

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE • CHIMIE BIOLOGIE

Année 2006

Étude structurale et mécanismes de formation de complexes amylose-ligand. Influence sur la rétention de composés d'arôme dans une matrice amyliacée

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences des aliments

Spécialité : Physico-chimie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Benoît BIAIS

Le 04 octobre 2006, devant le jury ci-dessous

Président M. TELLIER Charles, professeur • Université de Nantes
Rapporteurs Mme CONDÉ-PETIT Béatrice, professeur • IFSN, Zurich, Suisse
M. DELCOUR Jan, professeur • Université Catholique de Louvain, Belgique
Examineurs Mme CAYOT Nathalie, maître de conférence • ENESAD, Dijon
Mme LE BAIL Patricia, chargée de recherche • INRA, Nantes
Invité M. SEVENOU Olivier, senior technologist • United Biscuits Ltd, Royaume-Uni

Directeur de thèse : M. Alain BULÉON, directeur de recherche • INRA, Nantes

Co-encadrant : Mme Patricia LE BAIL, chargée de recherche • INRA, Nantes

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE • CHIMIE BIOLOGIE

Année 2006

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Étude structurale et mécanismes de formation de complexes amylose-ligand. Influence sur la rétention de composés d'arôme dans une matrice amyliacée

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences des aliments

Spécialité : Physico-chimie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Benoît BIAIS

Le 04 octobre 2006, devant le jury ci-dessous

Président du M. TELLIER Charles, professeur • Université de Nantes
Rapporteurs Mme CONDÉ-PETIT Béatrice, professeur • IFSN, Zurich, Suisse
M. DELCOUR Jan, professeur • Université Catholique de Louvain, Belgique
Examineurs Mme CAYOT Nathalie, maître de conférence • ENESAD, Dijon
Mme LE BAIL Patricia, chargée de recherche • INRA, Nantes
Invité M. SEVENOU Olivier, senior technologist • United Biscuits Ltd, Royaume-Uni

Directeur de thèse : M. Alain BULÉON, directeur de recherche • INRA, Nantes

Co-encadrant : Mme Patricia LE BAIL, chargée de recherche • INRA, Nantes

*La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne.
La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi.
Ici, nous avons réuni théorie et pratique :
Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi !
Albert Einstein*

Remerciements

Tout d'abord un grand merci à madame Béatrice Condé-Petit et monsieur Jan Delcour pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également monsieur Charles Tellier d'avoir accepté la présidence de ce jury de thèse ainsi que madame Nathalie Cayot et monsieur et Olivier Sève pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à madame Patricia Le Bail et monsieur Alain Buléon pour la qualité de leur encadrement, leur disponibilité et les conseils qu'ils m'ont prodigués au cours de ces trois années.

Je remercie tout particulièrement Bruno Pontoire, Cédric Gaillard, Paul Robert, Vincent Rampon et Vinh Tran de m'avoir accordé une place dans leur emploi du temps très chargé mais aussi et surtout pour l'aide précieuse qu'ils ont pu m'apporter en DRX, microscopie électronique, infrarouge, fluorescence et modélisation moléculaire. Merci également à Isabelle Goullieux et Jérôme Clément du CTCPA

C'est avec plaisir que je remercie les personnes de l'INRA qui m'ont assuré aide, soutien et ont fait vivre "le coin café" durant cette thèse. Je remercie tous les thésards et stagiaires du laboratoire et particulièrement Anh-line, David, Laurence, Najet, Jean-Pierre, Joris, Thomas (le Français), Thomas (le Suédois), et les Bulgares Nikki et Vanya pour les agréables moments passés en leur compagnie.

Je tiens à féliciter Chantal Denain pour l'organisation des doctoriales des Pays de la Loire, sans lesquelles je n'aurais pas rencontré les "voisins" : Alex, Caro, Erell, Karla, Fred, Guillaume, Laurent, Myriam et Vincent. Un énorme merci, car grâce à vous, la grisaille hivernale nantaise a été beaucoup plus facile à supporter !!!

J'ai une pensée particulière pour mes expatriés préférés : David, Julie, Sophie et Wilfried. Merci pour les séjours québécois, montpelliérains et canaulais (soon, londoniens !) que nous avons passés (et que nous passerons) ensemble. Je remercie également Fanny, Fouzia, Isabelle (la Montpelliéraine), Isabelle (la Bordelaise), Julien, Marie et Sandra et mes profs de ski attitrés : Bertrand, Estelle et Seb !! Merci à vous tous pour les apéros, les barbecues, les soirées au bord du lac, les réveillons, etc. mais aussi et surtout pour les parties de quenche !! Merci pour ces excellents souvenirs ! Si j'en ai omis certains, qu'ils me pardonnent, car à l'heure actuelle je n'ai plus qu'une idée en tête... apporter ce manuscrit à l'imprimerie !!! Encore une fois, merci à vous !

Pour finir, mes remerciements vont tout naturellement à mes parents, ma sœur et mon frère, ainsi qu'à l'ensemble de ma famille pour leur soutien quotidien. Merci pour tout...

Avant propos

Cette thèse s'inscrit dans le cadre général du Réseau Alimentation Référence Europe (RARE) et du programme CANAL - ARLE (Conception Assistée de Nouveaux Aliments - Arômes-Aliments-Emballages) coordonné par Mme E. Guichard de l'INRA de Dijon. Ce programme de recherches a pour ambition d'identifier les principaux facteurs qui gouvernent la perception de la flaveur dans des systèmes alimentaires complexes. Il vise également à comprendre les interactions entre les ingrédients de la matrice constituant l'aliment et les composés d'arôme afin d'appréhender les transferts d'arôme du produit vers l'emballage mais aussi leur diffusion à travers ce dernier. Ce programme est constitué de plusieurs groupes de travail, chacun étant dédié à l'étude de matrices spécifiques comme des jus de fruits, des desserts lactés ou des produits céréaliers de type génoise.

Le groupe de travail qui concerne la génoise (Animateur scientifique : Mme P. Le Bail) fait intervenir plusieurs partenaires : le CTCPA, la Compagnie des biscuits, Danone, United Biscuit Ltd, l'ENSIA de Massy et les centres INRA de Dijon et Nantes. Il a pour principaux objectifs d'étudier les mécanismes d'interaction entre les composés d'arôme, les macromolécules et les autres constituants de la matrice mais aussi leur impact sur la rétention et la libération des composés d'arôme. Pour répondre à ces questions, deux approches méthodologiques ont été envisagées :

- une approche dite "macroscopique" menée directement sur la génoise, par l'intermédiaire d'un post-doctorat Marie Curie effectué par M. Pozo-Bayón à l'INRA de Dijon
- une approche menée à une échelle plus "moléculaire" sur l'amidon, sujet de ma thèse effectuée à l'INRA de Nantes.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse ont fait l'objet des publications et communications suivantes :

Publications :

B. Biais, P. Le Bail, P. Robert, B. Pontoire and A. Buléon **2006** "Structural and stoichiometric studies of complexes between aroma compounds and amylose. Polymorphic transitions and quantification in amorphous and crystalline areas." *Carbohydrate Polymers*. Sous Presse.

B. Biais, P. Le Bail, P. Robert et A. Buléon **2005** "Localisation et dosage d'arômes dans des matrices amyliées en milieu concentré." *Industries des céréales*. vol. 142, pp 17-20.

P. Le Bail, B. Biais, M. Pozo Bayón and N. Cayot **2004** "The structure of complexes between amylose and aroma compounds and its impact on flavour release from a baked cereal product" *2004 GIGR International conference Beijing. Proceeding*.

Communications orales :

P. Le Bail, B. Biais and N. Cayot **2005** "Trapping and retention of ligand in starch based food matrices" *XIII International Starch Convention, Moscou, Juin 2005*.

B. Biais and M. Pozo Bayón **2004** "The structure of complexes between amylose and aroma compounds and its impact on flavor release from a baked cereal product." *COST Action 921, Valencia (Espagne), 14 et 15 Octobre 2004*.

Communications affichées :

B. Biais, P. Le Bail, P. Robert et A. Buléon **2004** "Localisation et dosage d'arômes dans des matrices amyliées en milieu concentré." *55ème journées techniques des industries céréalières. Paris. Novembre 2004*

B. Biais, P. Le Bail, P. Robert, A. Buléon **2004** "Piégeage et rétention d'arômes dans des matrices amyliées en milieu concentré." *Doctoriales des Pays de la Loire. La Roche-sur-Yon. Septembre 2004*

Liste des abréviations

- ACP : Analyse en Composantes Principales
- AED = DSC : Analyse Enthalpique Différentielle = Differential Scanning Calorimetry
- AFM : Atomic Force Microscopy = Microscopie à Force Atomique
- ATMD : Analyse Thermo-Mécanique Dynamique
- ATR : Attenuated Total Reflectance = Réflexion Totale Atténuée
- a_w : Water Activity = activité de l'eau
- modèle BET : modèle de Brunauer, Emmet et Teller
- CCD : Coupled Charged Device
- CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse
- CP/MAS : Cross Polarisation/Magic Angle Spinning
- \overline{DP} : Degré de Polymérisation moyen
- DRX : Diffraction des Rayons X
- DMSO : Dimethyl Sulfoxide
- FFH : Fraction Facilement Hydrolysable
- FT-IR : Fourier Transform - Infra Red
- modèle GAB : modèle de Guggenheim, Anderson et de Boer
- HMT : Heat Moisture Treatment
- MCBL : Microscopie Confocale à Balayage Laser
- MEB = SEM : Microscopie Électronique à Balayage = Scanning Electron Microscopy
- MET = TEM : Microscopie Électronique à Transmission = Transmission Electron Microscopy
- OSA : Octényl Succinate d'Amidon
- PATAg : Periodic Acid - Thiosemicarbazide - Argent
- RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
- RMS : Root Mean Square displacement
- $T_f = T_m$: Température de fusion = melting Temperature
- T_g : Température de transition vitreuse

Table des matières

INTRODUCTION	1
I ÉTAT DE L'ART	7

Chapitre 1

L'amidon

1.1	Composition et structure primaire	9
1.1.1	Fraction glucidique	9
1.1.1.1	L'amylopectine	11
1.1.1.2	L'amylose	13
1.1.1.3	Le matériel intermédiaire	15
1.1.2	Fraction non glucidique	15
1.1.2.1	La fraction lipidique	17
1.1.2.2	La fraction azotée	17
1.1.2.3	La fraction minérale	19
1.2	Morphologie et ultrastructure du grain d'amidon	19
1.2.1	Morphologie des grains d'amidon	19
1.2.2	Ultrastructure du grain d'amidon	21
1.2.2.1	Organisation de l'amylopectine en super-hélices	23
1.2.2.2	L'organisation en blocklets	25
1.2.2.3	Modèle de cristal liquide pour l'amylopectine	27
1.2.3	Structures cristallines et hélicoïdale	29
1.2.3.1	Approche cristallographique et modèles moléculaires	29
1.2.3.2	Mailles cristallines	31

1.2.4	Effet de l'hydratation	33
1.2.5	Taux de cristallinité des amidons natifs A et B	35
1.2.6	Analogies entre les conditions de biosynthèse in vivo et de recristallisation in vitro. Vers le type cristallin A ou B	39

Chapitre 2

Transitions hydrothermiques et utilisation du matériau "amidon"

2.1	Transitions thermiques des polymères semi-cristallins	45
2.1.1	Transition vitreuse	47
2.1.1.1	Définition	47
2.1.1.2	Effet des plastifiants	49
2.1.2	Fusion des polymères semi-cristallins	49
2.1.3	Réorganisations des fondus	49
2.2	Transitions hydrothermiques des amidons	51
2.2.1	Transition vitreuse des amidons	51
2.2.2	Fusion des domaines cristallins de l'amidon et réorganisation de fondu	53
2.2.3	Gélatinisation	55
2.2.4	Rétrogradation et gélification de l'amidon, l'amylose et l'amylopectine	57
2.2.4.1	Gélification de l'amylose	59
2.2.4.2	Gélification de l'amylopectine	59
2.2.5	Recuit de l'amidon en excès d'eau ou "annealing"	61
2.2.6	Traitement HMT, transition allomorphique du type B vers le type A	63
2.3	Domaines d'utilisation des différents amidons	65
2.3.1	Utilisation en agroalimentaire	65
2.3.1.1	Les amidons natifs et mutants	65
2.3.1.2	Les amidons modifiés	67
2.3.2	Utilisations non-alimentaires	69

Chapitre 3

Amyloses V et complexes d'inclusion

3.1	Complexes dont la structure est spécifique de l'agent complexant	75
3.1.1	Complexes V_{DMSO}	77
3.1.2	Complexes $V_{glycerol}$	77

3.1.3	Complexes V_{KOH} et V_{KBr}	77
3.1.4	Complexes V_{iode}	79
3.2	Complexes V_6 aspécifiques	81
3.2.1	Préparation des complexes d'amylose	81
3.2.2	Complexes de type V_{6I}	83
3.2.2.1	Structure cristalline et moléculaire du type V_{6I}	83
3.2.2.2	Inclusion du ligand dans la cavité hélicoïdale	85
3.2.2.3	Transition vers le type V_a	87
3.2.3	Complexes de type V_{6II}	89
3.2.4	Complexes de type V_{6III}	91
3.3	Complexes de type V_8	91
3.4	Aspects stœchiométriques des complexes d'amylose	93
3.4.1	Stœchiométrie des complexes amylose-acides gras	93
3.4.2	Stœchiométrie des autres complexes	97
3.5	Stabilité thermique des complexes V	97
3.6	Modifications des propriétés des amidons par les complexes d'amylose	99

Chapitre 4

Produits céréaliers et interactions avec les arômes

4.1	Grandes formulations à base d'amidon	105
4.1.1	Les pains et viennoiseries	105
4.1.2	Les génoises et cakes	107
4.1.3	Les biscuits	109
4.1.4	Les produits extrudés/expansés	111
4.2	Aromatisation et interactions des arômes avec l'amidon	113
4.2.1	Généralités sur les arômes alimentaires	113
4.2.1.1	Définition	113
4.2.1.2	Composition d'un arôme	113
4.2.1.3	Les différentes familles de composés d'arôme	115
4.2.2	Principes d'encapsulation des arômes	115
4.2.2.1	Matériaux poreux à base d'amidon	119
4.2.2.2	Complexes d'inclusion avec la β -cyclodextrine	121
4.2.2.3	Complexation des arômes par l'amylose	123

Chapitre 1**Matériel**

1.1	Amylose	131
1.2	Composés d'arôme	131
1.3	Produits et réactifs	133
1.4	Formulation de l'arôme de note viennoiserie	135

Chapitre 2**Méthodes expérimentales**

2.1	Détermination préalable du degré de polymérisation de l'amylose	137
2.2	Protocole de cristallisation des complexes amylose - composés d'arôme	139
2.3	Lavage des complexes	141
2.4	Préparation de la pâte et cuisson de la génoise	143
2.5	Hydrolyse acide ménagée des complexes	143
2.6	Détermination du degré de polymérisation des résidus d'hydrolyse	145
2.6.1	Dosage des oses totaux (ou neutres)	145
2.6.2	Dosage des oses réducteurs	147
2.7	Caractérisation des complexes cristallins par diffraction des rayons X aux grands angles	149
2.7.1	Principe de la méthode	149
2.7.1.1	Conditions de diffraction	149
2.7.1.2	Technique des poudres cristallines	151
2.7.2	Mise en œuvre	151
2.7.3	Calcul du taux de cristallinité	153
2.7.4	Calcul de la taille des cristaux	155
2.8	Étude de la structure des complexes par microscopie électronique à trans- mission	155
2.8.1	Principe et fonctionnement de la méthode	157
2.8.2	Préparation des échantillons	159
2.8.3	Observations	161
2.9	Étude de l'inclusion des ligands dans l'hélice d'amylose par modélisation moléculaire	163

2.9.1	Construction de l'hélice d'amylose et des ligands	163
2.9.1.1	Construction de l'hélice V ₆	163
2.9.1.2	Recherche des conformations spatiales les plus stables des composés d'arôme	163
2.9.2	Recherche des solutions d'inclusion	165
2.9.3	Minimisation énergétique des solutions d'inclusion	167
2.10	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier	169
2.10.1	Principe de la méthode	169
2.10.2	Dosage des ligands piégés dans les complexes	171
2.10.2.1	Gamme étalon et préparation des échantillons	171
2.10.2.2	Acquisition des données infrarouge	173
2.10.2.3	Détermination de la quantité de ligand par Analyse en Composantes Principales	173
2.10.3	Étude cinétique de la formation des complexes	175
2.11	Étude de la stabilité thermique des complexes par μ DSC	175
2.11.1	Principe de l'analyse enthalpique différentielle	175
2.11.2	Mise en œuvre	177
2.12	Dosage par fluorescence de la dihydrocoumarine et de la vanilline dans la génoise	179
2.12.1	Origine de la fluorescence	181
2.12.2	Mise en œuvre	183
2.12.3	Extraction et dosage des composés d'arôme de la pâte et de la génoise	183
2.12.3.1	Acquisition des données de fluorescence	183
2.12.3.2	Gammes étalons	183
2.12.3.3	Extraction des composés d'arôme	185

III RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

187

Chapitre 1

Implication des complexes d'amylose dans la rétention des composés d'arôme

1.1	Complexation des composés d'arôme en milieu modèle	189
1.1.1	Caractérisation visuelle de la complexation des composés d'arôme.	189
1.1.2	Caractérisation du type cristallin par diffraction des rayons X . . .	193

1.2	Localisation et dosage des ligands dans les complexes obtenus	195
1.2.1	Morphologie des agrégats de complexes d'amylose	197
1.2.2	Nature semi-cristalline des complexes amylose-composé d'arôme .	199
1.2.3	Dosage des ligands piégés par spectroscopie infrarouge	203
1.2.3.1	Mise en évidence des ligands complexés et calibration des dosages	203
1.2.3.2	Vers la quantification des composés d'arôme piégés . . .	205
1.2.4	Dosage des ligands dans les zones cristallines	209
1.2.4.1	Cas de l'acide décanoïque et des complexes V_{6I}	209
1.2.4.2	Cas des complexes amylose-acide hexanoïque de type V_{6II}	213
1.2.4.3	Cas des complexes amylose- δ -décylactone de type V_{6III}	215
1.2.5	Vers la stœchiométrie des complexes	217
1.3	Discussion	219

Chapitre 2

Conditions de formation des complexes et aspects cinétiques

2.1	Influence des conditions de préparation	223
2.2	Contraintes thermiques, températures de cristallisation et de fusion	229
2.2.1	Stabilité thermique des complexes amylose-composés d'arôme . .	229
2.2.2	Mise en évidence de la complexation au cours d'une montée en température par Analyse Enthalpique Différentielle	233
2.3	Cinétiques de complexation des composés d'arôme	239
2.3.1	Cinétique de complexation de l'amylose et de l'acide décanoïque .	239
2.3.2	Cinétique de complexation de l'amylose et de l'acide hexanoïque .	245
2.3.3	Cinétique de complexation de l'amylose et de la δ -décylactone . . .	249
2.3.4	Bilan de l'étude cinétique	251
2.4	Discussion	255

Chapitre 3

Inclusion des composés d'arôme et influences sur leur libération

3.1	Inclusion des composés d'arôme	261
3.1.1	Recherche des conformations stables des composés d'arôme	261
3.1.2	Inclusion des molécules dans la simple hélice d'amylose	263
3.1.2.1	Recherche systématique des solutions d'inclusion	263

3.1.2.2	Minimisation énergétique des modèles d'inclusion en situation contrainte	265
3.1.2.3	Minimisation énergétique des modèles d'inclusions en situation non-contrainte	267
3.1.2.4	Mesure de la déformation de l'hélice	271
3.1.3	Bilan sur l'inclusion des composés d'arôme	273
3.2	Stabilité et conditions de libération	277
3.2.1	Influence des lavages sur la structure des complexes et extraction des composés d'arôme	279
3.2.1.1	Complexes de type V_{6I} (acide décanoïque)	279
3.2.1.2	Complexes de type V_{6II} (acide hexanoïque) et V_{6III} (δ -décalactone)	281
3.2.2	Libération des arômes en condition d'hydrolyse	283
3.3	Discussion	287

Chapitre 4

Vers une matrice alimentaire...

4.1	Mise en évidence de la complexation dans une génoise	293
4.2	Devenir des composés d'arôme dans la génoise avant et après cuisson . . .	295
4.2.1	Fluorescence intrinsèque de composés d'arôme	295
4.2.2	Dosage de la vanilline et de la dihydrocoumarine dans la génoise .	297
4.3	Co-complexation acide décanoïque/ δ -décalactone	299

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 307

Bibliographie 321

ANNEXES 357

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'amidon est un élément essentiel dans l'alimentation humaine. Il constitue une source d'énergie importante pour l'organisme, et est en partie digéré sous forme de glucose avant d'être absorbé par l'intestin (une proportion, comme les amidons résistants, peut être fermentée dans le colon). L'amidon est présent dans une grande majorité d'aliments, par exemple en tant que constituant de la farine, pour tous les produits céréaliers mais aussi dans les tubercules (pomme de terre, manioc...). Il est également très employé comme additif et agent améliorant la texture des produits alimentaires. Il est fréquemment soumis à des traitements hydrothermiques lors de la cuisson d'aliments ou au cours de la transformation en additif alimentaire. Au cours de ces traitements, l'amidon subit des modifications structurales importantes. La structure granulaire est détruite et l'amylose et/ou l'amylopectine peuvent se réorganiser ou interagir avec d'autres molécules présentes dans le milieu. L'amylose est particulièrement bien connue pour sa capacité à former des complexes avec de nombreux ligands et particulièrement avec des acides gras. De plus, il est établi depuis longtemps qu'une partie du processus de vieillissement d'une denrée alimentaire est imputable à une recristallisation de l'amylose et de l'amylopectine et que la formation de complexes entre des lipides et l'amylose retarde ce rassissement.

Un critère de qualité important pour un produit est la constance de son profil aromatique. Au cours de son élaboration, des composés d'arôme peuvent être ajoutés pour renforcer la saveur du produit. Ces molécules sont mélangées aux autres constituants (dont l'amidon) et il en résulte toujours une perte et/ou une altération de la note aromatique initiale. De plus, au cours du stockage et du vieillissement des produits finis, des pertes et modifications d'arômes se surajoutent aux précédentes.

Dans ce contexte, l'étude des interactions entre deux ingrédients aussi importants (amidon et arôme) apparaît comme essentielle afin de mieux comprendre et maîtriser l'évolution du profil aromatique d'une matrice alimentaire amyliée. Cependant, la complexité de ces matrices,

également constituées de lipides et de protéines ne permet pas d'évaluer clairement la participation de l'amidon dans la rétention des arômes. Il est alors important de privilégier une approche basée sur des milieux modèles plus simples. L'amylose, par ses capacités de complexation, est un support d'arôme potentiel, particulièrement intéressant pour de telles études.

Cette thèse a pour objet une meilleure compréhension des interactions, en milieu modèle, entre l'amylose et une vingtaine de composés d'arôme. Ces interactions peuvent conduire à la formation de complexes semi-cristallins dans lesquels sont piégés des composés d'arôme. La majeure partie de ce travail est consacrée à l'étude de la structure de ces complexes et de leurs mécanismes de formation. Pour tenter d'extrapoler les résultats obtenus à une matrice alimentaire, une partie de l'étude a également porté sur une matrice plus complexe : la génoise.

La première partie de ce manuscrit dresse un portrait de l'état des connaissances actuelles concernant l'amidon, le premier chapitre étant dédié aux amidons, à leur organisation et à leur structure. Les modifications structurales des amidons liées aux différents traitements hydrothermiques et les différents domaines d'utilisation des amidons sont décrits dans le chapitre 2. Le troisième chapitre est consacré aux nombreux types de complexe d'amylose, à leur structure et à leurs propriétés. Enfin le quatrième chapitre présente les principales formulations de produits céréaliers et les méthodes d'encapsulation de molécules pour l'aromatization de ces produits.

La deuxième partie s'attache à décrire les différentes méthodes qui ont été mises en œuvre pour cette étude.

La troisième partie de ce manuscrit présente l'ensemble des résultats obtenus. Tout d'abord concernant l'identification des complexes amylose-composés d'arôme, leur étude structurale à différentes échelles et la quantification des molécules piégées (Chapitre 1). Les conditions de formation et les cinétiques de cristallisation sont abordées dans le deuxième chapitre. L'inclusion des composés d'arôme dans l'hélice d'amylose et son influence sur la stabilité du complexe ou la libération des molécules piégées est discutée dans le chapitre 3. Le quatrième et dernier chapitre est consacré aux études menées sur des matrices plus élaborées (composés d'arôme en mélange) et sur la génoise.

Première partie

ÉTAT DE L'ART

Chapitre 1

L'amidon

L'amidon est un polysaccharide d'origine végétale. C'est la principale source et réserve glucidique synthétisée par les végétaux supérieurs au cours de la photosynthèse. L'amidon est essentiellement produit par les céréales, les tubercules et les légumineuses. La production annuelle européenne est supérieure à 7 700 000 tonnes, dont 49 % proviennent du maïs, 29 % du blé et 22 % de la pomme de terre (Röper, 2002). Les domaines d'utilisation de l'amidon sont très vastes et concernent les secteurs alimentaires (4,3 millions de tonnes) ou non-alimentaires (3,4 millions de tonnes).

1.1 Composition et structure primaire

L'amidon se présente à l'état natif sous forme de grains d'une taille variant de un micron à une centaine de microns suivant l'origine botanique. L'amidon est constitué de deux fractions : une fraction glucidique qui représente 98 à 99 % et une fraction non glucidique (0.1 à 2 %).

1.1.1 Fraction glucidique

L'amidon est principalement constitué d'un mélange de deux polymères : l'amylopectine et l'amylose, en proportions variables en fonction de l'origine de l'amidon. Ce sont des polymères d' α -D glucopyranosyl. Les monomères sont sous la forme la plus stable, c'est-à-dire la

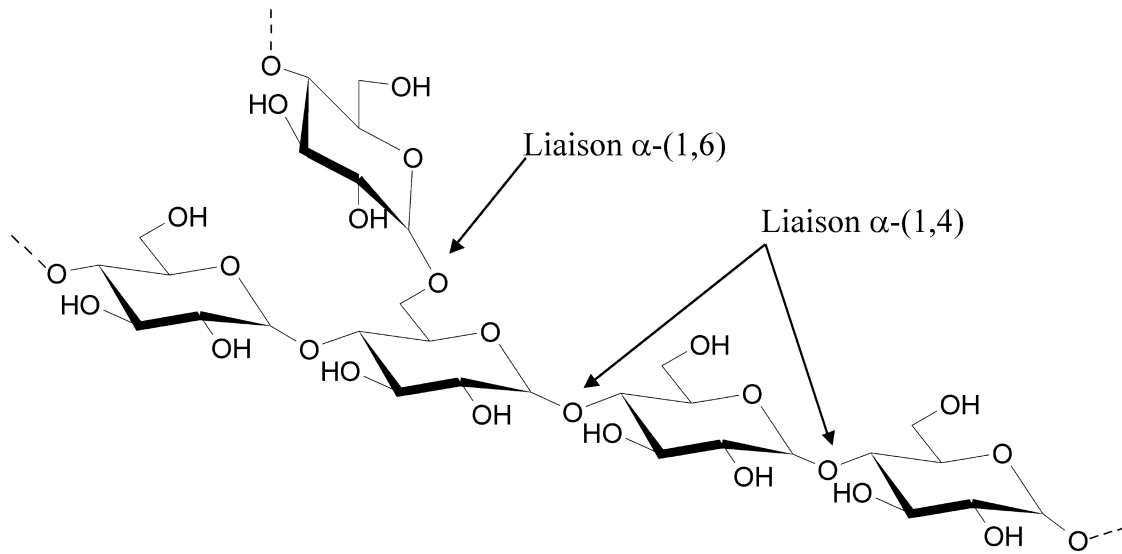


FIGURE 1.1 – Liaisons α -(1,4) et α -(1,6) reliant les monomères de glucose dans l'amidon. D'après Robin et al. (1974).

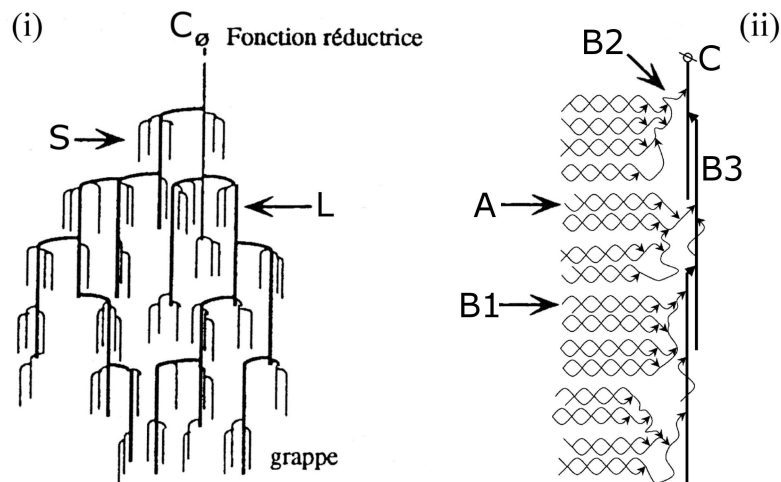


FIGURE 1.2 – Modèle en grappes de l'amylopectine.(i) D'après Robin et al. (1975). (ii) D'après Bertoft (2004).

conformation chaise 4C_1 ; ils sont reliés entre eux par des liaisons α -(1,4) et dans une moindre mesure (4 à 5 %) des liaisons α -(1,6) (Figure 1.1) (Schoch, 1945; French, 1984; Buléon et al., 1998a). Chaque polymère possède une seule extrémité réductrice libre. Même si l'unité de base est identique pour les deux polymères, ils sont très différents par leur taille et leur degré de ramification.

1.1.1.1 L'amylopectine

Le plus souvent, l'amylopectine représente 70 à 80 % de la fraction glucidique, et jusqu'à 99 % pour des variétés dites cireuses ou waxy en anglais (maïs, sorgho, riz et orge). Les unités glucose de l'amylopectine sont essentiellement reliées par des liaisons de type α -(1,4) mais 5 à 6 % de liaisons de type α -(1,6) confèrent à l'amylopectine une structure très ramifiée. Les premiers modèles structuraux de l'amylopectine présentaient une ramification homogène de la molécule. Kainuma et French (1972) ont établi un modèle à ramification hétérogène plus en accord avec les résultats expérimentaux. Dans ce modèle, modifié par Robin et al. (1975) (Figure 1.2(i)), l'amylopectine est constituée d'un ensemble de grappes formées de chaînes courtes d'un degré de polymérisation moyen (\overline{DP}) de 15-20 (chaînes S (short) ou chaînes A). Celles-ci sont reliées entre elles par des chaînes plus longues avec un \overline{DP} de 40-45 et appelées L (Long ou chaînes B). Burchard et Thurn (1985) et Thurn et Burchard (1985) ont par la suite légèrement modifié ce modèle en précisant que l'unique extrémité réductrice est portée par une chaîne de \overline{DP} supérieur à 60 (chaîne C) sur laquelle se greffent les chaînes B.

Ce modèle a ensuite été complété par plusieurs auteurs (Hizukuri, 1985, 1986; Hanashiro et al., 1996; Bertoft, 2004). Les chaînes S sont subdivisées en deux groupes : des chaînes de \overline{DP} 12-16 (Chaînes A) et des chaînes B1 de \overline{DP} 20-24. Les chaînes L sont subdivisées en chaînes B2 de \overline{DP} 42-55 et quelques chaînes B de \overline{DP} supérieur à 60 (B3). Les chaînes A sont essentiellement liées aux B1, elles-même reliées aux B2 ou B3 (Figure 1.2(ii)). Chaque ensemble d'une chaîne A et d'une chaîne B1 constitue un "cluster", alors que les chaînes B2 ou B3 peuvent porter deux, trois ou plus de clusters. Bertoft (2004) a récemment proposé un nouveau modèle dans lequel les clusters sont reliés à un squelette constitué des chaînes B3 qui

	Limite de β -amylolyse (%)	Capacité de liaison à l'iode (mg/100 mg)	λ_{max} (nm)	Viscosité intrinsèque (ml/g)
Amylose	70-80	20	620-640	140-280
Amylopectine	50-60	<1	540	120-190
Matériel intermédiaire	<70	9.5-12	580	-

TABLEAU 1.1 – Comparaison de propriétés physico-chimiques de l'amylose, l'amylopectine et du matériel intermédiaire. D'après Banks et Greenwood (1975).

s'étend presque perpendiculairement à l'axe des chaînes A et B1.

La structure en grappe confère à l'amylopectine, des propriétés physico-chimiques particulières :

- une faible capacité de liaison à l'iode, inférieure à 1 mg/100 mg d'amylopectine avec un maximum d'absorption $\lambda_{max} = 540$ nm (Tableau 1.1).
- une viscosité intrinsèque très faible de l'ordre de 120 à 190 ml/g (à 22.5 °C dans KOH 1 mol/l), compte tenu de sa masse molaire très élevée (10^7 à 10^8 g/mol).

1.1.1.2 L'amylose

L'amylose représente environ 20 à 30 % de la partie glucidique des amidons. Mais cette quantité peut varier jusqu'à 80 % (pour certaines variétés de maïs (*Zea mays*), d'orge (*Hordeum vulgare*), de riz (*Oriza sativa*) ou de pois (*Pisum sativum*)). L'amylose est une molécule essentiellement linéaire, composée de 500 à 6000 unités α -D glucopyranosyl, réparties sur 1 à 20 chaînes différentes d'un \overline{DP} moyen de 500. Banks et Greenwood (1975) ont montré que le nombre de liaison α -(1,6) est faible et réparti de façon aléatoire (Takeda et al., 1992), il semble cependant qu'elles soient fréquemment situées près de l'extrémité réductrice. Le caractère branché de l'amylose a été mis en évidence par action de la β -amylase qui hydrolyse les liaisons α -(1,4) pour former du maltose. Au cours de cette hydrolyse, seuls 70 à 80 % de l'amylose sont dégradés en raison de la présence des liaisons α -(1,6) qui stoppent l'activité enzymatique. Le taux de branchement est d'autant plus grand que la masse de l'amylose est importante (Takeda et al., 1992) mais il dépend aussi de l'origine botanique de l'amylose (Hizukuri et al., 1981). La masse molaire de l'amylose est généralement comprise entre $2 \cdot 10^5$ et $2 \cdot 10^6$ g/mol et dépend de l'origine botanique (Takeda et al., 1984) mais aussi de la méthode de fractionnement utilisée (Banks et Greenwood, 1975). Une population d'amylose est hétérogène avec une polydispersité généralement comprise entre 1.3 et 2.1 mais qui peut atteindre parfois des valeurs plus élevées (5-10). La capacité de liaison à l'iode de l'amylose est de l'ordre de 20 mg/100 mg (Tableau 1.1). L'amylose a la particularité de pouvoir complexer un grand nombre de molécules (alcools, lipides. . .).

Amidon	Lipides	Protéines	Cendres	Phosphore
Céréales				
Maïs normal	0.57	0.30	0.10	0.015
Maïs cireux	0.08-0.23	0.10	0.10	0.003
Amylomaïs	0.96-1.11	0.50	0.20	0.030
Blé	0.43-1.17	0.33	0.30	0.050
Tubercules				
Pomme de terre	0.02-0.09	0.05	0.30	0.040
Légumineuses				
Pois lisse	0.19	0.18	0.05-0.22	0.040
Pois ridé	0.23		0.11	0.030

TABLEAU 1.2 – Composition non glucidique d'amidons de différentes origines botaniques (en % d'amidon sec). D'après Duprat et al. (1980), Morrison (1988) et Vasanthan et Hoover (1992).

L'amylose peut être extraite à partir de grains d'amidons dispersés dans l'eau par réprécipitation sélective en présence d'alcool (butanol par exemple) (Schoch, 1942, 1945). L'amylose peut également être synthétisée *in vitro* par voie enzymatique soit à partir d'ADP-glucose avec la 1,4- α -D-glucan 4- α -D-glucosyltransferase (Granule Bound Starch Synthase, GBSS) (Ball et al., 1998) soit à partir de saccharose avec une amylosaccharase recombinante qui permet d'obtenir de l'amylose de \overline{DP} de 35-58 hautement cristalline (Potocki-Veronese et al., 2005). La 1,4- α -D-glucan : orthophosphate, α -glucosyl transferase (starch phosphorylase) est aussi utilisée pour produire de l'amylose à partir de glucose-1-phosphate (Pfannemüller, 1987). Finalement, l'amylose peut également être obtenue à partir d'amidon avec une enzyme débranchant : isoamylase ou pullulanase (Wong et al., 2007). Les amyloses synthétisées ainsi ne possèdent aucune ramification.

1.1.1.3 Le matériel intermédiaire

L'existence d'un troisième polymère glucidique a été mis en évidence dans l'amidon par plusieurs auteurs (Banks et Greenwood, 1975; Colonna et Mercier, 1984; Takeda et al., 1990). Ce polymère est qualifié de "matériel intermédiaire" car il possède des propriétés physico-chimiques intermédiaires entre celles de l'amylose et celles de l'amylopectine (Tableau 1.1, page 12).

Sa capacité de liaison à l'iode est comprise entre 9.5 et 12 mg/100 mg de polymère. Sa limite de β -amylolyse est également plus faible que celle de l'amylose. Dans les amidons à teneur normale en amylose, le matériel intermédiaire est présent à hauteur de 5 à 7 % alors que dans les amidons riches en amylose, la proportion de matériel intermédiaire peut atteindre jusqu'à 10 % (amylomais) et même 19 % (pois ridé) (Colonna et Mercier, 1984).

1.1.2 Fraction non glucidique

L'amidon contient aussi d'autres constituants non glucidiques et représentent 0.1 à 2 % selon l'origine botanique (Tableau 1.2). Il s'agit :

- d'une fraction lipidique, qui est la plus importante et la plus étudiée.

Amidon	Lipides externes	Lipides neutres					Phospholipides		GL
		internes					Total	LPL	Total
		Total	AGL	TG	DG	MG			
Blé	640-1174	35-95	20	2	5	2	586	557-1047	19
Riz	711	192	140	6	19	10	437	400	78
Maïs	598-756	316-528	348	18	23	22	269	170-248	20-47
Maïs cireux	80	70	-	-	-	-	-	4	6
Amylomaïs	964	704	-	-	-	-	-	212	48
manioc	109	60	-	12	3	4	29	17	20
Orge	757-1025	-	-	-	-	-	48-61	-	-
Orge cireux	174-630	-	-	-	-	-	8-35	-	-
Avoine	1047	434	273	134	26	-	413	346	200

TABLEAU 1.3 – Composition lipidique de plusieurs amidons de céréales (mg/100 g d'amidon). D'après Morrison (1988); Vasanthan et Hoover (1992); South et al. (1991); Hoover et Vasanthan (1992); Tester et Morrison (1992). AGL : Acides Gras Libres, TG : Triglycérides, DG : Diglycérides, MG : Monoglycérides, LPL : Lysophospholipides, GL : Glycolipides.

- d'une fraction azotée, constituée d'acides aminés, de protéines, mais aussi d'acides nucléiques.
- d'une fraction minérale, essentiellement représentée par le phosphore.

1.1.2.1 La fraction lipidique

Les lipides peuvent être regroupés en deux catégories basées sur leur extractibilité aux solvants (Morrison, 1981).

Les lipides externes, ou de surface, sont extraits à température ambiante avec des solvants apolaires (chloroforme ou eau-butanol). Ce sont essentiellement des triglycérides mais aussi en plus faible proportion, des acides gras, des glycolipides et phospholipides. Ils peuvent être libres ou liés aux protéines et proviendraient de l'albumen et du germe de la graine.

Les lipides internes, plus fortement liés, sont extraits à chaud avec des solvants polaires (propanol/eau à 100 °C (Morrison et Coventry, 1985)). Leur présence et leur composition dépendent de l'origine botanique (Tableau 1.3). Les amidons de tubercules et de légumineuses ont de très faibles teneurs en lipide. En revanche, les amidons de céréales sont caractérisés par une quantité de lipides généralement supérieure à 0.5 % dont les principaux représentants sont des lysophospholipides mono-acylés (86 à 94 %) pour le blé et des acides gras pour l'amidon de maïs (60-65 %) : les acides palmitique (C₁₆) et linoléique (C_{18:2}) principalement. Une partie de ces acides gras est complexée à l'amylose (Morrison et al., 1993).

1.1.2.2 La fraction azotée

Elle est essentiellement constituée d'acides aminés, de protéines et d'acides nucléiques. Plusieurs protéines ont été mises en évidence, certaines participent à la structure même du grain, tandis que d'autres sont simplement associées à ces grains (Schofield, 1994). Elles sont généralement localisées à la surface des grains d'amidon et plus abondantes dans l'amidon de blé (Greenwell et al., 1985; Seguchi et Yamada, 1989). La friabiline a été particulièrement étudiée car sa présence modifie la texture de l'endosperme du grain de blé (dur ou tendre) (Greenwell et Schofield, 1986; Morris, 2002; Turnbull et al., 2003). La présence de protéines à

Source	Amylose (% Amidon total)	Type de grain	Taille moyenne (μm)	Forme
Orge	21-24	grain A	20	
		grain B	2-3	lenticulaire
Blé	25-29	grain A	30	disques
		grain B	2-3	sphères parfaites
Blé cireux	1.2-2.0	1 seul type		
Maïs	25-28	1 seul type	15	polyédrique
Maïs cireux	0.5	1 seul type	15	polyédrique
Amylomaïs	60-73	1 seul type	5-25	très allongé
Avoine		grain A	15	composés
		grain B	2-3	ovoïde
Pomme de terre	18-21	1 seul type	40	ellipsoïde
Pomme de terre (sans amylose)	1	1 seul type	40	ellipsoïde
Pois lisse	49	1 seul type	5-10	réniforme
Pois ridé	33-36	1 seul type	30-50	rosette

TABLEAU 1.4 – Propriétés morphologiques de grains d'amidon et teneur en amylose de différentes origines botaniques (Duprat et al., 1980; Buléon et al., 1998a).

la surface des grains affecte leur charge, leur taux d'hydratation, leurs propriétés rhéologiques et leur susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique (Galliard et Bowler, 1987).

1.1.2.3 La fraction minérale

Le phosphore est le principal minéral présent dans l'amidon, mais il peut aussi contenir de très faibles quantités de calcium, potassium, magnésium et sodium. L'amidon de pomme de terre possède une fraction plus importante de phosphate (0.06 à 0.1 %), fixé par estérification directe sur les unités D-glucosyl de l'amylopectine dans une proportion de un groupe phosphate pour 300 unités glucosyl. Ils sont essentiellement fixés sur les carbones C6 (61 %) et C3 (38 %) mais aussi sur le C2 (1 %). Les phosphores sont principalement liés aux chaînes B (89 %) et sur les chaînes A de façon minoritaire (11 %). Les groupements phosphate anioniques, confèrent à l'amylopectine un caractère polyélectrolytique et provoquent des répulsions entre les chaînes d'amylopectine. Cela expliquerait l'hydratation et le gonflement rapide des grains, la viscosité importante des empois d'amidon de pomme de terre ainsi que leur lente rétrogradation. Les seuls phosphates présents dans les amidons de céréales sont attribués aux phospholipides.

1.2 Morphologie et ultrastructure du grain d'amidon

L'amidon est organisé sous forme de granules de taille et de forme variable qui dépendent des origines botaniques de l'amidon (Tableau 1.4). Les voies de biosynthèse propres à chaque phénotype peuvent engendrer des formes de grains différentes en fonction des contraintes liées aux autres composants subcellulaires. Certaines céréales (orge, blé, avoine) présentent deux populations de taille de grain : des grains A (20-30 μm) et des grains B ($\simeq 4 \mu\text{m}$) (Buléon et al., 1998a).

1.2.1 Morphologie des grains d'amidon

Les grains d'amidon secs observés en microscopie optique apparaissent transparents. Le développement de la microscopie confocale à balayage laser (MCBL) a permis d'obtenir après

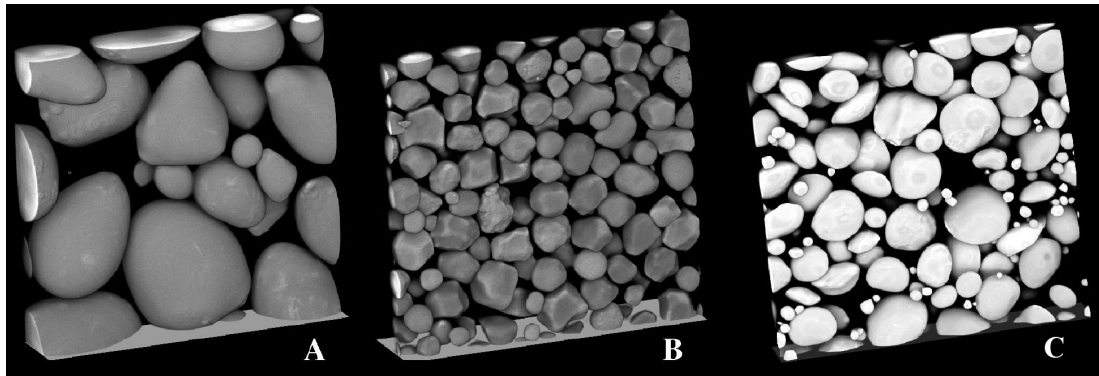


FIGURE 1.3 – Vue 3D de grains d’amidon observé en MCBL. A Pomme de terre. B Maïs. C Blé. ($160 \times 160 \times 36 \mu\text{m}^3$) (van de Velde et al., 2002)

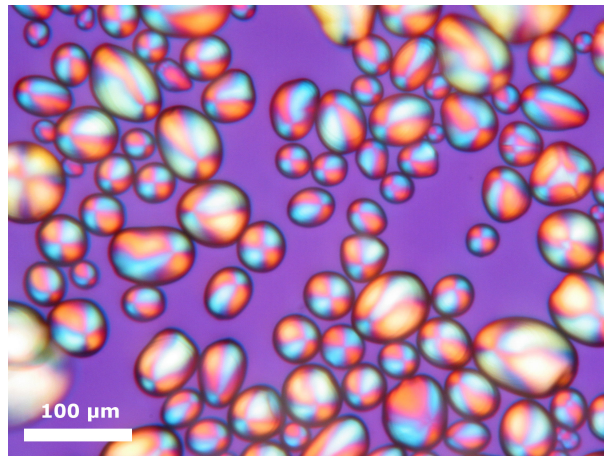


FIGURE 1.4 – Grains d’amidon de pomme de terre observés en microscopie en lumière polarisée
© CHAUNIER L.INRA.

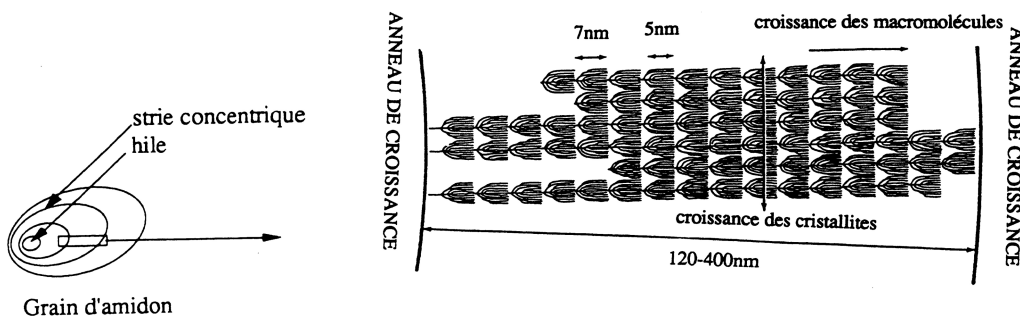


FIGURE 1.5 – Représentation schématique de l’arrangement de l’amylopectine dans le grain d’amidon. Structure en micelle fringée. (French, 1981)

coloration à la rhodamine des images de grains d'amidons en trois dimensions (van de Velde et al., 2002). Les grains d'amidon de pomme de terre sont ellipsoïdes d'une taille variant généralement de 45 à 75 μm (Figure 1.3A). Les grains d'amidon de maïs sont de forme polyédrique d'une taille d'environ 15-20 μm (Figure 1.3B). L'amidon de blé présente deux types de grains relativement sphériques de taille proche de 30 μm (grains A) et 5 μm (grains B) (Figure 1.3C). Même si les grains d'amidons de pomme de terre ou de tapioca apparaissent lisses en microscopie électronique à balayage (MEB), Fannon et al. (1992) ont montré que les grains d'amidons de céréales (blé, orge, seigle...) présentent des pores d'environ 100 nm à leur surface, exception faite de l'avoine et du riz. Ces pores seraient générés au moment de la biosynthèse du grain d'amidon et entraîneraient une plus grande sensibilité aux enzymes.

Observés en lumière polarisée, les grains d'amidon montrent une croix de Malte dont les branches se joignent au niveau du hile (Figure 1.4). Le hile est le centre de croissance initiale du grain d'amidon. La biréfringence du grain est positive ce qui implique une orientation radiale (Figure 1.5) des chaînes de polymères au sein du grain (French, 1981). Il n'est cependant pas réellement sphérique, c'est pourquoi il est considéré comme un sphérocrystal déformé. De plus, Buléon et al. (1997) ainsi que Waigh et al. (1997) ont montré par rayonnement synchrotron et microdiffraction des rayons X que l'orientation radiale est plus forte à la périphérie du grain d'amidon de pomme de terre qu'au centre. Récemment, cette organisation a été confirmée par microscopie de force atomique (AFM) (Baker et al., 2001).

1.2.2 Ultrastructure du grain d'amidon

Une organisation du grain d'amidon en couches concentriques a été mise en évidence par différentes techniques. Il est possible d'observer, en microscopie optique, sur des grains d'amidon, de pomme de terre ou de canne, hydratés, une alternance de couches concentriques à faibles et forts indices de réfraction. Ces couches ont été interprétées comme des "anneaux de croissance" (Frey-Wyssling et Buttrose, 1961). Ces couches, visibles en microscopie électronique à transmission (MET) sur des coupes de grains partiellement hydrolysés, sont alternativement amorphes et cristallines (Yamaguchi et al., 1979). La méthode d'hydrolyse appliquée influe sur

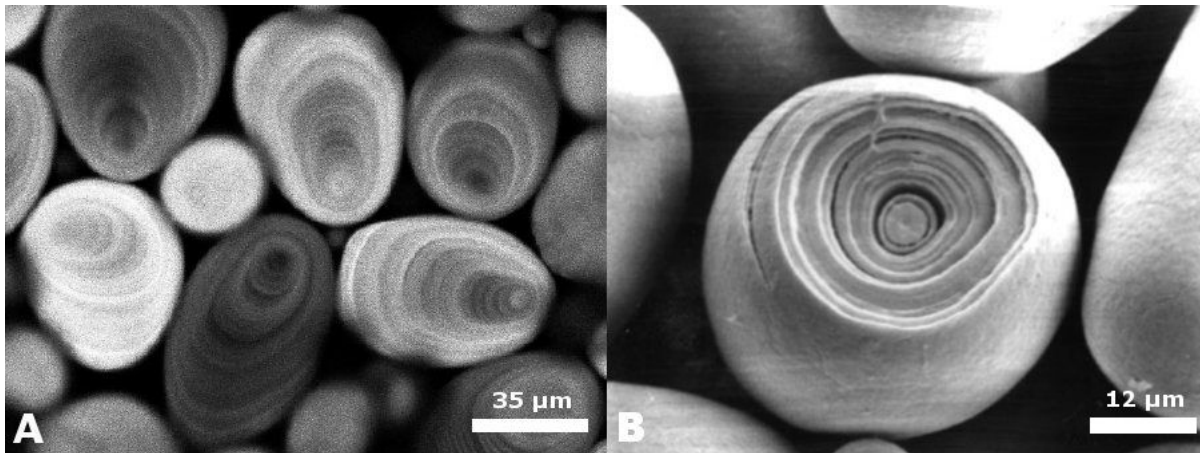


FIGURE 1.6 – Couches concentriques dans des grains d'amidon de pomme de terre. A. observé en MCBL (van de Velde et al., 2002). B. Grain fracturé observé en MEB. D'après Oates (1997).

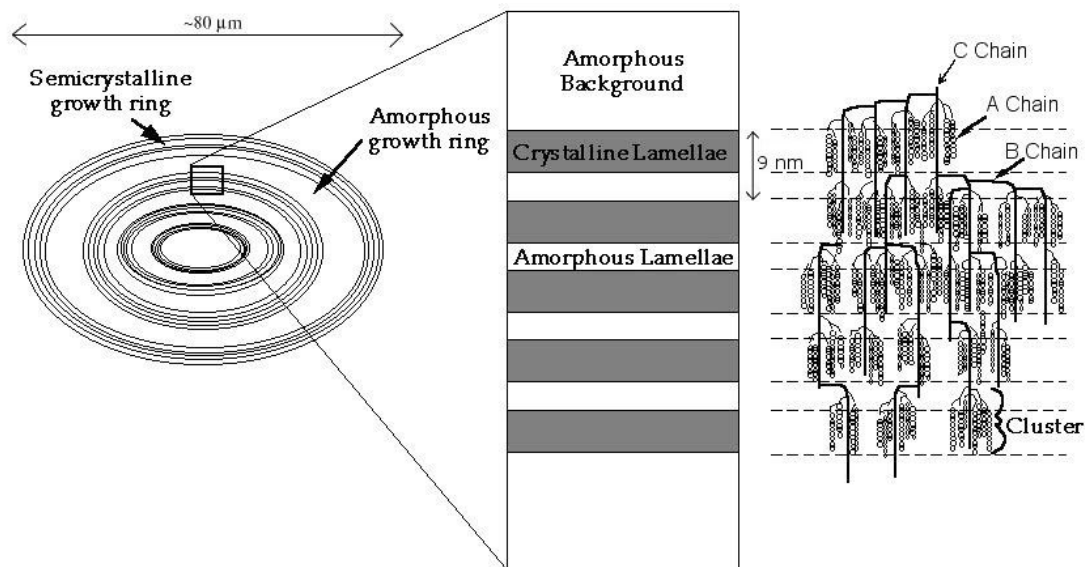


FIGURE 1.7 – Les différents niveaux d'organisation du grain d'amidon proposé par Jenkins et Donald (1995) d'après le modèle de French (1981).

les résultats obtenus. L'hydrolyse acide entraîne une augmentation de la cristallinité globale du grain alors qu'elle reste inchangée après une hydrolyse enzymatique (α -amylolyse) (Colonna et al., 1988). De la même façon, les couches observées après hydrolyse acide ont une épaisseur de 1 à 3 μm , alors que les couches observées après traitement enzymatique ont une épaisseur de 0.3 à 0.5 μm (Gallant et Guilbot, 1969; Gallant et al., 1972). Ces dimensions sont proches de celles observées en MCBL après marquage des grains d'amidons à la safranine (Figure 1.6A) (van de Velde et al., 2002) et en microscopie électronique à balayage (MEB) sur des grains partiellement hydrolysés (Gallant et al., 1972; Smith, 1999) ou fracturés (Oates, 1997). En effet, des grains d'amidons observés en MEB montrent une organisation en "oignon" avec plusieurs feuillets d'une épaisseur variable de 120 à 400 nm (Figure 1.6B). Récemment, Li et al. (2006) ont montré par microscopie à contraste interférentiel que cette organisation est marquée dans les grains d'amidon de pomme de terre, mais moins évidente pour les autres origines botaniques, notamment le maïs.

Les couches les plus résistantes aux hydrolyses (couches cristallines décrites précédemment) ont une organisation semi-cristalline (Yamaguchi et al., 1979; Oostergel et van Bruggen, 1993). De nombreux auteurs ont confirmé cette alternance de lamelles amorphes et cristallines par diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS) et ont mesuré une distance de répétition d'environ 9 nm (Oostergel et van Bruggen, 1989; Jenkins et al., 1993; Jenkins et Donald, 1995; Donald et al., 2001).

Jenkins et Donald (1995) ont proposé, à partir du modèle en micelle fringée de French (1981), un modèle d'organisation du grain d'amidon reprenant les différentes échelles structurales (Figure 1.7). L'épaisseur des répétitions semi-cristallines correspondrait à la structure en grappe de l'amylopectine : Les lamelles cristallines seraient majoritairement constituées des courtes chaînes de l'amylopectine (\overline{DP} 15), tandis que les lamelles amorphes contiendraient la plupart des points de branchements.

1.2.2.1 Organisation de l'amylopectine en super-hélices

Oostergel et van Bruggen (1993) ont proposé un modèle d'arrangement de l'amylopectine

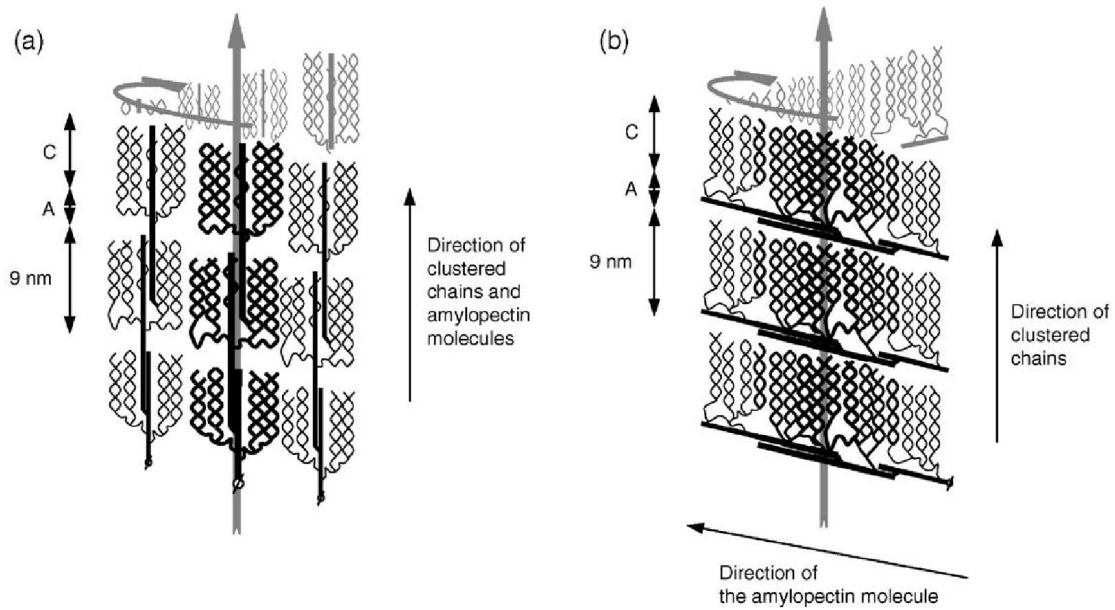


FIGURE 1.8 – Modèles de super-hélice d’amylopectine. (a) Modèle coopératif d’après Oostergel et van Bruggen (1993) (b) Modèle proposé par Bertoft (2004).

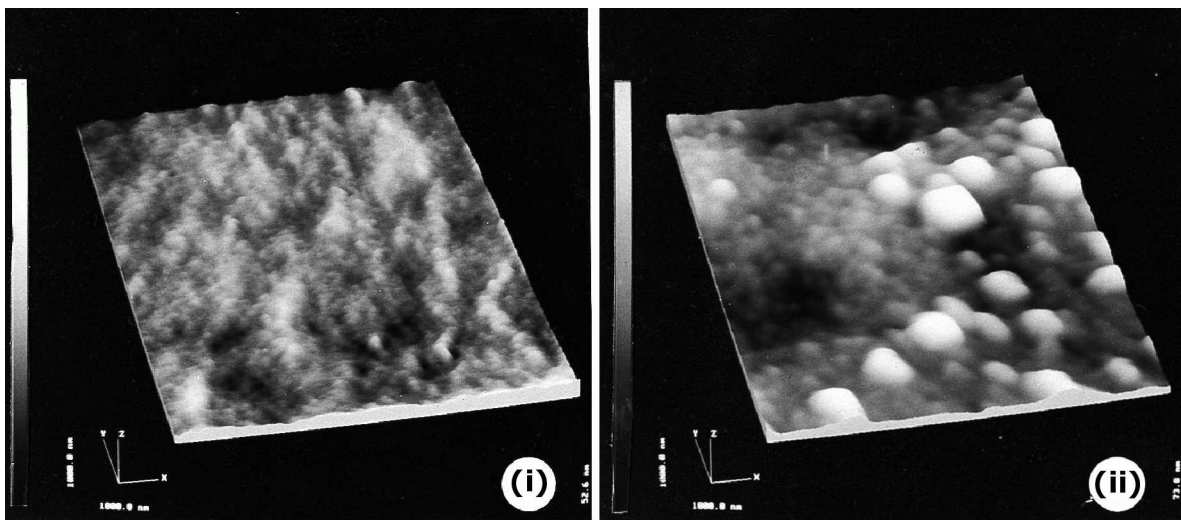


FIGURE 1.9 – Images AFM de la surface d’un grain d’amidon (surface de 1000 nm^2) (i). Amidon de blé (amplitude : 52-6 nm, représentant la différence entre le point le plus haut et le point le plus bas mesuré lors du scan) (ii). Amidon de pomme de terre (amplitude 73-8 nm). (Baldwin et al., 1998).

en super-hélice gauche, déduit de données de microscopie électronique et de reconstruction tomographique sur des amidons de pomme de terre. La super-hélice a un diamètre de 18 nm de large et une cavité centrale de 8 nm. Les lamelles amorphes formeraient un squelette pour les chaînes constituant les clusters d'amylopectine (Figure 1.8(a)). Cette super-hélice est une structure coopérative construite à partir de plusieurs molécules d'amylopectine. Les clusters et chaque molécule d'amylopectine sont alignés suivant l'axe de la super-hélice. Le modèle d'amylopectine établi par Bertoft (2004) permet d'envisager un autre arrangement aboutissant à la même super-hélice par une simple torsion de la molécule (Figure 1.8(b)). Dans ce modèle la super-hélice est construite à partir d'une seule molécule d'amylopectine, la structure de la lamelle cristalline reste identique mais la lamelle amorphe est constituée d'un vrai squelette formé par les longues chaînes de l'amylopectine (B3). L'axe des clusters reste identique à l'axe de la super-hélice mais l'amylopectine suit les spires de la super-hélice.

1.2.2.2 L'organisation en blocklets

Des grains d'amidon observés en MEB (Gallant et al., 1992), microscopie de force atomique (AFM) (Figure 1.9) et MET après marquage au PATAg (Periodic Acid - Thiosemicarbazide - Argent), présentent de petits agrégats plus ou moins sphériques. Suite à leurs observations, Gallant et al. (1997) ont proposé un schéma d'organisation du grain d'amidon basé sur l'auto-association de petites structures ovoïdes : les blocklets. Ils sont principalement constitués de l'amylopectine. Ce modèle préserve ainsi l'alternance de lamelles amorphes et cristallines observée en SAXS. Les blocklets sont associés entre eux pour former les couches amorphes et cristallines des anneaux de croissance (Figure 1.10, page 26). Récemment, Tang et al. (2006), ont complété le modèle de Gallant et al. (1997). L'amylose servirait à connecter les différents blocklets entre-eux et améliorerait ainsi la résistance des grains d'amidon (Ridout et al., 2003). En effet, les grains d'amidon à faible teneur en amylose sont plus facilement dégradés thermiquement, enzymatiquement ou mécaniquement que les grains d'amidon normaux.

La taille des blocklets dépend de l'origine botanique : Les blocklets d'amidon de blé ont une taille variant de 10 à 50 nm (Figure 1.9 (i)), tandis que les blocklets d'amidon de pomme

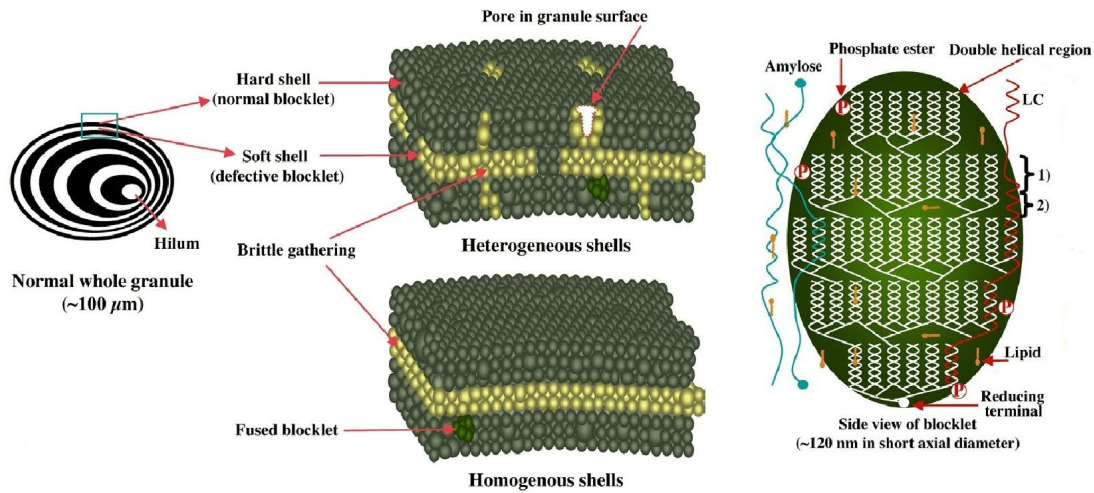


FIGURE 1.10 – Schéma d’organisation générale d’un grain d’amidon proposé par Gallant et al. (1997) et complété par Tang et al. (2006). 1) lamelle cristalline 2) lamelle amorphe.

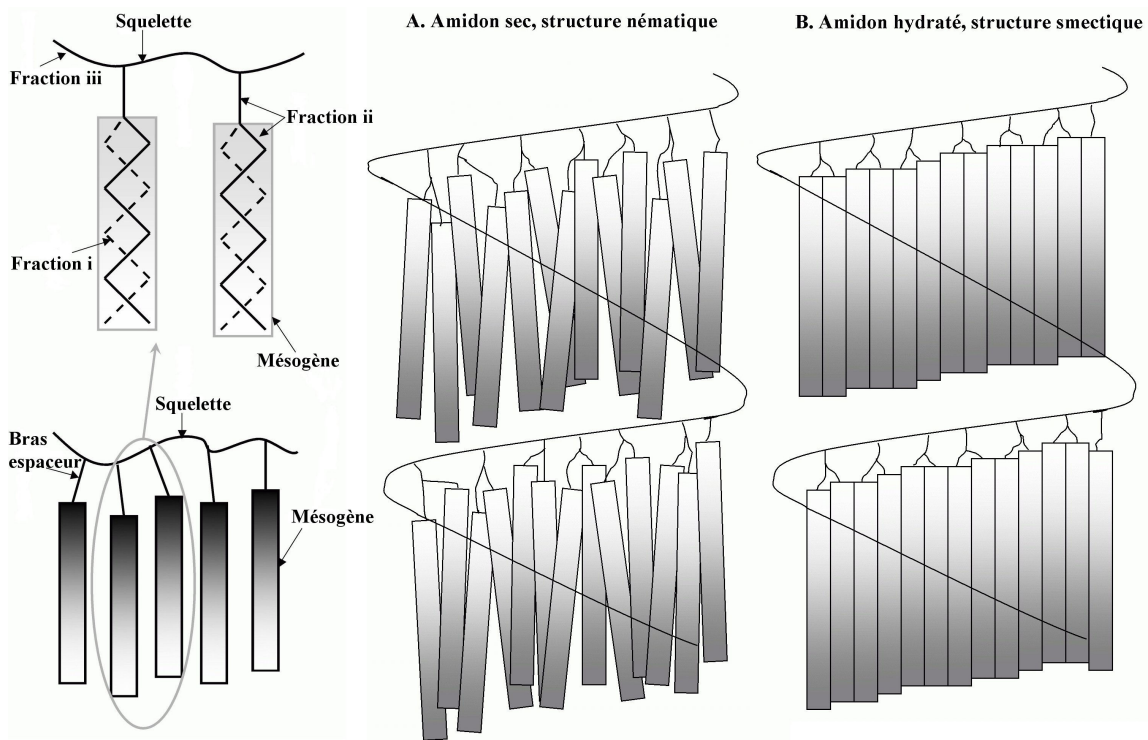


FIGURE 1.11 – Identification des fractions de l’amylopectine dans le modèle de cristal liquide : la fraction i est la longueur de la double hélice, ii est l’espaceur flexible et iii le squelette. D’après Waigh et al. (2000b). A. L’amidon sec est à l’état vitreux nématique. B. L’amidon hydraté forme une structure smectique lamellaire. D’après Waigh et al. (2000a).

de terre présenté sur la figure 1.9 (ii) sont beaucoup plus gros (200 à 500 nm) (Baldwin et al., 1998), mais sont eux-mêmes constitués de blocklets de 10 à 50 nm. La taille des blocklets dépend également de leur localisation dans le grain d'amidon, ainsi, les blocklets présents dans les couches cristallines sont plus gros (80-120 nm) que ceux présents dans les couches amorphes (\simeq 25nm). De plus, Tang et al. (2006) soulignent l'existence de blocklets déficients moins cristallins et riches en amylose perturbant les lamelles cristallines de l'amylopectine. Les couches cristallines dans les grains d'amidon seraient constituées de blocklets normaux et les couches amorphes constituées de blocklets déficients. En outre, les pores apparaissant à la surface des grains d'amidon lors d'une hydrolyse enzymatique correspondraient à des blocklets déficients présents à la surface du grain et plus sensible à l'hydrolyse que les blocklets normaux (Figure 1.10).

Les plus petits blocklets observés par Baker et al. (2001) (10 à 30 nm) pourraient correspondre aux arrangements en super-hélice proposés par Oostergel et van Bruggen (1993) et Bertoft (2004), celle-ci ayant un diamètre d'environ 18 nm.

1.2.2.3 Modèle de cristal liquide pour l'amylopectine

Waigh et al. (1998) ont mis en avant les caractéristiques structurales particulières de l'amylopectine et proposé un modèle analogue aux cristaux liquides (Figure 1.11). L'amylopectine peut être considérée comme constituée de trois types d'entités : des unités rigides (ou mésogènes, fraction i) représentées par les clusters d'amylopectine (cristallins), des bras espaceurs flexibles amorphes (fraction ii) et un squelette flexible également amorphe (Fraction iii). Les bras espaceurs limitent la mobilité des unités rigides et autorisent ainsi deux états : l'état nématique et l'état smectique (Waigh et al., 2000b,a). A l'état nématique les axes des unités rigides (hélices) tendent à s'aligner, mais ne forment pas réellement de lamelles (Figure 1.11A) . En milieu hydraté, la mobilité des hélices d'amylopectine est plus importante, elles peuvent alors se rassembler en structure smectique lamellaire (Figure 1.11B) correspondant à la périodicité mesurée par diffraction des rayons X aux petits angles (Donald et al., 2001). Dans ce cas les clusters sont mieux organisés et la cristallinité augmente.

Type A		Type B		Type C	
2θ (°)	d (nm)	2θ (°)	d (nm)	2θ (°)	d (nm)
		5.6	1.577	5.6	1.577
10.1	0.875	10.1	0.875	10.1	0.875
11.3	0.782	11.3	0.782	11.3	0.782
		14	0.632	14	0.632
14.9	0.594	14.9	0.594	14.9	0.594
17	0.521	17	0.521	17	0.521
18.1	0.490			18.1	0.490
		19.5	0.455	19.5	0.455
		22	0.404	22	0.404
23	0.386			23	0.386
23.9	0.372	23.9	0.372	23.9	0.372
26	0.342	26	0.342	26	0.342

TABLEAU 1.5 – Correspondance entre les angles de diffraction 2θ et les distances entre les plans réticulaires d ($\lambda_{CuK\alpha 1} = 0.15405$ nm) pour les amidons de type A, B et C. ©INRA.

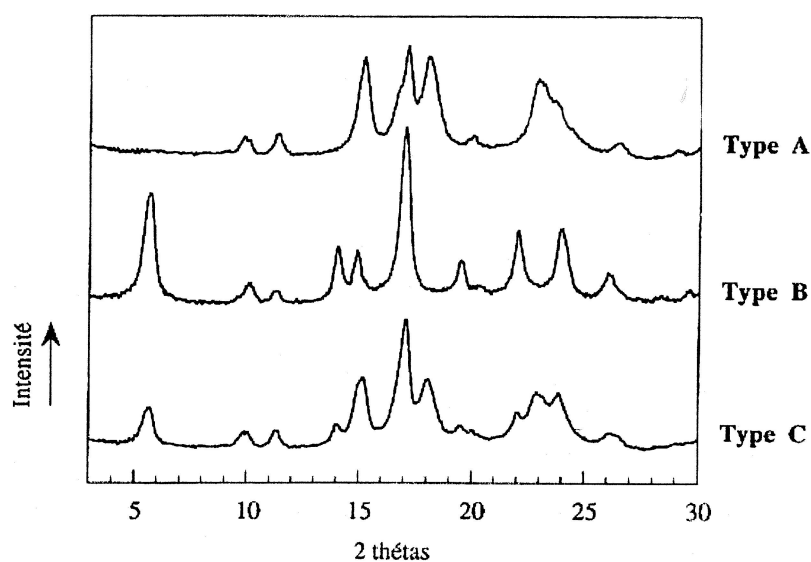


FIGURE 1.12 – Diagramme de diffraction des rayons X des types A, B et C obtenus à partir de poudres semi-cristallines. ©INRA 2005.

1.2.3 Structures cristallines et hélicoïdale

La nature semi-cristalline des amidons natifs a été mise en évidence pour la première fois par Scherrer en 1920, mais les travaux de Katz et Derksen (1933) ont conduit à une classification en trois catégories pour des phénotypes sauvages :

- Le type A, très fréquemment rencontré chez les céréales (blé, maïs...), son diagramme de diffraction des rayons X présente des pics caractéristiques aux angles 2θ ($\lambda = 0.15405$ nm) : 10.1, 11.3, 14.9, 17, 18.1, 23, 23.9 et 26° . (Figure 1.12).
- Le type B, essentiellement présent dans les tubercules et les amidons riches en amylose, qui donne des pics de diffraction caractéristiques aux angles 2θ ($\lambda = 0.15405$ nm) : 5.6, 10.1, 11.3, 14, 14.9, 17, 19.5, 22, 23.9 et 26° (Figure 1.12).
- Le type C, amidon généralement rencontré dans les légumineuses (pois lisse, haricot), correspond soit à un mélange de grains de type A et de type B (Sarko et Wu, 1978), soit à un mélange de cristallites A et B au sein d'un même grain comme cela a été montré pour l'amidon de pois lisse. Il possède des cristallites de type B au centre du grain et des cristallites de type A à la périphérie (Bogracheva et al., 1998; Buléon et al., 1998b).

Les distances réticulaires correspondantes sont données dans le tableau 1.5.

Les amidons de céréales qui contiennent des lipides (maïs, blé, orge...) peuvent présenter, en plus du type A, un type cristallin différent (type V) caractéristique de complexes amylose-lipides (Chapitre 3). Ces complexes n'existent généralement pas à l'état cristallin dans les amidons natifs. L'obtention de nombreux mutants permet dorénavant d'avoir tout un éventail d'amidons de compositions et de structures différentes.

1.2.3.1 Approche cristallographique et modèles moléculaires

Les diagrammes de DRX de grains d'amidon présentent des pics larges et une grande part d'amorphe. Ceci est dû à la faible cristallinité et à la petite taille des cristaux. Les données obtenues à partir de poudres cristallines sont donc difficilement interprétables. Les études cristallographiques ont plutôt été menées sur des cristaux fibrillaires d'amylose par diffraction des rayons X (Wu et Sarko, 1978a,b). L'obtention de monocristaux d'amylose (Buléon et al., 1984)

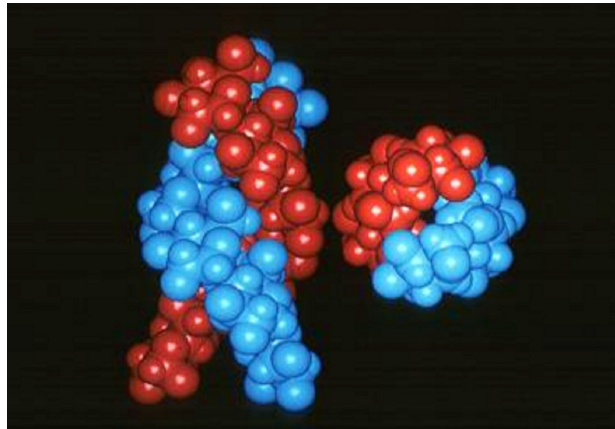


FIGURE 1.13 – Représentation moléculaire d'une double hélice de type A, formée par l'association de deux brins d'amylose. D'après les coordonnées de Imberty et al. (1991).

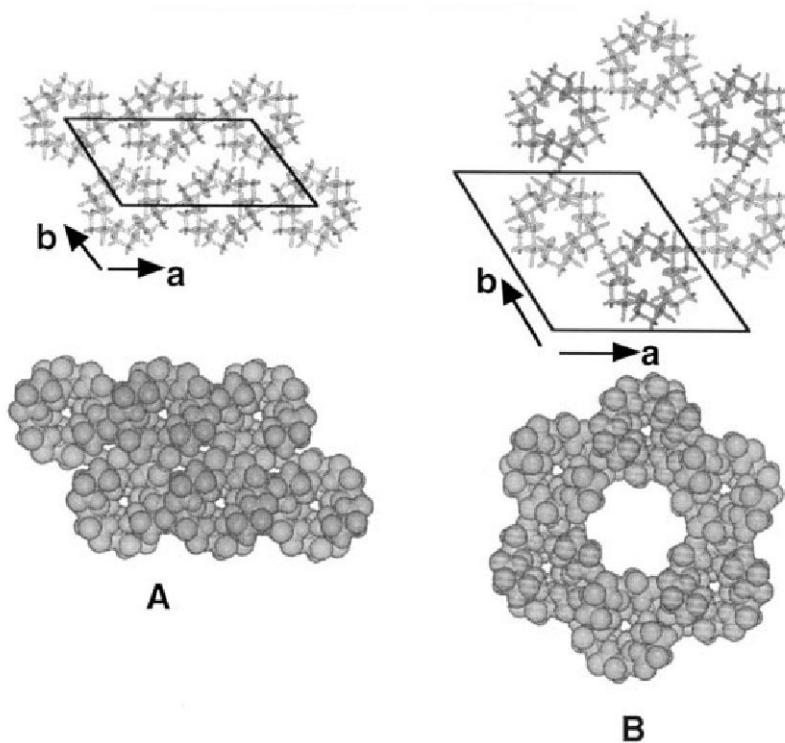


FIGURE 1.14 – Arrangements cristallins de doubles hélices d'amylose de type A et B. Projections des structures dans le plan (\vec{a}, \vec{b}) . D'après Buléon et al. (1998a).

et des études par diffraction électronique ont permis de proposer des paramètres de mailles et des groupes d'espace.

Les premiers travaux de modélisation de French et Murphy (1977) ont montré que l'amylose pouvait être agencée en double hélice. Pour le type A comme le type B, cet arrangement correspond à un minimum énergétique. Wu et Sarko (1978a,b) ont proposé des modèles d'amylose A et B faisant intervenir des doubles hélices droite empilées de façon antiparallèle. La différence entre les deux polymorphes réside dans la compacité des doubles hélices dans l'édifice cristallin. Ces modèles ne prenaient cependant pas en compte le modèle en grappe de l'amylopectine ni l'encombrement stérique qui en découle.

Les modèles de Imberty et al. (1988); Imberty et Pérez (1988), basés sur les données de Wu et Sarko (1978a,b) et enrichis de données obtenues par diffraction électronique proposent un arrangement parallèle de double hélices gauche à brins parallèles pour les types A et B (Figure 1.13). La conformation la plus stable pour l'amylose est une double hélice qui comporte 2×6 unités glucose par tour avec un pas d'environ 2.1 nm. Les angles dièdres moyens correspondants sont 83.8° pour Φ et -144.6° pour Ψ .

1.2.3.2 Mailles cristallines

Les deux types allomorphiques A et B diffèrent essentiellement par l'empilement des hélices et le nombre de molécules d'eau dans la maille cristalline. Le type A (Figure 1.14) possède une maille de type monoclinique ($a = 2.124$ nm, $b = 1.172$ nm, $c = 1.069$ nm et $\gamma = 123.5^\circ$) et appartient au groupe d'espace B2 ce qui implique que l'unité répétitive de l'hélice est un trimère de glucose (maltotriose), répété deux fois par tour d'hélice. Chaque hélice possède six voisines et la maille contient seulement quatre molécules d'eau distribuées de façon équivalente (Imberty et al., 1988).

Le type cristallin B (Figure 1.14) possède une maille hexagonale avec les paramètres $a = b = 1.85$ nm et $c = 1.04$ nm. Dans cette structure, chaque hélice possède seulement trois voisines mais cet empilement génère un large canal qui contient 36 molécules d'eau par maille (Imberty et Pérez, 1988). Les récents travaux de Takahashi et al. (2004) tendent à confirmer cette structure

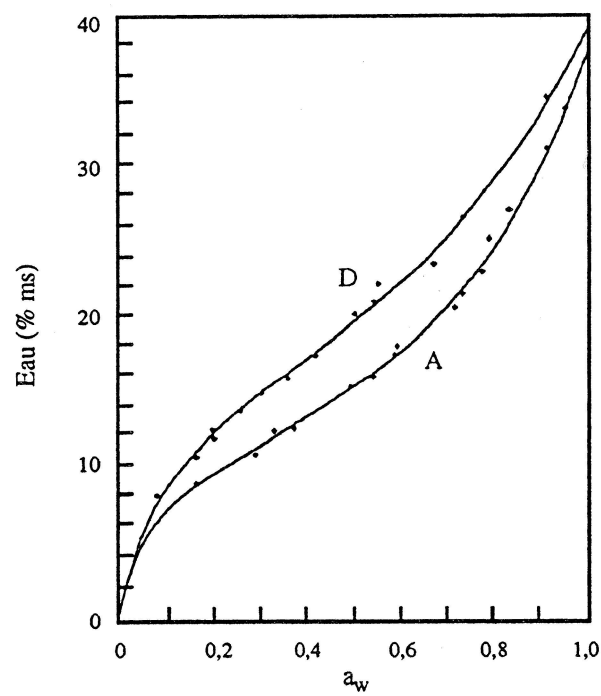


FIGURE 1.15 – Isotherme de sorption d'eau à 25 °C de l'amidon de pomme de terre natif. A. Isotherme d'absorption D. isotherme de désorption (Buléon et al., 1982).

avec un packing hexagonal appartenant au groupe d'espace $P6_1$ et des paramètres de maille très légèrement différents $a = b = 1.852$ nm, $c = 1.057$ nm. L'unité répétitive de l'hélice est dans ce cas un dimère (maltose) répété trois fois par tour.

Les types allomorphiques A et B peuvent également être différenciés en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ^{13}C CP/MAS (Cross Polarization/Magic Angle Spinning). Le signal du carbone C1 (impliqué dans la liaison osidique) des glucoses est un triplet pour le type A et un doublet pour le type B. En effet, les angles dièdres de part et d'autre du carbone C1 prennent trois valeurs légèrement différentes dans le cas où l'unité répétitive est un maltotriose (Type A) et seulement deux lorsqu'il s'agit d'un maltose (Type B) (Hori et al., 1987; Veregin et al., 1987).

1.2.4 Effet de l'hydratation

En présence d'eau et généralement jusqu'à une température de 50-60 °C, l'amidon sorbe de l'eau ce qui provoque un gonflement du grain (phénomène qui peut être inversé au cours d'une désorption). L'équilibre entre la teneur en eau de l'amidon et l'humidité relative du milieu à une température donnée est déterminée par des isothermes de sorption-désorption. Ils peuvent être réalisés à partir d'un produit préalablement séché, il s'agit d'une sorption, ou alors à partir d'un produit saturé en eau (désorption). Les deux courbes ne sont pas superposées, ce qui témoigne d'un phénomène d'hystérésis (Figure 1.15). Plusieurs modèles mathématiques ont été développés pour décrire de façon empirique les isothermes de sorption/désorption. Il est en effet important de pouvoir prédire les transferts d'eau entre un produit et son environnement pendant le séchage ou le stockage (positionnement du produit par rapport à la transition vitreuse, cf. § 2.1.1, page 47) (Le Meste et al., 2002). Un des modèles les plus utilisés est celui de Guggenheim, Anderson et de Boer (modèle GAB) qui est basé sur le modèle BET (Brunauer, Emmet et Teller). Le modèle BET est lui-même basé sur le principe d'une adsorption multicouche, la première couche monomoléculaire d'adsorbat (eau) est fixée sur le solide avec une énergie uniforme (elle correspond à la saturation des hydroxyles de l'amidon), les couches suivantes sont fixées avec une énergie égale à la chaleur de condensation de l'adsorbat. Le modèle GAB permet avec trois paramètres, une représentation des isothermes jusqu'à une activité de

l'eau $A_w = 0.90$:

$$\frac{m}{m_1} = \frac{(c-1)ka_w}{1+(c-1)ka_w} + \frac{ka_w}{1-ka_w} \quad (1.1)$$

m correspond à la teneur en eau, m_1 est la teneur en eau de la première monocouche, c 'est une constante énergétique liée à l'énergie de fixation de la première couche. La constante k représente la chaleur de sorption des couches suivantes sur la première.

