

50376
1981
39

N° d'ordre : 261

50376
1981
39

THESE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR INGENIEUR

(SPECTROCHIMIE et METHODES D'ANALYSE)

par

Armelle GARCIA

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DU FRACTIONNEMENT CHIMIQUE
DE L'AMIDON DE POMME DE TERRE
CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE SES CONSTITUANTS**



Soutenu le 13 mars 1981 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

M. F. WALLART	Président
M^{me} C. MERCIER	Rapporteur
M. B. FOURNET	Examineur
M. D. COUTURIER	Examineur
M. A. GUILBOT	Membre invité
M. G. FLECHE	Membre invité

Cette thèse a été effectuée au Centre de Recherches Agro-Alimentaires
de l'Institut National de la Recherche Agronomique
- Laboratoire de Biochimie des Aliments - Nantes.

Je remercie Madame Christiane MERCIER, Maître de Recherches
à l'INRA, Monsieur André GUILBOT, Directeur de Recherches à l'INRA et
toutes les personnes qui, à quelque titre que ce soit ont contribué
à sa réalisation.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

TRAVAUX ANTERIEURS

1. CONSTITUTION CHIMIQUE ET MACROMOLECULAIRE DE L'AMIDON.....	3
1.1. Constitution chimique.....	3
1.2. Structure macromoléculaire de l'amidon.....	4
1.2.1. L'amylose.....	4
1.2.2. L'amylopectine.....	4
1.2.3. Le matériel intermédiaire.....	6
2. FRACTIONNEMENT DE L'AMIDON.....	7
2.1. La lixiviation ("Selective leaching").....	7
2.2. Fractionnement par dispersion du grain.....	7
2.2.1. Dispersion du grain.....	8
2.2.2. Complexation de l'amylose. Fractionnement de l'amylose et l'amylopectine.....	8
2.3. Procédé industriel.....	10
3. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'AMYLOSE ET L'AMYLOPECTINE.....	11
3.1. Solubilité dans différents solvants.....	11
3.1.1. Solubilité en milieu aqueux et alcalin.....	11
3.1.2. Solubilité dans les solvants organiques.....	11
3.2. Formation des complexes.....	12
3.2.1. Complexation par l'iode.....	12
3.2.2. Complexation par les composés organiques.....	13
3.3. Propriétés viscosimétriques des macromolécules en solution.....	14
3.4. Comportement des constituants de l'amidon sur gel d'agarose.....	16
3.4.1. La filtration sur gel.....	16
3.4.2. Chromatographie de filtration sur gel d'agarose des constituants de l'amidon.....	17
4. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE L'AMYLOSE ET L'AMYLOPECTINE.....	18
4.1. Enzymes.....	18
4.1.1. Enzymes spécifiques de la liaison $\alpha(1\rightarrow4)$	18
4.1.2. Enzymes spécifiques de la liaison $\alpha(1\rightarrow6)$	19
4.1.3. Enzymes spécifiques des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ et $\alpha(1\rightarrow6)$	20
4.2. Hydrolyse enzymatique de l'amylose.....	20
4.3. Hydrolyse enzymatique de l'amylopectine.....	21

TRAVAUX PERSONNELS

MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL.....	23
1.1. Amidon et amyloses.....	23
1.2. Solvants.....	23
1.3. Gels et produits divers.....	23
1.4. Enzymes.....	23
1.5. Appareillage.....	24
2. METHODES	
2.1. Procédé de fractionnement de l'amidon.....	24
2.1.1. Prétraitement.....	24
2.1.2. Complexation par le thymol.....	25
2.1.3. Complexation par le butanol.....	25
2.1.4. Recristallisations.....	25
2.1.5. Dosage et conservation des produits obtenus au cours du fractionnement. Préparation et dosages de leurs solutions....	26
2.2. Méthodes de dosages.....	26
2.2.1. Méthodes de dosages enzymatiques.....	26
2.2.1.1. Dosage de l'amidon et des oligosides et polysides provenant de son fractionnement.....	26
2.2.1.2. Dosage du glucose.....	27
2.2.2. Méthodes de dosages chimiques.....	28
2.2.2.1. Dosage des glucides totaux.....	28
2.2.2.2. Dosage du pouvoir réducteur.....	28
2.3. Méthodes de caractérisation des produits de fractionnement.....	29
2.3.1. Détermination des profils d'élution sur gel de Sépharose 2B-CL.....	29
2.3.2. Détermination du maximum du spectre d'absorption du complexe amylose-iode.....	29
2.3.3. Détermination de la capacité de liaison à l'iode (CLI) par ampèrométrie.....	30
2.3.4. Détermination des caractéristiques viscosimétriques.....	31
2.3.5. Détermination du taux de β -amylolyse.....	31
2.3.5.1. Préparation du substrat.....	32
2.3.5.2. β -amylolyse.....	32

