyse prolongée de 48 à 72h à 110°C (Fountoulakis, 1998) ou de 4h à 160°C (Chiou, 1988) peut être nécessaire pour hydrolyser totalement ces liaisons
- La présence de métaux, de sels peuvent affecter la quantification de certains acides aminés (Blackburn, 1978 ; Ozols, 1990).
- Le Tryptophane est souvent totalement détruit et demande un protocole particulier.

L'hydrolysate est analysé par HPLC en utilisant une résine d'échange cationique et une détection après réaction à la ninhydrine (cf SOP : Nuri-Cere-002-fr).

Procédure pour la détermination des acides aminés totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-Cere-003.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

5 REACTIFS ET CONSOMMABLES

- Tampon de dilution Citrate de sodium pH 2.2
- Solution de NaOH à 4N (conservée à température ambiante) : 16.3 g de NaOH en pastilles /100 ml d'ED
- Acide méthane sulfonique AMS 4M SIGMA (ref M-4141 : 10x2mL, MM=96.10g/mol, d=1.48g/ml) ;
- Solution de Norleucine (Merck, M = 131.18g/mole). Peser précisément environ 0.015 g, Ajouter V ml de HCl 0.1N avec $V = \frac{m}{d}$ (mpesée/3.279)

6 APPAREILLAGE

- Système de dégazage avec vanne de commutation (azote/vide)
- Tubes à hydrolyse en verre (diamètre 1 cm, hauteur 10 cm), avec évent de dégazage et bouchon à vis teflon (Figure 1)
- Bloc chauffant, exemple : Reacti Therm Heating Module (PIERCE, ref 18790)
- Balance de précision (0.01 mg)

Figure 1. Tube d'hydrolyse



7 PROCÉDURE

7.1 Pesée et dégazage

Peser une masse d'échantillon correspondant à 6 à 9 mg environ de protéines (environ 15mg d'échantillon si cette information est manquante). L'introduire dans un tube à hydrolyse (penser à utiliser les entonnoirs adéquats)

Dans ce tube à hydrolyse, ajouter :

- 50 μ l de Norleucine (standard Interne) à 25 μ mole/ml.
- 450 μ l AMS 4N.

Visser le bouchon du tube à hydrolyse.

Chaque prise d'essai doit être dégazée immédiatement après sa préparation. Connecter le tuyau de la trompe à vide au système de dégazage (Figure 2) et ouvrir le robinet d'eau au maximum. Mettre le robinet du système de dégazage sur la position azote, ouvrir la bouteille d'azote et régler la pression de l'azote à 1 bar

Procédure pour la détermination des acides aminés totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-Cere-003.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

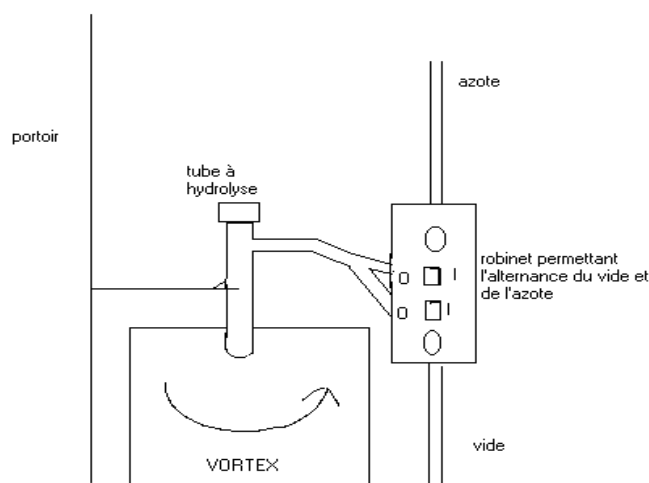


Figure 2 : Montage du système de dégazage de l'hydrolysats

Brancher le tube à hydrolyse, ouvrir légèrement le bouchon du tube tout en vortexant doucement (bouton sur 3/4), régler le robinet du système de dégazage en alternance azote et vide plusieurs fois successivement.

Revisser complètement le bouchon du tube à hydrolyse lorsqu'il est sous azote et déconnecter le tuyau

7.2 Hydrolyse des protéines

Allumer le bloc chauffant, réglé à 150°C, au minimum 30 minutes avant utilisation

Les tubes dégazés sont placés dans le bloc chauffant pendant 120 min.

Après hydrolyse, sortir les tubes et les laisser refroidir 5 min à température ambiante

Ajouter 450µl de NaOH 4N pour arrêter la réaction.

Le milieu réactionnel est ensuite prélevé avec une pipette Pasteur et placé dans une fiole jaugée de 5 ml. Le tube est rincé 3 fois avec le tampon de dilution (Citrate de sodium pH 2,2). Le volume de la fiole est ajusté à 5 ml avec ce tampon.

L'extrait est filtré à l'aide de filtre seringue (diamètre de pore 0.45 µm)

Procédure pour la détermination des acides aminés totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-Cere-003.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

7.3 Dosage des acides aminés totaux

Les échantillons sont placés dans des vials de 1,5 ml, bouchés hermétiquement et disposés en attente dans le passeur (réfrigéré à 4°C).

20 µl sont injectés et élués selon un diagramme d'élution qui dure 95 minutes (cf SOP : Nutri-Cere-002-fr). Préparer comme indiqué dans ce SOP les solutions de standard.

8 EXPRESSION DES RÉSULTATS

8.1 Mode de calcul et formules

Les acides aminés sont repérés par leur temps de rétention, et les calculs effectués à partir des aires mesurés à 570 nm pour tous les acides aminés, à l'exception de la proline ou la détection est réalisée à 440 nm (cf SOP : Nutri-Cere-002-fr).

Les teneurs en acides aminés sont directement calculés par le rapport d'aire de l'acide aminé détecté sur celui de l'étalon interne. Ils sont exprimés en g pour 100 g (base sèche)

8.2 Répétabilité

La différence acceptable entre deux déterminations réalisées simultanément par le même analyste pour un échantillon ne devra pas excéder une valeur de 5% (coefficient de variation).

9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

- La durée d'hydrolyse doit être scrupuleusement respectée, et le dégazage réalisé rapidement après préparation de l'échantillon.
- Re-préparer l'ensemble des étalons pour chaque nouvelle solution de norleucine
- Vérifier l'intégration (automatique) ; reprendre le calcul « manuellement » pour les pics mal calculés (problème souvent lié à la ligne de base).

10 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

Le rapport d'essai doit inclure tous les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon.

Procédure pour la détermination des acides aminés totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-Cere-003.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	Personne responsable	Description de la modification
18/08/2011	MESTRES Christian	Edition

12 ANNEXE



African Food Tradition rEvisited by Research

FP7 n°245025



Deliverable D.1.2.3.11: SOP for Biochemical and nutritional analysis for Group 1

**Procédure pour la détermination des acides aminés libres dans les produits
céréaliers fermentés**

SOP : Nutri-Cere-002-fr

Date : **18/08/201**

Version: **1**

Ecrit par : Gilles MOREL

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Christian MESTRES (christian.mestres@cirad.fr) / WP2 Leader
- ...
-

Ce document a été approuvé par :

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD	Christian MESTRES	18/08/2011
UAC		
CSIR		
FAAU		
ESB		
FRI		
NRC		

Procédure pour la détermination des acides aminés libres dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-Cere-002.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

Table des matières

1	Domaine et application	3
2	Références	3
3	Définitions	3
4	Principe	3
5	Réactifs	4
5.1	Consommables et réactifs pour l'analyseur (Biochrom, 30+).....	4
5.2	Acides aminés	4
6	Appareillage	5
7	Procédure	5
7.1	Extraction des acides amines libres	5
7.2	Dosage	6
8	Expression des résultats	6
8.1	Mode de calcul et formules	6
8.2	Répétabilité.....	7
9	Points critiques et Note sur la procedure.....	7
10	Rapport d'essai	8
11	Enregistrement des Révisions	8
12	Annexe.....	8

Procédure pour la détermination des acides aminés libres dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-Cere-002.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

1 DOMAINE ET APPLICATION

Cette procédure vise à la détermination des teneurs en acides aminés libres dans les produits végétaux secs, et en particulier les produits céréaliers fermentés.

2 REFERENCES

3 DEFINITIONS

Lorsque les acides aminés ne sont pas liés ensemble comme peptides ou comme protéines, ils sont appelés "forme libre" ou "acides aminés "libre"

4 PRINCIPE

Les acides aminés libres sont extraits par un tampon citrate (pH 2.2) en présence d'un standard interne (norleucine).

Ils sont analysés par HPLC en utilisant une résine d'échange cationique. Des tampons de différents pH ainsi qu'un gradient de température (four à effet Peltier) permettent de séparer les différents acides aminés.

L'éluant de colonne est mélangé à du réactif de ninhydrine passant par un serpentin chauffé à haute température formant avec les acides aminés une coloration directement proportionnelle à la quantité d'acides aminés.

Le mélange éluât/ninhydrine passe ensuite dans le photomètre. L'absorption lumineuse est mesurée à deux longueurs d'onde 570 et 440 nm (proline).

Après chaque analyse, la colonne est régénérée par une base forte puis équilibrée avec le tampon de départ avant une prochaine analyse. La séquence d'analyse dure plus de 90 minutes.

La détection limite est de 9 pico moles/l d'acide aminé.

Procédure pour la détermination des acides aminés libres dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-Cere-002.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

5 REACTIFS

5.1 Consommables et réactifs pour l'analyseur (Biochrom, 30+)

- Tampon Citrate de sodium (0,2 M) pH 2.65
- Tampon Citrate de sodium (0,2 M) pH 3.35
- Tampon Citrate de sodium (0,2 M) pH 4.25
- Tampon Borate/ Citrate de sodium (0,5 M) pH 8.6
- Sodium hydroxyde (0,4 M) pH 14
- Tampon de dilution Citrate de sodium pH 2.2
- Réactif Ultra Ninhydrine

Attention : toujours porter des lunettes de sécurité et des gants protecteurs pour manipuler ces produits chimiques.

Les déchets produits par l'analyseur d'acides aminés sont classés comme nocifs et doivent être traités comme tels.

5.2 Acides aminés

- Acides Aminés Standard (Sigma AA-S18) : contient 18 acides aminés à 2.5 μ moles/ml, exceptée la L-Cystine à 1.25 μ mole/ml

7 autres acides aminés seront ajoutés (cette liste n'est pas exhaustive). Pour plus de confort de pesée ces solutions seront effectuées à 25 μ moles/ml :

- Solution d'Acide Cystéique (Fluka 30170, M = 112.76 g/mole). Peser précisément environ 0.015 g, Ajouter V ml de HCl 0.1N avec $V = (\text{mpesée}/2.819)$
- Solution de Methionine Sulfoxide (Aldrich 64430, M = 165.21 g/mole). Peser précisément environ 0.015 g, Ajouter V ml de HCl 0.1N avec $V = (\text{mpesée}/4.13)$
- Solution de Methionine Sulfone (Aldrich 64410 M, = 181.21.g/mole). Peser précisément environ 0.015 g, Ajouter V ml de HCl 0.1N avec $V = (\text{mpesée}/4.53)$
- Solution d'Asparagine (Sigma A-0884, M = 132.1. g/mole). Peser précisément environ 0.015 g, Ajouter V ml de HCl 0.1N avec $V = (\text{mpesée}/3.30)$
- Solution de Norleucine (Merck, M = 131.18g/mole). Peser précisément environ 0.015 g, Ajouter V ml de HCl 0.1N avec $V = (\text{mpesée}/3.279)$
- Solution d'Acide γ -Aminobutyrique (Sigma A 2129, M = 103.12 g/mole). Peser précisément environ 0.015 g, Ajouter V ml de HCl 0.1N avec $V = (\text{mpesée}/2.578)$
- Solution de Tryptophane (Sigma T0254, M = 204.23 g/mole). Peser précisément environ 0.015 g, Ajouter V ml de HCl 0.1N avec $V = (\text{mpesée}/5.106)$

Procédure pour la détermination des acides aminés libres dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-Cere-002.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

- Solution d'Ornitine (Sigma O-2375, M = 168.62 g/mole). Peser précisément environ 0.015 g, Ajouter V ml de HCl 0.1N avec $V = (\text{mpesée} / 4.215)$
- Solution HCl à 0.1 N (solubilisation des acides aminés) : 1.65 ml de HCl 37% (pur, 12 N) qsp 200ml d'eau qualité HPLC

Pour préparer une solution de standard d'acide aminés à 0.25µmole/ml. Dans une fiole jaugée de 5 ml, placer :

- 500 µl du Standard AAS-18
- 50µl de chaque acide aminé à 25 µmole/ml
- qsp 5 ml avec Tampon de dilution Citrate de sodium pH 2.2.

6 APPAREILLAGE

Analyseur d'acides aminés Biochrom 30 +, équipé d'une colonne Na+

Balance de précision (0.01 mg)

7 PROCÉDURE

7.1 Extraction des acides amines libres

- Dans un tube à hémolyse, peser environ exactement 200 mg de matériel à analyser (poudre broyée, lyophilisat)
- Ajouter 50 µL de solution de Norleucine (à 25 µmoles/ml)
- Ajouter 4950 µl de Tampon de dilution Citrate de sodium pH 2.2
- Boucher hermétiquement, disperser au Vortex, puis par renversement pendant 60mn (roue d'extraction)
- Filtrer avec un filtre seringue 0.45 µm (filtre en Acétate de cellulose, Minisart NML, ref : 16555Q)
- Doser directement cette solution, ou conserver au congélateur (-20°C).

Procédure pour la détermination des acides aminés libres dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-Cere-002.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

7.2 Dosage

Les échantillons sont placés dans des vials de 1,5 ml, bouchés hermétiquement et disposés en attente dans le passeur (réfrigéré à 4°C).

20 µl sont injectés et élués selon un diagramme d'éluion qui dure 95 minutes.

8 EXPRESSION DES RÉSULTATS

8.1 Mode de calcul et formules

Les acides aminés sont repérés par leur temps de rétention, et les calculs effectués à partir des aires mesurés à 570 nm (Figure 1a) pour tous les acides aminés, à l'exception de la proline ou la détection est réalisée à 440 nm (Figure 1b).

1-Cysteic Acid	2-Met sulphoxide 1	3-Met sulphoxide 2	4-Met sulphone
5Aspartic acid	6-Threonine	7-Asparagine	8-Serine
9-Glutamique acid	10-Glycine	11-Alanine	12-Cysteine
13-Valine	14-Methionine	15Isoleucine	16Leucine
17-Norleucine ISTD	18-Tyrosine	19-Phenylalanine	20-Gaba (γAminobutyrique)
21-Histidine	22-tryptophane	23-Ornitine	24-Lysine
25-Ammonium Cl	26-Arginine		

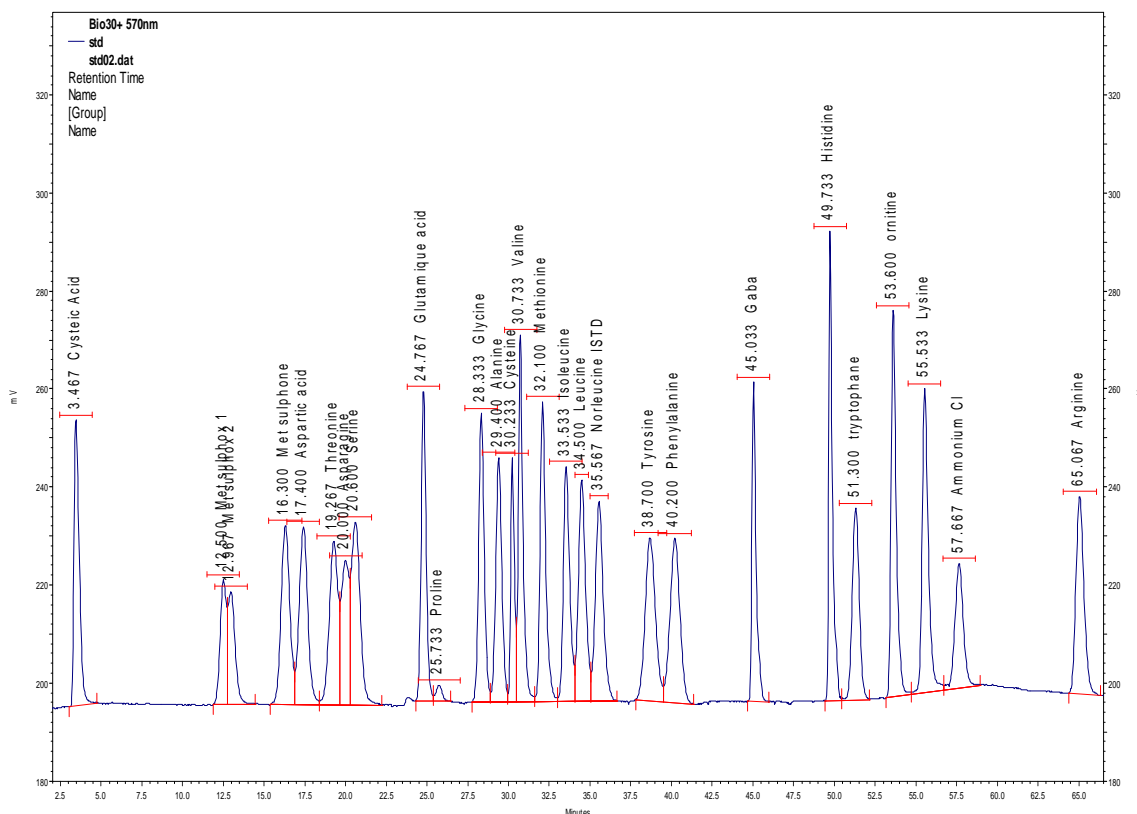


Figure 1a. Liste des standards, classés par ordre d'éluion, et chromatogramme à 570 nm

Procédure pour la détermination des acides aminés libres dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-Cere-002.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

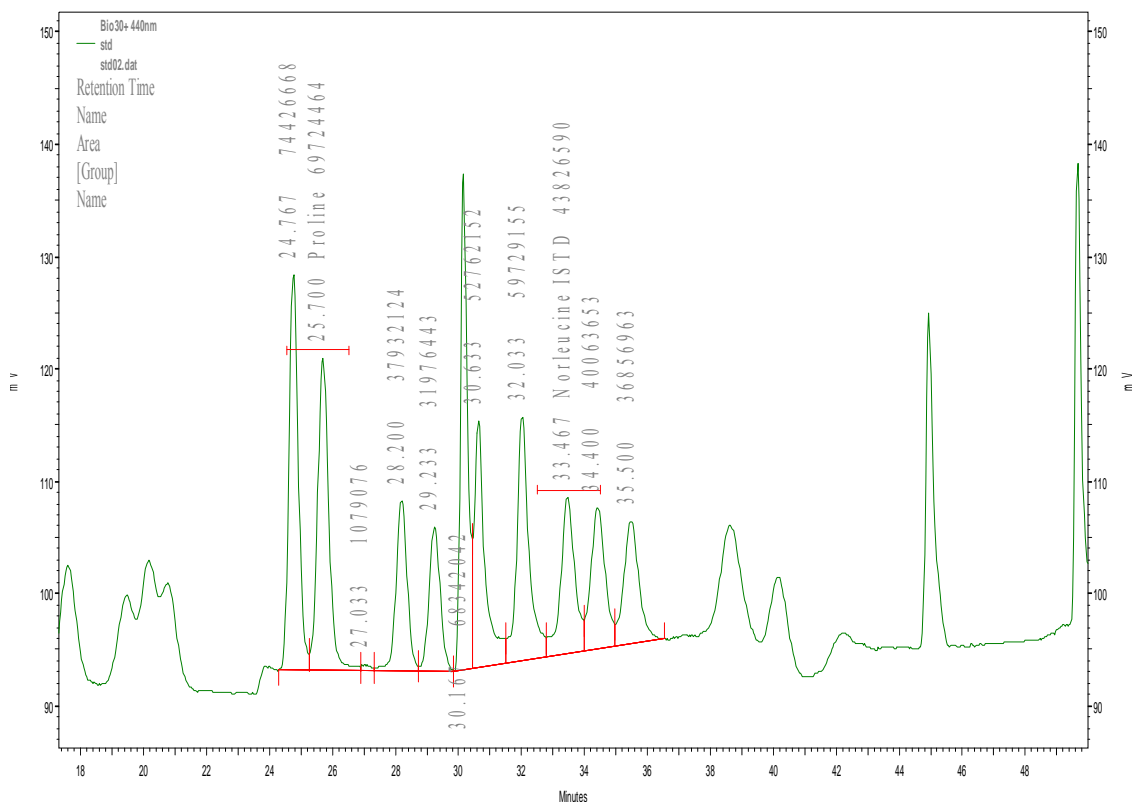


Figure 1b. Chromatogramme des standards à 440 nm

Les teneurs en acides aminés sont directement calculés par le rapport d'aire de l'acide aminé détecté sur celui de l'étalon interne. Ils sont exprimés en g pour 100 g (base sèche)

8.2 Répétabilité

La différence acceptable entre deux déterminations réalisées simultanément par le même analyste pour un échantillon ne devra pas excéder une valeur de 8% (coefficient de variation)

9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

- Re-préparer l'ensemble des étalons pour chaque nouvelle solution de norleucine
- Ne pas laisser les échantillons à 4°C au-delà de quelques jours (< 5).
- Vérifier l'intégration (automatique) ; reprendre le calcul « manuellement » pour les pics mal calculés (problème souvent lié à la ligne de base).

Procédure pour la détermination des acides aminés libres dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Nutri-Cere-002.fr

Date: 18/08/2011

Version : 1

10 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

Le rapport d'essai doit inclure tous les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon.

11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	Personne responsable	Description de la modification
18/08/2011	MESTRES Christian	Edition

12 ANNEXE



**African Food Tradition rEvisited by
Research
FP7 n°245025**



Deliverable D.1.2.3.11: SOP for Biochemical and nutritional analysis for Group 1

DETERMINATION OF PHOSPHORUS IN FERMENTED CEREAL FOODS

SOP: Nutri-Cere-006-en

Date : **19/01/2012**

Release : **1**

Written by : Hayford Ofori & Wisdom Amoa-Awua

For information on this SOP please contact :

- Wisdom Amoa-Awua(wisamoa@gmail.com)
- ...
-

This document has been approved by :

Partners	Name of the person who approved	Date DD/MM/YY
CIRAD	Christian MESTRES	19/01/2012
UAC		
CSIR		
FAAU		
ESB		
FRI	Wis AMOA	19/01/2012
NRC		

Table of contents

1	Scope and application	3
2	References	3
3	Définitions	3
4	Principe	3
5	Reagents	3
6	Apparatus.....	4
7	Procedure.....	4
8	Expression of résultats.....	5
8.1	Method of calculation and formulae	5
8.1	Repeatability.....	5
9	Critical points or Note on the procedure.....	5
10	Test report	5
11	Revision record.....	6
12	Appendix.....	6

1 SCOPE AND APPLICATION

This document specifies a routine reference method for the determination of Phosphorus in portion of ash solution. It is applicable to the analysis of maize and sorghum products.

2 REFERENCES

Ronald S.Kirk, Ronald Sawyer, "Pearson's composition and analysis of food", Ed 9,1991. pp 36-38

3 DEFINITIONS

Phosphorus is after calcium the most abundant mineral element in the body. It is found in bones, teeth and cellular fluids. It is used in the liberation and utilization of energy in animals and vegetables tissue therefore is widely distributed in all food (Ronald S.Kirk, Ronald Sawyer, "Pearson's composition and analysis of food", Ed 9,1991. pp 36-38

4 PRINCIPLE

Ash is prepared from a portion of the food sample by calcination then solubilized by hydrochloric acid.

Ammonium molybdate-sulphuric acid solution is added which will react with Phosphate to form Ammonium phosphomolybdate.

Then ascorbic acid is added to reduce Ammonium phosphomolybdate and blue colour of molybdenum blue which develop rapidly at the boiling point of the solution. The intensity of the blue colour is measured with a colorimeter.

5 REAGENTS

- Ammonium molybdate- sulphuric acid solution. Dissolve 10g of ammonium molybdate crystalline in about 70 ml of distilled water and dilute the solution to 100 ml. Carefully add 150 ml of conc. sulphuric acid to 150 ml distilled water mixing the solution during the addition. Cool the solution and add the ammonium molybdate solution carefully while mixing and allow the mixture to cool.
- Ascorbic acid crystal
- Phosphate stock solution : dissolve 87.86 mg of potassium dihydrogen phosphate (anhydrous). This solution is top up to 100 ml, and contains 200 micrograms or 0.2 mg of phosphorus in 1 ml and can be kept for a long time.

DETERMINATION OF PHOSPHORUS IN FERMENTED CEREAL FOODS

SOP: Nutri-Cere-006-en

Date: 19/01/2012

Release: 1

- Standard phosphate solution : 5 ml of phosphate stock solution is diluted to 100 ml with water.

6 APPARATUS

- Platinum Crucible
- Furnace
- Analytical balance (0.0001 g)
- Spatula
- Desiccator

7 PROCEDURE

Preparation of ash. Weigh accurately (0.0001 g) 4-5g of the food into a previously ignited, cooled and weighed crucible. For flour, milled rice and other milled cereals add a few drops of glycerol and mix. Heat gently over a Bunsen burner until the food is charred. Transfer the crucible to the muffle furnace at about 550°C and leave until a white or light grey ash is obtained.