La capacité de sorption pour une même activité de l'eau diminue lorsque la température augmente, ce qui implique une absorption de l'eau de nature physique. Dans un premier temps, le grain ne gonfle que faiblement, les molécules d'eau pénètrent essentiellement dans les espaces interstitiels du grain et chaque molécule d'eau établit deux liaisons hydrogène avec les hydroxyles de l'amidon. L'énergie de liaison de ces premières molécules fixées est de l'ordre de 40 kJ/mole (Guilbot et al., 1960). Quand la teneur en eau augmente, l'énergie de liaison diminue car l'eau gagne en mobilité. Le gonflement du grain est plus important et finalement l'énergie atteint une valeur proche de l'eau libre (pour une $a_w \geq 0.2$), c'est à dire 18 kJ/mole.

Les quantités d'eau qui peuvent être sorbées par le grain d'amidon varient en fonction de l'origine botanique du génotype et du degré d'organisation du grain d'amidon (Buléon et al., 1987). Le grain d'amidon de type B sorbe de 29 à 54 % d'eau, les amidons de blé (type A) et de pois lisse (type C) sorbent moins d'eau que l'amidon de pois ridé ou de pomme de terre (respectivement 26.5, 27.5, 30 et 54%).

1.2.5 Taux de cristallinité des amidons natifs A et B

L'eau fait partie intégrante de la structure cristalline des amidons de type A et B (Kainuma et French, 1972; Duprat et al., 1980; Buléon et al., 1987). Elle a donc nécessairement une grande influence sur la cristallinité des amidons, sur les diagrammes de DRX et les spectres RMN correspondants. La maille cristalline du type A contient beaucoup moins d'eau que la maille du type B qui est de fait plus sensible à l'hydratation que l'amidon de type A. En effet, l'intensité des pics de diffraction d'amidon de type B augmente avec le degré d'hydratation (de 0 à 33 %,

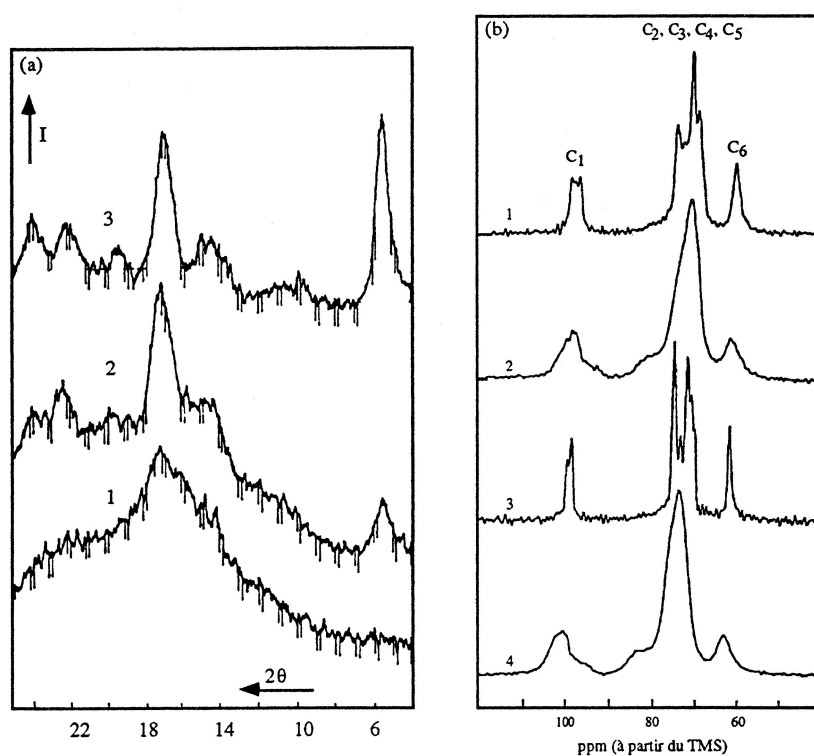


FIGURE 1.16 – Effet de l'hydratation sur la cristallinité. (a) Diagrammes de DRX d'un amidon de type B. (1) 6.40 %, (2) 14.94 %, (3) 33.55 % d'eau (Buléon et al., 1982). (b) Spectres de RMN du solide d'amidon de type A (1 et 2) et de type B (3 et 4). 1 et 3 : 100 %, 2 et 4 : 0 % (Veregin et al., 1986).

Figure 1.16) (Buléon et al., 1982). Dans les mêmes conditions, les résonances du ^{13}C des zones cristallines s'affinent alors que l'intensité de résonance des noyaux des zones amorphes diminue (Veregin et al., 1986; Buléon et al., 1987) et présentent une cristallinité apparente maximale à saturation en eau (Figure 1.16) (Veregin et al., 1986).

Le taux de cristallinité d'un amidon peut être déterminé par diffraction des rayons X en utilisant différentes méthodes de calcul. La méthode de Wakelin et al. (1959) permet de calculer des taux de cristallinité relatifs par rapport à des références amorphes et cristallines (références externes) avec une précision de ± 2 à 5 %. Elle permet également d'estimer la composition d'un mélange de polymorphes mais est très fortement dépendante des standards choisis. La méthode développée par Hermans et Weidinger (1961) est basée sur un principe simple, proche de la méthode de Natta (1955) : l'intensité des raies cristallines est proportionnelle au taux de phase cristalline et l'intensité du halo amorphe est proportionnelle au taux de phase amorphe (référence interne). Le calcul des aires respectives des pics cristallins et du halo amorphe permet de déterminer simplement le taux de cristallinité. Cependant la limite entre halo amorphe et pics cristallins n'est pas toujours facile à définir. Enfin, Ruland (1964) a essayé de développer une méthode plus rigoureuse où le taux de cristallinité est calculé comme rapport du nombre de centres diffuseurs dans la phase cristalline au nombre total de centres diffuseurs. Les intégrations pour déterminer l'intensité diffusée dans la phase cristalline sont réalisées dans l'espace réciproque. Elle ne nécessite, a priori, pas d'étalonnage mais est très complexe et relativement imprécise. La détermination du taux de cristallinité des amidons par DRX ne se limite pas à ces trois techniques, d'autres auteurs ont proposé un grand nombre de méthodes.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide (^{13}C CP/MAS) est également utilisée pour calculer des taux de cristallinité. Les noyaux des composés présents dans les zones amorphes donnent, par l'irrégularité de leurs environnements, des bandes de résonance larges tandis que les noyaux des zones cristallines donnent des bandes étroites. Les spectres peuvent être interprétés de deux façons différentes. Les intensités des bandes de résonance peuvent être comparées avec celles de standards (amorphes et cristallins) (Gidley et Bociiek, 1985; Cooke et Gidley, 1992). Cependant, certaines chaînes sont organisées en double hélice tout en n'étant

Origine botanique	Hydrolyse acide ⁽¹⁾ (%)	Diffraction des rayons X ⁽²⁾ (%)	RMN ¹³ C ⁽²⁾	RMN ¹³ C ⁽³⁾ (%)
Maïs normal	18	38	42	36
Maïs cireux	20	38	53	-
Amylomaïs	18	25	38	-
Blé	27	36	-	-
Riz	-	38	49	-
Pomme de terre	18	25	50	29
Manioc	24	24	44	-

⁽¹⁾ Robin (1976)

⁽²⁾ Gidley et Bociek (1985)

⁽³⁾ Paris et al. (1999)

TABLEAU 1.6 – Degrés de cristallinité de plusieurs amidons natifs évalués par différentes méthodes.

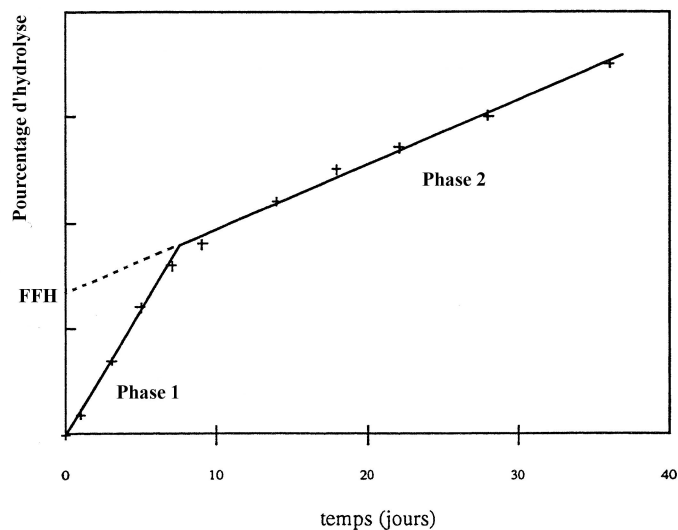


FIGURE 1.17 – Représentation schématique de la cinétique d'hydrolyse d'un amidon. La phase 1 correspond à l'hydrolyse de l'amorphe, la phase 2 celle du cristallin. FFH Fraction Facilement Hydrolysable.

pas impliquées dans la structure cristalline, ce qui provoque une légère surestimation des cristallinités calculées. L'autre solution consiste à discriminer, par décomposition spectrale, les composantes issues des doubles hélices amorphes de celles issues des doubles hélices des zones cristallines (Paris et al., 1999). Les premières ont une distribution de déplacement chimique très large tandis que les déplacements chimiques des carbones C1 des zones cristallines ont une gamme très étroite. Les résultats ainsi obtenus sont comparables à ceux de la DRX (Tableau 1.6).

L'hydrolyse acide ménagée d'amidon (Lintnérisation) en phase hétérogène par un acide dilué (HCl ou H₂SO₄) détruit préférentiellement les zones amorphes (Robin, 1976). Les cinétiques d'hydrolyse peuvent être décomposées en deux phases distinctes (Figure 1.17) qui caractérisent l'action de l'acide sur deux fractions différentes. La première facilement hydrolysable correspond à l'amorphe, la seconde hydrolysée très lentement aux zones cristallines. L'extrapolation au temps zéro de la seconde phase permet de déduire la fraction facilement hydrolysable (FFH, amorphe) et donc cristalline par différence. Les résultats obtenus sont souvent légèrement sous-estimés par rapport aux résultats obtenus en diffraction (Tableau 1.6).

Le taux de cristallinité peut également être approché par spectroscopie infrarouge mais la faible pénétration du faisceau IR dans l'échantillon (2-3 μm) ne permet pas d'étudier l'amidon natif. Enfin, l'analyse enthalpique différentielle (AED ou DSC) permet de montrer le caractère cristallin de l'amidon, mais ne permet pas de calculer un taux de cristallinité, l'enthalpie de l'endotherme de fusion obtenu n'étant pas linéairement corrélée au taux de cristallinité.

1.2.6 Analogies entre les conditions de biosynthèse in vivo et de recristallisation in vitro. Vers le type cristallin A ou B

Traditionnellement, le type A est associé aux amidons de céréales et le type B aux tubercules, mais de nombreux contre-exemples montrent que d'autres facteurs sont à prendre en compte dans le déterminisme du type d'amidon. Similairement, en fonction des conditions choisies, la recristallisation d'un amidon préalablement solubilisé pourra conduire à un type

cristallin A ou B.

Les conditions de température et d'hydratation au cours de la croissance de la plante peuvent induire des changements importants au niveau du type cristallin de l'amidon. La culture de blé ou de pois à température inférieure par rapport à la température de croissance "normale" (T) conduit à une augmentation de la proportion d'amidon B : jusqu'à 25 % pour le blé cultivé à T - 10 °C alors que 100 % de type A sont obtenus à T + 10 °C (Buléon et al., 1998a). De même, si la température est augmentée de 13.5 à 28 °C lors de la germination de graines de soja, la structure cristalline de l'amidon produit passe d'un type B à un type C, indiquant la production de cristallites de type A (Hizukuri et al., 1961). L'amidon des plantes qui se développent dans des conditions humides (comme les tubercules) présente souvent un type cristallin B alors que les céréales qui se développent en conditions plus chaudes et sèches possèdent la plupart du temps des grains de type A. Par analogie, la recristallisation d'amidon en type A est obtenue *in vitro* dans un milieu faiblement hydraté ou hydrophobe et à une température élevée au contraire de la recristallisation en type B qui est obtenue en milieu très hydraté à froid. Il semblerait cependant que la température n'ait aucune influence sur les très courtes chaînes ($\overline{DP} \leq 12$). Dans le cas de l'amylopectine de maïs, dont les chaînes S sont très courtes, il n'est pas possible d'induire une cristallisation en type B quelle que soit la température (Lu et al., 1996).

Une autre analogie remarquable entre la cristallisation *in vitro* et la biosynthèse *in vivo* est la relation entre la longueur des chaînes impliquées dans l'empilement cristallin et le type obtenu. La longueur des chaînes courtes de l'amylopectine semble influencer le type polymorphique cristallin (Hizukuri et al., 1983; Hizukuri, 1985, 1986). Dans la plupart des amidons de type A, la longueur des chaînes d'amylopectine est comprise entre 17.1 et 19.1 unités glucosyl alors que l'amylopectine des amidons de type B a une longueur de chaîne de 21.6 à 30.9 glucoses (Hizukuri et al., 1983). Par ailleurs, lorsque les grappes d'amylopectine possèdent un nombre de chaînes courtes important et une faible distance entre chaque point de branchement, le type A est favorisé (Gérard et al., 2000). De façon similaire, Pfannemüller (1987) a montré que des chaînes de \overline{DP} compris entre 10 et 12 cristallisent toujours en type A, tandis que le type cristallin B est obtenu avec des chaînes de \overline{DP} supérieur.

Enfin, le rapport amylose/amylopectine peut également conditionner le type cristallin. Les amidons de maïs mutants d'une même espèce sont de type A quand ils sont riches en amylopectine et de type B quand ils sont riches en amylose (Cheetham et Tao, 1998; Gérard et al., 2001). Le développement de la biologie moléculaire et de ces mutants ont bouleversé le déterminisme de l'amidon mais ont également permis de diversifier ses propriétés et d'envisager de nouvelles utilisations de l'amidon et de ces dérivés.

Chapitre 2

Transitions hydrothermiques et utilisation du matériau "amidon"

L'utilisation de l'amidon dans le domaine agroalimentaire ou non-alimentaire implique souvent une destruction du grain par traitement hydrothermique ou enzymatique. Le grain d'amidon est une structure hydrophile ayant des comportements très différents en fonction de la nature et l'intensité du traitement hydrothermique qui lui est appliqué. Ces divers traitements conduisent à différents degrés de déstructuration des grains d'amidon puis de réorganisation de l'amylose et/ou de l'amylopectine. Parallèlement, l'amélioration permanente de la connaissance des structures, des voies de biosynthèse et des modifications génétiques ou chimiques de l'amidon ont permis d'obtenir des amidons avec de nouvelles propriétés.

2.1 Transitions thermiques des polymères semi-cristallins

Lors d'un traitement thermique, l'amidon, comme polymère semi-cristallin, subit deux transitions de phase fondamentales : une transition vitreuse et une fusion à plus haute température.

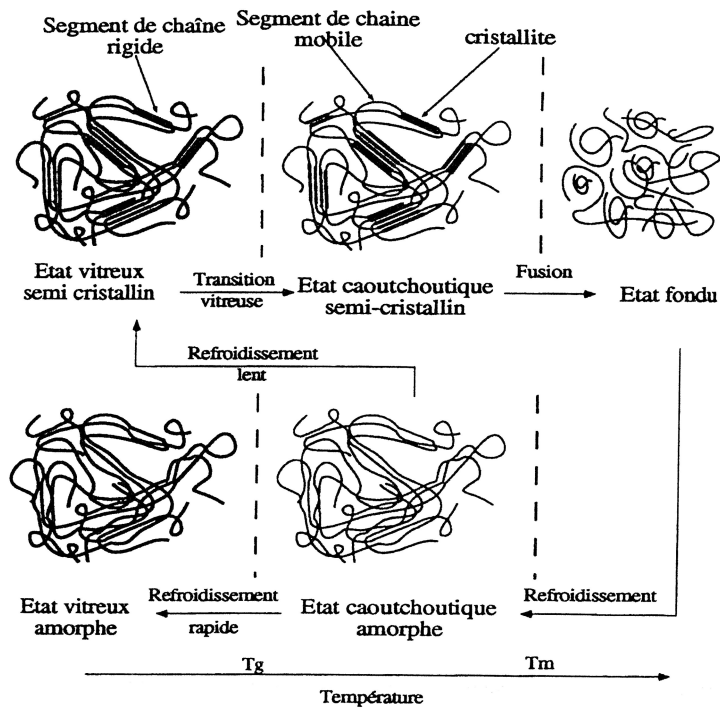


FIGURE 2.1 – Mécanismes généraux des transitions d'état d'un polymère semi-cristallin.

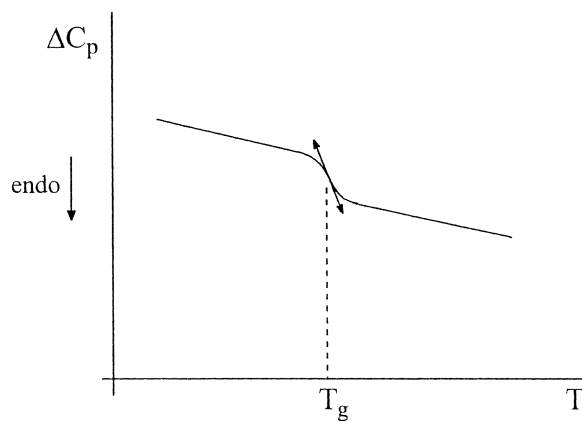


FIGURE 2.2 – Variation de la capacité calorifique C_p d'un polymère amorphe en fonction de la température. T_g est mesurée au point d'inflexion (Fontanille et Gnanou, 2002).

2.1.1 Transition vitreuse

2.1.1.1 Définition

La transition vitreuse est définie en considérant un polymère totalement amorphe mais peut être décrite dans les zones amorphes de polymères semi-cristallins. Pour une température T , inférieure à T_g (la température de transition vitreuse), le matériau est dur et cassant, il est à l'état vitreux. Dans cet état, les mouvements des chaînes de polymère sont presque interdits ou très fortement ralentis (notion de vieillissement physique). Pour une température T supérieure à T_g , le matériau est plus souple et ductile, il est à l'état caoutchoutique. Les chaînes de polymères dans les zones amorphes ont alors une plus grande mobilité (Figure 2.1). Pour des réseaux très denses, avec de longues chaînes de polymères, la transition vitreuse peut être difficile à déceler (Fontanille et Gnanou, 2002).

La transition vitreuse se manifeste par une variation de la chaleur spécifique C_p mesurable par Analyse Enthalpique Différentielle (AED). La T_g correspond à la température au point d'inflexion de la ligne de base (Figure 2.2). Elle peut également être mesurée par Analyse Thermo-Mécanique Dynamique (ATMD). La T_g correspond alors à la moyenne entre les températures (i) de chute du module de stockage E' et (ii) au maximum du pic de $Tan(\delta)$ correspondant à la relaxation α (Gaudin et al., 1999). Dans le cas de polymères semi-cristallins, la T_g peut être augmentée ou diminuée par le taux de cristallinité, les zones cristallines jouant un rôle de pontage des couches amorphes (Fontanille et Gnanou, 2002). Le signal lié à la transition vitreuse, obtenu en AED, est d'autant plus apparent que le taux de cristallinité est faible.

Au cours du temps, les polymères subissent un vieillissement physique qui se manifeste par des modifications des propriétés physiques et mécaniques. Pour une température supérieure à la T_g , un polymère peut atteindre son équilibre thermodynamique instantanément alors qu'à une température inférieure à la T_g , le polymère a besoin d'un certain temps pour atteindre cet équilibre. Durant cette période, le taux de fluage et la fermeté du polymère change continuellement (Hu et Sun, 2000). De la même façon, lorsqu'un traitement thermique est appliqué à un polymère avec une température comprise entre T_g et la température de fusion T_m (cf. § 2.1.2,

page 49), il peut subir des réarrangements structuraux entraînant par exemple une augmentation de la cristallinité ou des modifications plus importantes de l'empilement cristallin.

2.1.1.2 Effet des plastifiants

Un plastifiant est un diluant qui, lorsqu'il est ajouté à un polymère, abaisse la température de transition vitreuse. Ce diluant apporte du volume libre au système et permet le remplacement d'une partie des interactions polymère-polymère par des interactions polymère-diluant. Ceci aboutit à un abaissement de la T_g (Fontanille et Gnanou, 2002).

2.1.2 Fusion des polymères semi-cristallins

Au cours d'un chauffage, un polymère semi-cristallin peut subir une autre transition : la fusion. C'est une transition des zones cristallines du polymère vers un état liquide visqueux (Figure 2.1, page 46). Cela correspond à un passage de l'état caoutchoutique à l'état fondu lorsque que la température de fusion (T_f) est atteinte. La température de fusion dépend du monomère constitutif de la chaîne. Elle dépend également de la longueur de chaîne des polymères impliquées dans les cristaux. Pour de faibles \overline{DP} , la température de fusion augmente avec la masse molaire, cependant ce phénomène s'estompe sensiblement pour des \overline{DP} élevés (Fontanille et Gnanou, 2002). Enfin, la présence d'une impureté ou d'un diluant abaisse la température de fusion du polymère, ce phénomène est décrit par la relation de Flory (1930).

2.1.3 Réorganisations des fondus

Le refroidissement d'un polymère fondu conduit à deux états différents, selon qu'il est lent ou rapide. Lors d'un refroidissement suffisamment lent, le polymère se réorganise en aboutissant à un état semi-cristallin : c'est la cristallisation (Figure 2.1). La cristallisation n'est pas une transition symétrique de la fusion, en effet il existe un retard à la cristallisation par rapport à la température de fusion (phénomène de surfusion) (Fontanille et Gnanou, 2002).

Pour certains polymères, si le refroidissement est très rapide, lors d'une trempe, la cristalli-

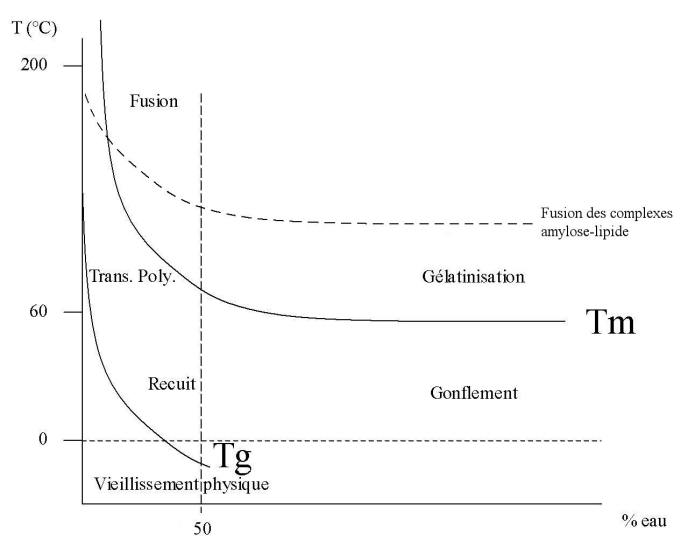


FIGURE 2.3 – Diagramme d'état des différentes transitions hydrothermiques de l'amidon par rapport à Tg et Tm en fonction de la teneur en eau et de la température. Les températures moyennes de fusion de complexes amylose-lipide sont indiquées par le trait en pointillés (Biliaderis et al., 1986).

sation peut être évitée. Le polymère est alors maintenu dans un état vitreux totalement amorphe (Figure 2.1) qui peut lui conférer des propriétés nettement différentes par rapport à l'état semi-cristallin.

2.2 Transitions hydrothermiques des amidons

Les différentes transitions hydrothermiques de l'amidon dépendent des conditions d'hydratation et de températures appliquées et de leur positionnement par rapport à T_g et T_m . Le diagramme d'état représenté sur la figure 2.3 montre ces différentes transitions.

2.2.1 Transition vitreuse des amidons

L'amidon est un polymère hydrophile et l'eau, son principal plastifiant. Elle est compatible avec l'amidon, permet un glissement des chaînes entre elles et abaisse la T_g . Cette augmentation de mobilité des chaînes en présence d'eau ou d'autres plastifiants a été très étudiée par AED (Bizot et al., 1997) ou ATMD (Lourdin et al., 1997b) mais aussi par RMN (Gaudin et al., 1999). Ce phénomène a été confirmé récemment par Saibene et Seetharaman (2006) en étudiant la complexation d'iode dans des grains d'amidon de part et d'autre de la T_g .

Les autres plastifiants de l'amidon sont généralement des polyols : glycérol, sorbitol, propylène glycol, éthylène glycol et quelques polyéthylènes glycol (Lourdin et al., 1997b). Cependant, l'urée, le lactate de sodium ou encore des sucres et oligosaccharides peuvent également être utilisés comme plastifiants de l'amidon. Paradoxalement et sous certaines conditions, ces plastifiants peuvent induire l'effet inverse sur l'amidon (Lourdin et al., 1997a). Ainsi, en fonction des conditions d'hydratation ($A_w \leq 0.22$) et/ou de concentration en plastifiant, ces derniers peuvent se comporter comme des "antiplastifiants" (Lourdin et al., 1997a; Chang et al., 2006). Par exemple, une quantité de sorbitol inférieure à 27 % (m/m), conduit à la formation de films d'amidon plus rigides et cassants, tandis que pour une quantité supérieure, le sorbitol, présente un effet plastifiant "classique" sur l'amidon (Gaudin et al., 1999, 2000).

La détermination précise des valeurs de T_g des amidons est difficile car la plage de tempé-

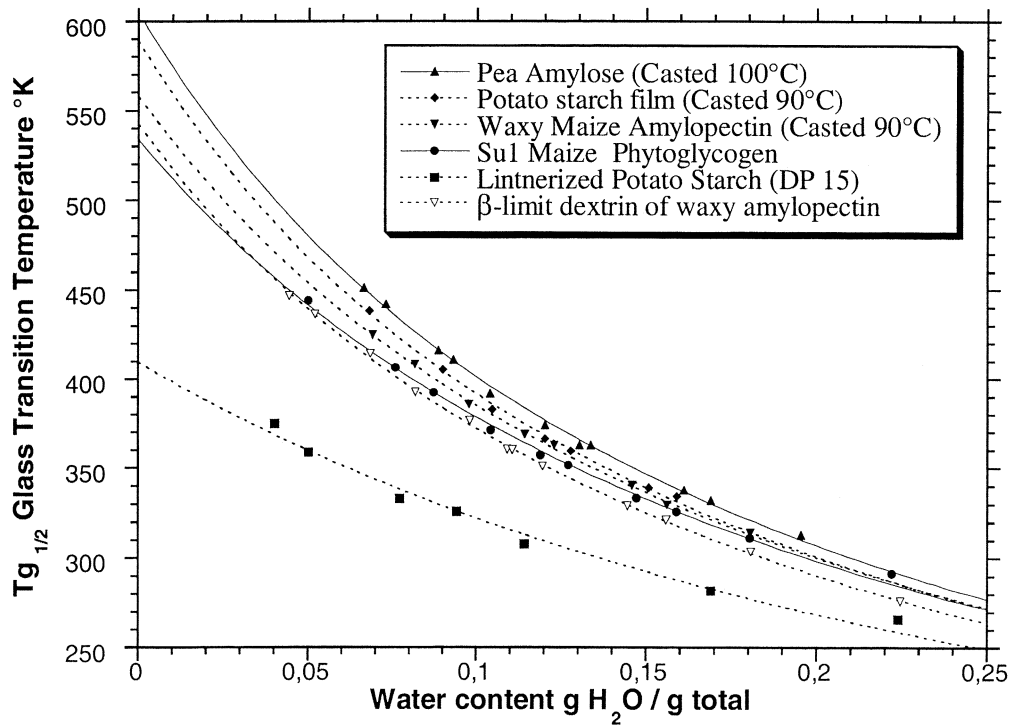


FIGURE 2.4 – Évolution de la température de transition vitreuse de films d'amidon, d'amylose et d'amylopectine, en fonction de la teneur en eau (Bizot et al., 1997).

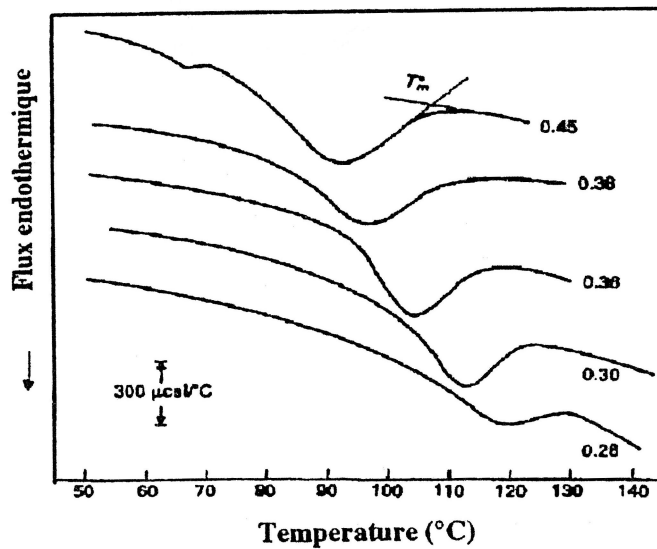


FIGURE 2.5 – Évolution de la température de fusion d'amidon de pomme de terre en fonction de différentes fractions volumiques d'eau. D'après Donovan (1979).

rature de transition vitreuse est élargie par la présence des couches cristallines entre les couches amorphes. Par ailleurs, le taux de cristallinité a également une influence sur la Tg de l'amidon : plus la phase amorphe est interrompue par les domaines cristallins, plus la Tg est élevée (Kalichevski et al., 1992). La température de transition vitreuse de l'amidon anhydre n'est pas directement mesurable, car une dégradation thermique survient avant la transition vitreuse. De ce fait, elle est extrapolée à teneur nulle en eau à partir de valeurs obtenues à différents taux d'humidité. Ces mesures de Tg peuvent être réalisées soit sur des grains d'amidon natif (Ze-
leznak et Hosney, 1987), soit sur de l'amidon amorphe déstructuré par extrusion ou casting (Kalichevski et al., 1992; Bizot et al., 1997). Ainsi, les valeurs de Tg de films d'amidon de maïs cireux et de pomme de terre anhydre ont été respectivement évaluées à 285 °C et 316 °C (Figure 2.4) (Bizot et al., 1997). Avec une teneur en eau de 12 %, la Tg est abaissée à 92 °C et la plupart du temps, la Tg est inférieure ou égale à la température ambiante lorsque la teneur en eau est supérieure à 20 %.

2.2.2 Fusion des domaines cristallins de l'amidon et réorganisation de fondu

La figure 2.5 présente les thermogrammes d'AED obtenus pour de l'amidon de pomme de terre en fonction de la teneur en eau (de 28 % à 45 % (v/v)) (Donovan, 1979). Le phénomène endothermique observé correspond à la fusion des zones cristallines de l'amidon en milieu hydraté. Le thermogramme de l'échantillon à 45 % d'eau présente un deuxième endotherme aux environs de 70 °C. Cet endotherme correspond à une autre transition hydrothermique de l'amidon, en excès d'eau : la gélatinisation qui est abordée dans le paragraphe 2.2.3. La température de fusion de l'amidon de pomme de terre augmente lorsque la quantité d'eau diminue (Donovan, 1979; Blanshard, 1987; Zobel et al., 1988). En conséquence, la fusion de l'amidon anhydre ne peut être observée car sa dégradation thermique survient avant d'avoir atteint la température de fusion (Tf ou Tm). Cependant, l'application de la relation de Flory permet pour l'amidon d'extrapoler Tf₀ (la température de fusion de l'amidon anhydre) en fonction de Tf à différentes

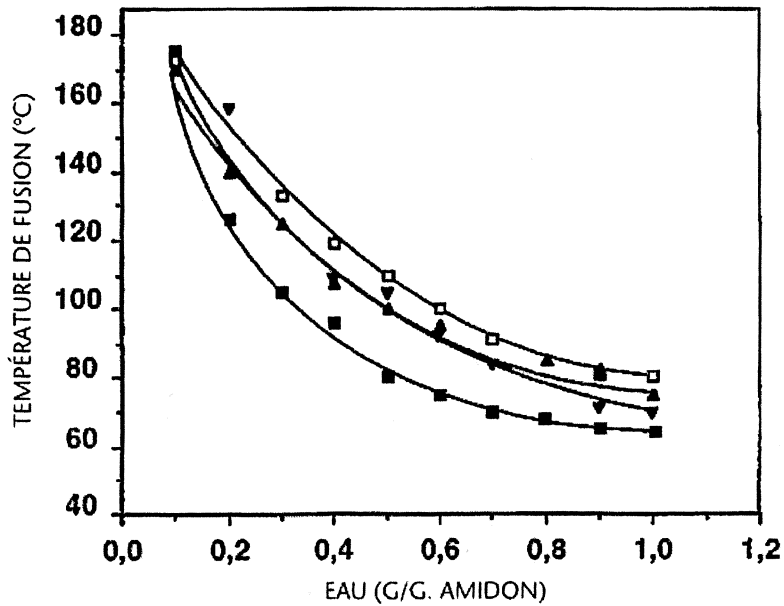


FIGURE 2.6 – Températures de fusion en fonction de la fraction volumique en eau pour des amidons de blé (■), maïs (□), pois (▼) et pomme de terre (▲). D'après Colonna et Buléon (1994).

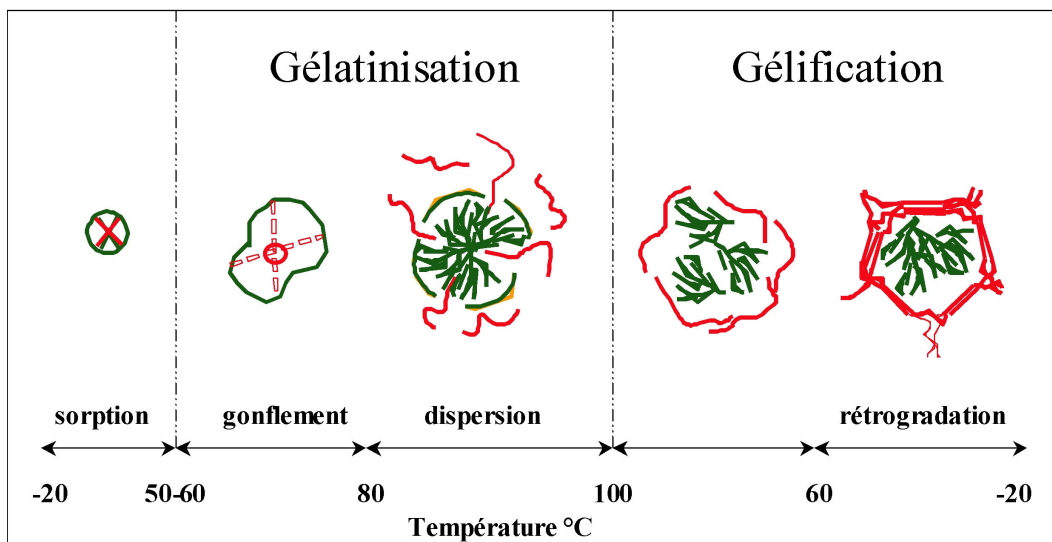


FIGURE 2.7 – Influence d'un traitement thermique en excès d'eau sur l'état de l'amidon.

teneurs en eau (Figure 2.6). Cette Tf_0 peut varier de 150 à 220 °C (Donovan, 1979) en fonction de l'origine botanique et du rapport amylose/amylopectine (Colonna et al., 1989).

Lors du refroidissement d'un fondu, il est possible de figer l'amidon à l'état amorphe vitreux par une trempe (cinétique de refroidissement très rapide (Figure 2.1, p 46)) ou un séchage rapide. En revanche, si la cinétique de refroidissement est lente, ou si la température de stockage est comprise entre T_g et T_f , les chaînes d'amidon peuvent se réorganiser et recristalliser. Par exemple, l'amidon de pomme de terre extrudé (fondu) et amorphe, contenant 35 % d'eau, et stocké pendant 2 jours à une température de 20 à 60 °C ($T_g <$ température ambiante et $T_f > 110$ °C), peut se réorganiser et présenter ainsi un type cristallin B ou A en fonctions des conditions (Farhat et al., 2001).

2.2.3 **Gélatinisation**

En excès d'eau et à des températures supérieures à 60 °C, les grains d'amidon subissent un processus complexe qui aboutit à la dispersion de l'amidon, la solubilisation totale ayant lieu à plus de 100 °C. (Zobel et al., 1988; Donovan, 1979) (Figure 2.7). Ce processus comprend deux étapes :

- un gonflement irréversible des grains.
- une modification radicale de l'organisation granulaire, illustrée par la perte de la biréfringence et de la cristallinité. L'amylose préférentiellement dispersée diffuse hors des grains et l'amidon forme un empis constitué de fantômes de grains et de macromolécules en suspension.

La gélatinisation de l'amidon peut être observée en analyse enthalpique différentielle et se traduit par un endotherme dont les caractéristiques dépendent du rapport amidon/eau, de l'hétérogénéité des grains et de la cinétique de chauffage.

Les phénomènes liés à la gélatinisation des grains dépendent de l'origine botanique mais aussi du type cristallin. Les grains d'amidon de tubercule ont en général un fort degré de gonflement ce qui aboutit à des empis avec une viscosité apparente importante (Doublier, 1981). En revanche, les amidons de céréales (type A) sont caractérisés par une première étape de gon-

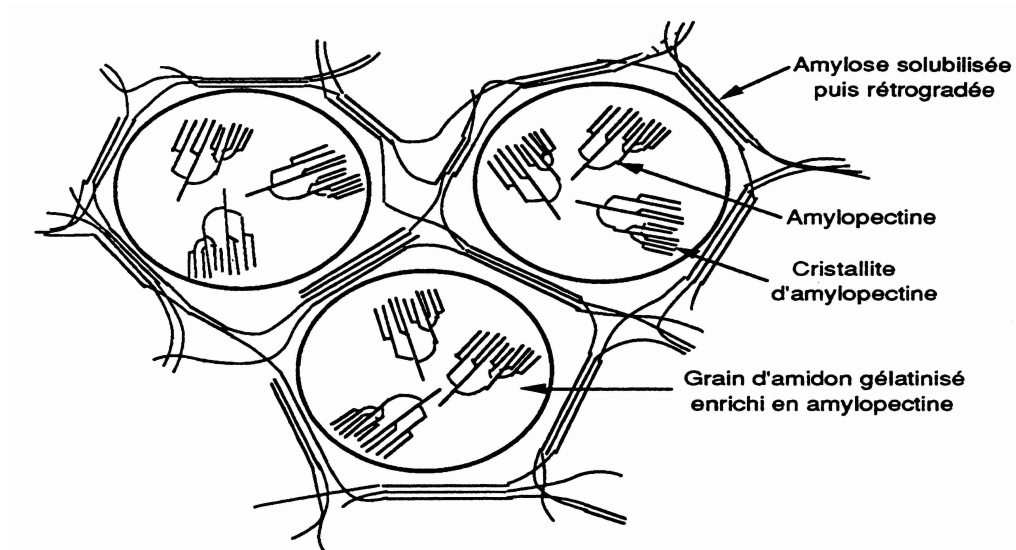


FIGURE 2.8 – Organisation d'un gel d'amidon. L'amylose solubilisée forme après rétrogradation une matrice continue emprisonnant les fantômes de grains enrichi en amylopectine. D'après Miles et al. (1985).

flement limité à la température de gélatinisation, puis vers 90 °C un second gonflement avec une dispersion marquée des macromolécules. Les amidons de blé donnent, ainsi, un empois de consistance beaucoup plus faible que ceux obtenus avec de l'amidon de tubercule (Doublier, 1981). La gélatinisation de l'amidon peut être modifiée par la présence d'autres composés dans le milieu, notamment par la présence de saccharose comme c'est souvent le cas dans les matrices alimentaires. La présence de saccharose dans le milieu induit une augmentation de la température et de l'enthalpie de gélatinisation (Chiotelly et al., 2000). L'eau interagit préférentiellement avec le saccharose ce qui limite la disponibilité de l'eau pour l'amidon. Le saccharose joue ainsi le rôle d'antiplastifiant (voir § 2.2.1, page 51) (Slade et Levine, 1989), mais Assifaoui et al. (2006) ont montré par RMN qu'il y a aussi des interactions amidon-saccharose qui augmentent la rigidité des chaînes d'amidon.

2.2.4 Rétrogradation et gélification de l'amidon, l'amylose et l'amylopectine

Les empois d'amidon sont instables à température ambiante. L'amylose et l'amylopectine sont deux polymères incompatibles en solution, une séparation de phase a lieu au cours d'un refroidissement à une température inférieure à 90 °C (Kalichevsky et Ring, 1987). En absence d'agent complexant, et lorsque la concentration est suffisante (1.5 à 2 %), l'amylose et l'amylopectine se réorganisent séparément en formant un gel blanc opaque. Il s'agit d'un gel mixte formé d'une matrice d'amylose emprisonnant des fantômes de grains riches en amylopectine (Miles et al., 1985) (Figure 2.8). Cependant, la nature des phases dispersées et dispersantes dans des gels modèles est fonction du rapport amylose/amylopectine (Leloup, 1989), lorsque ce rapport est inférieur à 0.43, l'amylopectine constitue la phase continue et l'amylose, la phase dispersée (Leloup et al., 1991).

Au moment de la mise en place du réseau tridimensionnel du gel, les chaînes d'amylose et d'amylopectine peuvent se réorganiser sous forme d'hélices (recristallisation partielle en type B). C'est la rétrogradation. La vitesse de rétrogradation est d'autant plus rapide que la tempéra-

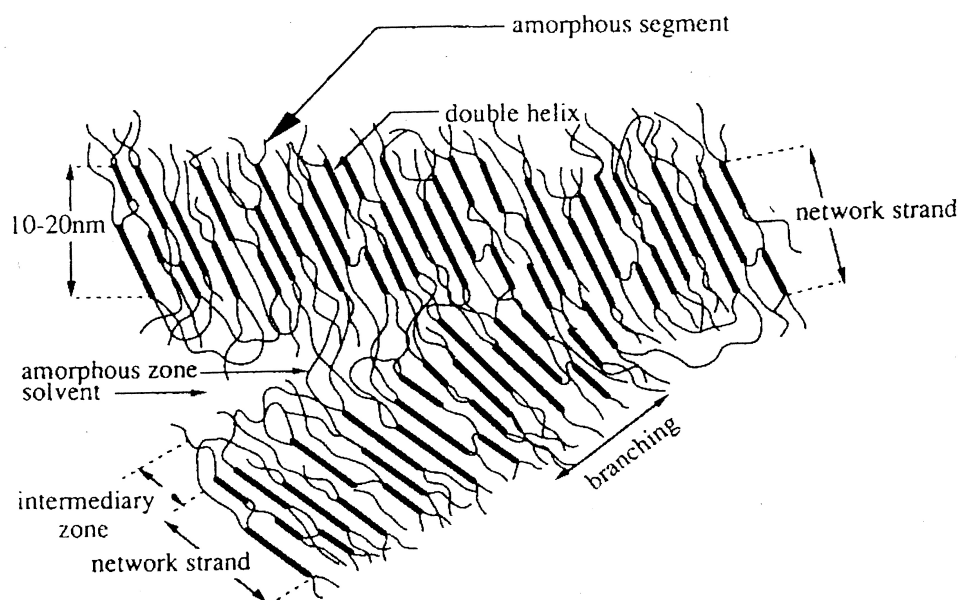


FIGURE 2.9 – Modèle d'organisation d'un gel d'amylose (Leloup et al., 1992).

ture finale est basse et que la différence entre la température de chauffage et la température après refroidissement est importante. Les amidons pré-gélatinisés ou riches en amylose rétrogradent plus rapidement que les autres amidons (Fechner et al., 2005).

2.2.4.1 Gélification de l'amylose

La gélification de l'amylose est un processus rapide (1-2h), nécessitant une concentration supérieure à 1.5 % (m/m). Les gels formés sont très stables avec une température de fusion proche de 120 °C (Miles et al., 1985; Doublier et Choplin, 1989) et présentent le plus souvent une structure de type B (comme les gels d'amylopectine). Cependant dans certaines conditions, le type A peut être observé, comme dans le cas de dispersions d'amidon de blé à 10 % stockées à 100 °C (Eerlingen et al., 1993).

Le modèle proposé par Leloup et al. (1992) (Figure 2.9), présente pour le gel d'amylose une structure microfibreuse. Les zones organisées partiellement cristallines sont assimilées à des microfibrilles de diamètre compris entre 10 et 20 nm. La longueur des chaînes au niveau des cristallites est d'environ 50 unités glucose, soit 15 nm de long. Ce modèle est comparable avec les résultats obtenus par hydrolyse enzymatique de gels d'amylose, selon lesquels les cristallites seraient constitués de 32 unités glucose (Jane et Robyt, 1984).

Le mécanisme d'agrégation de l'amylose a été décrit par Putaux et al. (2000) à partir de techniques de cryomicroscopie à transmission sur des solutions d'amylose à 0.1 %. Dans un premier temps, quelques molécules s'agrègent pour former de petits objets vermiculaires. Ces objets s'associent dans un second temps pour former des réseaux ramifiés plus étendus. Les bras de ces réseaux peuvent être décrits comme une alternance de cristallites de type B, d'une largeur de 10 nm et de zones amorphes. Au cours du temps ces réseaux se condensent par synérèse pour former des agrégats semi-cristallins.

2.2.4.2 Gélification de l'amylopectine

La gélification de l'amylopectine est un processus beaucoup plus lent qui nécessite des concentrations élevées en polymère de l'ordre de 10 %. Les gels d'amylopectine sont instables

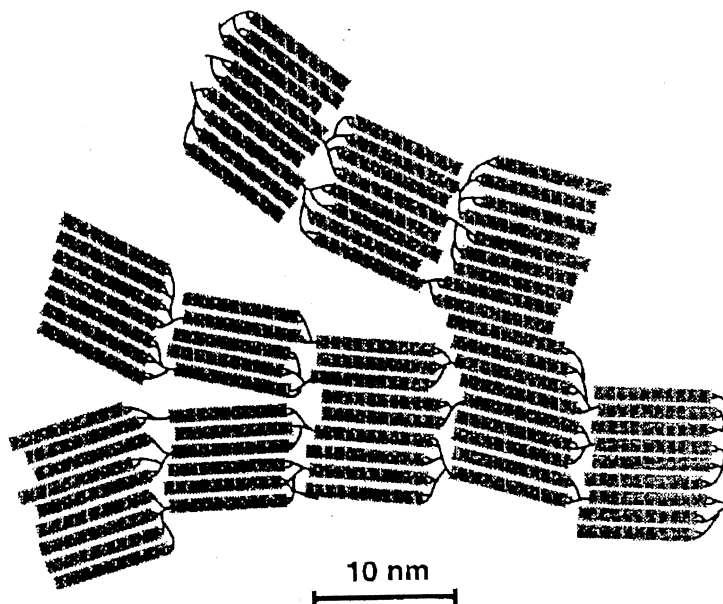


FIGURE 2.10 – Modèle d'organisation d'un gel d'amylopectine (Putaux et al., 2000).

et ont une température de fusion proche de 45 °C (Miles et al., 1985). Cette faible stabilité est due au faible \overline{DP} (15 au maximum) des chaînes courtes d'amylopectine, déterminé par chromatographie des résidus d'hydrolyse (Ring et al., 1987). La rétrogradation débiterait par des interactions intramoléculaires entre les courtes chaînes de l'amylopectine, formant ainsi des doubles hélices qui s'empilent ensuite pour former des cristaux de type B (modèle de Putaux et al. (2000), figure 2.10). La rétrogradation des longues chaînes d'amylopectine participerait également à la gélification (Nuessli et al., 2000).

2.2.5 Recuit de l'amidon en excès d'eau ou "annealing"

Le recuit est un traitement appliqué à l'amidon, à forte teneur en eau (de 40 à 55 %) et à des températures légèrement inférieures (10 à 15 °C) à la température de gélatinisation. Ce traitement aboutit à une augmentation de la température de gélatinisation, un affinement de l'endotherme de gélatinisation et des modifications de l'enthalpie de gélatinisation. Parallèlement la cristallinité semble diminuer, mais le type cristallin reste inchangé (Gouth et Pybus, 1971; Stute, 1992).

Les récents travaux de Kohyama et Sasaki (2006) ont montré, au cours du recuit, une diminution du nombre de cristallites et une plus grande perfection des cristallites restants. L'action de l'eau et de la température pourrait augmenter et faciliter les mouvements moléculaires au sein de la phase amorphe. Elle autoriserait un réarrangement des chaînes de polymères dans le même système cristallin en assurant une croissance ou une réorganisation des cristallites présents.

Le sensibilité d'un amidon au recuit dépend de l'origine botanique mais aussi du type cristallin, le type B étant plus sensible que le type A (Kohyama et Sasaki, 2006). Par ailleurs, Krueger et al. (1987) et Knutson (1990) ont montré que plus les amidons sont riches en amylose plus les modifications liées au recuit sont importantes.

Il existe un traitement hydrothermique proche du recuit mais à plus haute température et avec une hydratation plus faible. Il est appelé HMT (pour Heat Moisture Treatment).

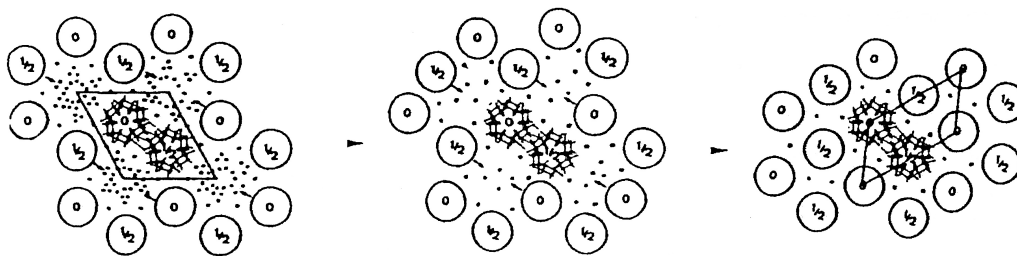


FIGURE 2.11 – Hypothèse de réorganisation des hélices lors de la transition du type polymorphique B vers le type A (Imberty et al., 1991).

2.2.6 Traitement HMT, transition allomorphique du type B vers le type A

Une propriété remarquable des structures amyloacées est la transition possible d'un type semi-cristallin vers un autre. En effet, lors d'un traitement hydrothermique, pendant 24 à 48 heures, à haute température (100-120 °C) et avec une hydratation intermédiaire (10 à 30 %), des transitions polymorphiques du type B vers le type A peuvent apparaître (Stute, 1992; Lim et al., 2001). Pour une même teneur en eau, cette transition nécessite une température plus élevée quand la longueur des chaînes est plus importante (145-160 °C). La transition du type B vers le type A a également été montrée pour des chaînes plus courtes (lintners de pomme de terre $\overline{DP}15$) (Le Bail et al., 1993). Dans ce cas elle est beaucoup plus rapide et nécessite des conditions différentes : 88 °C et 42 % d'eau ou 105 °C et 20 % d'eau.

Les structures cristallines A et B sont stabilisées respectivement par des liaisons hydrogène "directes" entre les chaînes ou par l'intermédiaire de molécules d'eau reliées elles-mêmes aux macromolécules par des liaisons hydrogène (ponts aqueux) (Imberty et al., 1991). Deux hypothèses ont été émises pour expliquer cette transition du type B vers le type A. La première hypothèse envisage une perte de molécules d'eau dans la maille cristalline de type B, les ponts aqueux seraient ainsi "convertis" en liaisons hydrogène directes inter-chaînes. Cela provoquerait un rapprochement des hélices (Figure 2.11) et donnerait finalement une maille cristalline de type A. La seconde hypothèse, émise par Buléon et al. (1998c), propose une fusion des cristallites de type B puis une recristallisation en type A. Les températures de fusion de sphéro-cristaux de type A et B seraient en accord avec ce modèle, le type A étant plus thermostable que le type B (Whittam et al., 1990).

Les deux traitements, recuit en excès d'eau et HMT sont parfois utilisés dans les procédés technologiques, alimentaires ou non, pour modifier les caractéristiques des amidons. Un exemple est le pré-traitement de l'amidon pour les aliments infantiles ou la création d'amidons ayant une meilleure stabilité à la congélation (Tester et Debon, 2000).

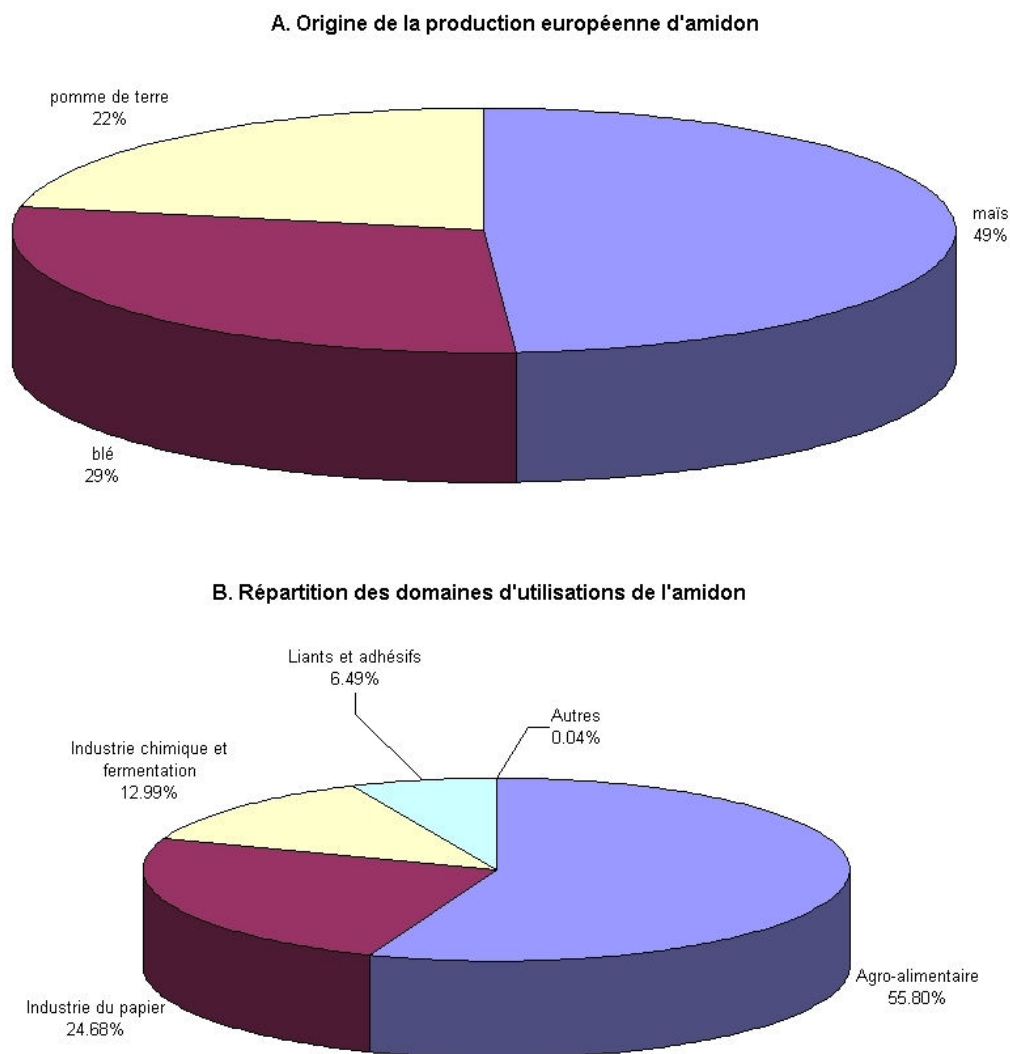


FIGURE 2.12 – A. Origine botanique de l'amidon produit en Europe. A. Répartition des domaines d'utilisation de l'amidon en Europe. D'après Röper (2002).

2.3 Domaines d'utilisation des différents amidons

L'amidon produit en Europe provient essentiellement du maïs, du blé et de la pomme de terre (Figure 2.12). La plus grande part de la production est dédiée à une utilisation en agroalimentaire que ce soit sous forme d'amidon natif, mutants ou modifiés. Cependant, les utilisations non alimentaires représentent tout de même 45 %, l'amidon est particulièrement employé dans la production de papier et dans l'industrie chimique et pharmacologique.

2.3.1 Utilisation en agroalimentaire

2.3.1.1 Les amidons natifs et mutants

L'amidon est particulièrement utilisé pour la production de dextrans ou de sirop de glucose. Il est bien évidemment présent dans tous les produits céréaliers, mais est également très employé pour de nombreux produits de type desserts gélifiés ou sauces. . . Sous sa forme native, il est seulement utilisé en tant qu'épaississant ou liant. Cependant les amidons dits "mutants", cireux ou riche en amylose sont de plus en plus utilisés car leur sensibilité aux traitements hydrothermiques et les structures résultantes augmentent leur champs d'application.

Les amidons cireux gélifient plus facilement et à plus basse température (<50 °C pour des amidons issus de certains mutants) et ne forment pas de gels fermes. Ils sont utilisés comme stabilisant ou épaississant et comme émulsifiant dans des préparations pour salades (Jobling, 2004). L'utilisation d'amidons cireux en complément d'autres farines améliore la qualité des pâtes et peut retarder le rassissement du pain. En revanche les produits fabriqués uniquement à partir d'amidon cireux sont de faible qualité (Van Hung et al., 2006).

Les amidons riches en amylose sont également très utilisés. Leur force de gonflement très importante, est mise à profit pour la production de confiseries. Ils forment aussi très facilement des films et protègent ainsi le croustillant des produits frits tout en réduisant l'absorption d'huile lors de la cuisson. Ils sont également utilisés dans la production d'amidons résistants aux bénéfices nutritionnels importants (Jobling, 2004). En effet, la substitution d'un amidon digestible par un amidon résistant conduit à une diminution de la réponse glycémique. Cette propriété

a été mise à profit pour élaborer des aliments pour diabétiques. La consommation d'amidon résistant semble également induire une diminution du cholestérol (Pohu, 2002).

2.3.1.2 Les amidons modifiés

Afin, d'améliorer les propriétés texturantes et la solubilité de l'amidon, notamment pour des produits à longue conservation ou congelés, des traitements chimiques sont parfois appliqués. Ces modifications conduisent à un changement de la structure de certaines unités glucosyl par oxydation, estérification ou éthérification des fonctions hydroxyles. Ces réactions sont souvent précédées d'une étape de pré-gonflement en milieu alcalin puis conduites sur des suspension d'amidon (30 à 40 %) à température modérée pour préserver la structure granulaire. Ces modifications sont apportées de façon hétérogène, essentiellement localisées dans les zones amorphes et en périphérie du grain. Il existe trois principales catégories d'amidons modifiés :

- les amidons réticulés
- les amidons stabilisés ou substitués
- les amidons oxydés

La réticulation permet d'obtenir des empois d'amidon ayant une bonne résistance aux températures élevées, à un cisaillement important ou à un pH acide. Elle consiste à renforcer la cohésion du grain d'amidon pour conserver son intégrité (induisant un retard de gonflement), par la mise en place de ponts entre les chaînes de polymères. Les deux amidons réticulés autorisés sont d'une part, l'adipate de diamidon, obtenu par estérification entre de l'amidon et l'acide adipique, et d'autre part, les phosphates de diamidon, obtenus par estérification avec des phosphates. Le taux de réticulation est très faible, variable de 1 pour 500 à 1000 unités glucosyl (Doublier et Thibault, 2002). Ils sont particulièrement utilisés dans les crèmes desserts ou les aliments en conserve.

La stabilisation (ou substitution) d'amidon consiste à substituer certaines des fonctions hydroxyles des unités glucosyl par des groupes acétates, phosphates ou hydroxypropyles. Ces substitutions permettent de limiter, voire de supprimer la rétrogradation et de diminuer la température de gélatinisation. Ces amidons sont caractérisés par leur degré de substitution (DS) qui

peut varier de 0 à 3 (nombre de groupements hydroxyles substitués par unité glucosyl). Ces amidons concernent essentiellement les produits surgelés dont la stabilité est un élément critique et les aliments à longue conservation. Des amidons particuliers, dits "OSA" (Octényl succinate d'amidon), sont substitués par des groupements octényl succiniques, très hydrophobes, qui confèrent à l'amidon de très bonnes propriétés émulsifiantes (Boursier, 1994).

Les amidons oxydés sont souvent traités avec de l'hypochlorite de soude qui hydrolyse en partie les polymères mais permet aussi de créer des groupes carboxyliques limitant la rétrogradation (Amidons carboxy méthylés). Ce traitement diminue la viscosité des empis. L'utilisation des amidons oxydés concerne la confiserie et la fabrication de gomme. Leur plus grande fluidité autorise l'utilisation de concentrations plus importante que les amidons natifs, facilitant ainsi certains procédés de fabrication (Boursier, 1994).

2.3.2 Utilisations non-alimentaires

L'industrie du papier utilise de l'amidon comme liant de la pâte à papier mais aussi pour améliorer la raideur, la résistance et l'aspect brillant des feuilles (amidon natif). Il permet également d'améliorer la réceptivité à l'encre (amidon modifié par oxydation ou cationisation). Il est également utilisé comme colle pour les différentes couches dans la fabrication du carton. (Röper, 2002).

L'amidon trouve des applications à haute valeur ajoutée dans le domaine pharmacologique et cosmétique. L'amidon et ses dérivés sont très utilisés comme excipients ou revêtements pour les comprimés mais aussi comme matrices pour la libération contrôlée d'ingrédients actifs et pour la synthèse de précurseurs de substances actives (l'acide 2-keto-L-gulonique précurseur de la vitamine C) (Röper, 2002).

Une autre application importante de l'amidon concerne la production de matériaux thermoplastiques biodégradables permettant de réduire les problèmes liés aux déchets. Ce procédé permet d'obtenir une bonne biodégradabilité mais reste très onéreuse. L'amidon peut être utilisé :

- seul, en présence de plastifiant pour la production d'objets moulés mais leur grande sensi-

bilité à l'eau est un inconvénient. Ceci peut cependant être corrigé par l'ajout d'un additif ou revêtement hydrophobe.

- en mélange avec des polymères synthétiques ou naturels soit comme charge, soit compatible avec un polymère hydrophile (Röper et Koch, 1990).

L'amidon est également utilisé comme agent liant dans la production de matériaux céramiques, la fabrication de pièces métalliques thermoformées et la production de graphite synthétique. A 300 °C, sous atmosphère réductrice, l'amidon est dégradé et seul son squelette carboné subsiste. Ce dernier est ensuite chauffé à 3000 °C pour former le graphite. L'amidon peut également être utilisé dans la composition de détergents (Röper, 2002).

Chapitre 3

Amyloses V et complexes d'inclusion

Les amidons natifs de type A, B ou C sont organisés sous forme de double hélice. Katz (1930) a mis en évidence un autre type cristallin d'amylose et d'amidon. Ce nouveau type cristallin communément appelé V pour "Verklesterung" (reprécipitation) d'après certains ou "Verkleistert" (gélatinisé) pour d'autres, a été obtenu par reprécipitation de solutions d'amidon en présence d'alcools. En 1932, Katz et Derksen ont noté plusieurs similitudes entre des clichés de diffraction des rayons X de poudres d'amylose V et d' α -cyclodextrine (Katz et Derksen, 1932). Ils ont alors proposé pour l'amylose de type V un arrangement en simple hélice mimant un empilement de cyclodextrines. L'hélice ainsi agencée comporte six résidus glucose par tour. Plus tard, en 1943, Rundle et Edwards ont montré sans ambiguïté possible la nature hélicoïdale de l'amylose V par diffraction des rayons X (Rundle et Edwards, 1943; Rundle et al., 1944). Cette structure a également été étudiée par résonance magnétique nucléaire (Veregin et al., 1987). Ces hélices présentent une cavité centrale susceptible d'accueillir la molécule utilisée pour la reprécipitation (alcool) d'où le terme parfois employé de complexes d'inclusion. Un grand nombre de molécules possède ce type de propriété complexante vis à vis de l'amylose. Les principales sont les acides gras, des alcools, le DMSO, l'iode, des sels (KOH, KBr), mais aussi certains composés d'arôme. Par ailleurs, très récemment, des nanotubes de carbones ont été complexés avec l'amylose pour faciliter leur dispersion en milieu hydrophile (Lii et al., 2003; Casey et al., 2005).

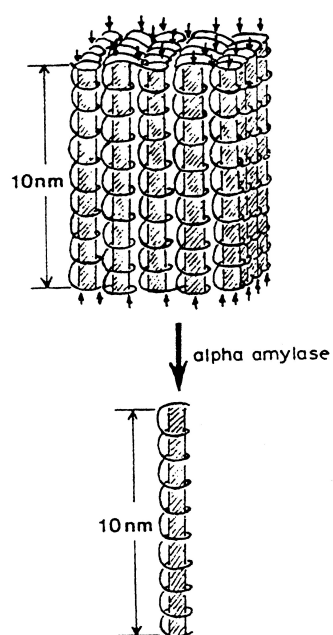


FIGURE 3.1 – Hydrolyse enzymatique de complexes amylose-alcool. La longueur des chaînes des résidus correspond à l'épaisseur des lamelles (Jane et Robyt, 1984)

L'amylose V présente un grand polymorphisme grâce aux libres rotations de part et d'autre de la liaison osidique. Ceci autorise ainsi plusieurs conformations hélicoïdales à six, sept ou huit glucoses par tour. Ces hélices ne forment pas nécessairement de cristaux après précipitation. En effet il est généralement admis qu'une hélice à sept résidus glucose par tour ne permet pas la formation d'un empilement cristallin pour des raisons de symétrie et ne peut donc exister qu'en solution ou à l'état amorphe.

En revanche, la plupart des complexes d'amylose peuvent être produits sous forme de cristaux fibrillaires et étudiés en diffraction des rayons X. Cependant, lorsqu'ils sont préparés en solution diluée, ils conduisent généralement à la formation de monocristaux lamellaires et peuvent également être analysés par diffraction électronique. Les cristaux lamellaires ont une épaisseur variable de 7.5 à 10 nm (Zobel et al., 1967; Yamashita et al., 1973) et l'axe des chaînes d'amylose est perpendiculaire au plan de base de la lamelle (Rundle et French, 1943). Ceci implique le repliement de la chaîne d'amylose lorsque sa longueur est supérieure à l'épaisseur de la lamelle. Cette organisation a par ailleurs été confirmée par hydrolyse enzymatique des zones amorphes (Figure 3.1) (Jane et Robyt, 1984).

A l'heure actuelle, il n'existe toujours pas de classification pertinente et explicite des différents types de complexes d'amylose. Les termes employés pour les décrire se réfèrent plus à la molécule complexée qu'au type de conformation structurale obtenue.

3.1 Complexes dont la structure est spécifique de l'agent complexant

Ces complexes possèdent pour la plupart une hélice gauche constitutive, à six résidus glucose par tour, mais différent par le pas de l'hélice et/ou par son mode d'empilement dans l'édifice cristallin. Ces structures ne peuvent être obtenues qu'avec un seul type de molécule complexante.

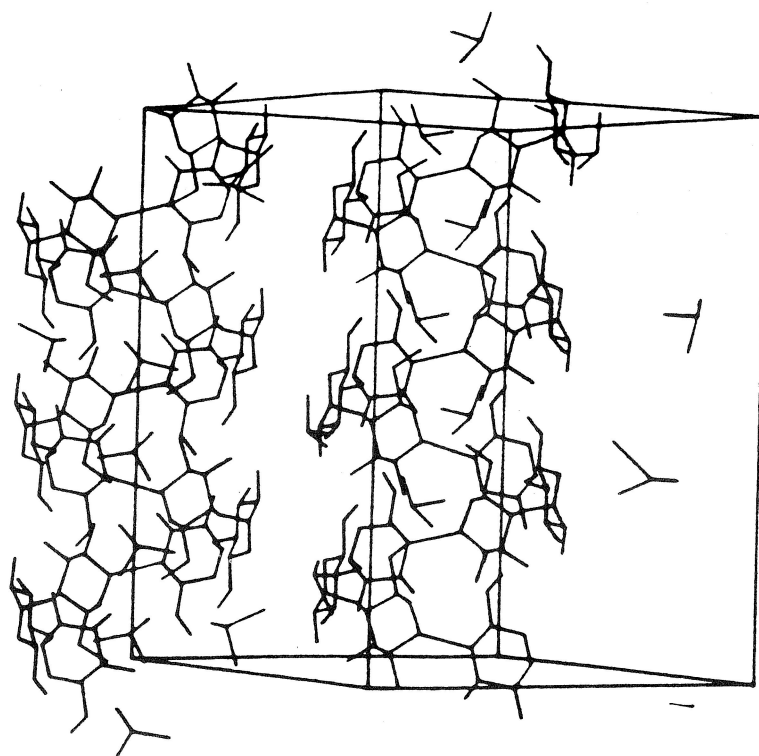


FIGURE 3.2 – Représentation de la maille cristallographique du complexe amylose-DMSO (Winter et Sarko, 1974).

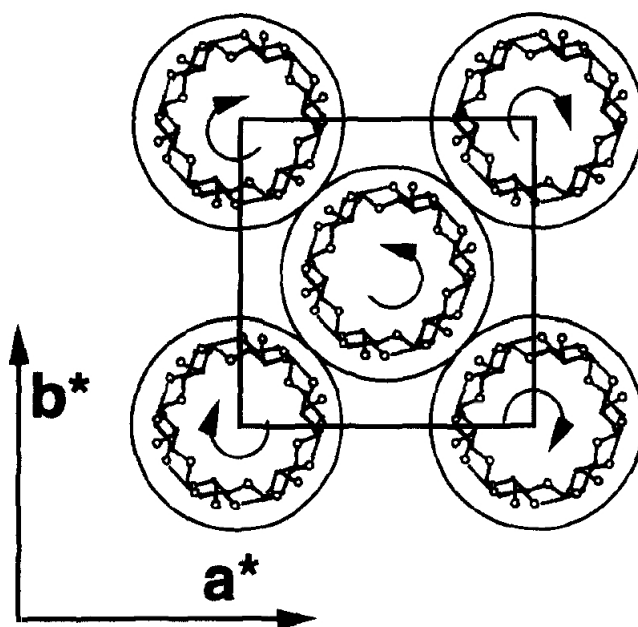


FIGURE 3.3 – Représentation schématique de la maille cristalline du complexe amylose-glycérol selon le plan (a,b) (Hulleman et al., 1996).

3.1.1 Complexes V_{DMSO}

Winter et Sarko (1974) ont proposé, pour les complexes amylose-DMSO, la structure cristallographique représentée sur la figure 3.2. La maille cristalline est pseudo-tétraogonale et de groupe d'espace $P2_12_12_1$ ($a=b= 1.97\text{nm}$, $c=2.439\text{nm}$). Elle contient deux hélices antiparallèles et six molécules de DMSO. L'unité répétitive le long de l'axe de chaîne est constituée de trois tours d'hélice. Ainsi, chaque tour d'hélice contient deux molécules de DMSO. Cette structure est facilement transformée en V_h (cf. § 3.2.2, page 83), par exposition des cristaux fibrillaires à des solutions alcooliques.

3.1.2 Complexes $V_{glycerol}$

La complexation du glycérol et de l'amylose peut aboutir à un empilement cristallin (figure 3.3) et a été décrit par Hulleman et al. (1996) à partir de cristaux lamellaires et diffraction électronique. La maille est orthorhombique, le groupe d'espace très probablement $P2_12_12_1$ avec les paramètres suivants : $a = 1.93 \text{ nm}$, $b = 1.86 \text{ nm}$ et $c = 0.83 \text{ nm}$. La maille contient deux hélices agencées de façon antiparallèle. Ni la position des molécules de glycérol, ni leur nombre, ne peut être clairement établi, mais la coloration possible de ces complexes par de l'iode suggère que le glycérol soit mobile, plutôt présent entre les hélices, et au nombre de quatre molécules par maille.

3.1.3 Complexes V_{KOH} et V_{KBr}

Comme la potasse est un solvant de l'amylose, les complexes amylose-KOH ne sont pas préparés par reprecipitation. Ils sont préparés par déacétylation de fibres cristallines d'acétates d'amylose, mises ensuite en présence de mélanges éthanol/eau/potasse (Senti et Witnauer, 1946). La structure des complexes amylose-KOH a été résolue par Sarko et Biloski (1980) avec des cristaux fibrillaires et par DRX. Deux hélices d'amylose s'arrangent dans une maille orthorhombique avec les paramètres $a = 0.884\text{nm}$, $b = 1.231\text{nm}$ et $c = 2.241\text{nm}$. Elle appartient au groupe d'espace $P2_12_12_1$. Chaque hélice est constituée de six résidus glucose (un tour d'hé-

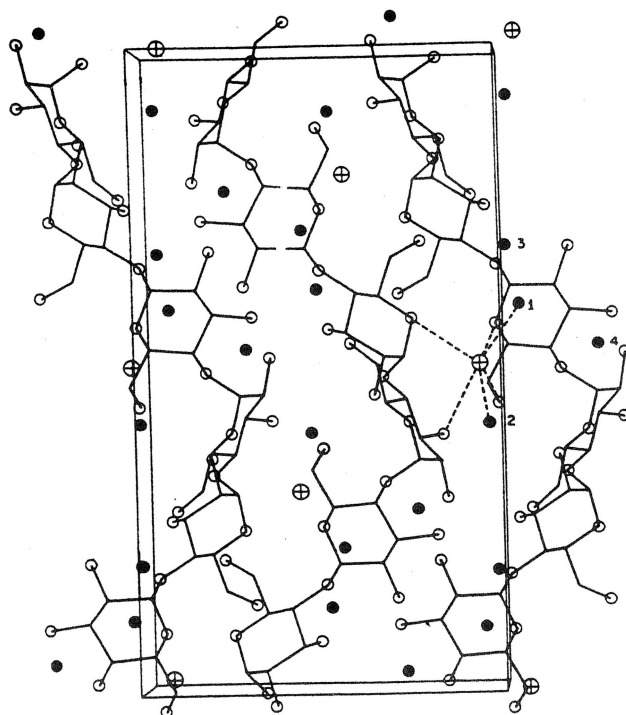


FIGURE 3.4 – Représentation de la maille cristalline du complexe amylose-KOH selon le plan (a, c). Les ions K⁺ sont notés par ⊕ (Sarko et Biloski, 1980).

lice) et chaque ion potassium est complexé avec trois résidus glucosyl (figure 3.4). Ce type de structure est également obtenu avec d'autres sels : LiOH, NaOH et CsOH.

Les lavages successifs des complexes amylose-KOH avec une solution hydroalcoolique de KBr entraînent un réarrangement de l'amylose. Dans la structure résultante, la maille de type tétragonale, et de symétrie $P4_32_12$ avec $a = b = 1.055\text{nm}$ et $c = 1.612\text{nm}$ (Miller et Brannon, 1980), contient deux hélices gauches constituées de quatre unités glucose. L'hélice d'amylose est étirée lors du passage V_{KOH} vers V_{KBr} .

3.1.4 Complexes V_{iode}

Des complexes d'amylose peuvent également être formés en présence d'iode. Rundle et al. (1944) ont montré que l'amylose acquiert alors une conformation hélicoïdale générant un canal où sont piégés les atomes d'iode. La maille cristalline est orthorhombique avec pour paramètres : $a = 1.360\text{nm}$, $b = 2.342\text{ nm}$ et $c = 0.817\text{nm}$ (Bluhm et Zugenmaier, 1981) et appartient au groupe d'espace $P2_1(S)$. Elle contient deux hélices d'amylose contiguës, ne permettant pas à un atome d'iode de trouver sa place entre les hélices. D'après Bluhm et Zugenmaier (1981), les atomes d'iode sont alignés aléatoirement dans la cavité de l'hélice et distant de 0.31nm (figure 3.5, page 80).

La formation de ces complexes donne lieu à une coloration qui dépend du degré de polymérisation de l'amylose, de la teneur en eau (ce complexe existe sous forme hydratée ou anhydre) et du positionnement de l'iode dans l'hélice. Cette variation de couleur est particulièrement marquée en fonction du degré de polymérisation de l'amylose : elle peut être marron (\overline{DP} 21-24), rouge (\overline{DP} 25-29), rouge-violet (\overline{DP} 30-38), bleu-violet (\overline{DP} 39-46) et bleu ($\overline{DP} > 47$) (John et al., 1983).

Les atomes d'iode sont piégés dans l'hélice sous la forme d'ions I^{2-} , I^{3-} et I^{5-} . La présence conjointe de ces trois anions serait responsable de la coloration bleue qui est absente dans le cas où seul l'ion I^{3-} est présent. Une hélice à sept ou huit résidus glucose par tour générerait une cavité trop large pour stabiliser la "chaîne polyiode" qui ne serait donc pas colorée.

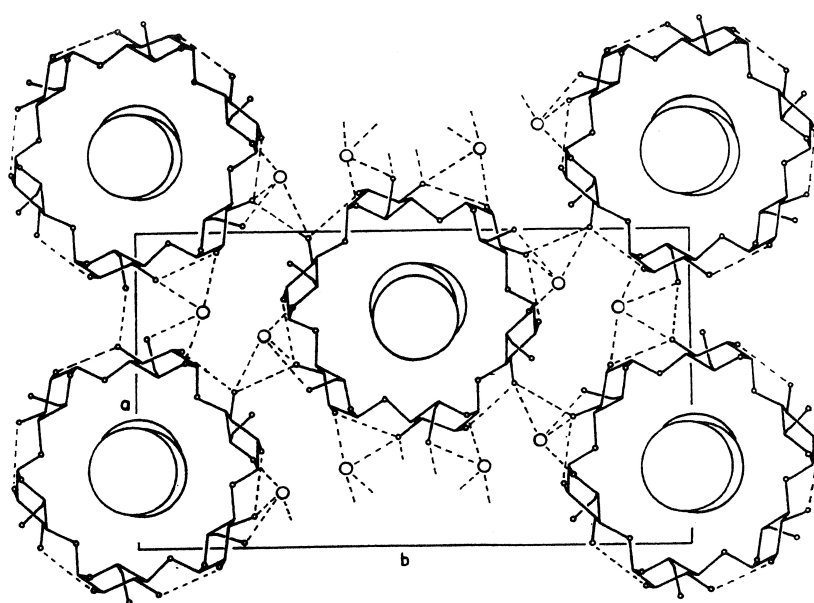


FIGURE 3.5 – Représentation de la maille cristalline du complexe amylose-iodine selon le plan (a,b). Les atomes d'iode sont disposés au centre des hélices. Les pointillés correspondent aux liaisons hydrogènes. (Bluhm et Zugenmaier, 1981)

Il existe d'autres types de complexes d'amylose mais ceux-ci peuvent être obtenus avec une grande variété de molécules différentes. Les complexes utilisant une hélice à six, sept ou huit glucoses par tour seront dorénavant dénommés respectivement V_6 , V_7 , V_8 .

3.2 Complexes V_6 aspécifiques

Trois grands types de structure ont été mis en évidence à partir d'amylose reprecipitée avec de l'éthanol (V_h , pour type V hydraté), du butanol ($V_{butanol}$) et de l'isopropanol ($V_{isopropanol}$). Ces trois complexes possèdent une hélice constructive d'amylose identique ; leurs principales différences résident donc dans les dimensions de la maille cristalline mais aussi par le nombre d'hélice que contient chaque maille.

De nombreuses molécules complexantes peuvent induire ces trois structures ; ceci conduit à définir trois "familles" de complexes. Dans la suite de ce manuscrit, ils seront dénommés respectivement V_{6I} pour V_h , V_{6II} pour $V_{butanol}$ et V_{6III} pour $V_{isopropanol}$ en référence à la taille de la maille cristalline. Cette dénomination évoque donc un type de structure non spécifique de la molécule présente dans le complexe.

3.2.1 Préparation des complexes d'amylose

La formation de complexes V_{6I} , V_{6II} ou V_{6III} nécessite la dispersion préalable de l'amylose dans une phase aqueuse suivie de l'ajout de la molécule complexante puis d'une précipitation. La dispersion peut être réalisée à froid dans une solution d'hydroxyde de sodium suivie d'une dialyse contre de l'eau ou une neutralisation (Buléon et al., 1984, 1990). Elle peut également être réalisée à chaud et sous pression ($T > 160$ °C) (Yamashita et al., 1973; Booy et al., 1979) ou en présence de DMSO (Biliaderis et al., 1985). L'alcool est généralement ajouté en concentration saturante (proche de 60 % (v/v) pour les alcools solubles dans l'eau) et à une température de 50 à 100 °C. Dans le cas des acides gras, 20 % (m/m) sont généralement ajoutés dans la dispersion d'amylose entre 60 et 90 °C. Cependant, pour certains monoglycérides à chaînes insaturées la température de cristallisation est plutôt comprise entre 30 et 40 °C. La précipitation

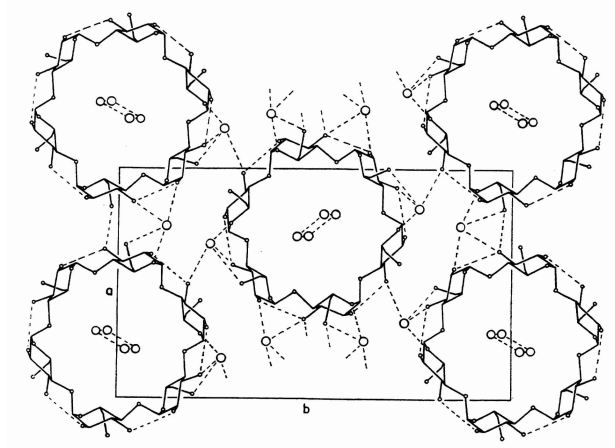


FIGURE 3.6 – Représentation moléculaire de l’amylose V_h (V_{6I}) selon le plan (a,b). D’après Rappenecker et Zugenmaier (1981) .

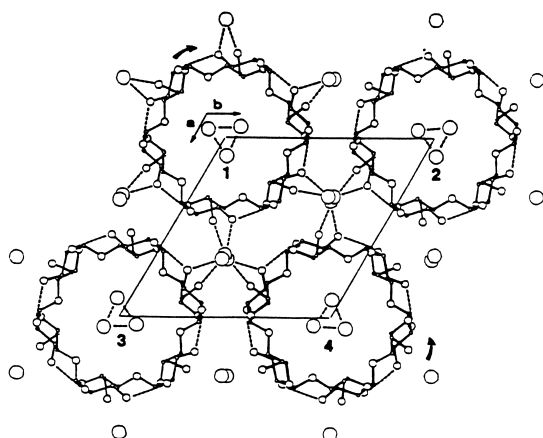


FIGURE 3.7 – Représentation moléculaire de l’amylose V_h (V_{6I}) selon le plan (a,b). D’après Brisson et al. (1991) .

des complexes cristallisés a généralement lieu après 24 à 48 heures.

3.2.2 Complexes de type V_{6I}

Les complexes de type V_{6I} sont obtenus avec certains alcools (éthanol, méthanol, n-propanol...) (Buléon et al., 1984; Brisson et al., 1991), des alcools à longues chaînes carbonées (jusqu'à 18 carbones) (Kowblansky, 1985; Whittam et al., 1989) ou encore, des lipides ayant une longue chaîne aliphatique (Yamashita et al., 1973).

3.2.2.1 Structure cristalline et moléculaire du type V_{6I}

Des clichés de diffraction des rayons X suffisamment résolus ont permis de définir un modèle structural du type V_{6I} . Rappenecker et Zugenmaier (1981) ont mis en évidence une maille élémentaire de type orthorhombique pseudo-hexagonale appartenant au groupe d'espace $P2_12_12_1$ avec $a = 1.365\text{nm}$, $b = 2.370\text{ nm}$ et $c = 0.805\text{ nm}$ (Figure 3.6). La maille cristalline contient deux hélices gauches antiparallèles et 16 molécules d'eau (huit intra-hélicoïdales et huit entre les hélices).

Par ailleurs, Brisson et al. (1991) ont proposé un autre modèle obtenu à partir de monocristaux et de clichés de diffraction électronique. Ce modèle présente une maille de type hexagonal de symétrie $P6_522$ avec $a = b = 1.365\text{nm}$, $c = 0.805\text{nm}$ et $\gamma = 120^\circ$ (Figure 3.7). D'après ce modèle la maille cristalline ne contient qu'une hélice d'amylose. L'empilement des hélices dans l'édifice cristallin est alors statistique et aléatoire et non pas antiparallèle comme dans le modèle de Rappenecker.