RESULTATS

1. COMPOSITION DE L'AMIDON DE POMME DE TERRE.....	33
2. ANALYSE QUANTITATIVE DU FRACTIONNEMENT.....	33
3. CARACTERISATION DES FRACTIONS OBTENUES AU COURS DU FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE DE PERMEATION SUR GEL DE SEPHAROSE 2B-CL.....	35
3.1. Procédé utilisé pour chaque chromatographie.....	35
3.2. Calibrage de la colonne.....	36
3.2.1. Détermination des V_0 et V_t	36
3.2.2. Détermination des K_{av} de 2 amyloses industrielles.....	37
3.2.3. Influence sur le profil d'élution de la masse de glucides injectés sur la colonne.....	38
3.3. Chromatographie de perméation sur gel de Sépharose 2B-CL des produits obtenues au cours du fractionnement de l'amidon de pomme de terre.....	38

3.3.1. Chromatographie de l'amidon de pomme de terre natif.....	38
3.3.2. Chromatographie des complexes d'amylose.....	38
3.3.3. Chromatographie des fractions amylopectine.....	40
3.3.4. Chromatographie des fractions de matériel intermédiaire.....	40
4. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES PRODUITS DU FRACTIONNEMENT DE L'AMIDON DE POMME DE TERRE ET DES 2 AMYLOSES INDUSTRIELLES.....	40
4.1. Détermination du maximum des spectres d'absorption des complexes formés avec l'iode.....	41
4.2. Détermination des capacités de liaison à l'iode (CLI) des amyloses industrielles et des produits du fractionnement de l'amidon de pomme de terre.....	41
4.3. Détermination des caractéristiques viscosimétriques des amyloses industrielles et des fractions obtenues au cours du fractionnement de l'amidon de pomme de terre.....	41
5. DETERMINATION DES TAUX DE β -AMYLOLYSE.....	43
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....	44

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION

L'amidon, substance glucidique de réserve, est synthétisé par la cellule végétale à partir de l'énergie solaire. Il apparaît dans la nature sous forme de grains dont la taille, la forme et les propriétés très variables, caractérisent l'origine botanique, malgré les faibles variations que peuvent entraîner des modes d'extraction différents.

La source d'amidon la plus importante est représentée par les graines de céréales (40-90% de leur poids sec), les graines de légumineuses (30-70% de leur poids sec) et les tubercules (65-85% de leur poids sec).

La production mondiale d'amidon est de 15 millions de tonnes, extrait principalement à partir de maïs (9 millions) et de pomme de terre (1,5 à 2 millions), le reste provenant du blé, du riz, du manioc. La France en produit à elle seule 600 000 tonnes dont, à l'heure actuelle, 60% proviennent du maïs, 10% du blé et 30% de la pomme de terre.

L'amidon a constitué de tout temps une source énergétique indispensable à l'alimentation des êtres vivants, en particulier à celle de l'homme. En dehors de son intérêt nutritionnel, il présente de nombreuses utilisations non alimentaires et constitue notamment une matière première importante dans l'industrie textile et celle du papier.

Certains futurologues pensent même qu'en tant que polymère glucidique, il aura un rôle important à jouer dans le cadre de la valorisation de la biomasse ; il sera peut-être l'une des matières de base à une industrie nouvelle : celle des "plastiques biologiques".

L'amidon est constitué de 2 types de macromolécules ; l'amylose, macromolécule linéaire et l'amylopectine en quantité plus importante (environ 75%). Selon la proportion de ses 2 constituants, l'amidon a des propriétés différentes, lesquelles présentent un intérêt certain en technologie alimentaire et industrielle. C'est ainsi que les amidons riches en amylopectine appelés amidons cireux ("waxy"), grâce à leurs propriétés particulières de viscosité, de tenue de pâte, d'anti-floculant sont largement utilisés aussi bien en technologie alimentaire qu'industrielle. Les amidons riches en amylose, par contre, voient leurs emplois soit seuls, soit comme adjuvants pour l'obtention de films ou de feuilles résistantes et transparentes, de rubans adhésifs. En technologie alimentaire, ils interviennent dans la texture des produits finis et peuvent être consommés comme produits à digestibilité lente.

.../...