Preparation of ash solution. To the crucible containing the ash add about 5ml of concentrated hydrochloric acid and boil the mixture for 5 minutes on a hot plate in a fume chamber, adding acid necessary to maintain the volume. Transfer to a beaker and wash the crucible into the beaker with distilled water. Adjust the volume to about 40 ml and boil for 10 minutes over a Bunsen burner. Cool, filter through glass wool into a 250 ml volumetric flask. Cool and make up to the volume.

Phosphorus analysis. 0.1-20 ml ash solution, which should contain 2 to 200 micrograms of phosphorus is pipetted in a 50 ml volumetric flask. Distilled water is added to make the volume up to 40 ml. 5ml of the ammonium molybdate –sulphuric acid solution is added. 0.1 g of crystalline ascorbic acid is added with a small spatula, and the neck of the flask is rinsed with a small volume of water. The solution is heated to about boiling point and boiled for 1 minute, and blue colour is developed rapidly. The solution is cooled and the volume is made up to 50ml. The optical density of the solution is measured at 655 nm. If the Coleman Colorimeter is used, the 12mm diameter cuvette and red filter 8-215 should be used. For the setting of the colorimeter a blank solution must be used, which contains all the reagents, including the acid used for dissolving of ash, except the food sample. In exactly the same way : 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15 and 20 ml of phosphate standard solution is treated and measured and the resulting calibration curve is used for the determination of the phosphorus in the sample solution. A graph of optical density is plotted against concentration.

8 EXPRESSION OF RESULTS

8.1 Method of calculation and formulae

$$\text{Percentage P content of original food} = \frac{A \times 250}{W \times V}$$

Where :A = mg P per 50 ml, W = weight of original food ashed (g), V= volume of ash solution (ml) diluted to 250 ml

8.1 Repeatability

Determination is made in duplicate, allowing a variance of $\pm 0.2\%$

$$\text{Variance} = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

where $x_i - \bar{x}$ = difference between duplicates and n is number of duplicates

9 CRITICAL POINTS OR NOTE ON THE PROCEDURE

- Do not open the furnace during ashing.
- Precautions to take when using and boiling hydrochloric and sulphuric acid solutions

10 TEST REPORT

The test report shall indicate the method used and the results obtained.

The test report shall include all details necessary for the complete identification for the sample.

DETERMINATION OF PHOSPHORUS IN FERMENTED CEREAL FOODS

SOP: Nutri-Cere-006-en

Date: 19/01/2012

Release: 1

11 REVISION RECORD

Date	Responsible person	Description of change

12 APPENDIX

Ronald S.Kirk, Ronald Sawyer, "Pearson's composition and analysis of food", Ed 9, 1991. pp 36-38

PHOSPHORUS

Phosphorus is after calcium the most abundant mineral element in the body. It is found in bones and teeth and in cellular fluids. It plays an essential function in the liberation and utilization of energy in animal and vegetable tissue and therefore is widely distributed in all food. The main sources in the diet are milk and milk products, bread and cereal products, meat and meat products and eggs. Phosphate content can be a useful index for estimating fruit and fruit juice content. The phosphorus content of fruit juices is given in Table 7.12. Phosphorus is used as orthophosphate or condensed phosphates as a food additive for various functional purposes in processed foods.

Phosphorus is readily determined in foods as orthophosphate by titrimetry or more usually by colorimetry. Lyons *et al.* (1985) have reported the determination of phosphorus in Kjeldahl digests using ICP-OES, and phosphate species should be readily determinable by ion chromatography. Hamence and Kunwordia (1974) have described a paper chromatographic procedure for the detection of orthophosphate, pyrophosphate and triphosphate. For polyphosphates in meat products, see Chapter 13.

Titrimetric methods

The precipitation of phosphate as a phosphomolybdate has been the basis of titrimetric procedures. In foodstuffs any metaphosphates or pyrophosphates must first be converted to orthophosphate by treatment with nitric acid. The method due to Wilson (1951) based on the precipitation of quinoline phosphomolybdate and

described in the seventh edition of this book and in the AOAC methods book, has largely replaced the ammonium phosphomolybdate method (Pearson, 1973). In both these methods the precipitate is collected and dissolved in a small known excess of alkali then back titrated with standard acid.

Colorimetric methods

VANADO-MOLYBDATE METHOD

Hanson (1950) introduced a simple colorimetric method for the determination of phosphate which is based on Mission's reaction. The acid solution containing orthophosphate is treated with an acid reagent containing molybdic acid and vanadic acid and a stable orange-yellow coloured complex of vanadimolybdiphosphoric acid (H_3PO_4 , VO_3 , 11MoO_3 , $n\text{H}_2\text{O}$) is formed. The maximum absorption is at 330 nm, but Donald *et al.* (1956) have reported that satisfactory results can be obtained in the region 420–480 nm, provided the light is monochromatic. The colour development is not markedly affected by the presence of hydrochloric, sulphuric, acetic or citric acid or by fluorides provided they are not present in relatively large quantities. This rapid and trouble free method has been widely introduced and is official in the Feeding Stuffs (Sampling and Analysis) Regulations 1982: SI No. 1144.

REAGENTS

Vanadate-molybdate composite reagents. Dissolve 20 g ammonium molybdate in 400 ml warm water (50°C) and cool. Dissolve 1.0 g ammonium vanadate in 300 ml boiling distilled water, cool and add 140 ml conc. nitric acid gradually with stirring. Then add the molybdate solution gradually to the acid vanadate solution with stirring and dilute to 1 litre with water.

Standard phosphate solution. Prepare a stock solution containing 3.834 g potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) per litre. Dilute 25 ml to 250 ml (1 ml \equiv 0.2 mg P_2O_5).

PREPARATION OF STANDARD GRAPH

To a series of 100 ml volumetric flasks add 0, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40 and 50 ml of the standard phosphate solution (\equiv 0–10 mg P_2O_5) and dilute each to 50–60 ml with water. Add a few drops of ammonia solution (0.88) and make just acid with nitric acid (1:2). Add 25 ml of the vanadate-molybdate reagent, dilute to the mark and mix. Allow to stand for 10 minutes and measure the optical density in a 2.5 or 10 mm cell at 470 nm.

PROCEDURE

Transfer a suitable volume of solution of the sample (containing 0.5–10 mg P_2O_5) to a 100 ml volumetric flask. If the determination is carried out on the ash, boil the ash with 10 ml of 5 M hydrochloric acid and wash the solution into the 100 ml flask with water, filtering if necessary. Neutralise by the dropwise addition of 0.88 ammonia (the volume of solution at this stage should be 50–60 ml) and then proceed as for the standard graph, i.e. make just acid with dilute nitric acid, add 25 ml of vanadate-molybdate reagent, dilute to the mark and measure the optical density after allowing to stand for 10 minutes.

MOLYBDENUM BLUE METHOD

Many methods have been proposed for determining phosphate based on Denigès' reaction. This involves the addition of ammonium molybdate to a solution of an

orthophosphate and the phosphomolybdate produced is partially reduced by stannous chloride to a blue compound ('molybdenum blue') which probably has the formula $(\text{MoO}_2, 4\text{MoO}_3)_2 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$. Alternative reducing agents have been suggested for quantitative purposes such as phenylhydrazine, hydroquinone, sulphur dioxide, hydrazine sulphate and *p*-methylaminophenol. Fogg and Wilkinson (1958) have described a useful technique employing vitamin C.

This colour development has found use in the automatic determination of phosphate using for example Technicon AutoAnalyzer equipment including a filter photometer for absorbance measurements. The method is described in detail by Hanson (1973).

PROCEDURE

Transfer 25 ml of a neutral ash solution containing in all not more than 0.1 mg orthophosphate to a 50 ml graduated flask. Add 5.0 ml molybdate solution (25.0 g/l sodium molybdate in 5 M sulphuric acid) followed by 2.0 ml hydrazine sulphate solution (1.5 g/l). Dilute to mark with distilled water and mix. Immerse flask in boiling water for 10 min, remove and cool in cold water. Measure absorbance at 830 or 680 nm against a reagent blank. Deduce phosphate content from a calibration graph prepared from a solution of potassium dihydrogen phosphate (0.2197 g/l: 1 ml \equiv 0.05 mg P).



**African Food Tradition rEvisited by
Research**
FP7 n°245025



Deliverable D.1.2.3.11. SOP for Biochemical and nutritional analysis for Group 1

Procedure for phytic acid (IP6) analysis in cereal fermented foods

SOP: Anti-Nutri-Cere-001

Date: **12/01/2012**

Version : **1**

Written by : Laetitia MESTRES

For information on this SOP please contact :

- Christian MESTRES (christian.mestres@cirad.fr) / WP2 Leader
- Alexia PRADES (alexia.prades@cirad.fr)
-

This document has been approved by :

Partner	Name of the person who approved	Date DD/MM/YY
CIRAD	Christian MESTRES Alexia Prades	12/01/2012 12/01/2012
UAC		
CSIR		
FAAU		
ESB		
FRI		
NRC		

Table of contents

1	Domaine et application	3
2	References	3
3	Définitions	3
4	Principe	3
5	Reactifs	5
6	Appareillage	5
7	Procédure	6
7.1	Phases mobiles et gradient	6
7.2	Extraction.....	6
7.3	Préparation des standards d'IP6.....	7
8	Expression des résultats	7
8.1	Méthode de calcul et formules	7
8.2	Répétabilité.....	8
9	Points critiques et Note sur la procédure.....	8
10	Rapport d'essai	8
11	Enregistrement des Révisions	8

Procedure for phytic acid (IP6) analysis in cereal fermented foods

SOP: Anti-Nutri-Cere-001

Date: 12/01/2012

Version: 1

1 DOMAINE ET APPLICATION

Cette procédure est décrite pour le dosage de l'acide phytique (IP6) dans les aliments à base de céréales, les huiles et les graines de légumineuses. Cette méthode est très précise et est indépendante de la teneur en phytates de l'échantillon.

2 REFERENCES

P. Talamond, S. Doulbeau, I. Rochette, J-P. Guyot and S. Treche. **2000**. Anion-exchange high-performance liquid chromatography with conductivity detection for the analysis of phytic acid in food. *Journal of Chromatography A*, **871**, 7–12.

3 DEFINITIONS

L'acide phytique ou acide myo-inositol hexaphosphorique est une biomolécule de formule brute $C_6H_{18}O_{24}P_6$, naturellement présente dans les graines de nombreuses céréales et légumineuses. Il représente 50 à 90 % du phosphore total. Il diminue, voire inhibe, l'absorption de divers cations (Zn, Cu, Co, Mn, Ca, Fe) en formant des sels insolubles appelés phytates.

La Chromatographie Ionique Haute Performance (HPIC) est basée sur un échange d'ions sur résine : dans le cas des phytates, il s'agit d'une colonne échangeuse d'anions, dont la phase est donc chargée positivement.

4 PRINCIPE

Plusieurs méthodes sont disponibles pour analyser l'acide phytique dans les aliments. La plus précise et rapide est celle décrite dans cette procédure, initialement mise au point par Talamond et al (2000). Les inositols-phosphates sont extraits en milieu acide de manière à les décomplexer. L'extrait est récupéré par centrifugation, puis séparé par Chromatographie Ionique Haute Performance (HPIC) et les phytates quantifiés par conductimétrie en présence d'un suppresseur d'anions ASRS 300. Le suppresseur d'anions permet de diminuer la conductivité et le bruit de fond dû à l'éluant NaOH, et ainsi améliore le signal des inositol phosphates. Le principe du suppresseur ASRS 300 est présenté sur la figure 1. Le suppresseur est constitué de deux compartiments de régénération où circule de l'eau et d'un compartiment qui reçoit l'éluant à contre-courant, séparés par des membranes à échange d'ions. Des électrodes sont placées le long des compartiments de régénération.

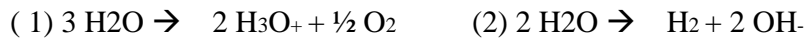
Procedure for phytic acid (IP6) analysis in cereal fermented foods

SOP: Anti-Nutri-Cere-001

Date: 12/01/2012

Version: 1

Sous l'effet d'un potentiel électrique, l'eau qui y circule est électrolysée : du côté de l'anode, elle subit une réaction d'oxydation (1) tandis que du côté de la cathode, l'eau est réduite (2) :



La membrane à échange d'ions permet le passage des ions H_3O^+ dans le compartiment où se trouve l'éluant, ce qui aboutit à sa conversion en eau, qui a une conductivité très faible. Le contre-ion Na^+ passe simultanément dans la seconde zone de régénération, afin de maintenir l'équilibre des charges, et se combine aux ions HO^- générés à cet endroit.

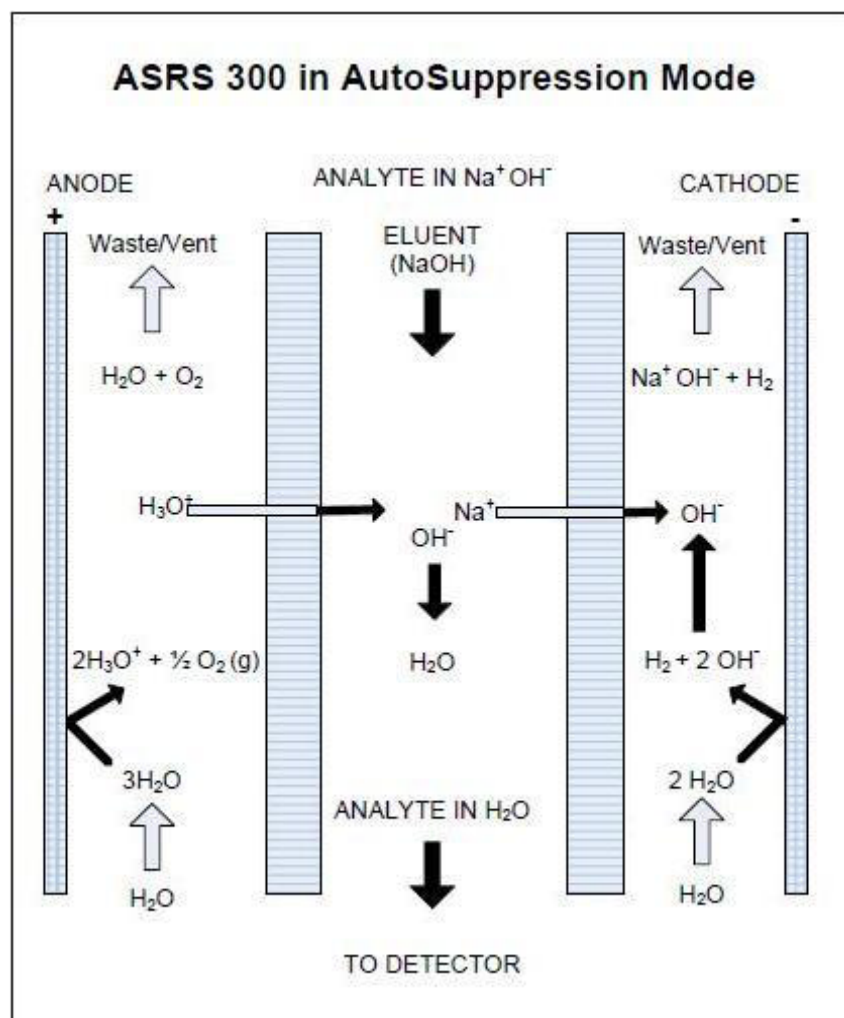


Figure 1. Principe de fonctionnement de l'autosuppresseur ASRS 300.

Procedure for phytic acid (IP6) analysis in cereal fermented foods

SOP: Anti-Nutri-Cere-001

Date: 12/01/2012

Version: 1

5 REACTIFS

Les réactifs sont de haute qualité analytique.

- Eau ultrapure avec une résistivité supérieure à 18 MΩ cm.
- Sodium phytate (Sigma Ref. P5681), utilisé pour la préparation des standards de solution d'acide phytique.
- NaOH 200 mM (Soude liquide – impératif, pas de pastilles - Sigma-Aldrich ref.72064)
- HCL 0,5 M
- Tampon phosphate pH 7,5 100mM préparé avec de l'eau ultrapure

6 APPAREILLAGE

- Chromatographie ionique haute performance à échange d'ion HPIC (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) équipé d'une boucle d'injection de 25 µL, et d'un détecteur conductimétrique présentée sur la figure 2.
- Colonne de retenue ATC1, une précolonne AG11 et une colonne AS11
- Cellule conductimétrique relié à un détecteur ED50 et un supprimeur d'anions ASRS 300.
- Vials Pyrex adaptable au carrousel de l'équipement avec fermeture PTFE adaptée
- Filtres seringues (diamètre de pore 0,2 µm)
- Seringues 5mL
- Centrifugeuse 5415R
- Agitateur type Vortex
- Tubes Eppendorf 2,5 mL ou tubes à essais 5mL
- Balance de précision 0,1 mg

Procedure for phytic acid (IP6) analysis in cereal fermented foods

SOP: Anti-Nutri-Cere-001

Date: 12/01/2012

Version: 1

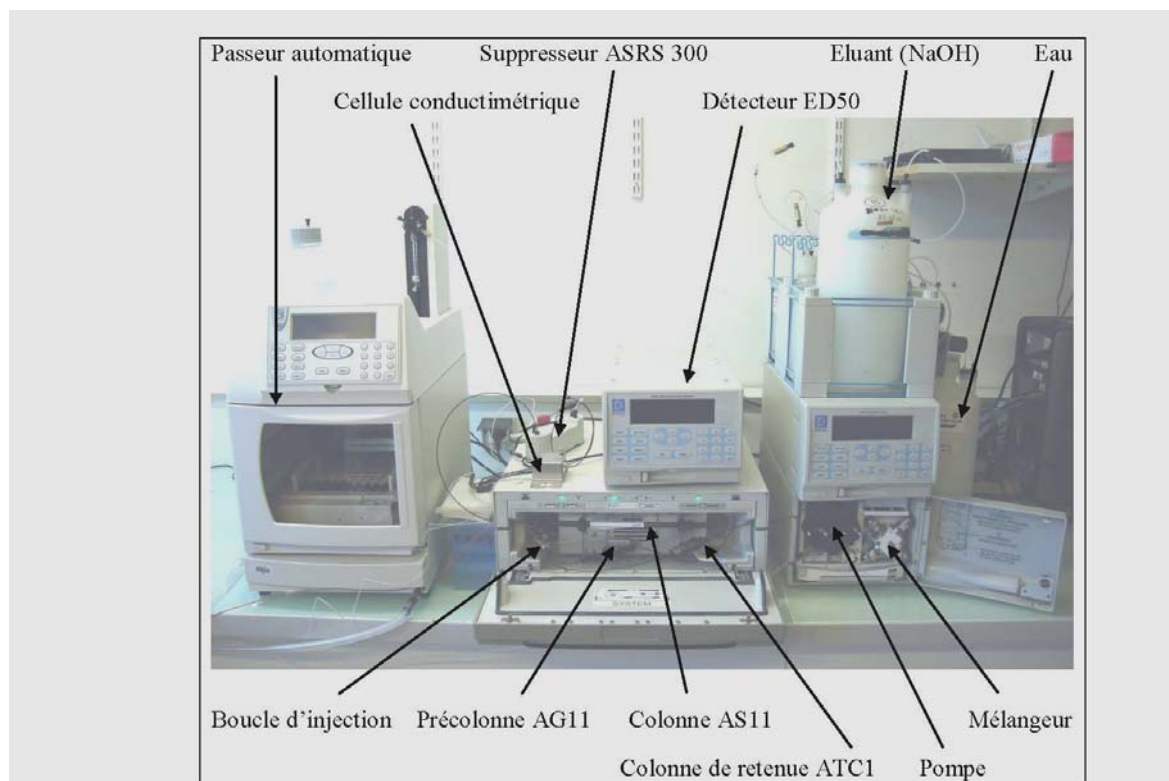


Figure 2 : Montage HPIC utilisé pour l'analyse des phytates

7 PROCEDURE

7.1 Phases mobiles et gradient

Deux phases mobiles sont préparées : (A) de l'eau Ultrapure, et (B) une solution de NaOH 200 mM. Le gradient est réalisé de sorte à passer d'une concentration de NaOH de 30 mM (15% de B) à 80 mM (40% de B) en 8 min, puis de revenir aux conditions initiales (30% de B) et de les maintenir pendant 8 min. La colonne est thermostatée à une température de 25°C

7.2 Extraction

- Peser environ exactement 0,1 g de poudre d'échantillon moulu.
- Ajouter 4 mL de la solution HCl 0,5 M.
- Fermer et vortexer
- Placer sous agitation 1 nuit (16h) à température ambiante, sous hotte (si possible)
- Vortexer, puis prélever 2 sous échantillons de 1,5 mL d'extrait
- Centrifuger à 13000 rpm, pendant 10 minutes, à température ambiante.
- Récupérer pour chaque sous échantillon 1 mL de surnageant.
- Diluer 50 fois avec une solution tampon phosphate pH 7,5 100mM: 100 μ l d'échantillon + 4900 μ l de tampon
- Filtrer sur filtre seringue 0,2 μ m
- Injecter 10 μ L.

Procedure for phytic acid (IP6) analysis in cereal fermented foods

SOP: Anti-Nutri-Cere-001

Date: 12/01/2012

Version: 1

7.3 Preparation des standards d'IP6

Préparer une gamme étalon, dans de l'eau ultrapure, à partir d'une solution mère de standard IP6 à 10mM. La solution mère à 10mM peut être congelée et conservée plusieurs semaines. La gamme étalon est préparée extemporanément par décongélation et dilution de la solution mère à 1mM. Cette solution fille est elle-même ensuite diluée de façon à obtenir des solutions de 0,002mM à 0,01mM. La gamme étalon ne se conserve pas plus de 24 heures à 20°C. Elle est injectée avant la série d'échantillons. Le volume de solution injectée est de 10 µL. Pour information, le temps de rétention de l'IP6 dans les conditions chromatographiques décrites est de $6,3 \pm 0,3$ min.

Un exemple de profil obtenu sur un standard IP6 à 0,73mM est présenté sur la figure 3.

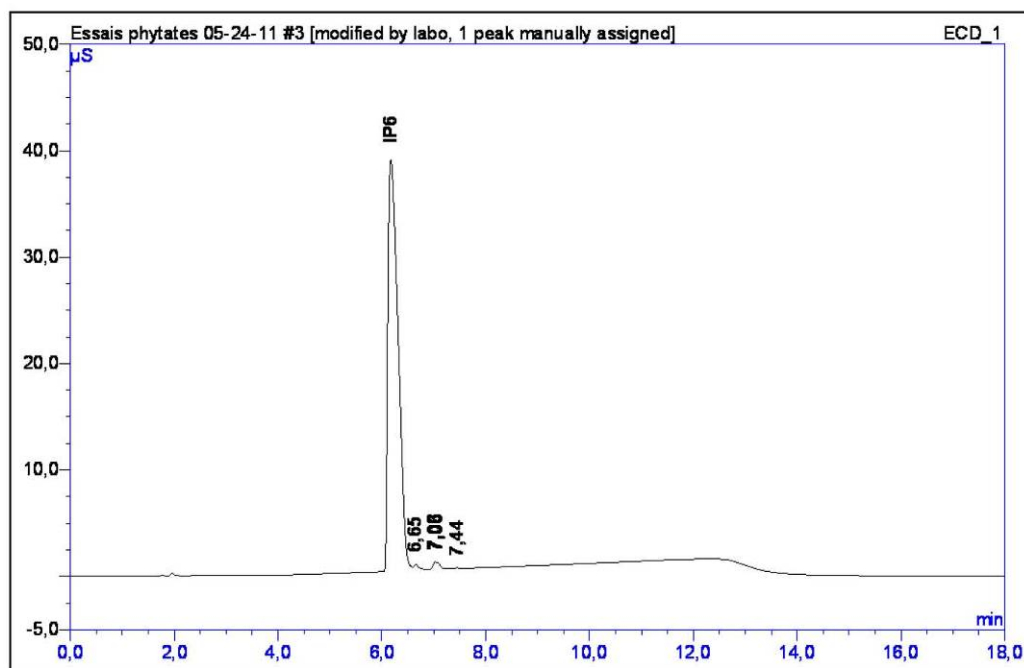


Figure 3 : Chromatogramme d'un standard d'IP6 à 0,73mM

8 EXPRESSION DES RÉSULTATS

8.1 Methode de calcul et formules

La surface sous le pic obtenu en conductimétrie est proportionnelle à la concentration en acide phytique. La gamme étalon permet de relier la surface du pic d'IP6 de l'échantillon à la concentration en IP6 de la solution extraite. La réponse du détecteur est linéaire sur la plage de concentrations

Procedure for phytic acid (IP6) analysis in cereal fermented foods

SOP: Anti-Nutri-Cere-001

Date: 12/01/2012

Version: 1

sélectionnée. Selon la méthode d'extraction utilisée et les dilutions effectuées, on obtient, après calcul, la teneur en IP6 pour 100 g de matière sèche.