Même si les modèles de Rappenecker et Zugenmaier (1981) et de Brisson et al. (1991) diffèrent par la maille cristalline, ils reposent tous les deux sur la même hélice d'amylose. Il s'agit d'une simple hélice gauche à six résidus par tour (Rundle et French, 1943) dont l'avance par résidu glucosyl (h), est comprise entre 0.132 nm et 0.136 nm . Ces hélices d'amylose sont stabilisées par des liaisons hydrogène intra moléculaires ($O_2...O_{3/2}$) et ($O_2...O_{6/7}$) entre les différents tours d'hélice (Rappenecker et Zugenmaier, 1981). Elle possède une cavité hydrophobe d'un diamètre d'environ 0.45 nm susceptible d'accueillir l'agent complexant (Godet et al., 1993,

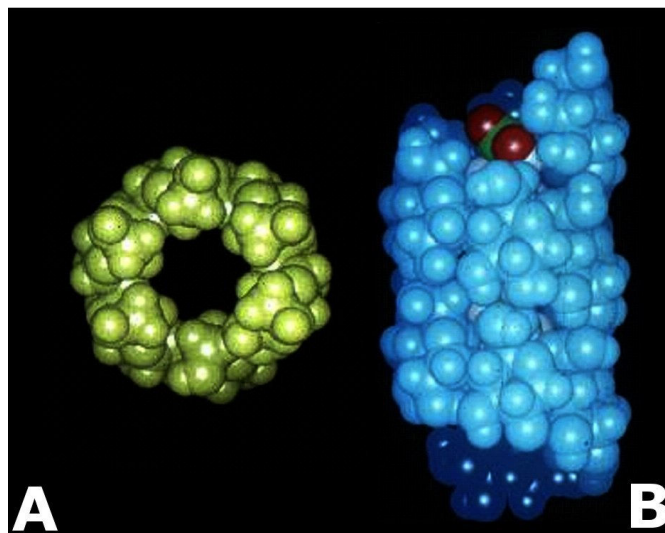


FIGURE 3.8 – A. Représentation de l'hélice V_6 dans le plan (a,b) B. Modèle d'inclusion d'un acide gras dans l'hélice d'amylose. La tête polaire du lipide ne peut être incluse. D'après Godet et al. (1993).

1995a).

Généralement la structure des complexes amylose-lipides était appréhendée par analogie avec les complexes amylose-alcool. Cependant, des monocristaux de complexes amylose-lipides obtenus et étudiés en diffraction électronique par Helbert (1994), ont permis de montrer que la structure de l'amylose est identique à la structure de l'amylose dans les complexes amylose-alcool. En revanche, les positions cristallographiques des lipides ne sont toujours pas connues. Les complexes d'amylose-acide gras sous forme de poudres polycristallines présentent des diagrammes de diffraction identique à ceux des complexes amylose-alcools (Godet et al., 1996).

3.2.2.2 Inclusion du ligand dans la cavité hélicoïdale

Les molécules possédant une chaîne aliphatique sont fréquemment incluses dans la cavité de l'hélice. La chaîne aliphatique peut être insérée dans la cavité hélicoïdale sans subir de contrainte importantes. En effet, Carlson et al. (1979) ont montré que la conformation de la chaîne aliphatique d'un acide gras inclus est identique à la conformation de la chaîne aliphatique de ce même acide gras dans son état cristallin. Une caractéristique importante de cette inclusion est l'adéquation presque parfaite entre le contenant (l'hélice) et le contenu (la chaîne aliphatique du ligand) : Godet et al. (1993) ont montré que l'avancement d'un résidu glucosyl correspond parfaitement à un groupement CH_2 de la chaîne aliphatique.

Même si une molécule peut être incluse dans la cavité de l'hélice ou induire sa formation, le piégeage de la molécule dans l'hélice requiert une longueur minimale de la chaîne aliphatique. Ainsi, les complexes obtenus à partir de petits alcools (méthanol, éthanol ou n-propanol) ne contiendraient que des molécules d'eau (Whittam et al., 1989). De la même façon, Godet (1994) a montré qu'un acide gras doit avoir plus de huit carbones pour être retenu et piégé dans la cavité de l'hélice.

Par ailleurs, le modèle également établi par Godet et al. (1993) montre que la tête polaire d'un acides gras est trop volumineuse et ne peut pas être incluse dans la cavité de l'hélice (Figure 3.8). Ceci peut expliquer le fait que les ligands avec une courte chaîne aliphatique ne sont pas bien retenus et le piégeage de la molécule dans l'hélice requerrait au minimum un tour

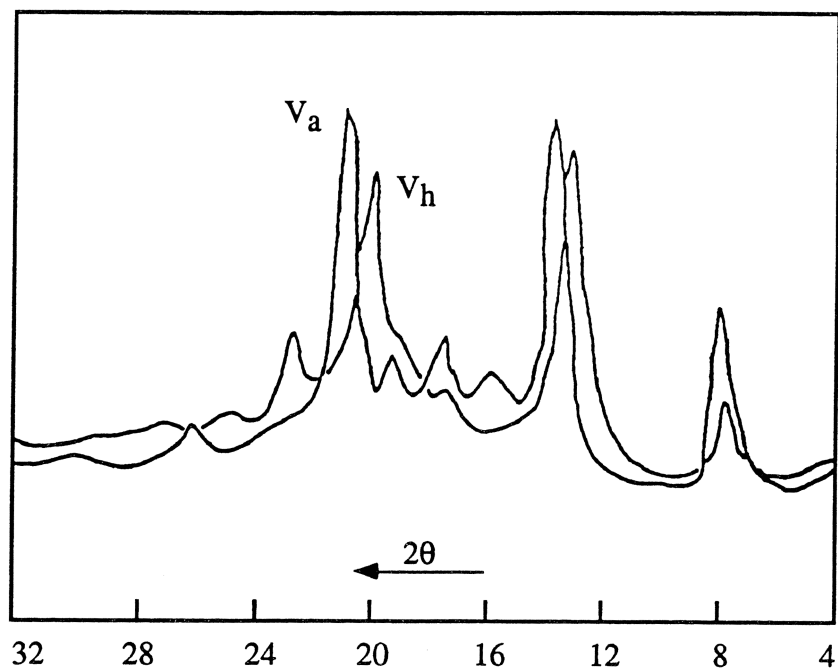


FIGURE 3.9 – Diagramme de diffraction des rayons X caractéristiques des types cristallins V_h et V_a .

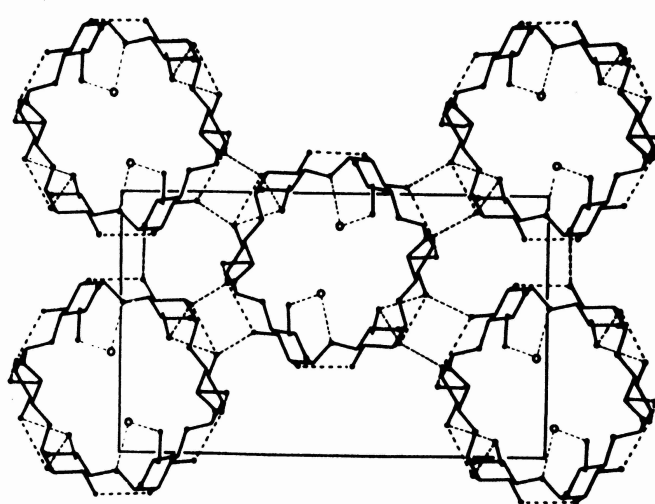


FIGURE 3.10 – Représentation de la maille cristallographique du complexe V_a selon le plan (a,b) (Sarko et Zugenmaier, 1980).

d'hélice complet.

L'inclusion d'acide gras entre les hélices dans la maille V_{6I} n'est pas envisageable car l'espace entre les hélices est très restreint et ne permet pas le positionnement de molécules plus volumineuses que des molécules d'eau (Godet et al., 1993). Ces dernières, présentes entre les hélices, jouent un rôle important. En effet, sous certaines conditions d'hydratation, l'empilement cristallin peut être modifié et conduire à une transition vers un autre empilement cristallin nommé V_a (a, pour anhydre).

3.2.2.3 Transition vers le type V_a

Ce type cristallin V_a peut être formé à partir de complexes V_{6I} , mais aussi lors d'une cristallisation à faible teneur en eau ou lors d'une extrusion. Lors d'un séchage de cristaux fibrillaires (activité de l'eau $A_w \leq 0.6$), une transition réversible du type V_h vers un autre type cristallin V_a peut être observée (Hinkle et Zobel, 1968). Cette transition peut conduire à des formes intermédiaires (Zobel et al., 1967) en fonction du degré d'hydratation. Le passage du type V_h vers le type V_a se traduit par une modification des diagrammes de DRX. En effet, les deux types cristallins présentent chacun des diagrammes de diffraction avec des pics caractéristiques aux angles $2\theta = 7.4^\circ$, 13.9° et 19.8° ($\lambda = 0.15405$ nm) pour le V_{6I} et $2\theta = 7.9^\circ$, 13.6° et 20.9° ($\lambda = 0.15405$ nm) pour le V_a (Figure 3.9).

Le type V_a , dont la structure a été résolue par Sarko et Zugenmaier (1980) possède une maille orthorhombique avec $a = 1.297$ nm, $b = 2.246$ nm, $c = 0.791$ nm et $\gamma = 90^\circ$ et appartient au groupe d'espace $P2_12_12_1$ (Figure 3.10). La maille contient deux hélices d'amylose et seulement huit molécules d'eau dans les hélices. La transition $V_h \rightarrow V_a$ résulte donc d'un rapprochement des hélices, conservant le même empilement mais formant une structure plus dense sans les molécules d'eau.

La présence des molécules d'eau dans les cristaux d'amylose de type V_{6I} et V_a a fait l'objet de plusieurs études (Rappenecker et Zugenmaier, 1981; Brisson et al., 1991). En effet, les molécules d'eau interstitielles sont très facilement éliminées lors du passage V_{6I} vers V_a alors que les molécules présentes dans la cavité hélicoïdale sont très difficilement substituées. Dans le

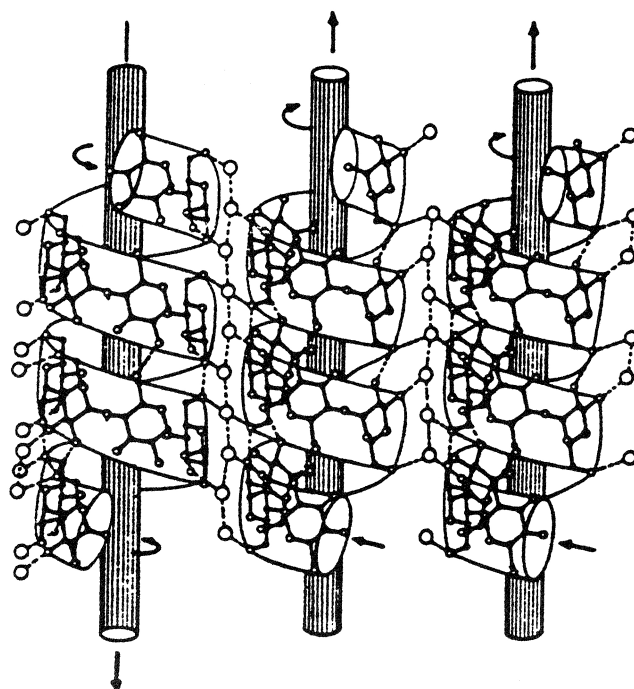


FIGURE 3.11 – Projection dans le plan (b, c) de trois hélices d'amylose dans la structure V_{6I} . Les molécules d'eau internes sont représentées par une colonne d'eau, les molécules interstitielles par des cercles et les liaisons hydrogène par des pointillés (Brisson et al., 1991).

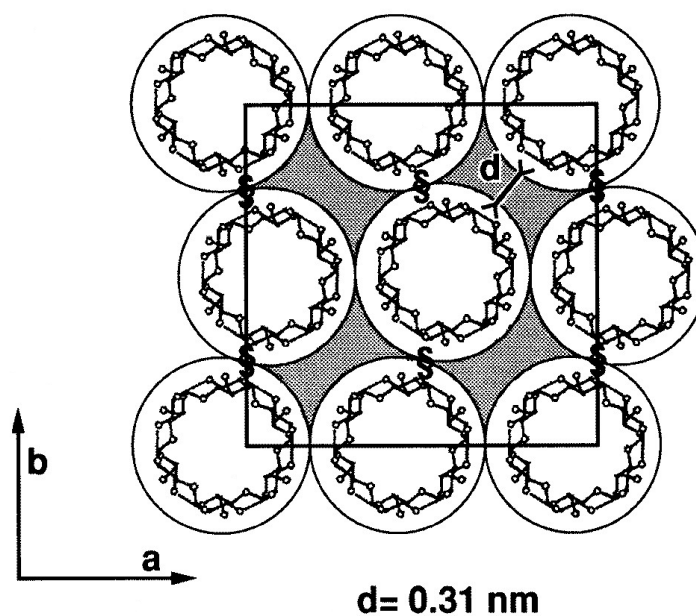


FIGURE 3.12 – Représentation schématique de l'organisation des hélices d'amylose dans la maille cristalline de complexes amylose-n-butanol selon le plan (a,b) (Helbert et Chanzy, 1994).

modèle de Brisson et al. (1991), les molécules d'eau internes sont associées en pseudo-hélices, formant une colonne d'eau identique pour les types V_{6I} et V_a , qui assurerait la cohésion des hélices dans la maille cristalline (Brisson et al., 1991) (Figure 3.11).

3.2.3 Complexes de type V_{6II}

Les complexes de type V_{6II} sont connus sous l'appellation $V_{n-butanol}$ depuis les travaux de Schoch (1942) sur le fractionnement de l'amidon par précipitation au butanol. Ces cristaux sont très sensibles à la dé-solvation et leur séchage entraîne une transition cristalline à l'état solide du type V_{6II} vers le type V_{6I} (Rundle et Edwards, 1943; Yamashita, 1965). Ils se présentent sous forme de lamelles rectangulaires craquelées le long de leur axe principal.

La maille cristalline est de type orthorhombique avec les paramètres : $a = 2.74$ nm, $b = 2.65$ nm et $c = 0.8$ nm et appartient au groupe d'espace $P2_12_12_1$ (Helbert et Chanzy, 1994). Elle contient approximativement quatre molécules de n-butanol et quatre hélices d'amylose, chacune étant en contact avec quatre portions d'hélices voisines et séparée de 0.31 nm de quatre autres portions (Figure 3.12).

Le doublement de la maille cristalline par rapport à celle du type V_{6I} pourrait être expliqué par la présence de n-butanol entre les hélices (Booy et al., 1979). En effet, l'espace entre les hélices d'amylose semble suffisamment grand pour qu'une molécule de n-butanol en conformation "trans" puisse s'insérer dans cette "poche" allongée. A l'heure actuelle, la position exacte des molécules de n-butanol dans la maille cristalline n'est pas définie : les molécules pourraient être fixées dans une position cristallographique déterminée ou mobiles dans un "canal" inter-hélice. Cependant, la diffusion aisée du n-butanol par séchage ou échange de solvant suggère que les molécules piégées possèdent une certaine mobilité. Les études menées jusqu'à présent ne permettent pas de statuer sur l'inclusion ou non du n-butanol dans l'hélice.

D'autres molécules comme le n-pentanol ou le 3-butène-1-ol, l'hexanal ou l'hexanol (Jouquand et al., 2006) sont connues pour complexer l'amylose et former un empilement cristallin de type V_{6II} .

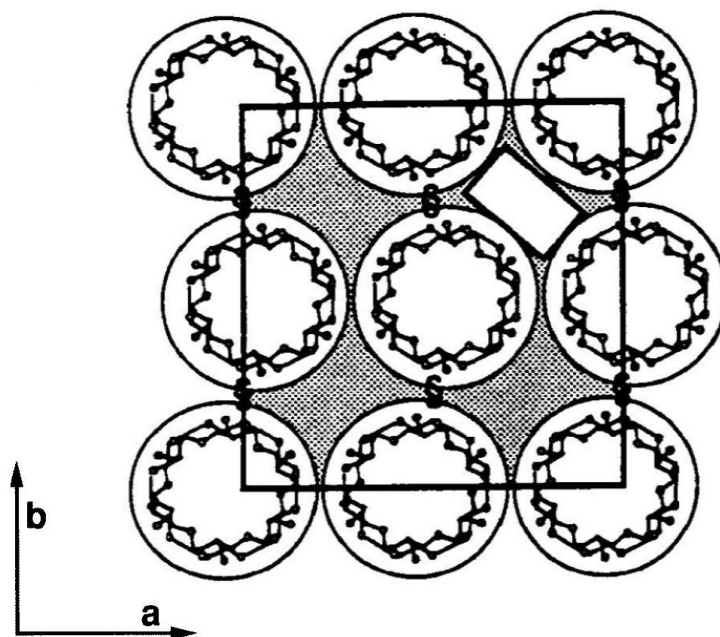


FIGURE 3.13 – Représentation schématique de l'organisation des hélices d'amylose dans la maille cristalline de complexes amylose-isopropanol selon le plan (a,b) (Buléon et al., 1990).

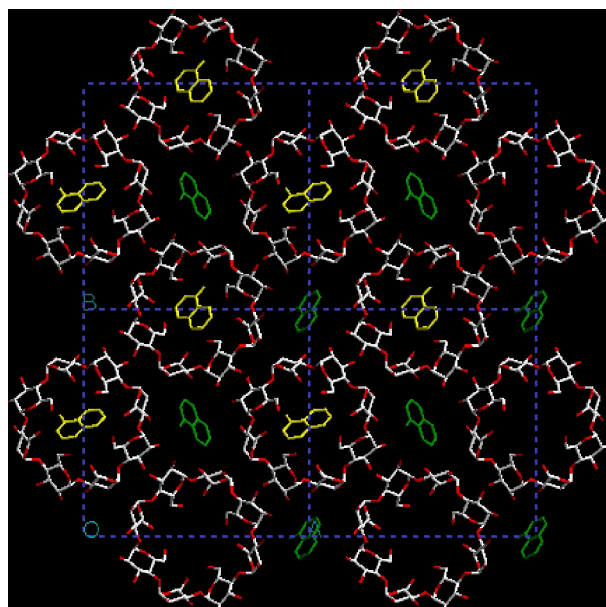


FIGURE 3.14 – Modèle de maille cristalline proposée par Winter et al. (1998) pour les complexes amylose- α -naphthol.

3.2.4 Complexes de type V_{6III}

Les complexes d'amylose de type V_{6III} ont été obtenus à partir d'isopropanol ($V_{isopropanol}$) et très étudiés (Yamashita et Hirai, 1966; Yamashita et al., 1973; Buléon et al., 1990). Ils sont moins sensibles à la dé-solvatation que les complexes avec le n-butanol mais une transition polymorphique vers le type V_{6I} est malgré tout possible à l'état solide (Yamashita et Hirai, 1966). Les cristaux rectangulaires se craquent alors perpendiculairement à l'axe principal des lamelles.

La maille cristalline, déterminée par Buléon et al. (1990), est représentée schématiquement sur la figure 3.13. Elle est orthorhombique et appartient au groupe d'espace $P2_12_12_1$ ou $P2_12_12$ avec $a = 2.83$ nm, $b = 2.93$ nm et $c = 0.8$ nm. Ces paramètres de mailles ont par la suite été précisés à partir de complexes avec des composés d'arôme (cf. § 4.2.2.3, page 123) (Nuessli et al., 2003). Elle contient quatre hélices d'amylose et des molécules sont très probablement piégées entre les hélices. Comme pour les complexes V_{6II} , il n'existe toujours pas de modèle moléculaire précis donnant les positions des hélices dans la maille.

De nombreuses molécules peuvent complexer l'amylose et conduire à un type cristallin V_{6III} . Il y a par exemple l'acétone, le thymol, le carvacrol (Helbert, 1994), la menthone ou le linalol (Le Bail et al., 2005).

3.3 Complexes de type V_8

Des complexes faisant intervenir une hélice d'amylose à huit unités glucosyl par tour ont été obtenus avec des molécules telles que l' α -naphthol ou la quinoléine (Yamashita et Monobe, 1971; Helbert, 1994).

Les monocristaux obtenus avec l' α -naphthol ont une forme plus ou moins carrée (Helbert, 1994). La maille cristalline proposée par Yamashita et Monobe (1971) est de type tétragonale, de groupe d'espace $P4_12_12$ ou $P4_32_12$, avec $a = b = 0.29$ nm et $c = 0.79$ nm et contiendrait deux hélices. En revanche, Helbert (1994) a proposé une maille légèrement différente avec $a = b = 0.33$ nm et $c = 0.79$ nm. Finalement, les travaux plus récents de Winter et al. (1998)

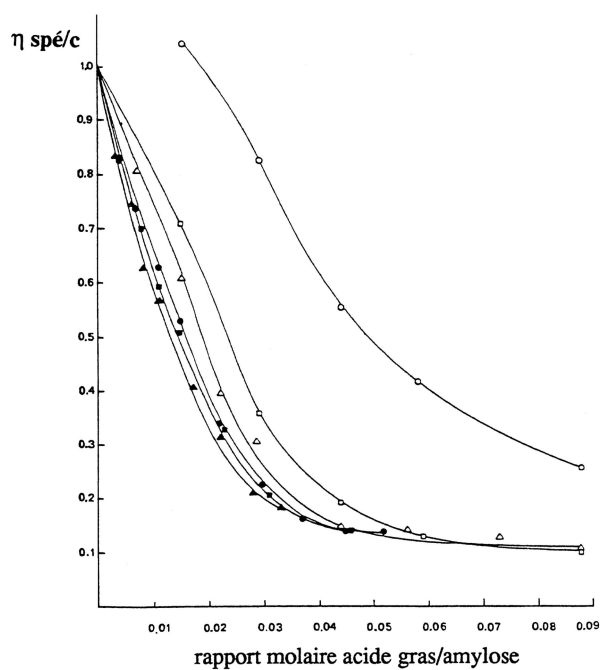


FIGURE 3.15 – Viscosité d'une solution d'amylose en fonction du rapport molaire acide gras/amylose (Karkalas et Raphaelides, 1986) pour l'acide laurique (○), l'acide myristique (□), l'acide palmitique (△), l'acide stéarique (●), l'acide arachidique (■) et l'acide béhénique (▲).

envisagent une troisième maille cristalline (Figure 3.14, page 90) de type tétragonale, de groupe d'espace $P4_32_12$ avec les paramètres $a = b = 2.33$ nm et $c = 0.8$ nm.

Les complexes obtenus avec la quinoléine s'agenceraient plutôt dans une symétrie orthorhombique pseudo-tétragonale dans le groupe d'espace $P2_12_12_1$ et $a = b = 4.66$ nm et $c = 0.79$ nm (Helbert, 1994).

Relativement peu d'études ont porté sur ce type de complexes, cependant les travaux de Jane et Robyt (1984) (hydrolyse enzymatique de complexes amylose- α -naphтол) ou de Gidley et Bociek (1988) (RMN) tendent à confirmer cette organisation en hélice V_8 . Par ailleurs, les stœchiométries calculées par Rutschmann et Solms (1990a) sont compatibles avec une structure hélicoïdale à huit glucoses par tour.

3.4 Aspects stœchiométriques des complexes d'amylose

3.4.1 Stœchiométrie des complexes amylose-acides gras

La stœchiométrie des complexes V_{6I} a principalement été étudiée sur des complexes obtenus à partir de lipides. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour déterminer la quantité de ligand dans les complexes amylose-lipide et conduisent à des résultats plus ou moins proches des taux théoriques de saturation de l'amylose, calculés par Karkalas et Raphaelides (1986). Ces résultats sont résumés dans le tableau 3.1 (page 94) en fonction de chaque méthode : mesures de viscosité (Karkalas et Raphaelides, 1986), isothermes de sorption (Rutschmann et Solms, 1990b,e), dosages chimiques (Godet et al., 1995b) et spectroscopie infrarouge (Fanta et al., 1999).

Au cours de la formation de complexes amylose-acides gras, la viscosité d'une solution d'amylose diminue lorsque la quantité d'acide gras augmente (Karkalas et Raphaelides, 1986) (Figure 3.15). Lorsque l'amylose est totalement complexée ou saturée, la viscosité ne varie plus et le rapport molaire acide gras/amylose correspond à la stœchiométrie de complexes amorphes en solution. Les isothermes de sorption réalisés par Rutschmann et Solms (1990b,e) et des mesures d'activité optique (Bulpin et al., 1987) montrent également un phénomène de saturation lié

	Théorique	mesure de la viscosité	isothermes de sorption	dosage chimique	Infrarouge	R.M.N. du liquide
matrice	amylose V ₆	amylose	amidon	amylose DP 80-900	amylomaïs	amylose hydroxypropylée
ac. caprilique	-	-	-	0.006-0.063 ⁽³⁾	-	-
ac. caprique	0.09 ⁽¹⁾	0.029-0.100 ⁽¹⁾	-	-	-	-
ac. laurique	0.077 ⁽¹⁾	0.052-0.068 ⁽¹⁾	-	0.03-0.332 ⁽³⁾	0.044-0.047 ⁽⁴⁾	-
ac. myristique	0.067 ⁽¹⁾	0.058 ⁽¹⁾	-	-	0.038-0.049 ⁽⁴⁾	-
ac. palmitique	0.060 ⁽¹⁾	0.038-0.052 ⁽¹⁾	0.011 ⁽²⁾	0.03-0.333 ⁽³⁾	-	-
ac. stéarique	0.54 ⁽¹⁾	0.038-0.047 ⁽¹⁾	0.010 ⁽²⁾	-	-	-
hexanal	-	-	-	-	-	0.122 ⁽⁵⁾
decanal	-	-	0.015 ⁽²⁾	-	-	0.083 ⁽⁵⁾
1-octen-3-ol	-	-	-	-	-	0.085 ⁽⁵⁾
(E)-2-octenal	-	-	-	-	-	0.081 ⁽⁵⁾
(E)-2-nonenal	-	-	-	-	-	0.084 ⁽⁵⁾
(E)-2-decenal	-	-	-	-	-	0.077 ⁽⁵⁾
(E)-4-decenal	-	-	-	-	-	0.064 ⁽⁵⁾
(Z)-4-decenal	-	-	-	-	-	0.041 ⁽⁵⁾
(E;E)-2,4-decadienal	-	-	-	-	-	0.039 ⁽⁵⁾
(-)-limonene	-	-	0.006 ⁽²⁾	-	-	-
menthone	-	-	0.045 ⁽²⁾	-	-	-
1-naphtol	-	-	0.063 ⁽²⁾	-	-	-

⁽¹⁾ Karkalas et Raphaelides (1986)

⁽²⁾ Rutschmann et al. (1989); Rutschmann et Solms (1990b,a,c,d)

⁽³⁾ Godet et al. (1995b)

⁽⁴⁾ Fanta et al. (1999)

⁽⁵⁾ Wulff et al. (2005)

TABLEAU 3.1 – Comparaison de plusieurs méthodes de dosage des ligands dans les complexes d'amylose. La stœchiométrie est exprimée comme le rapport du nombre de mole de ligand sur le nombre de mole d'unité glucosyl $n_{ligand} / n_{glucosyl}$.

à l'ajout d'acide gras dans le milieu. Les résultats obtenus varient grandement pour un même type de complexes. Les stœchiométries calculées par les mesures de viscosité pour des complexes amylose-acide palmitique ($n_{ligand} / n_{glucosyl}$ de 0.038 à 0.052) sont proches des rapports théoriques (0.06) tandis que les résultats des isothermes de sorption sont bien inférieurs à ce ratio (0.011). Cette dernière étude a été menée en présence d'amidon, alors que les stœchiométries théoriques ont été calculées pour de l'amylose, ceci explique probablement la différence observée. Par ailleurs, les mesures d'activité optique réalisées par Bulpin et al. (1987) aboutissent à une stœchiométrie supérieure à la saturation théorique (0.083); ce qui laisse penser que la complexation de l'amylose n'est pas le seul phénomène impliqué dans ces mesures (adsorption simple d'acides gras).

Contrairement aux méthodes précédentes, les études par dosage chimique (chromatographie en phase gazeuse (CPG) après méthylation des acides gras (Godet et al., 1995b)) et par infrarouge (Fanta et al., 1999) ont été menées respectivement sur des poudres semi-cristallines et sur des films de complexes. Les stœchiométries calculées sont proches des résultats obtenus par les mesures de viscosité mais les dosages en CPG présentent une grande variabilité probablement liés à la présence d'acide gras piégés dans les zones amorphes de ces complexes.

Les stœchiométries des complexes d'amylose présentent une grande variabilité en fonction de la technique utilisée et sont différentes pour chaque type de molécules complexées. Ainsi la stœchiométrie du complexe dépend de la longueur de la chaîne de l'acide gras, plus la chaîne est longue plus le rapport $n_{ligand} / n_{glucosyl}$ est faible (Karkalas et Raphaelides, 1986). Elle dépend également de la longueur de la chaîne d'amylose impliquée (Godet et al., 1995b). Finalement, Rutschmann et Solms (1990b) et Rutschmann et Solms (1990e) ont montré un effet coopératif positif de la complexation des acides gras par l'amylose. L'amylose se comporte de façon similaire à une enzyme allostérique. Ainsi, la complexation d'une molécule d'acide gras facilite et favorise la fixation d'une deuxième molécule d'acide gras.

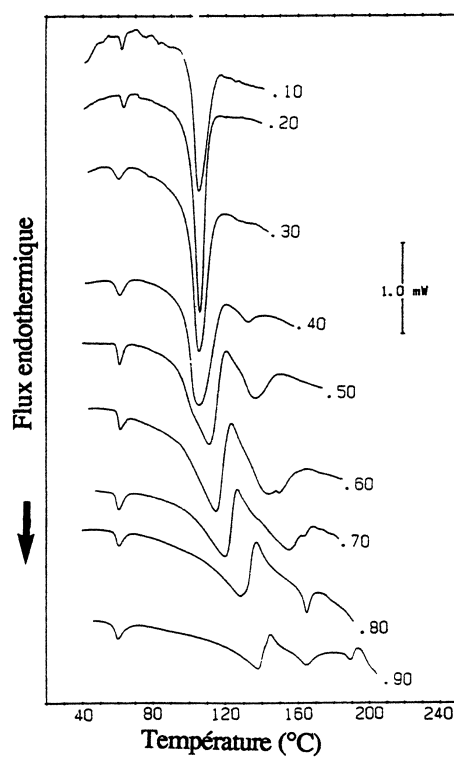


FIGURE 3.16 – Thermogrammes de complexe amylose-ac. stéarique à différentes teneurs en eau. La valeur indiquée en face de chaque thermogramme correspond à la proportion de complexe (en masse). D'après Biliaderis et al. (1986).

3.4.2 Stœchiométrie des autres complexes

Peu d'études ont porté sur les complexes obtenus avec d'autres molécules que les lipides et concernent essentiellement des complexes en solution. Les molécules complexantes utilisées pour ces études sont principalement des aldéhydes, des alcools et des cétones. Les travaux de Rutschmann et al. (1989); Rutschmann et Solms (1990b,c) et ceux plus récents de Wulff et al. (2005) par RMN ont abouti à des stœchiométries similaires à celles des complexes amylose-lipides (Tableau 3.1, page 94). Le dosage des molécules complexées et la détermination des stœchiométries des complexes V_{6II} et V_{6III} est d'autant plus difficile que les molécules peuvent être piégées à l'intérieur ou à l'extérieur des hélices. Mais, récemment une étude des molécules piégés dans les zones cristallines et amorphes de complexes solides amylose-composés d'arôme de types V_{6I} , V_{6II} et V_{6III} a été réalisée par infrarouge et DRX (Biais et al., 2006).

3.5 Stabilité thermique des complexes V

La stabilité thermique des amyloses complexées a été très étudiée. Comme dans le cas des amidons natifs, la teneur en eau de l'échantillon a une influence très importante sur la température de fusion des complexes. L'eau joue ainsi le rôle de diluant : la température de fusion des complexes diminue lorsque la teneur en eau passe de 10 à 50 % (m/m) mais n'a plus d'influence pour des concentrations supérieures à 50 % (Biliaderis et al., 1986) (Figure 3.16). Lorsque l'hydratation est inférieure à 70 %, plusieurs endothermes et exothermes peuvent être observés. Ils seraient liés à des réorganisations cristallines au cours du chauffage (phénomène de recuit) (Biliaderis et al., 1986).

La température de fusion est également dépendante de la longueur de la chaîne aliphatique de la molécule incluse dans l'hélice, que ce soit pour des alcools (Kowblansky, 1985; Whittam et al., 1989) ou des acides gras (Stute et Konieczny-Janda, 1983; Eliasson et Krog, 1985; Godet et al., 1995a). Par exemple, la température de fusion du complexes amylose-n-butanol est de 68 °C tandis que la température de fusion des complexes amylose-n-octanol est de 104 °C (Whittam et al., 1989). Concernant les acides gras, lorsque le nombre de carbone par chaîne

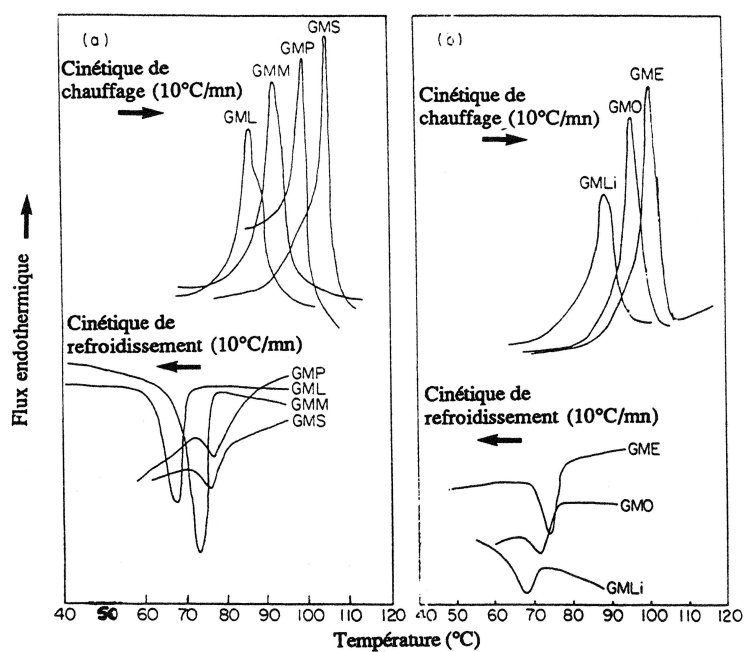


FIGURE 3.17 – Thermogrammes d’amylose complexée avec (a) des monoglycérides d’acides gras saturés : acide laurique (GML), myristique (GMM), palmitique (GMP), stéarique(GMS). (b) de monoglycérides d’acides gras insaturés : acide linoléïque (GMLi), oléïque (GMO) et élaïdique (GME). D’après Eliasson et Krog (1985).

aliphatique passe de 12 (ac. laurique) à 18 (ac. stéarique) la température de fusion augmente de 85.1 °C à 103.5 °C (Eliasson et Krog, 1985). En revanche, pour une même longueur de chaîne aliphatique, la température de fusion du complexe diminue avec le degré d'insaturation (Stute et Konieczny-Janda, 1983; Eliasson et Krog, 1985) (Figure 3.17) et l'enthalpie de fusion n'est pas significativement différente (1.58 ± 0.05 J/g de matière sèche de complexe) quelle que soit la longueur de la chaîne aliphatique (Bulpin et al., 1982; Whittam et al., 1989). La température de fusion des complexes augmente également avec la longueur de la chaîne d'amylose impliquée (Godet et al., 1995a).

Les thermogrammes de complexes amylose-lipides présentent souvent plusieurs endothermes de fusion. Biliaderis et Galloway (1989) ont émis l'hypothèse de deux formes de complexes. La température de fusion de complexes amylose-glycérol-1-stéarate de la forme I est de 100 °C alors que la fusion de la forme II se produit à 114 °C. Étant donné que la forme I ne présente pas de diagramme de DRX caractéristique, cette forme I correspondrait à des complexes à l'état amorphe et la forme II à des complexes cristallins.

La faible différence d'enthalpie de fusion mesurée pour les complexes de la forme I et ceux de forme II (20.5 et 26.7 J/g) montre que cette enthalpie correspond en grande partie à l'énergie nécessaire à la fusion des hélices d'amylose, la part liée à la désorganisation de l'édifice cristallin étant minime (Biliaderis et Galloway, 1989).

3.6 Modifications des propriétés des amidons par les complexes d'amylose

Les amidons de céréales contiennent une fraction de lipides qui peuvent complexer l'amylose lors d'un traitement hydrothermique. Les complexes ainsi obtenus peuvent avoir une forme globulaire, de disques (Peterson et al., 2005) ou même une forme presque cylindrique (Lalush et al., 2005). La formation de ces complexes modifie les propriétés et le comportement de l'amidon.

Elle peut par exemple avoir une influence sur la rétrogradation de l'amidon. En effet, si

tout ou partie de l'amylose est complexée, la rétrogradation de l'amylose est très faible ou inexistante. Sur un plan pratique, la rétrogradation de l'amidon est responsable du rassissement de produits céréaliers, mais ce rassissement est ralenti par la présence de complexes amylose-lipides (Gudmundsson, 1992).

En présence de complexes amylose-acide gras, l'amidon a un comportement proche d'un amidon réticulé, c'est à dire un gonflement retardé. En effet, en début de gélatinisation, une partie de l'amylose dispersée peut complexer des lipides présents dans le milieu et former une couche insoluble à la surface du grain. Cette couche limiterait la pénétration de l'eau à l'intérieur du grain et retarderait ainsi le gonflement. Ce phénomène a été mis en évidence avec des lipides endogènes (Eliasson, 1985) ou exogènes mais aussi lors d'ajouts de complexes préalablement formés à des amidons (Gelders et al., 2006).

La présence de complexes amylose-lipides procure également à l'amidon une bonne stabilité de la viscosité à haute température ou en cas de fort cisaillement et lors de la conservation des échantillons à froid (Gelders et al., 2006). La formation des complexes conduirait à une structure plus rigide qui stabiliserait le grain d'amidon gonflé (Krog, 1973).

Enfin, la bonne résistance de ces complexes aux hydrolyses acide ou enzymatique (Gelders et al., 2005), a conduit plusieurs auteurs à envisager l'utilisation de complexes d'amylose pour une libération contrôlée de diverses molécules (arômes, principes actifs de médicaments...) (Lalush et al., 2005; Wulff et al., 2005; Gelders et al., 2006).

Une illustration pratique de l'amélioration des propriétés de l'amidon concerne le procédé de pré-cuisson de certains riz. Les riz pré-cuits ont une consistance plus ferme que les riz normaux et sont moins collants (Derycke et al., 2005). Ceci est attribué à la formation de complexes avec les lipides endogènes au riz lors du procédé industriel de pré-cuisson (Biliaderis et al., 1993). Ces phénomènes de complexation impliquent tous les produits céréaliers qui subissent un traitement thermique en milieu suffisamment hydraté, l'amidon pourra interagir avec une grande variété d'ingrédients de la matrice, notamment les arômes présents, qu'ils soient endogènes ou exogènes.

Chapitre 4

Produits céréaliers et interactions avec les arômes

Les produits céréaliers de cuisson, aux textures très diverses, peuvent être regroupés sous la dénomination commune de mousses solides. En effet, les mousses se présentent sous la forme d'une dispersion de bulles de gaz dans une matrice continue. Elles peuvent être souples et déformables, comme c'est le cas pour la mie de pain, les génoises et bon nombre de produits de viennoiserie et de pâtisserie. Elles peuvent également être rigides et cassantes dans le cas des biscuits et des produits extrudés. La texture finale de ces produits (souple ou croustillante) est en grande partie conditionnée par le taux d'humidité de la pâte avant cuisson, la température pendant la cuisson et la teneur en eau du produit fini. En effet, la teneur en eau ayant une influence sur la Tg de l'amidon, des produits stockés ou utilisés à une température inférieure à leur Tg seront croustillants alors que les produits dont la Tg est inférieure à leur température d'utilisation seront plus souples ou moelleux. Ceci est illustré sur la figure 4.1 (page 104), où les pâtes et les produits de cuisson issus de quelques grandes formulations amylicées sont positionnés sur un diagramme par rapport à la Tg et la Tm de l'amidon.

Il est également nécessaire de bien distinguer les produits de panification et de viennoiserie qui subissent une fermentation (Kiger et Kiger, 1968) par l'emploi de levures biologiques (*Saccharomyces cerevisiae*) des produits de pâtisserie (génoises, madeleines. . .) qui ne subissent pas

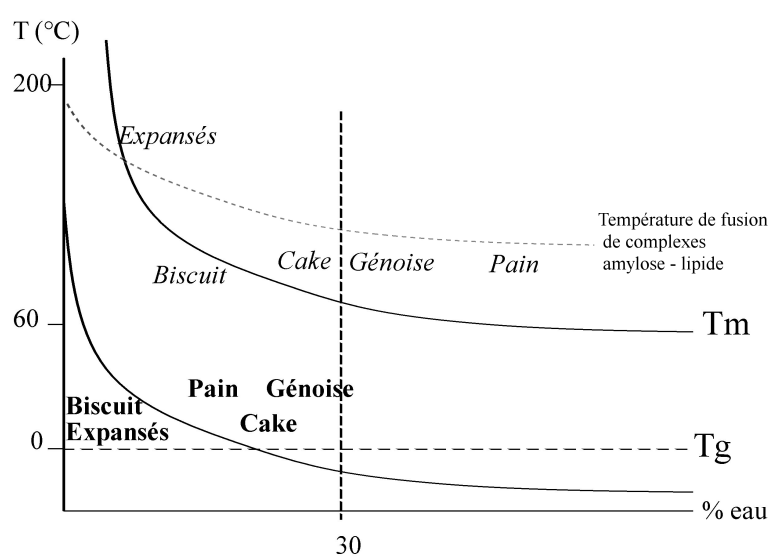


FIGURE 4.1 – Positionnement des grands types de *pâtes (italique)* en cours de cuisson et **produits après cuisson (gras)** par rapport à la T_g et la T_m de l'amidon. La température moyenne de fusion de complexes amylose - lipide est indiquée par le trait en pointillé. D'après Biliaderis et al. (1986).

de fermentation. En revanche ces produits nécessitent souvent l'utilisation d'agents émulsifiant et levant (Davies, 1986).

4.1 Grandes formulations à base d'amidon

4.1.1 Les pains et viennoiseries

Le pain est constitué de glucides, de protéines, de lipides (endogènes à l'amidon, ou exogènes dans certains cas) et de sels minéraux qui interagissent pour donner à cet aliment ses caractéristiques particulières de texture et d'aspect. La formule de fabrication habituelle du pain français est la suivante : 100 g de blé tendre, 60 g d'eau, 2 g de sel (NaCl) et 2 g de levure (Roussel et Chiron, 2002).

L'élaboration du pain, produit ancien mais complexe, met en oeuvre des actions mécaniques (le pétrissage), biochimiques (fermentation) et thermiques (cuisson), dans un ordre bien précis. La première étape est le pétrissage qui permet d'homogénéiser, d'aérer la pâte mais aussi de constituer un réseau protéique à partir du gluten. Ces trois phénomènes aboutissent, en fin de pétrissage, à un mélange cohésif viscoélastique. Il est homogène à l'œil nu mais est en réalité constitué d'une dispersion de bulles dans une matrice continue d'amidon et de protéines gonflées (Bloksma, 1990). La seconde étape est la fermentation, réalisée en deux temps. Le premier temps de fermentation (nommé "pointage en cuve") améliore la structure de la pâte et permet le développement de certains arômes. Le deuxième temps a lieu, après le façonnage des pains et a pour but de permettre le gonflement de la pâte avant sa mise en four (Roussel et Chiron, 2002). La dernière étape de fabrication est la cuisson qui provoque la gélatinisation de l'amidon (Figure 4.1), la dénaturation du gluten et une thermoréticulation. Il en résulte une expansion du produit, une perte en eau par évaporation et la formation d'une structure alvéolaire et d'une croûte (Sablani et al., 1998). Le ressuage est la période, après la sortie du four, pendant laquelle la température du pain s'abaisse jusqu'à la température ambiante. Cette période est caractérisée par une importante perte en eau (une baguette perd 2 à 3 % de sa masse) et également par une distorsion non négligeable du profil aromatique du produit. Au cours du refroidissement,

	Génoise	Cake
Œuf	45.5-30%	45.5-30%
Farine	30-25%	30-25%
Sucre	35-25%	35-25%
Matière grasse	0-4%	22-25%
Sel	0.5%	0.5%
Teneur en eau	≈ 37%	≈ 25%

TABLEAU 4.1 – Composition habituelle des pâtes à génoise et cake en pourcentage massique.

la croûte lisse et uniforme commence à se craqueler par contraction de la structure du pain et à s'écailler. Cet écaillage superficiel est une caractéristique recherchée du pain français si elle n'est pas excessive. Les alvéoles de la mie de pain peuvent présenter un large éventail de tailles avec une importante dispersité en fonction de la composition et du procédé de fabrication (Roussel et Chiron, 2002). La teneur en eau finale, proche de 30 % pour du pain blanc (abaisse fortement la Tg de l'amidon) donne une texture moelleuse de la mie de pain (Figure 4.1).

Les produits de viennoiserie ou les pains de mie subissent également une fermentation, mais les principales différences avec le pain résident dans leur composition. Ils contiennent en effet une proportion non négligeable de matières grasses et/ou de matières sucrantes (très généralement le saccharose). D'autres ingrédients peuvent également être ajoutés sous certaines conditions, pour leur rôle organoleptique (arômes) ou conservateurs.

4.1.2 Les génoises et cakes

Les génoises et les cakes sont également des mousses solides. Cependant, elles diffèrent légèrement par leur composition et leur procédé de fabrication.

La composition habituelle des génoises et cakes est donnée dans le tableau 4.1. Les deux sont constitués d'œuf, de farine, de sucre et de sel. En revanche les deux pâtes diffèrent par la teneur en matière grasse : 0 à 4 % pour la génoise et 22 à 25 % pour le cake (Lostie et al., 2002; Le Bail et al., 2004) et par la teneur en eau avant cuisson : proche de 37 % (en masse) pour la génoise et seulement 25 % pour les cakes. Des émulsifiants et des arômes peuvent également être ajoutés.

Une autre grande différence entre cake et génoise réside dans la préparation de la pâte. En effet la pâte de génoise subit après mélange des ingrédients, un foisonnement induisant le caractère mousseux de la pâte. L'expansion de la génoise pendant la cuisson est essentiellement due à la vaporisation de l'eau car aucun agent levant n'est ajouté à la pâte, contrairement aux cakes, pour lesquels, l'expansion de la pâte est obtenue par adjonction d'agents levants (bicarbonate de sodium et pyrophosphate de sodium). Après cuisson, la génoise comme le cake, doit subir une période de ressuage variant de 30 à 45 minutes. La teneur en eau finale du cake est comprise

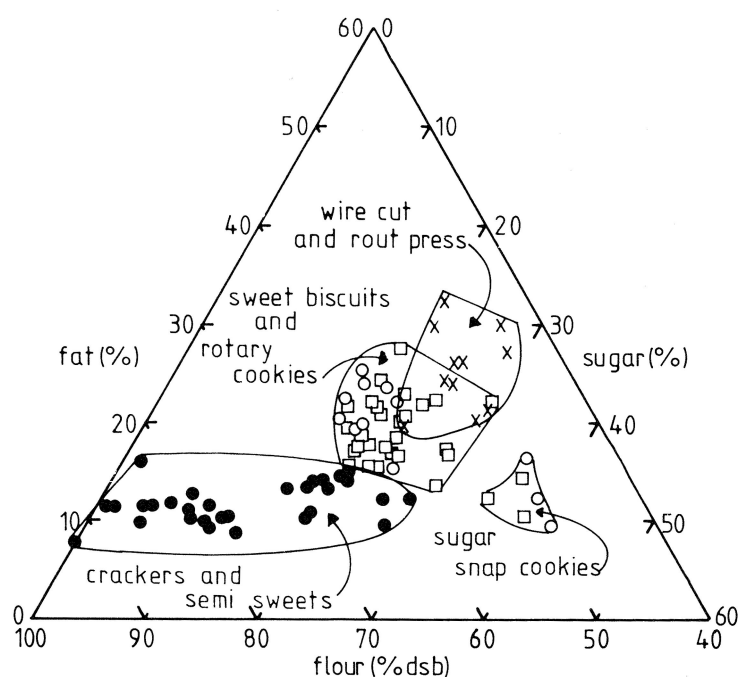


FIGURE 4.2 – Composition en farine, matière grasse et sucre (pourcentage en masse de produits secs) de différents type de biscuits, cookies et crackers. ● pâte dure, ○ pâte molle laminée et coupée, □ pâte molle moulée, × pâte molle cisillée. D’après Wade (1988).

entre 17 et 20 % et celle de la génoise entre 27 et 29 %.

Les travaux de Lostie et al. (2002) ont montré que la température maximale au cœur de la génoise, pendant la cuisson (environ 20 min. pour la génoise et entre 30 et 35 minutes pour le cake), est comprise entre 85 °C et 100 °C. L'amidon est alors gélatinisé et l'amylose est dispersée (Lostie et al., 2002), elle devient disponible pour former des complexes avec de petites molécules présentes dans le milieu. Par exemple, la formation de complexes amylose-lipide a pu être mise en évidence lors de cette cuisson (Le Bail et al., 2004). En effet, une pâte de génoise présente un diagramme de diffraction des rayons X de type cristallin A lié à l'amidon de la farine de blé. La génoise, après cuisson, présente un type cristallin V_{6I} , indiquant une complexation entre l'amidon et les lipides. La formation de ces complexes amylose-lipides au cours du procédé de fabrication de la génoise, laisse supposer que des interactions entre l'amylose et les composés d'arôme, endogènes ou exogènes, se produisent également.

4.1.3 Les biscuits

Au cours du XVIII^{ème} les biscuits étaient des pains cuits deux fois pour allonger leur période de conservation. Aujourd'hui, les biscuits subissent généralement une seule cuisson mais leur faible taux d'hydratation autorise tout de même une longue conservation (teneur finale après cuisson entre 1 et 5 %). Les différents biscuits peuvent être classés en fonction de la nature de leur pâte. Certaines, dites dure (hard), ont un caractère viscoélastique, lié comme pour le pain, au réseau de gluten mais avec une fermeté plus importante (teneur en eau de la pâte entre 20 et 30 %) . D'autres pâtes, dites molle (short), sont plus proches des formules de cakes mais contiennent beaucoup moins d'eau (consistance proche du sable mouillé, entre 11 et 19 % d'eau). Dans ce type de pâte, le mélange des ingrédients est réalisé de façon à limiter la formation du réseau de gluten (Wade, 1988).

La composition des biscuits est très variable en fonction du type de texture désirée. Cette variabilité présentée sur la figure 4.2 concerne la farine (de 55 à 95 % environ), la matière grasse (10 à 35 %) et le sucre (25 à 50%). D'autres composants minoritaires (moins de 2 %) sont fréquemment ajoutés. Ce sont essentiellement le sel (NaCl) et le bicarbonate de sodium pour ses

qualités de tampon afin d'ajuster le pH de la pâte et du biscuit mais il est aussi employé comme agent levant. L'acide tartrique est également souvent ajouté comme acidifiant. Finalement, les propriétés rhéologiques des pâtes dures peuvent être modifiées par ajout de faibles quantités de dioxyde de soufre (Wade, 1988).

Après le mélange des constituants de la pâte, les biscuits sont façonnés suivant différentes techniques et généralement cuits dans des fours "tunnels" (Wade, 1988). La faible proportion d'eau que contient la pâte implique des temps de cuisson courts variable de 1 à 15 min et ne permet pas une gélatinisation complète de l'amidon (Chevallier et al., 2002). La période de ressuage est très importante avant le conditionnement des biscuits ou un éventuel deuxième procédé technologique. Par la très faible teneur en eau des biscuits, l'amidon et les protéines sont à l'état vitreux. Cet état associé à une recristallisation du sucre, confère à ces biscuits, leur texture croustillante (Chevallier et al., 2002).

4.1.4 Les produits extrudés/expansés

Ce sont des produits tels que les céréales pour petit-déjeuners, les amuse-bouches apéritifs, les en-cas à base de céréales (type CracotteTM) ou encore des aliments pour animaux. Ces produits sont constitués majoritairement d'amidon, par exemple une préparation pour des corn flakes contient 75 % de farine de maïs, 15 % d'eau, 6 % de sucre, 3 % de malte sirupeux et 1 % de sel. Ce type de produit expansé est généralement obtenu par extrusion. Dans l'industrie en général, l'extrusion est l'un des procédés les plus utilisés pour la mise en forme des matériaux polymères. Par exemple elle permet de former des pièces variées telles que des tubes, des joints ou des films. Elle consiste à forcer la matière à passer sous pression à travers un orifice de petite dimension. Les pressions obtenues, dans un fourreau chauffé, grâce à une vis sans-fin sont élevées (100 bars) et induisent un auto échauffement de la matière ($T = 100$ à 200 °C) pendant un temps court (typiquement inférieur à une minute) (Babin, 2005). En sortie d'extrudeuse, la matière revient brusquement à la pression atmosphérique ; l'eau, à haute température (>100 °C) et maintenue par la pression sous forme liquide dans la phase fondue, se vaporise instantanément. La vapeur d'eau ainsi produite est le moteur de l'expansion du produit qui abouti après

refroidissement à une structure alvéolaire rigide (Babin, 2005; Chanvrier, 2005). Leur teneur en eau finale est généralement inférieure à 6 %. A ce taux d'hydratation et à température ambiante, l'amidon est à l'état vitreux et le produit croustillant.

4.2 Aromatisation et interactions des arômes avec l'amidon

4.2.1 Généralités sur les arômes alimentaires

4.2.1.1 Définition

L'arôme est une odeur agréable qui s'échappe de différentes substances d'origine végétale ou animale (Larousse, 1970). Dans le cadre d'une vision plus "physiologique", l'arôme peut être perçu lorsque certaines molécules, volatiles à pression atmosphérique, vont interagir avec la muqueuse nasale et provoquer cette sensation. Il convient de bien différencier arômes et parfums (odeurs), qui utilisent des mécanismes différents. Le parfum est inspiré par le nez et va directement interagir avec la muqueuse olfactive par voie orthonasale (odeur uniquement). Un arôme passe dans un premier temps dans la salive où il va interagir avec les papilles gustatives puis est expulsé par voie rétronasale vers la muqueuse olfactive (goût + odeur, c'est la saveur). Par extension, le terme "arôme" est employé la plupart du temps pour désigner les composés d'arôme. Ces composés odorants sont donc responsables en grande partie des propriétés organoleptiques d'un produit, mais ne possèdent aucune qualité nutritive (Richard, 1992).

4.2.1.2 Composition d'un arôme

L'arôme alimentaire est un mélange très complexe qui peut réunir jusqu'à 300 composés différents. Chaque composé apporte sa contribution à la note finale. Parfois, un composé ou un petit mélange de composés permet de retrouver la note d'un arôme "naturel", il arrive cependant que le mélange de tous les composés connus d'un arôme naturel ne permette pas de reconstituer un arôme "artificiel" satisfaisant (Fernandez et al., 2002).

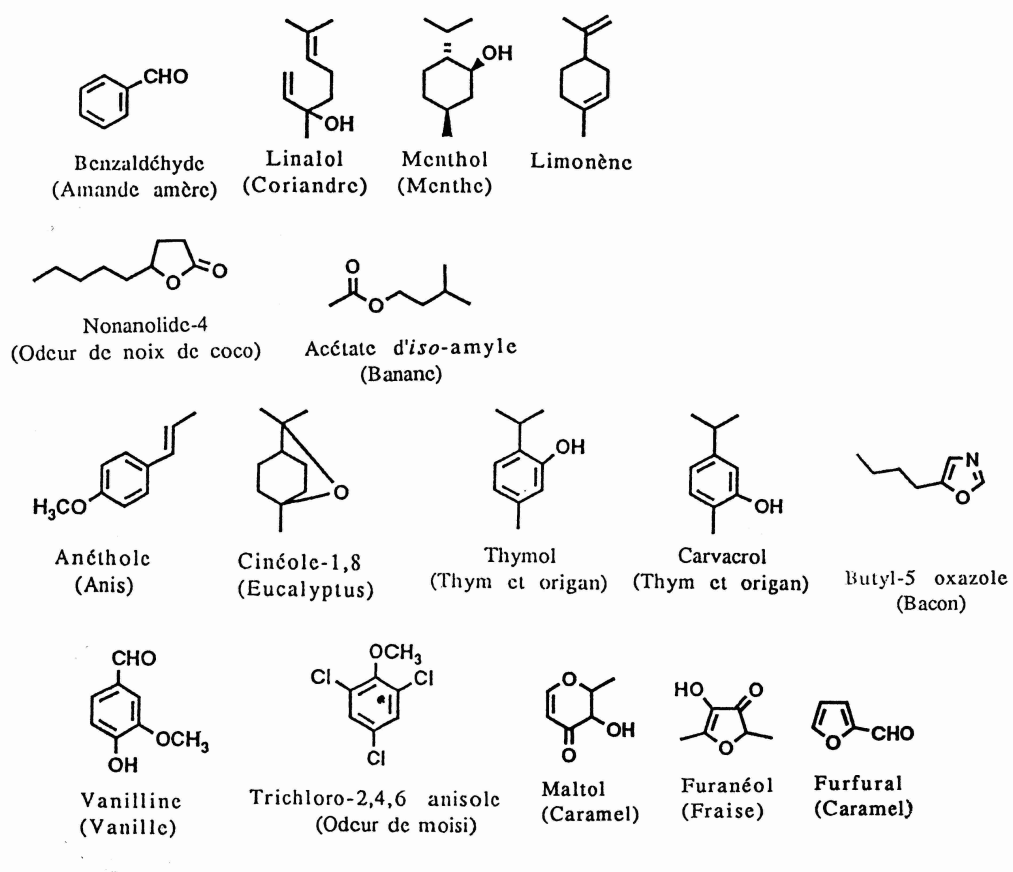


FIGURE 4.3 – Représentation de différentes molécules utilisées comme composé d'arôme. D'après Richard (1992).

4.2.1.3 Les différentes familles de composés d'arôme

Les composés d'arôme sont la plupart du temps de petites molécules ($M < 400$ Da) avec un squelette carboné linéaire, cyclique ou aromatique. Il existe plusieurs grandes familles de composé d'arôme (Figure 4.3) (Richard, 1992).

- Les hydrocarbures (terpènes (C10) ou sesquiterpènes (C15)), en général sensibles à la chaleur et aux phénomènes d'oxydation. Leur propriété aromatique ne se révèle qu'en présence d'autres composés.
- Les alcools, famille vaste et hétéroclite avec des alcools aliphatiques, cycliques, saturés, insaturés, terpéniques (linalol (coriandre) et menthol par exemple)
- Les composés carbonylés (β -ionone (fruits rouges), β -damascénone (framboise))
- Les esters et les lactones, notes fruitées. Elles constituent souvent la note principale d'un arôme. (acétate d'iso-amyle (banane), nonanolide-4 (noix de coco))
- Les éthers (anéthol (anis) ou cinéole-1,8 (eucalyptus))
- Les phénols, anti-oxydants et anti-bactériens (thymol, carvacrol (thym et origan))
- Les hétérocycles, produits le plus souvent lors de réactions thermiques entre un composé de nature glucidique réducteur et un acide aminé (responsable en général des notes de cuit (furfural, maltol (caramel), butyl-5 oxazole (bacon)) mais aussi de fruit (furanéol (fraise))
- D'autres composés comme la vanilline ou le trichloro2,4,6 anisole (flaveur de bouchon).

4.2.2 Principes d'encapsulation des arômes

Les préparations aromatiques sous forme liquide sont souvent difficiles à manipuler lors des procédés industriels et à incorporer dans les aliments. En effet, de nombreux composés d'arôme sont des molécules volatiles sensibles à la température, à la lumière et à l'oxygène de l'air qui peuvent entraîner une altération de la composition aromatique dès sa formulation et pendant le stockage. Les interactions des composés d'arôme avec les autres constituants de l'aliment peuvent contribuer à la perte d'arôme mais le procédé de fabrication (cuisson, stérilisation...) reste la source principale d'altération. En effet, au cours de la cuisson, une partie des composés

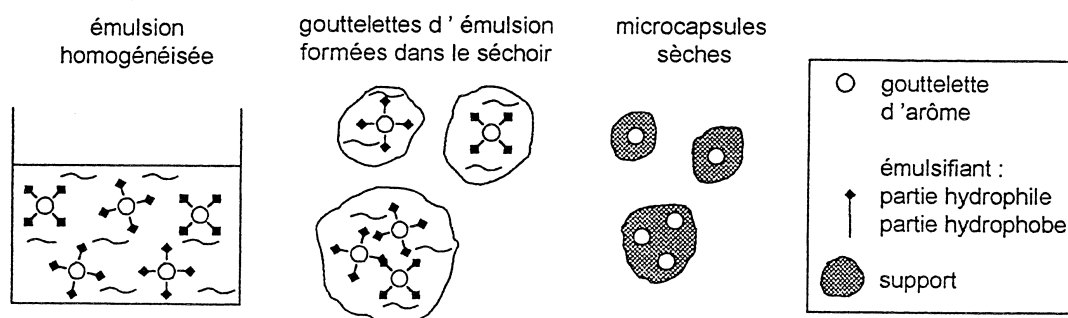


FIGURE 4.4 – Formation des microcapsules au cours du séchage par atomisation. D’après Arshadi (1993).

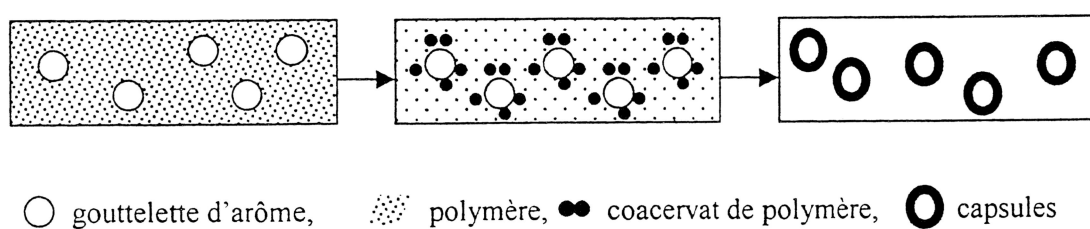


FIGURE 4.5 – Représentation schématique du procédé de coacervation appliqué à un mélange polymères/arôme. D’après Arshadi (1993).

d'arôme est perdue par évaporation ou effet azéotrope (vapeur d'eau). En outre, des réactions chimiques dues à l'action de la chaleur (hydrolyse et oxydation) conduisent à la dégradation de certaines molécules et à la genèse d'autres, désirables ou indésirables (Boutboul, 2001).

Une solution pour faciliter la manipulation des arômes consiste à les encapsuler, c'est à dire les piéger sur ou dans un support pour les stabiliser (Zeller et al., 1999). Les arômes encapsulés se présentent sous forme de poudres, faciles à incorporer, moins sensibles aux dégradations et permettent une libération contrôlée lors de la consommation du produit.

Les supports utilisés pour l'encapsulation, doivent être alimentaires et interagir suffisamment peu avec les composés d'arôme pour permettre leur libération (Boutboul, 2001). Les supports les plus utilisés sont de nature osidique : l'amidon et ses dérivés, les cyclodextrines mais aussi la cellulose et les gommes de type alginate, agar ou carraghénane. Dans une moindre mesure ces supports peuvent être d'origine lipidique (cire ou liposomes), protéique (gélatine) ou minérale (sel) (Boutboul, 2001).

Il existe quatre systèmes d'encapsulation :

- le système matriciel (ou d'enrobage), qui consiste à distribuer l'arôme dans une matrice solide par occlusion ou adsorption. Par exemple, une émulsion arôme/support peut être séchée après nébulisation par atomisation (Figure 4.4). Les particules obtenues sont constituées de gouttelettes d'arôme emprisonnées dans une sphère de matrice sèche. D'autres particules peuvent être obtenues par extrusion de la matrice fondue dans laquelle l'arôme est dispersé. Le taux d'encapsulation est proche de 80 %, mais la libération des arômes diminue au cours du temps du stockage ou de vieillissement du produit.
- le système réservoir (ou encapsulation), qui consiste à entourer les composés d'arôme d'un film continu de polymères. Une technique utilisée pour former ce type de capsules est la coacervation (Figure 4.5) : après dispersion de l'arôme dans une solution de polymère, en réponse à un changement chimique provoqué (pH, ajout de solvant...), les macromolécules s'agrègent autour des gouttelettes d'arôme, formant ainsi une enveloppe (ex. alginate). Ce système permet d'encapsuler un taux important d'arômes (50 à 95 %)

et une libération uniforme dans le temps.

- la fabrication de matériaux poreux à partir de grains d'amidon permet de piéger des composés d'arôme sans qu'il s'agisse d'encapsulation à proprement parler (cf. § 4.2.2.1).
- l'inclusion moléculaire consiste à former un complexe d'inclusion entre des molécules d'arôme et des cyclodextrines (cf. § 4.2.2.2, page 121), dextrines ou encore l'amylose (cf. § 4.2.2.3, page 123). Le taux d'encapsulation est faible (5 à 15 %) mais le complexe est très stable et permet une libération contrôlée dans le temps.

4.2.2.1 Matériaux poreux à base d'amidon

Les grains d'amidons, natifs ou non, peuvent être utilisés pour piéger des composés d'arôme. D'une façon générale, lors de ces procédés, les grains sont traités de façon à augmenter leur porosité et leur surface spécifique (Zeller et al., 1999).

Ainsi, des billes d'amidon microporeuses ont été obtenues après gélatinisation d'amidon de maïs et séchage dans l'éthanol (Glenn et Stern, 1999). La surface spécifique des amidons traités peut varier de 50 à 100 m²/g (0.5 m²/g pour de l'amidon natif). Les travaux de Buttery et al. (1999) ont montré que la rétention de composés d'arôme est bien plus forte avec ces amidons qu'avec des amidons natifs (jusqu'à 140 fois plus pour des pyrazines).

Le traitement enzymatique de grains d'amidon natifs par la glucoamylase permet également d'augmenter la porosité et la surface spécifique de l'amidon. De telles structures sont par exemple capable de retenir 54 % (m/m) d'huile essentielle de menthe poivrée (Zhao et al., 1996). Ce type de structure peut aussi être recouverte d'un film pour augmenter d'avantage la rétention.

Zhao et Whistler (1994) ont par ailleurs, réussi à former des agrégats de grains d'amidon de maïs par séchage par atomisation en présence d'une petite quantité de liant (gélatine, alginate et pectines). Ces agrégats sous forme de sphères auraient une porosité suffisante pour adsorber des arômes et contrôler leur libération.

Ces matériaux présentent un intérêt complémentaires aux techniques d'encapsulation classiques. En effet, ces procédés permettent de contrôler l'aromatisation de l'espace de tête dans

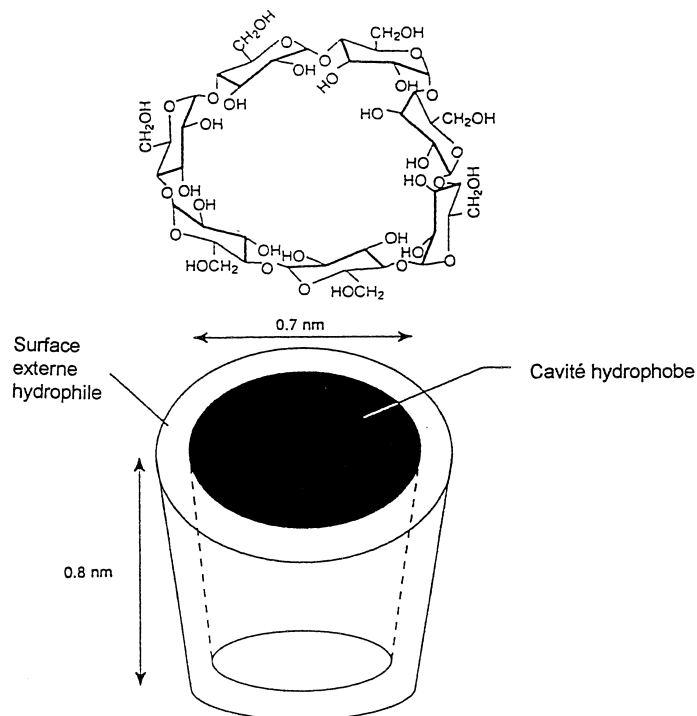


FIGURE 4.6 – Représentation schématique de la β -cyclodextrine. D’après Linden et Lorient (1999).

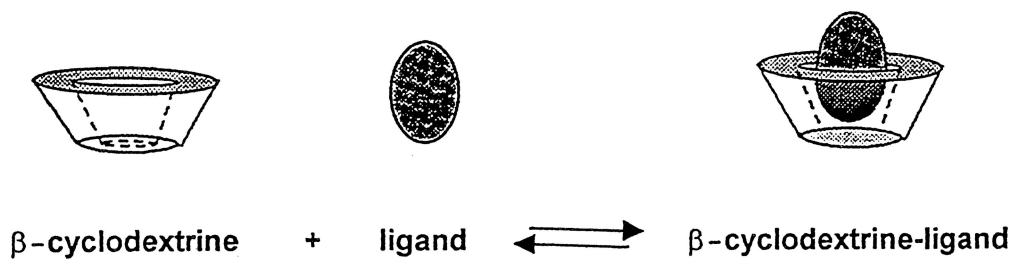


FIGURE 4.7 – Équilibre d’inclusion β -cyclodextrine - ligand. D’après Qi et Xu (1999).

un emballage. L'adsorption physique permet de contrôler l'équilibre thermodynamique des molécules volatiles entre l'aliment et la phase vapeur, garantissant ainsi une quantité d'arôme quasiment constante dans l'emballage (Boutboul, 2001).

4.2.2.2 Complexes d'inclusion avec la β -cyclodextrine

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques constitués d'unités glucosyl reliées par des liaisons α -(1,4). Le nombre d'unité glucosyl peut varier de six (α -cyclodextrine) à 12 (η -) et conditionne leur solubilité dans l'eau. Les plus utilisées sont les α -, β - et γ - cyclodextrines ayant respectivement six, sept et huit unités glucosyl. Tout comme l'hélice d'amylose, elles possèdent une cavité hydrophobe d'un diamètre plus ou moins grand qui peut accueillir un ligand (Figure 4.6). Elles peuvent complexer une grande variété de molécules de tailles différentes. Ainsi, la plus petite, l' α -cyclodextrine peut piéger des molécules ayant une chaîne aliphatique (aldéhydes, cétones, alcools et certaines molécules avec un cycle aromatique), des molécules contenant des cycles aromatiques ou hétérocycles peuvent être piégés dans la β -cyclodextrine (parfois également dans l' α -cyclodextrine) tandis que la γ -cyclodextrine peut accepter des molécules encore plus grosses. La β -cyclodextrine est la plus utilisée et la plus économique à produire (Del Valle, 2004).

La complexation de composés d'arôme par la β -cyclodextrine présente de nombreux avantages par rapports aux autre méthode d'encapsulation. Elle permet d'obtenir des poudres hydrophiles, soluble dans l'eau, contenant des composés d'arôme hydrophobes. Elle permet en outre de réduire la volatilité des composés d'arôme, les risques d'oxydation et de dégradation photochimique lors de la conservation. Finalement elle augmente la stabilité thermique des arômes au cours de la cuisson et le rendement de complexation est élevé (Del Valle, 2004).

De plus, l'inclusion d'arômes dans la β -cyclodextrine est un phénomène réversible qui permet une bonne complexation en milieu concentré et une excellente libération des molécules piégées en milieu aqueux dilué (aliments déshydratés) ou après contact avec la salive (confiseries) (Figure 4.7).

L'utilisation des cyclodextrines est cependant très réglementée car des études toxicologiques

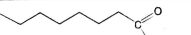
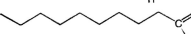














Flavor	Molecular structure	Molecular weight
Hexanal		100
Decanal		156
Fenchone		152
Thymol		150
Menthone		154
Menthol		156
Camphor		152
α -Naphthol		144
Geraniol		154
Carvone		150
δ -Heptalactone		128
δ -Nonalactone		156
δ -Decalactone		170
δ -Dodecalactone		198
γ -Decalactone		170
γ -Dodecalactone		198

FIGURE 4.8 – Exemples de composés d’arôme qui peuvent complexer l’amylose. D’après Conde-Petit et al. (2006).

ont montré, un risque réel de complexation du cholestérol et d'acides gras essentiels par les β -cyclodextrines et elles peuvent provoquer une irritation importante de la cornée dans le cadre d'une administration parentérale. En revanche, lors d'une administration par voie orale, il n'y a presque aucun risque toxicologique lié à une très faible absorption gastro-intestinale (Del Valle, 2004).

4.2.2.3 Complexation des arômes par l'amylose

Les capacités de complexation de l'amylose peuvent être mises à profit pour piéger des composés d'arôme. Les premiers travaux de Kuge et Takeo (1968) ont permis de mettre en évidence la complexation de la menthone par l'amylose. Par la suite, de nombreux auteurs ont obtenu des complexes avec un nombre important de composés d'arôme (Figure 4.8) (Osman-Ismail et Solms, 1973; Rutschmann et Solms, 1990c; Heinemann et al., 2003a; Nuessli et al., 2003; Wulff et al., 2005). Ces complexes peuvent être réalisés en solution (complexes amorphes), mais ils peuvent aussi aboutir à des empilements cristallins de type V_{6I} , V_{6II} ou V_{6III} en fonction des composés d'arôme (Le Bail et al., 2004, 2005). De plus, dans le cas de complexes de type V_{6III} , les dimensions de la maille cristalline suivant l'axe a et l'axe b varient très légèrement en fonction du composé d'arôme complexé. Ainsi les paramètres a et b des complexes amylose-menthone, amylose-fenchone et amylose-géraniole sont respectivement de 2.81 et 2.93 nm, de 2.85 et 2.97 nm et de 2.83 et 2.94 nm (Nuessli et al., 2003). Néanmoins, ces valeurs sont très proches des paramètres de maille des complexes amylose-isopropanol (Buléon et al., 1990) et ces différences ne sont, la plus part du temps, pas observables sur des diagrammes de diffraction issus de poudres semi-cristallines.

Tout comme la complexation en présence de β -cyclodextrines, la complexation d'arôme avec l'amylose permet une libération des molécules piégées, sous certaines conditions (Heinemann et al., 2003b). Ainsi, Heinemann et al. (2005), ont montré que l' α -amylase pancréatique de porc peut dégrader des sphérulites de complexes amylose-arôme. En revanche, à faible concentration, proche de celle de la salive humaine, l'hydrolyse est beaucoup plus lente et la libération rapide des arômes en bouche peu envisageable. En revanche cette lente libération peut

être recherchée pour des produits de type chewing-gum.

Il est par ailleurs possible d'obtenir des complexes à partir de mélanges aromatiques. Il y a, alors, présence conjointe de deux molécules ou plus dans les mêmes complexes (Rutschmann et Solms, 1990e; Wulff et al., 2005; Jouquand et al., 2006). Lorsque plusieurs composés d'arôme sont présents dans le système, des phénomènes de compétition et de coopérativité ont été observés. Dans certains cas, la complexation d'un type de molécule favorise la complexation d'un autre type et dans d'autres cas, au contraire, certaines molécules ont tellement d'affinité pour l'amylose que celle-ci est saturée et les autres molécules ne peuvent plus former de complexes (Rutschmann et Solms, 1990b,a,e, 1991).

Ces aspects tendent à montrer que la complexation d'arôme par l'amylose dans des matrices alimentaires réelles est possible. En outre, Le Bail et al. (2004) ont observé des différences entre les diagrammes de DRX de génoises supplémentées en arôme alimentaire et les diagrammes de DRX des mêmes génoises sans apport d'arôme. Les pics observés dans les diagrammes montrent clairement une cristallisation de type V liée à la présence de l'arôme exogène. De plus, la formation de cristaux sphérolytiques de complexes amylose-arôme est possible dans des matrices de type crème dessert (Heinemann et al., 2005).

Objectifs de la thèse

L'objectif de cette étude est une meilleure compréhension des interactions entre l'amylose (ou plus généralement l'amidon) et un arôme alimentaire contenant une vingtaine de molécules, afin d'envisager l'influence de l'amidon sur la rétention d'arôme dans une matrice alimentaire réelle comme une génoise. Sachant que d'une part, les conditions hydrothermiques de cuisson de la génoise sont propices à la gélatinisation de l'amidon et à la dispersion de l'amylose hors du grain (Le Bail et al., 2004), et que d'autre part, l'amylose peut complexer un grand nombre de molécules, l'essentiel de ces travaux a été réalisé avec des systèmes modèles extrêmement simplifiés : une amylose et un composé d'arôme. Cette étude a été menée dans le but de (i) mettre en évidence la formation de complexes amylose-composés d'arôme et d'étudier leur structure (ii) connaître les mécanismes et cinétiques de formation (iii) estimer l'influence de l'inclusion des ligands dans l'hélice d'amylose sur la libération des molécules (iv) mettre en évidence un effet significatif de la complexation sur la rétention des composés d'arôme dans la génoise.

Pour ce faire, des expériences de complexation ont été réalisées dans des conditions proches de celles du procédé de cuisson de la génoise. Les structures des complexes obtenus ont été étudiées par DRX et MET après marquage des échantillons au PATAg. L'analyse par spectroscopie infrarouge d'échantillons lavés et/ou hydrolysés en milieu acide a permis d'approcher la stœchiométrie des différents types de complexe formés. Les aspects cinétiques de la complexation de l'amylose ont également été abordés par spectroscopie infrarouge, DRX et analyse enthalpique différentielle. Une étude de l'inclusion des composés d'arôme dans l'hélice d'amylose a également été réalisée par modélisation moléculaire. Dans l'optique d'une étude plus appliquée, deux composés d'arôme ont été dosés, par spectroscopie de fluorescence, avant et après cuisson d'une génoise. Ces résultats ont été confrontés à ceux obtenus par M. Pozo-Bayón dans le cadre de son post-doctorat à l'INRA de Dijon (Pozo-Bayón et al., 2006), mais ne seront cependant pas détaillés dans ce manuscrit.

Deuxième partie

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Chapitre 1

Matériel

1.1 Amylose

Amylose commerciale d'amidon de pomme de terre (SIGMA Type III, ref. 9005-82-7)

1.2 Composés d'arôme

- Acétate d'éthyle (BDH Hiper Solv, Grade HPLC, ref. 152486E)
- Acétoïne (Acétyle méthyle carbinol ou 3 hydroxy-2 butanone, ALDRICH, ref. A1795-1)
- Acide butanoïque (ALDRICH, ref. B10,350-0)
- Acide décanoïque (99%, ALDRICH, ref. 15,376-1)
- Acide hexanoïque (ALDRICH, ref.15,374-5)
- Benzaldéhyde (99%, ALDRICH, ref. B133-4)
- Butanoate d'éthyle (ALDRICH, ref E1,570-1)
- Cinnamate de méthyle (FLUKA Chemica, ref. 96410)
- Cis-3-hexen-1-ol (ALDRICH, ref. H1,290-0)
- Citral (95%, mélange cis-trans, ALDRICH, ref. C8,300-7)
- γ -decalactone (99% ALDRICH, ref. D804-5G)
- δ -decalactone (98% ALDRICH, ref. 29,806-9)

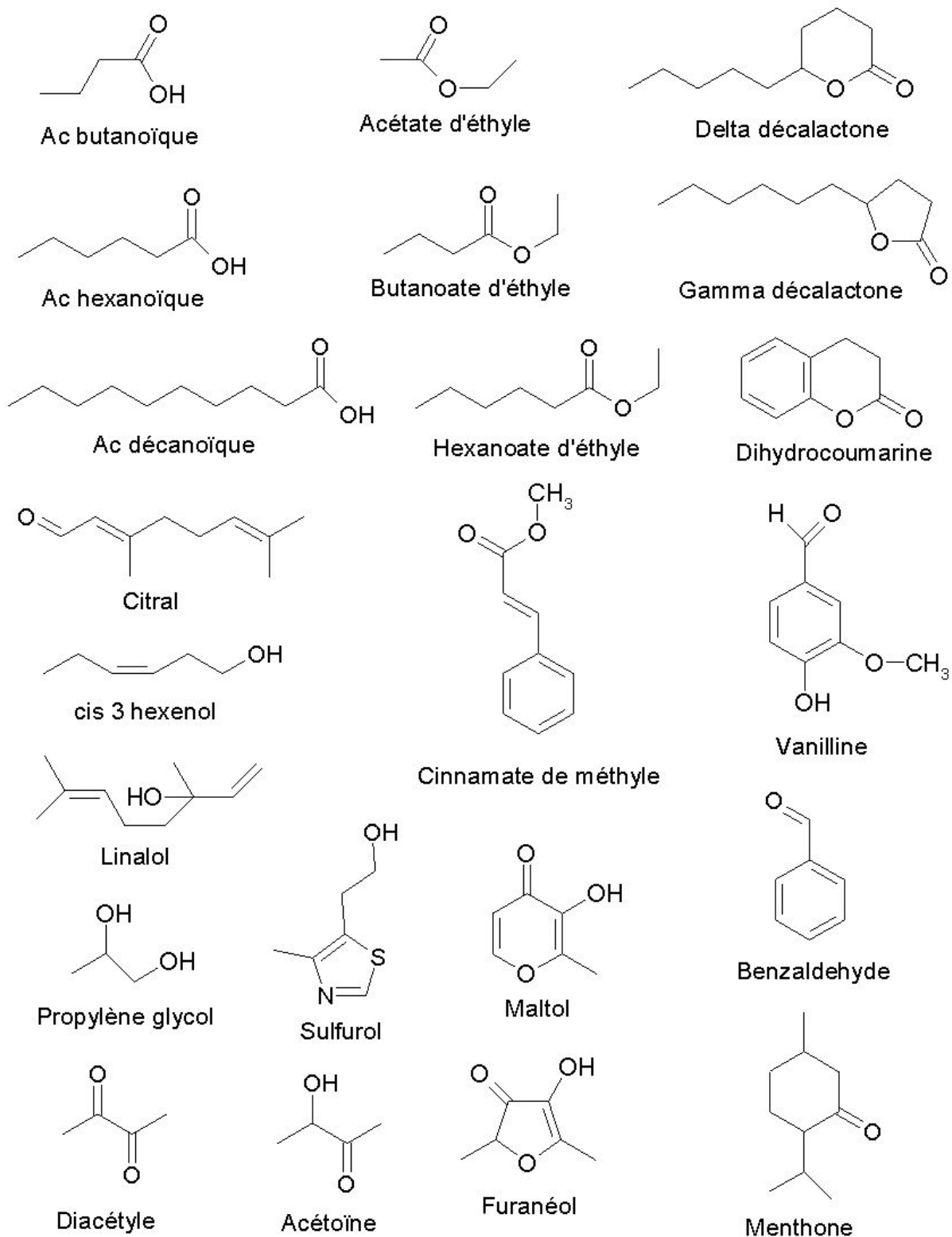


FIGURE 1.1 – Formules des composés d'arôme et du solvant

- Diacétyl (2,3 butanedione, ALDRICH, ref. B8,530-7)
- Dihydrocoumarine(ALDRICH)
- Furanéol (2,5 diméthyl-4-hydroxy-3(2H)furanone, FLUKA Chemica, ref. 40703)
- Hexanoate d'éthyle (Origine inconnue)
- Linalol (Origine inconnue)
- Maltol (3-hydroxy-2-méthyle-4-pyrone, 99%, ALDRICH, ref. H4,340-7)
- (-)-menthone (90%, ALDRICH, ref. 21,823-5)
- Sulfurol (4-méthyle-5-thiazole éthanol, ALDRICH, ref. 19,067-5)
- Vanilline (de synthèse, PROLABO, RECTAPUR, ref. 28902.186)

1.3 Produits et réactifs

- Acide chlorydrique (HCl, 37 % RECTAPUR, MERCK)
- Acide periodique (H₃IO₆,RECTAPUR, MERCK)
- Acide sulfurique (98 %, Merck VWR réf. 100731)
- Agar (MERCK)
- Arsénate de sodium (Na₂AsO₄, ACS reagent, SIGMA)
- Bromure de potassium (KBr, I.R. grade, ALDRICH)
- Carbonate de sodium (Na₂CO₃, SIGMA)
- Éthanol (95 % vol, RECTAPUR, MERCK)
- Éthanol absolu (RECTAPUR, MERCK)
- Heptamolybdate d'ammonium ((NH₄)₆Mo₇O₂₄, ALDRICH)
- Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO₃, ACS reagent, ALDRICH)
- Hydroxyde de potassium (pastilles, RECTAPUR, MERCK)
- Nitrate d'argent (AgNO₃, regeant plus, ALDRICH)
- Orcinol 3.5-dihydroxytoluène (Merck VWR réf. 826933)
- Propylène glycol (1,2propandiol 99%, ALDRICH, ref. 13,436-8)
- Résine d'inclusion Époxy (EPON, FLUKA Chemica)

- Sulfate de cuivre (CuSO_4 , 99.98 %, ALDRICH)
- Sulfate de sodium (Na_2SO_4 , >99 % SIGMA)
- Thiosemicarbazide ($\text{CH}_5\text{N}_3\text{S}$, MERCK)

1.4 Formulation de l'arôme de note viennoiserie

Cette formulation comprend 19 composés d'arôme, dilués dans un solvant : le propylène glycol, avec les proportions suivantes :

- Propylène glycol, 710 mg
- Acétate d'éthyle, 5 mg
- Acétoïne , 6 mg
- Acide butanoïque, 5 mg
- Acide décanoïque, 3 mg
- Acide hexanoïque, 1 mg
- Benzaldéhyde, 2 mg
- Butanoate d'éthyle, 3 mg
- Cinnamate de méthyle, 2 mg
- Cis-3-hexen-1-ol, 2 mg
- Citral, 5 mg
- γ -decalactone, 8 mg
- δ -decalactone, 10 mg
- Diacétyl, 3 mg
- Dihydrocoumarine, 5 mg
- Furanéol, 10 mg
- Hexanoate d'éthyle, 2 mg
- Maltol, 15 mg
- Sulfurol, 3 mg
- Vanilline, 200 mg

Chapitre 2

Méthodes expérimentales

2.1 Détermination préalable du degré de polymérisation de l'amylose

Le degré de polymérisation de l'amylose est relié à sa masse molaire par la relation :

$$\overline{DP} = \frac{M_{amylose}}{M_{anhydroglucose}} \text{ où } M_{anhydroglucose} = 162 \text{ g/mol.}$$

La masse molaire de l'amylose peut être approchée par des mesures de viscosité. En effet, la réponse des macromolécules en solution à l'application de forces hydrodynamiques peut renseigner sur leurs volumes et leurs dimensions et donc indirectement sur leurs masses molaires. Les solutions diluées d'amylose pouvant être considérées comme newtoniennes, c'est à dire que la viscosité est indépendante du cisaillement appliqué à la solution, la relation empirique de Mark-Houwink-Sakurada (eq. 2.1) peut être appliquée.

$$[\eta] = K \cdot M^\alpha \quad (2.1)$$

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_{solvant}}{\eta_{solvant}} \quad \eta_r = \frac{\eta}{\eta_{solvant}} \quad (2.2)$$

$[\eta]$ est la viscosité intrinsèque du polymère, K et α sont des constantes qui varient avec le polymère. $K = 6.92 \cdot 10^{-3}$ et $\alpha = 0.78$ pour l'amylose (Banks et Greenwood, 1969). $[\eta]$ peut être déterminée à partir de la viscosité spécifique (η_{sp}) et de la viscosité relative (η_r) (eq. 2.2). La

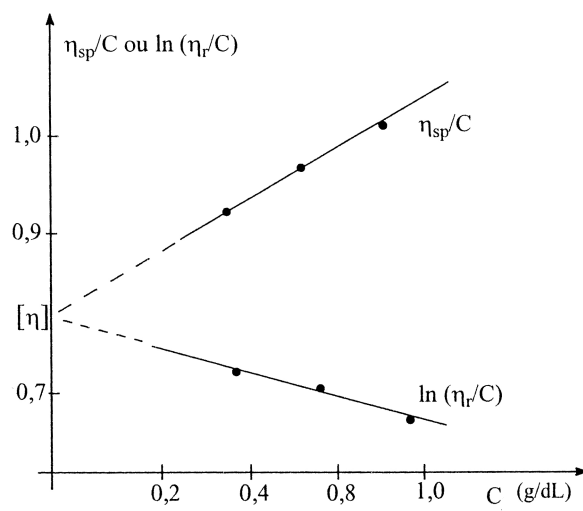


FIGURE 2.1 – Exemple d’extrapolation à concentration nulle pour la détermination de $[\eta]$.
D’après Fontanille et Gnanou (2002).

viscosité variant avec la concentration, l'extrapolation à concentration en polymère [amylose] nulle des droites $\eta_{sp}/[\text{amylose}]$ et $\ln(\eta_r / [\text{amylose}])$ en fonction de la concentration en amylose permet de déterminer $[\eta]$ (Figure 2.1). η est la viscosité de l'échantillon et η_{solvant} celle du solvant.