Les industriels étant de plus en plus intéressés par des amidons riches en amylose, dès 1952, VINEYARD et BEART ont obtenu par modification génétique d'amidon de maïs une variété à haut rendement en amidon avec un taux d'amylose variant de 50 à 70%. Expérimentalement, des amidons à 85% en amylose ont même pu être sélectionnés. Les agronomes espèrent obtenir une variété de céréales qui fournisse un amidon à 100% d'amylose mais contrairement au cas de l'amidon "waxy", de nombreux gènes récessifs qui contrôlent d'autres réactions que la synthèse de l'amylose interviennent et il semble peu probable dans ces conditions que ces espoirs deviennent réalité.

En conséquence, à l'heure actuelle, l'obtention d'amylose ne peut être réalisée que par fractionnement des grains d'amidons par des méthodes technologiques de complexation par les alcools ou de précipitation par les sels. Cependant, les méthodes existantes conduisent à des préparations de fractions d'amylose dont les caractéristiques de linéarité et de pureté ne sont pas toujours bien définies. C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris, à partir de l'amidon de pomme de terre, une des principales sources d'amidon en France, l'étude de son fractionnement chimique. La caractérisation des produits obtenus par des méthodes physico-chimiques et enzymatiques, rendant compte de la structure macromoléculaire et chimique, comparés aux préparations industrielles, devrait contribuer à la connaissance plus approfondie de la fraction amylose.

TRAVAUX ANTERIEURS

Depuis près d'un siècle, l'amidon, probablement plus que tout autre biopolymère, a fait l'objet de multiples recherches. Et, si à cause de la complexité de cette entité macromoléculaire qu'est le grain d'amidon, les premiers travaux ont souvent abouti à des résultats contradictoires, les progrès de ces 20 dernières années grâce à l'utilisation de méthodes modernes d'analyse physique et biochimique, ont conduit à une meilleure compréhension de son comportement physico-chimique. Néanmoins, un certain nombre de lacunes et contradictions persistent encore et bien des problèmes restent à élucider.

Dans l'exposé qui suit, nous rappelons brièvement l'état de nos connaissances quant à la constitution chimique et macromoléculaire de l'amidon. Nous présentons également les récents travaux relatifs au fractionnement de ses constituants et à leur caractérisation.

1 - CONSTITUTION CHIMIQUE ET MACROMOLECULAIRE DE L'AMIDON

De nombreux ouvrages concernant ce sujet ont été publiés pendant les 30 dernières années. Citons les principales mises au point publiées après 1970 : BADENHUIZEN (1971), ULMANN (1971), BANKS et GREENWOOD (1975), FRENCH (1975), RADLEY (1976), GREENWOOD (1976), DUPRAT *et al.* (1980).

Les grains d'amidon extraits se présentent sous l'aspect d'une poudre blanche insoluble dans l'eau froide. La forme et la taille des grains dépendent de l'origine du végétal (Tableau 1).

1.1 - CONSTITUTION CHIMIQUE

L'hydrolyse acide complète de l'amidon libre 98 à 99 % de D-glucose. L'amidon est donc un polymère de D-glucose.

La fraction non glucidique du grain d'amidon représente 0,5 à 2 % de leur composition chimique totale (Tableau 2) (DUPRAT *et al.*, 1980). Les impuretés résistant à la purification sont constituées de protéines, de nucléotides, de matières minérales (l'amidon de pomme de terre par exemple contient 0,04 à 0,1 % de phosphore sous forme d'ester phosphorique lié principalement ou exclusivement à l'amylopectine (BROWN *et al.*, 1974)), et de lipides (principalement dans le cas des amidons de céréales qui en contiennent de 0,5 à 1 % au moins (MORRISON, 1978); ces lipides, surtout la lysolécithine et les acides gras libres sont complexés par l'amylose, ce qui modifie les propriétés colloïdales de l'amidon).

Malgré leur faible quantité, ces matières non glucidiques ne sont pas à sous-estimer au niveau des comportements physico-chimique et technologique de l'amidon (Tableau 2).

TABLEAU 1

TENEUR, FORME ET DIMENSIONS DES AMIDONS DE FRUITS, GRAINES ET TUBERCULES

(Duprat *et al.* 1980)