8.2 Répétabilité

L'écart type de répétabilité doit être inférieur à 5% (rapporté à la moyenne), et l'écart type de reproductibilité sera au maximum de 8% (rapporté à la moyenne). Le CV répétabilité observé sur la gamme étalon est de 1,3%.

9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

- Eviter d'utiliser du matériel inox ou métallique car cela pourrait biaiser le dosage,
- N'utiliser que de l'eau ultrapure pour tout le dosage,
- Ne jamais utiliser de soude en pastilles pour une analyse en chromatographie ionique,
- Il faut thermostatier la colonne à 25°C pour éviter les différences entre mesures,
- Ne pas conserver la gamme étalon diluée.

10 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

Le rapport d'essai doit inclure tous les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon.

11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	Personne responsable	Description de la modification



African Food Tradition rEvisited by Research

FP7 n°245025



Deliverable D.1.2.3.11: SOP biochemical and functional analysis for Group 1

**Procédure pour la détermination des phénols totaux dans les produits
céréaliers fermentés**

SOP : Anti-Nutri-Cere-002

Date : **17/01/2011**

Version: **2**

Ecrit par : Laetitia MESTRES (laetitia.mestres@yahoo.fr)

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Christian MESTRES (christian.mestres@cirad.fr) / WP2 Leader
- Laetitia MESTRES (laetitia.mestres@yahoo.fr)
-
-
-

Ce document a été approuvé par :

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD UAC CSIR FAAU ESB FRI NRC	Christian MESTRES	19/01/2012

Procédure pour la détermination des phénols totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Anti-Nutri-Cere-002

Date: 17/01/2012

Version : 2

Table des matières

1	Domaine et application	3
2	Références	3
3	Définitions	3
4	Principe	4
5	Réactifs	4
6	Appareillage	4
7	Procédure	5
8	Expression des résultats	8
8.1	Mode de calcul et formules	8
8.1.1	<i>Calculs</i>	8
8.1.2	<i>Formules</i>	9
8.2	Répétabilité.....	9
9	Points critiques et Note sur la procedure.....	9
10	Rapport d'essai	10
11	Enregistrement des Révisions.....	10
12	Annexe	11

Procédure pour la détermination des phénols totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Anti-Nutri-Cere-002

Date: 17/01/2012

Version : 2

1 DOMAINE ET APPLICATION

Cette méthode s'applique au dosage des phénols totaux dans les produits végétaux.

2 REFERENCES

1. Michodjehoun-Mestres, L., Souquet, J.-M., Fulcrand, H., Bouchut, C., Reynes, M. and Brillouet, J.-M. (2009). Monomeric phenols of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). *Food Chemistry* 112, 851-857.
2. Ribéreau-Gayon P. 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris 254 pp.
3. Georgé S, Brat P., Alter P., and Amiot M-J. 2005. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp 1370–1373.
4. Boizot N., Charpentier J-P. 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques. In le Cahier des techniques de l'INRA - Amélioration Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques. Numéro spécial, 79-82.

3 DEFINITIONS

Composés phénoliques : Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins.

Le réactif de Folin-Ciocalteu : est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$).

Composés interférents : lors du dosage des composés phénoliques en présence du réactif de Folin, d'autres composés réducteurs, tels que l'acide ascorbique (vitamine C) les acides aminés, les sucres, également extraits par le solvant, sont aussi dosés avec les polyphénols. Ainsi pour se prémunir de leur interférence lors du dosage, on réalise l'adsorption des polyphénols puis on dose les composés interférents non retenus sur la colonne d'adsorption.

Procédure pour la détermination des phénols totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Anti-Nutri-Cere-002

Date: 17/01/2012

Version : 2

4 PRINCIPE

Les phénols sont extraits à l'aide d'un mélange acétone/eau (70/30), puis dosés par mesure spectrophotométrique après réaction avec le réactif de Folin-Cicalteu. En milieu basique, le réactif de Folin oxyde les **groupements oxydables des phénols** présents dans l'échantillon. Les produits de réduction de couleur bleue, sont un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968), présentant un maximum d'absorption comprise entre 620 et 760 nm, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

Les résultats sont corrigés des substances interférentes (vitamine C, protéines, acides aminés...), dosées spécifiquement, et les teneurs en phénols totaux sont exprimés en équivalents d'acide gallique (**acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque, figure 1**)

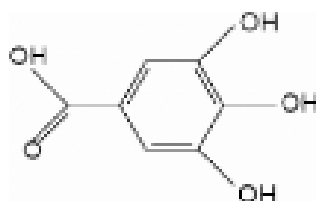


Figure 1: L'acide gallique (Acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque).

5 REACTIFS

- Réactif de Folin-Cicalteu, dilué au dixième (1/10) avec de l'eau distillée (la solution diluée se conserve maximum **1 semaine** à 4°C)
- Solution aqueuse de carbonate de sodium Na₂CO₃ (75 g/L), se conserve maximum **1 semaine à 4°C et surtout éviter l'évaporation**
- Méthanol qualité HPLC
- Acétone qualité analytique
- Acide gallique anhydre 5 mg/mL. Solution à **préparer et doser le jour même.**

6 APPAREILLAGE

- Agitateur magnétique
- Micropipette,
- Mixeur Ultra-turax

Procédure pour la détermination des phénols totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Anti-Nutri-Cere-002

Date: 17/01/2012

Version : 2

- Filtre papier
- Spectrophotomètre pouvant mesurer à 760 nm
- Cartouche Oasis HLB 6cc 200mg extraction cartridges (hydrophilic-lipophilic balance, **Waters Corporation Milford, Massachusetts ASA**, contenant une phase solide qui est un copolymère [poly (divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone)].
- Système porte cartouche, SUPELCO 20" Hg Vacuum, VISIPREP 24™ DL, USA
- Tubes coniques gradués de 15 ml KIMBLE GLASS Inc. Art N° 45165-15
- Cuvette: volume minimum 4 mL
- Bêchers
- Tubes à vis
- Agitateur magnétique

7 PROCÉDURE

7.1 Extraction

L'ensemble des étapes du dosage des phénols totaux est présenté sur le **schéma 1**.

7.1.1 Extraction des phénols totaux

- Dans un bécher de 100 mL, peser environ exactement 100 mg de poudre (échantillon)
- Ajouter 10 mL d'acétone/eau 70/30 (v/v)
- Agiter pendant 30 min à température ambiante sur un agitateur magnétique
- Filtrer sur papier Whatman n°1 (Ø150 mm). Le filtrat est appelé **extrait brut**.
- Conserver les extraits bruts à -20°C si l'analyse est différée
- L'extrait brut est dosé en triple.

- Dans un tube à vis de 10ml ajouter 50 µL de l'extrait brut et 450 µL de méthanol pour le dosage au Folin (**cf. 7.2**).

7.1.2 Réalisation du blanc pour le dosage des phénols totaux

- Déposer 50 µL du solvant d'extraction (acétone/eau 70 :30 v/v) dans un tube à vis
- Ajouter 450 µL de méthanol.
- Faire le dosage de Folin **cf. 7.2**.

7.1.3 Purification et dosage des composés interférents

Si le dosage de Folin-Ciocalteu est simple à mettre en œuvre et très sensible, il n'est cependant pas spécifique des polyphénols. Le réactif de Folin-Ciocalteu réagit avec les acides aminés, tyrosine et tryptophane des protéines, les sucres réducteurs comme le glucose et le fructose, l'acide ascorbique, l'acide tartrique et les sulfites. Pour éviter que ces composés ne surestiment la vraie valeur des phénols totaux, il faut procéder au dosage des composés interférents après

Procédure pour la détermination des phénols totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Anti-Nutri-Cere-002

Date: 17/01/2012

Version : 2

fixation des polyphénols, sur des cartouches Oasis, par exemple. La différence des valeurs obtenues donne la valeur réelle des phénols totaux de l'échantillon.

Conditionnement des cartouches

- Déposer 4 fois 3 mL de méthanol sur des cartouches neuves
- Rincer avec 2 fois 3 mL d'eau distillée
- Après adsorption des composés phénoliques, passer 4 fois 3 mL de méthanol et 2 fois 2 mL d'eau distillée pour nettoyer la cartouche.
- Fermer avec du parafilm et stocker à température ambiante pour une prochaine analyse

Ces étapes sont à effectuées avant et après chaque analyse, ou en passant d'un échantillon à un autre.

La cartouche peut être utilisée dans ces conditions 5 à 8 fois, si elle n'est pas encrassée.

Purification des composés interférents

Pour favoriser l'adsorption des composés phénoliques sur la colonne, il est impératif de réaliser une dilution et **d'abaisser ainsi la teneur en acétone de 70% à 8,8 % dans l'extrait brut.**

- Disposer les cartouches Oasis sur le système porte cartouche SUPELCO
- Soulever le couvercle du système et disposer les tubes coniques gradués de 15 mL sous chaque sortie de colonne Oasis
- Dans une fiole, déposer 500 µL de l'extrait brut
- Ajouter 3,5 mL d'eau distillée
- Soit FD_1 le facteur de dilution (8)
- Pipeter 2 mL du mélange et déposer sur une cartouche Oasis préalablement conditionnée (cf. paragraphe 7.1.3.1)
- Rincer avec 2 fois 1 mL d'eau distillée
- Mesurer exactement le volume de la solution dans le tube conique
- Soit FD_2 le facteur de dilution (2) dans le tube conique
- Prélever 500 µL (= V_1) de cette solution pour le dosage au Folin-Ciocalteu (cf. 7.2)
- Dosage à réaliser en triple.

Il faut noter que d'autres études réalisent une dilution pour une teneur en acétone finale de 14% dans l'extrait brut. Cette approche sera nécessaire si la teneur de 8,8 % n'est pas satisfaisante.

Réalisation du blanc des composés interférents

- Dans un tube à vis de 10 mL, déposer 30 µL de solvant d'extraction (acétone/eau 70/30v/v)
- Ajouter 470 µL d'eau distillée ceci afin de réaliser la dilution 16 réalisée au total dans le lavage des composés interférents.

Procédure pour la détermination des phénols totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Anti-Nutri-Cere-002

Date: 17/01/2012

Version : 2

- Réaliser le dosage de Folin_Ciocalteu (cf. 7.2)
- Dosage à réaliser en triple.

7.2 Dosage au Folin-Ciocalteu

- Dans chacun des tubes à vis contenant 500 µL de mélange pour les composés phénoliques, les différents blancs et les composés interférents, ajouter 2,5 mL de réactif Folin-Ciocalteu (dilué 1/10e dans eau distillée)
- Agiter au Vortex, incuber 2 min à température ambiante
- Ajouter 2,5 mL de carbonate de sodium
- Agiter au Vortex, et incuber immédiatement dans un bain-marie à 50°C pendant 15 min
- Refroidir rapidement les tubes dans l'eau froide
- Faire le zéro du spectromètre avec de l'eau distillée
- Mesurer l'absorbance à la longueur d'onde de 760 nm contre de l'eau distillée.

Remarque : Le risque chimique lié à la mise en œuvre du protocole de dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu devient acceptable à condition de réaliser toutes les manipulations sous sorbonne / hotte à parois latérales et fermeture frontale.

7.3 Réalisation de la courbe d'étalonnage

Il est impératif de réaliser les dilutions et de manipuler le méthanol sous la hotte.

Le dosage pour l'étalonnage se fait également suivant le schéma 1 en prélevant le volume indiqué de chaque dilution et en complétant avec du méthanol pour obtenir toujours 500µl de volume total dans le tube avant de rajouter le réactif de Folin dilué.

- Préparer une solution d'acide gallique de concentration massique à 50 et 500 mg/L dans du méthanol pour une absorbance entre 0,1 et 0,6
- Réaliser une **dilution 10⁵** de cette solution initiale. **C'est la solution-mère.**
- Prélever dans 10 tubes à vis 0, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 300, 400 et 500 µL de cette solution-mère.
- Compléter à 500 µL le contenu de chaque tube à vis avec du méthanol.
- Réaliser le dosage au Folin-Ciocalteu (cf. 7.2)
- A partir des valeurs des absorbances obtenues, calculer la droite d'étalonnage de l'acide gallique. :

$$Y = \alpha X$$

où X est la concentration massique g/L en équivalent acide gallique
Y l'absorbance à 760 nm
 α la pente de la droite.

Procédure pour la détermination des phénols totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Anti-Nutri-Cere-002

Date: 17/01/2012

Version : 2

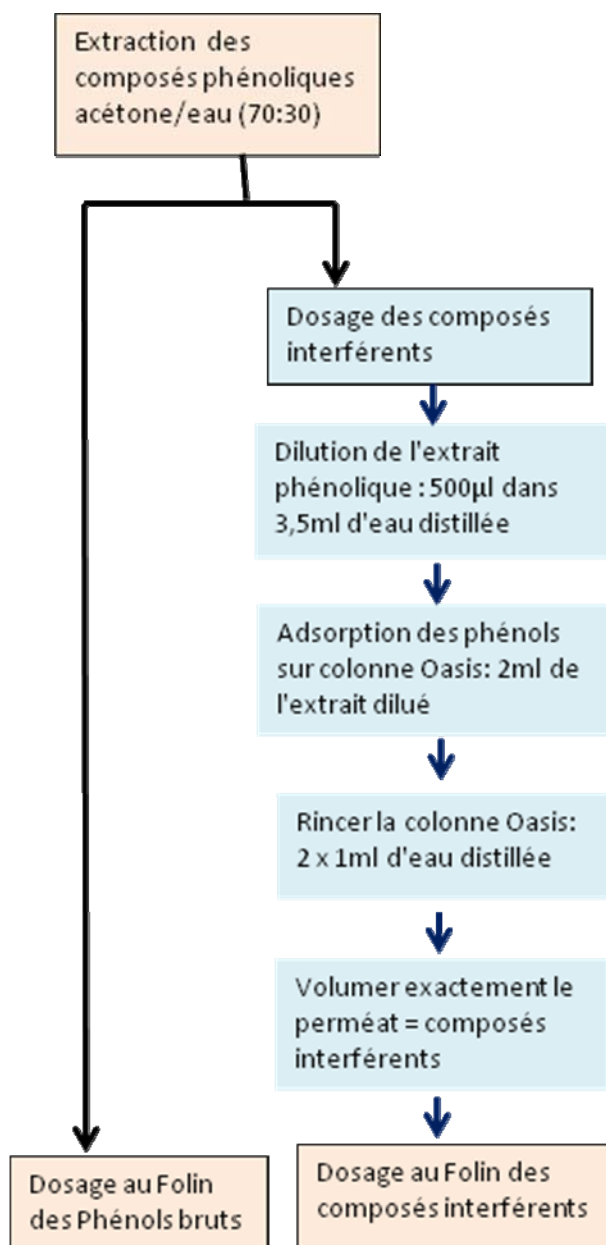


Schéma 1: Extraction et dosage des phénols totaux

8 EXPRESSION DES RESULTATS

8.1 Mode de calcul et formules

8.1.1 Calculs

Noter les absorbances (Abs) de chaque solution :

- Abs solution échantillon : **E**

Procédure pour la détermination des phénols totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Anti-Nutri-Cere-002

Date: 17/01/2012

Version : 2

- Abs solution Blanc échantillon : **Be**
- Abs solution interférents : **I**
- Abs solution Blanc interférents : **Bi**
- **V_E** le volume initial d'Extraction (10 mL)
- **V₁** le volume d'essai pour le dosage au Folin
- **FD₁** et **FD₂** facteurs de dilution pour la purification des composés interférents

8.1.2 Formules

La concentration en phénols totaux brut est calculée (en équivalent acide gallique) de la manière suivante :

$$\text{Phénols totaux bruts} = ((E - Be) / \text{pente}) * V_E / V_1$$

Calculer de même la teneur en composés interférents en équivalent acide gallique en tenant compte des dilutions :

$$\text{Interférents} = (I - Bi) / \text{pente} * FD_1 * FD_2 * V_E / V_1$$

La différence des valeurs en phénols totaux brut et en composés interférents donne la teneur en phénols totaux réels de l'échantillon, exprimée **mg acide gallique/ 100g de matière fraîche**.

$$\text{Phénols totaux bruts} = \text{Phénols totaux bruts} - \text{Interférents}$$

8.2 Répétabilité

Dans une double détermination, essayer d'obtenir une différence d'absorbance (Abs) qui varie de 0.050 à 0.100 unités maximum.

9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

- **Tous les manipulations doivent être réalisées sous hotte/sorbonne du fait de l'utilisation d'actéone et de réaction de Folin-Ciocalteu**
- Il est important que les échantillons soient réduits en fine poudre (taille des particules environ 40 µm) car la finesse de la poudre conditionne la qualité de l'extraction.

Procédure pour la détermination des phénols totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Anti-Nutri-Cere-002

Date: 17/01/2012

Version : 2

- Nous utilisons un solvant acétonique plutôt que le méthanol ou l'éthanol pour extraire les polyphénols, car il a l'avantage de précipiter les protéines et d'extraire faiblement les sucres.
- Il convient d'évaluer au préalable pour chaque type de tissu la quantité de composés non phénoliques pouvant interférer avec le réactif de Folin-Ciocalteu. En effet si la teneur en composés non phénoliques des extraits est inférieure à 1% alors on peut s'affranchir du dosage de correction des composés interférents.
- Pour cela, on réalise un dosage différentiel avant et après passage de l'extrait sur une colonne Oasis sur laquelle vont s'adsorber spécifiquement les polyphénols.
- La gamme est réalisée avec de l'acide gallique, composé de coût peu élevé et qui se solubilise facilement dans l'eau. De plus, la gamme une fois préparée se conserve environ 1 mois à 4°C. Il peut-être toutefois préférable de choisir le polyphénol témoin en fonction de la composition de l'extrait à analyser, car l'intensité de la réaction varie en fonction du nombre de groupements hydroxyles (-OH) portés par les noyaux benzéniques des molécules.

10 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

Le rapport d'essai doit inclure tous les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon.

11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	Personne responsable	Description de la modification

**Procédure pour la détermination des phénols totaux dans les produits céréaliers
fermentés**

SOP : Anti-Nutri-Cere-002

Date: **17/01/2012**

Version : **2**

12 ANNEXE



African Food Tradition rEvisited by Research
FP7 n°245025



Deliverable D.1.2.3.11. SOP for Biochemical and nutritional analysis for Group 1

Dosage des acides cinnamiques dans les produits céréaliers fermentés

SOP: Anti-Nutri-Cere-003-fr

Date : **23/05/2011**

Version : **2**

Ecrit par : Laetitia MESTRES

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Christian MESTRES (christian.mestres@cirad.fr) / WP2 Leader
- ...
-
-

Ce document a été approuvé par :

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD	Christian MESTRES	04/01/11
UAC	Noël AKISSOE	17/05/11
CSIR		
FAAU		
ESB		
FRI		
NRC		

Table des matières

1	Domaine et application	3
2	References	3
3	Définitions	3
4	Principe	3
5	Reactifs	4
6	Appareillage	5
7	Procédure	6
7.1	Préparation des réactifs	6
7.2	Saponification	7
7.3	Acidification	7
7.4	Extraction.....	7
7.5	Cas particuliers :délipidation.....	8
7.6	Nettoyage et déchets	8
7.7	Préparation des réactifs	8
7.8	Préparation des échantillons.....	8
7.9	Condition de séparation sur l'HPLC	9
8	Expression des résultats	10
8.1	Methode de calculs et formules.....	10
8.2	Répétabilité.....	11
9	Points critiques et Note sur la procedure.....	11
10	Rapport d'essai	11
11	Enregistrement des Révisions	12
12	Annexe.....	12

Dosage des acides cinnamiques dans les produits céréaliers fermentés

SOP: **Anti-Nutri-Cere-003-fr**

Date : 23/05/2011

Version : 2

1 DOMAINE ET APPLICATION

Cette méthode permet l'identification et la quantification des acides cinnamiques libres et estérifiés par méthode chromatographique. Elle a été développée, testée, et adaptée sur le riz blanchi et broyé.

2 REFERENCES

Cette méthode est une adaptation au riz du protocole développé par Barron, Surget et Rouau, (2007) : Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum L.*) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition, *J Cereal Sci.*, **2007**, 45 : 88-96.

3 DEFINITIONS

Acides cinnamiques : ce sont des molécules comportant une fonction propénoïque et une ou plusieurs fonctions phénol : on trouve essentiellement l'acide férulique et p-coumarique dans les céréales.

AX : Arabinoxylanes

HPLC : High Pressure Liquid Chromatography (Chromatographie liquide haute performance).

TMCA : acide 3,4,5- triméthoxy-*trans*-cinnamique

CSFT : mélange d'acide *p*-coumarique, d'acide *trans*-ferrulique

4 PRINCIPE

Dans un premier temps, on procède à la saponification des échantillons qui libère les acides phénoliques (monomères et dimères) estérifiés aux arabinoxylanes (**Figure 1**).

Les acides phénoliques ainsi libérés sont extraits à l'éther après acidification du milieu à pH2. Les acides phénoliques libres sont aussi dosés.

Dosage des acides cinnamiques dans les produits céréaliers fermentés

SOP: Anti-Nutri-Cere-003-fr

Date : 23/05/2011

Version : 2

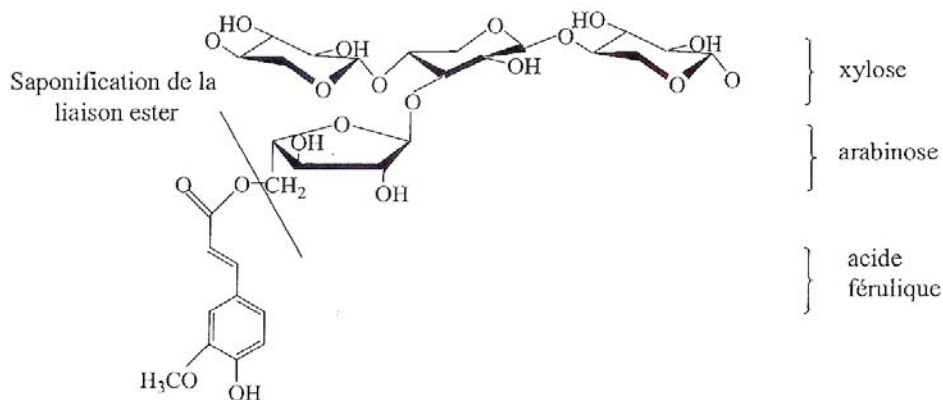


Figure 1 : saponification et libération des acides phénoliques (monomères et dimères) estérifiés aux arabinoxyanes.

On procède à une séparation chromatographique en phase inverse sur une colonne de type C18. Il va se créer des interactions entre les particules en silice greffée apolaires et les acides phénoliques (plus les molécules sont apolaires plus elles seront retenues sur la colonne). On influe sur l'élution des composés en augmentant le pourcentage d'acétonitrile (moins polaire que l'eau). Les acides phénoliques sont détectés grâce à leur absorption UV.

5 REACTIFS

Le tableau 1 donne la liste des réactifs utilisés ainsi que les précautions pour leur manipulation.

Dosage des acides cinnamiques dans les produits céréaliers fermentés

SOP: Anti-Nutri-Cere-003-fr

Date : 23/05/2011

Version : 2

Tableau 1: Liste des réactifs et toxicité

Réactifs	Marques, référence ou qualité	Toxicité	Protection cutanée	Protection oculaire	Protection respiratoire
acide <i>p</i> -coumarique	SIGMA C-9008	aiguë	oui	oui	oui
acide <i>trans</i> -ferrulique	F-3500	aiguë	oui	oui	oui
acide sinapique	Fluka 85430	aiguë	oui	oui	oui
acide 3,4,5-triméthoxy- <i>trans</i> -cinnamique	SIGMA T-4002	aiguë	oui	oui	oui
acétate de sodium trihydrate	pour analyse	faible			
acétonitrile	Grade HPLC	très aiguë	oui	oui	oui
acide acétique glacial	Merck ref 63	aiguë	oui	oui	oui
acide chlorhydrique	pour analyse	aiguë	oui	oui	oui
hydroxyde de sodium 35%	pour analyse	aiguë	oui	oui indispensable	oui
éther diéthylique		aiguë	oui	oui	oui
Hexane		très aiguë	oui	oui	oui
eau ultrapure	ultra filtrée et HPLC				

6 APPAREILLAGE

- Agitateur rotatif par retournement pour tubes de 30 mL (type heidolph Reax 2)
- Centrifugeuse avec rotor pour tube de 10mL en verre.
- Etuve à 35 °C
- pHmètre.
- Système d'évaporation avec gaz argon ou azote.
- Système de filtration de solvants
- Système HPLC avec pompe à gradient et avec détecteur UV.