La masse molaire de l'amylose peut ensuite être retrouvée à partir de l'équation 2.3, permettant ainsi la détermination de son degré de polymérisation.

$$M_{\text{amylose}} = \left(\frac{[\eta]}{K} \right)^{\frac{1}{\alpha}} = \left(\frac{[\eta]}{6.92 \cdot 10^{-3}} \right)^{\frac{1}{0.78}} \quad (2.3)$$

La méthode décrite par Banks et Greenwood (1969), basée sur des mesures de viscosité de solutions d'amylose dans la potasse (KOH), a été utilisée pour déterminer le \overline{DP} de l'amylose employée dans cette étude. Une solution d'amylose à 25 g/l est préparée dans KOH (1 mol/l) et agitée à 4 °C pendant 24 à 48 heures, jusqu'à solubilisation complète de l'amylose. Cette solution est ensuite diluée de façon à obtenir une solution mère d'amylose à 5 g/l dans KOH (0.2 mol/l). Une gamme de concentration de 0 à 5 g/l est préparée. La viscosité de chaque point de la gamme est déterminée à 25°C avec un viscosimètre CONTRAVESTM Low Shear 40 (géométrie de type cylindres concentriques, vitesse de cisaillement variant de 0 à 100 s⁻¹).

2.2 Protocole de cristallisation des complexes amylose - composés d'arôme

Les complexes ont été préparés dans des conditions proches, en terme de température, des conditions rencontrées lors de la cuisson d'une génoise.

Deux cents milligrammes d'amylose sont dispersés dans 20 ml d'eau (1 % (m/m)). Après un bullage d'azote de 10 minutes pour éviter les phénomènes d'oxydation, la solution est agitée pendant 5 à 10 minutes. Elle est ensuite placée dans un flacon hermétique et dans un bain d'huile à 160 °C pendant 45 minutes. Cette étape de solubilisation à haute température est nécessaire pour désenchevêtrer totalement l'amylose extraite industriellement par reprécipitation

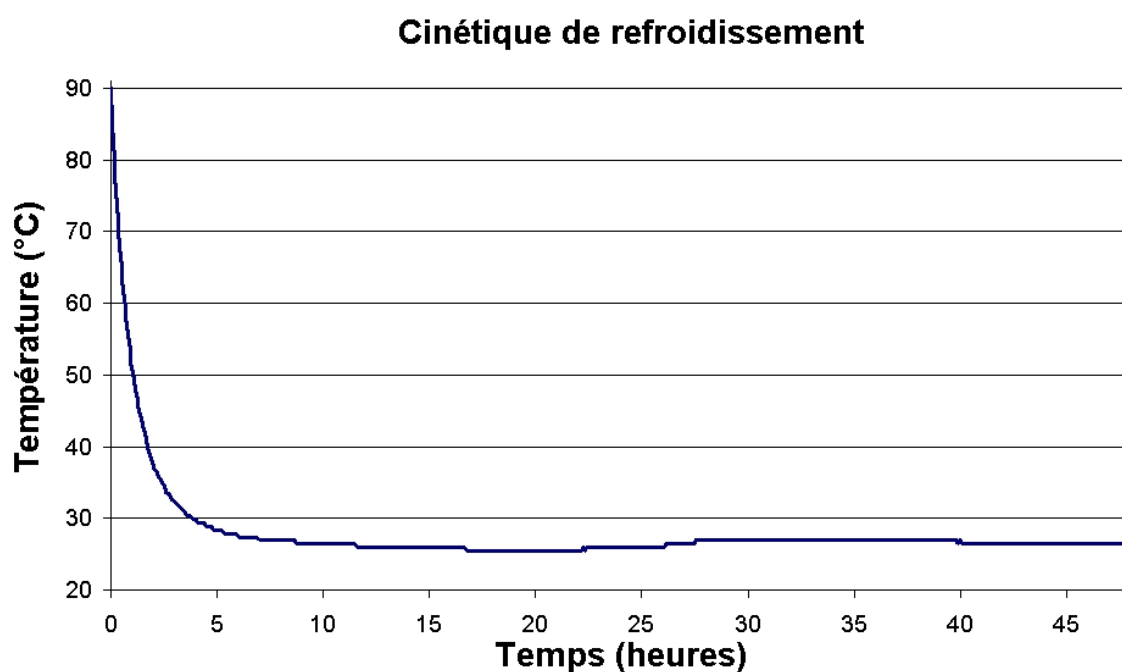


FIGURE 2.2 – Cinétique de refroidissement mesurée avec un capteur Thermo-BiolabTM au cours de la précipitation des complexes.

au butanol. La solution d'amylose est ensuite refroidie à 90 °C pendant 2 à 3 minutes puis filtrée à chaud (P.T.F.E., 0.45 μm).

Dans le même temps, dans un autre flacon, 2 ml de complexant sont mélangés à 10 ml d'eau et chauffés à 90 °C pendant 10 minutes. Pour les complexes amylose-acide décanoïque, l'acide décanoïque doit être préchauffé à 40 °C, celui-ci étant solide à température ambiante ($T_m = 35$ °C). Les deux solutions sont ensuite mélangées et agitées fortement pendant 1 à 2 minutes. Le mélange est ensuite refroidi dans le bain d'huile jusqu'à température ambiante en suivant la cinétique présentée sur la figure 2.2. Après 48 heures, le précipité obtenu est centrifugé à 20000 g pendant 20 minutes à 20 °C. Le culot est récupéré et conditionné sous atmosphère contrôlée par une solution saturée de chlorure de sodium (activité de l'eau, $A_w = 0.75$ à 25 °C).

Ce protocole général a été adapté pour les composés d'arôme plus solubles dans l'eau (l'acétate d'éthyle, l'acétoïne, le diacétyle, l'acide butyrique et le sulfurool). Pour ces molécules, une concentration en volume de 60 % a été ajoutée à la solution d'amylose. Par ailleurs, la température de mélange a été abaissée à 60 °C pour l'acétate d'éthyle dont le point d'ébullition est proche de 77 °C et pour la vanilline qui est très sensible thermiquement.

2.3 Lavage des complexes

Plusieurs méthodes de lavage des complexes ont été effectuées.

- *Et50pc5* : 100 mg de complexes sont ajoutés à 5 ml d'un mélange éthanol/eau (50/50) et la suspension est agitée légèrement pendant 5 minutes. L'échantillon est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 20000 g à 20 °C.
- *Et50pc 10* : 100 mg de complexes sont ajoutés à 5 ml d'un mélange éthanol/eau (50/50) et la suspension est agitée légèrement pendant 10 minutes. L'échantillon est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 20000 g à 20 °C.
- *Et100pc* : 100 mg de complexes sont ajoutés à 5 ml d'éthanol et la suspension est agitée légèrement pendant 5 minutes. L'échantillon est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 20000 g à 20 °C.

Ingrédient	Proportion (g)
Farine de blé	x
Saccharose	x
Œufs entiers pasteurisés	1.82x
Huile de palme	0.16x
Sel (NaCl)	0.02x

TABLEAU 2.1 – Ingrédients pour la préparation d'une génoise. Les proportions sont données par rapport à la quantité de farine de blé (x) .

Le culot est récupéré et à nouveau conditionné à $A_w = 0.75$.

2.4 Préparation de la pâte et cuisson de la génoise

Les génoises ont été préparées par M. Pozo-Bayón (Post-doctorat, INRA, Dijon) à partir de farine de blé, de saccharose, d'œufs entiers pasteurisés, d'huile de palme et de sel (NaCl) dont les proportions sont données dans le tableau 2.1 (Proportions par rapport à la quantité de farine).

Les œufs, le sucre et le sel sont mélangés pendant 5 minutes, dans un bain thermostaté à 50 °C, avec un mixeur électrique ménager. La mousse obtenue est sortie du bain-marie et après 1 minute de repos, mixée à nouveau pendant 2 minutes. La farine est ensuite ajoutée petit à petit et délicatement incorporée avec une cuillère en bois. L'huile de palme est fondue puis les composés d'arôme y sont rajoutés (200 mg pour 210g de pâte). Cette huile aromatisée est incorporée de façon homogène à la pâte.

La pâte est ensuite déposée dans un moule en aluminium recouvert de téflon® et cuite dans un four électrique à 195 °C pendant 25 minutes.

Après la cuisson, la génoise est immédiatement sortie du moule et réservée jusqu'à refroidissement à température ambiante. La croûte est alors enlevée et plusieurs échantillons sont prélevés dans la mie.

2.5 Hydrolyse acide ménagée des complexes

Les hydrolyses acide ménagées des complexes ont été réalisées suivant la méthode décrite par Robin et al. (1974). Quatre cents milligrammes de complexes sont dispersés dans 80 ml d'acide chlorhydrique (HCl, 2.2 mol/l) pour une concentration finale de 5 mg/ml. Les suspensions sont ensuite maintenues à 35 °C pendant 35 jours. Chaque jour, elles sont agitées pendant 1 minute environ. Des conditions plus douces ont également été utilisées pour les complexes amylose-acide hexanoïque et amylose- δ -décylactone : HCl (1 mol/l) et une température de 25 °C pendant 35 jours.

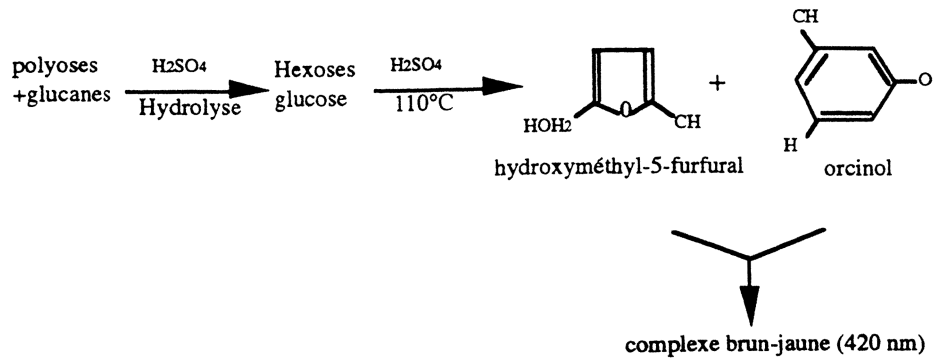


FIGURE 2.3 – Principe du dosage chimique des oses neutres par la méthodes de l’orcinol sulfurique (Tollier et Robin, 1979).

À différents temps d'hydrolyse, 2 ml du mélange sont prélevés après agitation et centrifugés à environ 4500 g pendant 5 minutes. Après la centrifugation, 500 μ l du surnageant sont prélevés pour déterminer le taux de glucose issu de l'hydrolyse. L'acidité de ces 500 μ l de surnageant est neutralisée par ajout de 500 μ l de KOH (2.2 mol/l). Parallèlement le culot est redispersé dans 2 ml d'eau, centrifugé une nouvelle fois et conditionné à 0.75 d'activité de l'eau.

2.6 Détermination du degré de polymérisation des résidus d'hydrolyse

Chaque molécule d'amylose possède une seule extrémité réductrice et un certain nombre de résidus glucosyl. Le degré de polymérisation des résidus peut donc être exprimé comme le rapport des oses totaux sur les oses réducteurs.

2.6.1 Dosage des oses totaux (ou neutres)

La quantité d'oses totaux a été déterminée par la méthode de l'orcinol-sulfurique (Tollier et Robin, 1979). Cette méthode consiste à hydrolyser à chaud les chaînes de polysides. Les oses neutres ainsi libérés se déshydratent et forment des dérivés furfuriques se colorant en jaune en présence d'orcinol (Figure 2.3). La détermination de la concentration, calculée en équivalent glucose, est réalisée par spectrophotométrie d'absorption à $\lambda = 420$ nm. Une gamme étalon de 0 à 150 μ g/ml de glucose est utilisée pour déterminer la concentration en oses des échantillons. Pour le dosage, approximativement 20 mg de complexes sont solubilisés dans 1 ml de KOH (0.5 mol/l) à froid (4 °C) sous agitation pendant 24 heures. Après solubilisation complète les échantillons sont dilués 250 fois dans de l'eau pour atteindre une concentration en KOH de $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Le réactif à l'orcinol est préparé en solution à 1 g/l dans de l'acide sulfurique/eau à 70 % (v/v). Le dosage des sucres est réalisé avec un analyseur automatique TechniconTM (Bran Luebbe Auto-Analyzer 3).

2.6.2 Dosage des oses réducteurs

Parallèlement, le dosage des oses réducteurs a été réalisé par la méthode de Nelson (1944). En milieu alcalin et à chaud, les groupes hémiacétals libres des glucoses réduisent les ions cuivriques Cu^{2+} en ions Cu^+ . Ces ions peuvent ensuite complexer des groupes arséno-molybdiques et développer ainsi une coloration bleue. Cette méthode utilise quatre réactifs :

- *Solution A* : 200 g de Na_2SO_4 anhydre, 25 g de Na_2CO_3 anhydre, 25 g d'acide tartrique et 20 g de NaHCO_3 anhydre sont solubilisés dans 1 l d'eau pure. La solution doit être conservée à 30 °C.
- *Solution B* : 30 g de CuSO_4 et 4 gouttes de H_2SO_4 concentré sont solubilisés dans 200 ml d'eau pure.
- *Solution C* : préparée extemporanément à partir de 25 ml de solution A et 1 ml de solution B.
- *Solution D* : préparée à chaud (55 °C) à partir de 50 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 42 ml de H_2SO_4 et 6 g de Na_2AsO_4 dans 1 l d'eau pure pendant 3 heures.

L'échantillon à analyser est solubilisé pour obtenir une concentration de 20 mg/ml dans KOH (1 mol/l) pendant 24 heures à 4 °C, puis dilué au dixième dans de l'eau pure. Cent vingt-cinq microlitres de cette solution sont mélangés à 125 μl du réactif C puis placé à 100 °C pendant 15 minutes, 125 μl du réactif D sont alors ajoutés. Après 10 minutes d'agitation, 1 ml d'eau pure est introduit. La densité optique est alors mesurée à $\lambda = 620$ nm. La concentration est déterminée à partir d'une gamme étalon de 0 à 250 $\mu\text{g/ml}$.

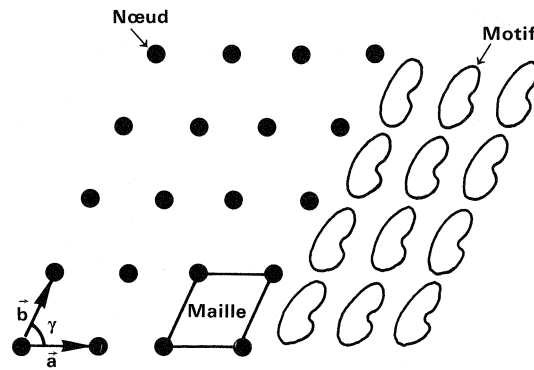


FIGURE 2.4 – Réseau et cristal à deux dimensions (Janin et Delepierre, 1999).

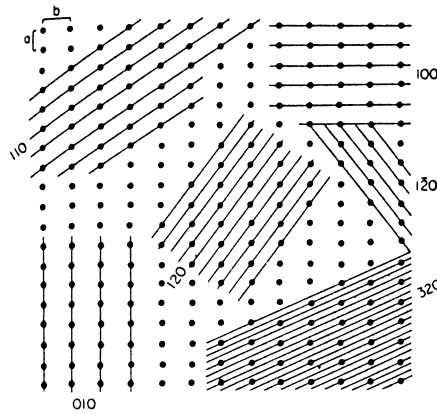


FIGURE 2.5 – Familles de plans réticulaires. Les indices de Miller correspondants sont indiqués. La distance entre deux plans successifs est caractéristique de la famille (Janin et Delepierre, 1999).

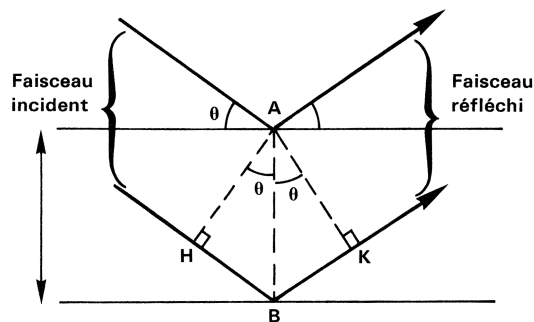


FIGURE 2.6 – Loi de Bragg. Les ondes réfléchies sur deux plans réticulaires distants de d ont une différence de marche $HB + BK = 2d \sin \theta$ (Janin et Delepierre, 1999).

2.7 Caractérisation des complexes cristallins par diffraction des rayons X aux grands angles

2.7.1 Principe de la méthode

2.7.1.1 Conditions de diffraction

Un cristal est formé par la répétition dans l'espace d'un objet nommé "motif cristallin". Dans le cas le plus simple, ce motif cristallin est un atome ou une molécule répété par translation (Figure 2.4). Dans un espace à trois dimensions, cette translation est caractérisée par trois vecteurs non-coplanaires (\vec{a} , \vec{b} et \vec{c}). Le parallélépipède construit à partir de ces trois vecteurs constitue la maille cristalline. La répétition de la maille cristalline dans l'espace conduit à la formation de plans parallèles (plans réticulaires) séparés d'une distance caractéristique appelée distance réticulaire (d) (Figure 2.5). Dans l'espace direct, chaque famille de plans réticulaires est caractérisée par un nombre entier n .

$$hx + ky + lz = n \quad (2.4)$$

x , y et z sont les coordonnées relatives aux vecteurs \vec{a} , \vec{b} et \vec{c} et h , k et l des nombres entiers appelés indices de Miller.

Lorsqu'un rayonnement de longueur d'onde λ traverse un échantillon cristallin, il est diffusé uniquement suivant certaines directions privilégiées : il est diffracté. La condition de diffraction veut que les ondes réfléchies sur les plans réticulaires successifs d'une même famille aient une différence de marche illustrée sur la figure 2.6 qui peut être exprimée par :

$$HB + BK = 2AB \sin \theta = 2d \sin \theta \quad (2.5)$$

La condition de diffraction exige que cette différence de marche soit un multiple entier de la longueur d'onde, exprimée par la loi de Bragg (Equation 2.6).

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (2.6)$$

2.7. Caractérisation des complexes cristallins par diffraction des rayons X aux grands angles

Pour étudier des cristaux par diffraction (des rayons X ou des électrons), la longueur d'onde λ doit être inférieure à $2d$ car $\sin \theta$ est toujours inférieur à 1. Pour étudier les distances interatomiques de l'ordre de 0.3 à 2 nm, la longueur d'onde minimale doit être comprise entre 0,6 et 4 nm, ce qui est le cas pour un faisceau de rayons X.

2.7.1.2 Technique des poudres cristallines

Les complexes d'amylose se présentent sous forme de poudre semi-cristalline. C'est à dire qu'ils se présentent sous la forme de microcristaux orientés aléatoirement (dans toutes les directions de l'espace). Du fait du hasard, certains seront orientés correctement pour pouvoir diffracter. La Loi de Bragg peut ainsi être appliquée à chacun d'entre eux. Les rayons diffractés sont recueillis sur un détecteur courbe et les diagrammes obtenus, montrent l'intensité des rayons diffractés en fonction de l'angle de diffraction. Ces diagrammes présentent un ensemble de pics, chacun correspondant à un angle de diffraction 2θ , inversement proportionnel à la distance réticulaire d des plans diffractants. Ils présentent généralement une "bosse" liée à la diffusion des parties amorphes et une déviation de la ligne de base liée à la diffusion de l'eau présente dans l'échantillon. L'intensité des pics de diffraction est proportionnelle au taux de cristallinité tandis que leur largeur à mi-hauteur est inversement proportionnelle à la taille des cristaux.

2.7.2 Mise en œuvre

Après conditionnement des échantillons sous atmosphère contrôlée par une solution aqueuse saturée en NaCl (activité de l'eau $A_w = 0.75$ à température ambiante), environ 30 mg de précipité sont placés dans une rondelle en cuivre entre deux feuilles de ruban adhésif afin d'éviter une perte d'eau au cours de la mesure.

Les échantillons ont été examinés à l'aide de deux diffractomètres différents. Un diffractomètre Inel XRG3000 (Inel, France), dont le tube à rayons X contient une source au cuivre ($\text{CuK}_{\alpha 1}$). Les rayons X sont générés avec un courant de 40 kVolt et une intensité de 30 mA et ont une longueur d'onde $\lambda = 0.15405$ nm obtenue grâce à un monochromateur en quartz. Les rayons diffractés sont enregistrés sur un détecteur courbe de 120° (CPS120, Inel, France)

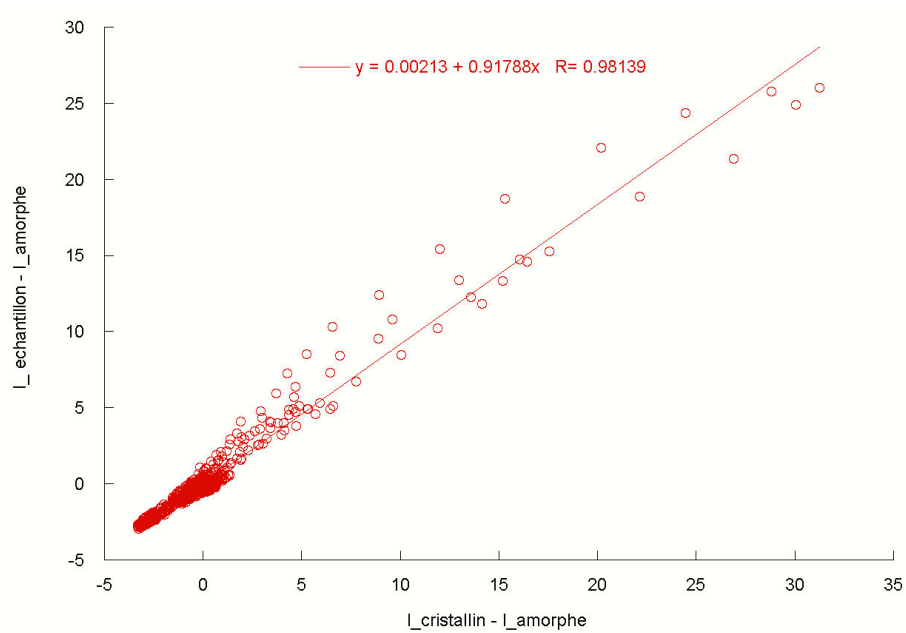


FIGURE 2.7 – Exemple de diagramme de Wakelin obtenu pour un complexe amylose-acide décanoïque après 13 jours d’hydrolyse acide. Le taux de cristallinité est proche de 92 %.

pendant 2 heures.

Les diagrammes de diffraction recueillis au cours des études cinétiques ont été réalisés à l'aide d'un diffractomètre BRUKERTM D8 Discover opérant à 40 kV et 40 mA, équipé d'un détecteur GADDS. La longueur d'onde identique au cas précédent a été obtenue par des doubles miroirs de Goebel. Le temps d'acquisition est variable de 5 à 10 minutes.

Les spectres obtenus sont normalisés par rapport à l'aire totale diffusée pour des angles 2θ compris entre 3 et 30 °.

2.7.3 Calcul du taux de cristallinité

Le taux de cristallinité des complexes amylose-acide décanoïque a été déterminé par la méthode de Wakelin et al. (1959). Cette méthode consiste à comparer le diagramme de l'échantillon à celui de deux références externes, une amorphe et une cristalline. La référence amorphe est le diagramme de diffraction d'un échantillon d'amidon extrudé. Un problème majeur consiste à définir une bonne référence cristalline. Il n'existe pas de référence standardisée pour l'amylose de type V et l'intensité des pics de diffraction peut être influencée par la quantité et le type de ligand piégé dans l'hélice. La référence cristalline est déterminée de la manière qui suit : le diagramme de la référence amorphe, est ajusté par un facteur multiplicatif et soustrait au diagramme de l'échantillon le plus cristallin, issu des expériences d'hydrolyse acide, de façon à obtenir une ligne de base nulle. Le diagramme de la référence résultante est ensuite normalisé entre 3 et 30 ° par rapport à l'aire sous la courbe de diffraction.

Pour chaque valeur d'angle 2θ , la différence entre l'intensité de l'échantillon et l'intensité de la référence amorphe est tracée en fonction de la différence entre l'intensité de la référence cristalline et celle de la référence amorphe (eq. 2.7) :

$$(I_{ech} - I_{am})_{2\theta} = f(I_{cris} - I_{am})_{2\theta} \quad (2.7)$$

Une régression linéaire est ensuite effectuée sur le nuage de points tracé précédemment. Le taux de cristallinité correspond à la pente de la droite de régression (Figure 2.7). Cette méthode

est assez fiable et précise ($\pm 3\%$) si le taux de cristallinité est supérieur à 10-15 %.

Parce qu'il n'a pas été possible d'obtenir de références cristallines pour les complexes de type V_{6II} et V_{6III} , les taux de cristallinité de ces complexes ont été calculés par une autre méthode dérivée de celle de Hermans et Weidinger (1961). Comme pour la détermination de la référence cristalline décrite ci-dessus, le diagramme amorphe d'amidon extrudé est soustrait à celui de l'échantillon, après ajustement par un facteur multiplicatif de façon à avoir une intensité nulle entre les pics de diffraction. Le taux de cristallinité correspond au facteur multiplicatif nécessaire pour obtenir une ligne de base nulle. Cette méthode est moins précise ($\pm 5\%$) que la méthode de Wakelin et al. (1959) mais ne nécessite pas de référence cristalline.

2.7.4 Calcul de la taille des cristaux

La taille des cristaux de complexes amylose-composé d'arôme suivant différents plans réticulaires a été déterminée à partir de la relation de Scherrer :

$$d_{hkl} = \frac{K \times \lambda}{\beta \times \cos \theta} \quad (2.8)$$

d_{hkl} est la taille des cristaux suivant le plan réticulaire hkl. K est une constante qui dépend de la façon de définir la taille des domaines diffractants = 0.9. λ est la longueur d'onde du rayonnement X (nm). β est la largeur du pic de diffraction à mi-hauteur (en radian) et θ l'angle de diffraction (en radian).

2.8 Étude de la structure des complexes par microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique est l'une des techniques souvent mises en oeuvre pour approcher l'organisation d'un échantillon d'amidon (Gaillard et al., 2004). Pour révéler la présence de différentes zones organisées et visualiser leur disposition parmi des régions restées amorphes, il est en effet indispensable de disposer d'une technique dont la résolution est supérieure à la taille

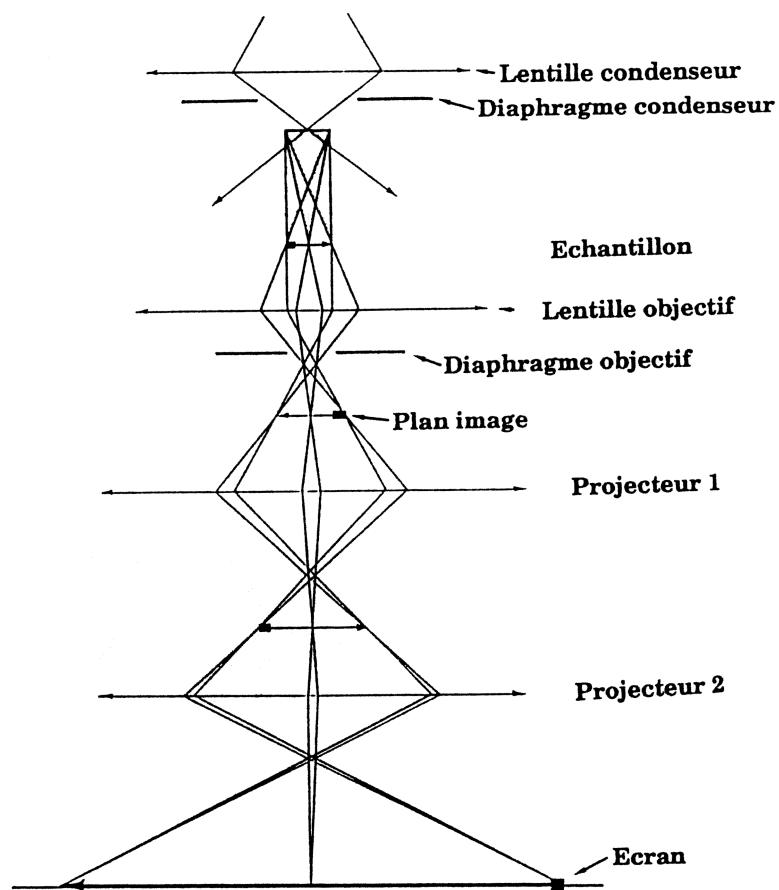


FIGURE 2.8 – Trajet du faisceau d'électron dans le microscope électronique à transmission (Helbert, 1994).

des objets à observer. Le pouvoir résolutif de la microscopie électronique en mode transmission étant supérieur à la taille connue des lamelles d'une structure semi-cristalline (Gallant et Guilbot, 1969), nous avons appliqué systématiquement cette méthode pour visualiser la structure des différents types de complexes formés.

2.8.1 Principe et fonctionnement de la méthode

La microscopie électronique à transmission est basée sur les principes d'interaction entre un faisceau énergétique, constitué ici par des électrons accélérés, et les atomes de la matière étudiée. Un microscope électronique à transmission peut être globalement décrit comme l'assemblage de trois parties distinctes (Figure 2.8). Le canon à électron, partie supérieure du microscope, est le lieu où sont successivement produits les électrons par échauffement d'un filament thermoïonique et accélérés entre deux plaques de potentiels différents. Dans ce que l'on peut considérer comme la partie intermédiaire, le faisceau électronique traverse ensuite une plaque circulaire chargée négativement, le Whelnet, qui a pour rôle de centrer les électrons vers l'axe du microscope. Des séries de lentilles électromagnétiques et de diaphragmes placés le long de l'axe optique permettent ensuite d'affiner la qualité du faisceau avant que celui-ci ne traverse l'échantillon préalablement placé sur le cheminement du faisceau électronique. La lentille condenseur et la lentille objectif en constituent les plus importantes. Dans la troisième et dernière partie du microscope, les électrons transmis sont récupérés sur un système d'acquisition pouvant être soit un écran fluorescent, soit des supports argentiques, soit des caméras CCD (Charge Coupled Device). Sur une image de microscopie électronique à transmission, les détails de l'objet d'étude apparaissent par différence de contraste entre des zones de densités différentes. Une zone très dense (contenant par exemple plus d'atomes lourds) va transmettre peu d'électrons (l'interaction de ceux-ci avec les atomes, nombreux, est dans ce cas plus fréquente) et conduire à une zone moins brillante sur l'image. Par contre, les zones les moins denses de l'échantillon vont transmettre plus d'électrons, ce qui donne une brillance augmentée.

Dans le cas des échantillons entièrement organiques, comme l'amidon, le contraste naturellement obtenu par transmission est quasi-inexistant, considérant que chaque zone de l'échan-

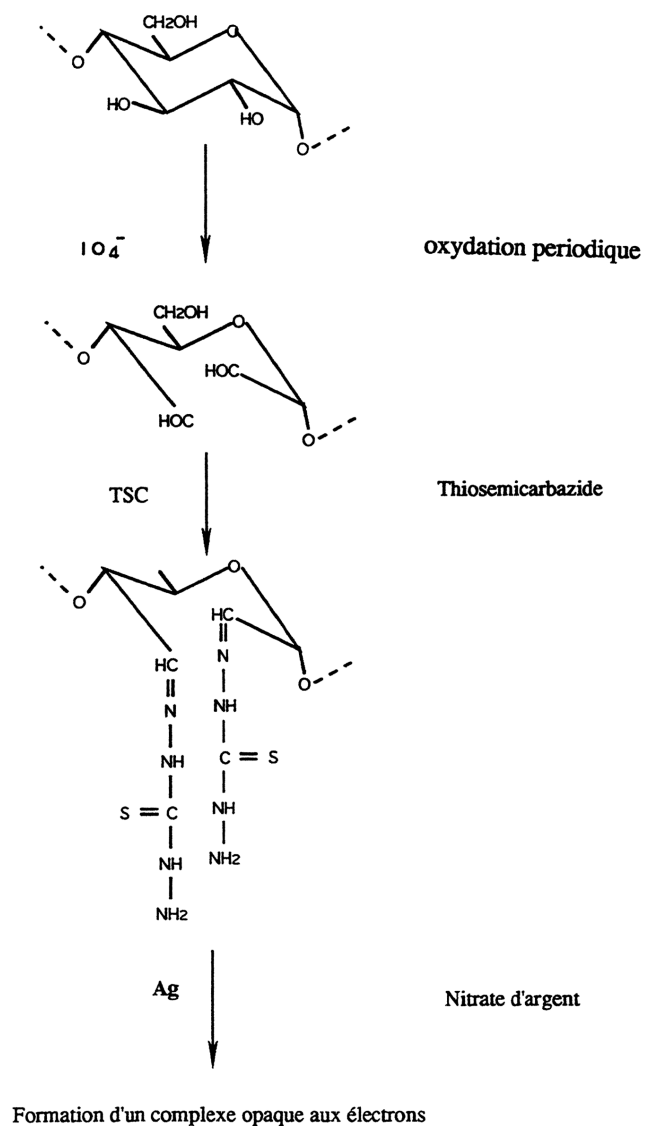


FIGURE 2.9 – Représentation de la réaction de marquage d'un polysaccharide par la méthode du PATAg (Gallant et Guilbot, 1969).

tillon a la même densité correspondant à une présence moyenne identique entre atomes H, C et O de la matière organique. Dans ce cas, il est souvent nécessaire de recourir à des méthodes de marquage chimique pour augmenter le contraste entre les différentes phases organiques. Le principe de la plupart des marquages chimiques est basé sur la diffusion sélective de métaux lourds qui s'accrochent préférentiellement sur l'une des zones en raison de caractéristiques particulières. Par exemple, la diffusion de sels d'argent au travers d'un échantillon semi-cristallin va inexorablement permettre de différencier les zones amorphes par rapport aux zones cristallines. Le sel métallique va en effet plus facilement diffuser à travers les zones les moins organisées et pénétrer avec plus grande difficulté dans les zones de repli lamellaire en raison de leur compacité supérieure.

2.8.2 Préparation des échantillons

Dans chaque cas, les complexes d'amylose sont successivement marqués à l'argent, selon la méthode du PATAg (Periodic Acid - Thiosemicarbazide - Argent) (Gallant et Guilbot, 1969), puis inclus dans une résine et découpés classiquement en sections ultrafines (environ 50 nm d'épaisseur) pour permettre une transmission optimale du faisceau incident (une épaisseur supérieure arrêterait tous les électrons). L'application de la méthode de marquage chimique au PATAg est basée sur l'oxydation des polysaccharides par l'acide périodique, ouvrant les cycles par des fonctions carbonyles, suivie de la fixation de thiosemicarbazide sur chaque carbonyle formé. Enfin l'argent ajouté est chélaté par les thiosemicarbazides fixés sur le polymère (Figure 2.9).

Pour faciliter la manipulation de chaque complexe étudié, généralement sous forme de poudre, il est en premier lieu nécessaire de disperser l'échantillon dans un gel d'agar. Pour ce faire, une dispersion à 3 % d'agar est préparée en dissolvant à chaud (environ 45 °C) une masse de 0,75 g de poudre Agar dans 25 g d'eau. Après mélange des poudres à l'agar encore liquéfié suivi du refroidissement et gélification, des petits cubes (environ 1 mm) contenant les complexes sont découpés sous une loupe binoculaire. Le marquage au PATAg est réalisé par plusieurs bains successifs :

- solution d'acide périodique 1 % dans l'eau pendant 30 minutes.
- 6 rinçages de 5 minutes dans de l'eau pure.
- solution saturée de thiosemicarbazide dans l'eau (environ 1.5 %) pendant 24 heures.
- à nouveau 6 rinçages de 5 minutes dans l'eau.
- solution de nitrate d'argent à 1 % dans l'eau pendant 48 heures.
- 6 rinçages de 5 minutes dans l'eau.

Chaque bloc d'agar est ensuite inclus dans une résine hydrophobe (EPON). Pour cela, les échantillons sont progressivement déshydratés dans des bains successifs de 5 minutes de gradient croissant en éthanol (25, 50, 75, 85 et 100 %). L'EPON n'étant pas soluble dans l'alcool, un échange éthanol contre oxyde de propylène est réalisé par bains successifs à gradient d'oxyde de propylène croissant (50 % puis 100 %). Les échantillons sont ensuite progressivement imprégnés de résine liquide par bains à gradient de résine liquide croissant (50 % puis 100 %). Chaque bloc imprégné de résine est finalement durci par différentes étapes de chauffage (1 jour à 40 °C et 4 jours à 60 °C). A partir de chaque bloc des coupes ultrafines de 50 à 70 nm d'épaisseur sont obtenues par découpe à l'ultramicrotome en utilisant un couteau à pointe de diamant. Enfin, les coupes sont déposées sur des grilles de cuivre recouvertes par un film de carbone avant d'être observées sous le microscope.

2.8.3 Observations

Les différentes observations sont effectuées soit par utilisation d'un MET Jeol JEM-100S en récupérant les images sur support argentique, soit sur un MET Jeol JEM-1230 en récupérant les images sur caméra CCD. Les microscopes sont utilisés avec une tension d'accélération de 80 kV.

2.9 Étude de l'inclusion des ligands dans l'hélice d'amylose par modélisation moléculaire

Les calculs et les minimisations de structure ont été réalisés avec les logiciels INSIGHT II et Cerius²(AccelrysTM) sur une station de travail O₂ (Silicon GraphicsTM). Le champ de force cff91, utilisé pour les minimisations, était fourni avec les logiciels.

2.9.1 Construction de l'hélice d'amylose et des ligands

2.9.1.1 Construction de l'hélice V₆

Une hélice d'amylose de 18 résidus glucosyl a été reconstruite par propagation suivant l'axe c des coordonnées de l'unité asymétrique de la maille cristalline déterminée par Rappenecker et Zugenmaier (1981) pour le type V_{6I}.

2.9.1.2 Recherche des conformations spatiales les plus stables des composés d'arôme

Les 20 molécules constituant l'arôme de note "viennoiserie" ainsi que deux autres composés d'arôme (la menthone et le linalol) ont été construites à partir du module "builder" de Insight II. Les degrés de liberté d'une molécule sont liés formellement aux paramètres internes (longueur des liaisons covalentes, angle de valence et angle dièdre) mais en pratique, les angles dièdres sont les principaux responsables des flexibilités conformationnelles car les lois énergétiques les concernant sont beaucoup plus souples et tolèrent de larges plages de variations. La rotation autour d'une liaison covalente est quasiment libre et les limitations sont dues indirectement aux contacts atomiques qui peuvent découler de la variation de ces angles dièdres. Pour les petites molécules, il est toujours intéressant de faire une recherche systématique de conformations, en identifiant les principaux angles dièdres susceptibles de varier (notamment ceux hors des cycles) et en opérant un balayage par incrément régulier pour trouver les zones de conformations les plus probables. Lorsque le nombre de dièdres est limité, il est alors possible de représenter ces variations conformationnelles sous forme de courbe, carte ou volume iso-énergétiques (pour un,

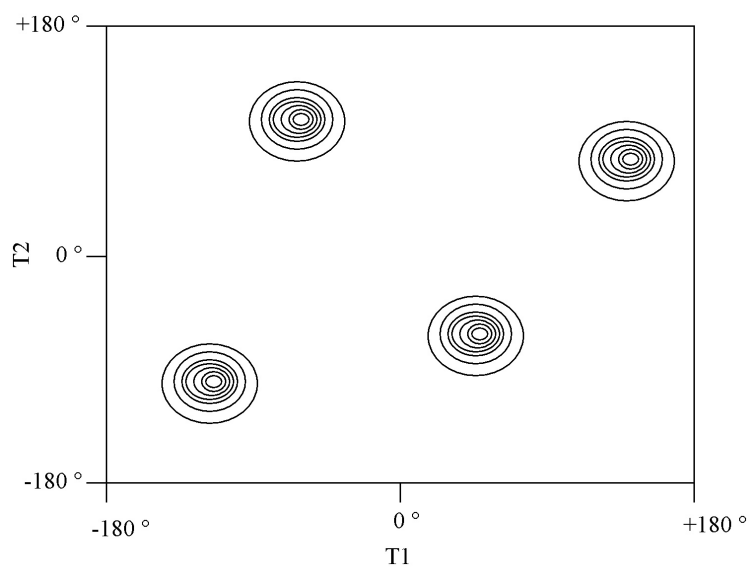


FIGURE 2.10 – Représentation schématique d’une carte d’isoénergie en fonction des angles dièdres T_1 et T_2 . Les iso-contours d’énergie sont représentés par les cercles concentriques.

deux et trois degrés de liberté respectivement). Dans cette étude, les angles dièdres retenus (T_1 et T_2) ont été balayés de -180° à 180° par pas de 10° . Ces tracés iso-énergétiques permettent d'identifier les principaux minima énergétiques (Figure 2.10) et de les affiner ultérieurement par des minimisations sur l'ensemble des paramètres internes (10 000 itérations). Bien évidemment, cette stratégie systématique est réservée à de petites molécules avec un faible nombre de degrés de liberté. Dans le cas de structures bien plus importantes (protéines ou polymères glucidiques), il faut utiliser d'autres principes de structuration pour accéder à leurs organisations tridimensionnelles : éléments de structures secondaires et organisation globulaire pour les protéines ; architecture ordonnée pour les polymères glucidiques (structures hélicoïdales ou linéaires)

2.9.2 Recherche des solutions d'inclusion

La construction initiale des complexes d'inclusion utilise la topologie de chacun des partenaires pour limiter le nombre de degrés de liberté de positionnement d'une molécule par rapport à l'autre. La structure hélicoïdale de la matrice amylosique laisse une cavité interne dans laquelle il faut positionner le ligand. Néanmoins, la topologie de la "paroi interne" de l'hélice n'est pas identique en tout point et oblige à prendre en compte deux paramètres pour positionner le ligand : translation le long de l'axe de l'hélice (axe c) et rotation (autour de l'axe c) du ligand. Cependant, les topographies non sphériques des ligands et l'étroitesse de la cavité ne nécessitent pas de faire intervenir les deux autres rotations perpendiculaires à l'axe c. Les conformations les plus stables des composés d'arôme ont été sélectionnées pour étudier leurs possibilités d'inclusion dans l'hélice d'amylose. Pour chaque modèle d'inclusion, les barycentres de l'hélice d'amylose et des molécules incluses ont été superposés. Pour chaque opération de translation et de rotation, l'énergie d'interaction entre l'amylose et le ligand est mesurée. Cette énergie d'interaction, exprimée en kcal/mol est calculée comme étant :

$$\text{Énergie d'interaction} = E_{\text{complexe}} - E_{\text{amylose}} - E_{\text{ligand}} \quad (2.9)$$

Comme pour la recherche des conformations spatiales des ligands seuls, une recherche systématique a été réalisée. Les opérations de translation ont été faites sur une longueur de 8 nm

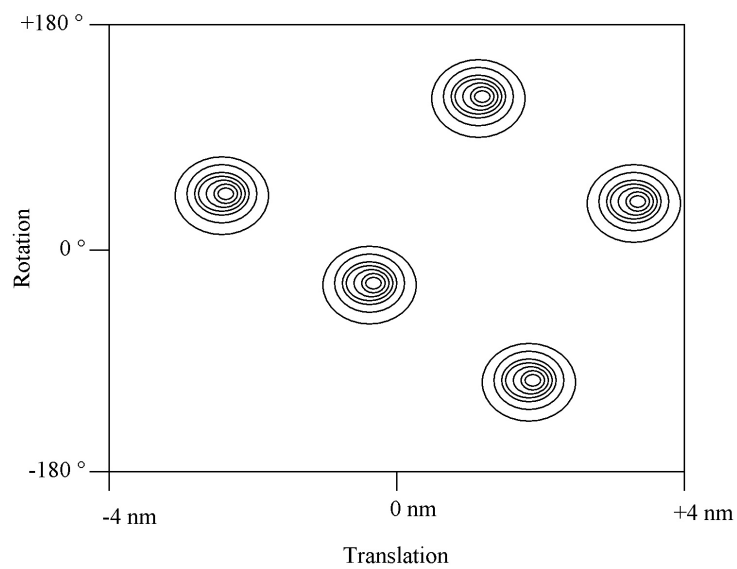


FIGURE 2.11 – Représentation schématique d’une carte de translation - rotation. Les minima d’énergie permettent de déterminer le couple translation/rotation correspondant à une solution d’inclusion plus probable.

(-4 à +4 nm) (pas de l'hélice d'amylose) avec un pas de 0.2 nm ; les opérations de rotations sur 360 ° (-180 ° à +180 °) avec un pas de 5 °. Les résultats sont exprimés sous forme de cartes montrant l'énergie d'interaction, entre l'hélice d'amylose et le ligand, en fonction de la translation en abscisse et de la rotation en ordonnée (Figure 2.11). Les couples rotation/translation qui aboutissent au plus faibles énergies correspondent aux zones d'inclusion les plus stables et les plus probables.

2.9.3 Minimisation énergétique des solutions d'inclusion

Les solutions d'inclusion ne présentant pas de conflits stériques insurmontables ont été ensuite minimisées pour affiner ces géométries initiales et évaluer l'adaptation réciproque de chacun des partenaires. Les solutions d'inclusion ont été minimisées suivant deux protocoles différents. Dans une première situation très contrainte, tous les atomes lourds de l'amylose (oxygène et carbone) ont été fixés. Les seuls mouvements autorisés au cours de l'optimisation sont donc ceux des hydrogènes de l'amylose et des atomes de la molécule incluse. L'énergie d'interaction est calculée après 10000 itérations et permet d'évaluer et de comparer la complémentarité de forme entre la structure hélicoïdale de l'amylose et les différentes conformations des ligands.

Le deuxième type d'optimisation a été réalisée dans une situation totalement "relâchée" où aucun des atomes n'a été fixé. Dans ce cas, tous les atomes sont libres de leur mouvement et chaque molécule se déforme pour s'adapter à l'autre. Ce calcul a pour objectif de mesurer l'éventuelle déformation de la matrice amylosique en situation de complexation. Ce dernier type d'optimisation a également été fait avec l'hélice d'amylose vide pour "calibrer" les résultats en présence de ligands et pour évaluer les possibles artefacts de la relaxation de la chaîne hélicoïdale dans le vide (non présence stabilisante des chaînes voisines et effets de bords de l'hélice). Dans ce dernier protocole, les résultats ont été analysés visuellement et quantitativement par la mesure du déplacement moyen (RMS : root mean square displacement) des positions atomiques de l'amylose après superposition avec l'hélice sans ligand.

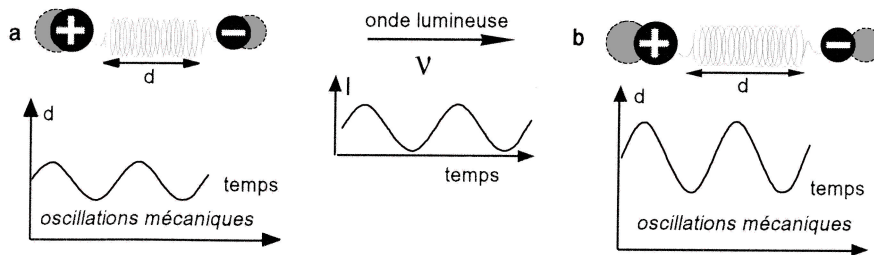


FIGURE 2.12 – Interprétation mécanique de l'interaction d'une onde lumineuse avec une liaison polarisée. La fréquence mécanique ne change pas, mais l'amplitude est modifiée lorsque la fréquence est identique. D'après Rouessac et Rouessac (1998).

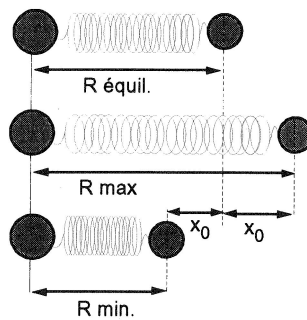


FIGURE 2.13 – Modèle d'oscillateur harmonique pour une molécule diatomique. D'après Rouessac et Rouessac (1998).

2.10 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

2.10.1 Principe de la méthode

L'infrarouge analytique regroupe plusieurs méthodes d'identification et de dosage non destructives basées sur l'absorption (ou la réflexion), par l'échantillon, des radiations électromagnétiques de longueur d'onde λ comprise entre 1 et 1000 μm . Cette bande spectrale est elle-même divisée de 1 à 2.5 μm en proche infrarouge, de 2.5 à 25 μm en moyen infrarouge et au-delà en lointain infrarouge. La partie la plus riche en information et la plus accessible au niveau expérimental est le moyen infrarouge. Les absorptions dans ce domaine forment une "empreinte digitale" des composés et peuvent également renseigner sur les structures.

Les absorptions dans le moyen infrarouge proviennent de l'interaction de la composante électrique d'ondes électromagnétiques incidentes avec les dipôles électriques des liaisons non symétriques. Si ce dipôle, oscille à la même fréquence que l'onde, la composante électrique de celle-ci peut transmettre son énergie à la liaison (Figure 2.12). En conséquence, une liaison n'ayant pas de dipôle permanent est transparente dans le moyen infrarouge (par exemple O_2 , N_2 , Cl_2).

Pour représenter par un modèle simple les vibrations des liaisons, on se réfère au modèle de l'oscillateur harmonique. C'est un ensemble formé par deux masses pouvant glisser sans frottement sur un plan et réunies par un ressort (Figure 2.13). Si les deux masses sont écartées d'une valeur x_0 par rapport à la distance d'équilibre R_e , lors du relâchement du système, celui-ci oscille avec une période qui est fonction de la constante de raideur du ressort k ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$) et des masses en présence. Le terme d'oscillateur harmonique est employé du fait que l'élongation est proportionnelle à la force exercée tandis que la fréquence de vibration ν_{vib} en est indépendante. La fréquence peut être calculée à partir de la relation 2.10, où μ représente la masse réduite du système.

$$\nu_{vib} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (2.10)$$

L'énergie de vibration peut être déterminée à partir de la relation 2.11 :

Gamme théorique	0 %	2 %	5 %	6 %	7 %	10 %	12 %
Ac. décanoïque	0	2.45	4.82	6.08	7.28	10.11	12.5
Ac. hexanoïque	0	2.17	4.08	5.7	6.59	10.14	12.66
δ -décalactone	0	2.39	5.19	6.31	7.19	10.25	12.32

TABLEAU 2.2 – Concentration en pourcentage (m/m) de ligand dans les mélanges standards pour la gamme étalon.

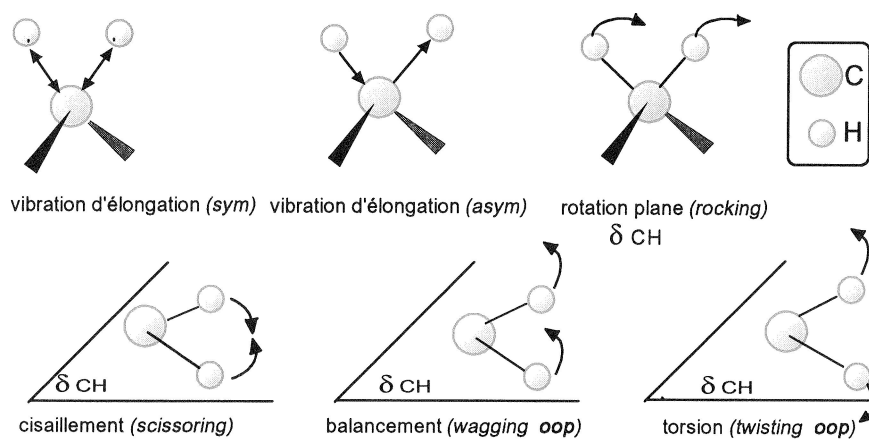


FIGURE 2.14 – Vibrations moléculaires du CH_2 d'élongations et de déformations dans le plan ou hors du plan (oop). D'après Rouessac et Rouessac (1998).

$$E_{vib} = \frac{1}{2} \cdot k \cdot x_0^2 \quad (2.11)$$

Les vibrations moléculaires peuvent être de plusieurs types. Les plus connues sont les vibrations d'élongation (symétrique ou asymétrique) et les vibrations de déformation angulaires (cisaillement, balancement et torsion) (Figure 2.14).

Les spectres infrarouge représentent, pour chaque longueur d'onde, exprimée sous forme de nombres d'onde $\bar{\nu}$ (cm^{-1}) ($\bar{\nu} = 1/\lambda_{cm}$), le rapport des intensités transmises avec ou sans échantillon. Ce rapport appelé transmittance T peut être remplacé par son pourcentage (%T) ou par l'absorbance ($A = \log(1/T)$). Les maxima des bandes d'absorption présentes sur les spectres sont caractéristiques de certaines fonctions chimiques et peuvent être modifiées par des particularités structurales ou environnementales.

2.10.2 Dosage des ligands piégés dans les complexes

La quantité de ligand présent dans les différents échantillons étudiés a été mesurée par infrarouge. Les dosages ont été réalisés, avant et après hydrolyse préférentielle des zones amorphes, pour les complexes amylose-acide décanoïque, amylose-acide hexanoïque et amylose- δ -décylactone, respectivement représentatifs des complexes V_{6I} , V_{6II} et V_{6III} .

2.10.2.1 Gamme étalon et préparation des échantillons

La gamme est constituée de plusieurs mélanges d'amylose, préalablement séchée dans une étuve à 50 °C pendant 24 h, et de ligand. Les proportions en masse de chacun des points des gammes pour le dosage de l'acide décanoïque, de l'acide hexanoïque et de la δ -décylactone sont données dans le tableau 2.2.

Pour l'analyse en infrarouge, les échantillons et les gammes étalon ont été préparés sous forme de pastilles de KBr. Pour cela, 2 mg de complexes ou d'étalon sont mélangés et broyés finement avec 100 mg de KBr puis compressés à 300 kg/cm². Chaque échantillon et point de la gamme a été préparé en triplicat.

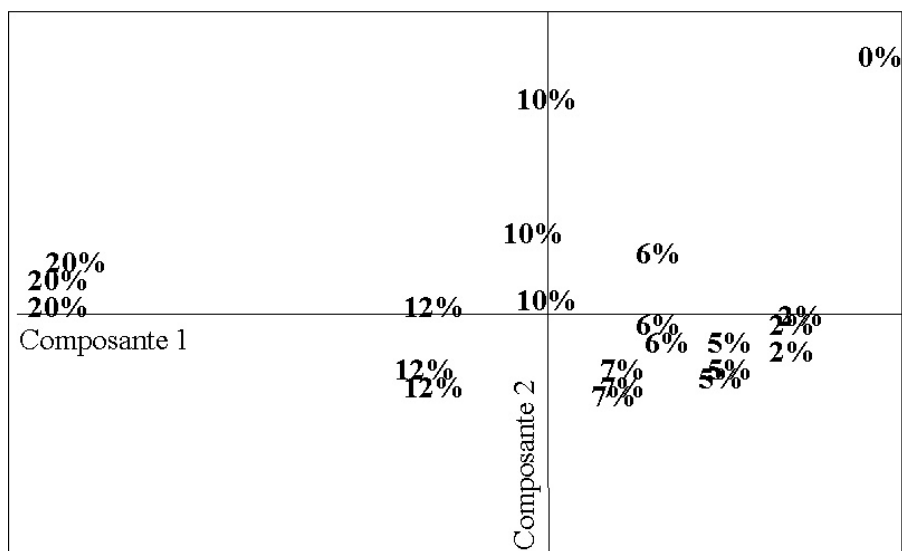


FIGURE 2.15 – Exemple de carte ACP obtenue pour une gamme étalon. L'axe 1 semble être lié au pourcentage de ligand.

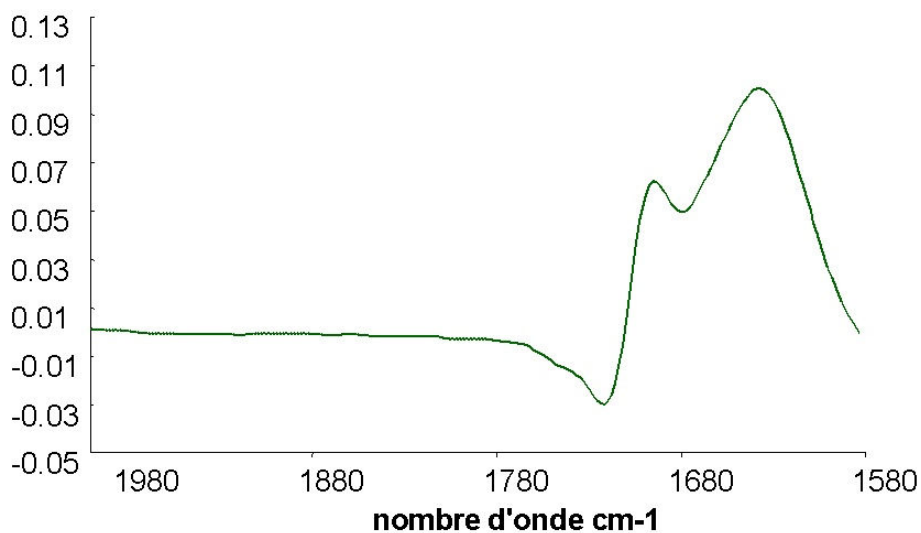


FIGURE 2.16 – Exemple de profil spectral pour la deuxième composante issue de l'ACP de la figure 2.15.

2.10.2.2 Acquisition des données infrarouge

Le spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier de type Vector 22 (Bruker, France) est configuré pour fonctionner en mode "Absorbance". Les spectres sont obtenus après accumulation de 200 scans entre 4000 et 400 cm^{-1} (résolution 4 cm^{-1}). Ils sont ensuite lissés (17 points de lissage), puis coupés entre 2000 et 800 cm^{-1} , la ligne de base est corrigée (correction élastique, 32 points) et normalisés (normalisation vectorielle) à partir du logiciel OPUS (v 2.06).

2.10.2.3 Détermination de la quantité de ligand par Analyse en Composantes Principales

Les molécules piégées ont été dosées par la méthode décrite par Robert et al. (1996), utilisant l'Analyse en Composantes Principales (ACP). L'ACP permet de mettre en évidence des corrélations entre les données spectrales et les données chimiques (quantité de ligands piégés). Chacun des spectres des gammes étalon est utilisé pour générer une carte de l'ACP. Les individus (points de la gamme étalon) sont répartis sur la carte en fonction des différents axes correspondant chacun à des variables (Figure 2.15).

L'axe de la première composante est celui qui étire le mieux le nuage de points et donc celui qui discrimine le mieux les échantillons. L'axe de la deuxième composante principale est perpendiculaire au premier ce qui permet de décorrélérer les différentes variables impliquées dans les deux composantes. Ces deux axes constituent un nouveau repère et l'ACP donne les coordonnées des individus (dites coordonnées factorielles) dans ce repère.

Chaque point des spectres infrarouge peut être caractérisé dans ce nouveau repère par deux vecteurs. Ce sont les vecteurs propres. Si l'on trace le module de ces vecteurs propres en fonction du nombre d'onde, on obtient un profil spectral qui montre l'élément discriminant dans la composante principale concernée (Figure 2.16).

Le calcul de la quantité de ligands piégés est réalisé à partir d'une équation de prédiction obtenue par une régression en composante principale. Si l'on trace la quantité de ligands dans l'étalon en fonction de la valeur de la composante principale, les points de la gamme se répartissent suivant une ligne droite. L'équation de la droite de régression permet de calculer la

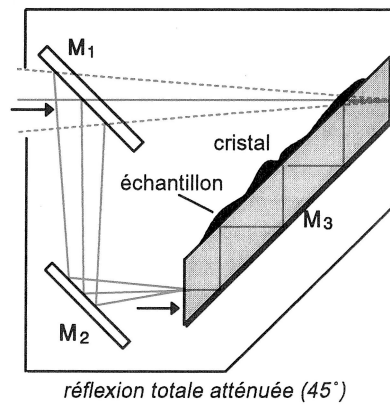


FIGURE 2.17 – Dispositif ATR permettant l'étude d'échantillons par réflexion (Rouessac et Rouessac, 1998).

quantité de ligands piégés dans un complexe à partir de la valeur de la composante principale pour cet échantillon.

2.10.3 Étude cinétique de la formation des complexes

Un suivi cinétique de la formation des complexes a été réalisé par infrarouge en mode "réflexion totale atténuée" (ATR, Attenuated Total Reflectance). Le principe des dispositifs ATR est de faire subir au faisceau d'infrarouge plusieurs réflexions à l'interface entre un cristal parallélépipédique d'indice de réfraction élevé et l'échantillon (Figure 2.17). Compte tenu de la différence d'indice de réfraction entre les deux milieux et de l'angle d'incidence, la lumière pénètre d'environ une demi-longueur d'onde (environ $2 \mu\text{m}$) dans l'échantillon à chaque réflexion. La succession de plusieurs réflexions totales ainsi atténuées conduit à une accumulation d'absorptions. Le spectre final, après correction de la profondeur de pénétration, est identique à un spectre obtenu en transmission.

Une solution d'amylose à 1 % est préparée conformément au protocole indiqué dans le paragraphe 2.2 (page 139). Dix pourcents de ligands (par rapport à la masse d'amylose) sont ajoutés à la solution qui est fortement agitée pendant 4 ou 5 secondes puis immédiatement déposée dans une cuve étanche, thermostatée, et traversée par le cristal d'ATR. Les mesures de spectres sont prises toutes les 5 minutes pendant 24 heures (voir § 2.10.2.2, page 173).

Pour chaque échantillon, la cinétique a été réalisée suivant deux protocoles :

- refroidissement de 70 °C à température ambiante, pendant 24 heures
- température constante (70 °C), pendant 24 heures

2.11 Étude de la stabilité thermique des complexes par μ DSC

2.11.1 Principe de l'analyse enthalpique différentielle

L'analyse enthalpique différentielle (AED ou DSC pour Differential Scanning Calorimetry) permet de mesurer les paramètres thermodynamiques et cinétiques de transitions de phase. Cette

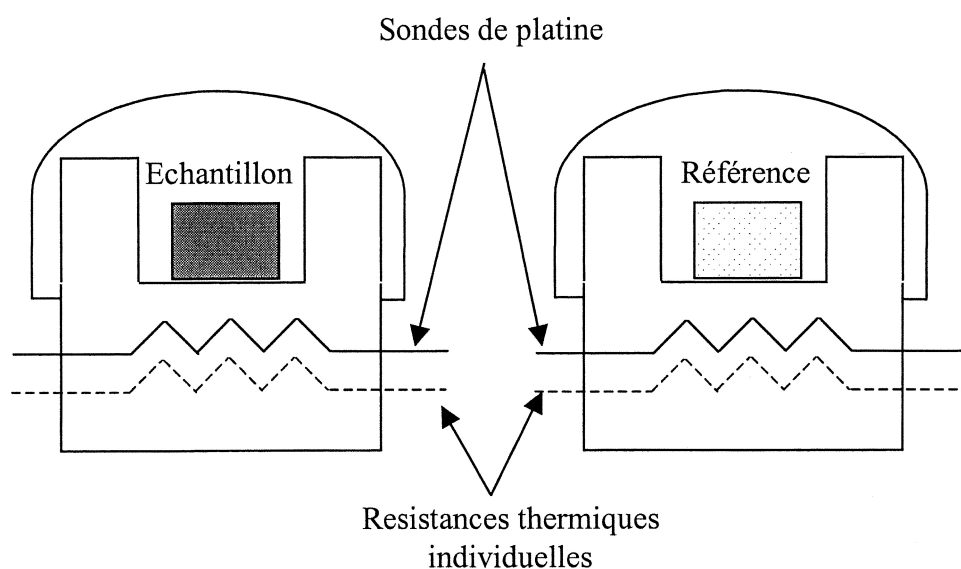


FIGURE 2.18 – Représentation schématique du système d'analyse d'un calorimètre. D'après Donato (2004).

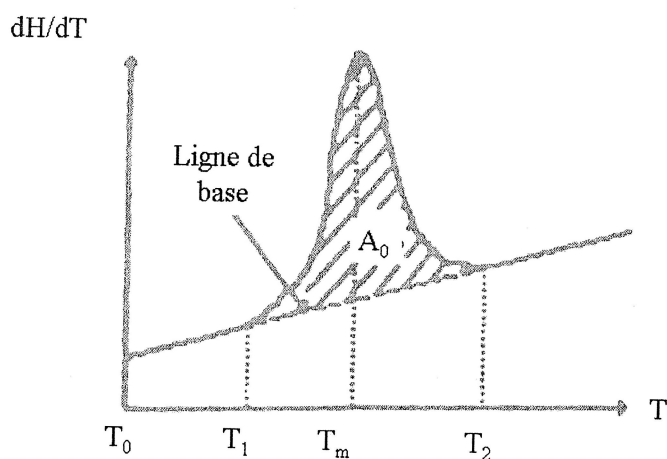


FIGURE 2.19 – Représentation simplifiée d'un thermogramme d'AED. A_0 correspond à l'aire du pic et T_m à la température de transition. Généralement le caractère exothermique ou endothermique est indiqué par une flèche verticale car les modes de représentation diffèrent d'un appareil à l'autre. D'après Donato (2004).

méthode consiste à chauffer ou à refroidir progressivement et à vitesse constante l'échantillon à analyser et une référence inerte (souvent le solvant de l'échantillon (eau)) de même masse et de capacité calorifique comparable. L'échantillon et la référence sont déposés dans des capsules étanches puis placés dans un détecteur isolé thermiquement pour la mesure (Figure 2.18). A chaque instant, la différence de puissance électrique nécessaire pour maintenir l'échantillon et la référence à la même température est mesurée. Un étalonnage permet de convertir cette mesure de puissance électrique en flux de chaleur différentiel. La différence de flux énergétique dQ est enregistrée tout au long de la programmation en température. Si une transition de phase se produit dans l'intervalle de températures T_1 et T_2 ($T_1 < T < T_2$), on aura :

$$dQ = dH + C_p \cdot dT \quad (2.12)$$

Avec, dQ l'énergie thermique, dH l'enthalpie de transition, C_p est la différence de capacité calorifique entre la référence et l'échantillon et dT l'intervalle de température. L'enthalpie de transition sur l'ensemble de la plage de température est donnée par :

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} dQ - \int_{T_1}^{T_2} C_p \cdot dT \quad (2.13)$$

Lorsqu'une transition thermique survient dans l'échantillon, au cours du chauffage (ou du refroidissement), l'échange thermique se traduit par un pic sur le thermogramme dont la surface est proportionnelle à la variation d'enthalpie ΔH du système (Figure 2.19). Si cette transition se traduit par un apport supplémentaire d'énergie, il s'agit d'une réaction endothermique et le pic est un endotherme. Si la transition montre une diminution de l'énergie apportée au système, c'est une réaction exothermique et le pic correspondant est un exotherme. La température correspondant au maximum du pic de transition est considérée comme étant la température de vitesse de réaction maximale et détermine la température de transition.

2.11.2 Mise en œuvre

Les mesures ont été réalisées avec un microcalorimètre SETARAMTM MicroDSC III

2.12. Dosage par fluorescence de la dihydrocoumarine et de la vanilline dans la génoise

(France). Cinquante milligrammes de complexes et 800 μl d'eau sont déposés dans une capsule en inox, tandis que la capsule référence contient 800 μl d'eau. La quantité d'eau dans la capsule référence et la capsule contenant l'échantillon est identique, car la C_p des échantillons est négligeable par rapport à la C_p de l'eau. Les capsules sont ensuite fermées hermétiquement avec un joint thermorésistant puis placées dans le four de l'appareil et maintenues à 5 °C pendant 5 minutes. Les thermogrammes sont ensuite enregistrés au cours d'une montée en température de 5 à 120 °C à une vitesse de 0.1 °C/min suivie d'une descente à vitesse égale. Deux cycles successifs ont également été programmés pour certains échantillons.

Afin de mettre en évidence la formation de complexes d'amylose lors d'une montée en température, une solution d'amylose à 1 % (m/m) a été préparée conformément au protocole décrit précédemment. Cette solution est refroidie rapidement à température ambiante puis 20 % (m/m_{amylose}) de composés d'arôme sont ajoutés. Le mélange est ensuite immédiatement déposé dans une capsule en inox puis analysé. Les rampes de température suivies sont les suivantes :

- 20 °C à 50 °C à 1 °C/min
- 50 °C à 120 °C à 0.1 °C/min
- 120 °C à 50 °C à 0.1 °C/min
- 50 °C à 20 °C à 1 °C/min

2.12 Dosage par fluorescence de la dihydrocoumarine et de la vanilline dans la génoise

Deux composés d'arôme ont été suivis au cours de l'élaboration de la génoise par spectrophotométrie de fluorescence.

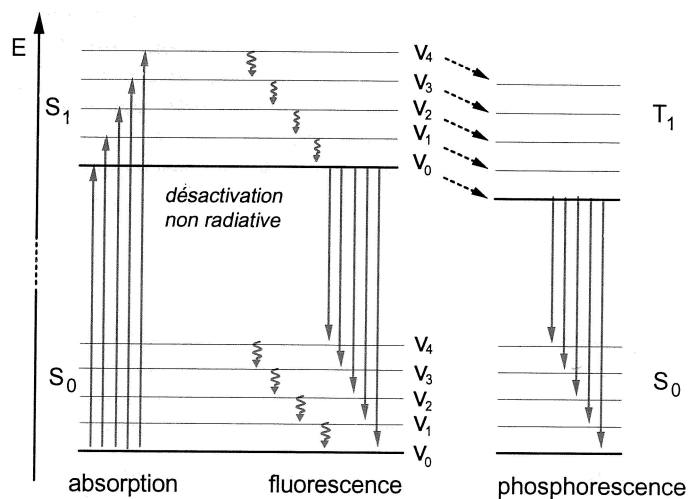


FIGURE 2.20 – Diagramme énergétique comparatif de la fluorescence et de la phosphorescence. Les flèches courtes correspondent à des mécanismes de conversion interne sans émission de photons. D'après Rouessac et Rouessac (1998).

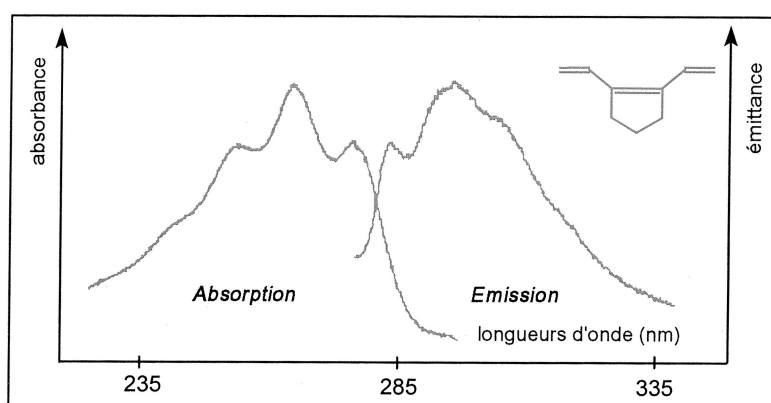


FIGURE 2.21 – Représentation des spectres d'absorption et de fluorescence d'un triène. D'après Rouessac et Rouessac (1998).

2.12.1 Origine de la fluorescence

Certains composés, lorsqu'ils sont excités par des radiations lumineuses du domaine du visible ou du proche ultraviolet, réémettent tout ou partie de l'énergie reçue sous forme d'un rayonnement. En absorbant un photon, un chromophore passe de son état électronique fondamental à un état excité qui est instable à une température ordinaire (Figure 2.20). Le retour à l'état fondamental S_0 , peut se faire par échange d'énergie dans la molécule ou avec d'autres molécules lors de collisions (l'énergie est perdue sous forme de chaleur). La molécule peut également revenir à l'état S_0 par émission d'un photon : c'est le phénomène de luminescence. Si la réémission est rapide (avec des demi-vies de l'ordre de la nanoseconde), il s'agit de fluorescence. Si le phénomène est lent (proche de la seconde), il s'agit de phosphorescence. Dans ce cas, le chromophore passe par un état intermédiaire un peu plus stable (T_1) avant de revenir à S_0 .

D'après la loi de Stokes, l'énergie du photon réémis est toujours plus faible que l'énergie de celui a été absorbé, donc sa longueur d'onde sera plus élevée (Figure 2.21). L'émission des photons de fluorescence se fait dans toutes les directions de l'espace. Généralement, les mesures de fluorescence sont effectuées en solution et perpendiculairement à l'axe du rayon incident pour éviter que celui-ci ne perturbe les mesures. Il est également possible de mesurer une fluorescence sur des échantillons solides en utilisant le mode dit "frontal" du spectrofluorimètre.

Il existe deux types de spectres de fluorescence :

- un spectre d'excitation de fluorescence : le détecteur est focalisé sur une seule longueur d'onde d'émission tandis que la longueur d'onde d'excitation varie sur une plage de longueur d'onde au cours de l'expérience.
- un spectre d'émission de fluorescence est obtenu en fixant la longueur d'onde d'excitation à une valeur bien précise et en scannant une plage de longueur d'onde d'émission à partir du détecteur.

	Dihydrocoumarine	Vanilline
$\lambda_{excitation}$ (nm)	281	365
$\lambda_{émission}$ (nm)	300	431

TABLEAU 2.3 – Longueur d’onde d’excitation et d’émission maximale de fluorescence de la vanilline et de la dihydrocoumarine.

2.12.2 Mise en œuvre

La dihydrocoumarine et la vanilline ont été choisies dans la formule de l'arôme "viennoiserie" pour cette étude, car, d'une part elles présentent une fluorescence intrinsèque et d'autre part, elles ont des comportements complexant différents vis à vis de l'amylose (cf. Tableau 1.2, page 194). Leurs longueurs d'onde d'excitation et d'émission de fluorescence respectives sont données dans le tableau 2.3.

2.12.3 Extraction et dosage des composés d'arôme de la pâte et de la génoise

2.12.3.1 Acquisition des données de fluorescence

Les mesures de fluorescence sont effectuées sur un spectrofluorimètre Hitachi F-4500 FL. L'appareil est réglé pour réaliser des spectres d'émission de fluorescence. Les fentes d'excitation et d'émission sont réglées sur 5 nm et le voltage du photomultiplicateur à 700 V.

Pour la vanilline, la longueur d'onde d'excitation est fixée à $\lambda = 355$ nm et le spectre d'émission de fluorescence est réalisé entre 365 et 480 nm à une vitesse de 240 nm/min. Pour la dihydrocoumarine, la longueur d'onde d'excitation est de 275 nm et les spectres sont mesurés entre 285 et 350 nm.

2.12.3.2 Gammes étalons

Pour des solutions très diluées, l'intensité de fluorescence d'un composé est proportionnelle à sa concentration. Une gamme étalon de 0 à 0.4 μ M de dihydrocoumarine est préparée à partir d'une solution mère à 20 μ M, dans un mélange éthanol/eau (50/50). De la même façon une gamme étalon de 0 à 4 mM est préparée à partir d'une solution de vanilline à 20mM. L'intensité de fluorescence est tracée en fonction de la concentration en composés d'arôme et l'équation de la droite de régression linéaire permet de retrouver la concentration dans les échantillons.

2.12.3.3 Extraction des composés d'arôme

Environ 500 mg de pâte ou de génoise sont finement broyés dans 10 ml d'éthanol et agités pendant 5 minutes puis passés sur un filtre PTFE 0.45 μ m. Cinq millilitres de cette solution sont prélevés et un volume identique d'eau pure est ajouté puis le mélange est analysé par fluorescence. Dans le cas de la dihydrocoumarine, une dilution au 20^{ième} dans un mélange éthanol/eau (50/50) est réalisée avant l'analyse.

Troisième partie

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre 1

Implication des complexes d'amylose dans la rétention des composés d'arôme

1.1 Complexation des composés d'arôme en milieu modèle

La génoise étant un milieu trop complexe pour étudier les interactions des composés d'arôme avec la partie amylacée, et l'amylose étant connue pour ses propriétés de complexation, il a été convenu de mener cette étude sur le système modèle le plus simple : l'amylose.

L'objectif de ces travaux est de mettre en évidence des interactions entre l'amylose et les 20 molécules qui composent l'arôme de note "viennoiserie". Le mélange aromatique complet ainsi que la menthone et le linalol, connus pour former de complexes de type V_{6III} (Le Bail et al., 2005), ont également été étudiés dans les mêmes conditions. Les complexes obtenus ont été identifiés par comparaison des diagrammes de diffraction avec les données de la littérature relatives aux trois types cristallins V_6 (Rappenecker et Zugenmaier, 1981; Helbert et Chanzy, 1994; Buléon et al., 1990).

1.1.1 Caractérisation visuelle de la complexation des composés d'arôme.

L'amylose, solubilisée à chaud, est métastable et reprécipite au cours du temps lorsque que la température est inférieure à une cinquantaine de degrés et sa concentration proche de

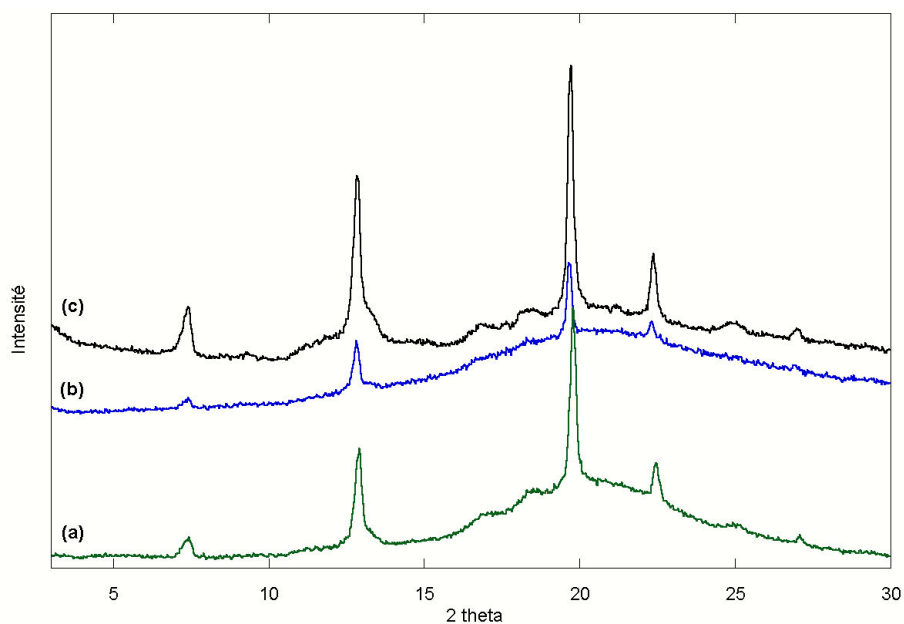


FIGURE 1.1 – Diagramme DRX d'amylose caractéristique du type V_{6I}, obtenu en présence de (a) l'arôme "viennoiserie", (b) du propylène glycol et (c) de l'acide décanoïque.

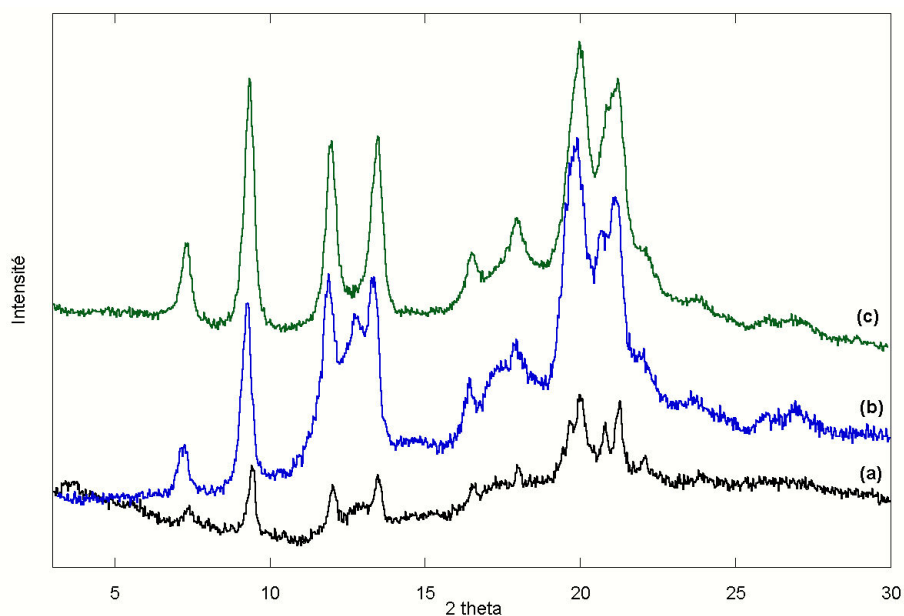


FIGURE 1.2 – Diagramme DRX d'amylose caractéristique du type V_{6II}, obtenu en présence de (a) hexanoate d'éthyle, (b) acide hexanoïque et (c) cis-3hexenol.

0.1 % (m/m). Cette reprecipitation correspond à la rétrogradation de l'amylose solubilisée en type cristallin B. Elle se traduit, dans les conditions de température et de concentrations utilisées, par l'apparition d'un trouble dans la solution après deux à trois heures puis par une lente précipitation pendant 48 heures ou plus. Le précipité obtenu est de couleur blanche, peu dense et d'aspect très "cotonneux".

En présence de composés d'arôme, trois comportements différents ont été observés. Le premier comportement est une formation rapide d'un trouble de la solution d'amylose (quelques minutes) suivie d'une précipitation qui ne semble plus évoluer après 24 heures. Le précipité obtenu est blanc, beaucoup plus dense que celui décrit précédemment et ne montre pas un aspect cotonneux mais s'apparente plutôt à de la "colle blanche" assez ferme. Ceci a été observé pour l'acide décanoïque, l'acide hexanoïque, l'hexanoate d'éthyle, le propylène glycol, le cis-3-hexen-1-ol, la δ -décylactone, la γ -décylactone, l'acide butanoïque, la dihydrocoumarine, le linalol, la menthone et également avec l'arôme complet de viennoiserie.

Le deuxième comportement observé en présence de composés d'arôme est identique à celui observé pour la solution d'amylose seule, illustrant vraisemblablement une rétrogradation de l'amylose malgré la présence du composé d'arôme. Ce comportement a été observé lors des essais de complexation de l'acétate d'éthyle, du benzaldéhyde, du butyrate d'éthyle, du cinnamate de méthyle, du furanéol, du maltol, du sulfurool et de la vanilline. Ceci laisse penser que ces molécules ne présentent pas d'affinité particulière pour l'amylose et que leur présence ne modifie pas la réorganisation de l'amylose.