ORIGINE BOTANIQUE	AMIDON % M.S.	FORME	ϕ en μ
<u>Céréales</u>			
. Avoine vêtue	41,5 - 43,3		5 - 15
nue	63,8 - 67,0		
. Blé	67,2 - 68,4	Lenticulaire, polyédrique	2 - 38 (30)
. Maïs normal	71,0 - 74,0	Polyédrique	5 - 25
. Mil	68,0 - 69,6		
. Orge vêtue	54,8 - 59,3	Lenticulaire	2 - 5
nue	64,9 - 68,2		20 - 30
. Riz	74,6 - 88,0	Polyédrique	3 - 8
. Seigle	50,3	Lenticulaire	12 - 40
<u>Tubercules</u>			
. Igname	68,5 - 82,8	Polyédrique, sphérique, ovoïde	1 - 70
. Manioc	85,0 - 86,6	Hémisphérique, sphérique	5 - 35
. Patate douce	69,2 - 72,0	Polyédrique	10 - 25
. Pomme de terre	65,0 - 85,0	Ellipsoïdale	15 - 100
<u>Légumineuses</u>			
. Arachide	0,9 - 6,7		
. Fève - Féverole	30,0 - 43,0	Sphérique ovoïde	5 17 - 31
. Haricot	30,0 - 35,0	Réniforme	
. Lentille	55,0 - 68,0		
. Pois lisse	43,0 - 48,0	Réniforme (simple)	5 - 10
. Pois ridé	32,0 - 37,0	Rosette (composé)	30 - 40
<u>Fruits</u>			
. Banane plantain	72,3 - 74,2		
. Banane	0,8 - 7,5		
. Châtaigne	55,0 - 60,0		



TABLEAU 2

COMPOSITION NON GLUCIDIQUE ET TENEUR EN AMYLOSE DE DIFFERENTS AMIDONS
(résultats exprimés p. 100 d'amidon sec)

(Duprat *et al.* 1980)

AMIDON	PROTEINES (N _x 6,25)	LIPIDES	CENORES	P	AMYLOSE
<u>Céréales</u>					
. Avoine	0,24	1,3	-	-	27
. Blé	0,33	1,12	0,3	0,05	26
. Maïs cireux	0,10	0,23	0,1	0,003	< 1
. Maïs normal	0,30	0,61-0,65	0,1	0,015	28
. Maïs riche en amylose .	0,50	1,11	0,2	0,03	52-80
. Orge	0,11	1,0	-	0,03	22
. Riz	-	1,04	-	-	14-32
. Seigle	-	0,54-0,62	-	-	-
<u>Tubercules</u>					
. Manioc	0,1	0,1	0,3	-	17
. Pomme de terre	0,05	0,09	0,3	0,04	23
<u>Légumineuses</u>					
. Féverole	0,16	0,06	0,07	0,02	24
. Pois lisse	0,19	0,18	0,05-0,22	0,04	35
. Pois ridé	0,23	-	0,11	0,03	66
<u>Fruits</u>					
. Banane	0,32	-	-	0,02	16
. Mangue	0,25	-	-	0,02	24
. Pomme	0,10	-	-	0,03	19



La nature des liaisons unissant entre elles les unités glucose a été déterminée par des techniques de méthylation, d'oxydation périodique, d'hydrolyses acide et enzymatique. Ces analyses ont montré que les unités glucose sont liées entre elles principalement par des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ et par 4 à 5 % de liaisons $(1\rightarrow6)$ (fig. 1). Des liaisons $\alpha(1\rightarrow2)$ et $\alpha(1\rightarrow3)$ seraient également présentes (MANNERS et MERCER, 1963) à raison de 0,5 % (THOMA, 1965; WOLFROM et THOMSON, 1957).

1.2 - STRUCTURE MACROMOLECULAIRE DE L'AMIDON

Le problème a longtemps été de savoir si l'amidon, macromolécule dont le monomère est le D-glucose mais dont le type de liaisons subit de telles variations, est constitué d'une seule ou de plusieurs populations macromoléculaires distinctes. Bien que la question soit encore controversée, il est à l'heure actuelle reconnu que le grain d'amidon est constitué d'au moins 3 types de composants glucidiques - l'amylose, l'amylopectine et un matériel intermédiaire mal connu - dans des proportions qui varient d'un amidon à l'autre.

Pour la plupart des amidons, la teneur en amylose varie entre 15 et 25 % (Tableau 2). Cependant, à l'intérieur d'une même espèce botanique, certaines variétés (maïs riche en amylose ou amylomaïs, pois ridé) peuvent en contenir jusqu'à 80 %, alors que d'autres en contiennent moins de 1 % (amidons cireux de maïs, d'orge, de sorgho, amidon de riz glutineux), la fraction principale étant l'amylopectine.

1.2.1 - L'amylose

L'amylose est généralement décrite comme une macromolécule linéaire constituée de résidus D-anhydroglucopyranose associés entre eux par la liaison $\alpha(1\rightarrow4)$ (fig. 1). Une extrémité de la chaîne porte le groupement pseudo-aldéhydique réducteur, l'autre un résidu sans groupement réducteur. Quelques ramifications du type $\alpha(1\rightarrow6)$ ont été mises en évidence au taux de une liaison pour plusieurs milliers de résidus glucose. L'amylose native est une très grande macromolécule avec un degré de polymérisation moyen (\overline{DP}) pouvant varier de 200 à 6000 suivant l'origine botanique de l'amidon et dans une moindre mesure en fonction de la méthode utilisée pour sa solubilisation.