7 PROCEDURE

7.1 Préparation des réactifs

Précaution : Travailler impérativement sous Sorbonne

- Solution d'hydroxyde de sodium 2N dégazée à l'hélium et stockée sous argon (NaOH 2N : 40 g de NaOH dans 500 ml d'eau millipore). Conserver au maximum 1 mois à température ambiante dans un flacon en plastique.
- Solution d'acide chlorhydrique 4N, (HCl 4N) : 165,6mL d'acide chlorhydrique 37% dans 500 mL.
- **Conserver dans le réfrigérateur**

A partir d'une solution à 37%
dont le PM = 36,46 et 1kg = 0,841
840mL correspond à 1000g
X mL correspond à $(36,46 * 4 \text{ (pour 4M)}) \text{ g}$

 $= 125,5 \text{ mL à } 37\%$
 $X = ((122,5 / 37) * 100) \text{ mL} / 1000 \text{ mL H}_2\text{O}$

 $X = 33,1 \text{ mL HCl à } 37\% / 100 \text{ mL H}_2\text{O}$

- Solution d'acide 3,4,5- triméthoxy-*trans*-cinnamique (TMCA) dans le méthanol :
500 µg/mL pour des sons, des grains entiers.
50µg/mL pour du riz blanchi broyé.

Il est conseillé pour cette solution de préparer **une solution mère à 1mg/mL dans le méthanol puis de réaliser une dilution 20.**

SM (1mg/mL) : 20 mg/20 mL de MeOH

SF (50µg/mL): 1 mL SM/20 mL MeOH

- solution mère étalon CSFT (mélange d'acide *p*-coumarique, d'acide *trans*-ferrulique dans le méthanol pur) : peser 25 mg de chaque acide à diluer dans 50mL de méthanol pur.
- Solution fille à 50 µg/mL (100 µL SM + 0,9 mL méthanol). Conserver cette solution maximum 1 mois au congélateur dans un flacon hermétique en verre ambré.

Dosage des acides cinnamiques dans les produits céréaliers fermentés

SOP: **Anti-Nutri-Cere-003-fr**

Date : 23/05/2011

Version : 2

7.2 Saponification

Cette extraction doit se faire à partir d'une poudre fine ($\leq 0,5\mu\text{m}$).

Les échantillons sont extraits obligatoirement en double.

- Peser environ **50 mg** (entre 47 et 53 mg) à 0,1 mg près, dans un tube en verre à vis de 10 mL et noter la valeur de cette masse M
- Ajouter 100 μL d'éthanol absolu (pour éviter la formation de grumeaux). Laisser le temps à l'éthanol d'humecter la farine.
- Ajouter **3 mL de NaOH 2N**, boucher, puis agiter légèrement si nécessaire.
- Placer les tubes sous **azote**
- Mettre les tubes à agiter sur l'agitateur rotatif en position 2 (environ 30 tours/min) pendant **2h** dans une étuve à **35°C**.
- Aussitôt après les 2h, **ajouter** 50 μL de la solution **TMCA**.

- Préparer l'**étalon CSFT + TMCA** en ajoutant 50 μL de chaque solution étalon dans 3mL de NaOH 2N et sans l'incubation à 35°C.

7.3 Acidification

- Ajouter entre 1,5 et 2 mL d'**HCl 4N** froid dans tous les tubes. Le volume aura été déterminé préalablement de manière à obtenir un pH entre 1,8 et 2,2.

7.4 Extraction

- Ajouter 2,5 ou 3 mL d'éther et agiter fortement
- Dégazer le tube
- Centrifuger 5 minutes à 1000 g à 20°C
- Récupérer la phase supérieure (éther) dans le tube à hémolyse en verre
- Extraire de nouveau avec 2,5 ou 3 mL d'éther ; et ajouter à l'extrait précédent
- Evaporer les extraits éther sous azote (possible de chauffer légèrement, pas plus de 40°C)
- Stocker les tubes au congélateur et à sec

Dosage des acides cinnamiques dans les produits céréaliers fermentés

SOP: Anti-Nutri-Cere-003-fr

Date : 23/05/2011

Version : 2

7.5 Cas particuliers : délipidation

Certains échantillons contiennent beaucoup de lipides qui peuvent gêner l'extraction. Dans ce cas, on peut procéder à une délipidation à l'hexane avant l'extraction.

Peser environ 100 mg (entre 95 et 105 mg) à 0,1 mg près, dans un tube à vis de 30 mL et noter la valeur de la masse M.

- Ajouter 5 mL d'hexane
- Mettre les tubes à agiter sur l'agitateur rotatif en position 2 (environ 30 tours/min) pendant **1h** dans une étuve à **35°C**.
- Centrifuger 5 minutes à 1000 g à 20°C
- Eliminer le surnageant (ne pas jeter l'hexane à l'évier, mais dans un bidon prévu à cet effet) et laisser sécher le culot sous la hotte pendant une nuit.
- Décoller le culot d'un coup sec et ajouter 100 µL d'éthanol absolu pour aider à suspendre le culot dans le NaOH
- Puis procéder à l'extraction classique (cf. point 7.4 Extraction).

7.6 Nettoyage et déchets

- Après extraction, laisser les tubes ouverts sous la hotte une nuit afin que tous les résidus d'éther s'évaporent.
- Mettre ensuite les tubes à tremper dans du TFD4 10% pendant plusieurs heures avant de les laver et de les rincer à l'eau désionisée. Les bouchons sont nettoyés, un à un, avec du détergent classique.
- Injection en HPLC.

7.7 Préparation des réactifs

- Une solution de tampon acétate de sodium 0,07 M pH = 4,6
- Peser exactement 9 g d'acétate de sodium, dissoudre dans environ 250 mL d'eau HPLC et ajouter 4,4 mL d'acide acétique glacial, avec une seringue en verre.
- Filtrer sous vide sur des membranes de 0,45 µm.
- Ajuster le volume à 2 L dans une fiole jaugée (l'eau millipore étant préalablement filtrée à 0,45 µm)
- Vérifier le pH tampon au pH-mètre.

7.8 Préparation des échantillons

- Ajouter **x mL** d'une solution méthanol / eau, 50 : 50 (x = 0,5 mL pour des échantillons de farines)
- Filtrer les échantillons sur des filtres 0,45 µm (Ø = 4 mm, nylon).

Dosage des acides cinnamiques dans les produits céréaliers fermentés

SOP: Anti-Nutri-Cere-003-fr

Date : 23/05/2011

Version : 2

7.9 Condition de séparation sur l'HPLC

On amorce les pompes de l'HPLC avec, en voie A le tampon acétate de sodium et, en voie B l'acétonitrile 100%.

Débit 1 mL/min

Programmer 15% de B environ 15 min avant le démarrage pour équilibrer et pour que le programme redémarre à 15%

Gradient

Temps (min)	%A	%B
0	85	15
6	85	15
30	65	35
35	20	80
40	20	80
45	85	15
55	stop	

- La colonne utilisée est une Symmetry C18 particules de 5µm, 4,6 x 250 mm (WATERS) (particules en silices sphériques, pores de 100Å, greffage polymérique, «endcapée», teneur en carbone 16%).
- Température de colonne 35°C
- Détection à 320 nm.

Dosage des acides cinnamiques dans les produits céréaliers fermentés

SOP: Anti-Nutri-Cere-003-fr

Date : 23/05/2011

Version : 2

8 EXPRESSION DES RESULTATS

8.1 Methode de calculs et formules

➤ **Intégrer l'étalon CSFT.**

Calculer les facteurs de réponse de chaque acide phénolique par :

S_{TMCA} / S_{AP}

où

S_{AP} : Surface du pic d'acide phénolique dosé

S_{TMCA} : Surface du pic de TMCA.

Ces derniers doivent correspondre aux facteurs de réponse référence présentés dans le tableau ci-dessous :

(Z)ferrulic	1,78
p-coumaric	0,52
(E)sinapic	0,57
(E)ferrulic	0,46
8,5'-diFA	0,9
8-o-4'-diFA	0,49
8,5-benzofuran-diFA	0,85
5,5'-diFA	0,56

➤ **Intégrer chaque chromatogramme et identifier chaque pic (exemple, figure 2).**

Les surfaces permettent de calculer la quantité de chaque acide phénolique en µg/mg de produit :

$(S_{AP} * FR * Qté_{TMCA}) / (S_{TMCA} * M * \% MS)$

S_{AP} : Surface du pic d'acide phénolique dosé

S_{TMCA} : Surface du pic de TMCA.

FR : facteur de réponse de l'acide phénolique par rapport au TMCA (voir ci-dessous)

Qté TMCA : quantité de TMCA ajoutée en µg (soit 2,5 µg)

M : masse pesée en mg

%MS : pourcentage de matière sèche de l'échantillon.

Dosage des acides cinnamiques dans les produits céréaliers fermentés

SOP: Anti-Nutri-Cere-003-fr

Date : 23/05/2011

Version : 2

Profil du Son témoin sur ALLTIMA neuve

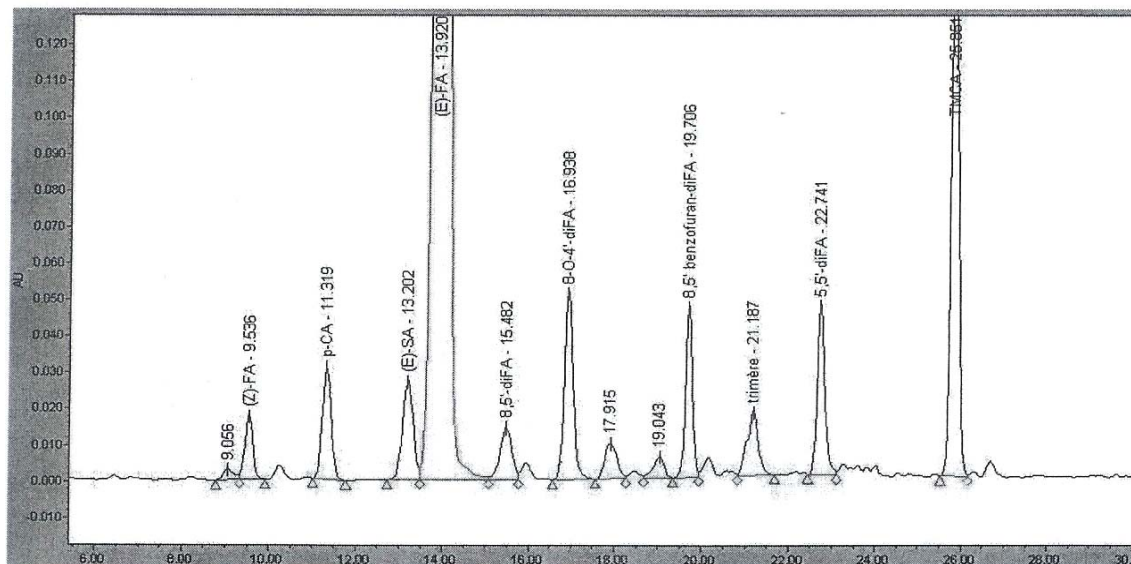


Figure 2. Exemple de chromatogramme pour un son témoin

8.2 Répétabilité

L'écart type entre des répétitions réalisées dans un court intervalle de temps ne dépassera pas 15% de la moyenne (coefficient de variation) pour une teneur en composé supérieure à 10 mg/kg et 25% pour une teneur en composé inférieure à 10 mg/kg

9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

- Bien dé-oxygéner la solution de soude pour la saponification, afin d'éviter l'oxydation des polyphénols ; réaction favorisée en milieu alcalin.
- Etant donné la faible répétabilité de la méthode, la réalisation de triples est fortement recommandée.

10 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

Le rapport d'essai doit inclure tous les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon.

Dosage des acides cinnamiques dans les produits céréaliers fermentés

SOP: Anti-Nutri-Cere-003-fr

Date : 23/05/2011

Version : 2

11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	Personne responsable	Description de la modification
17/05/2011	Noël AKISSOE	Edition

12 ANNEXE

Barron, C. Surget A. et Rouau X. Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum L.*) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *J Cereal Sci.*, **2007**, 45 : 88-96.

Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition

C. Barron, A. Surget, X. Rouau*

INRA, UMR IATE (INRA, UMII, Agro.M, CIRAD), 2 Place Viala, 34 060 Montpellier, Cedex1, France

Received 16 May 2006; received in revised form 7 July 2006; accepted 19 July 2006

Abstract

Hand dissection of mature grains from two common wheats (*Triticum aestivum* L., cv. Caphorn and cv. Crousty) were performed to quantitatively assess their tissue composition and to obtain homogeneous samples of embryonic axis, scutellum, starchy endosperm, aleurone layer, hyaline layer, outer pericarp and a composite layer made up of testa + hyaline layer + inner pericarp. Polymeric neutral sugar and phenolic acid contents of the samples were determined and used to identify specific composition patterns in each tissue irrespective of the cultivar. The scutellum and embryonic axis showed the lowest amount of carbohydrates with similar relative amounts of arabinose and xylose (Ara + Xyl), but the scutellum differed from the embryonic axis in its high phenolic acid, in particular ferulate dehydrodimer, content. The peripheral layers of the grains were mainly composed of cell wall polysaccharides, chiefly arabinoxylans but with differing structures. The hyaline layer was mostly composed of arabinoxylan with extremely low Ara/Xyl ratio (0.1), with high amounts of ferulic acid monomers and hence very weakly crosslinked. The aleurone layer differed from the outer pericarp by its much lower Ara/Xyl ratio and lower amounts of ferulic acid dimers and trimers. High proportions of ether-linked phenolic acids (released by alkali at 170 °C) were detected specifically in the seed coat and tissues in the crease region. The possible application of biochemical markers found in the various tissues to monitor wheat grain fractionation processes is discussed.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Wheat grain; Aleurone; Germ; Scutellum; Pericarp; Arabinoxylan; Phenolic acids

1. Introduction

Traditionally, wheat grain fractionation is performed using a dry milling process which leads to the separation of flour and semolina (from the starchy endosperm) from the germ and bran (which are recovered either in a single fraction or as two separate fractions, depending on the milling procedure). However valuable nutritional constituents including micronutrients, phytochemicals and fibres are particularly concentrated in the germ and bran fractions. These milling fractions are not homogeneous

with respect to tissue and biochemical composition. Some of the components of these fractions being potentially detrimental to food processing or pose nutritional problems should not be included into the final flours. Monitoring grain dry fractionation processes to recover all the potential nutritional benefits while discarding unwanted fractions, requires that the fate of the different tissues be tracked during processing. Biochemical markers have been used successfully to follow the behaviour of the aleurone and pericarp fractions in peripheral layers from grains of soft wheat (Antoine et al., 2004) and durum wheat (Peyron et al., 2002) during fractionation. To increase the efficiency of fractionation monitoring tools, the compositional heterogeneity of each of the grain tissues must be clearly assessed.

The different tissues constituting the wheat grain are generally described in terms of their embryogenic origin and structure (Bradbury et al., 1956a; Evers and Bechtel, 1988). The peripheral tissues of the grain overlying the

Abbreviations: Ara, arabinose; Ara/Xyl, arabinose to xylose ratio; ESEM, environmental scanning electron microscopy; FAm, *cis*- and *trans*-ferulic acid; FAd, dimeric forms of ferulic acid; FAt, 4-O-8', 5'-5'' ferulic acid dehydrotrimer; Gal, galactose; Glc, glucose; Man, mannose; p-CA, *para*-coumaric acid; PCA, principal component analysis; Rha, rhamnose; Rib, ribose; SA, sinapic acid; Xyl, xylose

*Corresponding author. Tel.: +33 4 99 31 04; fax: +33 4 99 61 30 76.

E-mail address: rouau@ensam.inra.fr (X. Rouau).

starchy endosperm, are made up successively from the outer to the inner surface, comprise the outer pericarp (beeswing bran), the inner pericarp (comprising cross cells and tube cells), seed coat (testa), hyaline layer (nucellar epidermis) and the aleurone layer. Thus the peripheral layers of mature grain are multilayered with layers of each tissue type of different thickness and closely associated with one another. The aleurone layer is the thickest (up to 65 µm), the outer pericarp is of intermediate thickness (15–30 µm) and the seed coat the thinnest (5–8 µm). The germ comprises the embryonic axis and the scutellum. Global compositions have been recorded for germ (mostly embryonic axis), the aleurone layer and outer pericarp (reviewed by Fincher and Stone, 1986; Pomeranz, 1988). The carbohydrate and phenolic acid compositions of the outer pericarp and aleurone layer (Antoine et al., 2003; Rhodes et al., 2002) indicated the presence of high amounts of cell wall polysaccharides, especially highly feruloylated arabinoxylans showing different structural features. More recently, Parker et al. (2005) focused on the composition of the bran layer of mature wheat grain, and in particular the inner pericarp and seed coat plus hyaline layer. However, due to the difficulty of completely dissecting tightly associated tissues, there are no compositional data, e.g. for the hyaline layer or scutellum. The isolation and determination of the complex compositional patterns of carbohydrates and phenolic acids for each tissue, which has already revealed their potential as tissue markers, is essential for the selection of improved markers for monitoring grain fractionation.

We have established the composition of each tissue of common wheat grains by first, determining the relative amounts of each tissue within the grain and then establishing their neutral sugar and phenolic acid compositions. The chromatographic methods used allowed the recording of the many different sugars and phenolic acids present by performing only two analyses per sample, which is advantageous with respect to the development of a tissue marker methodology.

2. Experimental

2.1. Tissues isolation

Two common wheat cultivars differing in kernel hardness were used: Caphorn (hard) and Crousty (soft). Non-adhering tissues (pericarp and modified aleurone layer (Bradbury et al., 1956b, c)) surrounding the embryonic axis were first removed and then the embryo was separated from dry grains with a needle. To facilitate endosperm dissection and to avoid losses of cell wall polysaccharides by dissolution, all the following steps were performed on grains soaked in 50% aqueous ethanol for 16 h at room temperature. To make the pretreatments comparable, the dissected embryos were also soaked in 50% aqueous ethanol for 16 h after which the scutellum was removed with a scalpel. The endosperm and peripheral layers were

dissected from degerminated grain. First the crease was removed and the starchy endosperm was scraped away from the aleurone layer inner surface with a scalpel. Clean peripheral layers were further dissected with a scalpel: first the loosely attached and easily removed outer pericarp was removed, then the aleurone layer was dissected from the intermediate layer (composed of inner pericarp, seed coat and hyaline layer). In some cases, the composite intermediate layer was imbibed in water to allow specific recovery of the hyaline layer on its inner side. Dissected tissues were dried at 25 °C over phosphorus pentoxide (P₂O₅) and ball-milled for 5 min before chemical analysis.

To allow comparison of the effects of soaking in water and 50% ethanol prior to dissection, the aleurone, intermediate layer and outer pericarp were also dissected from degerminated grains after hydration in water for 16 h.

2.2. Determination of the relative amount of tissues within the grain

Similar hand dissections of 20 grains were performed in quadruplicate to quantify the relative amounts of the different tissues. All recovered tissues were weighed after drying over P₂O₅. Bran composition was deduced from the combined weights of the aleurone, intermediate layer and outer pericarp, dissected from peripheral layers without the crease.

2.3. Chemical analysis

2.3.1. Phenolic acids

Ester-linked phenolic acids were saponified under oxygen-free Ar at 35 °C in 2 M sodium hydroxide (Antoine et al., 2003). Ether-linked phenolic acids were released at 170 °C in 4 M sodium hydroxide (Grabber et al., 1995). An internal standard (2,3,5 trimethoxy-(E)-cinnamic acid (TMCA), T-4002, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) was added before adjusting pH to 2. Phenolic acids were then extracted with diethylether and quantified by RP-HPLC (Antoine et al., 2003). The response factors of the following forms of ferulic acid dehydrodimers (FAd) (8-O-4', 8,5' benzofuran, 5,5') and ferulic acid dehydro-trimer (FAt) relative to the internal standard were determined at 320 nm with purified samples. The ferulic acid monomer (FAm) content was calculated from the amount of *cis*- and *trans*-ferulic acid (FAm) and the total amount of ferulic acid dehydrodimers (8-O-4', 8,5', 8-5' benzofuran, 5,5' forms) (Fad). All analyses were performed at least in duplicate unless otherwise stated, and the standard error of the mean was less than 10%.

2.3.2. Neutral sugars

Neutral sugars were quantified as anhydro-sugars determined by gas-liquid chromatography (DB 225 capillary column) of their alditol acetates obtained after sulphuric acid hydrolysis (1 M, 2 h, 100 °C) of the samples (Blakeney et al., 1983). A prehydrolysis step (13 M

sulphuric acid, 30 min, 25 °C) was added for the aleurone, intermediate and pericarp layers to measure the cellulosic glucose (Glc) (Saeman et al., 1954). All analyses were performed at least in duplicate and presented as mean values. The standard error was less than 10%.

2.4. Data analysis

Principal component analysis (PCA) was performed on reduced data with Matlab (Mathtools) and the PLS Toolbox (Eigenvector). Data were from the neutral sugar analysis data set (data without prehydrolysis) and phenolic acid analysis (saponification at 35 °C).

3. Results and discussion

3.1. Relative proportions of grain tissues

Meticulous hand dissection of wheat grain and further dissection under a microscope allowed the separation of

tissues to give homogeneous preparations (Fig. 1) and whose identity was established from their histological compositions (Surget and Barron, 2005). Fluorescence microscopy (Antoine et al., 2003) and environmental scanning electron microscopy (ESEM), was used to assess the purity of the recovered tissues and to validate the dissection procedure. The absence of contaminants was verified using specific staining procedures or ESEM, as illustrated in Fig. 1d where the absence of starch on the inner side of aleurone layer was verified. The parts of the grain that are difficult to dissect lie between the outer pericarp and the aleurone layer. In previous work (Antoine et al., 2003), this composite comprising the tightly associated inner pericarp, seed coat and hyaline layer was recovered as a single fraction, the “intermediate layer”. In this study, sufficient amounts of the hyaline layer were recovered for biochemical analyses. Moreover, manual dissection and weighing were also applied to quantify the relative proportion within the grain of embryonic axis, scutellum, endosperm, aleurone, pericarp and the

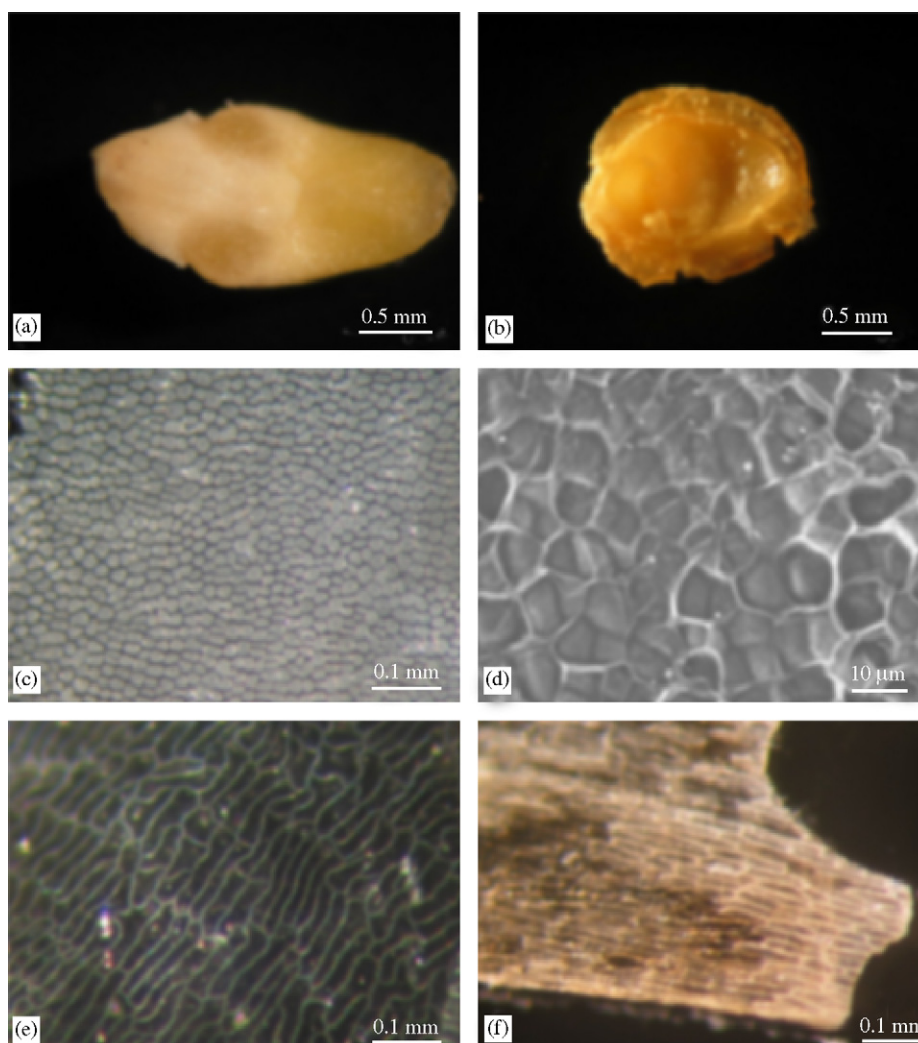


Fig. 1. Micrographs of pure dissected tissues: (a) embryonic axis; (b) scutellum; (c) aleurone layer; (d) inner side of aleurone layer (ESEM observation); (e) hyaline layer, and (f) outer pericarp.