Le troisième comportement, observé en présence de diacétyl et d'acétoïne, aboutit à la formation d'une solution qui est stable pendant plusieurs semaines sans aucune précipitation. Ces deux molécules gênent donc la précipitation de l'amylose. Certains composés d'arôme jouent donc le rôle de solvant, d'autres de précipitants et enfin certains de complexants de l'amylose. En outre, il est possible que certaines molécules se comportent de façons différentes en fonction de la concentration comme cela a été montré pour les alcools.

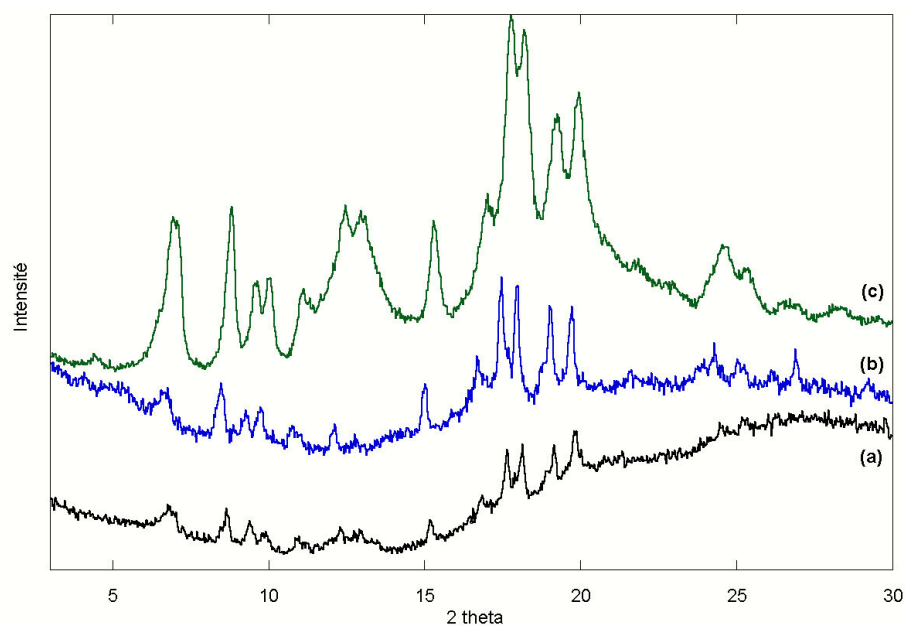


FIGURE 1.3 – Diagramme DRX d'amylose caractéristique du type V_{6III}, obtenu en présence de (a) acide butyrique, (b) de dihydrocoumarine et (c) de γ -décalactone.

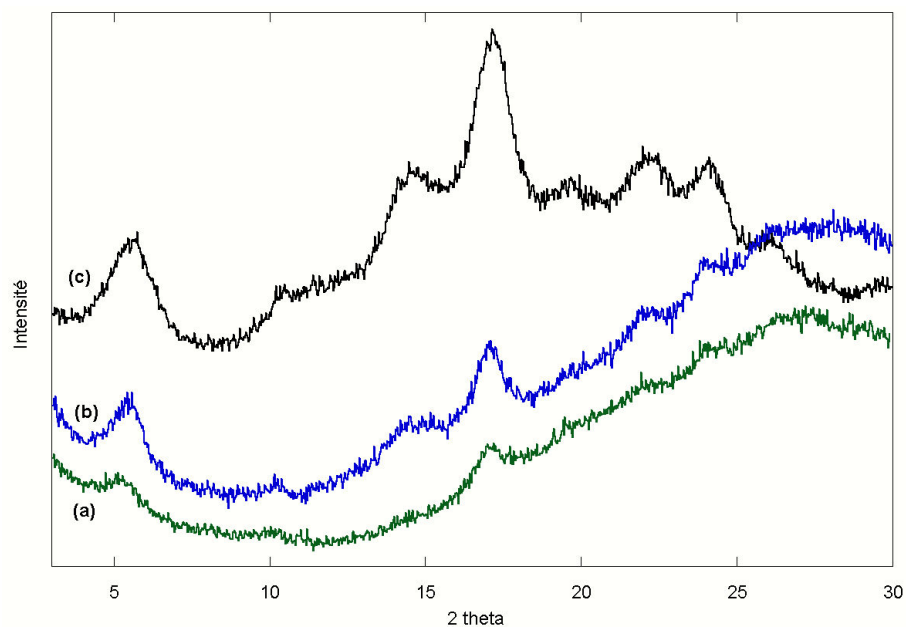


FIGURE 1.4 – Diagramme DRX d'amylose caractéristique du type B, obtenus en présence de (a) furanéol, (b) vanilline et (c) sulfurool.

1.1.2 Caractérisation du type cristallin par diffraction des rayons X

Chacun des mélanges amylose-composés d'arôme précipités ont été étudiés en DRX aux grands angles (WAXS).

Les diagrammes de diffraction des précipités obtenus en présence d'acide décanoïque, de propylène glycol ou de l'arôme complet de viennoiserie sont présentés dans la figure 1.1 (page 190). Ces trois diagrammes sont caractéristiques du type de complexes V_{6I} avec des pics de diffraction pour les angles $2\theta = 7.4, 12.9, 19.8$ et 22.4° ($\lambda_{CuK\alpha 1} = 0.15405$ nm) (Tableau 1.1, page 194). La "bosse" de diffusion centrée à 19° sur les trois diagrammes montre la présence d'amorphe dans les échantillons, mais les pics de diffraction, intenses et fins, indiquent des zones cristallines peu nombreuses mais bien organisées et de taille relativement importante. La formation de complexes de type V_{6I} avec le mélange aromatique, peut être expliquée par la grande proportion de propylène glycol dans le mélange (solvant de l'arôme) qui complexe également l'amylose en type V_{6I} ou peut être une affinité plus importante pour l'amylose des molécules complexant en type V_{6I} .

La précipitation d'amylose en présence d'hexanoate d'éthyle, d'acide hexanoïque ou de cis-3-hexenol conduit à la formation de complexes de type V_{6II} dont les diagrammes de diffraction sont présentés dans la figure 1.2 (Page 190). Ils présentent des pics caractéristiques à $2\theta = 7.3, 9.4, 12, 13.4, 16.5, 18, 20, 20.8, 21.2$ et 22.1° (Tableau 1.1, page 194).

Enfin, le type cristallin V_{6III} a été observé pour les précipités obtenus avec la δ -décalactone, la γ -décalactone, l'acide butanoïque, la dihydrocoumarine, le linalol et la menthone. Les diagrammes de DRX respectifs sont présentés sur la figure 1.3 et possèdent tous les pics caractéristiques du type V_{6III} ($2\theta = 6.9, 8.8, 9.6, 10.0, 11.1, 12.5, 13.0, 15.2, 17.0, 18.1, 19.2, 19.9, 24.5$ et 25.2°). Les distances réticulaires et les indexations correspondantes sont données dans le tableau 1.1 (Page 194).

Tous les précipités "cotonneux" obtenus avec l'acétate d'éthyle, le benzaldéhyde, le butyrate d'éthyle, le cinnamate de méthyle, le furanéol, le maltol, le sulfurool et la vanilline, montrent un diagramme de DRX caractéristique du type cristallin B (pics caractéristiques à $2\theta = 5.7$ et 17.2°), ce qui implique nécessairement une rétrogradation de l'amylose au cours de la pré-

Chapitre 1. Implication des complexes d'amylose dans la rétention des composés d'arôme

Complexes V _{6I}				Complexes V _{6II}				Complexes V _{6III}			
2θ (°)	d (nm)	h k l	d _{calc} (nm)	2θ (°)	d (nm)	h k l	d _{calc} (nm)	2θ (°)	d (nm)	h k l	d _{calc} (nm)
7.4	1.190	0 2 0	1.185	7.3	1.208	2 1 0	1.217	6.9	1.278	2 1 0	1.273
		1 1 0	1.183	9.4	0.943	2 2 0	0.952	8.8	1.004	2 2 0	1.017
12.9	0.686	1 3 0	0.684	12.0	0.739	2 3 0	0.742	9.6	0.920	1 3 0	0.923
19.8	0.449	2 4 0	0.448			1 1 1	0.738	10.0	0.884	3 1 0	0.897
22.4	0.397	0 1 2	0.397	13.4	0.658	0 4 0	0.663	11.1	0.796	0 0 1	0.800
						3 2 0	0.792			3 2 0	0.792
				16.5	0.536	3 4 0	0.537	12.5	0.710	1 4 0	0.709
				18.0	0.493	3 3 1	0.497	13.0	0.683	1 2 1	0.681
				20.0	0.444	3 4 1	0.445	15.2	0.580	3 4 0	0.578
				20.8	0.427	5 2 1	0.428	17.0	0.522	4 1 1	0.521
				21.2	0.418	4 5 0	0.419	17.7	0.500	4 2 1	0.498
				22.1	0.402	5 3 1	0.402	18.1	0.489	5 3 0	0.489
								19.2	0.462	5 0 1	0.462
								19.9	0.446	5 4 0	0.447
								24.5	0.362	5 5 1	0.363
								25.2	0.353	0 4 2	0.351

TABLEAU 1.1 – Correspondance entre les angles de diffraction 2θ et les distances réticulaires d (λ_{CuKα1} = 0.15405 nm) pour les complexes de type V_{6I} (ac. décanoïque), V_{6II} (ac. hexanoïque) et v_{6III} (δ-décalactone).

Pas de complexation	Complexes V _{6I}	Complexes V _{6II}	Complexes V _{6III}
acétate d'éthyle	acide décanoïque	acide hexanoïque	acide butanoïque
benzaldéhyde	propylène glycol	cis-3-hexnol	δ-décalactone
butanoate d'éthyle	arôme "viennoiserie"	hexanoate d'éthyle	γ-décalactone
cinnamate de méthyle			dihydrocoumarine
furanéol			linalol
maltol			menthone
sulfurol			
vanilline			

TABLEAU 1.2 – Tableau récapitulatif des complexes obtenus en fonction des complexants utilisés.

cipitation. La figure 1.4 (page 192) montre ainsi, les diagrammes de diffraction de précipités obtenus pour les mélanges amylose-(a) furanéol, (b) vanilline et (c) sulfurol. Les diagrammes des mélanges amylose-furanéol et amylose-sulfurol montrent une forte déviation de la ligne de base liée à la présence d'eau plus importante dans ces échantillons. Les diagrammes des précipités récupérés avec l'acétate d'éthyle, le benzaldéhyde, le butyrate d'éthyle, le cinnamate de méthyle et le maltol sont très similaires à celui obtenu en présence de furanéol.

La précipitation de l'amylose en présence des molécules de l'arôme "viennoiserie" a conduit, pour certaines d'entre elles, à l'obtention de complexes V_{6I} , V_{6II} ou V_{6III} (Tableau 1.2). Pour chacune de ces familles, l'intensité et la largeur à mi-hauteur des pics de diffraction dépend du type et de la quantité de molécules piégées dans l'amylose et varient fortement d'un diagramme de DRX à l'autre. Ils ne peuvent donc pas être comparés entre-eux. De plus, il est possible que l'intensité dépende également de la teneur en eau, comme c'est le cas pour l'amylose de type B (Buléon et al., 1982).

Pour la suite de ces travaux, un composé d'arôme a été sélectionné en fonction du type de complexe obtenu et considéré comme "représentatif" de sa famille de complexe. L'acide décanoïque, l'acide hexanoïque et la δ -décalactone ont été respectivement choisis pour les complexes de type V_{6I} , V_{6II} et V_{6III} . Cependant, certaines contraintes liées aux techniques et aux appareillages utilisés, ont parfois conduit à l'utilisation d'autres molécules.

1.2 Localisation et dosage des ligands dans les complexes obtenus

La figure 1.5 (page 196) présente schématiquement l'organisation d'un polymère semi-cristallin comme l'amylose. Les régions semi-cristallines sont constituées de lamelles cristallines et de lamelles amorphes. Ces régions semi-cristallines sont elles-mêmes séparées les unes des autres par des régions totalement amorphes. Lorsque l'amylose est complexée avec un ligand, celui-ci peut ainsi être localisé dans différents "compartiments" :

- adsorbé sur la surface des particules précipitées (ligand libre ou facilement éliminé)

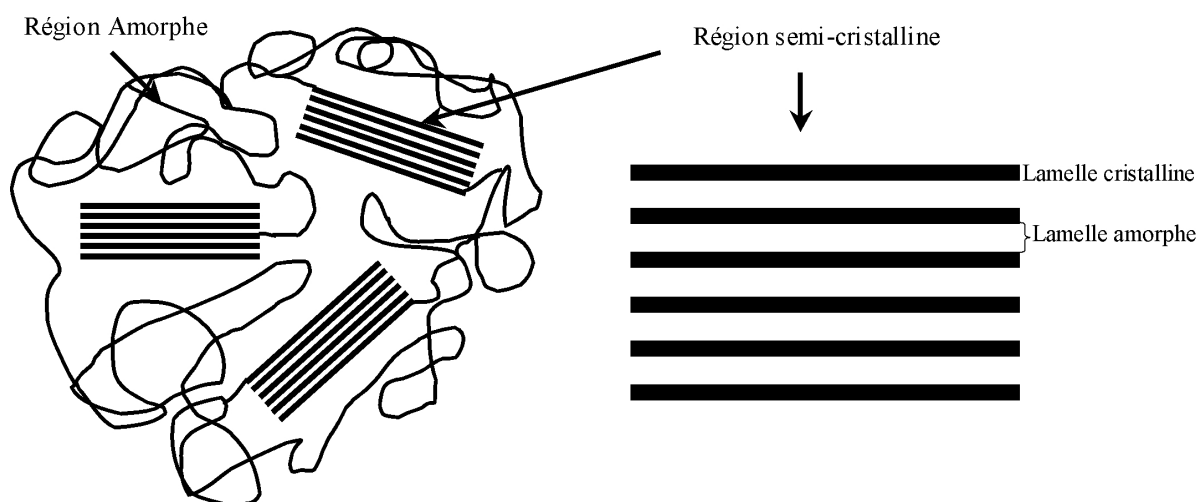


FIGURE 1.5 – Représentation schématique de l'organisation d'un polymère semi-cristallin comme l'amylose.

- retenu dans les régions amorphes
- piégé dans les régions semi-cristallines

Lorsque les molécules sont retenues dans les régions semi-cristallines, elles peuvent l'être :

- dans les lamelles amorphes
- dans les lamelles cristallines (dans ou entre les hélices)

Chacune de ces localisations possibles conduit probablement à des rétentions différentes.

En outre, certaines molécules peuvent induire la formation de l'hélice sans pour autant être présentes dans le complexe après précipitation, c'est par exemple le cas de certains alcools (Whittam et al., 1989) ou de l'acide caprilique (Godet, 1994). L'utilisation conjointe de la diffraction des rayons X, de la microscopie électronique et de la spectroscopie infrarouge sur des complexes après lavages dans des mélanges éthanol-eau et/ou des hydrolyses acide ménagées a permis de définir la contribution de chacun ces "compartiments" dans la rétention de l'acide décanoïque, l'acide hexanoïque et la δ -décalactone par l'amylose.

1.2.1 Morphologie des agrégats de complexes d'amylose

Lors de la préparation des complexes pour l'observation en microscopie électronique, les complexes, agglomérés, ont été plus ou moins finement broyés pour produire des petits fragments de taille variable. Les clichés de la figure 1.6 (page 198) montrent des vues de microscopie électronique des trois types de cristaux d'amylose V_{6I} , V_{6II} et V_{6III} . les clichés A et B ($\times 20\ 000$) sont issus de complexes amylose-acide hexanoïque et amylose- δ -décalactone. Ces clichés correspondent aux plus gros fragments de complexes. Ils montrent une certaine hétérogénéité alternant des zones claires et des zones plus sombres. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la différence de contraste observée sur ces coupes. La préparation des échantillons ayant nécessité la diffusion d'un marqueur à base d'argent (donnant lieu habituellement à un fort contraste), il est possible que cette diffusion n'ait pas eu lieu de façon isotropique mais se soit préférentiellement accumulée dans certaines directions. En conséquence, les zones de contraste plus foncé des clichés A et B (indiquées par d+) seraient uniquement dues à un effet diffusif.

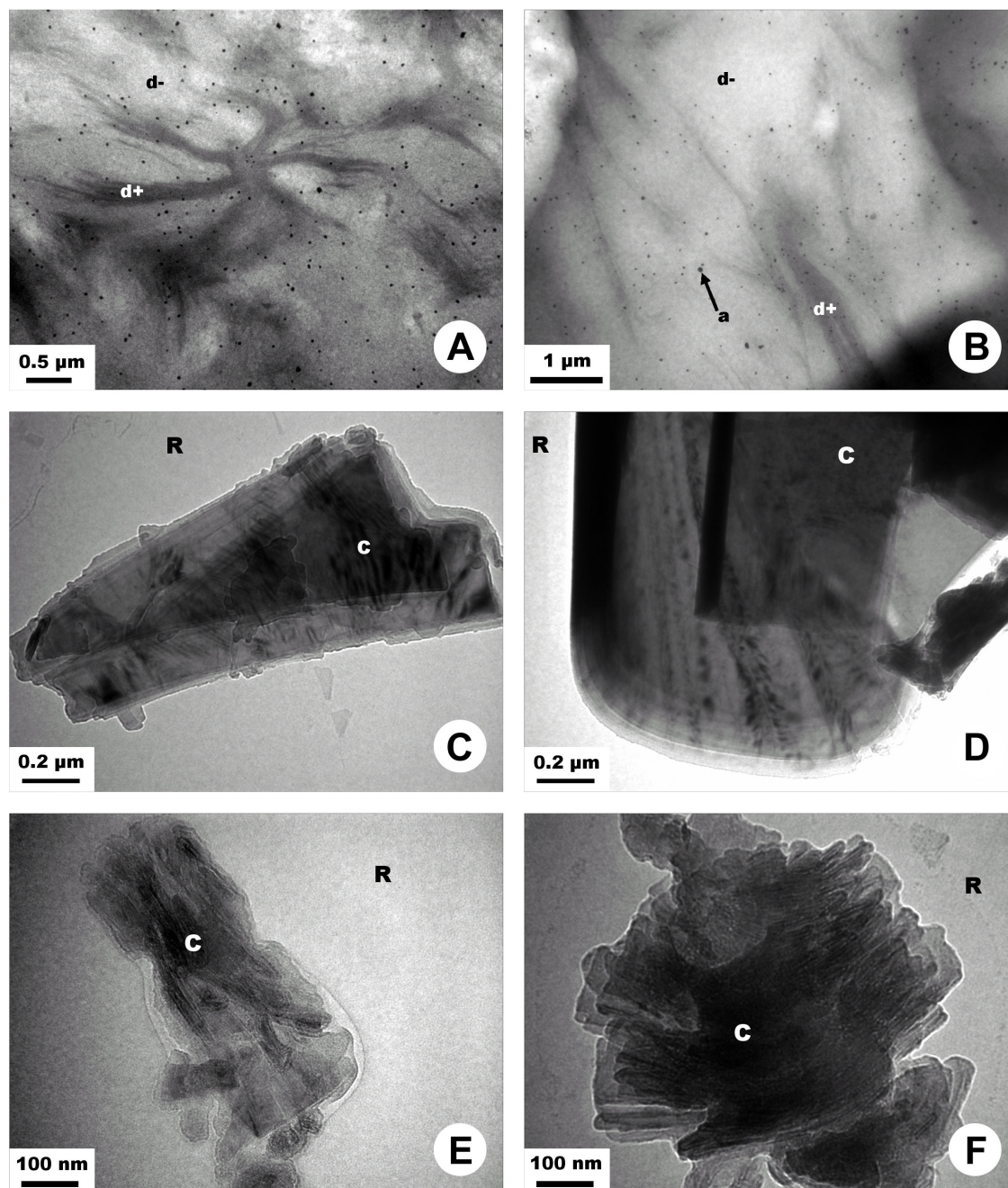


FIGURE 1.6 – Morphologie des agrégats et cristaux de complexe d'amylose.
Agrandissement $\times 20\ 000$ **A.** amylose-acide hexanoïque **B.** amylose- δ -décalactone.
Agrandissement $\times 80\ 000$ **C.** amylose-acide décanoïque **D.** amylose- δ -décalactone.
Agrandissement $\times 150\ 000$ **E.** amylose-acide décanoïque **F.** amylose-acide hexanoïque.
R et **C** indiquent respectivement la résine d'inclusion et les cristaux.
d+ et **d-** représentent des zones plus ou moins denses.
a correspond à un artéfact de coloration lié au marquage.

Une seconde possibilité consisterait à assimiler les zones les plus claires (indiquées sur les clichés par d-) à des domaines de densité plus faible présents naturellement dans les cristaux et inversement les zones plus sombres à des densités plus importantes. Cependant, des agrandissements réalisés sur les parties denses (non présentés) démontrent qu'elles ne correspondent pas systématiquement à des zones cristallines.

Une troisième hypothèse, précédemment évoquée par Godet (1994), assimilerait les zones les plus claires à des "lacunes" issues de l'écartement entre plusieurs plaquettes cristallines, correspondant à des plans de croissance superposés.

A plus fort grossissement ($80\ 000 \times$ (clichés C et D) et $150\ 000 \times$ (clichés E et F)), il est possible d'observer de petits fragments de cristaux (notés C) inclus dans la résine (R). Ces fragments ont une taille variable d'environ 300 nm à 2-3 μm et montrent une morphologie proche indépendamment du type de complexes V_{6I} , V_{6II} et V_{6III} . Ils se présentent sous la forme de feuillets cristallins superposés, particulièrement visibles sur les clichés C (amylose-acide décanoïque), D (amylose- δ -décalactone) et F (amylose-acide hexanoïque). Les clichés D et F sont particulièrement intéressants dans le sens où la morphologie observée correspond à celle attendue pour un monocristal de type V_{6III} obtenu avec des composés d'arôme (Nuessli et al., 2003), c'est à dire des languettes allongées (cliché D). Les agrandissements utilisés pour ces clichés ne permettent cependant pas de mettre en évidence les lamelles amorphes et cristallines des complexes amylose-composé d'arôme.

1.2.2 Nature semi-cristalline des complexes amylose-composé d'arôme

Les structures semi-cristallines des complexes amylose-acide décanoïque, amylose-acide hexanoïque et amylose- δ -décalactone ont été mises en évidence par MET après marquage au PATAg. En effet, la vitesse de diffusion des marqueurs dans les couches cristallines est inférieure à la vitesse de diffusion dans les couches amorphes. Ce principe permet de créer un contraste qui révèle ainsi l'organisation lamellaire sur des clichés à plus fort agrandissement ($\times 250\ 000$ à $\times 500\ 000$).

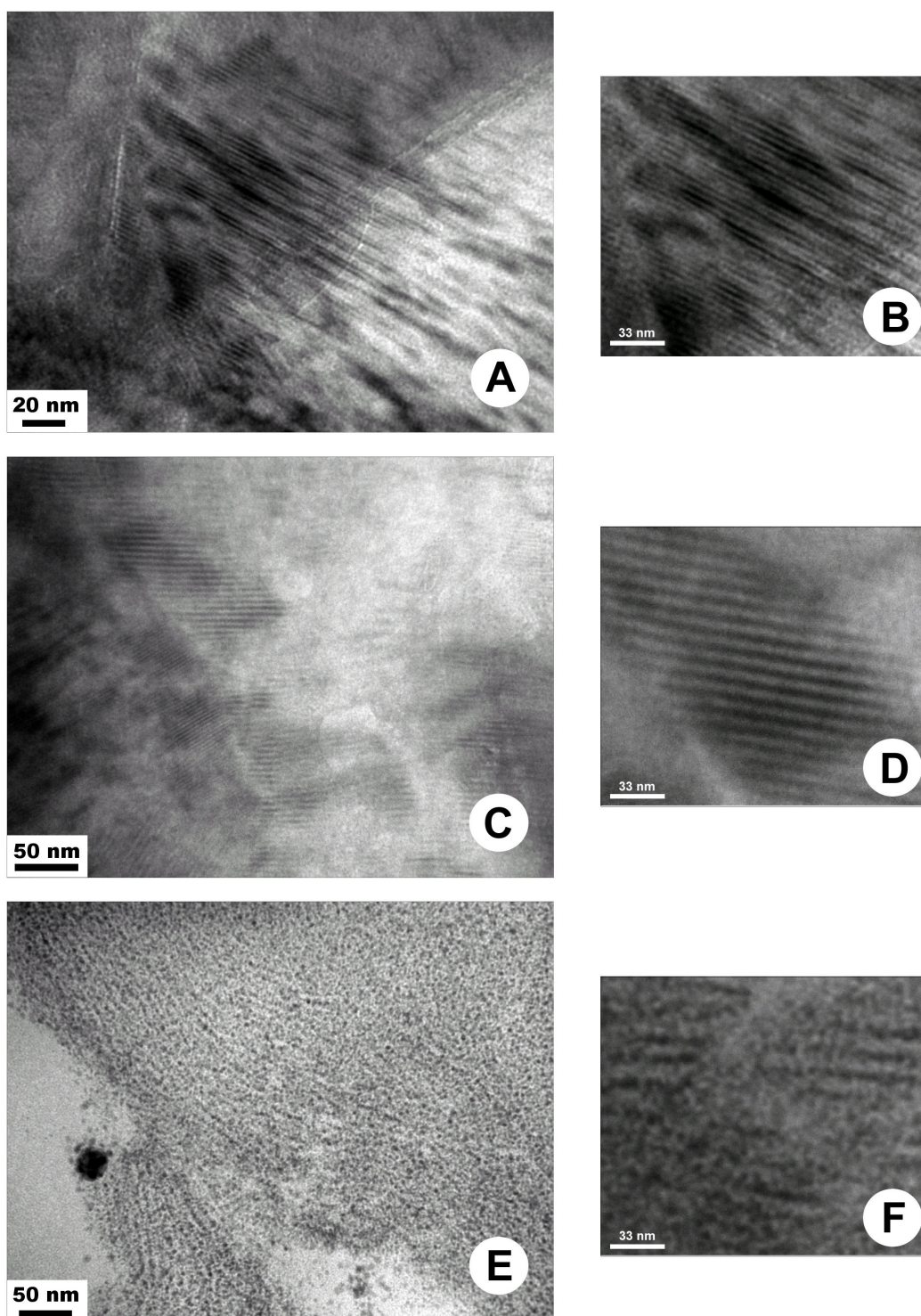


FIGURE 1.7 – Structure lamellaire semi-cristalline des cristaux d'amylose complexée en présence de :
A et **B** Acide décanoïque (Agrandissement $\times 500\ 000$ et $\times 600\ 000$).
C et **D** Acide hexanoïque (Agrandissement $\times 300\ 000$ et $\times 600\ 000$).
E et **F** δ -décalactone (Agrandissement $\times 250\ 000$ et $\times 600\ 000$).

La figure 1.7 présente des clichés de MET des complexes avec l'acide décanoïque (A et B), l'acide hexanoïque (C et D) et la δ -décylactone (E et F). La fine striation visible sur les clichés A, C et E correspond à l'alternance des lamelles amorphes et cristallines. Celle-ci est bien régulière dans le cas des complexes amylose-acide décanoïque et amylose-acide hexanoïque tandis qu'elle est moins organisée mais néanmoins visible pour les complexes avec la δ -décylactone. Les clichés B, D et F sont des images de surfaces égales, à plus fort grossissement (agrandissement $\times 600\,000$). Les épaisseurs des couches amorphes et cristallines ont ainsi pu être mesurées précisément à partir de profils en intensité et sont données dans le tableau 1.3.

Complexant	Type Cristallin	Amorphe + Cristallin	Cristallin	Amorphe
Acide décanoïque	V_{6I}	3 nm	1.6 nm	1.4 nm
Acide hexanoïque	V_{6II}	5.6 nm	4 nm	1.6 nm
δ -décylactone	V_{6III}	10.2 nm	5.1 nm	5.1 nm

TABLEAU 1.3 – Épaisseurs moyennes des couches amorphes et cristallines mesurée pour les trois types de complexes V_{6I} , V_{6II} et V_{6III} .

L'épaisseur des lamelles cristallines est respectivement de 1.6 nm, 4 nm et 5.1 nm pour les complexes avec l'acide décanoïque, l'acide hexanoïque et la δ -décylactone. En considérant une hélice d'amylose à 6 unités glucosyl par tour et un pas de 0.8 nm, cela correspond respectivement à 2, 5 et 6 tours d'hélice par lamelle cristalline. Ces dimensions sont proches des épaisseurs mesurées sur des complexes amylose-acides gras, qui varient entre 1.6 et 4.6 nm en fonction du \overline{DP} de l'amylose et de la longueur de la chaîne aliphatique (Godet, 1994). En revanche, elles sont inférieures à celles mesurées par Jane et Robyt (1984) pour des complexes amylose-alcools (10 nm) et par (Galloway et al., 1989) pour des complexes amylose-monoglycérides (14.5 nm).

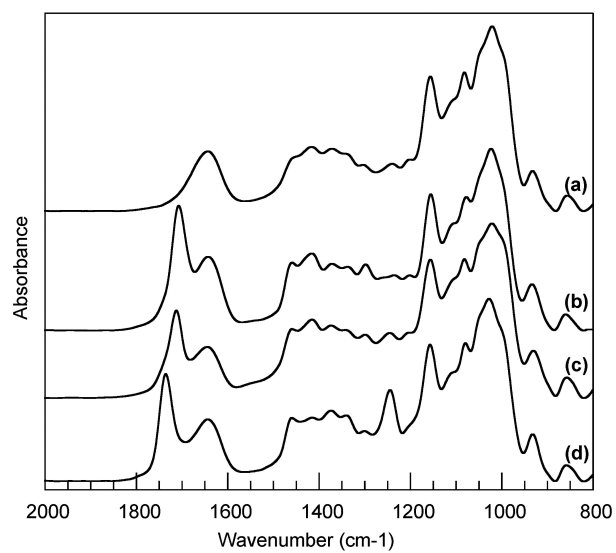


FIGURE 1.8 – Spectres infrarouge (a) d'amylose et de complexes avec (b) l'acide décanoïque, (c) l'acide hexanoïque et (d) la δ -decalactone.

1.2.3 Dosage des ligands piégés par spectroscopie infrarouge

1.2.3.1 Mise en évidence des ligands complexés et calibration des dosages

La présence de ligands dans les complexes peut être mise en évidence par spectroscopie infrarouge comme illustré sur la figure 1.8. Le spectre l'amylose seule (Figure 1.8(a)) montre une bande d'absorption caractéristique de la liaison osidique à 1155 cm^{-1} . Une bande d'absorption de l'eau est également visible à 1640 cm^{-1} . Les spectres (b), (c) et (d) correspondent respectivement aux complexes avec l'acide décanoïque, l'acide hexanoïque et la δ -déalactone. La bande à 1706 cm^{-1} présente sur les spectres (b) et (c) est due à la liaison carbonyle des acides décanoïque et hexanoïque tandis que cette bande est décalée à 1737 cm^{-1} pour la fonction carbonyle de la δ -déalactone (d). Ce dernier spectre présente également une bande d'absorption supplémentaire à 1244 cm^{-1} correspondant à la liaison C-O de la lactone.

Les ACP générées à partir des spectres infrarouges des mélanges standards ont permis de calculer des équations de prédiction pour le dosage des composés d'arôme piégés (exemple de l'acide décanoïque donné sur la figure 1.9 (page 204), les résultats correspondant aux complexes amylose-acide hexanoïque et amylose- δ -déalactone sont donnés en annexe 1 et 2). Pour chacune des trois ACP, les mélanges standards sont clairement répartis le long de l'axe de la première composante principale en fonction de la quantité de ligands (Figure 1.9A). Cette première composante principale explique respectivement 91 %, 95 % et 91 % de la variance totale pour les complexes avec l'acide décanoïque, l'acide hexanoïque et la δ -déalactone. Les profils spectraux des premières composantes principales montrent qu'elles sont essentiellement reliées à la bande d'absorption de la fonction carbonyle des ligands (1706 et 1737 cm^{-1}) (Figure 1.9B). La deuxième composante principale est essentiellement dépendante de la quantité d'eau présente dans l'échantillon (bande de l'eau à 1640 cm^{-1}) et explique 6 %, 4 % et 8 % de la variance totale pour les complexes avec l'acide décanoïque, l'acide hexanoïque et la δ -déalactone.

Une relation linéaire entre la quantité de ligands et la valeur de la première composante principale a pu être établie. Les équations de prédiction et les écart-types ont été déterminés pour les trois types de complexe (Figure 1.9C) :

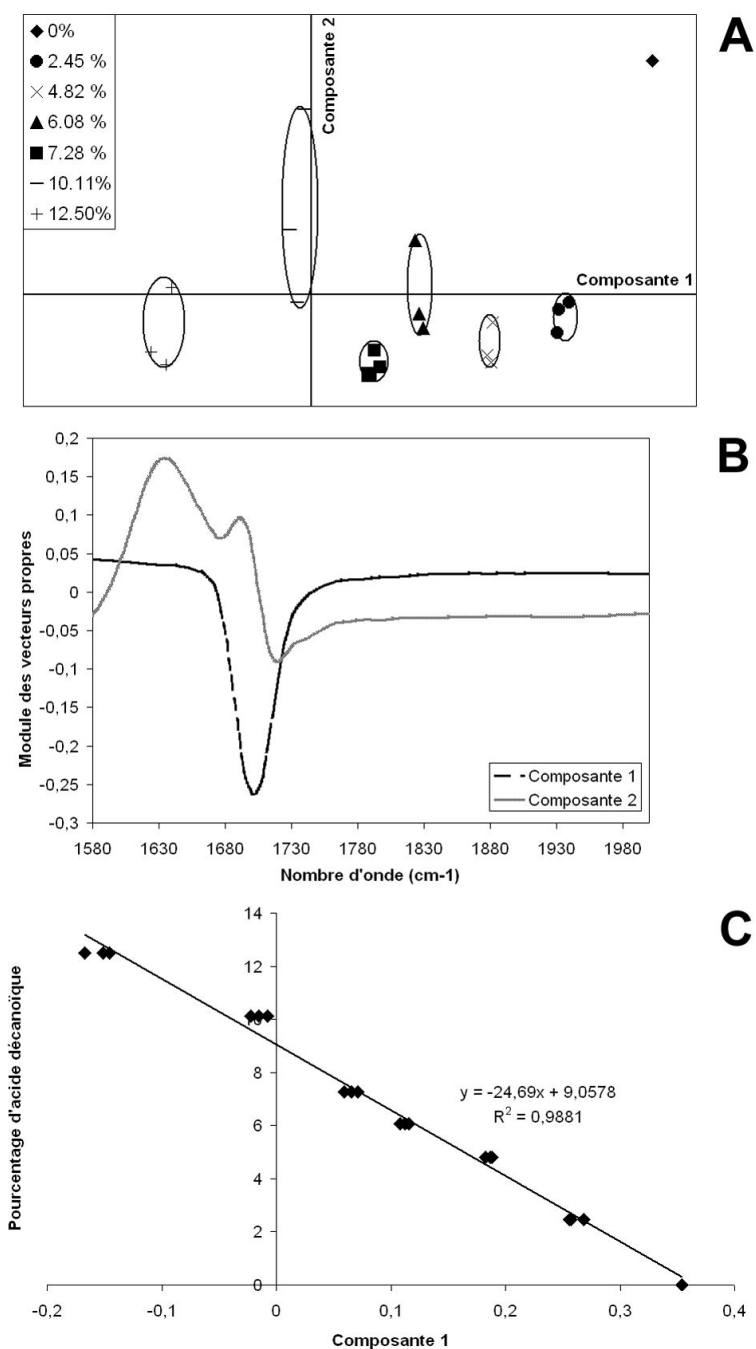


FIGURE 1.9 – Principe du dosage de l'acide décanoïque dans les complexes. (A) Carte ACP obtenue à partir de la gamme étalon, (B) Profils spectraux des composantes 1 et 2 et (C) droite de régression et équation de prédiction pour le dosage.

- avec l'acide décanoïque : $y = -24.69x + 9.0578$ $r^2 = 0.9881$ $\sigma = 0.7\%$
- avec l'acide hexanoïque : $y = 27.747x + 6.201$ $r^2 = 0.9821$ $\sigma = 0.6\%$
- avec la δ -décalactone : $y = 16.626x + 6.8921$ $r^2 = 0.9619$ $\sigma = 0.7\%$

y correspond aux pourcentages massiques des ligands et x à la valeur des premières composantes principales.

1.2.3.2 Vers la quantification des composés d'arôme piégés

Les mesures effectuées après conditionnement des complexes précipités ont montré de grandes variations dans les mesures en fonction du type de ligands (en moyenne, 11 % (m/m) pour l'acide hexanoïque, 16 à 17 % pour la δ -décalactone et 23 % pour l'acide décanoïque) mais aussi, pour un même ligand, entre plusieurs échantillons. Cette grande variabilité est due à une proportion importante de composé d'arôme qui n'est pas complexé mais simplement adsorbé sur le précipité. En effet, le diagramme de DRX de complexes amylose-acide décanoïque (Figure 1.10, page 206) présente les pics caractéristiques de la structure de type V_{6I} mais aussi des pics de diffraction (3.2° , 11.6° , 18.5° , 21.6° et 28.9° , $\lambda_{CuK\alpha 1} = 0.15405$ nm) supplémentaires qui correspondent à l'acide décanoïque cristallisé seul. En revanche, les diagrammes de DRX des complexes précipités à partir d'acide hexanoïque et de δ -décalactone montrent seulement les pics caractéristiques des types V_{6II} ou V_{6III} car ces deux ligands sont liquides à température ambiante. Il est cependant probable que ces complexes contiennent également une grande proportion de ligands libres adsorbés.

Les différents lavages mis en oeuvre ont permis d'éliminer les composés d'arôme non complexés et d'approcher la quantité de ligands piégée dans chacun des trois types de complexes. L'optimisation des lavages a consisté à trouver le meilleur compromis pour éliminer les ligands libres sans entraîner de modification (ou à défaut, le moins possible) du type cristallin. La figure 1.11 (page 206) présente les diagrammes de diffraction de complexes amylose-acide décanoïque obtenus avant et après lavage dans le mélange éthanol/eau (50/50) avec agitation pendant 5 minutes (Et50pc5). L'acide décanoïque libre est bien éliminé comme le montre la disparition des pics de diffraction à 3.2° , 11.6° , 18.5° , 21.6° et 28.9° (Figure 1.11b). En re-

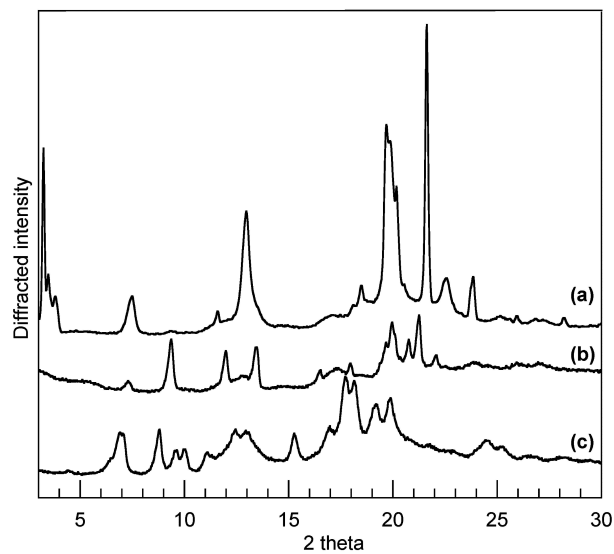


FIGURE 1.10 – Diagrammes DRX de complexes obtenus avec (a) l'acide décanoïque, (b) l'acide hexanoïque et (c) la δ -decalactone.

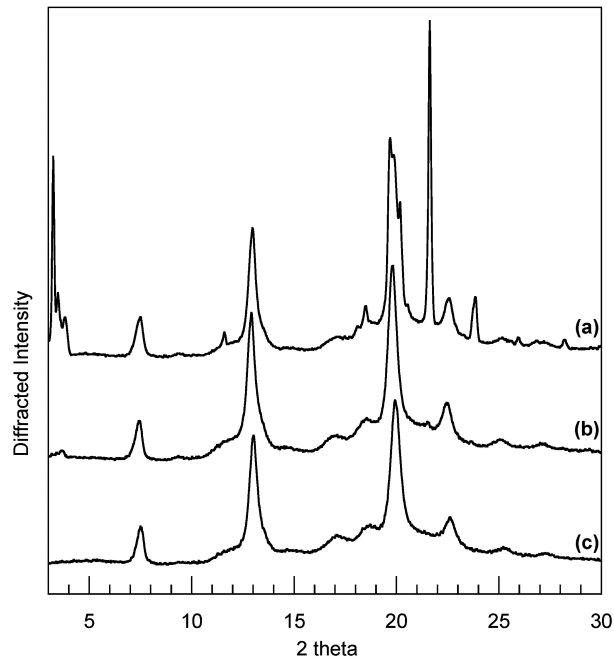


FIGURE 1.11 – Influence des lavages sur les diagrammes de DRX de complexes amylose-acide décanoïque. (a) aucun lavage, (b) un lavage et (c) deux lavages.

vanche, la cristallinité de l'échantillon semble diminuer faiblement après le deuxième lavage (Figure 1.11c), indiquant probablement une légère libération d'acide décanoïque. Les mêmes lavages appliqués aux complexes obtenus avec l'acide hexanoïque conduisent à une transition polymorphique du type V_{6II} vers le type V_{6I} , beaucoup plus nette après le deuxième lavage. Dans le cas du complexe V_{6III} , une transition partielle vers le type V_{6II} se produit au cours du premier lavage puis vers le type V_{6I} après le deuxième. Par conséquent, les échantillons ayant subi un seul lavage semblent être les plus pertinents tant au niveau de l'élimination des ligands libres que de la préservation de la structure des complexes.

La quantité de ligands dosée après chaque étape de lavage varie en fonction du type cristallin et du ligand. Elle est, après le premier lavage, de $7.1 \pm 1.4 \%$, $8.2 \pm 1.2 \%$ et $8.6 \pm 1.4 \%$ pour l'acide décanoïque, l'acide hexanoïque et la δ -décylactone (Tableau 1.4). Avec un \overline{DP} moyen de l'amylose de 840, cela correspond à des rapports molaires $n_{ligand}/n_{glucose}$ de 0.072, 0.125 et 0.091. Les quantités dosées après le deuxième lavage sont plus faibles et respectivement de $5.6 \pm 1.4 \%$, $5.9 \pm 1.2 \%$ et $7.4 \pm 1.4 \%$, ce qui confirme le fait que les changements structuraux observés soient liés à la libération de composés d'arôme des complexes.

Nombre de lavages	Complexes V_{6I}	Complexes V_{6II}	Complexes V_{6III}
	acide décanoïque	acide hexanoïque	δ -décylactone
0	$23 \pm 1.4 \%$	$11 \pm 1.2 \%$	$16-17 \pm 1.4 \%$
1	$7.1 \pm 1.4 \%$	$8.2 \pm 1.2 \%$	$8.6 \pm 1.4 \%$
2	$5.6 \pm 1.4 \%$	$5.9 \pm 1.2 \%$	$7.4 \pm 1.4 \%$

TABLEAU 1.4 – Influence des lavages sur le dosage de composés d'arôme dans les complexes.

Ces résultats sont en accord avec la littérature existante. En effet, des dosages effectués par RMN sur des complexes en solution avec des molécules variées ont abouti à des valeurs comprises entre 3.6% et 7.4% en fonction des molécules utilisées. Les rapports $n_{ligand}/n_{glucose}$ correspondant varient de 0.040 avec des complexes amylose-(E ; E)-2,4-decadienal à 0.122 pour des complexes amylose-hexanal (Wulff et al., 2005). La quantité d'acide décanoïque (V_{6I}) dosée est inférieure à celle de l'acide hexanoïque (V_{6II}) ou de la δ -décylactone (V_{6III}), mais

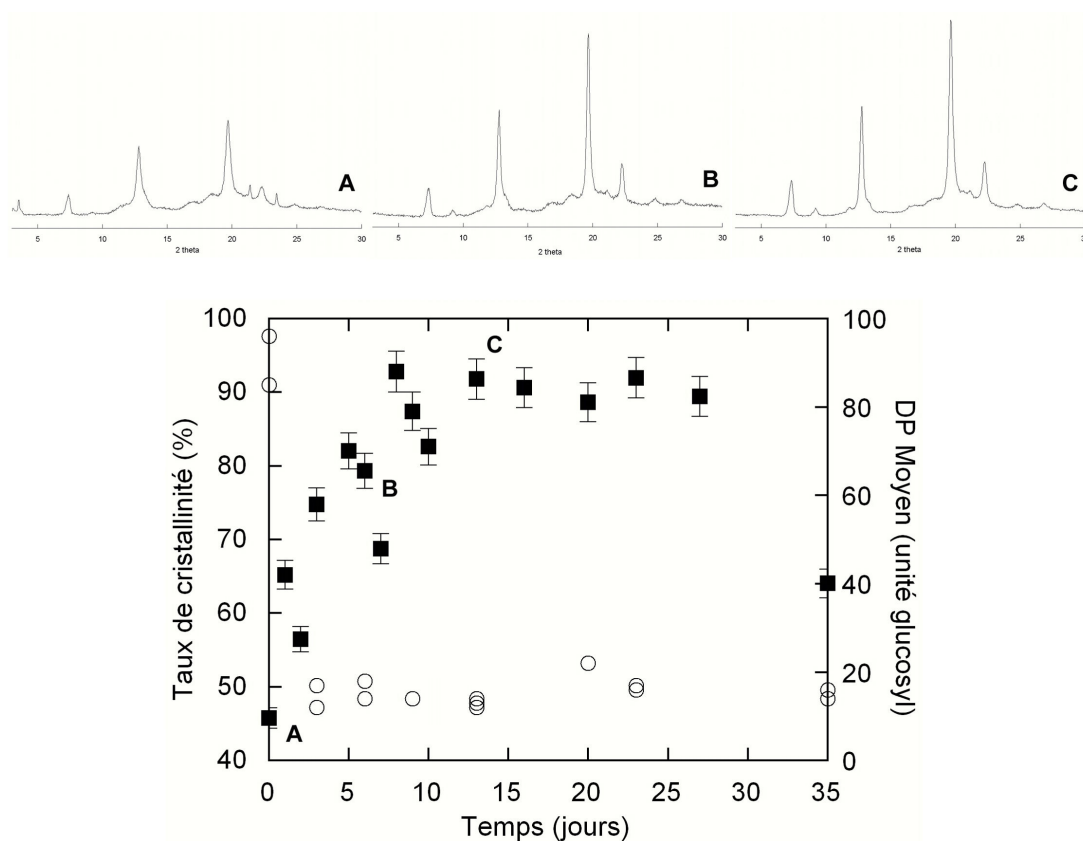


FIGURE 1.12 – Evolution du taux de cristallinité de complexes amylose-acide décanoïque (■) et du degré de polymérisation moyen de l'amylose (○) au cours de l'hydrolyse acide ménagée.

correspond aux ligands piégés dans l'amorphe et uniquement dans les hélices. Ces derniers résultats sont similaires à ceux obtenus pour des complexes amylose-acide laurique (5.5 %, $n_{\text{ligand}}/n_{\text{glucose}} = 0.047$) et amylose-acide myristique (6.8 %, $n_{\text{ligand}}/n_{\text{glucose}} = 0.049$) (Fanta et al., 1999). La quantité plus importante de ligands dosée dans le cas des complexes avec l'acide hexanoïque et la δ -décylactone peut être expliquée par les dimensions supérieures des mailles cristallines, l'espace inter-hélice étant suffisamment important pour accueillir une partie des molécules piégées. Ces résultats ne permettent cependant pas d'évaluer les participations respectives des zones amorphes et cristallines dans la rétention des composés d'arôme par l'amylose.

1.2.4 Dosage des ligands dans les zones cristallines

Afin de déterminer la quantité de ligands piégés spécifiquement dans les lamelles cristallines, des hydrolyses acides ménagées ont été réalisées sur les trois types de complexes. En effet, en milieu acide dilué, les régions amorphes sont dégradées plus rapidement que les zones semi-cristallines (Robin, 1976). L'utilisation de la spectroscopie infrarouge (FT-IR) et de la diffraction des rayons X a permis de quantifier les composés d'arôme présents et de suivre les variations de cristallinité au cours du temps.

1.2.4.1 Cas de l'acide décanoïque et des complexes V_{6I}

L'hydrolyse de complexes amylose-acide décanoïque, réalisée sur des échantillons non lavés, est caractérisée par trois phases successives.

La première phase correspond à une hydrolyse rapide des régions amorphes les plus sensibles (Fraction Facilement Hydrolysable, FFH). Elle est illustrée par une augmentation importante du taux de cristallinité (de 46 ± 5.6 % à 90 ± 5.6 %) de l'échantillon pendant les six ou sept premiers jours (Figure 1.12 ■). La grande variabilité des mesures de cristallinité lors des premiers jours d'hydrolyse est due à l'hétérogénéité de la poudre semi-cristalline (particules plus ou moins grosses). Les diagrammes de diffraction 1.12A, 1.12B et 1.12C correspondent aux complexes amylose-acide décanoïque avant hydrolyse (A), après six jours (B) et 13 jours

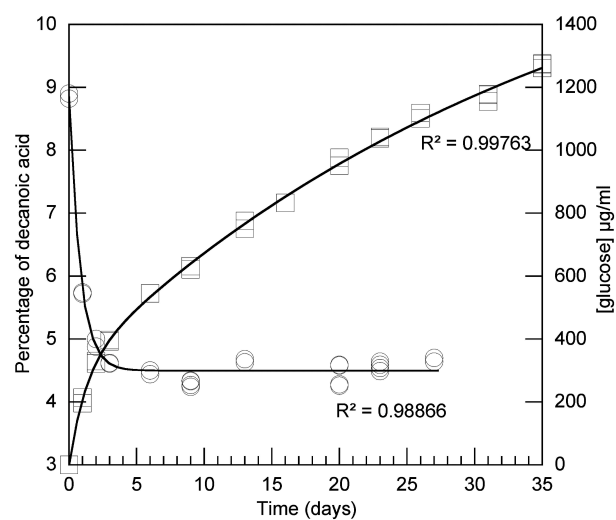


FIGURE 1.13 – Evolution du taux de glucose dans le surnageant (□) et de la quantité d'acide décanoïque (○) dans le complexe en fonction du temps d'hydrolyse.

d'hydrolyse (C). Le diagramme A montre qu'une petite quantité d'acide décanoïque libre est présente dans l'échantillon (pics peu intenses à 3.2° , 21.6° et 23.4° , $\lambda_{CuK\alpha 1} = 0.15405$ nm). L'augmentation de cristallinité s'accompagne d'une diminution rapide du \overline{DP} de l'amylose jusqu'à atteindre 16 unités glucosyl par fragment d'amylose (Figure 1.12 ○). Cette première phase d'hydrolyse rapide est également mise en évidence par la détermination de la quantité de glucose libéré dans le surnageant au cours du temps (Figure 1.13 □)

La phase suivante est caractérisée par une hydrolyse concomitante des lamelles amorphes et cristallines des régions semi-cristallines. Durant cette période la vitesse d'hydrolyse est fortement ralentie (Figure 1.13 □) et le taux de cristallinité, comme le \overline{DP} (Figure 1.12), n'évoluent plus. L'affinement des pics de diffraction des diagrammes B et C par rapport au diagramme A indique également une augmentation de la taille des cristallites, qui peut être expliquée par une réorganisation des chaînes dans les lamelles cristallines au cours de l'hydrolyse ou par une hydrolyse plus rapide des plus petits cristaux et de ceux ayant des défauts. Le \overline{DP} de 16 unités glucosyl, correspond à environ 2.6 tours d'hélice par fragment d'amylose, ce qui est en accord avec les épaisseurs de lamelles mesurées en microscopie électronique.

La troisième phase correspond à la dégradation des dernières zones cristallines les plus résistantes à l'hydrolyse et est mise en évidence par une diminution du taux de cristallinité après le vingt septième jour d'hydrolyse.

La quantité d'acide décanoïque mesurée dans le complexe (Figure 1.13 ○) diminue rapidement au cours de l'hydrolyse, de $8.9 \pm 1.4 \%$ à $4.5 \pm 1.4 \%$ pour atteindre un plateau qui se maintient ensuite jusqu'au vingt-septième jour d'hydrolyse. Cette diminution très rapide coïncide parfaitement avec la dégradation de la fraction facilement hydrolysable. Après quatre ou cinq jours, la quantité d'acide décanoïque ne change plus alors que la cristallinité augmente toujours, ceci montre bien que la totalité des ligands piégés dans les lamelles amorphes a été libérée au cours de ces quatre jours. Durant les 20 jours suivants, la quantité de ligands et le taux de cristallinité restent inchangés, malgré l'hydrolyse concomitante des zones amorphes restantes et des zones cristallines les moins résistantes. Cela signifie donc que le plateau à 4.5% correspond à ce qui est strictement piégé à l'intérieur des hélices d'amylose dans les zones cristallines les

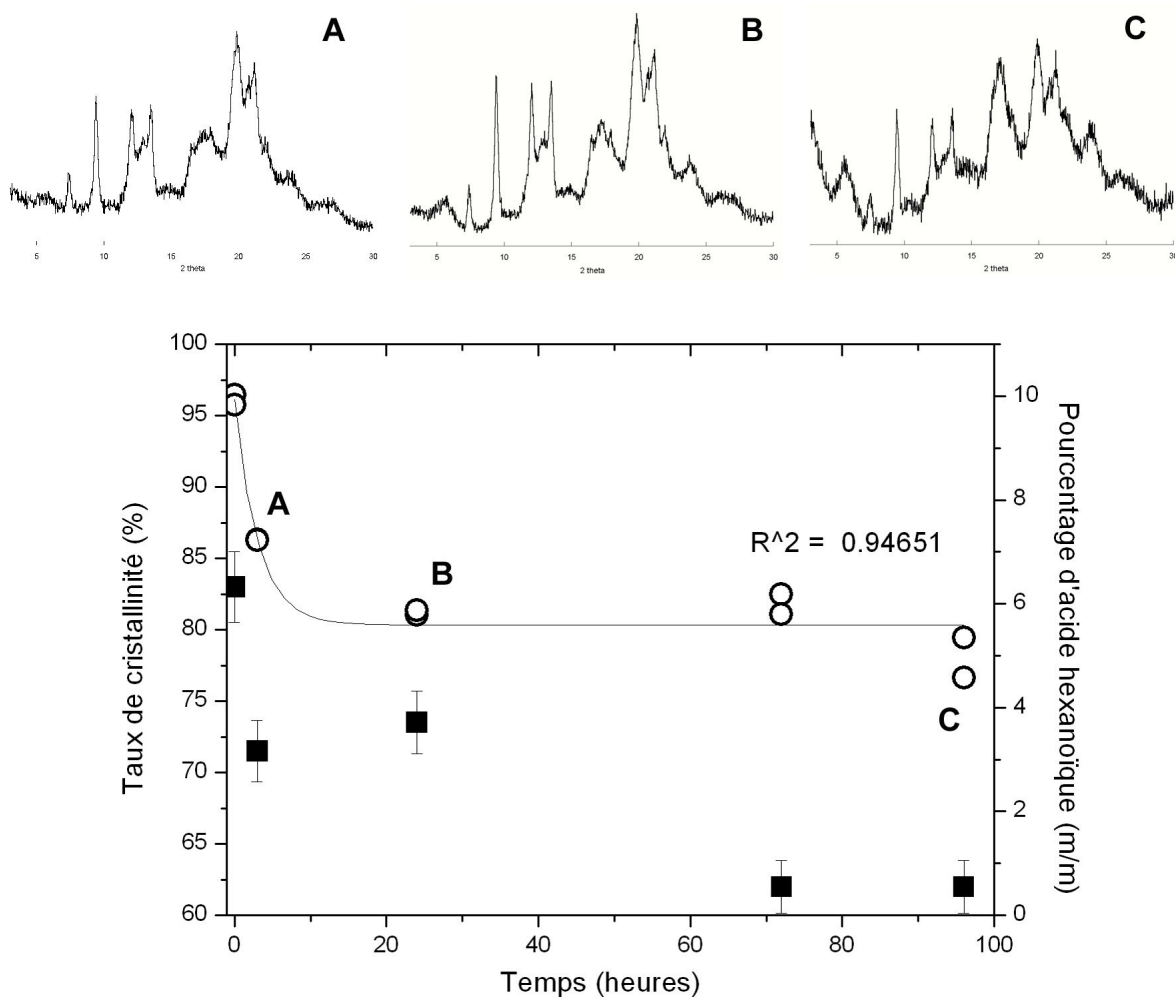


FIGURE 1.14 – Evolution du taux de cristallinité de complexes amylose-acide hexanoïque (■) et de la quantité d'acide hexanoïque (○) au cours de l'hydrolyse acide ménagée.

plus résistantes aux hydrolyses.

1.2.4.2 Cas des complexes amylose-acide hexanoïque de type V_{6II}

L'hydrolyse de complexes amylose-acide hexanoïque dans des conditions identiques à celles utilisées pour les complexes amylose-acide décanoïque (HCl 2.2 mol/L, 35 °C) conduit à une transition polymorphique rapide (moins de quatre heures) du type V_{6II} vers le type cristallin B. Des conditions d'hydrolyse plus douces (HCl 1 mol/l, 25 °C), ont permis de retarder cette transition polymorphique vers le type cristallin B et d'approcher la quantité de ligands piégés dans les zones cristallines. Les diagrammes de diffraction 1.14A (après trois heures d'hydrolyse), 1.14B (après 24 heures) et 1.14C (après 72 heures) illustrent cette rétrogradation progressive. Le taux de cristallinité diminue au cours des 36 premières heures puis semble atteindre un plateau vers 62 % (figure 1.14 ■).

La quantité d'acide hexanoïque, mesurée parallèlement (Figure 1.14 ○), diminue de $9.9 \pm 1.2 \%$ à $5.6 \pm 1.2 \%$ et semble tendre vers un plateau au-delà de 24 heures d'hydrolyse. Par conséquent, la dernière valeur mesurée par infrarouge, avant la transition polymorphique vers le type B serait proche de la quantité d'acide hexanoïque piégée dans les lamelles cristallines. Cette transition est illustrée sur le diagramme de diffraction 1.14B qui montre nettement un pic à 5.7° caractéristique de l'amylose B, et absent sur le diagramme 1.14A. Au-delà de 72 heures le type B est majoritaire par rapport au type V_{6II} (Figure 1.14C). La transition polymorphique vers le type B est probablement due à une réorganisation des fragments d'amylose libérés lors de l'hydrolyse des régions amorphes stabilisant l'empilement V_{6II} . Cela montre que les interactions entre l'amylose et l'acide hexanoïque ne sont pas suffisantes pour stabiliser l'hélice.

Ainsi, contrairement au cas de l'acide décanoïque, l'acide hexanoïque n'est probablement pas présent à l'intérieur de la cavité hélicoïdale.

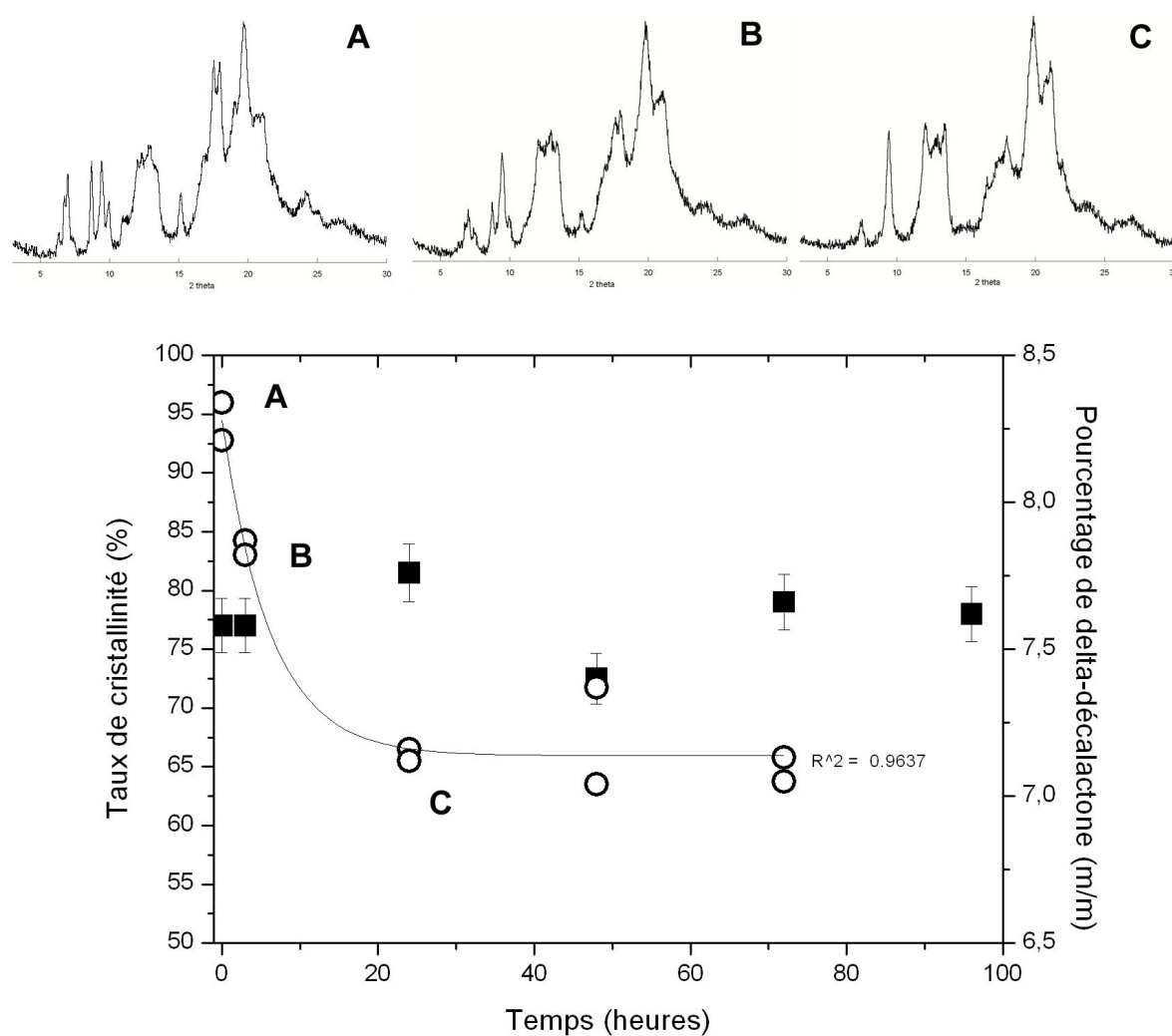


FIGURE 1.15 – Evolution du taux de cristallinité de complexes amylose- δ -décalactone (■) et de la quantité de δ -décalactone (○) au cours de l'hydrolyse acide ménagée.

1.2.4.3 Cas des complexes amylose- δ -déalactone de type V_{6III}

L'hydrolyse des complexes amylose- δ -déalactone a montré un comportement intermédiaire par rapport aux deux types précédents de complexes. En effet, au cours de l'hydrolyse, une rapide transition polymorphique du type V_{6III} vers le type V_{6II} a été observée. En revanche, aucune rétrogradation en type cristallin B ne s'est produite. Comme pour les complexes amylose-acide hexanoïque, l'hydrolyse a été réalisée dans les conditions normales (HCl 2.2 mol/l, 35 °C) et avec des conditions plus douces (HCl 1 mol/l, 25 °C) de façon à retarder la transition vers le type V_{6II} . Les diagrammes de diffraction réalisés avant l'hydrolyse (Figure 1.15A), après trois heures (Figure 1.15B) et après 24 heures d'hydrolyse (Figure 1.15C) illustrent cette transition qui se déroule quelles que soient les conditions utilisées et toujours après les premières vingt-quatre heures d'hydrolyse.

Le taux de cristallinité, proche de $78 \pm 6 \%$, ne semble pas être modifié au cours du temps (Figure 1.15). Ceci indique que les zones amorphes sont probablement hydrolysées à la même vitesse que les zones cristallines. Ce phénomène pourrait être expliqué par la taille plus importante de l'espace existant entre les hélices au sein de la maille cristalline. Les hélices seraient ainsi plus accessibles et l'empilement moins résistant que dans le cas du type V_{6I} , par exemple, où l'espace inter-hélice est réduit au minimum. Ces résultats semblent corroborés par les clichés de microscopie électronique qui montrent que la structure lamellaire des complexes amylose - δ -déalactone est moins organisée que pour les autres complexes.

Le pourcentage de δ -déalactone diminue dans le même temps de $8.3 \pm 1.4\%$ à $7.1 \pm 1.4 \%$ et atteint un plateau. La transition rapide en V_{6II} ne permet pas de conclure précisément sur la quantité de ligand piégé dans les zones cristallines de type V_{6III} . Cependant, plusieurs essais successifs ont permis d'encadrer cette mesure qui est comprise entre $7.8 \pm 1.4 \%$ et $7.1 \pm 1.4 \%$ (Moyenne 7.4%) juste avant que la transition V_{6III}/V_{6II} ne se produise.

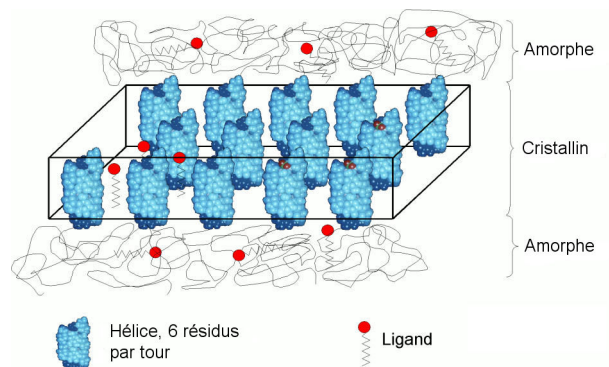


FIGURE 1.16 – Représentation schématique de complexes d'amylose et localisation possible des ligands dans l'amorphe, à l'intérieur des hélices ou dans l'espace inter-hélice.

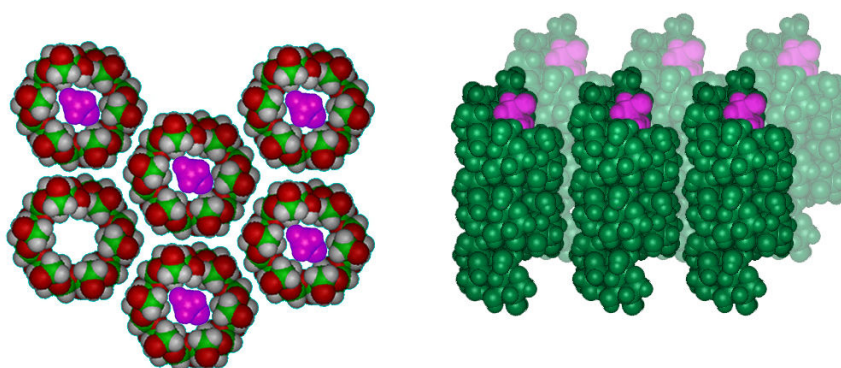


FIGURE 1.17 – Représentation schématique de lamelles cristallines de complexes amylose-acide décanoïque et localisation de l'acide décanoïque à l'intérieur des hélices.

1.2.5 Vers la stœchiométrie des complexes

Les résultats des différents dosages après lavage et hydrolyse ainsi que les études par DRX et TEM permettent d'envisager un schéma global du piégeage des composés d'arôme par l'amylose. La figure 1.16 représente schématiquement un empilement semi-cristallin d'amylose. Les composés d'arôme peuvent être piégés dans les lamelles amorphes et/ou cristallines, et dans ce cas ils peuvent être situés à l'intérieur de la cavité hélicoïdale ou entre les hélices. La présence des molécules dans les zones amorphes semble indépendante de la molécule complexante et du type cristallin observé. En revanche le comportement à l'hydrolyse de chacun des trois types de complexes est visiblement lié à sa structure semi-cristalline, à l'organisation de sa maille cristalline mais aussi à la localisation de la molécule complexée dans cette maille.

L'acide décanoïque est inclus dans la cavité de l'hélice et apporte une grande stabilité aux lamelles cristallines même lorsque la grande majorité des lamelles amorphes est hydrolysée (Figure 1.17). L'espace restreint entre les hélices et les liaisons hydrogène existantes entre elles, semblent suffisantes pour assurer la cohésion de l'empilement cristallin (liaison H entre l'oxygène porté par le carbone 3 d'un glucose et l'hydroxyle porté par le carbone 6 d'un glucose de l'hélice voisine (Rappenecker et Zugenmaier, 1981)). La quantité mesurée par infrarouge correspond à ce qui est piégé dans la cavité hélicoïdale (4.5 %) soit un rapport molaire $n_{\text{ligand}}/n_{\text{glucose}} = 0.046$ ou 22 unités glucosyl pour une molécule d'acide décanoïque (Tableau 1.5, 220). Sachant que le \overline{DP} est proche de 16, il y a environ une molécule incluse par hélice.

Contrairement au complexe amylose-acide décanoïque, la grande sensibilité du complexe amylose-acide hexanoïque à l'hydrolyse et la rapide apparition du type cristallin B laissent penser que l'acide hexanoïque n'a pas d'interaction forte avec l'amylose. Il n'est vraisemblablement pas présent dans la cavité de l'hélice mais uniquement entre les hélices (Représentation schématique de la figure 1.18, page 218). De cette façon, dès que les lamelles amorphes ne sont plus présentes pour stabiliser l'ensemble de la structure cristalline, les fragments d'amylose se réorganisent en type B. Le \overline{DP} de l'amylose n'a pas pu être déterminé en cours d'hydrolyse, mais la mesure de l'épaisseur de la couche cristalline en microscopie électronique permet d'es-

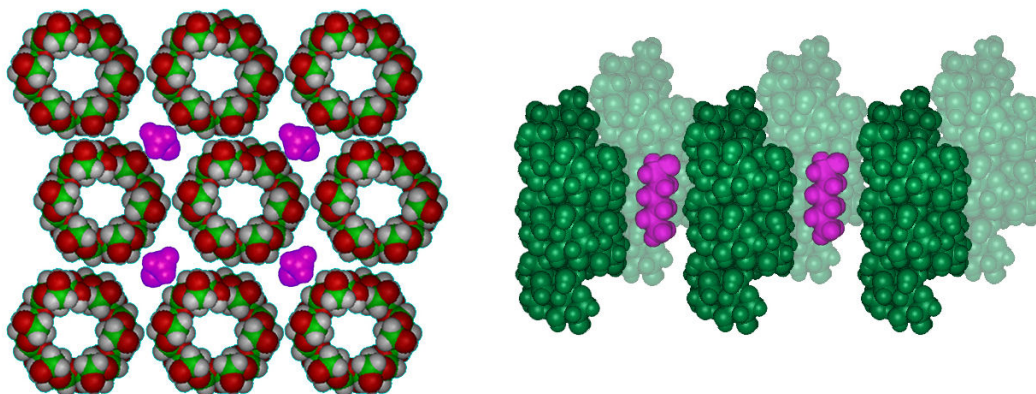


FIGURE 1.18 – Représentation schématique de lamelles cristallines de complexes amylose-acide hexanoïque et localisation de l'acide hexanoïque entre les hélices.

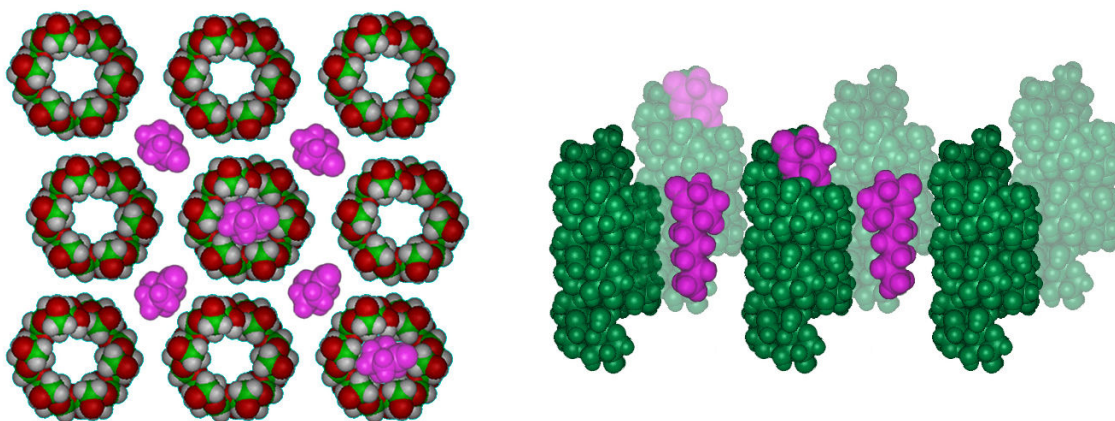


FIGURE 1.19 – Représentation schématique de lamelles cristallines de complexes amylose- δ -décalactone et localisation de la δ -décalactone à l'intérieur et entre les hélices.

timer le \overline{DP} de l'amylose dans la lamelle cristalline à environ 30 (4 nm = 5 tours d'hélice). La quantité d'acide hexanoïque dosée dans les zones cristallines est proche de 5.6 % ce qui correspond à 2.34 molécules d'acide hexanoïque pour une molécule d'amylose ($n_{ligand}/n_{amylose}$) (Tableau 1.5, 220).

Le cas de la δ -décalactone implique probablement une situation intermédiaire. Le fait qu'il n'y ait pas de retrogradation laisse penser que la δ -décalactone est incluse ou au moins partiellement incluse et que les interactions avec l'amylose sont suffisamment forte pour stabiliser la conformation hélicoïdale. Le type cristallin V_{6III} implique par ailleurs qu'elle soit nécessairement présente entre les hélices (Figure 1.19). En revanche, la piètre organisation lamellaire augmenterait sensiblement la vitesse d'hydrolyse des zones cristallines, entraînant (i) la libération rapide d'une partie des molécules piégées entre les hélices et (ii) une augmentation de la mobilité des hélices dans le système cristallin. Ceci aboutirait, dans le même temps, au rapprochement des hélices, à la transition vers le type V_{6II} qui possède une maille plus compacte et à une perfection des cristallites étant donné que cette structure V_{6II} semble être très peu sensible à l'hydrolyse. Cela confirmerait par ailleurs l'importance de l'inclusion dans l'hélice. La double localisation de la δ -décalactone dans et entre les hélices permettant ainsi de former un type V_{6II} plus stable que celui obtenu en présence d'acide hexanoïque. De façon similaire au cas de l'acide hexanoïque, le \overline{DP} de l'amylose dans les lamelles cristallines a pu être estimé par microscopie électronique à 38 (6.3 tours d'hélice), les 7.4 % de δ -décalactone qui peuvent être piégés dans les zones cristallines correspondent ainsi à un rapport molaire $n_{ligand}/n_{amylose}$ de 2.68 δ -décalactone par hélice d'amylose (Tableau 1.5).

1.3 Discussion

La première étape de ces travaux a consisté à identifier, parmi un ensemble de molécules constituant un arôme alimentaire, les composés d'arôme susceptibles de former des complexes avec l'amylose. Neuf d'entre eux peuvent interagir avec l'amylose et aboutir à trois types d'empilements cristallins connus (V_{6I} , V_{6II} et V_{6III}). Les trois types de cristaux obtenus ont une

Complexes	amylose-acide décanoïque			amylose-acide hexanoïque			amylose- δ -décalactone		
	V _{6I}			V _{6II}			V _{6III}		V _{6II}
	Non lavé	Lavé	Hydrolysé	Non lavé	Lavé	Hydrolysé	Non lavé	Lavé	Hydrolysé
Ligand	22.8%	7.1%	4.5%	10.6%	8.4%	5.6%	16.7%	8.6%	7.4%
\overline{DP}	840	840	16	841	841	30*	841	841	38*
$n_{ligand}/n_{amylose}$	234	61	0.74	139	105	2.34	161	76	2.68
$n_{ligand}/n_{glucose}$	0.279	0.072	0.046	0.165	0.125	0.083	0.192	0.091	0.076

TABLEAU 1.5 – Stœchiométrie des complexes avec l'acide décanoïque, l'acide hexanoïque et la δ -décalactone. La quantité de ligands piégés dans les régions amorphes et cristallines est déterminée après lavage tandis que les dosages après hydrolyse renseignent sur la quantité de ligand piégé uniquement dans les zones cristallines. * : DP estimé par rapport à l'épaisseur de la couche cristalline mesurée par TEM.

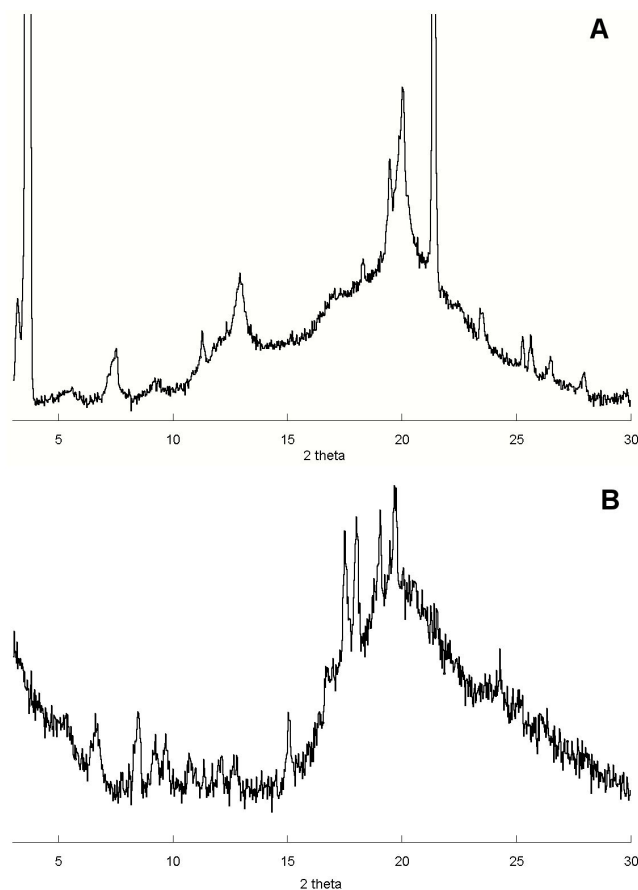


FIGURE 1.20 – A. Diagramme de DRX caractéristique du type V_{6I} obtenu à partir de mélange amidon-acide décanoïque. B. Diagramme de DRX caractéristique du type V_{6III} obtenu à partir de mélange amidon- δ -décalactone.

morphologie et une organisation lamellaire semi-cristalline similaires indépendamment du composé d'arôme utilisé.

Les quantités de ligands piégés dans les régions amorphes et cristallines, déterminées après lavage et dans les zones cristallines après hydrolyses, sont résumées dans le tableau 1.5. Une quantité variable de 3 à 5 % (m/m) de ligands peut être retenue dans les régions amorphes. Cette rétention ne fait vraisemblablement pas intervenir d'interactions spécifiques entre l'amylose et le ligand mais fonctionne sur le principe d'un "filet" retenant les molécules piégées.

La quantité de ligands piégés dans les lamelles cristallines est globalement comprise entre 5 et 8 % (m/m) en fonction du type cristallin mais aussi de la molécule piégée. Ces différences observées ne permettent pas de définir un modèle théorique pour les trois types V_{6I} , V_{6II} et V_{6III} . Cependant la capacité d'une molécule à complexer l'amylose est en partie liée à sa structure et la présence d'une chaîne aliphatique. De plus, pour une même classe chimique, la présence de la molécule dans l'hélice semble dépendre de la longueur de cette chaîne, en effet, l'acide hexanoïque (C6) et l'acide caprilique (C8) (Godet, 1994) ne sont pas présents dans l'hélice d'amylose, tandis que l'acide décanoïque avec dix atomes de carbone est bien inclus dans la cavité hélicoïdale.

Les conditions qui ont été utilisées lors de la préparation des complexes avec les composés d'arôme sont proches des conditions thermiques retrouvées lors de la cuisson d'une génoise. La formation de complexes d'amylose avec les composés d'arôme est donc envisageable lors du procédé de fabrication et ce d'autant plus que des mélanges amidon- δ -décalactone et amidon-acide décanoïque préparés dans les mêmes conditions ont conduit à la formation de complexes V_{6I} et V_{6III} identifiés par diffraction des rayons X (Figure 1.20).

Les proportions d'arôme utilisées au cours des procédés de fabrication de la génoise (0.1 à 0.3 % (m/m) laissent penser que la totalité des composés d'arôme complexables du mélange aromatique peuvent être piégés par l'amylose (uniquement dans l'hypothèse où tous les autres ingrédients de la génoise n'interviendraient pas dans la rétention des ces molécules, ce qui n'est bien évidemment pas le cas).

Chapitre 2

Conditions de formation des complexes et aspects cinétiques

Il est communément admis que la capacité d'une molécule à complexer l'amylose dépend fortement de sa structure chimique. En effet, des molécules hydrophobes qui possèdent une chaîne aliphatique sont souvent susceptibles de complexer l'amylose. La cavité centrale de l'hélice d'amylose V est-elle aussi hydrophobe, tandis que la face externe de l'hélice est plus hydrophile. Un des facteurs clé de la complexation semble donc être la bonne mise en "contact" de l'amylose, dispersée en solution aqueuse, avec des ligands plutôt hydrophobes. Cependant, d'autres paramètres interviennent également. Par exemple, les conditions thermiques ont une grande influence sur la complexation de l'amylose. Ainsi, des complexes préparés à plus basse température seront généralement moins cristallins que les mêmes complexes préparés à une température supérieure. Les conditions de préparation doivent donc être minutieusement choisies pour favoriser au maximum la complexation.

2.1 Influence des conditions de préparation

Au cours de cette étude, la complexation a été réalisée en excès de ligand, c'est à dire, qu'un nombre de ligands supérieur au nombre de résidus glucosyl a été ajouté à la solution d'amylose.

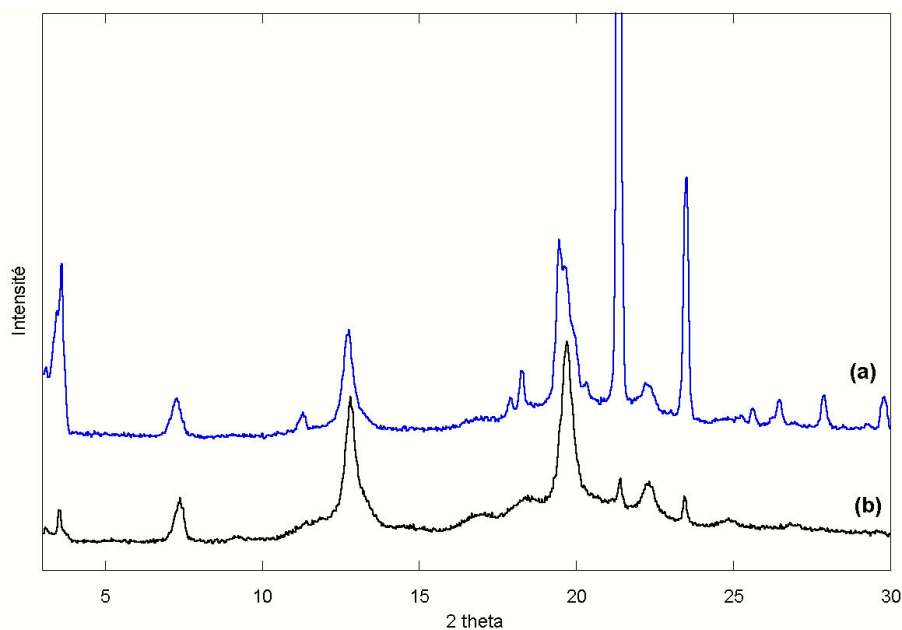


FIGURE 2.1 – Diagrammes de diffraction des rayons X de complexes amylose-acide décanoïque préparés (a) avec 10 % (v/v) d'acide décanoïque et (b) avec 0.25 % (v/v) d'acide décanoïque pour une solution d'amylose à 1% (200 mg dans 20 ml d'eau).

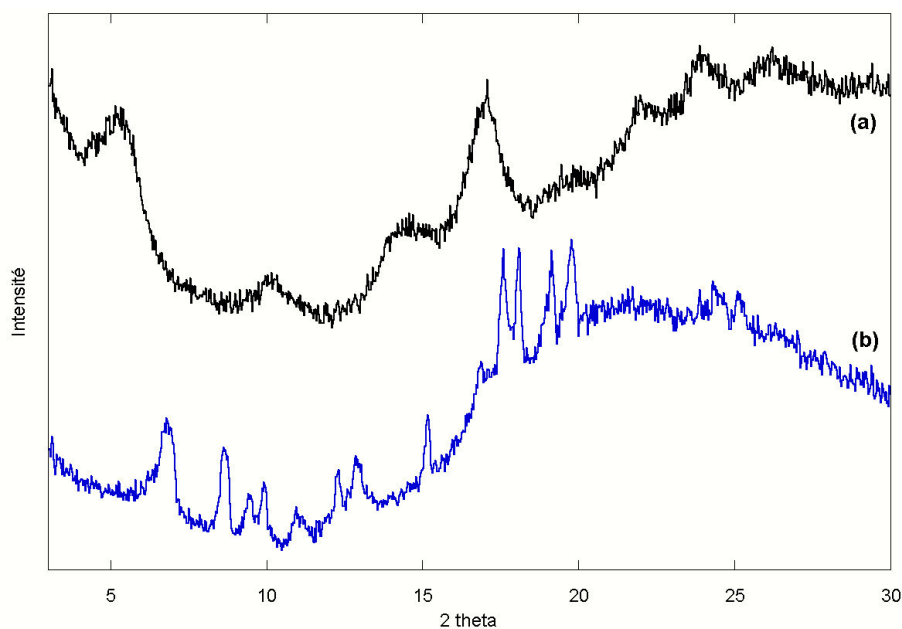


FIGURE 2.2 – Diagrammes de diffraction des rayons X de mélanges amylose-isopropanol préparés (a) avec 10 % (v/v) et (b) avec 60 % (v/v) pour une solution d'amylose à 1% (200 mg dans 20 ml d'eau).

Il a, par ailleurs, été vérifié que la précipitation d'une solution d'amylose seule aboutit systématiquement à un diagramme de DRX de type B. Ainsi, dans les conditions choisies, le rapport molaire $n_{ligand}/n_{unité\ glucosyl}$ est supérieur à 2 pour toutes les molécules utilisées dans cette étude.

Cette concentration est suffisante pour les molécules hydrophobes comme les lactones et les acides gras (>C6). Elle peut même être réduite de façon importante pour certaines molécules, comme illustré sur la figure 2.1. Les complexes préparés en fort excès d'acide décanoïque (diagramme 2.1a, avec 2 ml d'acide décanoïque, soit 10 % (v/v)) ont un diagramme de diffraction très similaire à celui de complexes réalisés avec seulement 0.25 % (v/v) de la solution d'amylose (soit 22.5 % (m/m) d'acide décanoïque pour 200 mg d'amylose) (Diagramme 2.1b). Ces deux concentrations correspondent respectivement à un rapport molaire de $n_{ligand}/n_{unité\ glucosyl}$ de 8.50 et 0.21 alors que l'intensité des pics de diffraction de l'amylose est peu différente pour les deux échantillons. En outre, leur diagramme ne montre pas de pic appartenant au type d'amylose B rétrogradée. Leur principale différence réside ainsi dans l'intensité des pics de diffraction de l'acide décanoïque libre ($3,4^\circ$ 21.6° et 23.6° , $\lambda_{CuK\alpha 1} = 0.15405$ nm), beaucoup plus grande lorsque la concentration en acide décanoïque est de 10% (v/v). (Diagramme 2.1a).

Dans le cas de molécules hydrophiles et plus solubles dans l'eau (propylène glycol, isopropanol), de telles concentrations ne suffisent pas mais correspondent pourtant à un large excès ($n_{ligand}/n_{unité\ glucosyl} = 22$ pour le propylène glycol et 21 pour l'isopropanol). La figure 2.2 présente les diagrammes de diffraction de type B de mélanges amylose-isopropanol réalisés dans des conditions identiques à celles utilisées pour les autres ligands (Diagramme 2.2a, 10 % (v/v)). L'ajout de 60 % (v/v) est nécessaire ($n_{ligand}/n_{unité\ glucosyl} = 126$) pour induire la formation de complexes de type V_{6III} (Diagramme 2.2b). De même, le propylène glycol nécessite une concentration encore supérieure pour complexer l'amylose. Le diagramme (a), essentiellement amorphe, présenté sur la figure 2.3 (page 226) correspond à l'addition de 60 % (v/v) de propylène glycol à la solution d'amylose ($n_{ligand}/n_{unité\ glucosyl} = 132$). La formation de complexes de type V_{6I} nécessite ainsi d'ajouter 100 % (v/v) de propylène glycol à la solution d'amylose soit un rapport $n_{ligand}/n_{unité\ glucosyl} = 220$ (Figure 2.3b).

Les proportions plus importantes de complexant nécessaires dans le cas des molécules plus

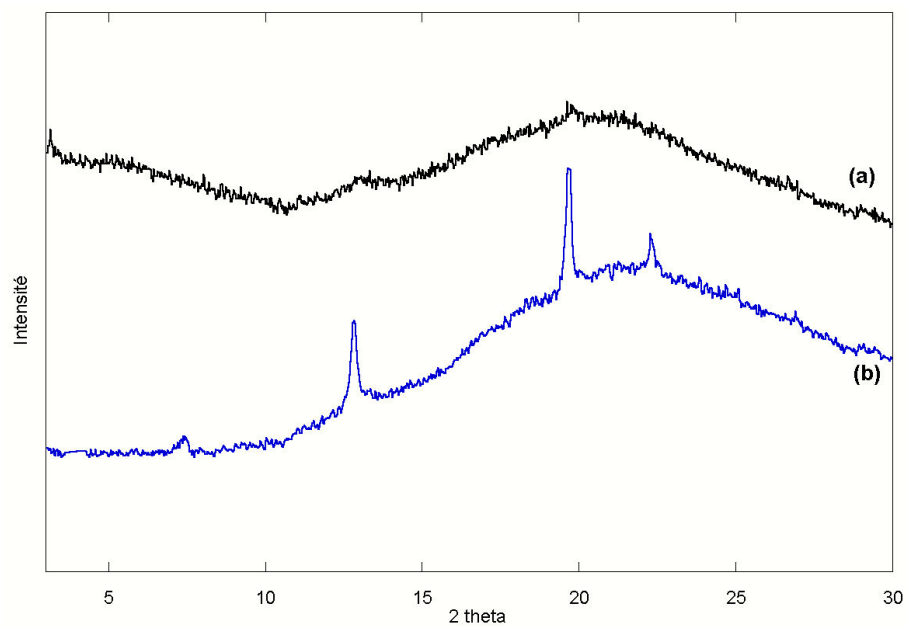


FIGURE 2.3 – Diagrammes de diffraction des rayons X de mélanges amylose-propylène glycol préparés (a) avec 60 % (v/v) et (b) avec 100 % (v/v) pour une solution d'amylose à 1% (200 mg dans 20 ml d'eau).

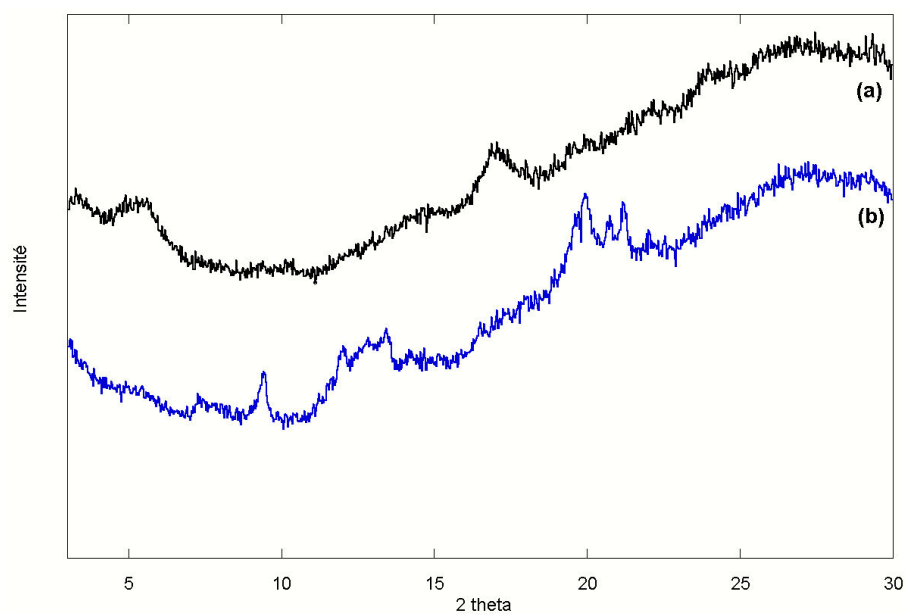


FIGURE 2.4 – Influence de l'agitation au cours du mélange amylose-complexant cas de l'amylose et de l'hexanoate d'éthyle (a) avec une faible agitation et (b) avec forte agitation.

hydrophiles peuvent être expliquées par le fait que ces molécules interagissent plus favorablement avec l'eau (le solvant) plutôt qu'avec l'amylose. Une concentration plus importante permet de forcer les interactions ligand-amylose au détriment des interactions ligand-eau et de conduire à la formation des complexes. Au contraire, des molécules plus hydrophobes privilégient, même à faible concentration, les interactions avec l'amylose plutôt qu'avec l'eau.

Une autre possibilité pour augmenter les interactions amylose-ligands peut conduire à modifier les conditions expérimentales sans modifier les concentrations mises en jeu. Les diagrammes de diffraction de la figure 2.4 sont issus de mélanges amylose-hexanoate d'éthyle dans les mêmes proportions. Le diagramme 2.4a, de type B, a été obtenu après précipitation d'échantillons faiblement agités, tandis que les mélanges agités plus fortement conduisent bien à la formation de complexes de type V_{6II} (diagramme 2.4b). Cette forte agitation provoque vraisemblablement la formation d'une émulsion contenant de très fines gouttelettes d'hexanoate d'éthyle dans la solution d'amylose. La répartition du complexant est ainsi plus homogène et les interactions amylose-hexanoate d'éthyle favorisées. Au contraire, après une agitation plus douce, l'émulsion formée présente de plus grosses gouttelettes de complexant qui coalescent plus rapidement et entraînent une séparation de phase, réduisant dans le même temps les possibilités d'interaction avec l'amylose.

Ces résultats montrent que certaines des molécules qui complexent l'amylose peuvent se comporter de façon différente en fonction des conditions d'expérimentation. Ces conditions sont à adapter en fonction de la structure et des propriétés physico-chimiques des molécules. Ainsi, les molécules plus hydrophiles nécessitent une concentration plus importante et suffisante pour saturer le solvant afin de forcer les interactions amylose-ligands. D'une autre façon pour les molécules moins solubles dans l'eau, la concentration de ligand peut être plus faible mais la difficulté consiste alors à favoriser ces interactions bien que l'amylose et le ligand soient situés dans deux phases incompatibles. Une bonne homogénéisation du milieu est donc nécessaire pour induire la complexation.

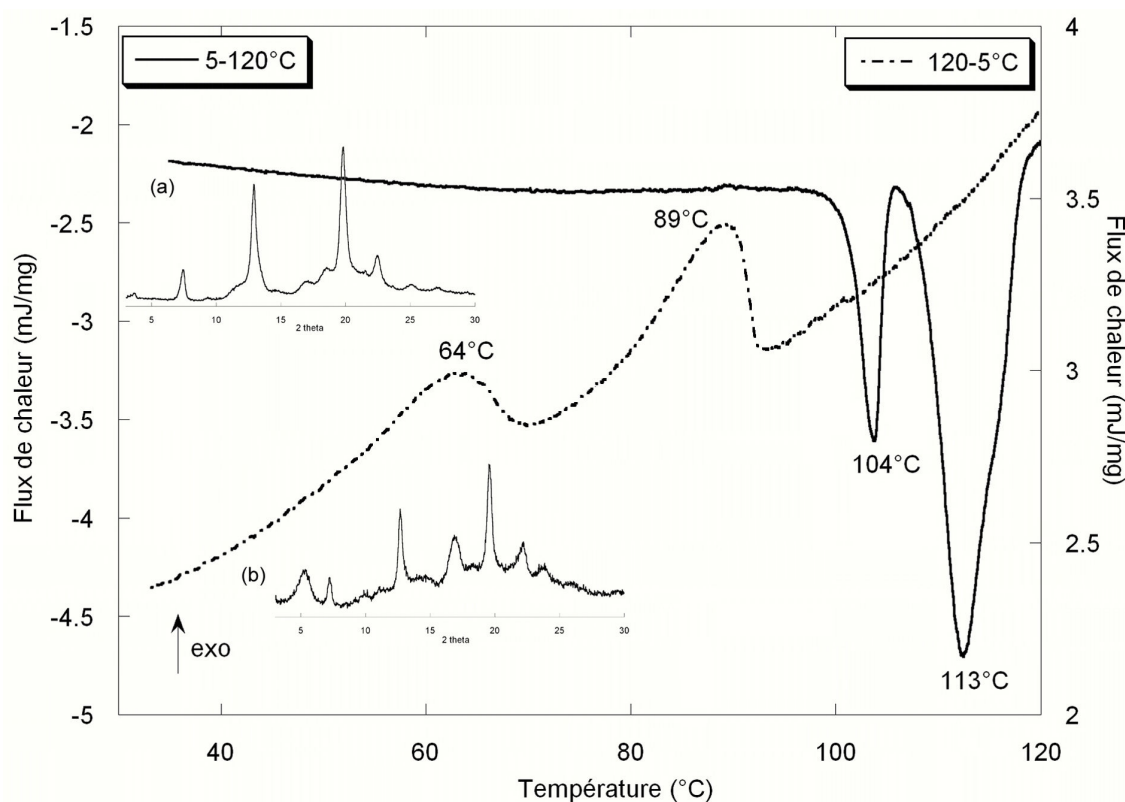


FIGURE 2.5 – Thermogrammes de complexes amylose-acide décanoïque de 30 à 120 °C et diagrammes de diffraction (a) avant μ AED et (b) après un cycle de température de 5 à 120 °C puis 120 à 5 °C (0.1 °C/min).

En outre, l'hydrophobie des agents complexants n'est pas la seule propriété à prendre en compte. En effet, le cinnamate de méthyle et la γ -décylactone ont une solubilité dans l'eau similaire, respectivement 0.039 et 0.029 g/100 ml d'eau à 25 °C (Issus de la base de données du site internet Syracuse Research Corporation, <http://www.syrres.com/esc/>), or seule la γ -décylactone conduit à la formation de complexes. D'autres caractéristiques moléculaires interviennent très probablement dans le phénomène de complexation de telle façon que chaque protocole doit être adapté et optimisé en fonction du composé d'arôme. Il est ainsi possible que certaines des molécules n'ayant pas pu être complexées, puissent l'être dans des conditions plus éloignées des conditions imposées par un procédé agroalimentaire (par exemple en présence de diméthyle sulfoxyde).

2.2 Contraintes thermiques, températures de cristallisation et de fusion

La température est un facteur influençant fortement la complexation de l'amylose et des composés d'arôme. Par conséquent, la température de cuisson d'un produit et plus particulièrement la température au cœur du produit sera déterminante pour la formation des complexes dans une matrice alimentaire réelle. Une étude de la stabilité thermique de complexes avec différents composés d'arôme a ainsi été réalisée par microcalorimétrie différentielle afin de déterminer les températures de fusion, et de recristallisation au cours du refroidissement, des complexes amylose-composé d'arôme. Les températures auxquelles ils se forment ont également été étudiées au cours du chauffage d'un mélange d'amylose-composés d'arôme dans des capsules d'AED.

2.2.1 Stabilité thermique des complexes amylose-composés d'arôme

La figure 2.5 présente les thermogrammes obtenus entre 30 °C et 120 °C pour des complexes amylose-acide décanoïque ainsi que les diagrammes de diffraction avant et après analyse

Composé d'arôme	Endothermes		Exothermes	
	104 °C	113 °C	89 °C	64 °C
Acide décanoïque	104 °C	113 °C	89 °C	64 °C
δ -décalactone	93 °C	108 °C	74 °C	44 °C
Linalol	-	111 °C	81 °C	55 °C
Menthone	-	117 °C	87 °C	56 °C

TABLEAU 2.1 – Températures de fusion et de cristallisation de complexes amylose-composé d'arôme.

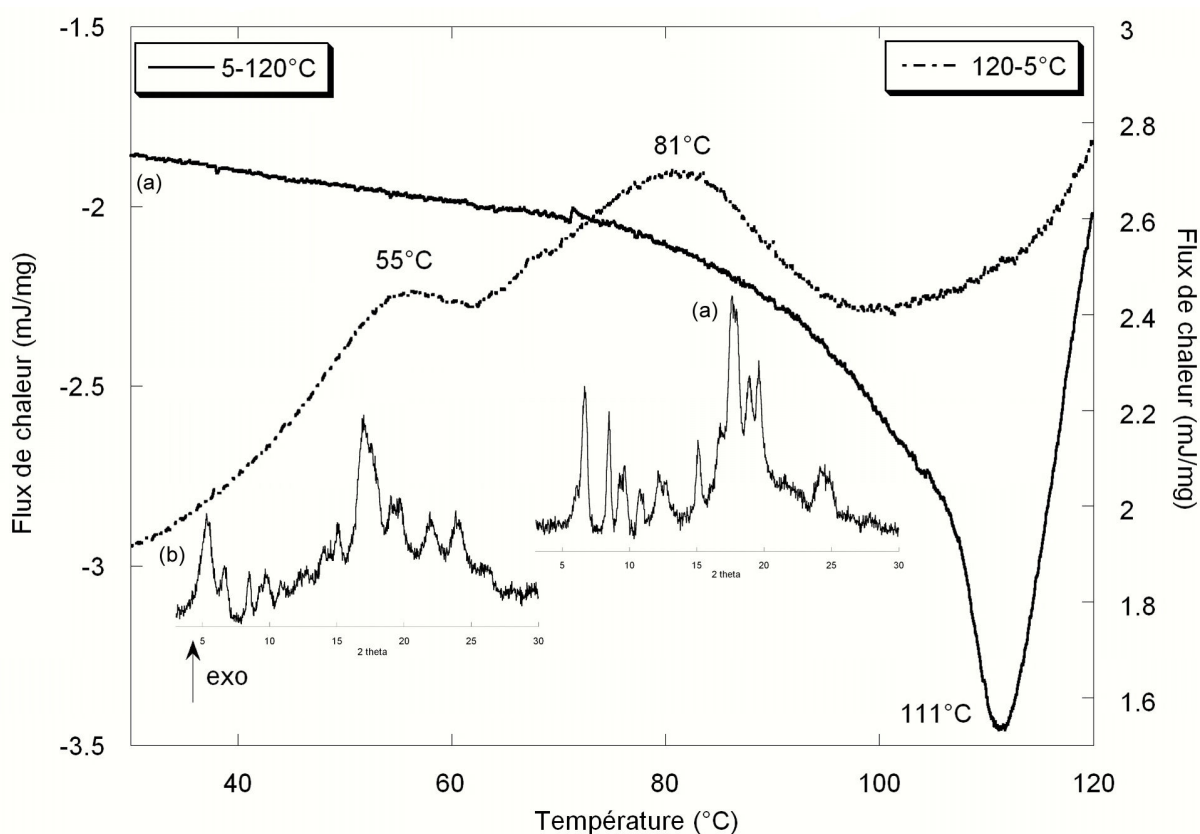


FIGURE 2.6 – Thermogrammes de complexes amylose-linalol de 30 à 120 °C (0.1 °C/min) et diagrammes de diffraction (a) avant μ AED et (b) après un cycle de température de 5 à 120 °C puis 120 à 5 °C (0.1 °C/min).

en AED. Lors de la montée en température (de 5 à 120 °C, 0.1 °C/min, trait plein), deux phénomènes endothermiques se produisent à 104 °C et 113 °C. Il s'agit de la fusion des complexes amylose-acide décanoïque. Ces températures de fusion sont en accord avec ce qui est généralement observé pour des complexes amylose-acide gras (Godet, 1994). Les deux endothermes successifs pourraient être expliqués par l'existence de deux populations de taille de cristaux dans l'échantillon ou par la réorganisation d'une partie des cristaux en cours de chauffage aboutissant à une température de fusion supérieure (phénomène de recuit).

Au cours de la descente en température (de 120 à 5 °C, 0.1 °C/min, trait pointillé) deux phénomènes exothermiques se produisent successivement à 89 °C et 64 °C. Le premier correspond vraisemblablement à la recristallisation des complexes d'amylose et est en accord avec les données de la littérature. Le second exotherme peut être expliqué par la rétrogradation d'une partie de l'amylose. Ceci est confirmé par la présence de pics caractéristiques de l'amylose rétrogradée en type B sur le diagramme de diffraction 2.5b, réalisé en fin d'expérience, ces pics étant absents du diagramme de diffraction réalisé avant l'étude en AED (Diagramme a). Cette rétrogradation peut être expliquée par l'absence d'agitation dans la capsule d'AED et la vitesse de refroidissement lente (0.1 °C/min) par rapport à la vitesse de refroidissement des complexes préparés pour les autres études (environ 0.3 °C/min de 90°C à 35 °C, figure 2.2, page 140). Elle peut être due à la réorganisation d'une partie de l'amylose n'ayant pas formé de nouveaux complexes après la fusion de ceux-ci lors du chauffage ou à une réorganisation des zones amorphes, elle a, par ailleurs, été observée pour tous les complexes amylose-composé d'arôme étudiés.

Les complexes amylose- δ -décylactone montrent un thermogramme (cf. annexe 3) très similaire à celui des complexes amylose-acide décanoïque avec deux endothermes de fusion à 93 °C et 108 °C (Tableau 2.1) lors du chauffage et deux exothermes 74 °C et 44 °C au cours du refroidissement. Ces complexes sont ainsi moins stables thermiquement et cristallisent à plus basse température (74 °C). Les complexes préparés à partir de linalol (Figure 2.6) et de menthone (cf. annexe 3) ne montrent qu'un endotherme de fusion, respectivement à 111 °C et 117 °C (Tableau 2.1). Néanmoins, le thermogramme correspondant aux complexes amylose-linalol (Figure 2.6) présente un épaulement en début d'endotherme laissant pressentir l'existence de plu-

sieurs phénomènes thermiques successifs probablement liés à la présence de complexes plus ou moins organisés. Les complexes amylose-linalol et amylose-menthone ont des températures de cristallisation proches, les thermogrammes présentent deux exothermes, respectivement, à 81 °C et 87 °C puis 55 et 56 °C. De façon similaire aux complexes amylose-acide décanoïque, les diagrammes de diffraction réalisés en fin d'expérience présentent, pour ces trois composés d'arôme, des pics liés au type B en plus des pics caractéristiques du V_{6III} .

Les températures de fusion des complexes amylose-composés d'arôme sont globalement comprises entre 100 et 120 °C et ne semblent pas être dépendantes du type cristallin. En effet, la δ -décalactone, la menthone et le linalol forment un empilement de type V_{6III} avec l'amylose et leurs complexes ont des températures de fusion et de cristallisation très variables. Entre autres, les complexes amylose-menthone ont une température de fusion supérieure à celle des complexes amylose-acide décanoïque qui forment cependant une structure plus dense.

Au cours du refroidissement, le premier exotherme apparaît généralement entre 90 et 70 °C et correspond vraisemblablement à la cristallisation des complexes amylose-composés d'arôme. Le second endotherme, dont la température varie de 44 à 64 °C, est très probablement lié à la recristallisation en type B d'une partie de l'amylose. Des trempes dans l'azote liquide des échantillons prélevés de part et d'autre de chacun des exothermes n'ont pas permis d'identifier plus clairement leur origine, en partie à cause des contraintes liées aux appareillages et aux temps d'acquisition des données de diffraction.

2.2.2 Mise en évidence de la complexation au cours d'une montée en température par Analyse Enthalpique Différentielle

Pour envisager une application en agroalimentaire, il est important de savoir si les complexes amylose-composé d'arôme peuvent être formés en cours de cuisson et/ou ensuite lors du refroidissement. Cette cuisson peut être assimilée à un chauffage débutant à température ambiante jusqu'à la température maximale au cœur du produit. L'utilisation conjointe de l'AED et de la diffraction des rayons X a permis de mettre en évidence la formation de complexes au

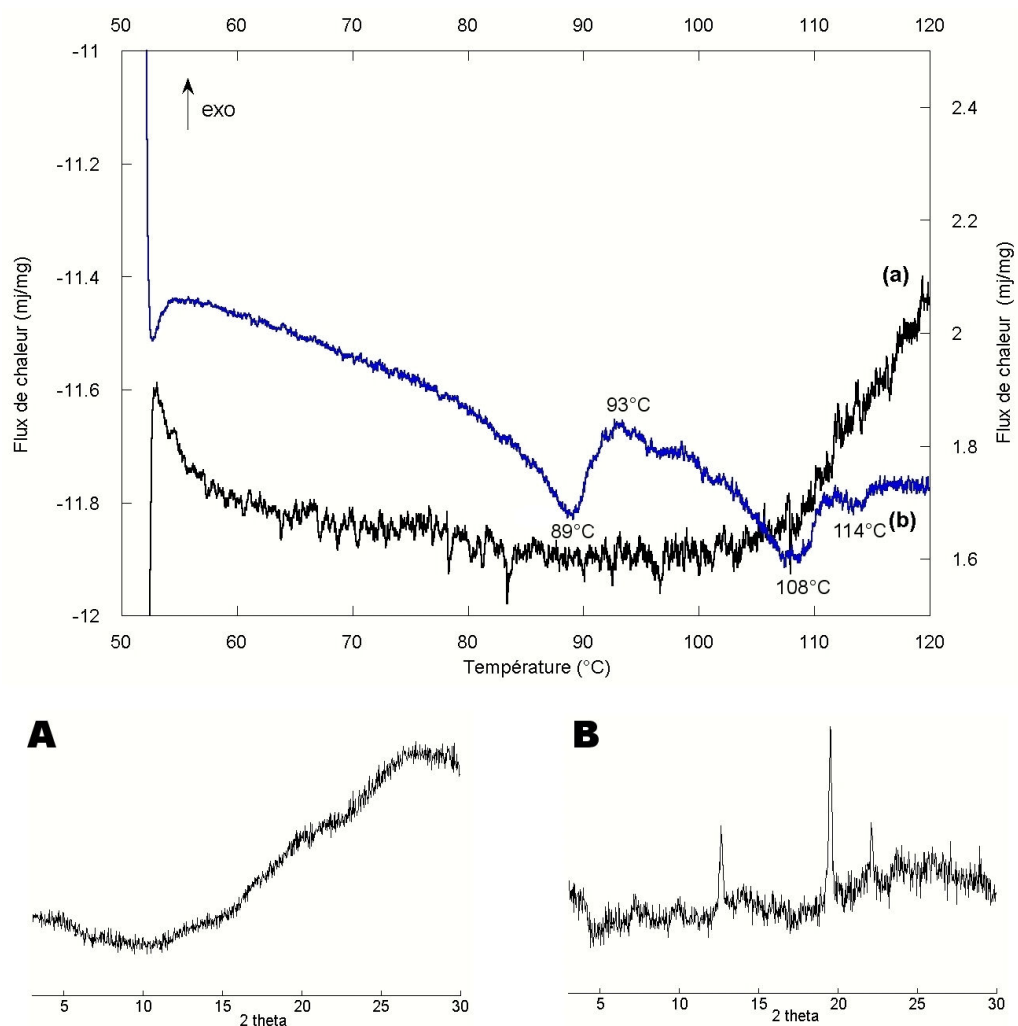


FIGURE 2.7 – Thermogrammes (a) d'amylose seule et (b) de mélange amylose - acide décanoïque 10 % (m/m) de 50 à 120 °C, $v = 0.1$ °C/min. **A.** Diagramme de diffraction de l'amylose après solubilisation et avant ajout de l'acide décanoïque. **B.** Diagramme de diffraction des complexes formés après chauffage du mélange

cours du chauffage d'une solution d'amylose et de composés d'arôme. Pour cela, une solution d'amylose à 1% (m/m) a été préparée à chaud (160 °C) puis refroidie rapidement à température ambiante, 20 % (m/m_{amylose}) d'acide décanoïque ont été ajoutés et le mélange analysé par AED au cours d'un chauffage de 20 à 120°C. L'une des contraintes liées à cette étude est la rétrogradation rapide de la solution d'amylose lorsque la température est inférieure à une cinquantaine de degrés. Pour éviter cela, la rampe de température choisie comporte deux phases. La première de 20 à 50 °C (non représentée sur les thermogrammes) avec une vitesse de 1 °C/min est suffisamment rapide pour éviter la rétrogradation de l'amylose. Elle est suivie d'une rampe de 50 à 120 °C à une vitesse de 0.1 °C/min. Cette vitesse lente permet de distinguer les différents phénomènes liés à la température. La structure cristalline a été vérifiée en fin d'expérience par diffraction des rayons X.

La figure 2.7 présente les thermogrammes (de 50 à 120 °C) obtenus pour une solution d'amylose et un mélange amylose-acide décanoïque à 20 % (m/m). Le tracé (a) correspond à une solution d'amylose seule. Les déviations importantes de la ligne de base en début et fin de thermogramme sont des artefacts liés à la remise à l'équilibre de l'appareil lors du changement de la vitesse de chauffe. Ce thermogramme ne montre pas de phénomène significatif induit par l'amylose, sur cette plage de température.

Le tracé (b) est le thermogramme du mélange amylose-acide décanoïque. Celui ci montre successivement un endotherme marqué à 89 °C, un ou plusieurs exothermes proches de 93 °C puis deux endothermes à 108 °C et 114 °C. Ce comportement a déjà été mis en évidence par Biliaderis et al. (1985), Biliaderis et al. (1986) et Le Bail et al. (1999). L'endotherme de fusion à plus basse température (89 °C) correspond à la fusion de complexes peu organisés présentant un diagramme de diffraction amorphe (complexes de type I). Les endothermes de fusion observés à 108°C et 114 °C sont dus à la fusion de complexes beaucoup plus organisés qui présentent un diagramme de diffraction de type V (complexes de type II semi-cristallins) (Biliaderis et al., 1986). Le Bail et al. (1999) ont par ailleurs montré qu'une vitesse de chauffe trop rapide ne permet pas de différencier tous ces phénomènes et que seul un endotherme "composite" est observé.

Les résultats de Biliaderis et al. (1985) concernent des complexes amylose-lipides au cours d'un chauffage de 40 à 180 °C. Les travaux de Le Bail et al. (1999) portent quant à eux sur de l'amidon de maïs qui contient probablement déjà des complexes amylose-lipides amorphes dans les grains d'amidon.

L'étude menée ici est basée sur des mélanges amylose de pomme de terre-acide décanoïque réalisés à température ambiante ($\simeq 25$ °C) ce qui exclu la présence préalable de complexes dans le milieu. De plus, la solution d'amylose seule ne montre aucun phénomène thermique sur cette plage de température. Par conséquent, l'endotherme observé à 89 °C sur la figure 2.7 est nécessairement dû à la fusion de complexes qui ont été formés au cours de la montée en température. L'exotherme qui suit à 93 °C correspond très probablement à une recristallisation des complexes ayant fondu à 89°C (Biliaderis et al., 1985). Ces complexes, recristallisés à plus haute température, sont vraisemblablement mieux organisés (phénomène de recuit) et fusionnent à 108 °C et 114 °C, conformément à ce qui a été montré dans le paragraphe précédent (Tableau 2.1, page 230).

Une autre hypothèse peut expliquer la présence de l'exotherme à 93 °C et des endothermes à 108 °C et 114 °C. Ceux-ci pourraient être indépendants de l'endotherme de fusion observé à 89°C et traduiraient ainsi la formation de deux populations de cristaux : la première population de cristaux formés à basse température et fusionnant à 89°C, et la deuxième population, formée à 93 °C, fusionnant ensuite à 108 et 114°C.

Les deux diagrammes de diffraction A et B, de la figure 2.7, réalisés en début et fin d'expérience confirment la complexation de l'amylose au cours du chauffage. Le premier diagramme correspond à l'amylose après solubilisation et refroidissement à température ambiante, juste avant l'ajout de l'acide décanoïque. L'échantillon est très hydraté mais apparaît comme essentiellement amorphe. Néanmoins, des résidus de pics appartenant au type B et/ou V sont très légèrement visibles et peuvent être dus à une solubilisation incomplète de l'amylose lors de la préparation de la solution mais aussi à un début de réorganisation de l'amylose pendant l'acquisition des diagrammes de diffraction des rayons X (deux heures). En revanche, le diagramme B présente les pics caractéristiques de la structure V_{6I} , ces complexes ont donc été formés dans la

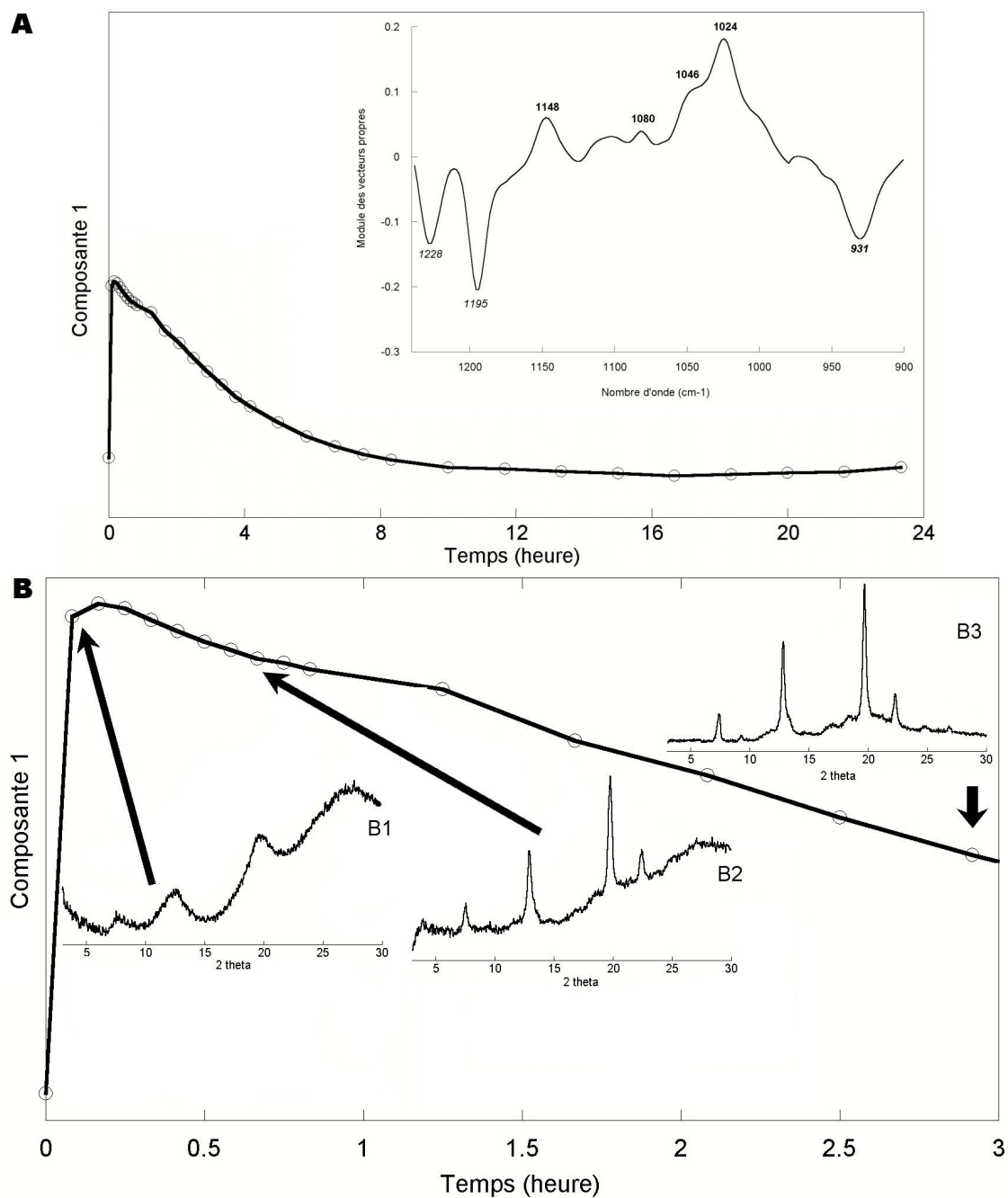


FIGURE 2.8 – Cinétique de complexation de l'amylose avec l'acide décanoïque (A) suivi par infrarouge de 24 heures (B) zoom sur les trois premières heures.

capsule de μ AED.

Les résultats de ces deux études par analyse enthalpique différentielle montrent que les conditions thermiques requises pour la complexation des composés d'arôme et de l'amylose sont globalement comprises entre 70 et 90 °C. Ces conditions étant réunies lors de la cuisson d'une génoise (90 à 100 °C à cœur en cours de cuisson), il est très probable que des complexes puissent être formés durant cette cuisson et cristallisent, après, au cours du refroidissement. Cependant, l'étude des aspects cinétiques de la complexation est particulièrement importante car certains produits nécessitent une cuisson de courte durée (de quelques minutes à quelques dizaines de minutes).

2.3 Cinétiques de complexation des composés d'arôme

La spectroscopie infrarouge en mode ATR a permis de suivre en continu l'évolution de la structure d'un mélange amylose-composé d'arôme. À une solution d'amylose préparée à chaud (160 °C), puis refroidie à 70°C (contrainte liée au spectrophotomètre infrarouge), ont été ajoutés 20 % (m/m) de composé d'arôme. Le mélange a été immédiatement déposé dans la cuve infrarouge équipée du cristal ATR pour l'acquisition des données spectrales sur une durée de 24 heures et un refroidissement de 70°C à 20°C (environ cinq heures). Les différents spectres obtenus ont été traités par ACP. Les coordonnées factorielles associées à la première composante, exprimées en fonction du temps, décrivent une courbe cinétique qui met en évidence plusieurs phénomènes. Les prélèvements effectués à différents temps et analysés en diffraction des rayons X ont permis de suivre les changements de structure correspondants.

2.3.1 Cinétique de complexation de l'amylose et de l'acide décanoïque

La figure 2.8A présente la cinétique de complexation de l'amylose avec l'acide décanoïque ainsi que le profil spectral de la première composante principale.

Le profil spectral montre que la première composante principale prend en compte certaines

Chapitre 2. Conditions de formation des complexes et aspects cinétiques

Bande d'absorption (cm^{-1})	Liaisons impliquées	Variations remarquables en cours de complexation		
		Ac. décanoïque (V_{6I})	Ac. hexanoïque (V_{6II})	δ -décalactone (V_{6III})
1148 ^(2,3)	$C_{(1)}-O-C_{(4')}$	1152 \rightarrow 1150 cm^{-1}		1156 \rightarrow 1154 cm^{-1}
1124 ^(2,4)	C-C, C-O et C-O-H	↑		
1108 ^(2,4)	C-C et C-O	1108 \rightarrow 1105 \rightarrow 1103 cm^{-1}		
1080 ⁽¹⁾	C-O-H		↑	↑
1046 ^(2,4)	C-OH et CH_2 , C-O et C-C		1050 \rightarrow 1055 cm^{-1}	
1024 ⁽²⁾	C-OH		1022 \rightarrow 1028 cm^{-1}	
931 ^(2,3)	anomère α	931 cm^{-1}	938 cm^{-1}	

TABLEAU 2.2 – Bandes d'absorption infrarouge de l'amylose impliquant des modifications en cours de complexation en fonction des types cristallins et ligands utilisés. ↑ indique une augmentation de l'intensité de la bande.

⁽¹⁾ Cael et al. (1973)

⁽²⁾ Cael et al. (1975)

⁽³⁾ Sekkal et al. (1995)

⁽⁴⁾ Van Soest et al. (1995)

bandes d'absorption de l'amylose, de l'acide décanoïque et une bande commune aux deux molécules située à 931 cm^{-1} . Les bandes situées à 1228 et 1195 cm^{-1} sont dues à des absorptions de l'acide décanoïque tandis que les bandes à 1148 , 1080 , 1046 , 1024 cm^{-1} sont spécifiques de l'amylose (Tableau 2.2). La bande à 1080 cm^{-1} correspond aux vibrations de torsion des liaisons C-O-H (Cael et al., 1973).

Les bandes à 1046 cm^{-1} (vibrations des liaisons C-OH et CH_2 (Van Soest et al., 1995) ou C-O, C-C et C-OH (Cael et al., 1975)) et 1024 cm^{-1} (C-OH (Cael et al., 1975)) sont particulièrement intéressantes puisque leur intensité varie avec la cristallinité de l'échantillon. Lorsque la cristallinité augmente, l'intensité la première bande augmente alors que celle de la seconde diminue. Ces deux variations s'accompagnent de la formation d'une vallée à 1035 cm^{-1} (Cael et al., 1975).

Les bandes situées à 1148 et 931 cm^{-1} ont été attribuées à la liaison osidique α -(1,4) ($\text{C}_{(1)}\text{-O-C}_{(4')}$) (Cael et al., 1975; Sekkal et al., 1995). Il semble par ailleurs que la bande à 931 cm^{-1} puisse se déplacer fortement de 930 à 945 cm^{-1} en fonction du type d'amylose (V ou B (Cael et al., 1973)) ou de l'angle dièdre de la liaison osidique (Sekkal et al., 1995).

Sur ce profil spectral, les bandes d'absorption de l'amylose sont positives tandis que les bandes d'absorption de l'acide décanoïque sont négatives. Par conséquent, les valeurs de la première composante principale exprimées en fonction du temps de complexation indiquent principalement les variations de proportion relative des deux molécules présentes dans le milieu et en contact avec le cristal ATR.

Ce tracé, présenté sur la figure 2.8A (page 238) montre trois phases successives. La première est illustrée par une augmentation très rapide de la valeur de la première composante principale au cours des dix premières minutes. Elle est due à un appauvrissement rapide du milieu en acide décanoïque en excès et peut être expliquée par la séparation de phase entre la solution d'amylose et l'acide décanoïque après le mélange. La deuxième, correspond à une légère décroissance de la courbe qui tend rapidement vers un plateau au cours de la première heure. Finalement, la troisième correspond à une nouvelle décroissance qui tend vers un plateau après huit heures de complexation. Ces deux phases de décroissance indiquent un nouvel enrichissement du milieu

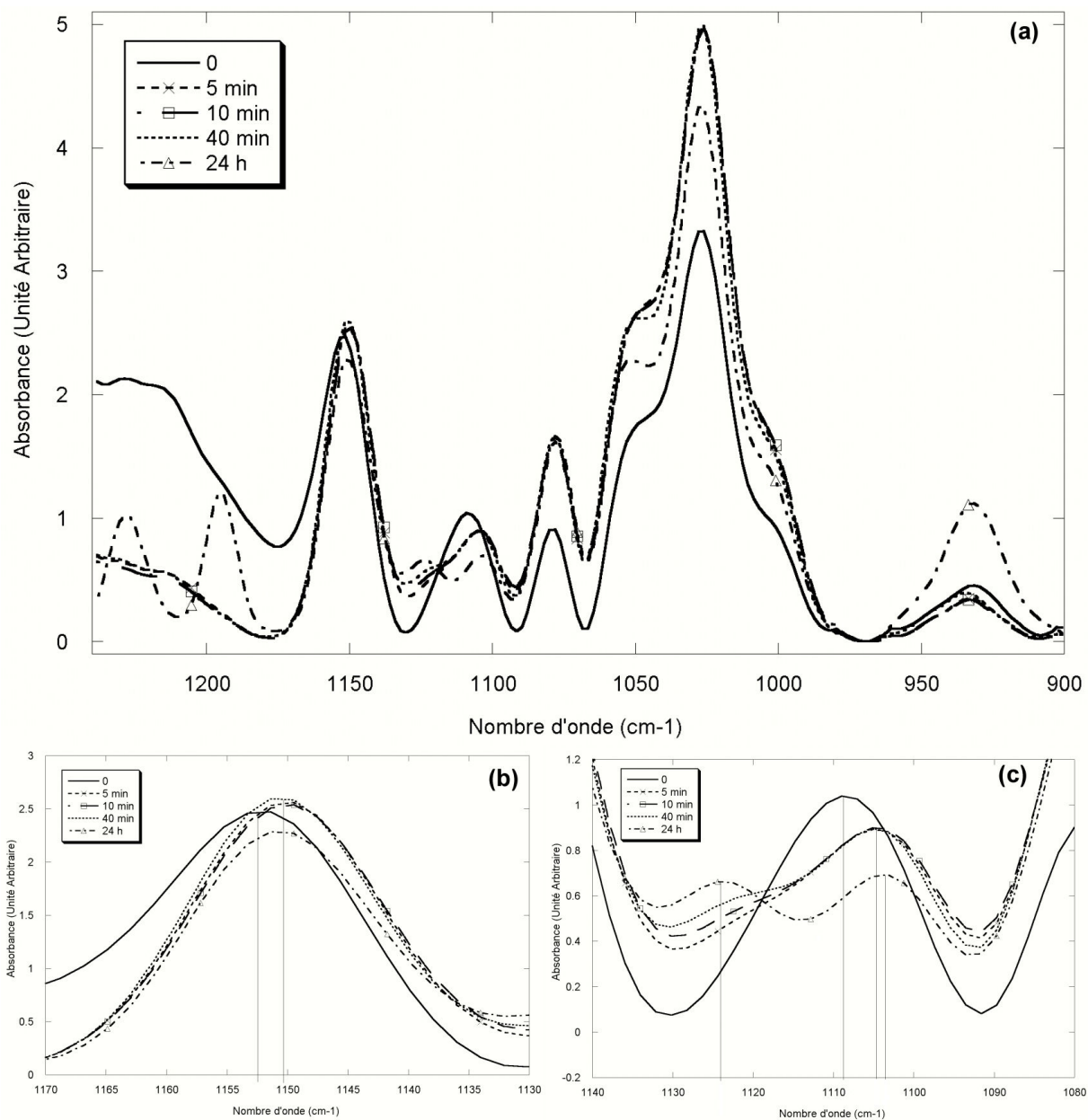


FIGURE 2.9 – Évolution des spectres infrarouges de 1240 à 900 cm⁻¹ au cours de la formation des complexes amylose-acide décanoïque.

en acide décanoïque expliqué par la précipitation progressive des complexes amylose-acide décanoïque sur le cristal ATR.

La figure 2.8B est un zoom sur les trois premières heures de précipitation. Le diagramme de diffraction B1, effectué cinq minutes après le mélange de la solution d'amylose et de l'acide décanoïque, montre les trois pics caractéristiques de la structure de type V_{6I} . Ces résultats impliquent une formation très rapide des hélices (inférieure à cinq minutes). La faible intensité des pics de diffraction montre que la cristallinité est faible, et la largeur importante des pics, que la taille des cristallites est très petite. Celle-ci peut être évaluée à partir du pic de diffraction situé à 7.4° ($\lambda_{CuK\alpha_1} = 0.15405$ nm) correspondant aux réflexions du plan réticulaire 1 1 0 (Rappenecker et Zugenmaier, 1981) qui est perpendiculaire à l'axe c (axe des chaînes). Par conséquent, les mesures suivant ce plan rendent compte de la taille latérale des cristaux. Celle-ci est de 4.5 ± 0.6 nm après cinq minutes de complexation.

Durant cette période certains changements sont visibles sur les spectres infrarouge (Figure 2.9(a)). Ceux-ci ayant été normalisés par rapport à l'aire sous la courbe, les variations d'intensité des pics d'absorption ne peuvent être discutées. Par exemple, l'augmentation d'intensité des pics d'absorption de la région spectrale comprise entre 1070 et 980 cm^{-1} n'est pas liée à la formation des complexes mais à la normalisation. Cependant, il semble qu'il y ait un déplacement de la bande d'absorption de la liaison osidique située à 1152 cm^{-1} vers 1150 cm^{-1} au cours des cinq premières minutes de complexation (Figure 2.9(b)). Si ce déplacement est significatif, il est possible qu'il soit lié à la conformation particulière que prend la liaison osidique lors de la formation des hélices d'amylose. Cette première phase correspondrait donc à l'inclusion de l'acide décanoïque, la formation des hélices et la nucléation des cristaux.

Les diagrammes de diffraction pris au cours de la phase d'évolution lente, après 40 minutes (B2) et trois heures (B3) de précipitation sont très similaires, particulièrement en terme d'intensité des pics de diffraction. Ils diffèrent seulement par le taux d'hydratation supérieur de l'échantillon B2 par rapport à l'échantillon B3 (illustré par la déviation importante de la ligne de base du diagramme B2), ce dernier ayant été conditionné sous atmosphère contrôlée à une activité de l'eau de 0.75. La première phase de décroissance observée entre dix minutes et une

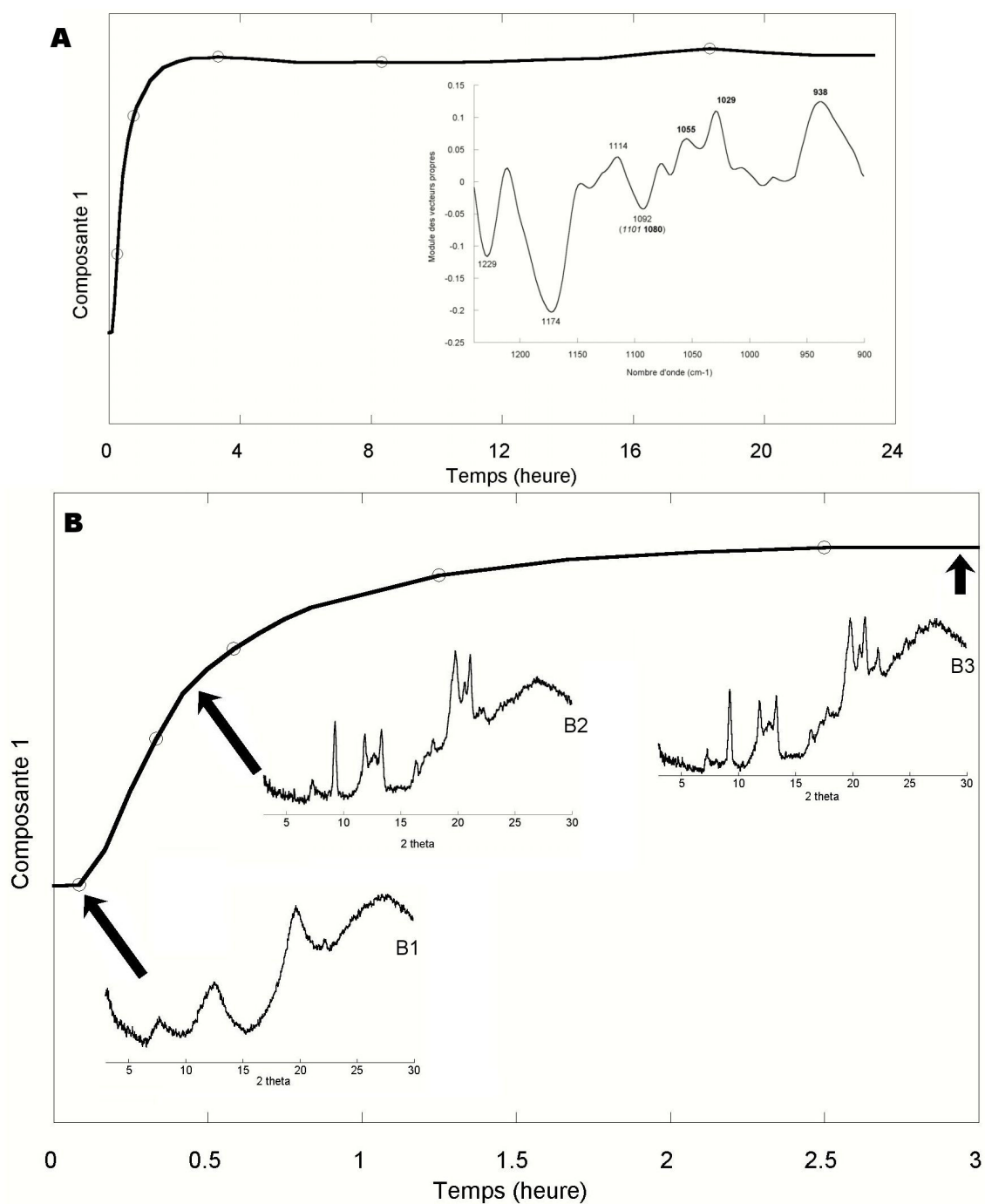


FIGURE 2.10 – Cinétique de complexation de l'amylose avec l'acide hexanoïque (A) suivi par infrarouge de 24 heures (B) zoom sur les trois premières heures.

heure et demi pourrait ainsi correspondre à la phase de croissance des cristallites, tandis que la décroissance suivante serait uniquement liée à la précipitation des cristaux d'amylose complexée car leur taille n'évolue pas ou très peu, puis qu'elle est de 19 ± 2 nm après 40 minutes et de 23 ± 2 nm après 24 heures de cristallisation.

Au cours de cette période, les bandes d'absorption infrarouge situées à 1124 et 1108 cm^{-1} subissent des modifications (Tableau 2.2, page 240). La première bande, à 1124 cm^{-1} , est associée à des vibrations des liaisons C-C, C-O et C-O-H (Cael et al., 1975; Van Soest et al., 1995). Elle apparaît progressivement tout au long de la précipitation (Figure 2.9(b)). La seconde (1108 cm^{-1}), attribuée aux vibrations des liaisons C-C et C-O (Cael et al., 1975; Van Soest et al., 1995), se déplace vers 1105 cm^{-1} après 40 minutes de complexation et est située à 1103 cm^{-1} après 24 heures. (Figure 2.9(b)).

2.3.2 Cinétique de complexation de l'amylose et de l'acide hexanoïque

La figure 2.10A présente la cinétique de complexation de l'amylose et l'acide hexanoïque dans des conditions identiques à celles décrites précédemment. Le profil spectral de la première composante principale suivie au cours du temps présente des bandes d'absorption liées à l'acide hexanoïque (1229 , 1174 et 1114 cm^{-1}) et à l'amylose (1055 , 1029 et 938 cm^{-1}). Il intègre également une bande à 1092 cm^{-1} qui est due à la superposition d'une bande d'absorption de l'acide hexanoïque à 1101 cm^{-1} et de la bande de vibration de l'amylose à 1080 cm^{-1} . Le suivi cinétique au cours des 24 heures de précipitation permet de mettre en évidence un phénomène principal qui semble terminé après quatre ou cinq heures de complexation. Contrairement au cas de l'acide décanoïque, la courbe augmente avec le temps de complexation. Les bandes du profil spectral correspondant à l'acide hexanoïque étant essentiellement négatives, cela signifie qu'il y a un appauvrissement du milieu en acide hexanoïque au cours du temps. Cela peut être expliqué par le fait que l'acide hexanoïque est plus soluble dans l'eau (1 g/100ml) que l'acide décanoïque (6.10^{-3} g/100ml) et donc présent en plus grande quantité dans la phase aqueuse en contact avec le cristal ATR. Lorsque les complexes amylose-acide hexanoïque précipitent sur le cristal ATR, la proportion relative de solvant, et donc d'acide hexanoïque solubilisé, entrant en

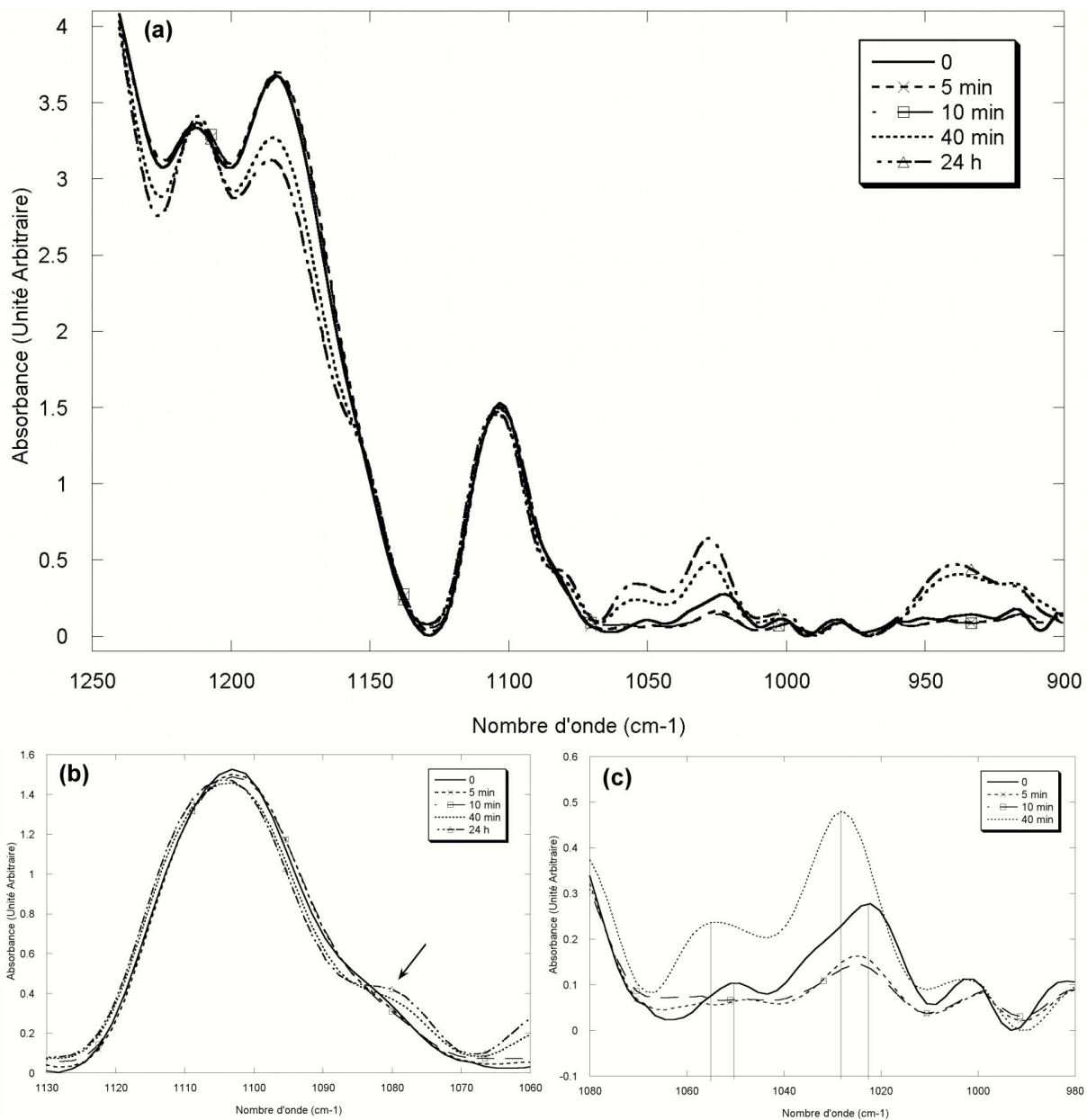


FIGURE 2.11 – Évolution des spectres infrarouges de 1240 à 900 cm^{-1} au cours de la formation des complexes amylose-acide hexanoïque.

contact avec le cristal diminue.

La figure 2.10B présente l'évolution de la première composante principale au cours des trois premières heures. Comme la complexation de l'amylose et l'acide décanoïque, la complexation avec l'acide hexanoïque débute par une première phase de quelques minutes, suivie d'une deuxième phase qui atteint un plateau. Les diagrammes de diffraction réalisés après 10 minutes (B1), 40 minutes (B2) et trois heures (B3) confirment ce schéma. Le diagramme B1, réalisé après 10 minutes de complexation, présente un type cristallin V_{6I} (identifié après indexation des pics et superposition avec le diagramme B1 de la figure 2.8). Ceci implique que la mise en place des hélices d'amylose ait été très rapide, conformément à ce qui a été observé précédemment. Par ailleurs, la taille des cristallites (environ 4.5 ± 0.6 nm) dans le plan réticulaire 1 1 0 (7.4° , $\lambda_{CuK\alpha 1} = 0.15405$ nm)), très proche de celle calculée pour les complexes amylose-acide décanoïque, semble montrer que les mécanismes de nucléation sont très similaires au cas précédent. Ce type cristallin V_{6I} est malgré tout troublant étant donné que le diagramme observé après 40 minutes (diagramme B2) est de type V_{6II} (normalement attendu pour l'acide hexanoïque). Cela implique qu'il y ait eu une nucléation des cristaux en type V_{6I} puis une croissance des cristaux aboutissant à un type V_{6II} et donc un écartement des hélices au cours de cette période.

La phase suivante dont l'évolution est beaucoup plus lente correspond probablement à la croissance des cristaux et le plateau qui suit à leur précipitation. Ceci est confirmé par la mesure de la taille des cristaux suivant le plan 2 2 0 (V_{6II}) dont la réflexion correspond au pic observé à 9.24° . Cette mesure peut être comparée à celle calculée à partir du pic de diffraction à 7.4° des diagrammes de type V_{6I} car les deux mailles cristallines sont de type orthorhombique et ces pics correspondent aux réflexions des plans 1 1 0 (V_{6I}) et 2 2 0 (V_{6II}). Les mesures suivant ces plans considèrent donc les distances dans la même direction.

La taille des cristaux augmente, ainsi, d'environ 4.5 nm \pm 0.6 nm après 10 minutes jusqu'à 30 ± 2 nm après 40 minutes puis reste constante puisqu'elle est de 28 ± 2 nm après trois heures et 24 heures.

La figure 2.11 présente les spectres infrarouges correspondant à chacune des étapes de la

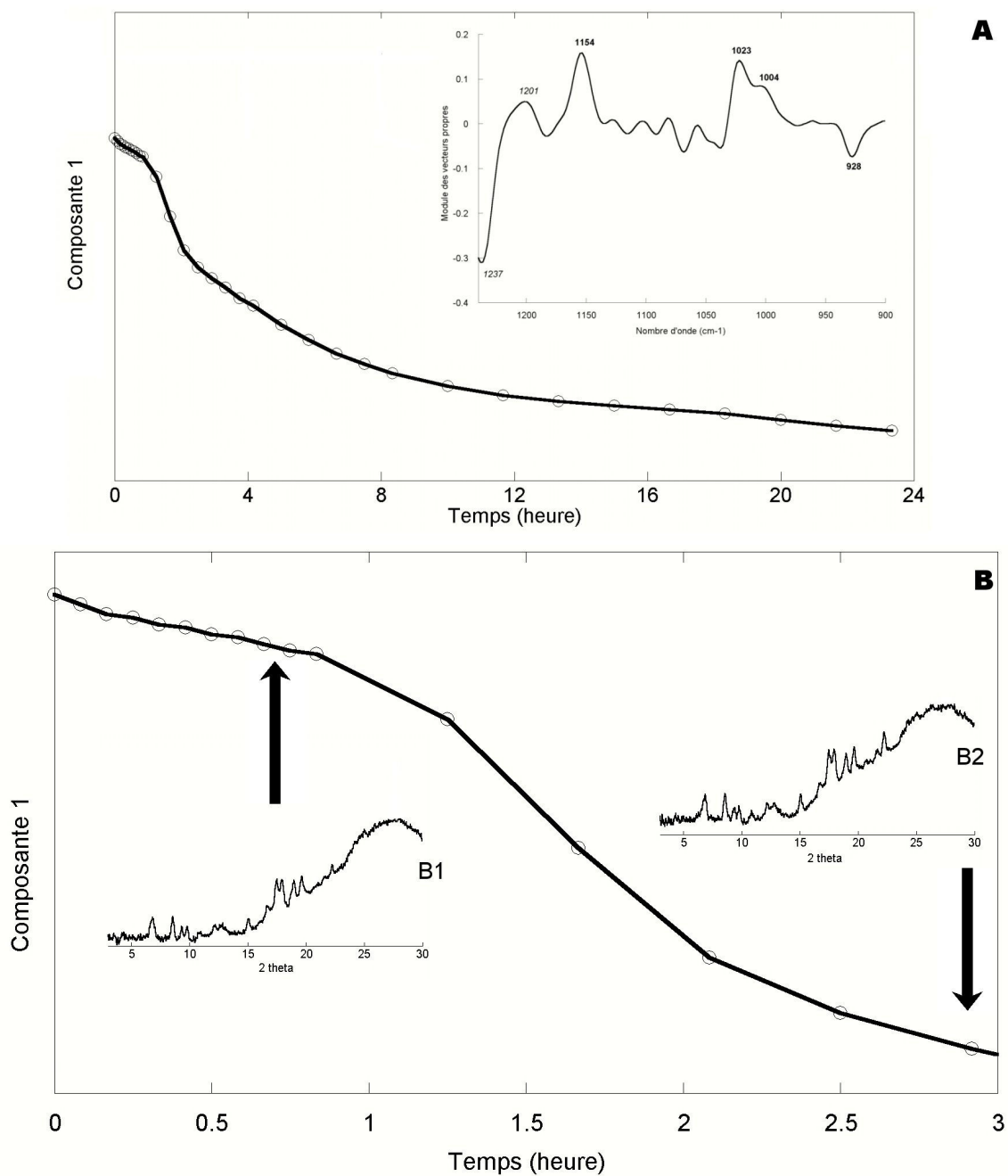


FIGURE 2.12 – Cinétique de complexation de l'amylose avec la δ -décalactone (A) suivi par infrarouge de 24 heures (B) zoom sur les trois premières heures.

complexation mise en évidence précédemment. L'interprétation visuelle de ces spectres est difficile en raison de bandes d'absorption de l'acide hexanoïque plus intenses que dans le cas de l'acide décanoïque. Ceci est probablement dû à la quantité plus importante d'acide hexanoïque solubilisé (cf. ci-dessus) dans le milieu. Il semble que la complexation entraîne certaines modifications des spectres infrarouge, notamment la bande d'absorption située à 1080 cm^{-1} (Tableau 2.2, page 240). Cette bande est en effet non visible en début de cinétique (noyée sous une bande d'absorption de l'acide hexanoïque à 1100 cm^{-1}), elle apparaît progressivement à partir de 40 minutes de complexation (Figure 2.11(b)).

D'autres changements concernant l'amylose sont également visibles dans la région spectrale comprise entre 980 et 1070 cm^{-1} . En effet, les pics observés à 1050 et 1022 cm^{-1} se décalent au cours de la complexation vers 1055 et 1028 cm^{-1} . Ces bandes correspondent à des vibrations de liaisons C-O-H, il est peut-être possible que ce décalage, progressif au cours du temps, soit lié à l'établissement de liaisons hydrogène entre les hélices voisines pendant la croissance de l'édifice cristallin car de telles liaisons existent dans le cas de complexes de type V_{6I} (Rappenecker et Zugenmaier, 1981).

2.3.3 Cinétique de complexation de l'amylose et de la δ -décylactone

La cinétique de complexation de la δ -décylactone est présentée sur la figure 2.12A. Le profil spectral de la première composante intègre des bandes d'absorption dues à la δ -décylactone à 1237 et 1201 cm^{-1} , et les bandes d'absorption de l'amylose situées à 1023 et 1004 . La bande observée à 928 cm^{-1} est probablement commune aux deux molécules. La complexation de l'amylose et de la δ -décylactone semble être moins rapide que les deux précédentes cinétiques étudiées. Elle présente une première phase de lente évolution au cours de la première heure, suivie d'une deuxième, illustrée par une décroissance de la courbe qui tend vers un plateau après neuf à dix heures de complexation sans pour autant l'atteindre (Figure 2.12B). Contrairement aux deux cas précédents, il n'a pas été possible d'étudier la structure obtenue dans les premières minutes de la complexation, faute de précipité formé dans la solution. Le deuxième prélèvement, effectué après une quarantaine de minutes de complexation révèle un diagramme

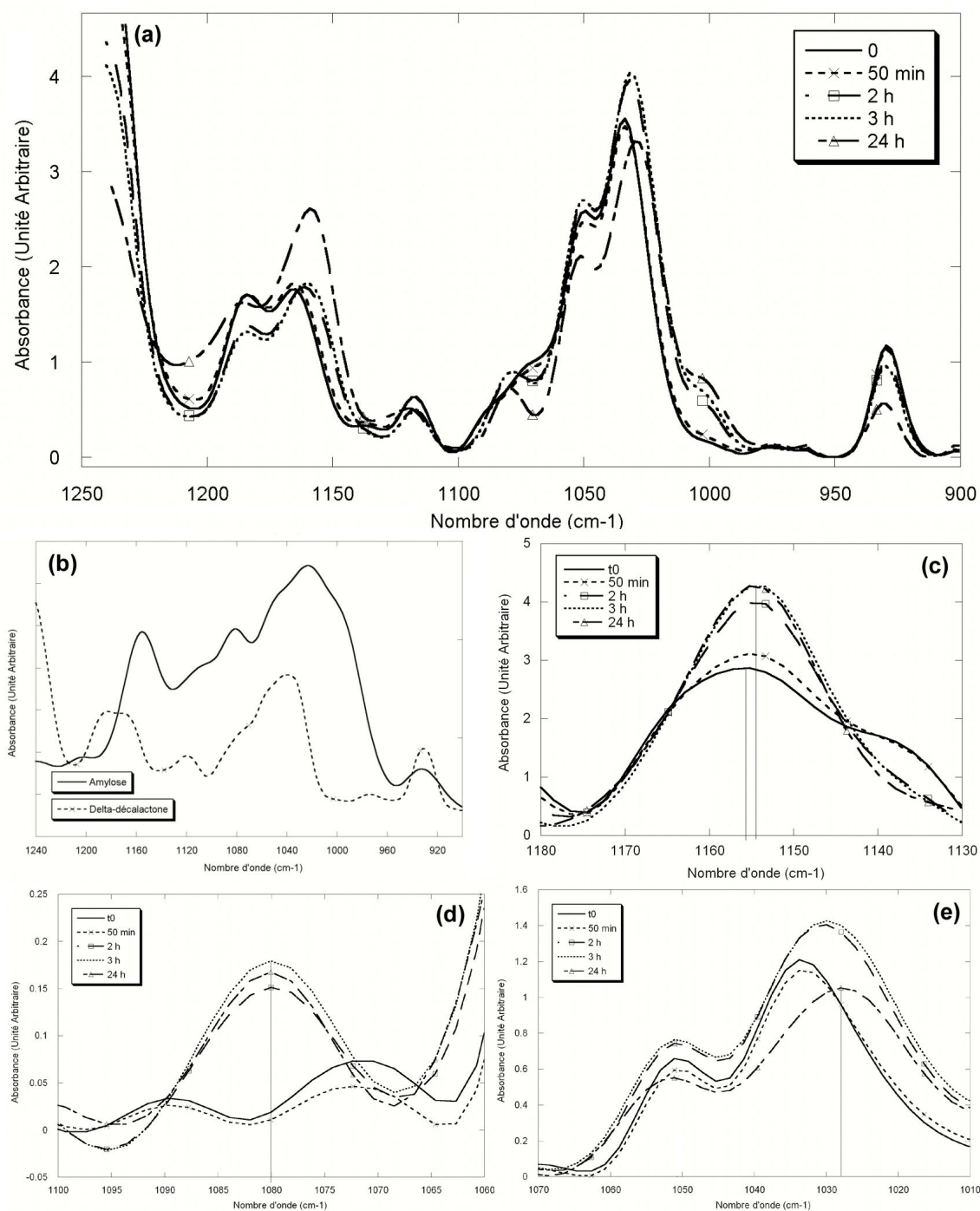


FIGURE 2.13 – Évolution des spectres infrarouges de 1240 à 900 cm^{-1} au cours de la formation des complexes amylose-acide δ -déalactone. Sauf (b), superposition des spectres infrarouge de l'amylose et de la δ -déalactone. (c), (d) et (e) Spectres infrarouge des complexes après soustraction du spectre de la δ -déalactone.

de diffraction caractéristique du type cristallin V_{6III} (diagramme B1). La croissance des cristaux semble avoir principalement eu lieu au cours de la première heure puisque les distances mesurées suivant le plan 2 2 0 (pic à 8.56°) sont respectivement de $27 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$, $27 \pm 2 \text{ nm}$ et $28 \pm 2 \text{ nm}$ après 40 minutes, trois heures et 24 heures de complexation.

L'interprétation visuelle de l'évolution des spectres infrarouge pris au cours de la complexation (Figure 2.13(a)) est rendue difficile par la présence de pics d'absorption communs à l'amylose et la δ -décylactone (Figure 2.13(b)). Certains changements peuvent cependant être mis en évidence après soustraction du spectre infrarouge de la δ -décylactone, aux spectres enregistrés après 50 minutes, deux heures, trois heures et 24 heures de complexation. Il semble ainsi que la bande d'absorption de la liaison osidique située à 1156 cm^{-1} se décale vers 1154 cm^{-1} au cours de la première heure de complexation (Figure 2.13(c)).

De façon similaire à la complexation de l'amylose et de l'acide hexanoïque, l'intensité de la bande d'absorption située à 1080 cm^{-1} apparaît progressivement au cours de la phase de décroissance observée sur la cinétique (Figure 2.13(d)). Enfin, il semble qu'il y ait un décalage de la bande à 1033 cm^{-1} vers 1027 cm^{-1} (Figure 2.13(e)). Cette bande étant généralement située entre 1020 et 1025 cm^{-1} (Tableau 2.2, page 240), ce décalage est très probablement dû à la présence d'une bande d'absorption de la δ -décylactone dans cette région spectrale (1033 cm^{-1}).

2.3.4 Bilan de l'étude cinétique

Cette étude cinétique, réalisée sur trois types de complexe différents, a permis de montrer que la formation de complexes amylose-ligand peut être grossièrement décomposée en deux phases. La première phase concerne la formation des simple-hélices d'amylose, l'inclusion potentielle du ligand, et la nucléation des cristaux, tandis que la seconde correspond à la croissance et la précipitation des cristaux.

La première phase est plus ou moins rapide en fonction du ligand utilisé pour la complexation. Dans le cas de l'acide décanoïque et de l'acide hexanoïque, cette phase est très courte (quelques minutes). Elle semble être caractérisée par la mise en place d'une structure peu ordonnée de type V_{6I} qui peut être transitoire, comme lors de la complexation de l'acide hexanoïque.

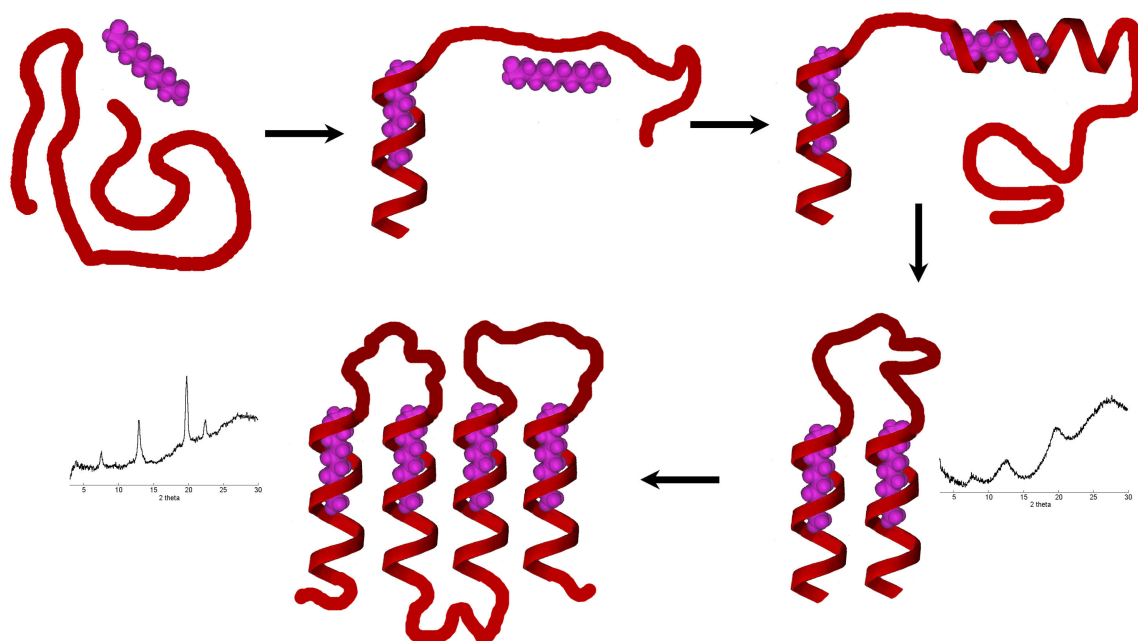


FIGURE 2.14 – Schéma possible de complexation de l'amylose et de l'acide décanoïque.

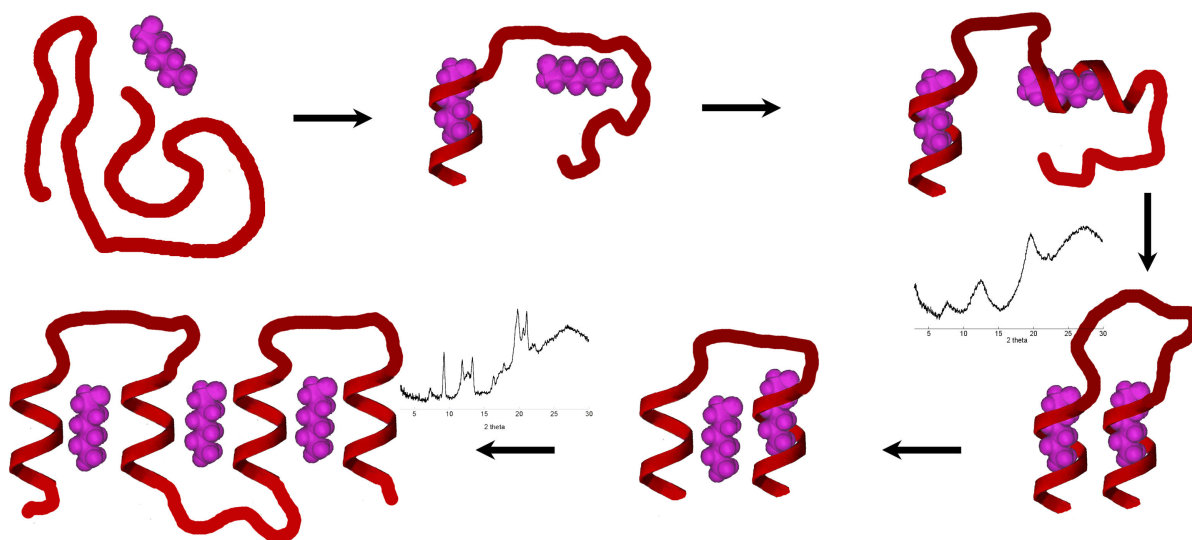


FIGURE 2.15 – Schéma possible de complexation de l'amylose et de l'acide hexanoïque.

La complexation de la δ -décylactone et de l'amylose pourrait faire intervenir un mécanisme différent aboutissant directement à un empilement cristallin de type V_{6III} . Cependant, l'absence de données de diffraction dans les premières minutes de complexation, lié à une précipitation plus tardive, ne permet pas de conclure. Par ailleurs, il semble que cette première phase entraîne des modifications des spectres infrarouge. Il est ainsi possible que le déplacement de la bande d'absorption de la liaison osidique, de 1152 vers 1150 cm^{-1} dans le cas de l'acide décanoïque et de 1156 vers 1154 cm^{-1} avec la δ -décylactone, puisse être provoqué par la formation des simples hélices. Cette hypothèse mériterait d'être approfondie. Un tel déplacement n'a pas été observé lors de la complexation de l'amylose et de l'acide hexanoïque car cette bande d'absorption est superposée avec une bande d'absorption très intense de l'acide hexanoïque.

La seconde phase de complexation correspond à la mise en place de l'empilement semi-cristallin "définitif", à la croissance des cristaux et leur précipitation. Elle nécessite en moyenne cinq à huit heures pour être achevée et semble être caractérisée en infrarouge, par une apparition progressive de la bande d'absorption de l'amylose située à 1080 cm^{-1} .

Ces résultats permettent de proposer un mécanisme de formation pour les différents complexes étudiés. Dans le cas du complexe amylose-acide décanoïque (Figure 2.14) et durant les premières minutes de complexation, des simple-hélices d'amylose s'organisent et commencent à s'associer pour former des embryons de cristaux de type V_{6I} , expliquant ainsi le diagramme de diffraction obtenu après cinq minutes de complexation (cristallinité faible et petits cristaux). Au cours des heures suivantes, la phase de croissance des cristaux aboutit à leur précipitation.

Le schéma de formation des complexes amylose-acide hexanoïque est vraisemblablement plus compliqué (Figure 2.15). De façon similaire au cas précédent, il semble que les hélices d'amylose se forment dans les premières minutes de la complexation et aboutissent à un type cristallin V_{6I} . Cependant, les résultats présentés dans le premier chapitre suggèrent une très mauvaise rétention de l'acide hexanoïque dans l'hélice d'amylose. Il est ainsi probable que l'acide hexanoïque présent dans les hélices "sorte" (équilibre dynamique entre l'intérieur et l'extérieur de l'hélice) de la cavité et vienne s'intercaler entre les hélices encore très mobiles et

peu organisées. Il est également possible des molécules d'acide hexanoïque solubilisées dans le milieu s'intercalent aussi entre les hélices. De cette façon, les hélices s'écartent et forment un empilement de type V_{6II} (Transition polymorphique V_{6I} vers V_{6II}). Ce dernier est ensuite stabilisé par la présence des couches amorphes entre les lamelles cristallines.

Les résultats expérimentaux ne permettent pas de définir un schéma de complexation de la δ -décalactone, mais il est probable que le mécanisme impliqué soit différent et aboutisse directement à un empilement de type V_{6III} .

2.4 Discussion

L'ensemble de cette étude a porté sur certains facteurs pouvant influencer la complexation des composés d'arôme par l'amylose. La concentration en complexant doit être suffisante pour saturer le milieu (solvant aqueux) afin de favoriser les interactions amylose-complexant. Dans le cas de molécules complexantes solubles dans l'eau une concentration importante suffit à provoquer ces interactions (cas de l'isopropanol ou du propylène glycol, ajout de 60 à 100 % (v/v)). En revanche, pour les molécules insolubles dans l'eau une bonne homogénéisation du milieu est nécessaire pour augmenter les interactions amylose-ligand et induire la complexation.

La température de mélange est également un facteur important. Il est préférable que celle-ci soit comprise entre 70 °C et 90 °C pour favoriser la cristallisation. Ainsi des complexes préparés à plus haute température seront mieux organisés et plus cristallins que des complexes préparés à une température plus basse.

Les températures de fusion élevées, globalement comprises entre 100 et 120 °C, montrent une grande stabilité thermique. Ces propriétés sont intéressantes dans le cadre d'une application industrielle. En effet des composés d'arôme peuvent être préalablement complexés à l'amylose puis ajoutés dans une préparation industrielle avant cuisson. Si la température au cœur du produit, lors de la cuisson, n'est pas supérieure à la température de fusion des complexes (100-120 °C), les complexes et les composés d'arôme seront préservés.

Enfin, si les conditions de concentration et de température sont réunies, la complexation est

un phénomène qui peut être très rapide (de l'ordre de quelques minutes). Les cinétiques observées sont compatibles avec le temps de cuisson d'une génoise. Il est ainsi probable que la complexation d'un composé d'arôme dépende plus de ces capacités d'interaction avec l'amylose que du procédé technologique en lui-même.

Chapitre 3

Inclusion des composés d'arôme et influences sur leur libération

Il existe une très grande variété de molécules qui peuvent complexer l'amylose. Les classes chimiques de ces molécules sont très différentes. Des complexes ont ainsi été obtenus avec des alcools, des acides gras, des aldéhydes et des molécules aromatiques. Des molécules ayant des structures très différentes comme par exemple la γ -décylactone et l'acide butyrique forment des complexes cristallins de type V_{6III} . Au contraire, des molécules quasiment identiques peuvent avoir des comportements très différents. Ainsi, le citral et le géraniol ne diffèrent que par la fonction carbonyle du premier et la fonction alcool du second (Figure 3.1), pourtant le citral ne complexe pas avec l'amylose alors que le géraniol forme des complexes de type V_{6III} dans des conditions identiques (Nuessli et al., 2003). De la même façon, la dihydrocoumarine et l' α -naphthol (Yamashita et Monobe, 1971) qui sont constituées de deux cycles à six atomes (Figure 3.1) forment respectivement des complexes V_{6III} et V_8 . En outre, certaines molécules requièrent des conditions très strictes pour pouvoir former des complexes avec l'amylose tandis que d'autres complexent l'amylose avec une grande facilité quelles que soient les conditions expérimentales. Il est donc très difficile d'appréhender les caractéristiques structurales ou chimiques requises pour qu'une molécule puisse complexer l'amylose. Une étude par modélisation moléculaire de l'inclusion des composés d'arôme dans l'hélice d'amylose a été menée afin de

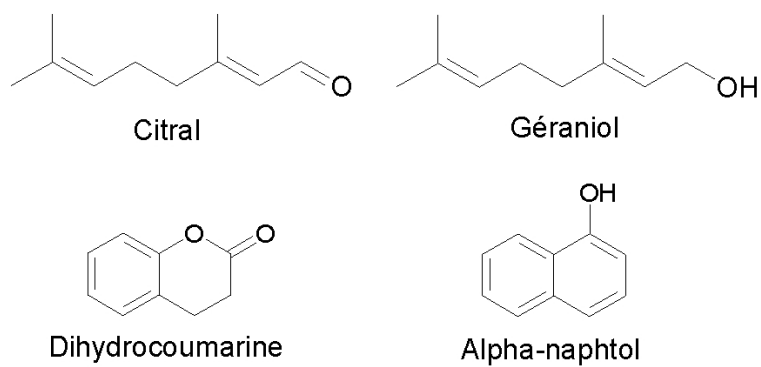


FIGURE 3.1 – Formules chimiques du citral, du géranol, de la dihydrocoumarine et de l' α -naphtol.

d'identifier les composés d'arôme susceptibles d'être inclus dans une simple hélice 6_5 d'amylose.

3.1 Inclusion des composés d'arôme

L'objectif de ce travail est d'étudier les possibilités d'inclusion des 20 molécules qui constituent l'arôme viennoiserie, du linalol et de la menthone, dans l'hélice d'amylose. Pour cela une hélice d'amylose à six résidus glucosyl par tour et un pas de 0.805 nm (trois tours) a été construite à partir des coordonnées cristallographiques déterminées par Rappenecker et Zugmaier (1981). Après la construction des 22 molécules, leurs conformations spatiales les plus stables ont également été recherchées car elles vont influencer l'adéquation entre la molécule incluse et l'espace disponible dans la cavité de l'hélice.