“intermediate layer” made up of the hyaline layer plus testa plus pericarp (Table 1). Wheat grains investigated here comprised starchy endosperm (82.7–83.7%), peripheral layers (pericarp + intermediate layer + aleurone) (13.1–14.3%) and finally the germ (3–3.2%), proportions similar to that reported by Pomeranz (1988). The content of peripheral layers averaged 14.3% for Caphorn and 13.1% for Crousty. The main differences between these cultivars lay in proportions of outer pericarp and intermediate layer (which also comprises also inner pericarp) (Antoine et al., 2003). The difference observed in the mass proportions of outer pericarp and intermediate layer between these two cultivars is in the same order of magnitude as the differences in bran tissue thickness measured on seven Pacific Northwest wheat varieties (Larkin et al., 1951).

Table 1
Histological composition of wheat mature grains from two wheat cultivars (Caphorn and Crousty) (% of dry weight)

	Caphorn	Crousty
Germ	3.0	3.2
Embryonic axis	1.5	1.7
Scutellum	1.5	1.5
Starchy endosperm	82.7	83.7
Peripheral layers	14.3	13.1
Aleurone layer	6.5	6.4
Intermediate layer ^a	3.8	3.2
Outer pericarp	4.0	3.5

^aComposed of the hyaline layer + testa + inner pericarp.

Table 2
Neutral sugars composition (mg 100 mg⁻¹ of tissue) of wheat grain tissues from two wheat cultivars (Caphorn and Crousty)

		Rham	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glu	Ara + Xyl	Ara/Xyl	Total
Whole grain	Caphorn	0.4	0.2	2.7	3.8	0.8	0.6	62.0	6.5	0.71	70.5
	Crousty	0.5	0.1	2.2	3.0	0.8	0.6	64.2	5.3	0.73	71.4
Starchy endosperm	Caphorn	0.5	0.2	0.8	1.0	0.6	0.3	74.4	1.7	0.81	77.6
	Crousty	0.6	0.2	0.7	0.8	0.5	0.4	78.1	1.5	0.87	81.2
Scutellum	Caphorn	0.3	0.2	4.5	3.4	0.0	0.9	2.7	7.9	1.31	12.0
	Crousty	0.0	0.2	4.7	3.4	0.0	1.2	3.5	8.1	1.39	12.9
Embryonic axis	Caphorn	0.0	1.1	8.5	6.3	0.8	2.0	2.8	14.8	1.35	21.5
	Crousty	0.0	0.9	8.6	6.4	0.9	2.1	3.1	14.9	1.35	22.0
Aleurone layer	Caphorn	0.0	0.0	7.7 (8.6) ^a	16.2 (19.6) ^a	0.4	0.7	9.4 (12.2) ^a	23.9 (28.3) ^a	0.47	34.3 (42.4) ^a
	Crousty	0.0	0.0	5.2 (6.2) ^a	12.5 (14.3) ^a	0.4	0.6	9.2 (11.4) ^a	17.6 (20.5) ^a	0.41	27.8 (34.0) ^a
Hyaline layer	Caphorn	0.0	0.0	6.3	60.6	0.0	0.0	4.6	66.8	0.10	71.4
	Crousty	0.0	0.0	5.9	47.2	0.0	0.0	4.2	53.1	0.13	57.3
Intermediate layer ^b	Caphorn	0.0	0.0	11.9 (11.3) ^a	28.2 (28.1) ^a	0.0	1.3	3.1 (15.3) ^a	40.1 (39.4) ^a	0.42	44.4 (57.5) ^a
	Crousty	0.0	0.0	11.3 (11.0) ^a	26.5 (27.3) ^a	0.0	1.4	3.7 (16.1) ^a	37.7 (38.3) ^a	0.43	42.8 (57.0) ^a
Outer pericarp	Caphorn	0.0	0.0	25.4 (26.2) ^a	21.5 (21.6) ^a	0.0	1.4	1.6 (26.6) ^a	46.9 (47.8) ^a	1.19	49.9 (78.2) ^a
	Crousty	0.0	0.0	24.1 (24.9) ^a	21.3 (21.3) ^a	0.0	1.4	1.4 (25.1) ^a	45.4 (46.2) ^a	1.13	48.2 (73.8) ^a

^aValues obtained when a prehydrolysis step in 72% sulphuric acid is added. Standard error is less than 10%.

^bComposed of the hyaline layer + testa + inner pericarp.

3.2. Specific tissue composition

The results of carbohydrate and phenolic acid analyses of the different grain tissues are presented Tables 2 and 3, respectively.

3.2.1. Composition of the starchy endosperm, embryonic axis and scutellum

The major monosaccharide of the starchy endosperm is Glc (96% of the neutral sugars), arising from its high starch content. Arabinose (Ara) and xylose (Xyl) represented only about 2% of the neutral sugars arising from arabinoxylans the major cell wall polysaccharide, although minor amounts of arabinogalactan could contribute as much as 20% of the total Ara (Loosveld et al., 1998). The low phenolic acid content was consistent with the low degree of feruloylation of the starchy endosperm wall arabinoxylan (Lempereur et al., 1997; Rhodes et al., 2002).

The scutellum and embryonic axis, both part of the germ, were relatively low in neutral carbohydrate (approx. 12% and 25%, respectively) but had different relative compositions. Ara and Xyl made up 65% of the total neutral carbohydrates in both tissues, with high (about 1.35) Ara/Xyl ratio similar to values obtained for the outer pericarp (Antoine et al., 2003). However they differed in the relative amounts of other neutral sugars. Appreciable amounts of ribose (1%) and mannose (3.4%) were found in hydrolysates from the embryonic axis. The mannose yielding component was present after ethanol soaking suggesting the possible presence of mannans or glucomannans. In respect to phenolic acid composition, the scutellum had relatively higher amounts: 3.9 µg mg⁻¹

Table 3
Phenolic acid compositions of wheat grain tissues from two wheat cultivars (Caphorn and Crousty)

		p-CA	SA	FAm	FAd	FAt	FAm/Ara molar ratio ($\times 100$)	Xyl/FAd molar ratio	[phenol]/ (Ara + Xyl) (%)
		(μg mg ⁻¹ of tissue)							
Whole grain	Caphorn	0.02	0.04	0.86	0.15	0.03	2.2	736	1.7
	Crousty	0.02	0.06	0.87	0.14	0.03	1.5	654	2.13
Starchy Endosperm	Caphorn	0.0	0.01	0.05	0.0	0.0	0.4	7354	0.36
	Crousty	0.0	0.01	0.04	0.0	0.0	0.2	6076	0.40
Scutellum	Caphorn	0.01	0.01	3.48	0.37	0.03	5.3	271	4.95
	Crousty	0.01	0.01	3.32	0.30	0.03	2.0	331	4.54
Embryonic axis	Caphorn	0.0	0.0	0.31	0.09	0.01	0.2	2053	0.28
	Crousty	0.0	0.01	0.57	0.10	0.01	0.2	1860	0.46
Aleurone layer	Caphorn	0.15	0.06	8.14	0.36	0.02	7.2	1299	3.66
	Crousty	0.16	0.08	7.98	0.31	0.02	7.4	1195	4.84
Hyaline layer	Caphorn	0.08	0.00	9.84	0.73	0.07	10.7	2417	1.61
	Crousty	0.09	0.00	10.83	0.46	0.02	11	3003	2.15
Intermediate layer ^a	Caphorn	0.05	0.02	4.67	0.61	0.06	2.7	1359	1.35
	Crousty	0.06	0.04	4.96	0.59	0.06	2.1	1306	1.51
Outer pericarp	Caphorn	0.05	0.00	2.04	1.97	0.74	0.5	318	1.02
	Crousty	0.11	0.01	4.50	2.59	0.85	0.6	240	1.78

^aComposed of the hyaline layer + testa + inner pericarp. FAm values were calculated by summing (E)-FA and (Z)-FA content. FAd values were calculated by summing 8,5', 8-5' benzo, 8-O-4' and 5-5' diferulates contents. Xyl/FAd values were calculated by using Mw for diferulate of 386. Standard error is less than 10%.

compared to the embryonic axis, 0.4–0.7 μg mg⁻¹. The phenolic-to-(Ara + Xyl) ratio was the highest among all tissues in agreement with the intense autofluorescence observed microscopically (Smart and O'Brien, 1979a). The two tissues had high phenolic-to-(Ara + Xyl) ratios, but differed in their Ara/Xyl ratio and the relative amounts of oligomeric forms of ferulic acid. The low abundance of pCA supported previous suggestions by Smart and O'Brien (1979b). Based on their chemistry and autofluorescence, the scutellar cell walls exhibited characteristics in common with aleurone cell walls, which may relate to the comparable functions of the two tissues during germination (Smart and O'Brien, 1979a), one being secretory (aleurone layer) and the other being absorptive (scutellum).

3.2.2. Composition of peripheral layers

For the first time, significant amounts of hyaline layer were available for compositional analysis. Neutral carbohydrates, with Xyl, Ara and Glc as the sole sugars, accounted for 72% of the hyaline layer. Thus the hyaline layer was mainly cell wall polysaccharides, comprising 93.7% arabinoxylans with an Ara/Xyl ratio of 0.10, which is much lower than for arabinoxylans from the starchy endosperm (Dervilly et al., 2000; Izydorczyk and Biliaderis, 1993). This explains the high susceptibility of this tissue to xylanase hydrolysis observed by Benamrouche et al. (2002). FAm was present at a concentration of 9.84 μg g⁻¹ implying a high FAm/Ara molar ratio (10.7:100) but with a low degree of cross-linking (Xyl/FAd molar

ratio = 2400). The hot alkaline treatment did not lead to additional phenolic acid recovery as compared to saponification in mild conditions indicating that phenolic ether linkages were not present.

All the peripheral layers could be clearly distinguished from the starchy endosperm and germ fractions by the high amount of neutral sugars arising from cell wall polysaccharides, mainly Ara + Xyl. The content of cellulose was deduced from the Glc content (Saeman et al., 1954) because of the absence of starch in these tissues. (1 → 3;1 → 4)-β-glucans were found mostly in the aleurone layer (23% of cell wall polysaccharides). On the other hand cellulose was an abundant cell wall polysaccharide in the outer pericarp and intermediate layers (25% and 12.2%), respectively, in agreement with previously published data on walls from the aleurone, beeswing bran (outer pericarp) and intermediate layer (Antoine et al., 2004; Fincher and Stone, 1986; Parker et al., 2005; Pomeranz, 1988). Depending on the tissue and its location in the grain, the cell wall arabinoxylans showed different characteristics. The aleurone layer had low Ara/Xyl values (0.41–0.47) with high FAm/Ara ratio (7:100) and high Xyl/FAd molar ratio (1200–1300) indicative of poorly cross-linked arabinoxylans as previously reported (Parker et al., 2005; Rhodes et al., 2002). The adjacent hyaline layer had the lowest Ara/Xyl ratio (0.1) and the highest content of FA esterified Ara (FAm/Ara ratio (approx. 11:100). On the other hand, the outer pericarp had the highest Ara/Xyl ratio (1.13–1.19) and the lowest Xyl/FAd ratio (240–318),

as previously observed (Antoine et al., 2003; Parker et al., 2005). However, in contrast with results of Parker et al. (2005), the relative amounts of each form of FAd detected after saponification at 35 °C (data not shown) did not differ significantly among the different tissues, high temperature (170 °C) alkaline treatment designed to release ether-bound phenolic acids (Grabber et al., 1995; Iiyama et al., 1990), also showed differences between peripheral layers. For the aleurone and hyaline layers there was no difference in total phenolic acid recovery between 35 °C saponification and hot alkali treatment, but for the intermediate layer and outer pericarp, hot alkali increased the phenolic acids released by 2.25- and 2-fold, respectively.

The relative FAM content of aleurone layer measured in this study was about 20% higher than that previously recorded (Antoine et al., 2003). Although cultivar differences is a possible reason for this effect, the hand dissection procedure (ethanol vs. water soaking) was checked (Fig. 2). Indeed, it was confirmed that a simple immersion of bran strips in water induces arabinoxylan cross-linking (Peyron et al., 2001). Thus soaking in water, rather than aqueous

ethanol, led to an underestimation of FAM by between 12% and 20%, depending on the cultivar and an over-estimation of the oligomeric forms of ferulic acid (FAd and FAI) by up to 100% in the aleurone layer. A similar tendency was observed for the pericarp but to a lesser extent, whereas there was no significant effect in the intermediate layer. The activation of endogenous phenol-oxidases or peroxidases which are known to be present in the cell walls of peripheral layers (Fraignier et al., 2000) could be induced by incubation in water (Peyron et al., 2001). The more marked effect in aleurone cells could be explained by the higher amount of peroxidase cofactors such as hydrogen peroxide in this living tissue (Encina and Fry, 2005). Although similar trends were observed regardless of the cultivar, the effects were higher for Caphorn possibly due to differences in oxidase activity or substrate accessibility. The content of sinapic acid (SA) in the aleurone layer was 0.08 $\mu\text{g mg}^{-1}$ in ethanol-soaked tissue compared to 0.32 $\mu\text{g mg}^{-1}$ for water-soaked tissue. The apoplasmic/cytoplasmic location of SA remains to be determined but this phenolic acid could be in part ester-linked to sugars or small oligosaccharides as found in gluten fraction (Labat et al., 2000) and would be easily solubilised in ethanol. However, SA bound to arabinoxylans has been recorded in insoluble dietary fibre from rice (Bunzel et al., 2002).

3.2.3. Seed coat and crease

Although it has not been possible to isolate and analyse pure seed coat, its specific composition could be deduced from compositions of intermediate layer, hyaline layer and pericarp, assuming that outer pericarp and inner pericarp were similarly constituted. The seed coat appeared poor in neutral carbohydrates, with Ara+Xyl as the main constituents, as in the two adjacent layers. No specific conclusion could be drawn about the Ara/Xyl ratio from our results. Considering the value of the Ara/Xyl ratio given by Parker et al. (2005) (0.13) for a seed coat + hyaline composite, a low Ara/Xyl ratio in the seed coat may be deduced. As in the aleurone and hyaline layers, a low amount of FAd is likely in the seed coat, in agreement with Parker et al. (2005). However, the high amounts of phenolic acids specifically recovered after alkaline hydrolysis at 170 °C from the composite intermediate layer (Table 4) is indicative of ether-linked phenolic acids and is consistent with the significant presence of lignin (Antoine et al., 2003), tannins (Miyamoto and Everson, 1958) and/or suberin/cutin (Matzke and Riederer, 1990) in these tissues. Indeed ether linkages between arabinoxylans and lignin, through phenolic acids, are well-known in tissues of the Gramineae (Grabber et al., 1995; Iiyama et al., 1990; Scalbert et al., 1985).

The relative composition of the crease region was deduced by comparing the composition of all grain peripheral layers including the crease, and the calculated composition of peripheral layers from the aleurone, intermediate and outer pericarp values, taking into account

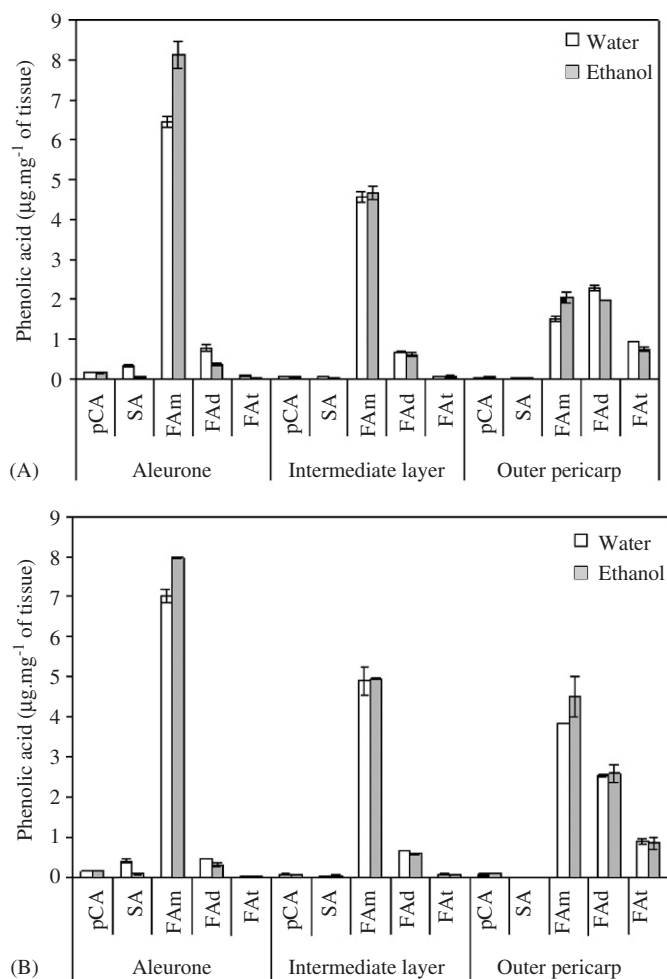


Fig. 2. Phenolic acid composition of the aleurone layer, intermediate layer* and outer pericarp according to the water vs. ethanol soaking before dissection (the errors bars represent $\pm 1\sigma$) (*composed of the hyaline layer + testa + inner pericarp): (A) Caphorn cv, and (B) Crousty cv.

their relative proportion within the bran (Table 1). No compound was diagnostic of the crease (Table 5). However differences were observed between calculated and measured values supporting a non-homogenous composition of the peripheral layers covering the grain: a higher amount of Glc was observed when the crease was included in the analyses, as well as a lower amount of FAt. This result could be related to a higher aleurone-to-pericarp ratio in the crease region, as supported by microscopic examination (Evers and Bechtel, 1988). The high amounts of phenolic acids released by hot alkali treatment (170 °C) could be related to specific tissues types present only in this part of the grain, such as the vascular bundle, a lignified tissue, or by analogy with seed coat results, the pigment strand, where ether linkages between feruloylated arabinoxylans and other polymers may occur.

3.3. Biochemical markers

To further our goal to generate specific tissue markers as new tools for development and control of milling processes, the data for tissue compositions from two wheat cultivars were statistically analysed. Similarity maps were drawn from principal components to give a synthetic image of cultivar variability vs. tissue variability (Fig. 3). Regardless of the chemical analysis (neutral sugars or phenolic acid),

Table 4
Phenolic acids content ($\mu\text{g mg}^{-1}$ of tissue) released after saponification at 35 °C or alkaline hydrolysis at 170 °C for two wheat cultivars (Caphorn and Crousty)

		Phenolic acids	
		35 °C	170 °C
Intermediate layer ^a	Caphorn	5.40	12.83
	Crousty	5.72	9.85
Hyaline layer	Caphorn	10.73	8.84
	Crousty	11.40	10.47
Outer pericarp	Caphorn	4.80	10.06
	Crousty	8.07	11.83

^aComposed of the hyaline layer + testa + inner pericarp.

Table 5

Comparison of the two wheat cultivars for biochemical analyses of samples of bran including the crease and calculated values of bran without crease (issued from data measured on aleurone layer, intermediate layer and outer pericarp, given in Tables 2–4 and their relative proportion within the bran given in Table 1)

		Ara	Xyl	Man	Gal	Glu	FAm	FAd	FAt	Phenolic acids
		(mg 100 mg ⁻¹ of tissue)						Saponification 35 °C ($\mu\text{g mg}^{-1}$ of tissue)		
Bran calculated	Caphorn	13.76	20.84	0.16	1.02	5.54	5.51	0.88	0.23	9.57
	Crousty	11.72	18.24	0.17	1.04	5.76	6.31	0.99	0.25	9.32
Bran + crease	Caphorn	14.16	22.10	0.21	1.30	9.51	5.06	0.85	0.15	13.84
	Crousty	13.71	20.65	0.19	1.19	8.92	5.44	0.98	0.17	13.02

cultivar variability was always lower than tissue variability. Similarity maps enhanced differences in neutral sugar composition already observed between tissues: relative sugar composition is described by the first axis (Glc vs. Ara + Xyl) whereas the second axis mainly indicates the

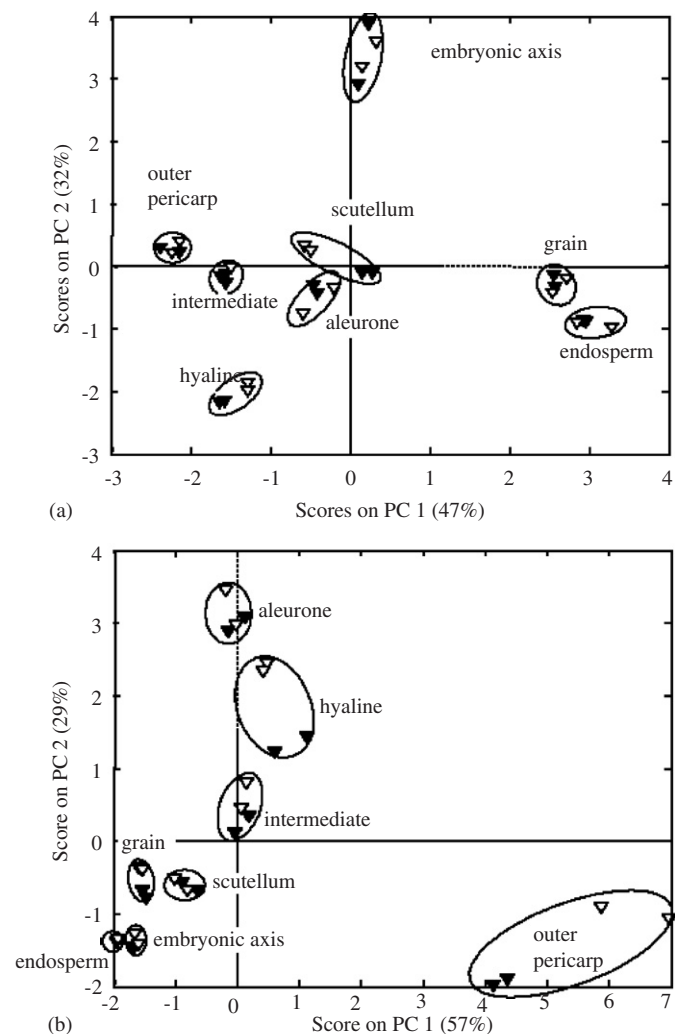


Fig. 3. PCA similarity map drawn for two common wheat cultivars, Caphorn (▼) and Crousty (▽): (a) neutral sugar analysis, and (b) phenolic acid analysis.

presence of ribose (Fig. 3a). The distinctive difference in sugar composition between scutellum and embryonic axis was then highlighted. The highest differences between the two cultivars were observed for the scutellum and hyaline layer. For the latter, due to the difficulty in preparing the sample and the different behaviours of the cultivars, an artefactual result cannot be discounted. Using the phenolic acid data set, the similarity map defined by principal components 1 and 2 discriminated between the tissues (Fig. 3b). In this case, cultivar variability was still lower than tissue variability but the dispersion was greater, in particular, for the outer pericarp and the hyaline layer.

A trimer of ferulic acid (FAt) (4-O-8', 5-5'' dehydrotriferulic acid) was for practical purposes specific for the outer pericarp, as previously reported for maize bran (Bunzel et al., 2003; Rouau et al., 2003) and peripheral layers of common wheat (Antoine et al., 2003). About 90% of the ferulic acid trimer was concentrated in this tissue which itself accounted for less than 4% of the grain. No trace of the trimeric ferulic acid was found in the scutellum despite similarity to pericarp in Ara+Xyl and phenolic composition (high Ara/Xyl, low Xyl/FAd ratios). The presence of the outer pericarp could be assessed thanks to the amount of FAt, as previously used by Antoine et al. (2004). FAt is the only specific marker identified among the analysed compounds. Indeed, even though FAm and FAd were highly concentrated in aleurone (55–60%) and outer pericarp (60–65%), respectively, they do not permit a quantitative distinction between these tissues in a complex mixture. Similar comments can be made about p-CA, 67% of which is concentrated in the aleurone layer. No specific marker for the seed coat could be clearly identified, however the additional phenolic acids recovered after hot alkaline hydrolysis could be valuable diagnostic constituents of seed coat and crease region.

The germ fraction recovered from conventional wheat grain milling is composed mainly of embryonic axis; however it is possible to recover also the scutellum using specific processes (Posner and Li, 1991). The differences in composition revealed between embryonic axis and scutellum could be used to follow their separation during processes. However, truly specific markers would be preferable to allow efficient tracking of these quantitatively minor tissues during whole grain processing, where compositional differences in sugars and phenolic acids may be masked by the major tissue components.

Although only one truly specific marker was identified, PCA clustering showed that identification of a specific tissue using neutral sugar or phenolic acid patterns could be easily made. Another approach to the development of new tools for monitoring the fractionation behaviour of each tissue would be to subject the global biochemical data, from the tissues to multivariate data analysis. Taking into account the low variability of the carbohydrate analyses, this measurement appears as the most appropriate. However, in the case of fractionation of whole grain, the high amount of Glc from endosperm starch would mask

small differences in tissue composition (e.g. due to aleurone layer content). In that case, analysis of phenolic acids and starch content, as used by Peyron et al. (2002), could solve the problem. The choice of markers must be simplified and adapted for each specific system (whole grain, degerminated grains, bran, and so on).

Acknowledgements

This study was financially supported by the European Commission in the Communities Sixth Framework Programme, Project HEALTHGRAIN (FP6-514008). This publication reflects only author's views and the Community is not liable for any use that may be made of the information contained in this article.