3.1.1 Recherche des conformations stables des composés d'arôme

Toutes les molécules de l'arôme, ainsi que le linalol et la menthone, ont été construites et minimisées sur l'ensemble des paramètres internes (longueur des liaisons atomiques, déformations des angles de valence et des angles dièdres). Pour les molécules ayant une chaîne aliphatique (acides carboxyliques et esters principalement), seule la conformation de la chaîne aliphatique la plus étirée (donc la plus linéaire) a été considérée.

Dans le cas du propylène glycol, du linalol et de la menthone qui possèdent un ou plusieurs carbones asymétriques, toutes les conformations et combinaisons de conformations R et/ou S ont été envisagées et chacun des stéréoisomères construits. Par exemple, la menthone, avec deux carbones asymétriques, peut être de conformation 2R5R, 2R5S, 2S5R ou 2S5S.

D'autres molécules (comme les lactones, les esters ou encore le linalol) présentent des liaisons dont la libre rotation permet de modifier de façon importante la géométrie spatiale de la molécule. La rotation autour de ces liaisons est définie par des angles dièdres (Φ ou T1 et Ψ ou T2) de part et d'autre de cette liaison. Ils ont été utilisés pour réaliser des cartes isoénergétiques exprimant l'énergie de la molécule en fonction des deux angles. La figure 3.2 (page 262) pré-

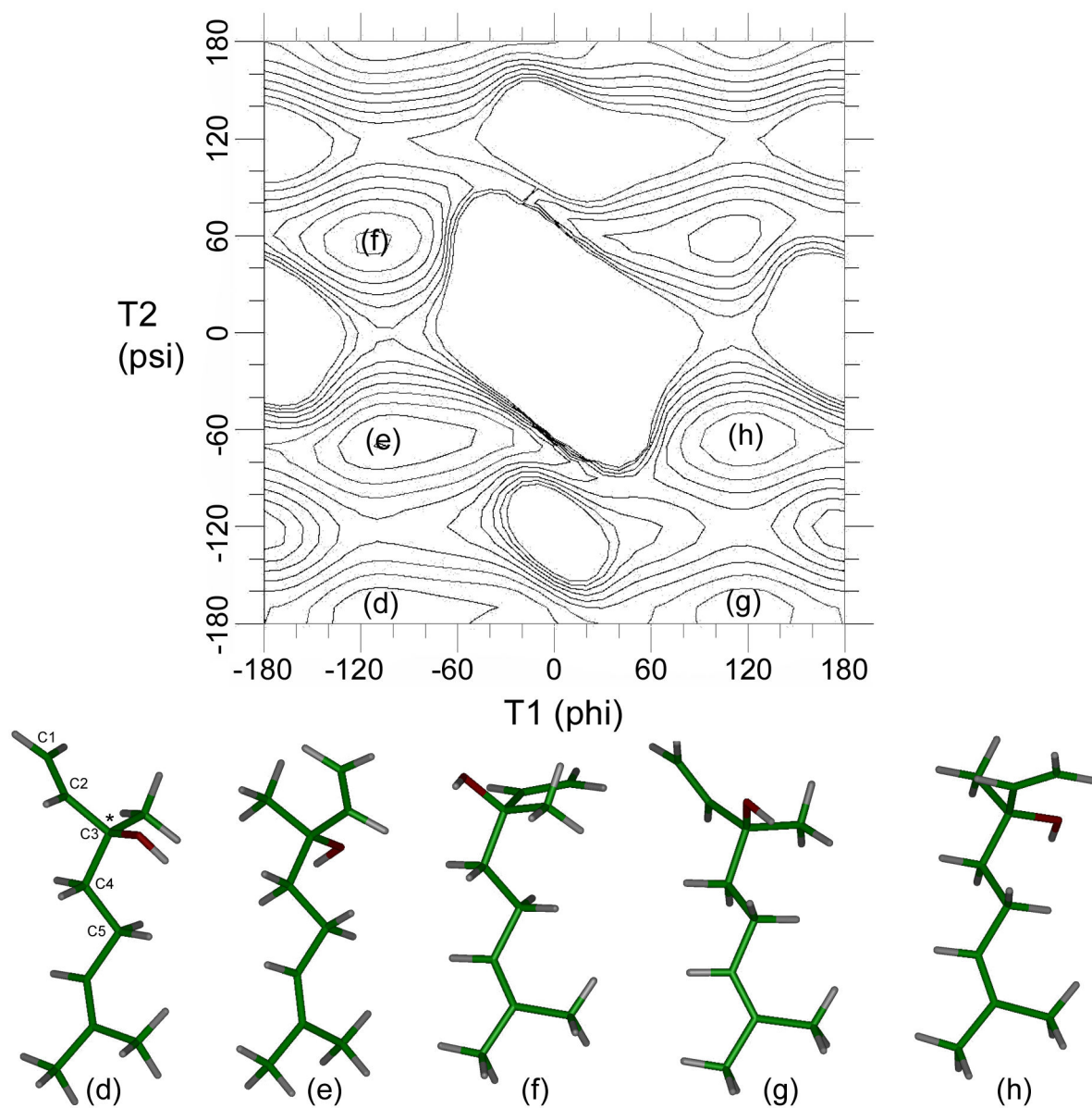


FIGURE 3.2 – Carte isoénergétique calculée pour le stéréoisomère S du linalol en fonction des angles φ et Ψ , définis respectivement comme les angles dièdres C1-C2-C3-C4 et C2-C3-C4-C5 et cinq conformères de plus basse énergie. Le carbone asymétrique est indiqué par * sur le premier modèle.

sente la carte isoénergétique obtenue pour la conformation S du linalol en fonction des angles Φ (T1) (C1-C2-C3-C4) et Ψ (T2) (C2-C3-C4-C5) et exprime donc l'énergie conformationnelle du linalol en fonction de la rotation autour de la liaison C3-C4. Elle montre cinq minima (notés d, e, f, g et h) énergétiques pour les combinaisons d'angles Φ/Ψ $-108.35^\circ/179.91^\circ$, $-102.69^\circ/-57.25^\circ$, $-111.13^\circ/59.17^\circ$, $117.49^\circ/-173.35^\circ$ et $118.41^\circ/60.53^\circ$. L'énergie après minimisation des cinq conformations n'étant pas significativement différente (respectivement -35.6 kcal/mol, -35 kcal/mol, -33.5 kcal/mol, -33.7 kcal/mol et -33.3 kcal/mol), les cinq modèles ont été conservés pour étudier leur inclusion dans l'hélice.

Cette stratégie a permis de construire plusieurs modèles pour neuf des 22 molécules : deux (a et b) pour le cinnamate de méthyle et le propylène glycol, trois modèles (a, b et c) pour la γ -décalactone, la δ -décalactone, l'acétate d'éthyle, l'hexanoate d'éthyle et le butyrate d'éthyle, quatre modèles (a, b, c et d) pour la menthone et huit modèles (de a à h) pour le linalol (trois de conformation R et cinq de conformation S). Cela représente un total de 41 modèles pour les 22 molécules.

3.1.2 Inclusion des molécules dans la simple hélice d'amylose

3.1.2.1 Recherche systématique des solutions d'inclusion

Une recherche systématique des solutions d'inclusion a été réalisée. Les résultats, également présentés sous forme de cartes isoénergétiques, rendent compte de l'énergie d'interaction entre l'amylose et le composé d'arôme en fonction de la rotation le long de l'axe de l'hélice et de la translation de la molécule incluse par rapport au barycentre de l'hélice. En exemple, la figure 3.3 (page 264) présente la carte isoénergétique obtenue pour l'inclusion d'un conformère de l'hexanoate d'éthyle (modèle c). Cette carte montre des minima énergétiques pour six combinaisons d'angles de rotation et de translation. Les quatre solutions d'inclusion de plus basse énergie correspondent aux modèles notés (c1) à (c4) (coupe longitudinale et vue de dessus).

Des modèles d'inclusion potentiels ont été proposés pour chacune des 22 molécules, avec des énergies d'interactions variant de -40 kcal/mol pour les molécules les plus linéaires comme

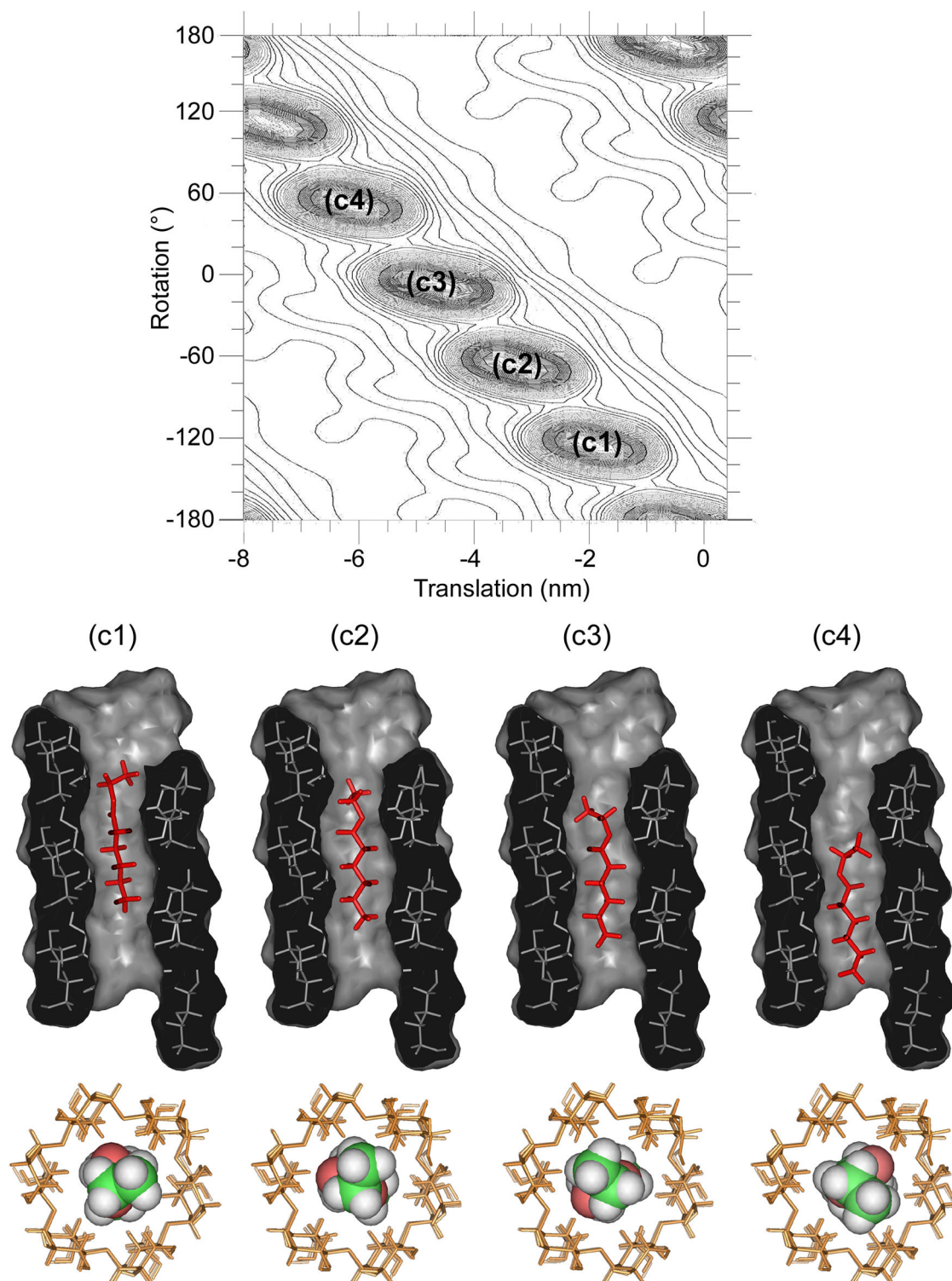


FIGURE 3.3 – Carte de rotation/translation obtenue pour l'inclusion de l'hexanoate d'éthyle dans l'hélice d'amylose et quatre solutions d'inclusion de plus basse énergie.

les acides gras à 200 kcal/mol pour les molécules plus volumineuses comme la dihydrocoumarine. Ces énergies peuvent être comparées pour plusieurs conformations ou solutions d'inclusion d'une même molécule mais ne sont pas strictement comparables pour les inclusions de molécules différentes. Il est cependant possible d'admettre que les différences d'énergie observées ont une certaine signification. Dans tous les cas, aucune des solutions d'inclusion ne peut être rejetée sans minimisation énergétique. Par conséquent, un total de 218 modèles d'inclusion a été conservé pour la suite de l'étude.

3.1.2.2 Minimisation énergétique des modèles d'inclusion en situation contrainte

Les modèles d'inclusions issus des opérations de rotation/translation ont été optimisés par modélisation moléculaire en ne relaxant que les hydrogènes de l'amylose (le squelette de l'hélice d'amylose est rigide) et les atomes du composé d'arôme inclus. Après 10000 itérations, toutes les solutions d'inclusion ont une énergie d'interaction comprise entre -44 kcal/mol et -4 kcal/mol (Tableau 3.1, page 266). Ces énergies, relativement faibles, montrent que chaque composé d'arôme peut potentiellement être inclus dans la cavité de l'hélice d'amylose contrainte et identique à celle définie par Rappenecker et Zugenmaier (1981).

Les énergies d'interaction calculées permettent de séparer les composés d'arôme en deux catégories. La première catégorie regroupe les solutions d'inclusion ayant les plus basses énergies d'interaction. Elle concerne essentiellement les molécules qui ont pu être complexée dans les conditions choisies pour cette étude. Il s'agit de l'acide décanoïque, les γ - et δ -décalactone, l'hexanoate d'éthyle, l'acide hexanoïque et le cis-3-hexen-1-ol mais aussi du butyrate d'éthyle et d'une conformation du cinnamate de méthyle (a), qui n'ont pas été complexés.

Le second groupe est constitué des solutions d'inclusion dont les énergies d'interaction sont les plus élevées et concerne principalement les molécules qui n'ont pas montré de capacité à complexer l'amylose (le benzaldéhyde, le cinnamate de méthyle (conformère a), le citral, le furanéol, le maltol, le sulfurol et la vanilline). Cette catégorie contient également des solutions d'inclusion obtenues avec de bons complexants de l'amylose : le linalol, la menthone, la dihydrocoumarine, l'acide butyrique et deux conformères (b et c) de la δ -décalactone. Sachant que

Type	Molécule	Energie d'interaction	Energie d'interaction	RMS
cristallin	(Solubilité dans l'eau à 25 °C(g/L))	Hélice contrainte (kcal/mol)	Hélice libre (kcal/mol)	
V _{6I}	Ac. décanoïque (0.062)	-44	-46	0.41
	Propylène glycol (>100)	-19	-20	0.44
V _{6II}	Ac. hexanoïque (10)	-30	-31	0.40
	Cis-3-hexen-1-ol (16)	-29	-29	0.41
	Hexanoate d'éthyle (0.63)	-39	-39	0.40
V _{6III}	Ac. butyrique (6)	-24	-24	0.39
	γ-décalactone (0.29)	-39	-42	0.43
	δ-décalactone (a) (0.39)	-35	-41	0.41
	δ-décalactone (b, c)	-21	-41	0.48
	3,4-dihydrocoumarine (<1)	-15	-34	0.48
	Linalol (1.6)	-17	-35	0.51
	Menthone (0.69)	-4	-32	0.53
B	Acétoïne (1000)	-22	-23	0.41
Rétrogradé	Acétate d'éthyle (80)	-26	-26	0.38
	Benzaldéhyde (<0.1)	-14	-25	0.43
	Butyrate d'éthyle (4.9)	-32	-32	0.40
	Cinnamate de méthyle (a) (0.38)	-31	-39	0.42
	Cinnamate de méthyle (b)	-22	-37	0.46
	Citral (1)	-22	-37	0.46
	Diacétyl (210)	-19	-22	0.40
	Furanéol (18.5)	-16	-27	0.43
	Maltol (10)	-13	-30	0.46
	Sulfurol (21.4)	-11	-26	0.47
	Vanilline (11)	-25	-38	0.44

TABLEAU 3.1 – Énergies d'interaction après minimisation des modèles d'inclusion, en situation contrainte ou relâchée et RMS évalué pour chaque composé d'arôme. **Texte gras** : molécules du groupe I, texte normal : molécules du groupe II. Les lettres entre parenthèses correspondent aux différentes conformations lorsqu'elles ont montré des différences significatives.

ces molécules induisent un type cristallin V_{6III} et sont positionnées entre les hélices d'amylose, elles pourraient induire la formation de la simple-hélice sans pouvoir être présentes dans la cavité après la précipitation.

La figure 3.4 (page 268) présente un modèle d'inclusion de l'acide hexanoïque dans l'hélice d'amylose contrainte après minimisation énergétique. La chaîne aliphatique et le groupe carboxylique sont totalement inclus dans la cavité de l'hélice. L'énergie d'interaction finale est satisfaisante (-30 kcal/mol) et une liaison hydrogène peut être établie entre un oxygène glycosidique et l'hydrogène du groupe carboxylique de l'acide hexanoïque. Ce modèle d'inclusion ne présente aucun conflit stérique ni contact atomique entre l'amylose et le composé d'arôme. Ces résultats sont contraires à ceux obtenus par Godet et al. (1995b) qui avaient indiqué la présence possible de conflits stériques au-delà d'un certain seuil correspondant au positionnement du troisième carbone de l'acide gras face à l'hydrogène porté par le C5 du premier résidu glucose de l'hélice (Godet et al., 1995b). L'absence de contact atomique entre l'amylose et la molécule incluse a également été vérifiée pour les modèles d'inclusion de l'acide décanoïque et les quatre modèles d'inclusion de l'hexanoate d'éthyle présentés sur la figure 3.3.

3.1.2.3 Minimisation énergétique des modèles d'inclusions en situation non-contrainte

Au cours de cette étape de minimisation énergétique, tous les atomes de l'amylose et de la molécule incluse ont été relaxés. L'énergie d'interaction de chaque solution d'inclusion après minimisation est alors comprise entre -46 et -20 kcal/mol (Tableau 3.1). Au cours de l'optimisation, l'hélice d'amylose peut être fortement déformée, ce qui explique l'écart plus faible entre les énergies les plus extrêmes par rapport à la situation précédente.

Les solutions d'inclusion des molécules complexant l'amylose ont une énergie d'interaction plus faible alors que les solutions d'inclusion des molécules non complexantes conduisent à une énergie d'interaction généralement supérieure. Cependant certaines molécules comme le cinnamate de méthyle et le citral ont des énergies d'interaction avec l'amylose très proches de celles des molécules complexantes. Au contraire, le propylène glycol et l'acide butyrique aboutissent

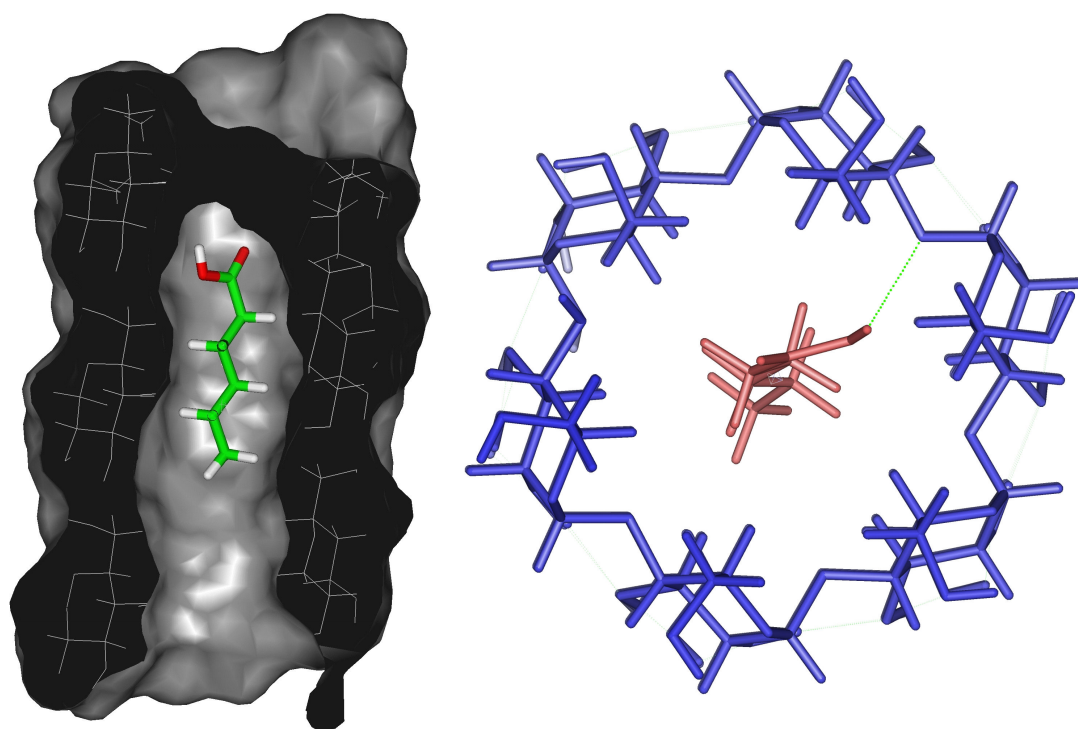


FIGURE 3.4 – Solution d’inclusion de plus basse énergie de l’acide hexanoïque. La fonction carbonyle de l’acide carboxylique est intégralement incluse dans la cavité hélicoïdale. Une liaison hydrogène (trait en pointillés) peut être établie entre l’oxygène d’une liaison glycosidique et l’hydrogène de la fonction carboxylique de l’acide hexanoïque.

à des solutions ayant des énergies d'interaction plus élevées. Il semble donc que ces énergies d'interaction soient plus corrélées au caractère hydrophobe de la molécule incluse, qu'à sa capacité réelle de complexation. Ainsi les molécules les plus hydrophiles (Tableau 3.1, page 266) comme le propylène glycol, l'acétoïne, le diacétyl, l'acide butyrique, l'acétate d'éthyle, le sulfurool et le furanéol donnent des solutions avec une énergie plus importante. Ceci peut être expliqué par la structure de l'hélice d'amylose qui présente une face externe plus hydrophile (fonctions hydroxyles des unités glucosyl orientées vers l'extérieur ou dans l'axe de l'hélice) et une face interne plus hydrophobe (hydrogènes portés par les unités glucosyl orientés vers l'intérieur de l'hélice)

Les résultats des deux types de minimisation ne permettent pas de statuer clairement sur les possibilités d'inclusion des différents composés d'arôme. En revanche la comparaison systématique des énergies en situation contrainte et relâchée pour chaque molécule permet de mettre en évidence deux comportements bien différents.

Le premier comportement (groupe I) concerne la plupart des molécules complexées expérimentalement : l'acide décanoïque, le propylène glycol, l'acide hexanoïque, le cis-3-hexen-1-ol, l'hexanoate d'éthyle, l'acide butyrique et les γ - et δ -décalactone. Ce comportement concerne, en outre, l'acétate d'éthyle, l'acétoïne, le butyrate d'éthyle et le diacétyl qui n'ont pas formé de complexes avec l'amylose dans les conditions utilisées. Indépendamment des valeurs des énergies d'interaction, les solutions d'inclusion de ces molécules ne montrent aucune différence significative (moyenne 1.6 kcal/mol, max. 6 kcal/mol) d'énergie d'interaction entre la situation contrainte et la situation relâchée. Cela signifie que ces molécules ne subissent pas de contrainte particulière lorsqu'elles sont incluses dans l'hélice cristallographique de Rappenecker et pourraient ainsi être présentes dans un empilement cristallin.

Le deuxième comportement (groupe II) observé est caractérisé par une différence importante d'énergie d'interaction entre la situation contrainte et la situation relâchée. Les énergies d'interaction des solutions d'inclusion des molécules ayant ce comportement sont toujours inférieures lorsque l'hélice n'est pas fixée. Cette différence est en moyenne de 16.7 kcal/mol

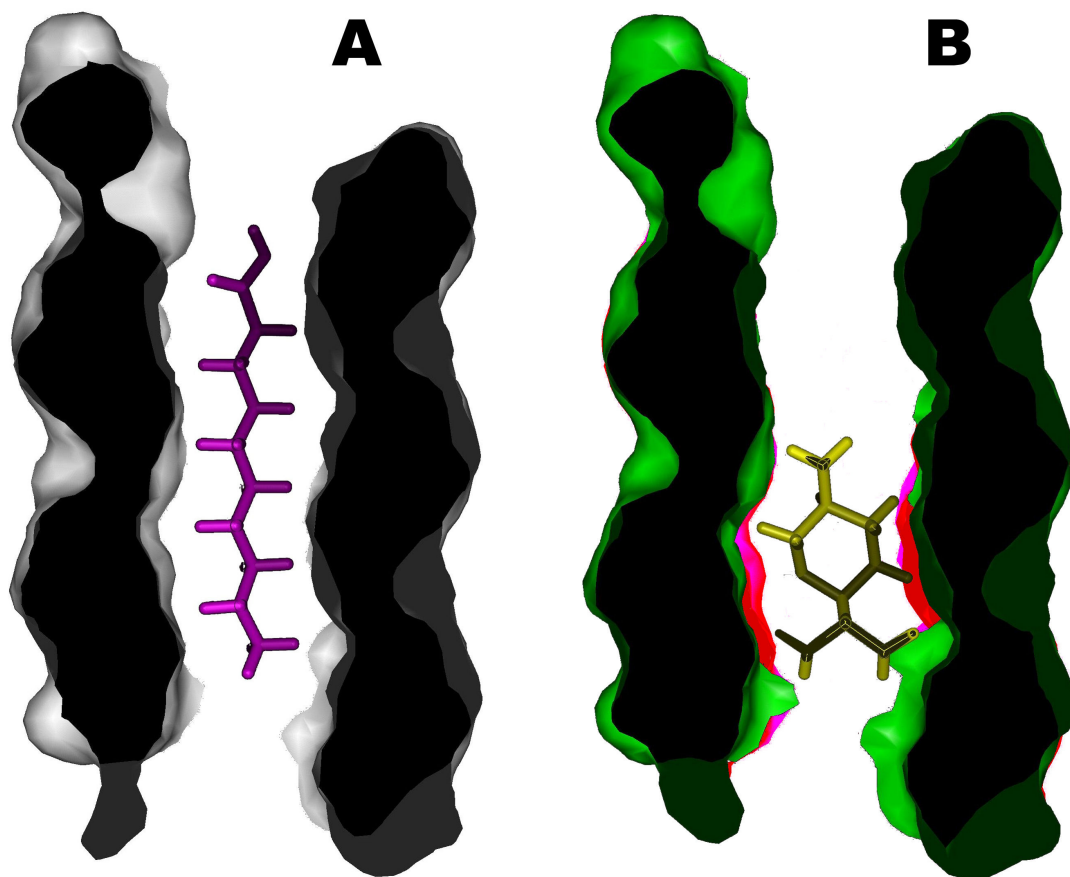


FIGURE 3.5 – Coupe longitudinale de solutions d'inclusion A. de l'acide décanoïque B. de la menthone. Les zones rouges correspondent à la déformation la cavité interne de l'hélice imposée par la présence de la menthone.

(min. 8 kcal/mol, max. 36 kcal/mol) pour la dihydrocoumarine, le linalol, la menthone, deux conformations de la δ -décalactone (b et c), le benzaldéhyde, le cinnamate de méthyle, le citral, le furanéol, le maltol, le sulfurol et la vanilline. Au contraire des molécules du groupe I, celles-ci sont probablement trop volumineuses pour être incluses dans l'hélice d'amylose sans induire une certaine déformation.

3.1.2.4 Mesure de la déformation de l'hélice

La mesure des déplacements moyens des positions atomiques (Root Mean Square displacement, RMS) de l'amylose entre la situation où l'hélice est fixée et celle où elle est libre permet d'évaluer la déformation de l'hélice liée à la présence du complexant dans la cavité. Le RMS, obtenu après superposition des structures contraintes et non contraintes, a également été déterminé pour l'hélice d'amylose vide. Cette stratégie a permis de définir une déformation "étalon" de l'hélice en absence de contrainte liée à l'empilement cristallin. Elle a été évaluée à 0.43.

Toutes les molécules du groupe I ont conduit à des solutions d'inclusion pour lesquelles le RMS (Tableau 3.1, page 266) est toujours inférieur ou égal à celui de l'hélice vide (de 0.38 à 0.44, moyenne 0.41). Cela signifie que ces molécules n'induisent aucune déformation de l'hélice lorsqu'elles sont incluses et explique le fait qu'il n'y ait pas de différence d'énergie entre les deux situations. En outre, il est très probable que leur inclusion stabilise la structure hélicoïdale puisque la déformation de l'hélice en leur présence est souvent inférieure à la déformation de l'hélice vide. Ainsi, ces molécules peuvent probablement être incluses dans l'hélice cristallographique.

Les molécules appartenant au groupe II aboutissent à des solutions d'inclusion pour lesquelles le RMS est généralement supérieur à celui de l'hélice vide (moyenne 0.48). La figure 3.5 présente une solution d'inclusion de l'acide décanoïque (RMS 0.41) (A) et de la menthone (RMS 0.53) (B), elle montre que l'inclusion de la menthone impose une déformation locale de l'hélice. Les molécules appartenant à ce groupe sont donc, vraisemblablement, trop volumineuses pour être incluse dans l'hélice cristallographique d'amylose. Cependant les RMS déterminés après inclusion d'un conformère du cinnamate de méthyle (a), du benzaldéhyde

et du furanéol sont égaux ou légèrement inférieurs à celui de référence (0.43). Ces molécules n'induisent pas de déformation de l'hélice et leur incapacité à complexer l'amylose n'est probablement pas due à leur volume.

3.1.3 Bilan sur l'inclusion des composés d'arôme

Cette étude a montré que les composés d'arôme étudiés peuvent être regroupés en deux catégories. Pour les molécules appartenant au groupe I, l'énergie d'interaction amylose-ligand est indépendante des conditions de minimisation (hélice libre ou fixée) et la déformation moyenne de l'hélice est inférieure ou égale à la déformation de référence. La présence de la molécule dans la cavité hélicoïdale n'a pas d'influence sur cette déformation et peut stabiliser l'hélice par des liaisons hydrogène (figure 3.4, page 268) ou des interactions hydrophobes.

L'inclusion des composés d'arôme appartenant au groupe II conduit à des différences importantes d'énergie d'interaction entre les situations contrainte et relâchée, ainsi qu'une déformation de l'hélice supérieure à celle de référence. Ces molécules ne sont probablement pas présentes dans les cavités hélicoïdales de l'amylose impliquée dans les lamelles cristallines.

Toutes les molécules de l'arôme qui forment des complexes V_{6I} et V_{6II} appartiennent à la première catégorie. La maille cristalline du type cristallin V_{6I} présente un espace entre les hélices très restreint, les molécules complexantes peuvent être positionnées à l'intérieur de l'hélice (Godet et al., 1995b) ou totalement absente comme pour les alcools à courte chaîne (Whittam et al., 1989). L'acide décanoïque, avec un RMS inférieur à 0.43 et une énergie d'interaction très faible ($\simeq -45$ kcal/mol), est présent dans l'hélice. En outre, la très grande résistance de ces complexes à l'hydrolyse acide et les dosages réalisés confortent cette idée. En comparaison, le propylène glycol semble avoir moins d'affinité pour l'amylose car l'énergie d'interaction du complexe est plus importante (-20 kcal/mol) et le RMS calculé, proche (et même légèrement supérieur) à celui de l'hélice seule. Le propylène glycol pourrait donc induire la formation des hélices sans rester présent dans les lamelles cristallines comme dans le cas des alcools à courte chaîne aliphatique.

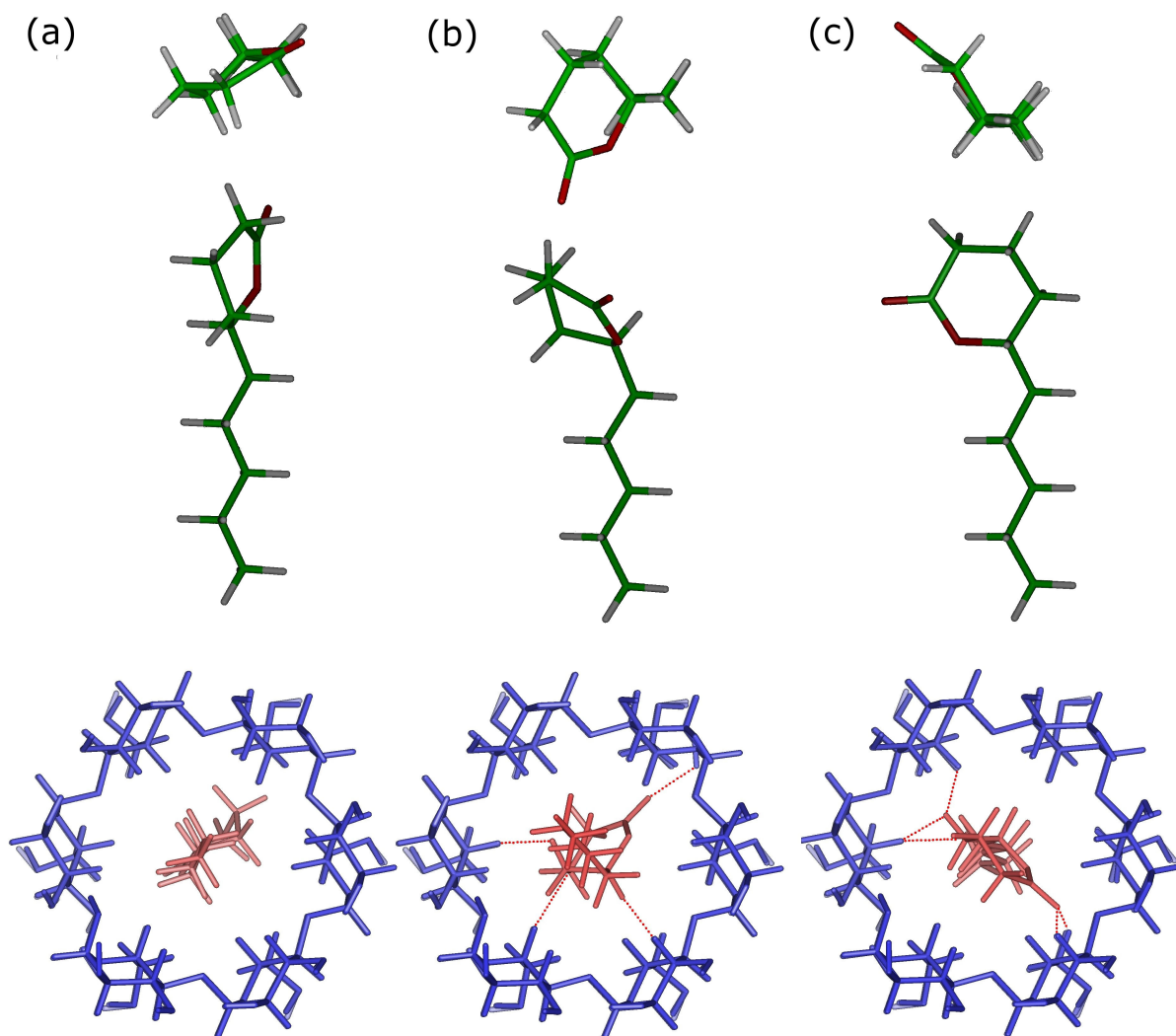


FIGURE 3.6 – Représentation des trois conformères les plus stables de la δ -décalactone. Le conformère (a), le plus linéaire, est le seul à pouvoir être inclus dans l'hélice 6_5 d'amylose sans aucun contact atomique (traits pointillés).

L'acide hexanoïque, l'hexanoate d'éthyle et le cis-3-hexen-1-ol conduisent tous trois à des complexes de type V_{6II} . Ces molécules sont donc nécessairement présentes entre les hélices d'amylose. Les résultats des hydrolyses et lavages menés sur les complexes amylose-acide hexanoïque ont montré que l'acide hexanoïque n'est pas présent à l'intérieur des hélices, sans doute dû à la longueur de sa chaîne aliphatique. Les énergies d'interaction déterminées pour l'inclusion du cis-3-hexen-1-ol sont proches de celles de l'acide hexanoïque ce qui laisse penser que le cis-3-hexen-1-ol pourrait être présent, uniquement, entre les hélices. En revanche, le cas de l'hexanoate d'éthyle est très similaire à celui de l'acide décanoïque en terme d'énergie d'interaction. Elle est identique quelles que soient les conditions de minimisation. Ainsi, l'hexanoate d'éthyle pourrait être présent à l'intérieur de l'hélice mais aussi entre les hélices dans les complexes cristallins. Cependant, la modélisation moléculaire n'apporte aucune certitude et ces hypothèses mériteraient d'être vérifiées, par exemple par spectroscopie infrarouge.

Les molécules qui forment des complexes de type V_{6III} avec l'amylose peuvent appartenir aux deux groupes. L'acide butyrique et la γ -décalactone appartiennent au groupe I et peuvent par conséquent être présents dans l'hélice d'amylose mais également entre les hélices. En revanche, le RMS des complexes avec le linalol, la menthone et la dihydrocoumarine est bien supérieur à celui de l'hélice (respectivement 0.51, 0.53 et 0.48). En considérant que les hélices d'amylose ne peuvent pas être localement déformées sans modifier le diagramme de diffraction caractéristique du type V_{6III} , ces trois molécules sont probablement présentes uniquement entre les hélices dans les lamelles cristallines.

La δ -décalactone est un cas particulièrement intéressant puisque les conformères b et c appartiennent au groupe II et ne peuvent à priori pas être inclus dans la cavité de l'hélice de Rappenecker. En revanche, le conformère a, le plus linéaire, appartient au groupe I et peut donc être inclus dans l'hélice. Cette inclusion est illustrée sur la figure 3.6(a). Elle ne provoque aucun contact atomique entre l'amylose et la δ -décalactone. De plus, une liaison hydrogène

(non représentée) entre l'oxygène de la fonction carbonyle de la δ -décylactone et la fonction hydroxyle portée par un C2 d'une unité glucosyl permet de stabiliser cette inclusion.

En revanche, l'inclusion, dans l'hélice cristallographique, des deux autres conformations (Figure 3.6 (b) et (c)) conduit nécessairement à plusieurs contacts atomiques entre les deux molécules. Ils sont illustrés par les traits en pointillés sur la figure 3.6. Ces résultats montrent l'importance de la géométrie de la molécule lors de la complexation. Les trois conformations de la δ -décylactone a, b et c étant équiprobables, cela confirme l'hypothèse, évoquée à l'issue du premier chapitre, concernant la double localisation de la δ -décylactone dans et entre les hélices.

La majorité des molécules n'ayant pas complexé expérimentalement sont volumineuses (cycle ou ramification) mais sont aussi les molécules les plus hydrophiles (le benzaldéhyde mis à part). Certaines appartiennent au groupe II et d'autres au groupe I, comme l'acétate d'éthyle, l'acétoïne, le butyrate d'éthyle et diacétyle. Leur inclusion est envisageable mais leur grande solubilité dans l'eau défavorise certainement leur possibilité d'interaction avec l'amylose. Il est donc possible qu'en optimisant les conditions expérimentales ces molécules puissent former des complexes avec l'amylose.

L'inclusion d'une molécule dans la cavité de l'hélice d'amylose semble principalement gouvernée par sa géométrie et son caractère hydrophobe ou hydrophile. D'autres paramètres interviennent cependant car, malgré les grandes similarités (structure et hydrophobie) du géranol et du citral, le premier forme des complexes V_{6III} et le second ne semble pas avoir d'affinité pour l'amylose. L'inclusion de la molécule et les forces d'interactions amylose-composé d'arôme conditionnent vraisemblablement la stabilité du complexe et la facilité avec laquelle les molécules pourront être libérées.

3.2 Stabilité et conditions de libération

L'intérêt de la complexation de composés d'arôme par l'amylose réside essentiellement dans les possibilités de libération des molécules au moment de la consommation du produit. En

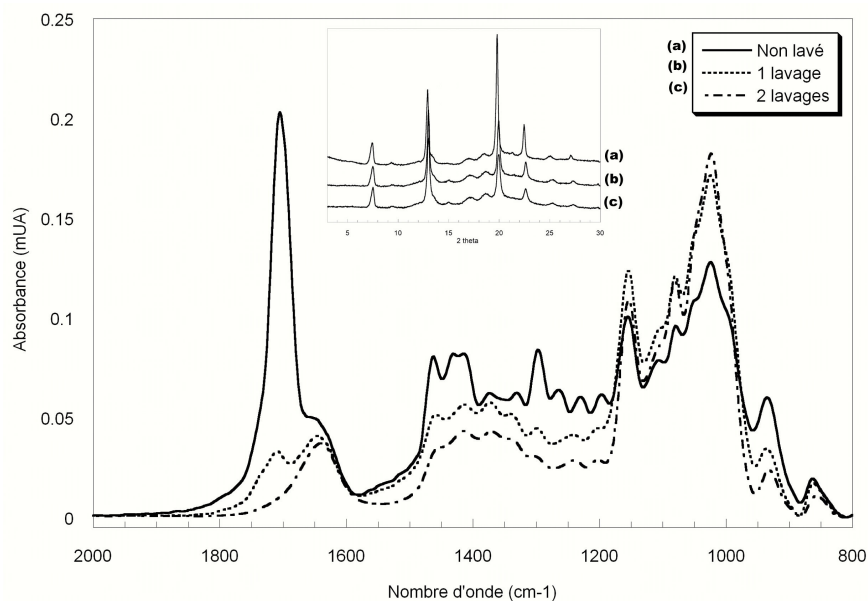


FIGURE 3.7 – Influence de lavages à l'éthanol sur les spectres infrarouge et diagramme de diffraction de complexes amylose-acide décanoïque.

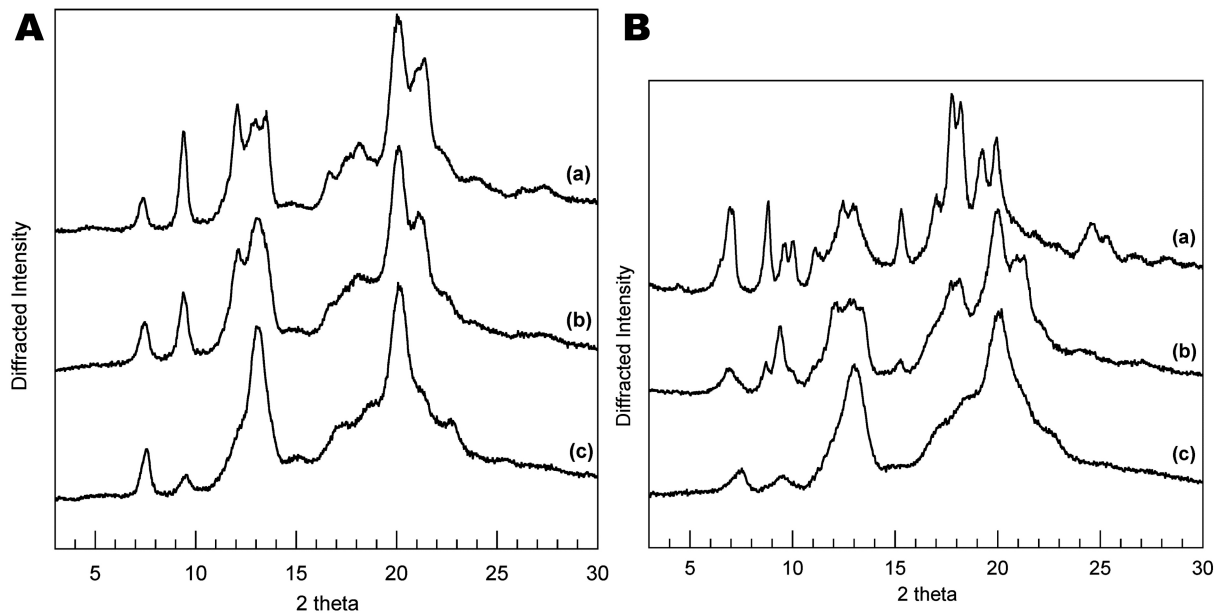


FIGURE 3.8 – Influence des lavages avec un mélange EtOH/H₂O (50/50) pendant 5 minutes sur les complexes avec A. l'acide hexanoïque B. la δ -décylactone. (a) Echantillon non lavé (b) après un lavage et (c) après deux lavages.

revanche, les complexes doivent également être suffisamment stables pour éviter au maximum la perte des arômes au cours du temps de stockage. Les résultats de calorimétrie présentés dans le chapitre 2 ont montré que la stabilité thermique des complexes est liée à la fusion (désorganisation) de la simple hélice et dépend peu de la molécule utilisée pour la complexation. Les températures de fusion étant élevées (de 90 à 120 °C environ), il est peu probable que la libération des arômes, au cours du stockage ($\simeq 25$ °C) ou lors de la mise en bouche ($\simeq 37$ °C), fasse intervenir des phénomènes thermiques. En revanche les différents lavages étudiés et les hydrolyses menés sur plusieurs complexes ont permis de mettre en évidence des stabilités très variables en fonction du composé d'arôme.

3.2.1 Influence des lavages sur la structure des complexes et extraction des composés d'arôme

Les différents complexes amylose-composé d'arôme se comportent de façon très variable lorsqu'ils sont dispersés dans un solvant. Les structures des complexes ont été étudiées après différents lavages plus ou moins longs :

- dans un mélange éthanol/eau (50/50) pendant cinq minutes
- dans un mélange éthanol/eau (50/50) pendant dix minutes
- dans l'éthanol pur pendant cinq minutes

3.2.1.1 Complexes de type V_{6I} (acide décanoïque)

Les résultats présentés dans le chapitre 1 ont montré que des lavages de complexes amylose-acide décanoïque avec un mélange éthanol/eau (50/50) permettent d'éliminer l'acide décanoïque non complexé. Dans ces conditions et quel que soit le temps de lavage, l'acide décanoïque piégé à l'intérieur des hélices n'est pas extrait et ce traitement n'entraîne pas de modification structurale ou de transition polymorphique (Figure 1.11, page 206).

La longueur de la chaîne aliphatique de l'acide décanoïque et ses fortes interactions avec l'hélice d'amylose, confirmées par modélisation moléculaire, sont probablement responsables

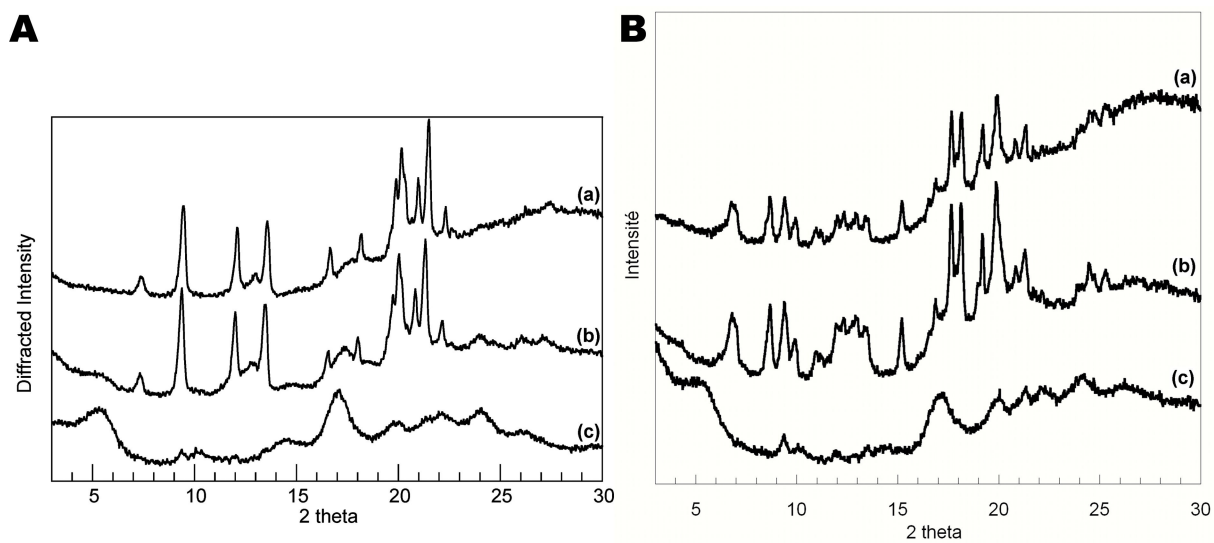


FIGURE 3.9 – Influence des lavages avec un mélange EtOH/H₂O (50/50) pendant 10 minutes sur les complexes avec A. l'acide hexanoïque B. la δ -décalactone. (a) Echantillon non lavé (b) après un lavage et (c) après deux lavages.

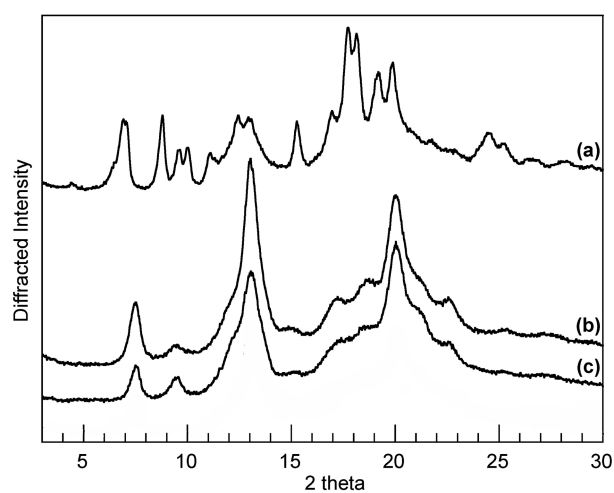


FIGURE 3.10 – Influence de lavages avec l'éthanol sur les complexes amylose- δ -décalactone. (a) Echantillon non lavé (b) après un lavage et (c) après deux lavages.

de "l'insensibilité" de ce complexe à un tel traitement.

L'acide décanoïque peut cependant être extrait très rapidement lors de lavages à l'éthanol. La figure 3.7 (page 278) présente les spectres infrarouge de complexes amylose-acide décanoïque avant et après lavages. Le pic de la fonction carbonyle de l'acide décanoïque (1706 cm^{-1}) diminue très fortement après le premier lavage et disparaît totalement après le second alors que la structure V_{6I} est préservée. L'acide décanoïque, très hydrophobe, est plus facilement extrait par un solvant organique comme l'éthanol (plus apolaire que l'eau).

3.2.1.2 Complexes de type V_{6II} (acide hexanoïque) et V_{6III} (δ -décalactone)

La figure 3.8 (page 278) présente l'influence de lavages dans le mélange éthanol/eau (50/50) pendant 5 minutes sur les complexes amylose-ac. hexanoïque (A) et amylose- δ -décalactone (B). Les transitions polymorphiques progressives $V_{6II} \rightarrow V_{6I}$ (acide hexanoïque) et $V_{6III} \rightarrow V_{6II} \rightarrow V_{6I}$ (δ -décalactone), montrent qu'une partie des ligands présents entre les hélices est éliminée facilement au cours des lavages. Les molécules piégées entre les hélices semblent donc interagir moins fortement avec l'amylose que celles présentes à l'intérieur de l'hélice (cas de l'acide décanoïque).

Deux lavages consécutifs effectués avec le même solvant pendant un temps plus long (dix minutes) aboutissent à une rétrogradation complète de l'amylose en type cristallin B pour l'acide hexanoïque et la δ -décalactone (Figure 3.9). Cette rétrogradation en type B résulte probablement d'une augmentation de la mobilité des chaînes d'amylose due à un contact plus prolongé avec le solvant aqueux, entraînant la libération des molécules piégées et permettant ainsi la réorganisation de l'amylose des zones amorphes et cristallines. Cette transition V vers B a déjà été observée dans le cas de complexe amylose-alcools de type V_{6I} (Le Bail et al., 1995) et d'acide gras à courte chaîne mais dépend également du degré de polymérisation de l'amylose.

Le lavage à l'éthanol pur appliqué aux complexes amylose-acide hexanoïque ou amylose- δ -décalactone mène à une transition polymorphique rapide du type V_{6II} ou V_{6III} vers le type V_{6I} et à une extraction totale de ces deux molécules, dès le premier lavage (Figure 3.10).

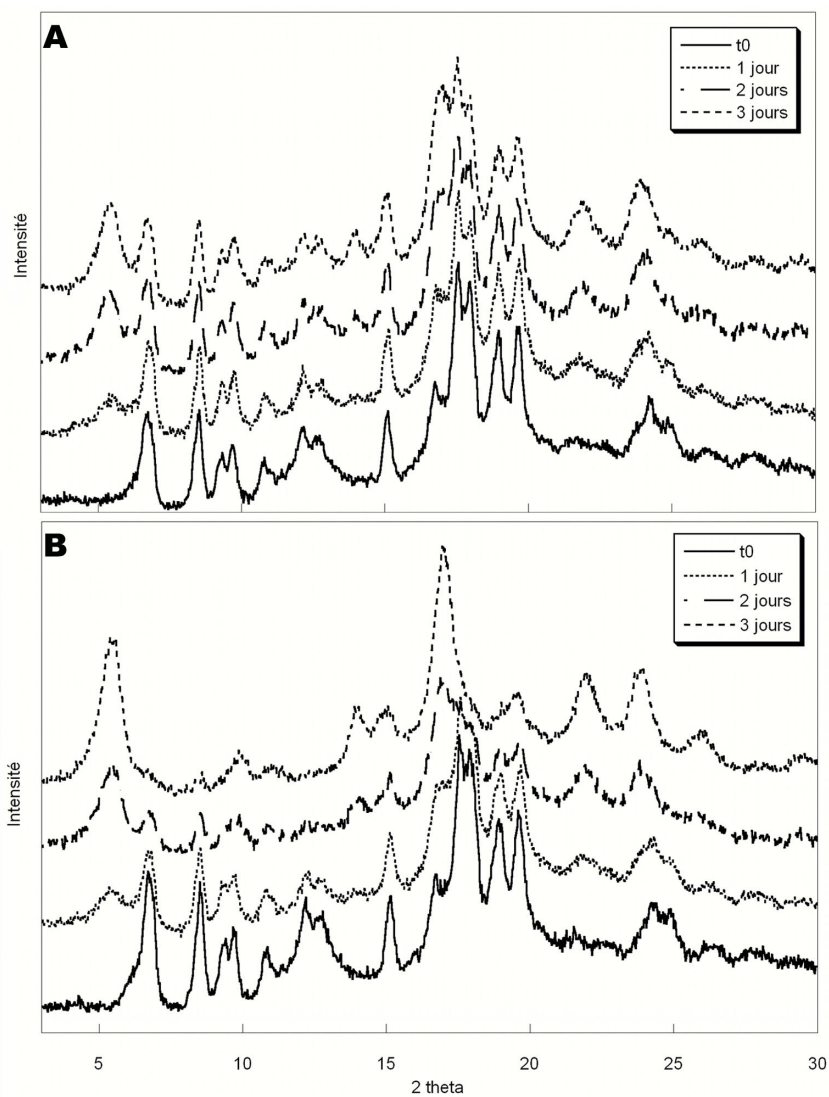


FIGURE 3.11 – Evolution des diagrammes de diffraction des rayons X en cours d'hydrolyse A. Complexes amylose-menthone B. amylose-linalol.

Les modifications structurales observées au cours des lavages de ces deux complexes tendent à montrer que l'inclusion dans l'hélice, et surtout la capacité de la molécule à être "bloquée" dans l'hélice, est un facteur déterminant la stabilité du complexe en milieu aqueux. En outre, la libération des molécules piégées entre les hélices semble plus liée à une augmentation de la mobilité des chaînes d'amylose en milieu aqueux. Ces lavages, sans réellement apporter de données quantitatives sur la stabilité des complexes, permettent tout de même d'évaluer de manière qualitative leur comportement en milieu aqueux. Il est ainsi probable que le taux d'humidité du produit fini et l'humidité ambiante aient une influence sur la longévité des complexes au cours de la conservation du produit et sur la libération des composés d'arôme.

3.2.2 Libération des arômes en condition d'hydrolyse

Lors de la consommation d'un produit, la libération des composés d'arôme en bouche est due à la mastication et à l'action des amylases salivaires. Plusieurs hydrolyses acide ont été menées sur différents complexes afin d'appréhender leur résistance à ce traitement. Ces conditions, bien que très éloignées des conditions d'hydrolyse enzymatique, ont néanmoins permis de mettre en évidence des sensibilités différentes en fonction du composé d'arôme. Cette susceptibilité à l'hydrolyse a bien évidemment une influence sur la libération des composés d'arômes.

La figure 3.11 présente l'évolution des diagrammes de diffraction des rayons X de complexes amylose-menthone (A) et amylose-linalol (B) en cours d'hydrolyse (HCl, 2.2 mol/l, 35 °C). Pour les deux types de complexes, il se produit une transition polymorphique progressive du type V_{6III} vers le type B, accompagnée de la libération des composés d'arôme. Les diagrammes de diffraction des complexes amylose-menthone montrent que cette transition est moins rapide que pour les complexes amylose-linalol qui ont presque totalement rétrogradé après trois jours. Les complexes amylose-menthone paraissent plus résistants à l'hydrolyse et la libération de la menthone plus lente que celle du linalol.

La méthode de calcul du taux de cristallinité de Wakelin et al. (1959) a été adaptée afin de déterminer la vitesse de transition du type V vers le type B. La référence cristalline est remplacée, dans ce cas, par le diagramme de diffraction de l'échantillon avant hydrolyse (à t_0) et la

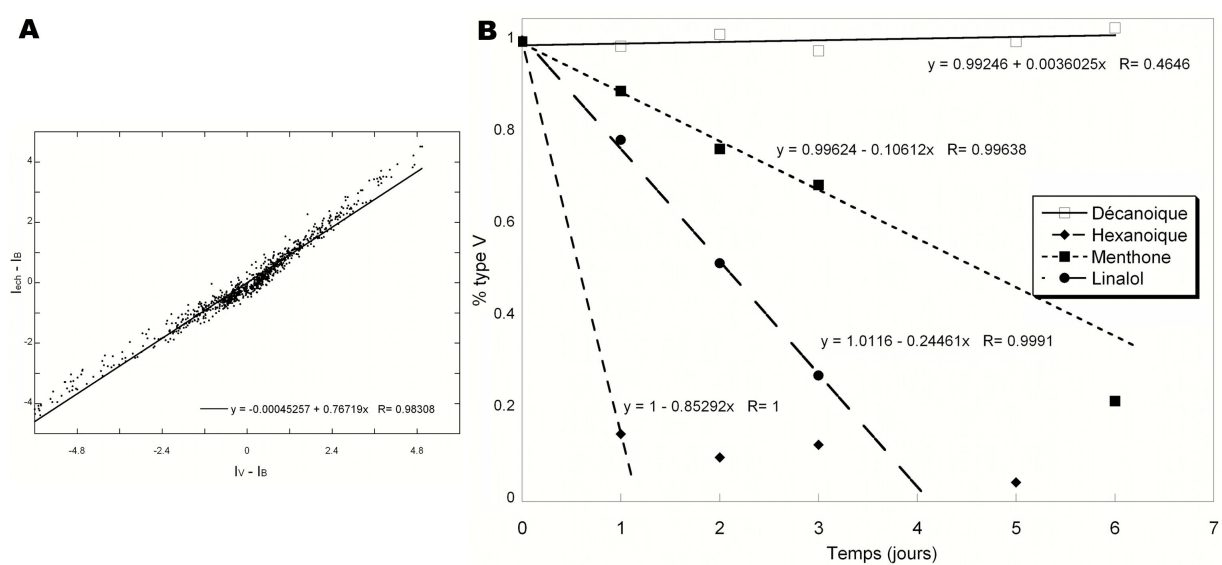


FIGURE 3.12 – A. Exemple de diagramme de type "Wakelin" obtenu pour des complexes amylose-menthone. B. Vitesse de transition polymorphique V vers B de différents complexes en situation d'hydrolyse.

référence amorphe par le diagramme de diffraction de type B obtenu après rétrogradation complète de l'échantillon hydrolysé. La figure 3.12A est un exemple de diagramme "type Wakelin" obtenu pour des complexes amylose-menthone. La pente de la droite de régression effectuée sur le nuage de points correspond à la proportion de type V dans l'échantillon ($\simeq 0.77$). Cette proportion, varie de 1, avant hydrolyse, à 0 lorsque les fragments d'amylose hydrolysés sont totalement réorganisés en type B. Cette proportion exprimée en fonction du temps, permet de déterminer la vitesse de transition polymorphique.

La figure 3.12B résume ainsi les résultats obtenus au cours d'hydrolyses de complexes avec l'acide décanoïque, l'acide hexanoïque, la menthone et le linalol. Les pentes de chaque droite de régression correspondent à la vitesse de transition V vers B. Dans le cas de complexes amylose-acide décanoïque, très résistants à l'hydrolyse et qui n'ont montré aucune transition polymorphique, cette pente est quasiment nulle. En revanche, elle est la plus importante pour les complexes amylose-acide hexanoïque dont la grande sensibilité à l'hydrolyse, liée à l'absence de molécule incluse dans l'hélice, a été démontrée dans le chapitre 1. Le linalol et la menthone ont une vitesse de transition intermédiaire.

La vitesse de transition polymorphique V vers B est dépendante de la sensibilité du complexe à l'hydrolyse. Elle-même est probablement dépendante de la cohésion de l'empilement cristallin assurée par les forces d'interaction amylose-ligand. Ce graphique permettrait ainsi de rendre compte de la force de ces interactions et de l'affinité du ligand pour l'amylose. Il pourrait être utilisé pour classer les différents composés d'arôme, les uns par rapports aux autres.

En suivant cette démarche, la menthone aurait plus d'affinité pour l'amylose que le linalol. Ceci semble confirmé par les températures de fusion mesurées précédemment (si les longueurs de chaînes d'amylose dans les lamelles cristallines sont similaires) : celle des complexes amylose-menthone (117 °C) est supérieure à celle des complexes amylose-linalol (111 °C), moins stables thermiquement et plus sensibles à l'hydrolyse. En revanche la plus grande stabilité des complexes amylose-menthone montrée ici est en désaccord avec les résultats de Le Bail et al. (2005). Ces derniers ont émis l'hypothèse de la présence simultanée du linalol dans l'hélice et entre les hélices et de la présence de la menthone exclusivement entre les hélices. Cette

situation engendrerait probablement une stabilité supérieure des complexes amylose-linalol. De plus, les résultats de modélisation semblent montrer que la menthone comme le linalol sont uniquement présents entre les hélices.

3.3 Discussion

La recherche de solutions d'inclusion des composés d'arôme par modélisation moléculaire a mis en évidence deux comportements différents en fonction des ligands considérés.

Concernant les molécules complexantes : soit les molécules ont potentiellement la place pour être incluses dans l'hélice d'amylose et les conditions de cristallisation utilisées permettent la complexation, soit leur inclusion entraîne un gonflement de la cavité hélicoïdale, elles ne peuvent alors être incluse dans les hélices de l'empilement cristallin. Elles présentent, cependant, une capacité à induire la formation de la simple hélice et ces molécules hôtes se placent alors à l'extérieur de l'hélice, dans l'espace inter hélice de l'empilement cristallin. Certaines molécules comme la δ -décalactone peuvent être situées ou non dans la cavité de l'hélice en fonction de la conformation spatiale qu'elles adoptent.

Concernant les molécules non-complexantes, soit elles ne présentent aucune affinité avec l'amylose et leur inclusion nécessite une déformation de la cavité hélicoïdale, soit les ligands sont susceptibles d'induire une hélice de type V, ce sont de petites molécules, relativement hydrophiles et très volatiles ; les conditions requises pour leur complexation n'ont pas été réunies dans cette étude.

La modélisation moléculaire est donc un outil de choix permettant de prédire la possibilité d'inclusion d'une molécule dans la cavité hélicoïdale, mais elle ne peut en aucun cas prédire les résultats expérimentaux puisqu'eux-mêmes dépendent des conditions de cristallisation.

Les différents lavages et les hydrolyses menés sur plusieurs complexes ont mis en évidence des éléments expérimentaux concordants avec les résultats de la modélisation moléculaire. Ainsi l'inclusion du composé d'arôme dans l'hélice et particulièrement la capacité de cette

molécule à y rester piégée conditionnent fortement la stabilité du complexe en milieu aqueux. Cette situation est parfaitement illustrée par les deux cas extrêmes, de l'acide décanoïque présent exclusivement dans les hélices et dont le complexe ne subit aucune modification en milieu très hydraté (lavage et hydrolyse) et celui de l'acide hexanoïque, présent uniquement entre les hélices qui est libéré très facilement et conduit à une structure, plus dense de type V_{6I} , ou B en fonction des conditions.

La position du composé d'arôme dans l'empilement semi-cristallin a également une influence importante sur la facilité avec laquelle il sera libéré. Ainsi, les complexes de type V_{6II} et V_{6III} libéreront les composés d'arômes piégés entre les hélices rapidement au moment de la consommation du produit tandis que les molécules incluses et ayant une très forte affinité avec l'amylose, comme l'acide décanoïque, seront probablement libérées très lentement, ou ne seront pas libérées. Cette possibilité a été évoquée par Heinemann et al. (2005), l' α -amylase, en concentration identique à celle de la salive, ne semble pas avoir une activité suffisamment rapide pour hydrolyser les complexes (sphérolites) en bouche.

La grande résistance de certains complexes à l'hydrolyse peut apparaître comme un inconvénient lorsque le composé d'arôme complexé est responsable d'une saveur recherchée. En revanche, il s'agit plutôt d'un avantage dans le cas de l'acide décanoïque qui apporte une contribution agréable à la note globale de l'arôme viennoiserie mais qui ne sera pas forcément apprécié ni recherché en bouche, à cause d'une saveur désagréable lorsqu'il est seul (proche de la poussière).

Chapitre 4

Vers une matrice alimentaire...

La génoise est une matrice complexe essentiellement constituée de protéines, de lipides et de polysaccharides. Les travaux décrits dans cette thèse ont été menés sur des systèmes modèles très simples et bien évidemment très éloignés d'une matrice alimentaire réelle. Cette approche est cependant nécessaire car elle permet de mieux appréhender les contraintes liées à la complexation de composés d'arôme par l'amylose sans prendre en compte la rétention due aux protéines ou aux lipides. En revanche, il est important de vérifier que les complexes peuvent être formés dans la génoise en cours de cuisson. De plus et dans l'hypothèse où ces complexes existent, il convient de s'assurer qu'ils ont une influence réelle sur la rétention des arômes ajoutés dans la génoise. Pour ce faire, deux composés d'arôme, l'un complexant, l'autre non, ont été dosés dans la pâte avant cuisson et dans la génoise.

L'arôme alimentaire est également un système constitué de nombreuses molécules. Il a été montré dans le chapitre 1 que sa complexation par l'amylose aboutit à un type cristallin V_{6I} . Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat. En effet, ce type V_{6I} peut être dû à la présence majoritaire de propylène glycol et d'acide décanoïque qui complexent l'amylose en type V_{6I} et au fait que la sensibilité de la technique utilisée ne permet pas de visualiser les autres types cristallins V_{6II} et V_{6III} . La deuxième hypothèse prend en compte les phénomènes de compétition au sein du mélange de composés d'arôme qui peuvent freiner ou empêcher la complexation de certaines molécules. Le cas échéant, le type V_{6I} observé serait dû à la complexation du propy-

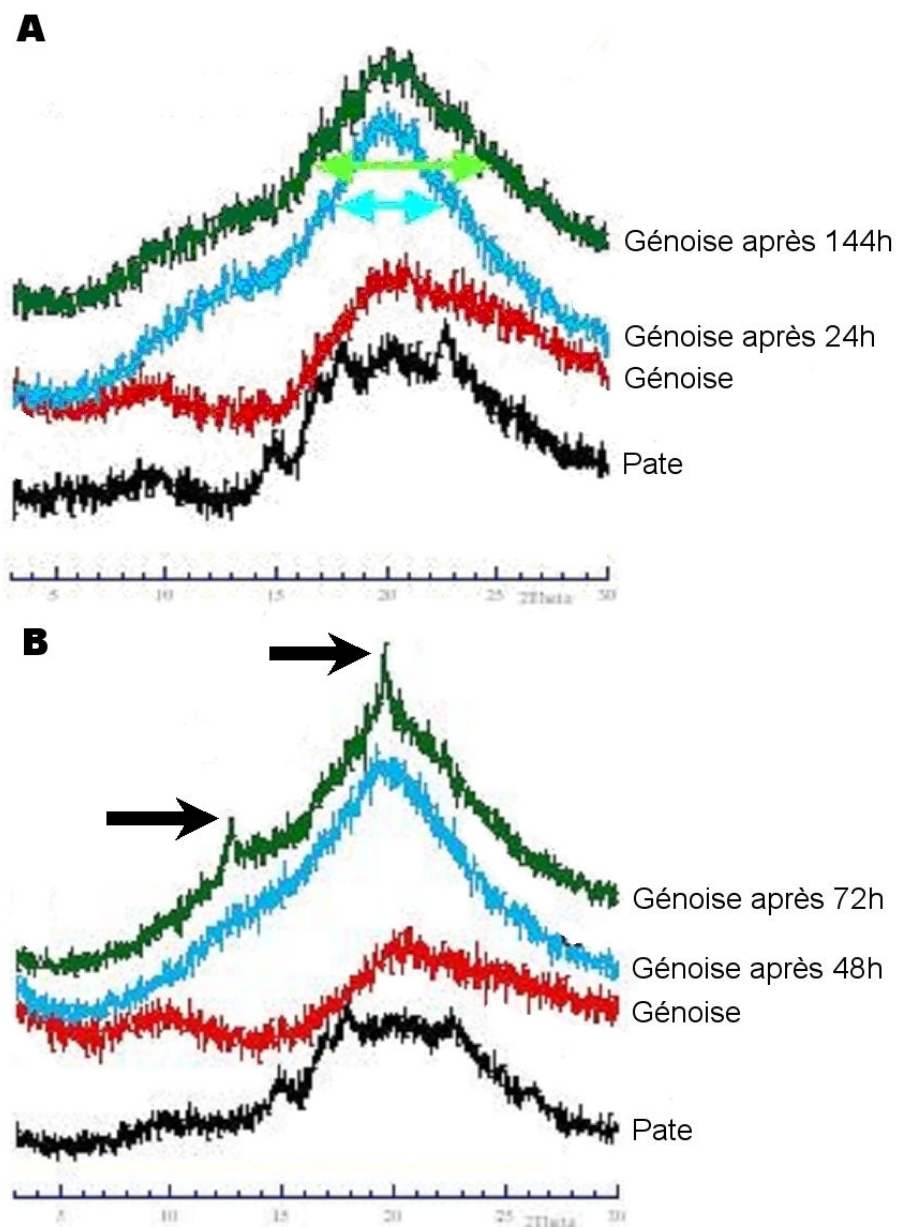


FIGURE 4.1 – Évolution des diagrammes de diffraction de la génoise avant et après cuisson. A. Génoise "nature". B. Génoise aromatisée. Diagrammes de diffraction réalisés à l'INRA de Nantes par M. Pozo-Bayón, B. Biais, P. Le Bail et N. Cayot.

lène glycol (ou de l'acide décanoïque) sans qu'aucune des autres molécules de l'arôme ne soit complexée. Afin de vérifier ces hypothèses, des complexations ont été réalisées en présence de mélanges d'acide décanoïque et de δ -decalactone en concentrations variables.

4.1 Mise en évidence de la complexation dans une génoise

La complexation de certains lipides avec l'amylose observée au cours de la cuisson de produits céréaliers laisse penser qu'un tel phénomène est également possible pour les composés d'arôme. Cette complexation a pu être montrée sur des génoises dans le cadre d'une collaboration avec M. Pozo-Bayón au cours de son stage post-doctoral à l'INRA de Dijon. L'ajout de l'arôme viennoiserie dans la pâte entraîne un comportement différent des ingrédients amylacés présents dans la génoise. La figure 4.1 présente l'évolution de diagrammes de diffraction réalisés sur des échantillons prélevés au cœur des génoises, avant et après cuisson, non aromatisées (A) et dans des génoises supplémentées en composé d'arôme (B). Dans les deux cas, il semble que la gélatinisation de l'amidon ait été complète au cours de la cuisson puisque les diagrammes réalisés juste après cuisson ne montrent aucun des pics caractéristiques de l'amidon de blé de type A.

Les diagrammes réalisés, sur la génoise non aromatisée, après 24 heures et 144 heures montrent un élargissement du pic de diffraction situé à 20° . Cet élargissement pourrait traduire un début de rétrogradation de l'amylose. Il pourrait être expliqué par le développement de pics à 17° , 19.5° , 22° et 23.9° caractéristiques de l'amidon B. Ces derniers ne seraient cependant pas visibles à cause de la ligne de base très bruitée. De plus les génoises ont été stockées sous atmosphère contrôlée par une solution saturée de NaCl (a_w 0.75) ce qui correspond à un taux d'hydratation des génoises d'environ 20 %. Pour cette teneur en eau, la Tg de l'amidon est abaissée à la température ambiante, cependant le sucre présent limite certainement la quantité d'eau disponible pour l'amidon. Il est donc probablement proche de sa transition vitreuse et la mobilité des chaînes de polymères réduite. La rétrogradation serait alors très lente.

L'évolution du diagramme de DRX de la génoise supplémentée en arôme est différente et

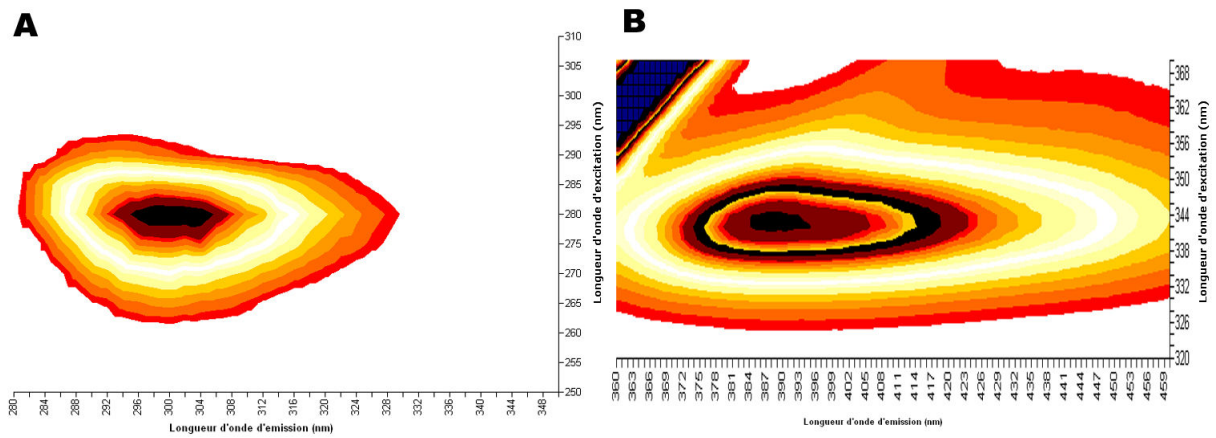


FIGURE 4.2 – Cartes de fluorescence de la dihydrocoumarine (A) et de la vanilline (B).

montre à partir de 72 heures l'apparition de pics fins, caractéristiques du type cristallin V_{6I} (indiqués par les flèches) traduisant la cristallisation de complexes d'amylose liée à l'ajout de l'arôme. Étant donné que les complexes amylose-lipides gênent considérablement la rétrogradation de l'amylose (Gudmundsson, 1992), les complexes amylose-composé d'arôme ont probablement le même effet. L'ajout d'arôme semble donc avoir une influence bénéfique sur la conservation du produit et ralentit le rassissement de la génoise.

Le dosage des composés d'arôme en milieu modèle a été réalisé par spectroscopie infrarouge (Chapitre 1). La génoise est un milieu trop complexe pour une telle approche. La fluorescence intrinsèque de deux molécules présentes dans l'arôme viennoiserie, a conduit à l'utilisation de la spectroscopie de fluorescence afin de doser ces molécules au cours de la préparation de la génoise.

4.2 Devenir des composés d'arôme dans la génoise avant et après cuisson

4.2.1 Fluorescence intrinsèque de composés d'arôme

L'arôme de note viennoiserie, formulé pour cette étude, contient des molécules de classes chimiques très variées. Parmi celles-ci, certaines possèdent des cycles aromatiques et des double liaisons conjuguées favorables au phénomène de fluorescence. Elle a été mise en évidence pour la dihydrocoumarine et la vanilline. La figure 4.2 présente les cartes de fluorescence en deux dimensions de ces molécules, avec les longueurs d'onde d'excitation en ordonnée et les longueurs d'onde d'émission en abscisse. Chaque courbe des cartes correspond à une intensité de fluorescence. Les maxima de fluorescence dans l'éthanol peuvent ainsi être déterminés en fonction des longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Ils sont obtenus pour des longueurs d'onde de $\lambda_{excitation} = 281$ nm, $\lambda_{émission} = 300$ nm pour la dihydrocoumarine et $\lambda_{excitation} = 343$ nm, $\lambda_{émission} = 388$ nm pour la vanilline.

La fluorescence est un phénomène très sensible à l'environnement proche de la molécule,

solvant éthanol/eau (x/y)	$\lambda_{excitation}$ (nm)	$\lambda_{émission}$ (nm)
0/100	365	431
25/75	362	425
33/66	360	416
50/50	358	412
70/30	355	405
100/0	343	388

TABLEAU 4.1 – Influence du solvant sur les longueurs d’onde d’excitation et d’émission de fluorescence de la vanilline

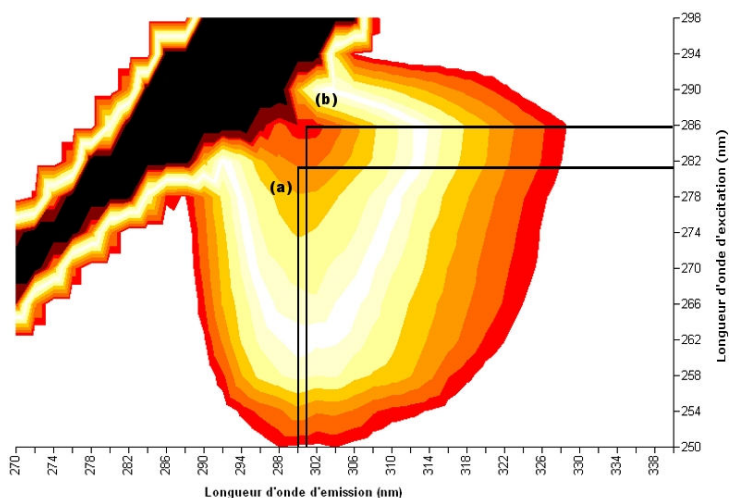


FIGURE 4.3 – Carte de fluorescence de la dihydrocoumarine dans les complexes d’amylose. Longueurs d’onde d’excitation et d’émission de la dihydrocoumarine en solution (a) et complexée (b).

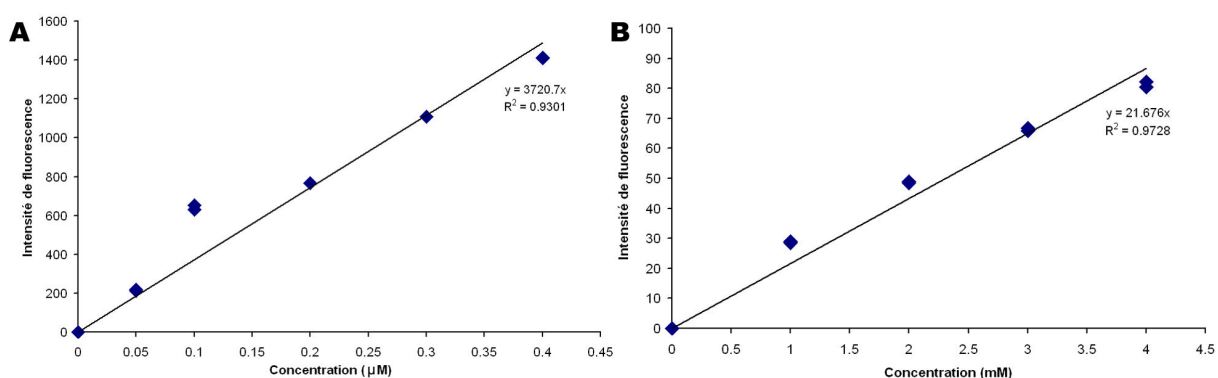


FIGURE 4.4 – Droites étalon pour le dosage par fluorescence de la dihydrocoumarine (A) et de la vanilline (B).

par exemple la fluorescence des tryptophanes des protéines est très fortement influencée par la polarité du milieu. Ainsi, la vanilline ne fluoresce pas à l'état solide et les longueurs d'onde d'excitation et d'émission varient fortement avec la composition du solvant dans lequel elle est solubilisée (Tableau 4.1). Elle subit une forte extinction de fluorescence dans l'eau pure puis le rendement de fluorescence augmente rapidement en ajoutant de l'éthanol (milieu plus apolaire).

La fluorescence de la dihydrocoumarine est beaucoup moins sensible à la composition du solvant. En revanche, ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission déterminées en solution et en angle droit sont différentes de celles mesurées sur des complexes amylose-dihydrocoumarine en mode frontal. Ceci peut être attribué à une modification de la fluorescence de la dihydrocoumarine lorsqu'elle est complexée. Ainsi, La carte de fluorescence obtenue à partir de complexes (Figure 4.3) montre un maximum de fluorescence pour $\lambda_{excitation} = 286 \text{ nm}$ et $\lambda_{émission} = 301 \text{ nm}$. Elle présente également une fluorescence pour les longueurs d'onde d'excitation et d'émission correspondant à la dihydrocoumarine seule pouvant être attribuée à de la dihydrocoumarine non complexée. Cette propriété pourrait être mise à profit pour vérifier la présence de dihydrocoumarine complexée dans la génoise sur des échantillons solide et en mode frontal.

Le dosage de la dihydrocoumarine et de la vanilline dans la pâte et la génoise a permis de montrer une influence des complexes sur la rétention des composés d'arôme dans une matrice alimentaire réelle.

4.2.2 Dosage de la vanilline et de la dihydrocoumarine dans la génoise

Après préparation de la pâte et cuisson de la génoise, la présence de dihydrocoumarine et de vanilline a été vérifiée sur des aliquotes en mode frontal. L'absence de fluorescence dans ces aliquotes après extraction par l'éthanol des composés d'arôme, semble indiquer que la totalité des molécules a été extraite de la génoise par ce traitement. La fluorescence de la dihydrocoumarine et de la vanilline a été mesurée dans les extraits obtenus et leur concentration calculée à partir de deux gammes étalon (Figure 4.4). Elles ont permis de déterminer la quantité de composé d'arôme présent dans la pâte avant cuisson et dans la génoise après cuisson. Ces résultats sont consignés dans le tableau 4.2 (page 298) et exprimés en pourcentage (m/m) par rapport à

	Dihydrocoumarine (%)	Vanilline (%)
Quantité ajoutée	100	100
Pâte avant cuisson	59	41
Génoise après cuisson	54	28

TABLEAU 4.2 – Dosage de la dihydrocoumarine et de la vanilline dans la génoise avant cuisson (pâte) et après cuisson.

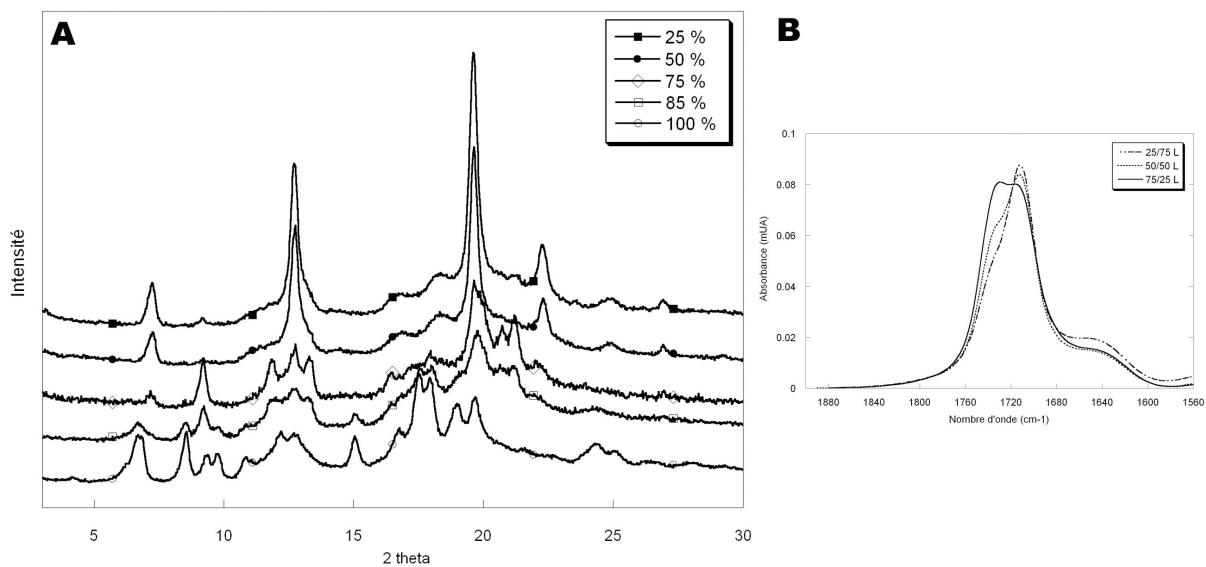


FIGURE 4.5 – A. Diagrammes de diffraction de complexes amylose-ac. décanoïque- δ -décalactone en fonction du pourcentage de δ -décalactone. B. Spectres infrarouge correspondants après lavage (proportion δ -décalactone/ac. décanoïque)

la quantité de composé d'arôme ajouté à la pâte (100 %).

Ils montrent une importante perte d'arôme durant la préparation de la pâte, respectivement 41 % et 59 % pour la dihydrocoumarine et la vanilline. Cette perte peut être expliquée par la volatilité de ces molécules, particulièrement au cours du foisonnement mécanique employé lors de la préparation de la pâte.

Le dosage des deux composés d'arôme dans la génoise après cuisson met en évidence une différence de rétention. En effet, la perte de dihydrocoumarine liée à la cuisson n'est que de 5 %, tandis qu'elle est de 13 % dans le cas de la vanilline. Cette différence peut être expliquée par le caractère complexant de la dihydrocoumarine vis à vis de l'amylose libérée des grains d'amidon pendant la cuisson. La complexation de l'amylose a donc bien une influence sur la rétention des composés d'arôme dans une matrice alimentaire réelle comme la génoise.

4.3 Co-complexation acide décanoïque/ δ -décylactone

Rutschmann et Solms (1990d) et Arvisenet et al. (2002) ont montré l'existence de phénomènes de compétition lorsque plusieurs composés d'arôme sont mis en contact avec de l'amidon. Afin de vérifier l'influence de la présence conjointe de deux composés d'arôme sur la formation des complexes d'amylose, des mélanges acide décanoïque- δ -décylactone ont été réalisés puis complexés avec l'amylose. La figure 4.5A présente le diagramme de diffraction de complexes obtenus pour des mélanges variant de 25 % (m/m) à 100 % de δ -décylactone. Jusqu'à une proportion de 50 %, l'ajout de δ -décylactone ne modifie pas l'empilement cristallin qui est de type V_{6I} . En revanche, au de là de cette proportion (75 et 85 %), la présence conjointe des deux composés d'arôme conduit à la formation de complexes proches du type V_{6II} .

Dans le cas des complexes préparés avec le mélange contenant 75 % de δ -décylactone, des combinaisons mathématiques des diagrammes de DRX de type V_{6I} et V_{6II} ont été réalisées afin d'obtenir un diagramme de diffraction théorique proche de celui observé. Cette combinaison a permis de mettre en évidence la présence conjointe de complexes de type V_{6I} et V_{6II} en proportions respectives 0.2 et 0.8 dans cet échantillon.

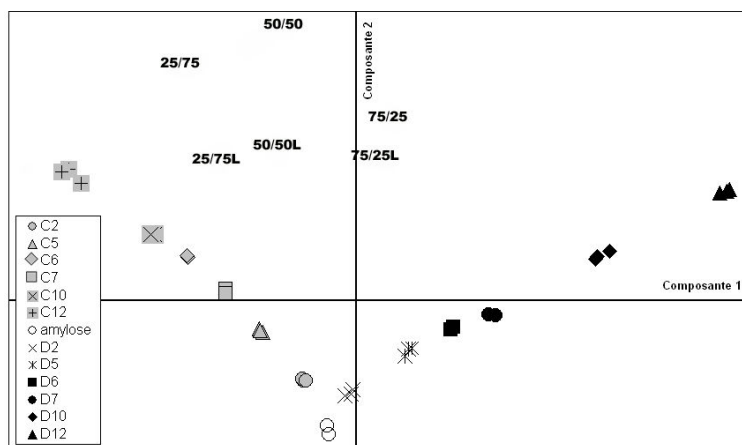


FIGURE 4.6 – Carte factorielle de l'ACP des gammes étalons et mélanges de δ -décalactone et d'ac. décanoïque. C2-C12 : gamme pour l'acide décanoïque. D2-D12 : gamme pour la δ -décalactone.

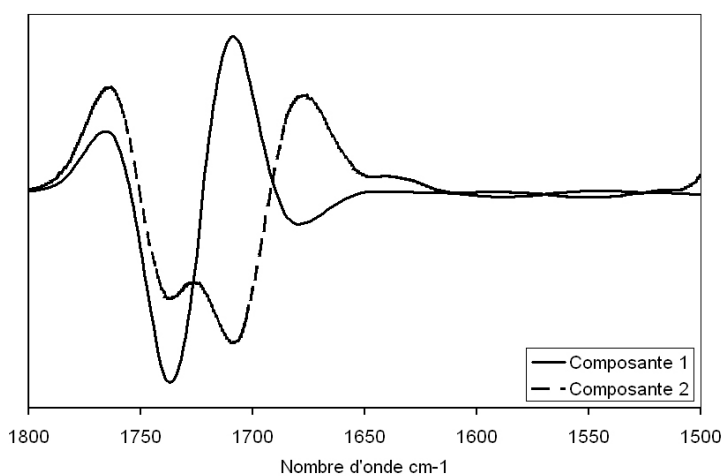


FIGURE 4.7 – Profils spectraux des composantes 1 et 2 de l'ACP présentée sur la figure 4.6.

Des combinaisons similaires ont également été réalisées et ont montré la présence de cristallites de type V_{6I} (proportion 0.1), V_{6II} (0.5) et V_{6III} (0.4) dans les complexes préparés avec le mélange à 85 % de δ -décylactone.

Cette étude met en évidence un phénomène de compétitions entre les ligands. L'acide décanoïque qui présente une meilleure affinité pour l'amylose est inclus prioritairement mais lorsque la proportion de δ -décylactone augmente, celle-ci peut être également piégée entre les hélices et induire "un gonflement " de la maille cristalline vers le type V_{6II} .

La figure 4.5B présente les spectres infrarouge (région spectrale des fonctions carbonyles de deux composés d'arôme) de complexes réalisés avec plusieurs de ces mélanges. Bien que les mélanges à 25 % et 50 % de δ -décylactone conduisent à des empilements semi-cristallins de type V_{6I} , les deux molécules sont présentes dans le complexe comme l'indique la bande d'absorption à 1706 cm^{-1} (fonction carbonyle de l'acide décanoïque) et l'épaulement, traduisant la présence d'une deuxième bande d'absorption à 1740 cm^{-1} (fonction carbonyle de la δ -décylactone).

La quantité de chacune des deux molécules peut être déterminée dans ces échantillons. La figure 4.6 présente la carte factorielle de l'ACP appliquée à l'ensemble des points des gammes étalons de l'acide décanoïque et de la δ -décylactone. La gamme étalon de l'acide décanoïque se répartit le long du premier axe vers la gauche tandis que celle de la δ -décylactone est positionnée de façon symétrique le long de cet axe vers la droite. Ceci est confirmé par le profil spectral de cette composante (Figure 4.7) qui considère les bandes d'absorption des carbonyles des deux molécules de façon opposée. Au contraire, le profil spectral de la deuxième composante principale prend en compte les deux bandes d'absorption suivant une même direction. Le deuxième axe correspond donc à la quantité globale de molécule piégée dans le complexe. Aucune corrélation linéaire n'a pu être établie entre l'une des deux composantes principales et la quantité d'un des deux composés d'arôme. En revanche, une régression non-linéaire réalisée avec le logiciel Origin 7.0TM a permis d'établir deux équations de prédiction pour l'acide

	Proportion δ -décylactone/ac. décanoïque dans le mélange					
	25/75 (V_{6I})		50/50 (V_{6I})		75/25 (V_{6II})	
	δ -décylactone	ac. décanoïque	δ -décylactone	ac. décanoïque	δ -décylactone	ac. décanoïque
% (m/m _{amylose})	2.6	10.5	4.2	9.8	6.3	8.0
$n_{ligand}/n_{glucose}$	0.025	0.111	0.041	0.102	0.064	0.082
$n_{ligand}/n_{amylose}$	21	93	35	86	54	69
Proportion dans le complexe	0.2	0.8	0.3	0.7	0.45	0.55

TABLEAU 4.3 – Dosages des composés d’arôme dans les complexes amylose/ac.décanoïque/ δ -décylactone.

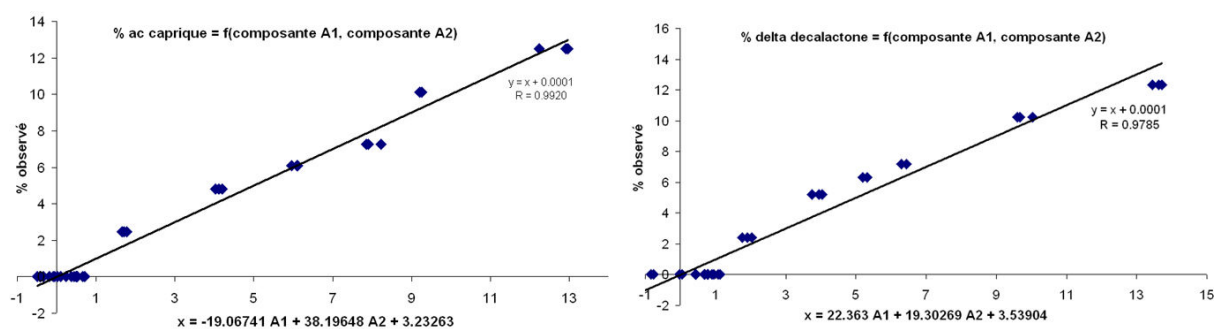


FIGURE 4.8 – Corrélation entre les équations de prédiction et la concentration réelle des différents points des gammes étalons.

décanoïque (Équation 4.1) et la δ -décylactone (Équation 4.2) en fonction de la valeur des deux composantes principales.

$$C_{acdecanoïque} = -19.06741A1 + 38.19648A2 + 3.23623 \quad (4.1)$$

$$C_{\delta\text{-décylactone}} = 22.363A1 + 19.30269A2 + 3.53904 \quad (4.2)$$

A1 et A2 correspondent respectivement aux valeurs des première et deuxième composantes principales. Ces deux équations de prédiction sont bien corrélées avec la quantité d'acide décanoïque ($R = 0.9920$) ou de δ -décylactone ($R = 0.9785$) présente dans les complexes (Figure 4.8).

Les résultats obtenus pour des proportions variables de 25 à 75 % de δ -décylactone sont données dans le tableau 4.3. La quantité totale de ligands piégés est légèrement supérieure ($\simeq 12\text{-}14\%$) à celle déterminée dans le cas des complexes préparés avec un seul composé d'arôme ($\simeq 8\text{-}11\%$). Ceci est probablement dû au fait que ces mesures ont été réalisées sur des échantillons non lavés pour ne pas risquer de modifier ni le type cristallin, ni la proportion de chaque composé d'arôme. Ces valeurs sont donc probablement légèrement surestimées de part la présence d'une petite quantité de ligands libres.

La quantité d'acide décanoïque est relativement constante (de 8 à 10.5 %) quelle que soit sa proportion dans le mélange initial avant complexation tandis que la quantité de δ -décylactone varie beaucoup plus (de 2.6 à 6.3 %). Les rapports $n_{\text{ligand}}/n_{\text{glucose}}$ et $n_{\text{ligand}}/n_{\text{amylose}}$ calculés pour chacun des deux composés d'arôme sont en accord avec ceux déterminés précédemment, mais permettent surtout de calculer la proportion relative de chaque molécule dans les complexes.

Lorsque le mélange de départ est constitué de 25 % de δ -décylactone et 75 % d'acide décanoïque, les proportions dans le complexe sont respectivement de 0.2 et 0.8. Le diagramme de DRX observé est type V_{6I} mais il est possible que des complexes V_{6II} et/ou V_{6III} soient également présent en faible proportion et non détectable par l'appareil. Cependant en considérant que le type V_{6I} est très largement majoritaire, il n'y a pas de molécule piégée entre les hélices et grossièrement une hélice d'amylose contenant une δ -décylactone pour quatre hélices d'amylose contenant un acide décanoïque. Ceci est uniquement valable si l'on considère que les

zones amorphes entre les zones cristallines piègent une quantité équivalente de δ -décalactone et d'acide décanoïque (rétention non spécifique).

Ce même rapport est d'environ une hélice contenant une δ -décalactone pour deux hélices contenant un acide décanoïque lorsque le mélange initial est constitué de 50 % de chaque molécule.

Pour le mélange à 75 % de δ -décalactone, il y a dans le complexe environ une molécule d'acide décanoïque pour une molécule de δ -décalactone. Leur localisation ne peut être affirmée mais il est probable que l'acide décanoïque soit présent dans les cavités hélicoïdales et la δ -décalactone plutôt présente entre les hélices.

Cette étude montre que la présence de plusieurs molécules dans le milieu n'empêche ni la complexation, ni la cristallisation, et que plusieurs composés d'arôme peuvent être présents dans le même agrégat semi-cristallin. En revanche, les proportions relatives des composés d'arôme peuvent engendrer des types cristallins intermédiaires, liés à des compétitions entre les différentes molécules.

Ce dernier chapitre a permis de montrer que des complexes d'amylose peuvent être formés dans une matrice alimentaire réelle et qu'ils ont une influence notable sur la rétention de composés d'arômes et l'évolution du produit (rassissement). Cependant les concentrations en composés d'arôme qui ont été employées pour l'étude de ces complexes en système modèle sont très supérieures à celles utilisées dans la génoise. Les résultats présentés dans le chapitre 2 ont montré que pour plusieurs composés d'arôme, en particulier les plus hydrophiles, une forte concentration dans le milieu est nécessaire pour permettre la complexation. Il est donc probable que certains de ces composés d'arôme, complexés en milieu modèle, ne le soient pas réellement au cours de la cuisson de la génoise.

La présence de plusieurs molécules complexantes ne semble pas gêner la complexation. Cependant, la présence de lipides complexables dans le milieu (l'huile de palme utilisée pour cette étude ne complexe pas l'amylose) peut également modifier cette complexation. Ce point mériterait d'être approfondi.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse avait pour objectif de mieux comprendre les interactions entre l'amylose et des composés d'arôme dans une matrice modèle et d'évaluer l'implication des complexes d'amylose dans la rétention de composés d'arôme ajoutés à une génoise. Cette étude s'inscrit dans les objectifs du groupe de travail sur les matrices amylacées concentrées du consortium CANAL-ARLE, dont les principales interrogations concernent :

- Le piégeage potentiel des composés d'arôme, leur localisation et leur quantification dans la génoise
- Le comportement de l'arôme au cours de la préparation de la génoise (perte...)
- La libération éventuelle de ces composés d'arôme piégés
- L'influence de la présence de l'arôme sur la conservation du produit

Les résultats des travaux sur milieu modèle effectués dans le cadre de cette thèse ont permis de montrer que neuf des 20 molécules d'un arôme formulé, peuvent complexer l'amylose dans des conditions thermiques proches de la cuisson de la génoise. Trois types de complexes semi-cristallins V_{6I} , V_{6II} et V_{6III} ont été obtenus. Ils s'organisent, après précipitation, sous forme d'agrégats semi-cristallins lamellaires. Les composés d'arôme peuvent être piégés dans les lamelles cristallines à l'intérieur des hélices d'amylose ou entre celles-ci en fonction du type de maille cristalline et du composé d'arôme complexé. Les régions amorphes peuvent également retenir une proportion non négligeable des molécules aromatisantes. Les dosages des molécules piégées dans les zones amorphes et cristallines indiquent que les quantités maximales de

composés d'arôme complexés sont supérieures à celles généralement ajoutés à la génoise (0.1 à 0.3 % (m/m_{pâte})). Une telle complexation n'est cependant possible que lorsque certaines conditions sont réunies. Le procédé de préparation de la génoise aura donc une influence capitale sur la complexation de l'amylose et des composés d'arôme.

Les conditions hydrothermiques semblent être les plus importantes. L'hydratation du milieu doit être suffisante et la température supérieure à 70-90°C afin de permettre une forte gélatinisation de l'amidon et la dispersion de l'amylose hors des grains d'amidon. Lorsque l'amylose est dispersée, la complexation requiert également une bonne homogénéisation du milieu afin de favoriser les interactions amylose-ligand. Si ces paramètres sont réunis, la complexation de composés d'arôme par l'amylose est un phénomène qui peut être rapide et achevé après quelques minutes ou dizaines de minutes. En revanche, la cristallisation est un phénomène beaucoup plus lent qui nécessite plusieurs heures.

La libération, sous certaines conditions, des molécules piégées est une propriété particulièrement importante des complexes amylose-composés d'arôme. Cette libération est liée à la stabilité du complexe et à l'affinité du ligand pour l'amylose. Les lavages et les hydrolyses acide menés sur plusieurs complexes ont montré qu'elle dépend de la structure cristalline et de l'inclusion de la molécule dans l'hélice (cas de l'acide décanoïque, complexe de type V_{6I}) et/ou de sa présence entre les hélices (cas du complexe avec l'acide hexanoïque, amylose de type V_{6II} ou du complexe amylose- δ -décalactone de type V_{6III}). Ainsi les molécules incluses dans l'hélice seront libérées plus lentement que celles présentes entre les hélices ou même piégées dans les régions amorphes.

Plusieurs des résultats obtenus au cours de cette étude ont permis de confirmer la présence de complexes amylose-composé d'arôme dans la génoise et de souligner leur importance dans la rétention des arômes. Ainsi, les dosages par fluorescence de la vanilline et de la dihydrocoumarine avant et après cuisson de la génoise ont mis en évidence une perte moins importante de dihydrocoumarine qui forme des complexes avec l'amylose au cours de la cuisson. De plus, lors des bilans d'aromatisation effectués par M. Pozo-Bayón sur les génoises (Pozo-Bayón et al., 2006), il n'a pas été possible d'extraire et de doser l'acide décanoïque. Ceci pourrait être ex-

pliqué par son caractère complexant vis à vis de l'amylose. Au cours de cette même étude, la libération des composés d'arôme a été étudiée au cours du temps par analyse de l'espace de tête (headspace). Certaines molécules comme l'hexanoate d'éthyle présentent une libération plus lente que d'autres, de même classe chimique, comme le butanoate d'éthyle. Cette différence pourrait être expliquée par le caractère complexant de l'hexanoate d'éthyle.

Plusieurs composés d'arôme n'ont pas formé de complexes avec l'amylose dans les conditions choisies pour cette étude mais leur inclusion dans l'hélice d'amylose, étudiée par modélisation moléculaire, est topologiquement possible. Il pourrait être utile de modifier les conditions de préparation, par exemple en changeant la polarité du solvant afin d'essayer d'optimiser les interactions de ces molécules avec l'amylose.

Cette étude, bien qu'apportant des informations importantes sur la quantité de molécules présentes dans les zones cristallines des complexes de type V_{6II} et V_{6III} , ne permet pas de statuer clairement sur la position des molécules piégées entre les hélices. La préparation de monocristaux de ces complexes, leur étude par diffraction électronique et la construction d'un modèle moléculaire des hélices d'amylose au sein de ces mailles cristallines permettrait de modéliser l'inclusion potentielle des molécules entre les hélices d'amylose.

En continuité de ce travail, la détermination des temps de relaxation longitudinaux $T_{1\rho}$ des molécules complexantes par RMN du solide conforterait leur localisation. Dans l'hypothèse d'une plus grande mobilité des molécules piégées entre les hélices, leur temps de relaxation longitudinal serait supérieur à celui de l'amylose et des molécules incluses dans l'hélice. Ceci a été vérifié pour les complexes amylose-acide décanoïque, le $T_{1\rho}$ de l'amylose est de 3.5 ms et celui de l'acide décanoïque de 4.5 ms. Cela confirme une nouvelle fois son inclusion dans la cavité de l'hélice.

Ces deux études ne permettraient cependant pas d'élucider de façon certaine les mécanismes de formation des complexes. La transition polymorphique $V_{6I} \rightarrow V_{6II}$ mise en évidence au cours de la complexation de l'amylose et de l'acide hexanoïque pourrait être confirmée par le suivi de la structure en temps réel par diffraction des rayons X issus d'un synchrotron.

Les complexes étudiés dans cette thèse ont montré des sensibilités à l'hydrolyse différentes en fonction du composé d'arôme. Une étude par modélisation moléculaire dynamique dans l'eau permettrait d'envisager, au niveau moléculaire, les possibilités de libération des molécules piégées dans l'hélice. Elle consisterait, par exemple à étudier, à partir des modèles d'inclusion déterminés dans cette thèse, la sortie de la molécule incluse hors de l'hélice. Il serait alors nécessaire de vérifier l'absence de contacts atomiques et de barrière énergétique pour chaque opération de rotation et de translation. Certaines molécules peu retenues peuvent probablement sortir de l'hélice d'amylose et d'autre nécessite une destruction de l'hélice d'amylose pour être libérées. Il semble que les α -amylases présentes dans la salive n'aient pas une activité suffisante pour envisager la libération de composés d'arôme inclus dans l'hélice, lors de la consommation d'un produit (Heinemann et al., 2005). Il serait intéressant de vérifier si leur action est suffisamment rapide pour dégrader les régions amorphes et déstabiliser les lamelles cristallines, permettant aux molécules présentes entre les hélices d'être libérées en bouche et aux molécules incluses dans l'hélice d'être libérées dans le tractus gastro-intestinal, comme cela est suggéré par Heinemann et al. (2005). En effet, l'hydrolyse de complexes amylose-lipides par les amylases pancréatiques est possible *in vivo* chez l'homme (Faisant et al., 1993).

La prise en compte des conditions de libération de chaque composé d'arôme, lors de la formulation d'un arôme alimentaire devrait permettre d'optimiser la rétention de l'arôme dans le produit tout en permettant une libération rapide en bouche. Par exemple, en privilégiant dans la formule, les molécules qui complexent l'amylose en type V_{6II} ou V_{6III} . Au contraire si une libération lente est recherchée, les molécules complexant en type V_{6I} sont à privilégier.

Dans l'éventualité d'une telle sélection, cette stratégie sera confrontée au problème de la très grande diversité des composés d'arôme utilisés et à la méconnaissance de leur capacité à complexer l'amylose.

Les travaux de M. Pozo-Bayón ont montré que l'arôme de viennoiserie formulé n'est pas stable. En effet les 20 molécules de l'arôme mélangées réagissent entre elles pour former de nombreux composés, il semble donc important de constituer une base de données recensant les

composés d'arôme par rapport à leur caractère complexant. Elle pourrait être réalisée à partir d'expériences simples de complexation "*in vitro*" et par une approche en modélisation QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship). Cette méthode consiste à rechercher des corrélations entre une activité biologique (toxicologique ou pharmacologique) et la structure chimique de molécules. Elle permet par exemple la prédiction de structure de molécules à intérêts thérapeutiques. Elle pourrait ainsi être adaptée à la prédiction de structures de molécules susceptibles de complexer l'amylose.

Les facteurs les plus importants qui vont conditionner la complexation de composés d'arôme au cours d'un procédé industriel sont la teneur en eau disponible (influence du sucre...) dans la pâte et la température. Dans le cas où ces conditions ne permettent pas la gélatinisation de l'amidon, il est possible d'envisager l'utilisation de complexes amylose-composé d'arôme préalablement formés comme additif, si les températures à cœur en cours de cuisson sont inférieures à leurs températures de fusion (environ 100-120°C à 80% (m/m) d'eau). De plus et contrairement aux cyclodextrines, l'amylose n'a pas d'effet toxicologique néfaste.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Arshadi, R. (1993). Microcapsules for food. *Journal of Microencapsulation*, 10 : 431–435.
- Arvisenet, G., Le Bail, P., Voilley, A., et Cayot, N. (2002). Influence of physicochemical interactions between amylose and aroma compounds on the retention of aroma in food-like matrices. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 : 7088–7093.
- Assifaoui, A., Champion, D., Chiotelly, E., et Verel, A. (2006). Characterization of water mobility in biscuit dough using a low-field 1h nmr technique. *Carbohydrate Polymers*, 64 : 197–204.
- Babin, P. (2005). *Matériaux alvéolaires à base de biopolymères : structure et propriétés mécaniques*. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Grenoble.
- Baker, A. A., Miles, M. J., et Helbert, W. (2001). Internal structure of starch granule revealed by afm. *Carbohydrate Research*, 330 : 249–256.
- Baldwin, P., Adler, J., Davies, M., et Melia, C. (1998). High resolution imaging of starch granule surfaces by atomic force microscopy. *Journal of Cereal Science*, 27 : 255–265.
- Ball, S., van de Wal, M., et Visser, R. (1998). Progress in understanding the biosynthesis of amylose. *Trends in Plant Science*, 3 : 462–467.
- Banks, W. et Greenwood, C. (1969). Viscosity and sedimentation studies on amylose in aqueous solution-further evidence for non-helical character. *European Polymer Journal*, 5 : 649–658.
- Banks, W. et Greenwood, C. (1975). Starch and its components. *Edinburgh University Press*, Edinburgh.
- Bertoft, E. (2004). On the nature of categories in amylopectin and their connection to the super helix model. *Carbohydrate Polymers*, 57 : 211–224.
- Biais, B., Le Bail, P., Robert, P., Pontoire, B., et Buléon, A. (2006). Structural and stoichiometric studies of complexes between aroma compounds and amylose. polymorphic transitions and quantification in amorphous and crystalline areas. *Carbohydrate Polymers*, Sous Presse.
- Biliaderis, C. et Galloway, G. (1989). Crystallization behavior of amylose-v complexes : Structure-property relationships. *Carbohydrate Research*, 189 : 31–48.
- Biliaderis, C., Page, C., et Maurice, T. (1986). Non-equilibrium melting of amylose-v complexes. *Carbohydrate Polymers*, 6 : 269–288.

-
- Biliaderis, C., Page, C., Slade, L., et Sirett, R. (1985). Thermal behavior of amylose-lipid complexes. *Carbohydrate Polymers*, 5 : 367–389.
- Biliaderis, C., Tonogai, J., Perez, C., et Juliano, B. (1993). Thermophysical properties of milled rice starch as influenced by variety and parboiling method. *Cereal Chemistry*, 70 : 512–516.
- Bizot, H., Le Bail, P., Leroux, B., Davy, J., Roger, P., et Buléon, A. (1997). Calorimetric evaluation of the glass transition in hydrated, linear and branched polyhydroglucose compounds. *Carbohydrate Polymers*, 32 : 33–50.
- Blanshard, J. (1987). Starch granule structure and function : a physicochemical approach. dans "crit. rep. chem.". *Galliard, T. (eds), Wiley & sons, Chichester*, 13 : 16–54.
- Bloksma, A. (1990). Rheology of the breadmaking process. *Cereal Foods World*, 35 : 228–236.
- Bluhm, T. et Zugenmaier, P. (1981). Detailed structure of the vh-amylose-iodine complex : a linear polyiodine chain. *Carbohydrate Research*, 89 : 1–10.
- Bogacheva, T., Morris, V., Ring, S. G., et Hedley, C. (1998). The granular structure of c-type pea starch and its role in gelatinization. *Biopolymers*, 45 : 323–332.
- Booy, F., Chanzy, M., et Sarko, A. (1979). An electron diffraction study of single crystals of amylose complexed with n-butanol. *Biopolymers*, 18 : 2261–2266.
- Boursier, B. (1994). Applications alimentaires des amidons modifiés. *Industries Alimentaires et Agricoles*, 09 : 583–592–323.
- Boutboul, A. (2001). *Etude des interactions entre les composés d'arôme et l'amidon par la technique de chromatographie inverse en phase gazeuse*. Thèse de doctorat, Université Paris XI.
- Brisson, J., Chanzy, H., et Winter, W. (1991). The crystal and molecular structure of vh amylose by electron diffraction analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13 : 31–39.
- Buléon, A., Bizot, H., Delage, M., et Multon, J. (1982). Evolution of crystallinity and specificity gravity of potato starch versus water ad- and desorption. *Starch/Stärke*, 32 : 361–366.
- Buléon, A., Bizot, H., Delage, M., et Pontoire, B. (1987). Comparison of x-ray diffraction patterns and sorption properties of potato, wrinkled and smooth pea, broad bean and wheat hydrolysed starches. *Carbohydrate Polymers*, 7 : 461–482.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., et Ball, S. (1998a). Starch granules : structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23 : 85–112.
- Buléon, A., Delage, M., Brisson, J., et Chanzy, H. (1990). Single crystals of v amylose complexed with isopropanol and acetone. *International Journal of Biological Macromolecules*, 12 : 25–33.
- Buléon, A., Duprat, F., Booy, F., et Chanzy, H. (1984). Single crystals of amylose with a low degree of polymerisation. *Carbohydrate Research*, 4 : 171–173.

-
- Buléon, A., Gérard, C., Riekkel, C., Vuong, R., et Chanzy, H. (1998b). Details of the crystalline ultrastructure of c-starch granules revealed by synchrotron microfocus mapping. *Macromolecules*, 31 : 6605–6610.
- Buléon, A., Le Bail, P., Colonna, P., et Bizot, H. (1998c). Phase and polymorphic transitions of starches at low and intermediate water contents. dans "the properties of water in foods. isopow 6". *Blackie Academic & Professional, London*, pages 160–178.
- Buléon, A., Pontoire, B., Riekkel, C., Chanzy, H., Helbert, W., et Vuong, R. (1997). Crystalline ultrastructure of starch granules revealed by synchrotron microfocus mapping. *Macromolecules*, 30 : 3952–3954.
- Bulpin, P., Cutler, A., et Lips, A. (1987). Cooperative binding of sodium myristate to amylose. *Macromolecules*, 20 : 44–49.
- Bulpin, P., Welsh, E., et Morris, E. (1982). Physical characterization of amylose-fatty acid complexes in starch granules and in solution. *Starch/Stärke*, 34 : 335–339.
- Burchard, W. et Thurn, A. (1985). Heterogeneity in branching. mathematical treatment of the amylopectin structure. *Macromolecules*, 18 : 2072–2082.
- Buttery, R., Glenn, G., et Stern, D. (1999). Sorption of volatile flavor compounds by microcellular cereal starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 : 5206–5208.
- Cael, J., Koenig, J., et Blackwell, J. (1973). Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates. part iii : Raman spectra of the polymorphic forms of amylose. *Carbohydrate Research*, 29 : 123–134.
- Cael, J., Koenig, J., et Blackwell, J. (1975). Infrared and rman spectroscopy of carbohydrates. part vi : Normal coordinate analysis of α -amylose. *Biopolymers*, 14 : 1885–1903.
- Carlson, t., Larsson, K., Ding-Nguyen, N., et Krog, N. (1979). A study of the amylose-monoglyceride complex by raman spectroscopy. *Starch/Stärke*, 31 : 222–224.
- Casey, A., Farrell, G., McNamara, M., Byrne, H., et Chambers, G. (2005). Interaction of carbon nanotubes with sugar complexes. *Synthetic Metals*, 153 : 357–360.
- Chang, Y., Abd Karim, A., et Seow, C. (2006). Interactive plasticizing effects of water and glycerol on the tensile properties of tapioca starch films. *Food Hydrocolloids*, 20 : 1–8.
- Chanvrier, H. (2005). *Matériaux à base de biopolymères de maïs : élaboration et comportement mécanique*. Thèse de doctorat, Université de Nantes.
- Cheetham, N. et Tao, L. (1998). Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules : an x-ray powder diffraction study. *Carbohydrate Polymers*, 36 : 277–284.
- Chevallier, S., Della Valle, G., Colonna, P., Broyart, B., et Trystram, G. (2002). Structural and chemical modifications of short dough during baking. *Journal of Cereal Science*, 35 : 1–10.
- Chiotelly, E., Rolée, A., et Le Meste, M. (2000). Effect of sucrose on the thermomechanical behavior of concentrated wheat and waxy corn starch-water preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 : 1327–1339.

-
- Colonna, P. et Buléon, A. (1994). Transformations structurales de l'amidon. dans "la cuisson-extrusion.". *Tec & Doc, Lavoisier, Paris*, pages 17–43.
- Colonna, P., Buléon, A., et Lemarié, F. (1988). Action of *Bacillus subtilis* α -amylase on native wheat starch. *Biotechnology and Bioengineering*, 31 : 895–904.
- Colonna, P. et Mercier, C. (1984). Macromolecular structure of wrinkled- and smooth-pea starch components. *Carbohydrate Research*, 126 : 233–247.
- Colonna, P., Tayeb, J., et Mercier, C. (1989). Extrusion cooking of starch and starchy products. dans "extrusion cooking.". *St Paul, MN, AACC*, pages 247–319.
- Conde-Petit, B., Escher, F., et Nuessli, J. (2006). Structural features of starch-flavor complexation in food model systems. *Trends in Food Science & Technology*, 17 : 227–235.
- Cooke, D. et Gidley, M. J. (1992). Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation : origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate Research*, 227 : 103–112.
- Davies, A. (1986). Protein functionality in bakery products. dans "chemistry and physics of baking.". *T.R.S.O. Chemistry, ed., Blanshard, J.M.V., Frazier, P.J. and Galliard, T. Londres*, pages 89–104.
- Del Valle, E. (2004). Cyclodextrins and their uses : a review. *Process Biochemistry*, 39 : 1033–1046.
- Derycke, V., Vandeputte, G., Vermeulen, R., De Man, W., Goderis, B., Koch, M., et Delcour, J. (2005). Starch gelatinization and amylose-lipid interactions during rice parboiling investigated by temperature resolved wide angle x-ray scattering and differential scanning calorimetry. *Journal of Cereal Science*, 42 : 334–343.
- Donald, A., Lisa Kato, P., Perry, P., et Waigh, T. (2001). Scattering studies of the internal structure of starch granules. *Starch/Stärke*, 53 : 504–512.
- Donato, L. (2004). *Gélification et séparation de phase dans les mélanges protéines globulaires/pectines faiblement méthylées selon les conditions ioniques*. Thèse de doctorat, Université de Nantes.
- Donovan, J. (1979). Phase transitions of the starch-water system. *Biopolymers*, 18 : 263–275.
- Doublier, J.-L. (1981). Rheological studies of starch : flow behaviour of wheat starch pastes. *Starch/Stärke*, 33 : 415–420.
- Doublier, J.-L. et Choplin, D. (1989). A rheological description of amylose gelation. *Carbohydrate Research*, 193 : 215–226.
- Doublier, J.-L. et Thibault, J.-F. (2002). Agents épaississants et gélifiants de nature glucidique dans "additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agro-alimentaires.". *Multon J.L. (ed), Lavoisier Tec & Doc, Paris*, pages 387–421.
- Duprat, F., Galland, D., Guilbot, A., Mercier, C., et Robin, J. (1980). Dans "les polymères végétaux". *ed. Monties B., Gautier-Villars*, pages 176–231.

-
- Eerlingen, R., Crombez, M., et Delcour, J. (1993). Enzyme-resistant starch. i. quantitative and qualitative influence of incubation time and temperature of autoclaved starch on resistant starch formation. *Cereal Chemistry*, 70 : 339–344.
- Eliasson, A. (1985). Starch gelatinization in the presence of emulsifiers. a morphological study of wheat starch. *Starch/Stärke*, 37 : 411–415.
- Eliasson, A. et Krog, N. (1985). Physical properties of amylose-monoglyceride complexes. *Journal of Cereal Science*, 3 : 239–248.
- Faisant, N., Champ, M., Colonna, P., Buléon, A., et Thibault, J.-F. (1993). Structural discrepancies in resistant starch obtained in vivo in humans and in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 21 : 205–209.
- Fannon, J., Hauber, R., et BeMiller, J. (1992). Surfaces pores of starch granules. *Cereal Chemistry*, 69 : 284–288.
- Fanta, G., Shogren, R., et Salch, J. (1999). Stream jet cooking of high-amylose starch-fatty acid mixtures. an investigation of complex formation. *Carbohydrate Polymers*, 38 : 1–6.
- Farhat, I., Protzmann, J., Becker, A., Vallès-Pamies, B., Neale, R., et Hill, S. (2001). Effect of the extent of conversion and retrogradation on the digestibility of potato starch. *Starch/Stärke*, 53 : 431–436.
- Fechner, P., Wartewig, S., Kleinebudde, P., et Neubert, R. (2005). Studies of the retrogradation process for various starch gels using raman spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 340 : 2563–2568.
- Fernandez, X., Kerverdo, S., Dunach, E., et Lizzani-Cuvelier, L. (2002). Les hétérocycles dans la chimie des arômes. *L'actualité chimique.*, Avril 2002 : 4–14.
- Fontanille, M. et Gnanou, Y. (2002). Chimie et physico-chimie des polymères. *Ed. Dunod, Paris*, pages 375–384.
- French, A. (1981). Dans "trends in the biology of fermentation for fuels and chemicals". *Eds A. Hollaender, R. Rabon, P. Rogers, A San Pietro, R. Valentine, R. Wolfe, Plenum Press, New York*.
- French, A. (1984). Organisation of starch granules. in : "starch, chemistry and technology". *Eds R.L. Whistler, J.N. Bemiller and E.F. Parschall, Academic press, New York*, pages 183–247.
- French, A. et Murphy, V. (1977). Computer modelling in the study of starch. *Cereals Foods World*, 22 : 61–70.
- Frey-Wyssling, A. et Buttrose, M. (1961). Makromolekulare feinslamellen in der körnern der kartoffelstärke. *Die Makromolekulare Chemie*, 44 : 173–178.
- Gaillard, C., Stadelmann, P., Plummer, C., et Fuchs, G. (2004). Practical method for high-resolution imaging of polymer by low-voltage scanning electron microscopy. *Scanning*, 26 : 122–130.

-
- Gallant, D., Bouchet, B., et Baldwin, P. (1997). Microscopy of starch : evidence of a new level of granule organization. *Starch/Stärke*, 32 : 177–191.
- Gallant, D., Bouchet, B., Buléon, A., et Pérez, S. (1992). Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46 : 3–16.
- Gallant, D. et Guilbot, A. (1969). Etude de l'ultrastructure du grain d'amidon à l'aide de nouvelles méthodes de préparation en microscopie électronique. *Starch/Stärke*, 21 : 156–163.
- Gallant, D., Mercier, C., et Guilbot, A. (1972). Electron microscopy of starch granules modified by bacterial α -amylase. *Cereal Chemistry*, 49 : 354–365.
- Galliard, T. et Bowler, P. (1987). Morphology and composition of starch. dans "starch : properties and potential". ed. *Gaillard T., John Wiley and sons*, pages 55–78.
- Galloway, G., Biliaderis, C., et Stanley, D. (1989). Properties and structure of amylose-glycerol monostearate complexes formed in solution or on extrusion of wheat flour. *Journal of food science*, 54 : 950–957.
- Gaudin, S., Lourdin, D., Forssell, P., et Colonna, P. (2000). Antiplasticisation and oxygen permeability of starch-sorbitol films. *Carbohydrate Polymers*, 43 : 33–37.
- Gaudin, S., Lourdin, D., Le Botlan, D., Ilari, J., et Colonna, P. (1999). Plasticisation and mobility in starch-sorbitol films. *Journal of Cereal Science*, 29 : 273–284.
- Gelders, G., Duyck, J., Goesart, H., et Delcour, J. (2005). Enzyme and acid resistance of amylose-lipid complexes differing in amylose chain length, lipid and complexation temperature. *Carbohydrate Polymers*, 60 : 379–389.
- Gelders, G., Goesart, H., et Delcour, J. (2006). Amylose-lipid complexes as controlled lipid release agents during starch gelatinization and pasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 : 1493–1499.
- Gérard, C., Planchot, V., Buléon, A., et Colonna, P. (2001). Amylolysis of maize mutant starches. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81 : 1281–1287.
- Gérard, C., Planchot, V., Colonna, P., et Bertoft, E. (2000). Relationship between branching density and crystalline structure of a- and b-type maize mutant starches. *Carbohydrate Research*, 326 : 130–144.
- Gidley, M. et Bociek, S. (1985). Molecular organization in starches : A ^{13}C cp/mas nmr study. *Journal of American Chemical Society*, 107 : 7040–7044.
- Gidley, M. et Bociek, S. (1988). ^{13}C cp/mas nmr studies of amylose inclusion complexes, cyclodextrins, and the amorphous phase of starch granules : Relationships between glycosidic linkage conformation and solid state ^{13}C chemical shifts. *Journal of American Chemical Society*, 110 : 3820–3829.
- Glenn, G. et Stern, D. (1999). Starch-based microcellular foams. *Journal of American Chemical Society*.

-
- Godet, M. (1994). *Mécanismes de formation des complexes Amylose-Acide gras*. Thèse de doctorat, Université de Nantes.
- Godet, M., Bizot, H., et Buléon, A. (1995a). Crystallization of amylose-fatty acid complexes prepared with different amylose chain lengths. *Carbohydrate Polymers*, 27 : 47–52.
- Godet, M., Bouchet, B., Colonna, P., Gallant, D., et Buléon, A. (1996). Crystalline amylose-fatty acid complexes : morphology and crystal thickness. *Journal of food science*, 61 : 1196–1201.
- Godet, M., Tran, V., Colonna, P., Buléon, A., et Pezolet, M. (1995b). Inclusion/exclusion of fatty acids in amylose complexes as a function of the fatty acid chain length. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17 : 405–408.
- Godet, M., Tran, V., Delage, M., et Buléon, A. (1993). Molecular modelling of the specific interactions involved in the amylose complexation by fatty acids. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15 : 11–16.
- Gouth, B. et Pybus, J. (1971). Effect on the gelatinization temperature of wheat starch granules of prolonged treatment with water at 50°C. *Starch/Stärke*, 23 : 210–212.
- Greenwell, P., Evers, A., Gough, B., et Russel, P. (1985). Amyloglucosidase-catalysed erosion of native, surface-modified and chlorine-treated wheat starch granules. the influence of surface protein. *Journal of Cereal Science*, 3 : 279–293.
- Greenwell, P. et Schofield, J. (1986). A starch granule associated with endosperm softness in wheat. *Cereal Chemistry*, 63 : 379–380.
- Gudmundsson, M. (1992). Effects of an added inclusion-amylose complex on the retrogradation of some starches and amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, 17 : 299–304.
- Guilbot, A., Charboniere, R., Abadie, P., et Girard, P. (1960). L'eau de sorption de l'amidon : étude par spectrologie hertzienne. *Starch/Stärke*, 12 : 327–332.
- Hanashiro, J., Abe, et Hizukuri, S. (1996). A periodic distribution of the chain length of amylopectin as revealed by high-performance anion-exchange chromatography. *Carbohydrate Research*, 283 : 151–159.
- Heinemann, C., Escher, F., et Conde-Petit, B. (2003a). Structural features of starch-lactone inclusion complexes in aqueous potato starch dispersions : the role of amylose and amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, 51 : 159–168.
- Heinemann, C., Zinsli, M., Renggli, A., Escher, F., et Conde-Petit, B. (2003b). Starch-flavour inclusion complexation in aqueous systems. dans "flavour research at the dawn of the twenty-first century.". *J.L. Le Quééré, P.X. Etiévant (eds.). Editions Tec & Doc, Paris*, pages 33–38.
- Heinemann, C., Zinsli, M., Renggli, A., Escher, F., et Conde-Petit, B. (2005). Influence of amylose-flavor complexation on build-up and breakdown of starch structures in aqueous food model systems. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 38 : 885–894.

-
- Helbert, W. (1994). *Données sur la structure du grain d'amidon et des produits de recristallisation de l'amylose*. PhD thesis, Université Joseph Fourier Grenoble I.
- Helbert, W. et Chanzy, H. (1994). Single crystals of v amylose complexed with n-butanol or n-pentanol : structural features and properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16 : 207–213.
- Hermans, P. et Weidinger, A. (1961). On the determination of the crystalline fraction of isotactic polypropylene from x-ray diffraction. *Die Makromolekulare Chemie*, 44 : 24–36.
- Hinkle, M. et Zobel, H. (1968). X-ray diffraction of oriented amylose fibers. iii. the structure of amylose-n-butanol complexes. *Biopolymers*, 6 : 1119–1128.
- Hizukuri, S. (1985). Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. *Carbohydrate Research*, 141 : 295–306.
- Hizukuri, S. (1986). Polymodal distribution of the chain length of amylopectins, and its significance. *Carbohydrate Research*, 147 : 342–347.
- Hizukuri, S., Fujii, M., et Nikuni, Z. (1961). Effect of temperature during germination on the crystalline type of starch in soybean seedling. *Nature*, 192 : 239–240.
- Hizukuri, S., Kaneko, T., et Takeda, Y. (1983). Measurement of the chain length of amylopectin and its relevance to the origin of crystalline polymorphism of starch granules. *Biochimica et Biophysica Acta*, 760 : 188–191.
- Hizukuri, S., Takeda, Y., Yasuda, M., et Susuki, A. (1981). Multi-branched nature of amylose and the action of debranching enzymes. *Carbohydrate Research*, 94 : 205–213.
- Hoover, R. et Vasanthan, T. (1992). Studies on isolation and characterization of starch from oat (*Avena nuda*) grains. *Carbohydrate Polymers*, 19 : 285–297.
- Hori, F., Yamamoto, H., Hirai, A., et Kitamaru, R. (1987). Structural study of amylose polymorphs by cross-polarization-magic-angle spinning, ¹³C-n.m.r. spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 160 : 29–40.
- Hu, H. et Sun, C. (2000). The characterization of physical aging in polymeric composites. *Composites Science and Technology*, 60 : 2693–2698.
- Hulleman, S., Helbert, W., et Chanzy, H. (1996). Single crystals of v amylose complexed with glycerol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 18 : 115–122.
- Imberty, A., Buléon, A., Tran, V., et Pérez, S. (1991). Recent advantages in knowledge of starch structure. *Starch/Stärke*, 43 : 375–384.
- Imberty, A., Chanzy, H., Pérez, S., Buléon, A., et Tran, V. (1988). The double helical nature of the crystalline part of a-starch. *Journal of Molecular Biology*, 201 : 365–378.
- Imberty, A. et Pérez, S. (1988). A revisit to three dimensional structure of b-type starch. *Biopolymers*, 27 : 1205–1221.

-
- Jane, J.-L. et Robyt, J. (1984). Structure studies of amylose-v complexes and retro-graded amylose by action of alpha amylases, and a new method for preparing amyloextrins. *Carbohydrate Research*, 132 : 105–118.
- Janin, J. et Delepierre, M. (1999). Biologie structurale. principes et méthodes biophysiques. *Hermann ed., Paris*, pages 27–53.
- Jenkins, P., Cameron, R., et Donald, A. (1993). A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources. *Starch/Stärke*, 45 : 417–420.
- Jenkins, P. et Donald, A. (1995). The influence of amylose on starch granule structure. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17 : 315–321.
- Jobling, S. (2004). Improving starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biology*, 7 : 210–218.
- John, M., Schmidt, J., et Kneifel, H. (1983). Iodine-maltosaccharide complexes : Relation between chain-length and colour. *Ultrastruct. Res.*, 95 : 210–217.
- Jouquand, C., Ducruet, V., et Le Bail, P. (2006). Formation of amylose complexes with c6-aroma compounds in starch dispersions and its impact on retention. *Food Chemistry*, 96 : 461–470.
- Kainuma, K. et French, A. (1972). Nägeli amyloextrin and its relationship to starch granule structure i. role of water in crystallization of b-starch. *Biopolymers*, 11 : 2241–2250.
- Kalichevski, M., Jaroszkiewicz, E., Ablett, S., Blanshard, J., et Lillford, P. (1992). The glass transition of amylopectin measured by dsc, dmta and nmr. *Carbohydrate Polymers*, 18 : 77–88.
- Kalichevsky, M. et Ring, S. (1987). Incompatibility of amylose and amylopectin in aqueous solution. *Carbohydrate Research*, 162 : 323–338.
- Karkalas, J. et Raphaelides, S. (1986). Quantitative aspect of amylose-lipid interactions. *Carbohydrate Research*, 157 : 215–234.
- Katz, J. (1930). Über die Änderungen in Röntgenspektrum der Stärke Beim Backen und Beim Altbackenwerden des Brotes. *Z. Phys. Chem.*, 150 : 37–59.
- Katz, J. et Derksen, J. (1932). IX Das Röntgenspektrum der alpha-Diamylose stimmt Weitgehend mit dem Gewisser Stärkpräparate überein. *Z. Phys. Chem.*, 158 : 337.
- Katz, J. et Derksen, J. (1933). Über die Umwandlung von Stärkepräparaten mit Kartoffelstärke-Spektrum (B-Spektrum) in Solche mit Weizenstärke-Spektrum (A-Spektrum) und Umgekehrt. *Z. Phys. Chem.*, A165 : 228–233.
- Kiger, J. et Kiger, J. (1968). Techniques modernes de la biscuiterie-pâtisserie-boulangerie (industrielles et artisanales) et des produits de régime. France.
- Knutson, C. (1990). Annealing of maize starches at elevated temperatures. *Cereal Chemistry*, 67 : 376–384.

-
- Kohyama, K. et Sasaki, T. (2006). Differential scanning calorimetry and a model calculation of starches annealed at 20°C and 50°C. *Carbohydrate Polymers*, 63 : 82–88.
- Kowblansky, M. (1985). Calorimetric investigation of inclusion complexes of amylose with long chain aliphatic compounds containing different functional groups. *Macromolecules*, 18 : 1776–1779.
- Krog, N. (1973). Influence of food emulsifiers on pasting temperature and viscosity of various starches. *Starch/Stärke*, 25 : 22–27.
- Krueger, B., Knutson, C., Inglett, G., et Walker, C. (1987). A differential scanning calorimetry study on the effect of annealing on gelatinization behavior of corn starch. *Journal of food science*, 52 : 715–718.
- Kuge, T. et Takeo, K. (1968). Complexes of starchy materials with organic compounds. part ii. complex formation in aqueous solution and fractionation of starch by 1-menthone. *Agricultural and Biological Chemistry*, 32 : 1232–1238.
- Lalush, I., Bar, H., Zakaria, I., Eichler, S., et Shimoni, E. (2005). Utilization of amylose-lipid complexes as molecular nanocapsules for conjugated linoleic acid. *Biomacromolecules*, 6 : 121–130.
- Larousse (1970). Dictionnaire larousse en 3 volumes. *ed. Librairie Larousse*.
- Le Bail, P., Biais, B., Pozo-Bayon, et Cayot, N. (2004). The structure of complexes between amylose and aroma compounds and its impact on flavour release from a baked cereal product. *GIGR International conference Beijing. Proceeding*.
- Le Bail, P., Bizot, H., et Buléon, A. (1993). 'b' to 'a' type phase transition in short amylose chains. *Carbohydrate Polymers*, 21 : 99–104.
- Le Bail, P., Bizot, H., Ollivon, M., Keller, G., Bourgaux, C., et Buléon, A. (1999). Monitoring the crystallization of amylose-lipid complexes during maize starch melting by synchrotron x ray diffraction. *Biopolymers*, 50 : 99–110.
- Le Bail, P., Bizot, H., Pontoire, B., et Buléon, A. (1995). Polymorphic transitions of amylose-ethanol crystalline complexes by moisture exchanges. *Starch/Stärke*, 47 : 229–232.
- Le Bail, P., Rondeau, C., et Buléon, A. (2005). Structural investigation of amylose complexes with small ligands : helical conformation, crystalline structure and thermostability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 35 : 1–7.
- Le Meste, M., Lorient, D., et Simatos, D. (2002). L'eau dans les aliments. *Tec & Doc, Lavoisier, Paris*, pages 49–83.
- Leloup, V. (1989). *Gels binaires d'amylose-amylopectine : structures et amylolyse*. PhD thesis, Université Paris 6.
- Leloup, V., Colonna, P., et Buléon, A. (1991). Influence of amylose-amylopectin ratio on gel properties. *Journal of Cereal Science*, 13 : 1–13.

-
- Leloup, V., Colonna, P., Ring, S., Roberts, K., et Wells, B. (1992). Microstructure of amylose gels. *Carbohydrate Polymers*, 18 : 189–197.
- Li, J.-H., Guiltinan, M., et Thompson, D. (2006). The use of laser differential interference contrast microscopy for the characterization of starch granule ring structure. *Starch/Stärke*, 58 : 1–5.
- Lii, C.-y., Stobinski, L., Tomasik, P., et Liao, C.-d. (2003). Single-walled carbon nanotube-potato amylose complex. *Carbohydrate Polymers*, 51 : 93–98.
- Lim, S., Chang, E., et Chung, H. (2001). Thermal transition characteristics of heat-moisture treated corn and potato starches. *Carbohydrate Polymers*, 46 : 107–115.
- Linden, G. et Lorient, D. (1999). Starch products. dans "new ingredients in food processing.". ed G. Linden and D. Lorient, CRC Press, New York, pages 242–262.
- Lostie, M., Peczalski, R., Andrieu, J., et Laurent, M. (2002). Study of sponge cake batter baking process. part i : Experimental data. *Journal of Food Engineering*, 51 : 131–137.
- Lourdin, D., Bizot, H., et Colonna, P. (1997a). "antiplasticization" in starch-glycerol films ? *Journal of Applied Polymer Science*, 63 : 1047–1053.
- Lourdin, D., Coignard, L., Bizot, H., et Colonna, P. (1997b). Influence of equilibrium relative humidity and plasticizer concentration on the water content and glass transition of starch materials. *Polymer*, 38 : 5401–5406.
- Lu, T.-J., Jane, J.-L., et Keeling, P.L. Singletary, G. (1996). Maize starch fine structures affected by ear developmental temperature. *Carbohydrate Research*, 282 : 157–170.
- Miles, M., Morris, V., Orford, P., et Ring, S. (1985). The role of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydrate Research*, 135 : 271–281.
- Miller, D. et Brannon, R. (1980). Accurate fiber x-ray diffraction data from films. dans "fiber diffraction methods". eds French A.D. and Garner K.C., ACS Symposium series, pages 93–112.
- Morris, C. (2002). Puroindolines : the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant Molecular Biology*, 48 : 633–647.
- Morrison, W. (1981). Starch lipids : a reappraisal. *Starch/Stärke*, 33 : 408–410.
- Morrison, W. (1988). Lipids in cereal starches : a review. *Journal of Cereal Science*, 8 : 1–15.
- Morrison, W. et Coventry, A. (1985). Extraction of lipids from cereal starches with hot aqueous alcohols. *Starch/Stärke*, 37 : 83–87.
- Morrison, W., Law, R., et Snape, C. (1993). Evidence for inclusion complexes of lipids with v-amylose in maize, rice and oat starches. *Journal of Cereal Science*, 18.
- Natta, G. (1955). Une nouvelle classe de polymères d'alpha oléfines ayant une régularité de structure exceptionnelle. *Carbohydrate Polymers*, 16 : 143–154.

-
- Nelson, H. (1944). A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 153 : 375–380.
- Nuessli, J., Handschin, S., Conde-Petit, B., et Escher, F. (2000). Rheology and structure of amylopectin potato starch dispersions without and with emulsifier addition. *Starch/Stärke*, 52 : 22–27.
- Nuessli, J., Putaux, J., Le Bail, P., et Buléon, A. (2003). Crystal structure of amylose complexes with small ligands. *International Journal of Biological Macromolecules*, 33 : 227–234.
- Oates, C. (1997). Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends in Food Science & Technology*, 8 : 375–382.
- Oostergel, G. et van Bruggen, E. (1989). On the origin of a low angle spacing in starch. *Starch/Stärke*, 41 : 331–335.
- Oostergel, G. et van Bruggen, E. (1993). The crystalline domains in potato starch granules are arranged in a helical fashion. *Carbohydrate Polymers*, 21 : 7–12.
- Osman-Ismail, F. et Solms, J. (1973). The formation of inclusion compounds of starches with flavor substances. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 6 : 147–150.
- Paris, M., Bizot, H., Emery, J., Buzaré, J., et Buléon, A. (1999). Crystallinity and structuring role of water in native and recrystallized starches by ¹³C cp-mas nmr spectroscopy 1 : spectral decomposition. *Carbohydrate Polymers*, 39 : 327–339.
- Peterson, S., Fanta, G., Adlof, R., et Felker, F. (2005). Identification of complexed native lipids in crystalline aggregates formed from jet cooked cornstarch. *Carbohydrate Polymers*, 61 : 162–167.
- Pfannemüller, B. (1987). Influence of the chain length of short monodisperse amylose on the formation of a- and b-type x-ray diffraction patterns. *International Journal of Biological Macromolecules*, 9 : 105–108.
- Pohu, A. (2002). *Formation des amidons résistants au cours des traitements thermiques et enzymatiques*. Thèse de doctorat, Université de Nantes.
- Potocki-Veronese, G., Putaux, J., Dupeyre, D., Albenne, C., Remaud-Siméon, M., Monsan, P., et Buléon, A. (2005). Amylose synthesized in vitro by amylosucrase : morphology, structure and properties. *Biomacromolecules*, 6 : 1000–1011.
- Pozo-Bayón, M., Guichard, E., et Cayot, N. (2006). Feasibility and application of solvent assisted flavour evaporation and standard addition method to quantify the aroma compounds in flavoured baked matrices. *Food Chemistry*, 99 : 416–423.
- Putaux, J., Buléon, A., et Chanzy, H. (2000). Network formation in dilute amylose and amylopectin studied by tem. *Macromolecules*, 33 : 6416–6422.
- Qi, Z. et Xu, A. (1999). Starch-based ingredients for flavor encapsulation. *Cereal Foods World*, 44 : 460–465.

-
- Rappenecker, G. et Zugenmaier, P. (1981). Detailed refinement of the crystal structure of vhamylose. *Carbohydrate Research*, 89 : 11–19.
- Richard, H. (1992). Connaissance de la nature des arômes. dans "les arômes alimentaires.". *Tec & Doc, Lavoisier, Paris*, pages 21–37.
- Ridout, M., Parker, M., Hedley, C., Bogracheva, T., et Morris, V. (2003). Atomic force microscopy of pea starch granules : Granule architecture of wild-type parent, *r* and *rb* single mutants, and the *rrb* double mutant. *Carbohydrate Research*, 338 : 2135–2147.
- Ring, S., Colonna, P., L'Anson, K., Kalichevski, M., Miles, M., Morris, V., et Orford, P. (1987). The gelation and crystallisation of amylopectin. *Carbohydrate Research*, 162 : 277–293.
- Robert, P., Devaux, M.-F., et Bertrand, D. (1996). Beyond prediction : extracting relevant information from near infrared spectra. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 4 : 75–84.
- Robin, J. (1976). *Comportement du grain d'amidon à l'hydrolyse acide ménagée. Etude physico-chimique et enzymatique de la fraction insoluble. Contribution à la connaissance de la structure de l'amylopectine.* Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie de Paris.
- Robin, J., Mercier, C., Charboniere, R., et Guilbot, A. (1974). Lintnerized starches. gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chemistry*, 51 : 389–406.
- Robin, J., Mercier, C., Duprat, F., Charboniere, R., et Guilbot, A. (1975). Etude chromatographique et enzymatique des résidus insolubles provenant de l'hydrolyse chlorhydrique d'amidons de céréales, en particulier de maïs cireux. *Starch/Stärke*, 27 : 36–45.
- Röper, H. (2002). Renewable raw materials in europe - industrial utilisation of starch and sugar. *Starch/Stärke*, 54 : 89–99.
- Röper, H. et Koch, R. (1990). The role of starch in biodegradable thermoplastic materials. *Starch/Stärke*, 42 : 123–130.
- Rouessac, F. et Rouessac, A. (1998). Analyse chimique. méthodes et techniques instrumentales modernes. *ed. Dunod, Paris, 4ème édition*, pages 147–172.
- Roussel, P. et Chiron, H. (2002). Les pains français. evolution, qualité, production. *Vesoul, France*, page 433p.
- Ruland, W. (1964). Crystallinity and disorder parameters in nylon 6 and nylon 7. *Polymer*, 5 : 89–102.
- Rundle, R. et Edwards, F. (1943). The configuration of starch in the starch-iodine complex. iv. an x-ray diffraction investigation of butanol-precipitated amylose. *Journal of American Chemical Society*, 65 : 2200–2203.
- Rundle, R., Foster, J., et Baldwin, R. (1944). On the nature of the starch-iodine complex. *Journal of American Chemical Society*, 66 : 2116–2120.

-
- Rundle, R. et French, A. (1943). The configuration of starch and the starch-iodine complex. ii. optical properties of starch fractions. *Journal of American Chemical Society*, 65 : 558–561.
- Rutschmann, M., Heiniger, J., Pliska, V., et Solms, J. (1989). Formation of inclusion complexes of starch with different organic compounds. i. method of evaluation of binding profiles with menthone as an example. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 22 : 240–244.
- Rutschmann, M. et Solms, J. (1990a). Formation of inclusion complexes of starch in ternary model systems with decanal, menthone and 1-naphtol. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 23 : 457–464.
- Rutschmann, M. et Solms, J. (1990b). Formation of inclusion complexes of starch with different organic compounds. ii. study of ligand binding in binary models systems with decanal, 1-naphtol, monostearate and monopalmitate. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 23 : 70–79.
- Rutschmann, M. et Solms, J. (1990c). Formation of inclusion complexes of starch with different organic compounds. iii. study of ligand binding in binary models systems with (-)limonene. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 23 : 80–83.
- Rutschmann, M. et Solms, J. (1990d). Formation of inclusion complexes of starch with different organic compounds. v. characterization of complexes with amperometric iodine titration, as compared with direct quantitative analysis. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 23 : 88–93.
- Rutschmann, M. et Solms, J. (1990e). The formation of ternary inclusion complexes of starch with menthone and monostearate. a possible food model system. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 23 : 451–456.
- Rutschmann, M. et Solms, J. (1991). Inclusion complexes of potato starch - a binding model with synergism and antagonism. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 24 : 473–475.
- Sablani, S., Marcotte, M., Baik, O., et Castaigne, F. (1998). Modeling of simultaneous heat and water transport in the baking process. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 31 : 201–209.
- Saibene, D. et Seetharaman, K. (2006). Segmental mobility in starch granules at low moisture contents. *Carbohydrate Polymers*, xx : 1–9.
- Sarko, A. et Biloski, A. (1980). Crystal structure of the koh-amylose complex. *Carbohydrate Research*, 79 : 11–21.
- Sarko, A. et Wu, H. (1978). The crystal structure of a, b and c polymorph of amylose and starch. *Starch/Stärke*, 21 : 73–78.
- Sarko, A. et Zugenmaier, P. (1980). Crystal structures of amylose and its derivatives. dans "fiber diffraction methods". Eds A.D. French and K.C. Gardner, ACS Symposium series, 141 : 459–482.
- Schoch, T. (1942). Fractionation of starch by selective precipitation with butanol. *Journal of American Chemical Society*, 64 : 2957–2962.

-
- Schoch, T. (1945). The fractionation of starch. *Advanced Carbohydrate Chemistry*, 1 : 247–277.
- Schofield, J. (1994). Wheat proteins : structure and functionality in milling and breadmaking. (Eds) W. Bushuk, V. Rasper (eds), *Wheat production, composition and utilization*. Blackie, Glasgow, pages 73–78.
- Seguchi, M. et Yamada, Y. (1989). Study of proteins extracted from the surface of wheat starch granules with sodium dodecyl sulfate. *Cereal Chemistry*, 66 : 193–196.
- Sekkal, M., Dincq, V., Legrand, P., et Huvenne, J. (1995). Investigation of the glycosidic linkages in several oligosaccharides using ft-ir and ft raman spectroscopies. *Journal of Molecular Structure*, 349 : 349–352.
- Senti, F. et Witnauer, L. (1946). Oriented filaments of amylose and alkali amylose. *Journal of American Chemical Society*, 68 : 2407–2408.
- Slade, L. et Levine, H. (1989). A food polymer approach to selected aspects of starch gelatinization and retrogradation. dans "frontiers in carbohydrate research 1. food applications.". R.P. Millone, J.N. BeMiller and R. Chandrasekaran (Eds). London : Elsevier.
- Smith, A. (1999). Making starch. *Current Opinion in Plant Biology*, 2 : 223–229.
- South, J., Morrison, W., et Nelson, O. (1991). A relationship between the amylose and lipid contents of starches from various mutants for amylose content in maize. *Journal of Cereal Science*, 14 : 267–278.
- Stute, R. (1992). Hydrothermal modification of starches : the difference between annealing and heat moisture treatment. *Starch/Stärke*, 44 : 205–214.
- Stute, R. et Konieczny-Janda, G. (1983). DSC-Untersuchungen an Stärken. Teil ii. Untersuchungen an Stärke-Lipid-Complexen. *Starch/Stärke*, 35 : 340–347.
- Takahashi, Y., Kumano, T., et Nishikawa, S. (2004). Crystal structure of b-amylose. *Macromolecules*, 37 : 6827–6832.
- Takeda, Y., Maruta, N., et Hizukuri, S. (1992). Structures of amylose subfractions with different molecular sizes. *Carbohydrate Research*, 226 : 279–285.
- Takeda, Y., Shirasaka, K., et Hizukuri, S. (1984). Examination of the purity and structure of amylose by gel-permeation chromatography. *Carbohydrate Research*, 132 : 83–92.
- Takeda, Y., Shitaozono, T., et Hizukuri, S. (1990). Structure of subfractions of corn amylose. *Carbohydrate Research*, 199 : 207–214.
- Tang, H., Mitsunaga, T., et Kawamura, Y. (2006). Molecular arrangement in blocklets and starch granule architecture. *Carbohydrate Polymers*.
- Tester, R. et Debon, S. (2000). Annealing of starch - a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27 : 1–12.
- Tester, R. et Morrison, W. R. (1992). Swelling and gelatinisation of cereal starches iii. some properties of waxy and normal non waxy barley starches. *Cereal Chemistry*, 69 : 654–658.

-
- Thurn, A. et Burchard, W. (1985). Heterogeneity in branching of amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, 5 : 441–460.
- Tollier, M.-T. et Robin, J. (1979). Adaptation de la méthode à l'orcinol-sulfurique au dosage automatique des glucides neutres totaux : conditions d'application aux extraits d'origine végétale. *Ann. Technol. Agric*, 28 : 1–15.
- Turnbull, K., Marion, D., Gaborit, T., Appels, R., et Rahman, S. (2003). Early expression of grain hardness in the developing wheat endosperm. *Planta*, 216 : 699–706.
- van de Velde, F., van Riel, J., et Tromp, R. (2002). Visualisation of starch granule morphologies using confocal scanning laser microscopy (cslm). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82 : 1528–1536.
- Van Hung, P., Maeda, T., et Morita, N. (2006). Waxy and high-amylose wheat starches and flours—characteristics, functionality and application. *Trends in Food Science & Technology*, in press : 1–9.
- Van Soest, J., Tournois, H., de Wit, D., et Vliegthart, J. (1995). Short range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance fourier-transform ir spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 283.
- Vasanthan, T. et Hoover, R. (1992). A comparative study of the composition of lipids associated with starch granules from various botanical sources. *Food Chemistry*, 43 : 19–27.
- Veregin, R., Fyfe, C., Marchessault, R., et Taylor, M. (1986). Characterisation of the crystalline a and b starch polymorphs and investigation of starch crystallisation by high-resolution ¹³C cp/mas nmr. *Macromolecules*, 19 : 1030–1034.
- Veregin, R., Fyfe, C., Marchessault, R., et Taylor, M. (1987). Correlation of ¹³C chemical shifts with torsional angles from high-resolution, ¹³C-c.p.-m.a.s. n.m.r. studies of crystalline cyclomalto-oligosaccharide complexes, and their relation to the structure of the starch polymorphs. *Carbohydrate Research*, 160 : 41–56.
- Wade, P. (1988). Biscuits, cookies and crackers. vol. 1. the principles of the craft. *Elsevier Applied Science, London and New York*, page 176p.
- Waigh, T., Gidley, M., Komanshek, B. U., et Donald, A. (2000a). The phase transformations in starch during gelatinisation : a liquid crystalline approach. *Carbohydrate Research*, 328 : 165–176.
- Waigh, T., Hopkinson, I., Donald, A., Butler, M.F. Heidelberg, F., et Riekkel, C. (1997). Analysis of the native structure of starch granules with x-ray microfocus diffraction. *Macromolecules*, 30 : 3813–3820.
- Waigh, T., Lisa Kato, K., Donald, A., Gidley, M., Clarke, C., et Riekkel, C. (2000b). Side-chain liquid-crystalline model for starch. *Starch/Stärke*, 52 : 450–460.
- Waigh, T., Perry, P., Riekkel, C., Gidley, M., et Donald, A. (1998). Chiral side-chain liquid-crystalline polymeric properties of starch. *Macromolecules*, 31 : 7980–7984.

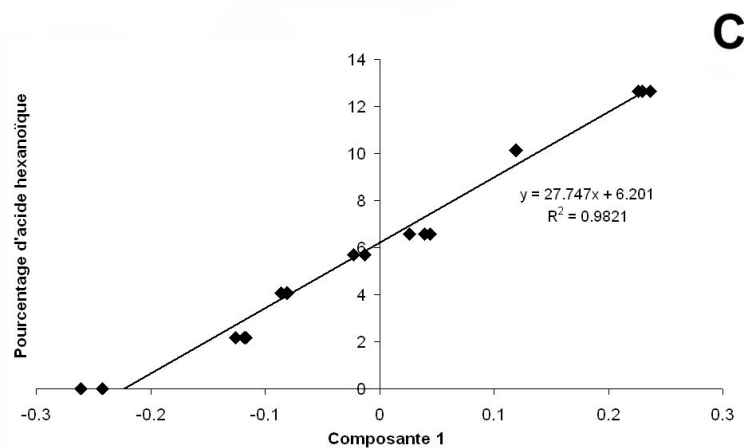
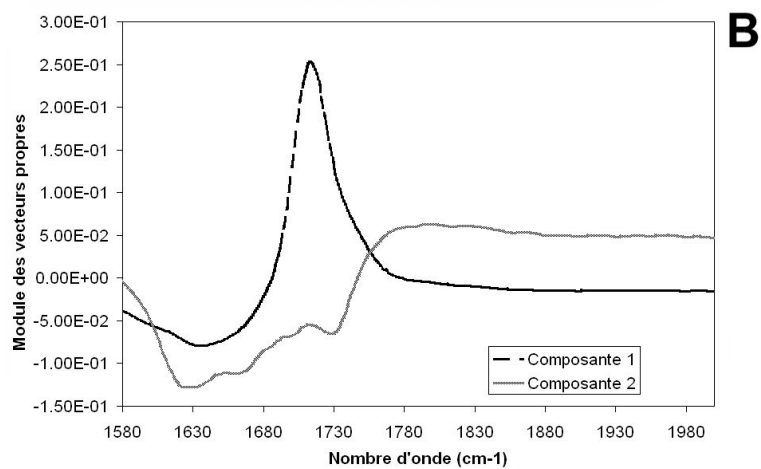
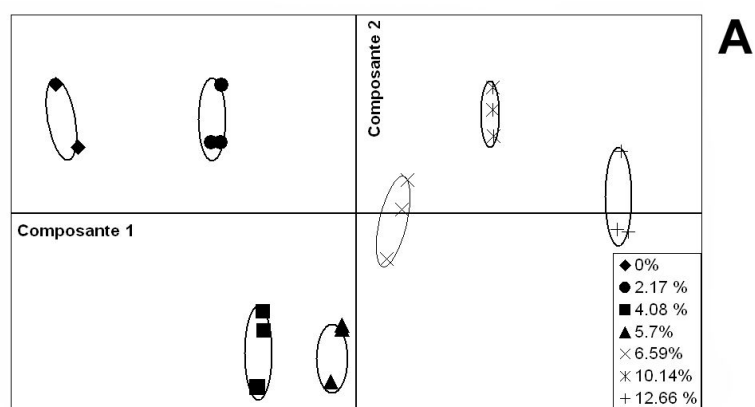
-
- Wakelin, J., Virgin, H., et Crystal, E. (1959). Development and comparison of two x-ray methods for determining the crystallinity of cotton cellulose. *Journal of Applied Physics*, 30 : 1654–1662.
- Whittam, M., Noel, T., et Ring, S. (1990). Melting behavior of a- and b-type crystalline starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 12 : 359–362.
- Whittam, M., Orford, P., Ring, S., Clark, S., Parker, M., Cairns, P., et Miles, M. (1989). Aqueous dissolution of crystalline and amorphous amylose-alcohol complexes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 11 : 339–344.
- Winter, W., Chanzy, H., et Putaux, J. (1998). Inclusion compounds of amylose. *Polymer Preparation*, 39 : 703–708.
- Winter, W. et Sarko, A. (1974). Crystal and molecular structure of the amylose-dmso complex. *Biopolymers*, 23 : 1461–1482.
- Wong, C., Muhammad, S., Dzulkifly, M., Saari, N., et Ghazali, H. (2007). Enzymatic production of linear long-chain dextrin from sago (*Metroxylon sagu*) starch. *Food Chemistry*, 100 : 774–780.
- Wu, H. et Sarko, A. (1978a). The double helical molecular structure of a-amylose. *Carbohydrate Research*, 61 : 27–40.
- Wu, H. et Sarko, A. (1978b). The double helical molecular structure of b-amylose. *Carbohydrate Research*, 61 : 7–25.
- Wulff, G., Avgenaki, G., et Guzman, M. (2005). Molecular encapsulation of flavours as helical inclusion complexes of amylose. *Journal of Cereal Science*, 41 : 1–11.
- Yamaguchi, M., Kainuma, K., et French, A. (1979). Electron microscopic observations of waxy maize starch. *Journal of Ultrastructure Research*, 69 : 249–261.
- Yamashita, Y. (1965). Single crystals of amylose v complexes. *Journal of Polymer Science*, A3 : 3251–3260.
- Yamashita, Y. et Hirai, N. (1966). Single crystals of v complexes. ii. crystals with 71 helical configuration. *Journal of Polymer Science*, A4 : 161–171.
- Yamashita, Y. et Monobe, K. (1971). Single crystals of amylose v complexes. iii. crystals with 81 helical configuration. *Journal of Polymer Science*, 9 : 1471–1481.
- Yamashita, Y., Ryugo, J., et Monobe, K. (1973). An electron microscopic study on crystals of amylose v complexes. *Journal of Electronic Microscopy*, 22 : 19–26.
- Zelezna, K. et Hosney, R. (1987). The glass transition in starch. *Cereal Chemistry*, 64 : 121–124.
- Zeller, B., Saleeb, F., et Ludescher, R. (1999). Trends in development of porous carbohydrate food ingredients for use in flavor encapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, 9 : 389–394.

-
- Zhao, J., Madson, M., et Whistler, R. (1996). Cavities in porous corn starch provide a large storage place. *Cereal Chemistry*, 73 : 379–380.
- Zhao, J. et Whistler, R. (1994). Spherical aggregates of starch granules as flavor carriers. *Food Technology*, July 1994 : 104–105.
- Zobel, H., French, A., et Hinkle, M. (1967). X-ray diffraction of oriented amylose fibers. ii. structure of v amyloses. *Biopolymers*, 5 : 837–845.
- Zobel, H., Young, S., et Rocca, L. (1988). Starch gelatinization : an x-ray diffraction study. *Cereal Chemistry*, 65 : 443–446.

ANNEXES

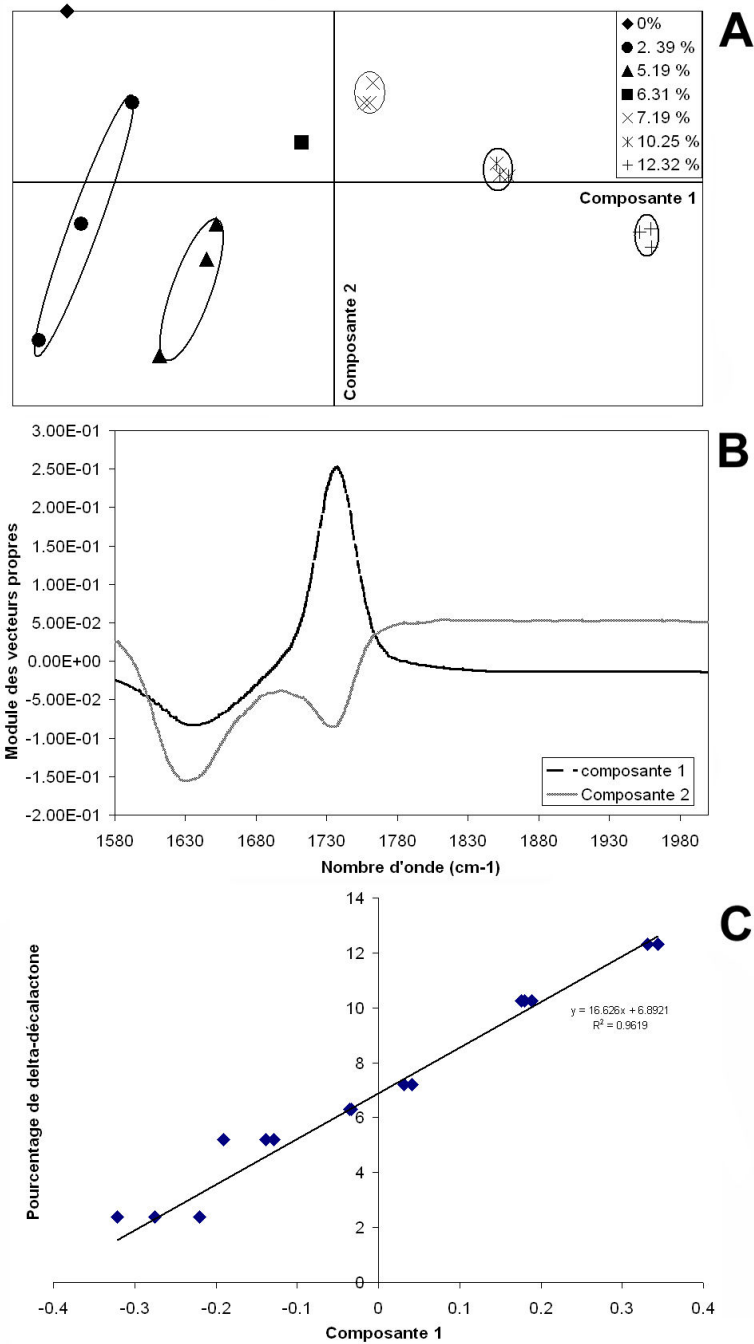
Annexe 1

Principe du dosage de l'acide hexanoïque dans les complexes. (A) Carte ACP obtenue à partir de la gamme étalon, (B) Profils spectraux des composantes 1 et 2 et (C) droite de régression et équation de prédiction pour le dosage.



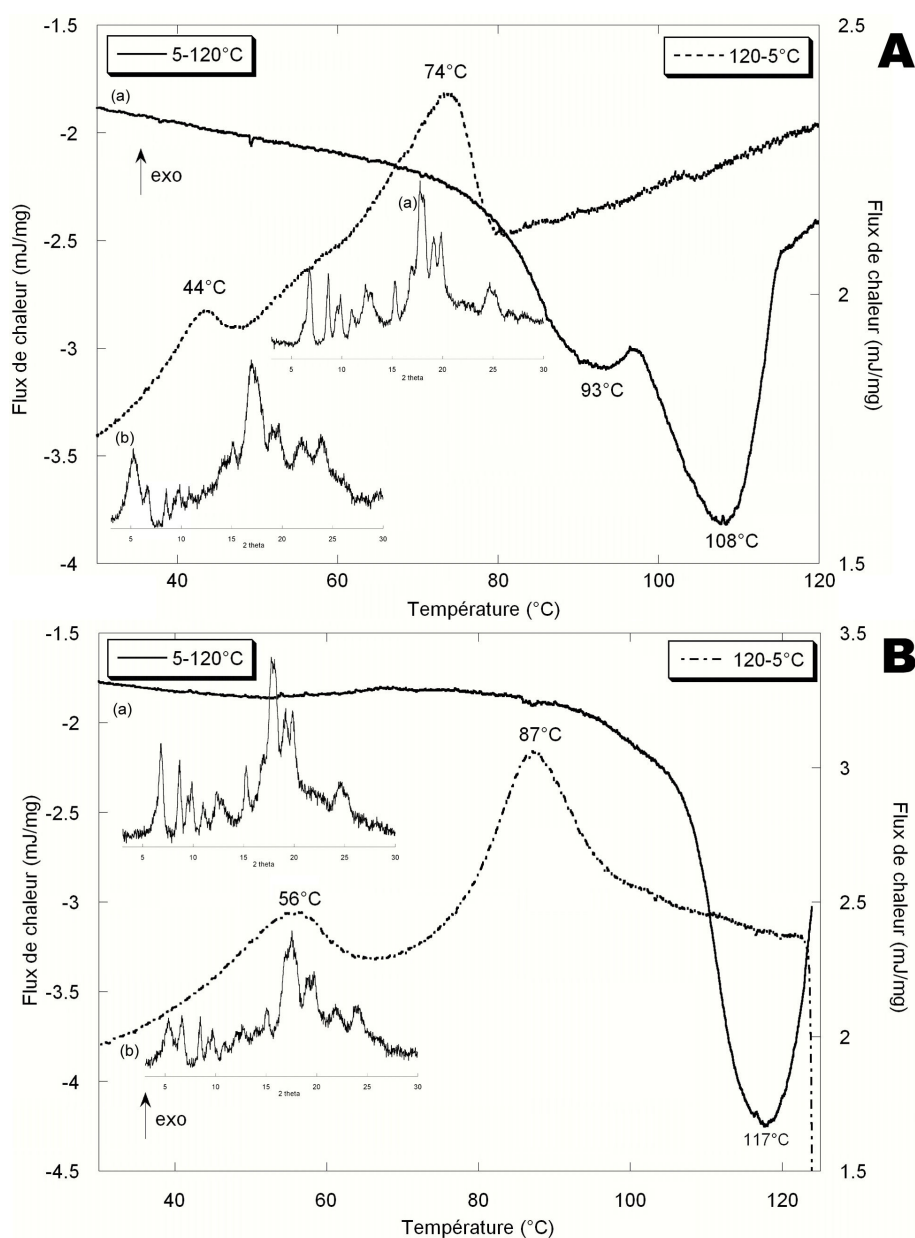
Annexe 2

Principe du dosage de la δ -décylactone dans les complexes. (A) Carte ACP obtenue à partir de la gamme étalon, (B) Profils spectraux des composantes 1 et 2 et (C) droite de régression et équation de prédiction pour le dosage.



Annexe 3

Thermogrammes de complexes de 30 à 120 °C (0.1 °C/min) et diagrammes de diffraction (a) avant μ AED et (b) après un cycle de température. A. Complexes amylose- δ -décalactone B. Complexes amylose-menthone.



Résumé

La complexation de l'amylose par des composés d'arôme a été étudiée afin de mieux appréhender l'influence de l'amidon sur la rétention d'arômes dans une matrice alimentaire de type génoise. La morphologie lamellaire des complexes semi-cristallins résultants a été étudiée par MET et trois types de structures cristallines V_{6I} , V_{6II} et V_{6III} ont été déterminées par diffraction des rayons X. La stœchiométrie de ces complexes a également été établie par dosage par spectroscopie infrarouge des molécules piégées dans les zones amorphes et cristallines et estimées à 1 à 3 molécules de composés d'arôme par hélice d'amylose dans les lamelles cristallines. L'étude des cinétiques de cristallisation par spectroscopie infrarouge a permis de proposer 2 mécanismes de complexation différents, l'un d'eux impliquant vraisemblablement une transition polymorphique d'un type cristallin V vers un autre type cristallin V en cours de cristallisation. L'étude par modélisation moléculaire a révélé que certains composés d'arôme peuvent être inclus dans la cavité de l'hélice d'amylose sans entraîner de déformation de celle-ci. En revanche d'autres composés d'arôme ne peuvent pas être inclus sans déformation de l'hélice. Ces molécules sont donc très probablement situées entre les hélices d'amylose dans l'empilement cristallin et lorsque la maille le permet (type V_{6II} et V_{6III}). La stabilité thermique des complexes étudiée par AED et l'ensemble de ces résultats suggèrent une réelle implication des complexes d'amylose sur la rétention des arômes dans une matrice alimentaire. Ceci a, par ailleurs, pu être vérifié par suivi en fluorescence d'un composé d'arôme complexant l'amylose et d'un autre ne complexant pas, avant et après cuisson d'une génoise.

Mots-clés: amidon, amylose, composés d'arôme, acide décanoïque, hexanoïque, complexes, delta-décalactone, rétention, diffraction des rayons X, infrarouge, modélisation moléculaire, MET

Abstract

The complexation between amylose and several aroma compounds was studied in order to grasp the influence of starch on the trapping of flavours in foods matrices as sponge-cakes. These complexations lead to 3 different semi-crystalline structures V_{6I} , V_{6II} and V_{6III} identified by X-Ray scattering. The TEM allowed to highlight a lamellar structure alternating amorphous and crystalline domains, more or less organized depending on the flavoring molecule used for complexation. The stoichiometry of these complexes was also investigated by measurements of trapped molecules within the amorphous and crystalline domains and found close to one to three molecules for one amylose helix in crystalline domains. The study of kinetics of crystallization by FT-IR spectroscopy allowed to propose 2 different complexation mechanisms, with polymorphic transition from one V crystalline type to an other V crystalline type during crystallization for one of them. The molecular modeling studies showed that some aroma compounds can be included inside the helix without any distortion. Those which can't be included without distortion might be only present between helices in crystalline domains. The thermal stability of complexes studied by DSC and preceding results suggest a real implication of amylose complexes on the retention of flavours in real food matrices. This point was verified by fluorescent spectroscopy following a complexing and a non-complexing molecule during and after the sponge-cake baking.

Keywords: starch, amylose, aroma compounds, flavours, hexanoic, decanoic acid, complexes, delta-decalactone, trapping, X ray scattering, infrared, molecular modeling, TEM