References

- Antoine, C., Peyron, S., Mabile, F., Lapierre, C., Bouchet, B., Abecassis, J., Rouau, X., 2003. Individual contribution of grain outer layers and their cell wall structure to the mechanical properties of wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2026–2033.
- Antoine, C., Peyron, S., Lullien-Pellerin, V., Abecassis, J., Rouau, X., 2004. Wheat bran tissue fractionation using biochemical markers. *Journal of Cereal Science* 39, 387–393.
- Benamrouche, S., Crônier, D., Debeire, P., Chabbert, B., 2002. A chemical and histological study on the effect of (1-4)- β -endo-xylanase treatment on wheat bran. *Journal of Cereal Science* 36, 253–260.
- Blakeney, A.B., Harris, P.J., Henry, R.J., Stone, B.A., 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research* 113, 291–299.
- Bradbury, D., McMasters, M.M., Cull, I.M., 1956a. Structure of the wheat kernel. II. Microscopic structure of pericarp, seed coat, and other coverings of the endosperm and germ of hard red winter wheat. *Cereal Chemistry* 33, 342–360.
- Bradbury, D., McMasters, M.M., Cull, I.M., 1956b. Structure of the wheat kernel. III. Microscopic structure of the endosperm of hard red winter wheat. *Cereal Chemistry* 33, 361–373.
- Bradbury, D., McMasters, M.M., Cull, I.M., 1956c. Structure of the wheat kernel. IV. Microscopic structure of the germ of hard red winter wheat. *Cereal Chemistry* 33, 373–391.
- Bunzel, M., Allerdings, E., Sinwell, V., Ralph, J., Steinhart, H., 2002. Cell wall hydroxycinnamates in wild rice (*Zizania aquatica* L.) insoluble dietary fibre. *European Food Research and Technology* 214, 482–488.
- Bunzel, M., Ralph, J., Funk, C., Steinhart, H., 2003. Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber. *European Food Research and Technology* 217, 128–133.
- Dervilly, G., Saulnier, L., Roger, P., Thibault, J.F., 2000. Isolation of homogeneous fractions from wheat water-soluble arabinoxylans. Influence of the structure on their macromolecular characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2, 270–278.
- Encina, A., Fry, S., 2005. Oxidative coupling of a feruloyl-arabinoxylan trisaccharide (FAXX) in the walls of living maize cells requires endogenous hydrogen peroxide and is controlled by a low-Mr apoplastic inhibitor. *Planta* 223, 77–89.
- Evers, A.D., Bechtel, D.B., 1988. Microscopic structure of the wheat grain. In: Pomeranz, Y. (Ed.), *Wheat: Chemistry and Technology*. AACC, St. Paul, pp. 47–95.
- Fincher, G.B., Stone, B.A., 1986. Cell walls and their components in cereal grain technology. *Advances in Cereal Science and Technology* 8, 207–295.

- Fraignier, M.P., Michaux-Ferrière, N., Kobrehel, K., 2000. Distribution of peroxidase in durum wheat (*Triticum durum*). *Cereal Chemistry* 77, 11–17.
- Grabber, J.H., Hatfield, R.D., Ralph, J., Zon, J., Amrheins, N., 1995. Ferulate cross-linking in cell walls isolated from maize cell suspensions. *Phytochemistry* 40, 1077–1082.
- Iiyama, K., Lam, T.B.T., Stone, B.A., 1990. Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. *Phytochemistry* 29, 733–737.
- Izydorczyk, M.S., Biliaderis, C.G., 1993. Structural heterogeneity of wheat endosperm arabinoxylans. *Cereal Chemistry* 70, 641–646.
- Labat, E., Morel, M.H., Rouau, X., 2000. Wheat gluten phenolic acids: occurrence and fate upon mixing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 6280–6283.
- Larkin, R.A., McMaster, T.C., Wolf, M.J., Rist, C.E., 1951. Studies on the relation of bran thickness to millability of some pacific northwest wheats. *Cereal Chemistry* 28, 247–258.
- Lempereur, I., Rouau, X., Abecassis, J., 1997. Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid content of durum wheat (*Triticum durum* L.) grains and its milling fractions. *Journal of Cereal Science* 25, 103–110.
- Loosveld, A.M., Maes, C., Van Casteren, V.H.M., Schols, H.A., Grobet, P.J., Delcour, J.A., 1998. Structural variation and levels of water-extractable arabinogalactan-peptide in European wheat flours. *Cereal Chemistry* 75, 815–819.
- Matzke, K., Riederer, M., 1990. The composition of the cutin of the caryopses and leaves of *Triticum aestivum* L. *Planta* 182, 461–466.
- Miyamoto, T., Everson, E.H., 1958. Biochemical and physiological studies of wheat seed pigmentation. *Agronomy Journal* 50, 733–734.
- Parker, M.L., Ng, A., Waldron, K.W., 2005. The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (*Triticum aestivum* L. cv. *Avalon*) grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 2539–2547.
- Peyron, S., Abecassis, J., Autran, J.C., Rouau, X., 2001. Enzymatic oxidative treatments of wheat bran layers: effects on ferulic acid composition and mechanical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4694–4699.
- Peyron, S., Surget, A., Mabilhe, F., Autran, J.C., Rouau, X., Abecassis, J., 2002. Evaluation of tissue dissociation of durum wheat grain (*Triticum durum* desf.) generated by the milling process. *Journal of Cereal Science* 36, 199–208.
- Pomeranz, Y., 1988. Chemical composition of kernel structures. In: Pomeranz, Y. (Ed.), *Wheat: Chemistry and Technology*. AACC, St. Paul, pp. 97–158.
- Posner, E.S., Li, Y.Z., 1991. A technique for separation of wheat germ by impacting and subsequent grinding. *Journal of Cereal Science* 13, 49–70.
- Rhodes, D.I., Sadek, M., Stone, B.A., 2002. Hydroxycinnamic acids in walls of wheat aleurone cells. *Journal of Cereal Science* 36, 67–81.
- Rouau, X., Cheynier, V., Surget, A., Gloux, D., Barron, C., Meudec, E., Montero, J.L., Criton, M., 2003. A dehydrotrimer of ferulic acid from maize bran. *Phytochemistry* 63, 899–903.
- Saeman, J.F., Moore, W.E., Mitchell, R.L., Millett, M.A., 1954. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Technical Association of the Pulp and Paper Industries, Journal* 37, 336–346.
- Scalbert, A., Monties, B., Lallemand, J.Y., Guittet, E., Rolando, C., 1985. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry* 24, 1359–1362.
- Smart, M.G., O'Brien, T.P., 1979a. Observation on the scutellum. II. Histochemistry and autofluorescence of the cell wall in mature grain and during germination of wheat, barley, oats and ryegrass. *Australian Journal of Botany* 27, 403–411.
- Smart, M.G., O'Brien, T.P., 1979b. Observation on the scutellum. III. ferulic acid as a component of the cell wall in wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology* 6, 485–491.
- Surget, A., Barron, C., 2005. Histologie du grain de blé. *Industrie des Céréales* 145, 3–7.



African Food Tradition rEvisited by Research

FP7 n°245025



Deliverable D.1.2.3.11. SOP for Biochemical and nutritional analysis for Group 1

Détermination de la teneur en tannins dans les produits céréaliers fermentés

SOP Number: **Anti-Nutri-Cere-004-fr**

Date : **23/05/2011**

Version : **1**

Ecrit par Laetitia MESTRES

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Christian MESTRES (christian.mestres@cirad.fr) / WP2 Leader
- ...
-
-

Ce document a été approuvé par :

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD	Christian MESTRES	25/01/11
UAC	Noël AKISSOE	12/05/11
CSIR		
FAAU		
ESB		
FRI		
NRC		

Table des matières

1	Domaine et application	3
2	References	3
3	Définitions	3
4	Principe	3
5	Reactifs	3
6	Appareillage	4
7	Procédure	4
7.1	Préparation de l'échantillon pour l'essai	4
7.2	Détermination	4
7.3	Etablissement de la courbe d'étalonnage.....	5
8	Expression des résultats	5
8.1	Mode de calcul et formules	5
8.1	Répétabilité.....	5
9	Points critiques et Note sur la procédure.....	5
10	Rapport d'essai	6
11	Enregistrement des Révisions	6
12	Annexe.....	6

Détermination de la teneur en tannins dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Anti-Nutri-Cere-004-fr

Date : 23/05/2011

Version : 1

1 DOMAINE ET APPLICATION

Cette méthode est issue de la norme NF V 03-751 et elle décrit le dosage des tannins dans les céréales et les produits céréaliers.

2 REFERENCES

NF V 03-751. Dosage des tannins.

3 DEFINITIONS

Les tannins sont des substances d'origine organique que l'on trouve dans pratiquement toutes les parties des végétaux (écorces, racines, feuilles, etc.). Ils sont caractérisés par une sensation de dessèchement en bouche. Il existe deux catégories de tannins : les tannins hydrolysables composés de sucre et d'acide-phénol, et les tannins condensés appelés tannins catéchiques ou proanthocyanidines. On trouve les deux dans les plantes.

4 PRINCIPE

Extraction des tannins par le diméthylformamide DMF sous agitation. Après centrifugation, addition de citrate d'ammonium et de fer (III) et d'ammoniaque à une partie aliquote du surnageant et mesure spectrophotométrique de l'absorbance de la solution obtenue à 525 nm. Détermination de la teneur en tannin en utilisant une courbe d'étalonnage préparée à partir de l'acide tannique.

5 REACTIFS

- Acide tannique, solution à 2g/L (réf. Merk n°773). Conservation une semaine.
- Ammoniaque, solution à 8.0g/L.
- Diméthylformamide, solution à 75% (v/v). Dans une fiole jaugée de 100 mL, introduire 75 mL de diméthylformamide. Diluer avec de l'eau distillée, laisser refroidir et compléter jusqu'au trait repère.
- Solution de citrate d'ammonium et de fer (III), à **28% de teneur en fer**, solution à 3,5 g/L, préparée 24 h avant emploi.

La teneur en fer du citrate ayant une influence sur les résultats, celle-ci doit être respectée impérativement.

6 APPAREILLAGE

- Le matériel utilisé est le même que listé dans la méthode de référence.

7 PROCEDURE

7.1 Préparation de l'échantillon pour l'essai

- Nettoyer l'échantillon puis le broyer dans un broyeur mécanique afin de réduire la taille des particules (100-150 µm).
- Bien homogénéiser.
- Faire la teneur en eau de l'échantillon
- Introduire environ exactement 1 g d'échantillon pesé dans un tube à centrifuger de 50 mL

7.2 Détermination

- Verser dans le tube à centrifuger, à la pipette 20 mL de la solution diméthylformamide.
- Boucher hermétiquement et agiter pendant 60 min à l'aide de l'agitateur
- Centrifuger à 3000 g.

- Prélever 1 mL du surnageant et l'introduire dans un tube à essais
- Ajouter 6 mL d'eau puis 1 mL de la solution d'ammoniaque
- Agiter au vortex

- Prélever 1 mL du surnageant et l'introduire dans un tube à essai
- Ajouter 5 mL d'eau puis 1 mL de la solution de citrate d'ammonium et de fer.
- Agiter au vortex
- Ajouter 1 mL de la solution d'ammoniaque
- Agiter au vortex

- Transvaser les deux solutions obtenues dans des cuves de mesure et lire l'absorbance après 10 minutes au spectrophotomètre à 525 nm après avoir fait le zéro avec de l'eau distillée
- Le résultat est la différence entre les deux mesures.

Détermination de la teneur en tannins dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Anti-Nutri-Cere-004-fr

Date : 23/05/2011

Version : 1

7.3 Etablissement de la courbe d'étalonnage

Avertissement : la gamme étalon est à réaliser tous les jours.

- Préparer 6 fioles jaugées de 20 mL et introduire respectivement 0, 1, 2, 3, 4, et 5 mL de la solution d'acide tannique. Compléter à 20 mL avec la solution de diméthylformamide. La gamme d'étalonnage ainsi obtenue est de 0 ; 0.1 ; 0.2 ; 0.3 ; 0.4 ; 0.5 mg/mL.
- Introduire 1 mL de chacune de ces solutions dans un tube à essai et y ajouter successivement 5 mL d'eau, 1 ml de la solution de citrate d'ammonium et de fer,
- Agiter au vortex
- Ajouter 1 mL de solution d'ammoniaque et agiter au vortex
- Transvaser le contenu dans les cuvettes et lire l'absorbance après 10 minutes au spectrophotomètre à 525 nm. Après avoir fait le zéro avec de l'eau distillée.
- Tracer la courbe d'étalonnage.

8 EXPRESSION DES RÉSULTATS

8.1 Mode de calcul et formules

La teneur en tannins, exprimée en pourcentage (p/p) d'acide tannique par rapport à la matière sèche est égale à :

$$\text{Tannin (\%)} = [(2 * c) / m] * [100 / (100 - H)]$$

Où

C est la concentration en acide tannique en mg / mL de la solution d'essai lue sur la courbe d'étalonnage

m est la masse de l'échantillon pesée

H est la teneur en eau de l'échantillon

8.2 Répétabilité

L'écart type entre des répétitions réalisées dans un court intervalle de temps ne dépassera pas une valeur de 0,02 % (base sèche) pour les variétés à tannins (teneur en tannins supérieure à 0,3 % base sèche) et 0,01 % (base sèche) pour les variétés dites sans tannins.

9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

- ✓ La gamme étalon est à réaliser tous les jours

Détermination de la teneur en tannins dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Anti-Nutri-Cere-004-fr

Date : 23/05/2011

Version : 1

10 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

Le rapport d'essai doit inclure tous les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon.

11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	Personne responsable	Description de la modification
12/05/2011	Noël AKISSOE	Edition

12 ANNEXE

NF V 03-751. Dosage des tannins.

NF V03-751

septembre 1985

AFNOR
Association Française
de Normalisation

www.afnor.fr

Ce document est à usage exclusif et non collectif des clients AFNOR SAGAWEB. Toute mise en réseau, reproduction et rediffusion, sous quelque forme que ce soit, même partielle, sont strictement interdites.

This document is intended for the exclusive and non collective use of AFNOR SAGAWEB. (Standards on line) customers. All network exploitation, reproduction and re-dissemination, even partial, whatever the form (hardcopy or other media), is strictly prohibited.

SAGAWEB

Pour : CIRAD CA

le 8/12/2003 - 17:16

Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent document, faite sans l'autorisation de l'éditeur est illicite et constitue une contrefaçon. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective et, d'autre part, les analyses et courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées (Loi du 1^{er} juillet 1992 – art. L 122-4 et L 122-5, et Code Pénal art. 425).

Diffusé par

AFNOR

norme française

NF V 03-751
Septembre 1985

Sorgho Dosage des tanins

E : Sorghum — Determination of tannin content
D : Sorghum — Bestimmung des Gehalts an Gerbstoffen

Norme française homologuée par décision du Directeur Général de l'afnor le 5 août 1985 pour prendre effet le 5 septembre 1985.

correspondance À sa date de publication, la présente norme a été proposée au programme de travail de l'ISO.

analyse La présence de polyphénols dans les graines de sorgho : les tanins, est responsable d'une diminution de l'énergie métabolisable des graines utilisées en alimentation animale. C'est pourquoi de nouvelles variétés à faible teneur en tanins sont en plein développement. Par ailleurs, les Communautés Européennes fixent une réfaction à appliquer à l'intervention en fonction de la teneur en tanins, ainsi qu'une teneur maximale pour la prise en charge des sorghos. À titre indicatif, lors de la campagne 1984-1985, la réfaction est appliquée à l'intervention pour une teneur en tanins supérieure à 0,4 % par rapport à la matière sèche, à condition que la teneur maximale soit inférieure à 1,5 % par rapport à la matière sèche (une valeur maximale de 1,0 % est prévue pour les campagnes suivantes).

La présente méthode de dosage des tanins n'est pas spécifique d'un seul type de polyphénols. Son intérêt se justifie cependant par la bonne corrélation négative qui a été observée entre l'énergie métabolisable des graines de sorgho, mesurée par expérimentation sur coqs, et les résultats obtenus par cette méthode.

descripteurs **Thesaurus International Technique** : céréale en grain, sorgho, analyse chimique, dosage, tannin.

modifications

corrections

Sorgho

NF V 03-751

Dosage des tanins

Septembre 1985

AVANT-PROPOS

La présente norme est en concordance technique avec la méthode d'analyse communautaire correspondante, fixée par le règlement n° 2159/84 du 26 juillet 1984 (J.O.C.E. N° L 197 du 27 juillet 1984), qui a été élaborée conjointement avec cette norme par les experts français.

Elle en diffère cependant de par la teneur en fer retenue pour le citrate d'ammonium et de fer (III) : 17-20 % au lieu de 28 % ; cette teneur en fer ayant une influence non négligeable sur les résultats et tous les essais interlaboratoires ayant été conduits avec une teneur de 17-20 %, une demande de modification à la méthode communautaire est en cours. Elle a été de plus complétée par les données d'un essai interlaboratoire.

1 OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente norme décrit une méthode globale de dosage des tanins dans les graines de sorgho.

2 RÉFÉRENCE

NF V 03-707 Céréales et produits céréaliers — Détermination de la teneur en eau (Méthode de référence pratique).

3 PRINCIPE

Extraction des tanins par le diméthylformamide avec agitation. Après centrifugation, addition de citrate d'ammonium et de fer (III) et d'ammoniaque à une partie aliquote du surnageant et mesure spectrométrique de l'absorbance de la solution ainsi obtenue, à 525 nm. Détermination de la teneur en tanins en utilisant une courbe d'étalonnage préparée à partir d'acide tannique.

4 RÉACTIFS

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de pureté au moins équivalente.

4.1 Acide tannique, solution à 2 g/l.

L'origine de l'acide tannique ayant une influence certaine sur la courbe d'étalonnage, il est, en conséquence, recommandé d'utiliser l'acide tannique Merck référence 773, pour permettre une comparaison des résultats entre laboratoires.

Cette solution se conserve une semaine.

4.2 Ammoniaque, solution à 8,0 g/l de NH₃.

4.3 Diméthylformamide, solution à 75 % (V/V).

Dans une fiole jaugée de 100 ml introduire 75 ml de diméthylformamide. Diluer avec de l'eau, laisser refroidir et compléter au trait-repère.

4.4 Citrate d'ammonium et de fer (III), ayant une teneur en fer comprise entre 17 % et 20 %, solution à 3,5 g/l, préparée 24 h avant emploi.

Note : La teneur en fer du citrate ayant une influence sur les résultats, celle-ci doit être respectée impérativement.

5 APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire, et notamment

5.1 Broyeur mécanique, permettant d'obtenir des particules passant intégralement au travers du tamis (5.2).

5.2 Tamis, de 1 mm d'ouverture de maille.

5.3 Centrifugeuse, permettant d'obtenir une accélération centrifuge de 3 000 g ($3\,000 \times 9,81 \text{ m.s}^{-2}$).

5.4 Tubes à centrifuger, d'environ 50 ml de capacité, bouchés hermétiquement.

5.5 Agitateur mécanique à mouvement de va-et-vient ou **agitateur magnétique**.

5.6 Agitateur mécanique pour tubes à essais (type Vortex).

5.7 Spectromètre, équipé de cuves de 10 mm d'épaisseur, permettant d'effectuer les mesures à 525 nm.

5.8 Pipettes, de 1 ml, 5 ml et 20 ml, classe A.

5.9 Pipettes graduées, de 5 ml et 10 ml, classe A.

5.10 Tubes à essais, 140 mm \times 14 mm.

5.11 Fioles jaugées, de 20 ml.

5.12 Balance analytique.

6 MODE OPÉRATOIRE

6.1 Préparation de l'échantillon pour essai

Éliminer de l'échantillon pour laboratoire les matières étrangères au sorgho, puis broyer l'échantillon dans le broyeur mécanique (5.1) afin de le réduire en particules passant intégralement au travers d'un tamis de 1 mm d'ouverture de maille (5.2). Bien homogénéiser.

6.2 Teneur en eau de l'échantillon pour essai

Déterminer la teneur en eau de l'échantillon pour essai selon la norme NF V 03-707.

6.3 Prise d'essai

Introduire dans un tube à centrifuger (5.4) environ 1 g d'échantillon pour essai (6.1) pesé à 1 mg près.

6.4 Détermination

6.4.1 Verser dans le tube à centrifuger, à la pipette (5.8), 20 ml de la solution de diméthylformamide (4.3). Boucher le tube hermétiquement et l'agiter durant 60 min \pm 1 min à l'aide de l'agitateur (5.5). Centrifuger ensuite durant 10 min avec une accélération de 3 000 g.

6.4.2 Prélever, à l'aide d'une pipette (5.8), 1 ml du liquide surnageant (6.4.1) et l'introduire dans un tube à essais (5.10). Ajouter successivement à la pipette : 6 ml d'eau et 1 ml de la solution d'ammoniaque (4.2), puis agiter pendant quelques secondes à l'aide de l'agitateur (5.6).

6.4.3 Prélever, à l'aide d'une pipette (5.8), 1 ml du liquide surnageant (6.4.1) et l'introduire dans un tube à essais (5.10). Ajouter successivement à la pipette : 5 ml d'eau, 1 ml de la solution de citrate d'ammonium et de fer (III) (4.4), agiter pendant quelques secondes à l'aide de l'agitateur (5.6), puis ajouter à la pipette 1 ml de la solution d'ammoniaque (4.2) et agiter à nouveau pendant quelques secondes à l'aide de l'agitateur (5.6).

6.4.4 Transvaser les solutions obtenues en 6.4.2 et 6.4.3 dans des cuves de mesure et mesurer les absorbances au spectromètre (5.7), à 525 nm par rapport à l'eau, 10 min \pm 1 min après la fin des opérations de 6.4.2 et 6.4.3.

Prendre comme résultat la différence des deux absorbances.

6.5 Nombre de déterminations

Effectuer deux déterminations sur des prises d'essai provenant du même échantillon pour essai.

6.6 Établissement de la courbe d'étalonnage

Avertissement : la gamme d'étalonnage doit être refaite tous les jours.

6.6.1 Préparer 6 fioles jaugées de 20 ml (5.11) et introduire à l'aide de la pipette (5.9) respectivement 0 — 1 — 2 — 3 — 4 et 5 ml de la solution d'acide tannique (4.1). Compléter au trait-repère avec la solution de diméthylformamide (4.3). La gamme d'étalonnage ainsi obtenue est de 0 — 0,1 — 0,2 — 0,3 — 0,4 et 0,5 mg/ml.

6.6.2 Introduire, à la pipette (5.8), dans des tubes à essais (5.10) 1 ml de chacune de ces solutions et y ajouter, à la pipette (5.8), successivement : 5 ml d'eau, 1 ml de solution de citrate d'ammonium de fer (III) (4.4), agiter pendant quelques secondes à l'aide de l'agitateur (5.6) puis ajouter 1 ml de solution d'ammoniaque (4.2) et agiter à nouveau pendant quelques secondes avec l'agitateur (5.6).

Transvaser les solutions ainsi obtenues dans des cuves de mesure et mesurer après 10 min \pm 1 min les absorbances au spectromètre, à 525 nm, par rapport à l'eau.

6.6.3 Tracer la courbe d'étalonnage en portant, en ordonnées, les valeurs de l'absorbance et, en abscisses, les concentrations correspondantes d'acide tannique de la gamme d'étalonnage (6.6.1), en milligrammes par millilitre.

Note : Cette droite ne passe pas par l'origine et aucune correction du zéro ne doit être effectuée.

7 EXPRESSION DES RÉSULTATS

La teneur en tanins, exprimée en pourcentage en masse d'acide tannique par rapport à la matière sèche, est égale à :

$$\frac{2c}{m} \times \frac{100}{100 - H}$$

où :

c est la concentration en acide tannique, en milligrammes par millilitre, de la solution d'essai, lue sur la courbe d'étalonnage (6.6.3).

m est la masse, en grammes, de la prise d'essai (6.3).

H est la teneur en eau de l'échantillon pour essai, en pourcentage en masse (6.2).

8 FIDÉLITÉ

Un essai interlaboratoire organisé en France avec la participation de 9 laboratoires dont 8 ont été retenus pour l'analyse statistique (1), chacun d'eux ayant effectué trois déterminations, a donné les résultats statistiques (évalués conformément à la norme NF X 06-041) indiqués dans le tableau.

Tableau

Échantillon	Variété sultan	Variété NK 121	Variété Argence
Moyenne	1,11	0,62	0,05
Écart-type de répétabilité, S_r	0,02	0,02	0,01
Coefficient de variation de répétabilité	1,9 %	3,3 %	21 %
Répétabilité, $2,83 S_r$	0,06	0,06	0,03
Écart-type de reproductibilité, S_r	0,07	0,03	0,02
Coefficient de variation de reproductibilité	6,1 %	4,8 %	44 %
Reproductibilité, $2,83 S_r$	0,19	0,08	0,06

9 PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée en précisant la marque et la référence de l'acide tannique retenu et le résultat obtenu. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente norme ou facultatifs ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le procès-verbal d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

(1) Ces 8 laboratoires ont utilisé lors de l'essai interlaboratoire un citrate d'ammonium et de fer (III) ayant une teneur en fer comprise entre 17 % et 20 %.



African Food Tradition rEvisited by Research

FP7 n°245025



Deliverable D.1.2.3.11. SOP for Biochemical and nutritional analysis for Group 1

Détermination de la teneur en cyanures totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP: Anti-Nutri-Cere-005-fr

Date : **23/05/2011**

Version : **1**

Ecrit par : Laetitia MESTRES

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Christian MESTRES (christian.mestres@cirad.fr) / WP2 Leader
- ...
-
-

Ce document a été approuvé par :

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD	Christian MESTRES	25/01/2011
UAC	Noël AKISSOE	14/05/2011
CSIR		
FAAU		
ESB		
FRI		
NRC		

Table des matières

1	Domaine et application	3
2	References	3
3	Définitions	3
4	Principe	3
5	Reactifs	4
6	Appareillage	4
7	Procédure	5
8	Expression des résultats	6
8.1	Methode de calcul et formules	6
8.2	Répétabilité.....	6
9	Points critiques et Note sur la procédure.....	6
10	Rapport d'essai	6
11	Revision record.....	6
12	Annexes :	7

Détermination de la teneur en cyanures totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Anti-Nutri-Cere-005-fr

Date : 23/05/2011

Version : 1

1 DOMAINE ET APPLICATION

Cette méthode est une adaptation (Padonou et al., 2005) de celle décrite par Essers et al (1993) pour le dosage des composés cyanogéniques dans les produits végétaux.

2 REFERENCES

Padonou P., Mestres C., Nago M.C. **2005**. The quality of boiled cassava roots: instrumental characterization and relationship with physicochemical properties and sensorial properties. *Food Chemistry* 89, 261-270.

Essers A. J. A, Bosveld M, Van der Grift R M, Voragen A G. J. **1993**. Studies on the quantification of specific cyanogens in cassava products and introduction of a new chromogen. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **63**, 287 – 296.

3 DEFINITIONS

Les cyanures sont les composés de l'anion CN⁻, formé d'un atome de carbone lié par une liaison triple à un atome d'azote. Le cyanure est un produit extrêmement toxique et mortel par anoxie. Il se rencontre naturellement dans beaucoup d'aliments et de plantes sous forme d'hétérosides cyanogéniques.

4 PRINCIPE

Les cyanures sont dosés par la méthode modifiée d'Essers et al. (1993). Les composés cyanés subissent une dégradation par une β -glucosidase, puis révélation par une réaction colorée et mesure de l'absorbance à 610 nm.

Détermination de la teneur en cyanures totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Anti-Nutri-Cere-005-fr

Date : 23/05/2011

Version : 1

5 REACTIFS

Gamme cyanures (KCN, MM=65,11)

- Préparer une solution-mère : peser environ exactement 100 mg dans 100 mL de soude 0,
- Diluer 50 fois cette solution-mère : 1 mL dans 50 mL de NaOH, c'est la solution fille

Acide orthophosphorique 0,1 M

- Diluer 6,74 mL d'acide orthophosphorique dans 1 L d'eau distillée.

Tampon tris-phosphate pH6,0; 0,1 M

- Dissoudre 38 g de phosphate de sodium tri-sodique dans 1 L d'eau distillée. Ajuster le pH à 6,0 par ajout d'acide orthophosphorique concentré.

Beta-glucosidase (Sigma G0395 from almonds)

- Dissoudre 10 mg de beta-glucosidase dans 10 mL de tampon pH6,0. Diluer 10 fois (5 mL dans 50 mL) avec du tampon pH 6,0. L'activité doit être supérieure ou égale à 5 μ M/min/mL.

Chloramine T

- Dissoudre 0,5 g de chloramine T dans 25 mL d'eau distillée. **Cette solution est à préparer chaque jour.**

Réactif coloré

- Dissoudre 3,7 g de soude dans 200 mL d'eau distillée. Ajouter 7 g d'acide 1-3-diméthyl-barbiturique et 5,7 g d'acide isonicotinique. Agiter pendant plusieurs heures. Ajuster le pH entre 7,0 et 8,0 avec de la soude ou de l'acide 0,1 N. ce réactif se conserve à température ambiante une douzaine de jours.

6 APPAREILLAGE

- Agitateur magnétique
- Centrifugeuse avec rotor pour tube de 50mL.
- pHmètre.

Détermination de la teneur en cyanures totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Anti-Nutri-Cere-005-fr

Date : 23/05/2011

Version : 1

7 PROCEDURE

Extraction des composés cyanogéniques

Dans un erlen de 50 mL, peser environ exactement 4 g de poudre de l'échantillon.
Ajouter 25 mL d'acide orthophosphorique 0,1 M.
Boucher et mettre en agitation pendant 5 minutes
Centrifuger à 2000 g pendant 5 minutes

Dosage des composés cyanogéniques

Dans un tube à essai, déposer 0,1 mL d'extrait (surnageant)
Ajouter 0,4 mL de tampon pH 6,0 et 0,1 mL de la solution de β -glucosidase
Laisser agir à température ambiante pendant 20 minutes
Ajouter 0,6 mL de soude 0,2 N
Agiter et laisser reposer pendant 5 minutes
Ajouter 2,8 mL de tampon pH 6,0 et agiter
Ajouter 0,1 mL de solution de chloramine T
Agiter et laisser reposer 5 minutes
Ajouter 0,6 mL de réactif coloré
Agiter et laisser reposer 10 minutes
Lire l'absorbance à 610 nm

Réalisation de la gamme étalon

Pour la gamme étalon, préparer 5 tubes témoins, comme indiqué dans le tableau ci-dessous) :

Tube	Solution fille (μ l)	Acide orthophosphorique 0,1 M (μ l)	[KCN] μ M/mL
1	0	100	0
2	25	75	0,08
3	50	50	0,15
4	75	25	0,23
5	100	0	0,31

Détermination de la teneur en cyanures totaux dans les produits céréaliers fermentés

SOP : Anti-Nutri-Cere-005-fr

Date : 23/05/2011

Version : 1

8 EXPRESSION DES RESULTATS

8.1 Methode de calcul et formules

$$[\text{KCN}] = ([\text{KCN1}] * V_E * (65,11 - 39,11 + 1) / m$$

Où [KCN] = teneur en cyanures de l'échantillon (mg / kg)
[KCN1] = teneur en cyanures de l'extrait en $\mu\text{M}/\text{mL}$
Ve = Volume de diluant utilisé pour l'extraction (25 mL)
M = masse de l'échantillon (g)

8.2 Répétabilité

L'écart type entre des répétitions réalisées dans un court intervalle de temps ne dépassera généralement pas 5% de la moyenne (coefficient de variation)

9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

ATTENTION : le cyanure est un composé particulièrement toxique. Le cyanure de potassium et les solutions de cyanures sont à manipuler avec précaution (hotte, gants). Le cyanure de potassium sera conservé dans un coffre fermé à clef et les solutions rapidement éliminées après dosage.

10 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

Le rapport d'essai doit inclure tous les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon.

11 REVISION RECORD

Date	Personne responsable	Description de la modification
14/05/2011	Noël AKISSOE	Edition

Détermination de la teneur en cyanures totaux dans les produits céréaliers fermentés
SOP : Anti-Nutri-Cere-005-fr

Date : 23/05/2011

Version : 1

12 ANNEXES :

Padonou P., Mestres C., Nago M.C. **2005**. The quality of boiled cassava roots: instrumental characterization and relationship with physicochemical properties and sensorial properties. *Food Chemistry* 89, 261-270.

The quality of boiled cassava roots: instrumental characterization and relationship with physicochemical properties and sensorial properties

Wilfrid Padonou^a, Christian Mestres^{b,*}, Mathurin Coffi Nago^a

^a *Faculté des Sciences Agronomiques, Université d'Abomey Calavi, 01 BP 526 Cotonou, Benin*

^b *CIRAD-CA, Programme Cultures Alimentaires, TA 70116, 73 Avenue JF Breton, 34398 Montpellier Cedex 5, France*

Received 17 June 2003; received in revised form 16 February 2004; accepted 16 February 2004

Abstract

The physicochemical properties of twenty promising new improved cassava cultivars (13 sweet and 7 bitter), harvested at maturity in Benin, were assessed. In parallel, instrumental measurements and sensorial tests were performed to assess boiled cassava quality. These properties and physicochemical properties were tentatively correlated. The colour score of boiled cassava tuber was closely correlated with ΔE measured on fresh pulp, while mealiness (or friability) could be assessed by resistance to penetration, measured on cooked tuber slices. Mealiness could also be predicted from starch functional properties (such as apparent viscosity after pasting), cyanide potential and the water content of fresh tubers. The cassava tubers had a narrow amylose content range (18.2%–22.6% starch basis). In addition, bitter cultivars appeared to be quite homogeneous with, in particular, high sugar and protein contents but low fibre contents. They also had original starch functional properties, with high solubility and low paste viscosity.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cassava; Colour; Texture; Functional properties; Sensory properties

1. Introduction

Cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) is one of the most important root crops in tropical countries. In Benin, production has multiplied almost fivefold in the last 20 years, reaching an estimated 2 million tons in 1997 (FAO, 1997). Cassava roots are consumed in Benin in several forms, including boiled in water, roasted, fried or after conversion into intermediate products, such as gari, flour (from dried chips), tapioca or starch. Boiled cassava (fingnin dida) is one of the most common forms of consumption in both rural and urban areas. It is prepared by peeling, cutting and boiling fresh cassava roots. The main quality attributes of boiled cassava are whiteness, sweetness and friability, all of which should be high.

The sensory quality of cassava roots is an important factor for the acceptance of new improved cultivars by farmers (Safo-Kantaka, Boampong, & Asante, 2002). It is also one of the major reasons for the use of a harmful bitter cultivar in Malawi, as farmers there believe that bitter cultivars give a whiter flour and a less elastic stiff porridge (Chiwona-Karlton et al., 1995). However, although some publications deal with variation in starch quality with cultivar and age of plant (Defloor, Dehing, & Delcour, 1998; Eggleston, Omoaka, & Arowshegbe, 1993; Moorthy & Ramanujam, 1986) particularly with a view to industrial use, very little is known about the cultivar effect on the quality of traditional dishes prepared from cassava roots. Studies by Wheatley and Gomez (1985) and Asaoka, Blanshard, and Rickard (1991) showed an effect of both cultivar and age at harvesting on the organoleptic properties (taste and texture) of boiled cassava pieces from four cultivars. However, they were unable to find any relationship between organoleptic quality and the physicochemical

* Corresponding author. Fax: +33-46-761-4444.

E-mail address: mestres@cirad.fr (C. Mestres).

characteristics of tubers or starch and concluded that further data on cassava root quality were required.

More data are available on the texture of boiled potato, particularly with regard to its friability (or mealiness), the principal sensory attribute of boiled potato tuber (Unrau & Nylund, 1957). It is generally held that tuber friability is due to cell rupture on chewing (Warren & Woodman, 1974). Several authors have related potato friability to starch content or starch properties. Starch swells during boiling, inducing a distension of the cell wall which facilitates cell separation in mealy potatoes (McComber, Osman, & Lohnes, 1988). However, no clear correlation has been found between starch content or starch properties and potato friability (McComber et al., 1988; Warren & Woodman, 1974) and other authors have hypothesized that friability should also or primarily be linked to cell wall properties (Iritani, Powers, Hudson, & Weller, 1977; Nonaka, 1980).

The aim of this paper is to assess the organoleptic properties of boiled cassava roots from 20 promising new improved cultivars harvested at maturity in Benin, to develop instrumental tests than can be routinely used to screen cassava cultivars for root quality, and to attempt to relate the sensory qualities of cassava roots to their physicochemical properties.

2. Materials and methods

2.1. Material

Twenty cassava cultivars were grown at the Centre for Food Plant Research in Niaouli, part of the Benin National Institute of Agronomic Research. Thirteen of these cultivars were sweet and seven bitter. The roots were harvested 13–15 months after planting and immediately transferred to the laboratory, where they were stored at 4 °C and analyzed within a few days. Part of the sample of each cultivar was peeled, cut into pieces, oven-dried at 45 °C for several days, then milled in a centrifuge mill (Roetsch, Haan, Germany) with a 250 µm outlet sieve.

2.2. Sensory evaluation

Roots were peeled, cut into pieces, washed twice and boiled for 40–45 min. Four samples were prepared simultaneously for each test and assessed by a panel of twenty people. The panel was previously selected and trained for taste and colour attributes of yam thick paste (Mestres, Dorthe, Akissoé, & Houhouigan, 2004). Three attributes were considered to be the most important by the panel considering boiled cassava roots: colour, friability and taste. The assessors were thus trained to quantify these attributes on a semi-structured scale (1–5) by tasting 4 cultivars among the 20 (two sweet and two

bitter) with 4 replications. The scale was fitted by consensus for the three attributes: from yellowish (1) to perfectly white (5) for the colour, from hard (1) to very friable (5) for the friability (this was evaluated by the disintegration ability between fingers and in the mouth) and from bitter (1) to very sweet (5) for the taste. After training, each cultivar was tested once and mean value and standard error calculated.

2.3. Penetration test

A penetration test was performed to determine the firmness of the cooked roots. Two roots of each cultivar were peeled and three 2.5 mm thick slices were cut from each root and cooked with open steam for 20 min. Firmness was assessed using a Texture Analyser (Stevens-LFR) equipped with a cone penetrator moving at 2 mm/s to a final penetration depth of 3 mm. Firmness was defined as the maximum value reached during the test. Each result was expressed as the mean value (in Newton) of 72 readings. Twelve measurements were made on each slice (four different readings for the outer, the middle and the inner part of the slice).

2.4. Colour

Colour was evaluated using a chromameter (Minolta) on fresh cassava pulp obtained by crushing the peeled root with a pestle and mortar. The chromameter was calibrated each day with a white ceramic. The International Lab system (L*, a* and b) was used and ΔE , the total difference from the white ceramic standard, was calculated (Hounhouigan, Nout, Nago, Houben, & Rombouts, 1993).

2.5. Proximate analysis

The water content of fresh roots was determined after heating root pieces at 105 °C for several days. All other functional and physicochemical analyses were performed on cassava flour in duplicate. Moisture content was determined after heating at 105 °C for 24 h. Protein content was calculated from nitrogen determination by the Kjeldahl procedure using 6.25 as conversion factor, while lipid content was determined after extraction with petroleum ether (AACC, 1984). Total sugar content was determined using the Luff–Schoorl procedure (Lees, 1968) and total fibre content according to Osborne and Voogt (1978). Total cyanide content was assessed by the procedure of Essers (1995) except that linamarase was replaced by beta-glucosidase from almonds (Sigma # G 0395).

2.6. Starch physicochemical and functional properties

The amylose content of the cassava flour was determined using differential scanning calorimetry according

to Mestres, Matencio, Pons, Yajid, and Fliedel (1996), while gelatinization onset temperature and enthalpy change were determined during the heating run at 10 °C min⁻¹ (Mestres & Rouau, 1997a). Intrinsic viscosity was measured at 35 °C in 0.2 N potassium hydroxide solution according to Mestres and Rouau (1997a). The pasting behaviour of the flour was determined on 8% (db) water dispersion using a Rapid Visco Analyser (RVA, Newport Scientific, Narabeen, Australia). The dispersion was heated from 35 to 80 °C at 6 °C min⁻¹, held at 80 °C for 3 min then cooled to 50 °C at 6 °C min⁻¹. Pasting temperature and maximum and final viscosities (V_{\max} and V_{fin} , respectively) were recorded on the profile. Solubility and swelling power were determined on 4% dry matter paste prepared in the RVA: the dispersion was heated from 35 to 70 °C at 6 °C min⁻¹, then held at this temperature for 3 min. The paste was immediately centrifuged and swelling and solubility determined according to Mestres, Nago, Akissoë, and Matencio (1997c).

2.7. Statistical analysis

Analysis of variance and comparison of means were performed using Minitab 13.2 (Minitab Sarl, Paris, France), considering two groups of cultivars (with low and high cyanide content). Principal component analysis

and regression models were also performed, using STAT-ITCF software (ITCF, Boigneville, France).

3. Results and discussion

3.1. Chemical composition

A great variation in the water content of fresh roots was observed: it ranged from 60.3% to 87.1% (wb) without any significant difference between sweet and bitter cultivars (Table 1). The range lay between that observed by Wheatley and Gomez (1985) on four cultivars harvested at various ages and seasons (from 65 to 74% wb) and the extremely wide one observed by Zakhia, Wheatley, O'Brien, and Dufour (1994) on a collection of 565 cultivars (from 52 to 87% wb). Proximate analysis of the dried roots revealed a low lipid content (mean value of 0.56% db) with a very low variation between cultivars (coefficient of variation of 12%). The variation was two to three times higher in the case of the total sugar, fibre and protein contents. Bitter cultivars had higher total sugar and protein contents but lower fibre content. This was particularly striking in the case of total sugar content, which was more than twice as high in bitter cultivars (mean value of 5.5% db) reaching a value of 8.9% (db) for the TMS91/02324 cultivar. The

Table 1
Chemical composition of peeled cassava roots (first column, wet basis) and cassava flours (other columns, dry basis)

Cultivars	Water	Amylose	Total sugars	Fibres	Proteins	Lipids	Cp ^a
<i>Sweet cultivars</i>							
TMS 94/0177	75.2	18.1	2.09	2.63	1.67	0.53	10.3
TMS 94/0461	69.6	16.5	2.28	4.71	1.66	0.64	8.8
TMS 92B/00061	78.8	18.1	2.22	3.29	3.17	0.45	8.2
TMS I 94/0270	67.4	17.6	1.92	3.97	3.03	0.61	8.0
TMS I 94/0239	64.0	17.4	1.76	4.19	2.76	0.56	10.1
TMS I 94/0237	65.4	16.7	2.12	4.52	3.88	0.42	8.3
TMS 94/0583	62.1	15.7	2.16	4.92	1.97	0.50	9.7
TMS 94/0192	66.8	16.4	1.90	4.01	3.07	0.58	10.1
TMS 91B/00455	87.1	15.5	2.57	4.48	2.73	0.65	9.9
TMS 92B/00068	73.8	18.0	2.43	3.41	2.86	0.62	20.0
BEN 86052	60.3	18.9	2.44	2.78	2.16	0.63	10.9
MCN 85043	65.2	19.2	2.44	3.99	2.51	0.57	11.0
RB 89509	72.4	16.8	2.09	4.42	2.65	0.53	11.4
Mean value	69.8	17.3	2.19	3.95	2.62	0.56	10.5
<i>Bitter cultivars</i>							
TMS 93/0700	80.9	17.3	4.68	3.40	2.38	0.59	15.0
TMS 92/0057	63.1	19.0	2.97	4.20	4.08	0.55	9.5
TMS 91/02327	63.1	18.1	4.92	2.65	3.47	0.50	11.9
TMS 93/0614	72.9	17.1	5.63	3.83	3.08	0.63	9.7
TMS 91/02324	63.8	17.4	8.93	2.63	3.68	0.47	9.9
TMS 93/0560	61.3	16.4	7.50	2.77	3.10	0.63	11.5
TMS 93/0517	75.3	15.9	3.60	3.24	2.82	0.59	10.1
Mean value	68.6	17.3	5.46	3.24	3.23	0.57	11.1
Overall mean value	69.4	17.3	3.3	3.70	2.84	0.56	10.7
Cvc ^b	11	6	37	20	24	12	26

^a Cyanide potential (ppm or mg/kg).

^b Coefficient of variation between cultivars.

total cyanogenic potential of the flour did not vary significantly with type of cultivar. The mean value (10.7 ppm, db) was around the FAO/WHO limit for cassava flour (10 ppm, cited by Essers, 1995) and in the same range as that measured by Kemdirim, Chukwu, and Achinewhu (1995) on Nigerian cassava flour. The cyanogenic potential was measured on flour, i.e. after a drying process known to dramatically lower the cyanogenic potential of cassava roots. This explains the low value found in our samples, particularly for bitter cultivars. It follows that measured values cannot be used to confirm the classification of cassava cultivars by bitterness.

3.2. Starch physicochemical and functional properties

The coefficients of variation of amylose content and of the thermal characteristics of starch gelatinization were low and mean values were similar for bitter and sweet cultivars (Table 2). Calculated on a starch basis (assuming a starch content of 85% db), the amylose content varied from 18.2 to 22.6%, with a mean value of 20.4%. These values and their narrow range are in agreement with previous results (Asaoka et al., 1991;

Defloor et al., 1998; Moorthy, 1994; Sriroth et al., 1999), which all showed a relatively constant amylose content (around $20\% \pm 2\%$) for cassava starch regardless of cultivar or harvest conditions. The mean values of the enthalpy change and onset temperature of starch gelatinization ($11.5 \text{ J g}^{-1} \text{ db}$ and $65.7 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively) were within the range of previous data (Defloor et al., 1998; Mestres & Rouau, 1997a; Moorthy, 1994), but in the low and high parts respectively. Intrinsic viscosity had a high coefficient of variation (25%), ranging from 39 ml/g (TMS 94/0583) to 139 ml/g (TMS 92/0057). However, both sweet and bitter cultivars had similar mean values of close to 100 ml/g, lower than the 170 to 190 ml/g reported in previous works (Bertolini et al., 2001; Mestres & Rouau, 1997a). This may be linked to interactions with other constituents, as intrinsic viscosities were measured, not on purified starch, but directly on the flour in the present study. The sample with the lowest intrinsic viscosity (TMS 94/0583) in fact had the highest fibre content (Table 1).

Dry matter solubility, after pasting at $70 \text{ }^\circ\text{C}$, was significantly higher (at 10% level) for bitter cultivars, whereas their swelling power mean values were not significantly different from that of sweet cultivars (11.1 versus 12.4 g/g , Table 3). Swelling power values, mea-

Table 2
Starch physicochemical characteristics

Cultivars	Gelatinization		Intrinsic viscosity (ml/g db)
	Enthalpy (J/g db)	Onset temperature ($^\circ\text{C}$)	
<i>Sweet cultivars</i>			
TMS 94/0177	13.3	66.6	133
TMS 94/0461	11.1	65.4	63
TMS 92B/00061	13.2	66.7	125
TMS I 94/0270	13.5	69.0	113
TMS I 94/0239	11.5	65.7	94
TMS I 94/0237	10.8	64.8	98
TMS 94/0583	7.6	65.7	39
TMS 94/0192	11.1	63.6	96
TMS 91B/00455	10.6	65.8	72
TMS 92B/00068	12.1	66.0	82
BEN 86052	12.6	64.0	99
MCN 85043	12.3	63.9	111
RB 89509	12.5	69.1	85
Mean value	11.7	65.9	93
<i>Bitter cultivars</i>			
TMS 93/0700	11.8	63.2	91
TMS 92/0057	11.8	70.3	139
TMS 91/02327	10.8	63.9	92
TMS 93/0614	12.1	65.5	95
TMS 91/02324	10.3	63.9	95
TMS 93/0560	9.5	66.0	71
TMS 93/0517	11.7	65.5	92
Mean value	11.4	65.5	96
Overall mean value	11.5	65.7	94
Cvc ^a	12	3	25

^a Coefficient of variation between cultivars.

Table 3
Functional properties of cassava flours

Cultivars	Solubility (mg/ml)	Swelling (g/g)	V_{max} (RVU)	V_{fin} (RVU)
<i>Sweet cultivars</i>				
TMS 94/0177	22.8	11.8	138	103
TMS 94/0461	37.5	13.2	73	19
TMS 92B/00061	35.4	15.5	167	127
TMS I 94/0270	19.3	8.3	110	64
TMS I 94/0239	38.4	16.2	127	93
TMS I 94/0237	33.7	17.8	152	169
TMS 94/0583	11.2	8.8	102	73
TMS 94/0192	36.6	16.6	122	51
TMS 91B/00455	19.7	10.0	69	47
TMS 92B/00068	26.9	10.1	87	34
BEN 86052	10.2	12.4	126	131
MCN 85043	30.6	11.2	74	14
RB 89509	34.1	9.7	62	2
Mean value	27.4	12.4	108	71
<i>Bitter cultivars</i>				
TMS 93/0700	40.8	11.6	70	10
TMS 92/0057	29.0	6.0	60	3
TMS 91/02327	40.8	14.8	81	22
TMS 93/0614	36.8	7.2	47	4
TMS 91/02324	43.4	15.5	74	13
TMS 93/0560	41.2	12.7	58	3
TMS 93/0517	30.1	9.6	92	27
Mean value	37.4	11.1	69	12
Overall mean value	30.9	11.9	94	50
Cvc ^a	13	28	31	42

^a Coefficient of variation between cultivars.

Table 4
Cassava root quality

Cultivars	Instrumental measurements		Sensory scores		
	Colour ΔE	Firmness (N)	Colour	Friability	Taste
<i>Sweet cultivars</i>					
TMS 94/0177	18.7	1.18	3.0	1.9	3.2
TMS 94/0461	17.0	1.47	3.3	1.8	3.2
TMS 92B/00061	21.3	1.84	2.7	1.3	3.6
TMS I 94/0270	17.2	1.58	3.3	2.1	3.4
TMS I 94/0239	18.2	0.87	2.8	3.8	2.9
TMS I 94/0237	17.1	0.87	3.1	3.6	3.4
TMS 94/0583	23.9	2.02	1.4	1.6	3.0
TMS 94/0192	19.4	1.87	2.4	1.4	3.4
TMS 91B/00455	24.1	1.69	1.5	1.7	3.6
TMS 92B/00068	17.9	0.93	3.4	3.5	3.8
BEN 86052	24.8	1.04	1.5	2.6	4.1
MCN 85043	19.1	1.53	2.7	1.8	3.8
RB 89509	17.7	1.81	3.4	1.2	3.1
Mean value	19.7	1.44	2.6	2.2	3.4
<i>Bitter cultivars</i>					
TMS 93/0700	18.5	2.06	2.2	1.8	3.0
TMS 92/0057	19.0	1.99	1.5	1.7	2.1
TMS 91/02327	19.7	1.8	2.9	2.2	3.3
TMS 93/0614	17.8	1.87	3.7	2.2	3.8
TMS 91/02324	17.8	1.86	2.8	2.4	2.4
TMS 93/0560	18.1	1.82	2.3	2.4	2.3
TMS 93/0517	17.1	2.13	3.1	2.0	2.3
Mean value	18.3	1.93	2.6	2.1	2.8
Overall mean value	19.2	1.6	2.6	2.1	3.2
Cvc ^a	13	21	28	35	48

^a Coefficient of variation between cultivars.

sured at 70 °C, were lower than those measured on cassava starch at 65 °C or 75 °C: 22 and 31 g/g, respectively (Mestres, Zakhia, & Dufour, 1997b; Mestres, Bounou, Akissoë, & Zakhia, 2000). This may be linked to the presence of residual cell walls in the flour, which can limit the swelling of the starch trapped within the cell structure. A similar phenomenon is observed when comparing the swelling power of maize flour with that of maize starch (Mestres et al., 1997c).

In addition, bitter cultivars had much lower hot paste viscosities, with a V_{fin} mean value of 12 RVU against 71 RVU for sweet cultivars (Table 3). Several bitter cultivars had a V_{fin} value close to zero, whereas several sweet ones had V_{fin} values of over 100 RVU. Similarly, Zakhia et al. (1994) reported that starch from bitter cultivars generally gave lower paste viscosities measured with a Viscoamylograph. Also, Malawi farmers claim that bitter cultivars give a less elastic stiff porridge than sweet cultivars (Chiwona-Karlton et al., 1995).

3.3. Characterization of roots

The total difference of freshly ground cassava pulp from the white ceramic standard (ΔE) varied between

17.0 and 24.8, with no significant difference between the two types of cultivar (Table 4).

After boiling in water, the root slices were scored for colour, friability and taste. Standard deviation for individual determinations ranged between 0.55 and 0.76 and standard deviation of mean score for the 20 assessors was 0.13 for colour and friability and 0.17 for taste. Mean scores were then used as single determinations for ANOVA processing. Colour scores ranged from 1.4 for TMS 94/0583, which had a yellowish colour, to 3.7 for TMS 93/0614, the whitest sample. There was no significant difference in the colour scores between sweet and bitter cultivars. However, Chiwona-Karlton et al. (1995) reported that farmers in Malawi prefer bitter cultivars as these give a much whiter flour. This discrepancy may be linked to the drying process, as colour was evaluated on freshly ground pulp or boiled root slices in our study.

The sensory score for the colour of boiled cassava roots was very significantly correlated with the ΔE of the fresh pulp ($r = 0.78$; Fig. 1). The colour score could thus be predicted from the instrumental measurement of pulp whiteness according to the formula:

$$\begin{aligned} \text{Colour score of boiled cassava} \\ = 7.0 - 0.23 \times \Delta E \text{ of fresh pulp.} \end{aligned}$$

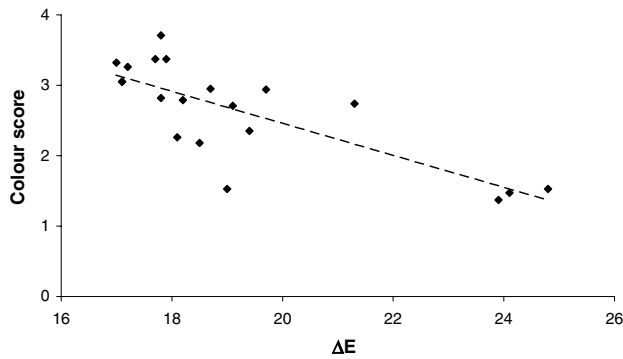


Fig. 1. Relationship between ΔE measured on fresh pulp and colour score of boiled tubers.

Firmness, determined on steam cooked root slices, ranged from 0.87 N (TMS I 94/0237 and TMS I 94/0239) to 2.13 N (TMS 93/0517) (Table 4). Sweet cultivars had a significantly lower firmness than bitter ones (mean values of 1.44 and 1.93 N, respectively). In parallel, the panel scored the boiled cassava slices for friability. Scores ranged from 1.2 for RB89509 to 3.8 for TMS I 94/0239, the most friable sample. Despite great variability between samples (coefficient of variation of around 30%) there were no significant difference in the friability scores between sweet and bitter cultivars. However, the three cultivars with a friability score of over 3.5 were sweet. In addition, the four cultivars with a firmness of close to or below 1 N had the highest friability scores, i.e. close to or above 3. A firmness of close to or below 1 N should thus be chosen when screening cassava cultivars for friability. Sensory friability was in fact inversely correlated with instrumental firmness ($r = -0.75$; Fig. 2) and could be predicted from the latter according to the formula:

$$\text{Sensory friability} = -1.3 \times \text{Firmness (N)} + 4.2.$$

Similarly, Unrau and Nylund (1957) showed a negative correlation between the cooked potato mealiness and the energy required to shear mashed potato. It is generally held that tuber friability (or mealiness) is due to

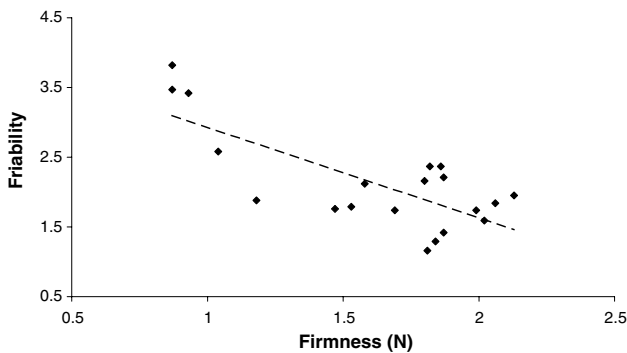


Fig. 2. Relationship between firmness of boiled tubers measured by penetration test and their friability score.

cell rupture on chewing. Accordingly, the higher the instrumental cohesion force between cells, the lower the sensory mealiness. It should be noted, however, that many other publications reported a positive correlation between potato mealiness and resistance to deformation, resulting in a rejection of the cell wall separation theory (Warren & Woodman, 1974).

BEN 86052 had the sweetest taste after boiling (score of 4.1) and TMS 92/0057 the most bitter, with a score of 2.1. As expected, bitter cultivars were rated significantly lower (mean value of 2.8) than sweet ones (mean value of 3.4), and it was possible to set the boundary between sweet and bitter cultivars at 3. However, it should be noted that several sweet cultivars were rated around or even below this limit (such as TMS I 94/0239) while some bitter cultivars had scores of above 3 (such as TMS 93/0614). This may be linked to the higher soluble sugar content of bitter cultivars (Table 1), which may mask their bitterness. In Amazonia, bitter cultivars are thus considered to give sweeter products (Dufour & Wilson, 1996).

3.4. Principal component analysis

A principal component analysis was performed to evaluate the most important variables for describing cassava quality and those able to discriminate between sweet and bitter cultivars. The first three components accounted for 21.0, 17.7 and 14.1% of the variation, respectively. The first component showed an opposition between paste viscosity (V_{\max} and V_{fin}) and firmness of boiled cassava slices (Fig. 3). Solubility was also negatively correlated with this axis. The second component was highly correlated with colour parameters (sensory colour opposed to ΔE) and proximate composition (protein content opposed to fibre content). Flour total sugar content was plotted in opposition to boiled root taste, in an intermediate position between the first and second axes. Several starch physical properties (gelatinization temperature and enthalpy change, swelling power) were highly correlated with the third component.

The 20 cultivars were plotted on a plan, with the percentage of variation associated with the first and second components (Fig. 4). Bitter cultivars were all located in the top left-hand quarter. According to variable plotting (Fig. 3), bitter cultivars were thus mainly characterized by low paste viscosities, high firmness after boiling and high solubility (negative part of the first axis) and high sugar and protein contents (positive part of the second axis), but low fibre content. Sweet cultivars were scattered over the other three quarters without any common trend. Three were plotted separately at the bottom of the graph, because of their high ΔE and poor colour score. The other sweet cultivars were scattered mainly along the first axis, revealing that the main var-

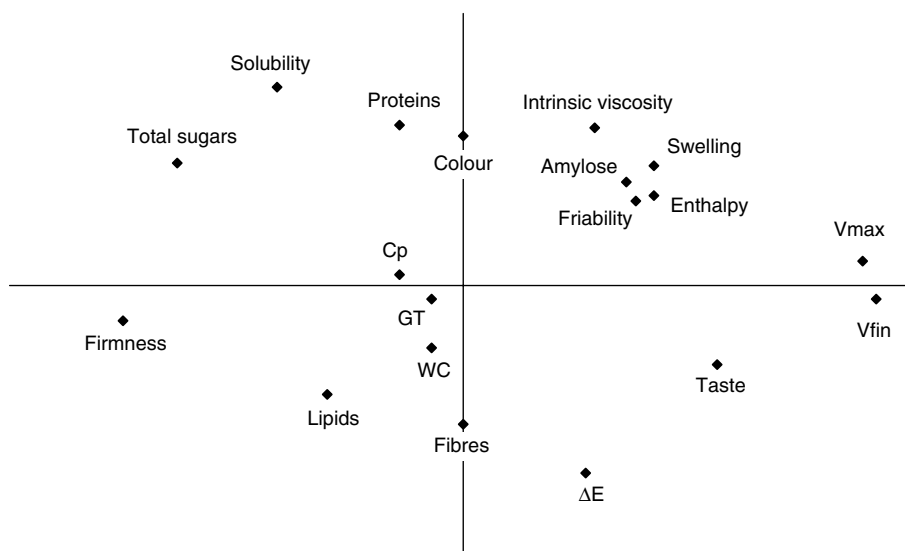


Fig. 3. Principal components plots of sensory, instrumental and physicochemical variables: first and second component; Cp, cyanide potential; GT, gelatinization temperature; WC, tuber water content.

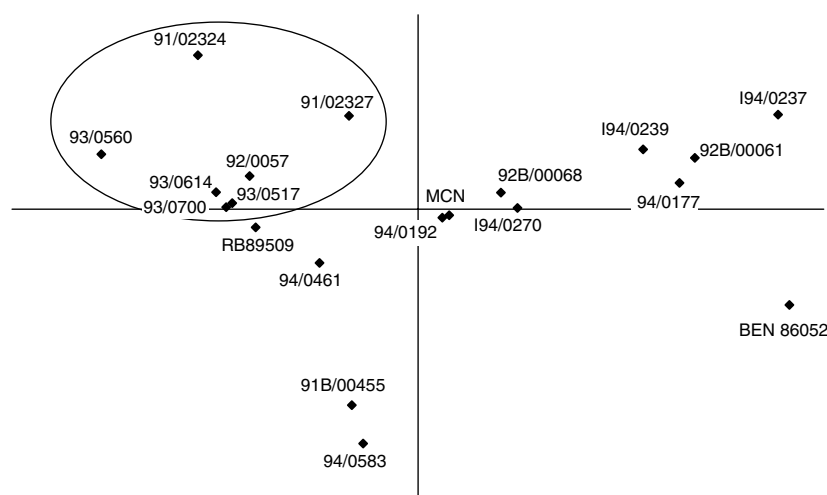


Fig. 4. Plotting of the 20 cultivars according to loadings on first and second components of principal component analysis.

iability was linked to functional properties: paste viscosity, solubility and firmness after boiling.

3.5. Regressions

None of the physicochemical characteristics was directly correlated with boiled cassava friability (Table 5). However, multiple regression analysis showed that (V_{fin}), cyanide potential (Cp) and tuber water content (WC) was able to explain 45% of sensory friability, each variable having a partial correlation coefficient of between 0.45 and 0.54:

$$\text{Sensory friability} = 2.9 + 0.007 \times V_{fin} + 0.13 \times \text{Cp} - 0.04 \times \text{WC}.$$

Instrumental firmness was however highly significantly correlated with V_{fin} (Table 5) and a regression model including V_{fin} and cyanide potential was able to explain 51% of firmness variability. In the case of potato, a positive correlation between mealiness and specific gravity is often reported even though the relationship is not always observed, particularly when agro-climatic conditions vary (Unrau & Nylund, 1957; Warren & Woodman, 1974). As specific gravity decreases as water content increases, the negative regression coefficient between cassava water content and friability agreed with general findings on potato tuber mealiness. The partial correlation with cyanide potential observed for both friability and firmness is very questionable, as it was determined on flour and certainly did not represent the

Table 5
Correlation coefficients between cassava physico-chemical characteristics and boiled cassava quality

	WC	Amylose	Total sugars	Fibres	Proteins	Lipids	Cp	Enthalpy	GT	Intrinsic viscosity	V_{\max}	V_{fin}	S70	G70	Firmness	ΔE	Colour	Taste
Amylose	-0.29	1																
Total sugars	-0.17	-0.07	1															
Fibres	0.07	-0.39	-0.56*	1														
Proteins	-0.22	0.13	0.36	-0.10	1													
Lipids	0.20	-0.12	-0.01	0.04	-0.39	1												
Cp	0.18	0.17	0.10	-0.28	-0.11	0.28	1											
Enthalpy	0.31	0.63	-0.30	-0.30	0.00	0.14	0.03	1										
GT	0.05	0.10	-0.29	0.29	0.17	0.01	-0.21	0.25	1									
Intrinsic viscosity	0.04	0.62	-0.06	-0.39	0.41	-0.27	-0.18	0.73***	0.41	1								
V_{\max}	-0.04	0.12	-0.51*	-0.07	-0.06	-0.49	-0.29	0.28	-0.09	0.32	1							
V_{fin}	-0.06	0.08	-0.49*	0.03	-0.07	-0.43	-0.31	0.18	-0.09	0.18	0.92***	1						
S70	0.00	-0.04	0.53*	-0.20	0.41	-0.20	0.07	-0.04	-0.24	0.14	-0.25	-0.40	1					
G70	-0.19	-0.05	0.06	-0.21	0.14	-0.47*	-0.13	-0.10	-0.56**	0.03	0.57**	0.48*	0.45*	1				
Firmness	0.17	-0.29	0.40	-0.01	0.15	0.01	-0.18	-0.28	0.08	-0.08	-0.48*	-0.60**	0.21	-0.37	1			
ΔE	0.04	-0.01	-0.22	0.04	-0.27	0.05	-0.08	-0.24	-0.16	-0.26	0.19	0.33	-0.65**	-0.07	0.04	1		
Colour	0.12	0.04	0.06	-0.09	0.06	-0.06	0.08	0.39	0.06	0.13	-0.01	-0.12	0.46*	0.12	-0.21	-0.78***	1	
Taste	0.22	0.26	-0.43	0.08	-0.30	0.18	0.16	0.37	-0.28	-0.13	0.28	0.38	-0.36	0.06	-0.44*	0.37	0.15	1
Friability	-0.32	0.10	0.05	-0.08	0.20	-0.03	0.29	-0.04	-0.20	-0.09	0.22	0.36	0.04	0.31	-0.74***	-0.20	0.18	0.07

* Significant at 5%.
 ** Significant at 1%.
 *** Significant at 0.1%.

real value of fresh tubers when consumed. The positive correlation between friability and hot paste viscosity agreed with the findings of Unrau and Nylund (1957) on potato. It should be noted, however, that other authors found no relationship between starch functional properties and potato or cassava friability (McComber et al., 1988; Asaoka et al., 1991). No correlation was found between friability and total fibre content, which tends to contradict the role of cell wall properties in tuber friability. However, we did not perform any specific determination of pectic substances and hemicelluloses, which were found to be linked to the texture properties of boiled sweet potato (Walter, Collins, Tuong, & Fine, 1997). Recent research has shown that these substances are important constituents of cassava pulp fibres (Salvador, Sukanuma, Kitahara, Tanoue, & Tchiki, 2000). It can thus be inferred that they ought to play a role in the friability of cassava tubers. In addition, it can be hypothesized that phenolic compounds present in cassava pulp (Buschman, Reilly, Rodriguez, Tohme, & Beeching, 2000), such as cinnamic acids, may also contribute to tuber mechanical properties by establishing crosslinks between hemicellulose chains, as observed in wheat bran (Peyron, Chaurand, Rouau, & Abecassis, 2002).

Accordingly with previous results on maize flour paste (Mestres et al., 1997c), swelling power and solubility were highly correlated with V_{fin} and V_{max} (Table 5). Seventy nine percent of V_{fin} variability was explained by solubility (S) and swelling power (G) measured at 70 °C and by intrinsic viscosity (IV):

$$V_{\text{fin}} = -29 - 4.2 \times S + 12.8 \times G + 0.61 \times IV.$$

This confirmed the preponderant role of swelling power and solubility in starchy paste viscosity. Moreover, swelling power appeared to be negatively correlated with onset gelatinization temperature and lipid content, these two variables explaining 53% of swelling power variability. Fibre content did not appear in the regression models, confirming that the functional properties of cassava flour were mainly linked to intrinsic properties of starch and not to interaction with residual cell wall material. Although the presence of residual cell walls can explain the relatively low solubility and swelling power of cassava flour compared to those of pure starch, they may not play a major role in inter-sample variability.

4. Conclusion

The colour and friability scores of boiled cassava tuber can be assessed by instrumental methods and these could be used to screen cultivars for root quality. Friability appeared to be related to starch functional properties (such as apparent viscosity after pasting), cyanide

potential and fresh tuber water content. However, further work is required to improve our understanding of the origin of tuber friability, in particular the respective role of starch and cell wall characteristics.

Bitter cultivars formed an homogeneous group with, in particular, high sugar and protein contents but low fibre content. They also had original starch functional properties, with high solubility and low paste viscosity. The origin of these unique starch functional properties has so far not been explained from their physicochemical properties and will be investigated in further studies.

Acknowledgements

The authors thank the Benin National Institute of Agronomic Research for providing cassava tubers, Françoise Matencio for her technical assistance and Garth Evans for his assistance with the English.

References

- American Association of Cereal Chemists (1984). Approved methods of the AACC. 8th edition. St Paul, Minnesota (USA).
- Asaoka, M., Blanshard, J. M. V., & Rickard, J. E. (1991). Seasonal effects on the physico-chemical properties of starch from four cultivars of cassava. *Starch*, 43(12), 455–459.
- Bertolini, A., Mestres, C., Raffi, J., Buléon, A., Lerner, D., & Colonna, P. (2001). Photodegradation of cassava and corn starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 675–682.
- Buschman, H., Reilly, K., Rodriguez, M. X., Tohme, J., & Beeching, J. R. (2000). Hydrogen peroxide and flavan-3-ols in storage roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) during postharvest deterioration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5522–5529.
- Chiwona-Karlton, L., Tylleskär, T., Rosling, H., Ngoma, J., Mahungu, N. M. & Saka, J. (1995). Reasons for use of bitter cassava – a priority in cassava production in Malawi. In *Root crops and poverty alleviation* (pp. 313–315). ISTRC-AB.
- Defloor, I., Dehing, I., & Delcour, J. A. (1998). Physico-chemical properties of cassava starch. *Starch*, 50(2–3), 58–64.
- Dufour, D. L., & Wilson, W. L. (1996). La douceur de l'amertume : une ré-évaluation des choix du manioc amer par les Indiens Tukano d'Amazonie. In A. H. C. M. Hladik, H. Pagezy, O. F. Linares, G. J. A. Koppert, & A. Froment (Eds.), *L'amélioration en forêt tropicale: Interactions bioculturelles et perspectives de développement* (pp. 875–896). Paris: CNRS/UNESCO.
- Eggleston, G., Omoaka, P. E., & Arowshegbe, A. U. (1993). Flour, starch and alternative (wheatless) breadmaking quality of various cassava clones. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62, 61–66.
- Essers, A. J. A. (1995). *Removal of cyanogens from cassava roots: Studies on domestic sundrying and solid-substrate fermentation in rural Africa*, Landbouwniversiteit, Wageningen.
- FAO. (1997). *Annuaire de production*. Roma (Italie): FAO.
- Hounhouigan, D. J., Nout, M. J. R., Nago, C. M., Houben, J. H., & Rombouts, F. M. (1993). Composition and microbiological attributes of mawè, a fermented maize dough from Benin. *International Journal of Food Science and Technology*, 28, 513–517.
- Iritani, W. M., Powers, M. J., Hudson, L., & Weller, L. (1977). Factors influencing time to breakdown (TTB) of cooked potato tissue. *American Potato Journal*, 54, 23–32.

- Kemdirim, O. C., Chukwu, O. A., & Achinewhu, S. C. (1995). Effect of traditional processing of cassava on the cyanide content of gari and cassava flour. *Plant Foods for Human Nutrition*, *48*, 335–339.
- Lees, R. (1968). *Laboratory Handbook of Methods of Food Analysis*. London: Leonard Hills Books.
- McComber, D. R., Osman, E. M., & Lohnes, R. A. (1988). Factors related to potato mealiness. *Journal of Food Science*, *53*(5), 1423–1426.
- 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*(1), 2–6.
- Mestres, C., & Rouau, X. (1997a). 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.
- Mestres, C., Zakhia, N., & Dufour, D. (1997b). Functional and physico-chemical properties of sour starch. In *Starch: Structure and functionality* (pp. 42–50). The Royal Society of Chemistry.
- Mestres, C., Nago, M., Akissoë, N., & Matencio, F. (1997c). End use quality of some African corn kernels. 2. Cooking behavior of whole dry-milled maize flours; incidence of storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(3), 565–571.
- Mestres, C., Boungou, O., Akissoë, N., & Zakhia, N. (2000). Comparison of the expansion ability of fermented maize flour and cassava starch during baking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*, 665–672.
- Mestres, C., Dorthé, S., Akissoë, N., & Houhouigan, J. (2004). Prediction of sensorial properties (colour and taste) of amala, a paste from yam chips flour of West Africa, through flour biochemical properties. *Plant Foods for Human Nutrition*, [in press].
- Moorthy (1994). Tuber crop starches. *Technical Bulletin Series*, *18*, 5–40.
- Moorthy, S. N., & Ramanujam, T. (1986). Variation in properties of starch in cassava varieties in relation to age of the crop. *Starch*, *38*(2), 58–61.
- Nonaka, M. (1980). The textural quality of cooked potatoes. I. The relationship of cooking time to the separation and rupture of potato cells. *American Potato Journal*, *57*, 141–149.
- Osborne, D. R., & Voogt, P. (1978). *The Analysis of Nutrients in Foods*. London: Academic Press.
- Peyron, S., Chaurand, M., Rouau, X., & Abecassis, J. (2002). Relationship between bran mechanical properties and milling behaviour of durum wheat (*Triticum durum Desf.*). Influence of tissue thickness and cell wall structure. *Journal of Cereal Science*, *36*, 377–386.
- Safo-Kantaka, O., Boamong, E. Y., & Asante, I. K. (2002). Morphological characterization of a collection of cassava germplasm in Ghana. In *Proceedings of potential of root crops for food and industrial resources, 12th symposium of ISTRC* (pp. 77–81). ISTRC.
- Salvador, L. D., Sukanuma, T., Kitahara, K., Tanoue, H., & Tchiki, M. (2000). Monosaccharide composition of sweetpotato fiber and cell wall polysaccharides from sweetpotato, cassava and potato analyzed by the high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 3348–3454.
- Sriroth, K., Santisopari, V., Petchalanuwat, C., Kurojanawong, K., Piyachomkwan, K., & Oates, C. G. (1999). Cassava starch granule structure-function properties: influence of time and conditions at harvest on four cultivars of cassava starch. *Carbohydrate polymers*, *38*, 161–170.
- Unrau, A. M., & Nylund, R. E. (1957). The relationship of physical properties and chemical composition to mealiness in the potato. I. Physical properties. *American Potato Journal*, *34*, 245–253.
- Walter, W. M., Jr., Collins, W. W., Tuong, V.-D., & Fine, T. I. (1997). Physical, compositional, sensory properties of french fry-type products from five sweet potato selections. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 383–388.
- Warren, D. S., & Woodman, J. S. (1974). The texture of cooked potatoes: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *25*, 129–138.
- Wheatley, C., & Gomez, G. (1985). Evaluation of some quality characteristics in cassava storage roots. *Qualitas Plantarum. Plant Foods for Human Nutrition*, *35*, 121–129.
- Zakhia, N., Wheatley, C., O'Brien, G., & Dufour, D. (1994). Screening of Ciat cassava germplasm diversity: the relationship between cyanogenic potential and cassava starch functional properties. *The cassava biotechnology network* (Vol. 2, pp. 823–830). Bogor (Indonesia): CBN.