1.2.2 - L'amylopectine

L'amylopectine, macromolécule ramifiée, est formée par l'association de résidus D-anhydroglucopyranose reliés entre eux par des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ en des chaînes linéaires - ou ramifications - greffés les uns sur les autres par des liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$. Le nombre de ces liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ représente 5 à 6 % de l'ensemble des liaisons de l'amylopectine.

Les ramifications constituant la macromolécule d'amylopectine se répartissent en chaînes externes ou chaînes A - liées au reste de la macromolécule au niveau du

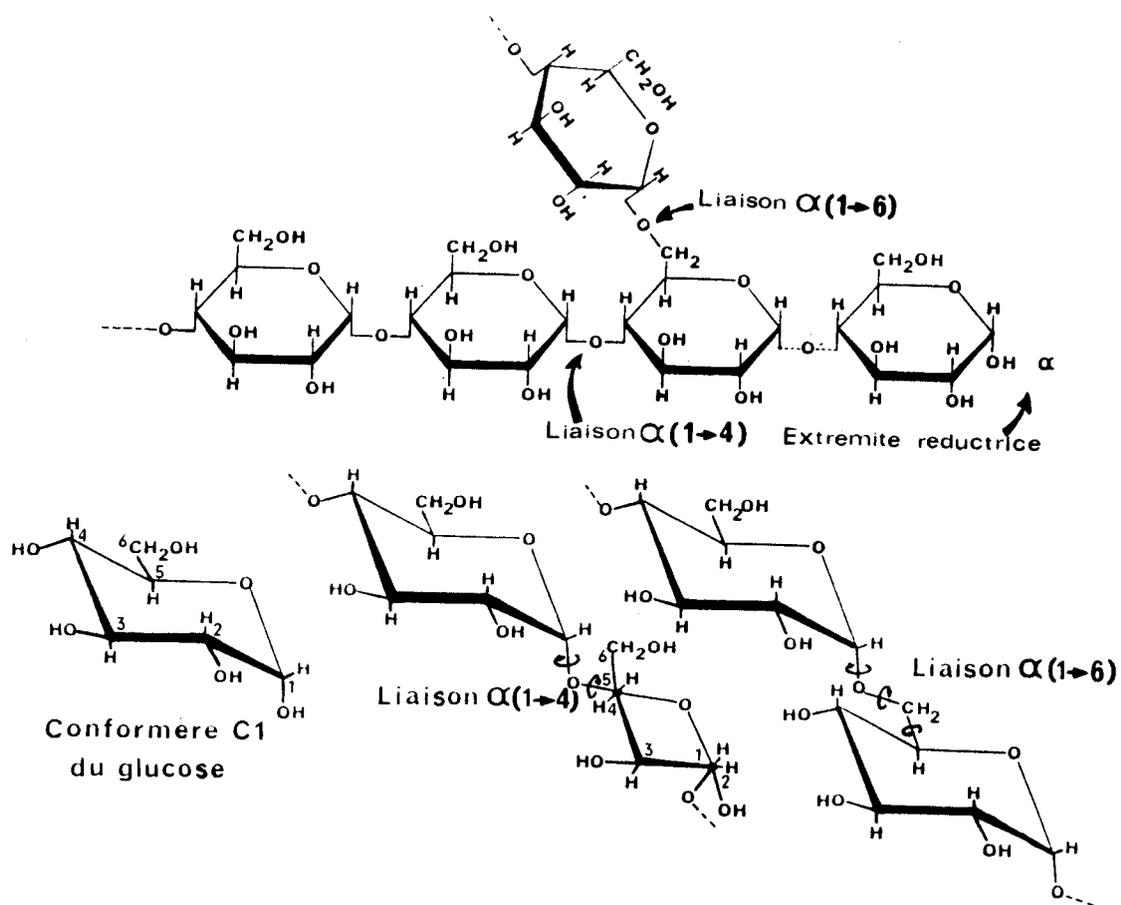


Fig. 1 - Structure chimique primaire constituée d'unités glucopyranose reliées en $\alpha(1\rightarrow4)$ ou $\alpha(1\rightarrow6)$. Les signes ✓ indiquent les rotations possibles au niveau des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ et $\alpha(1\rightarrow6)$.



carbone 1 de son unité réductrice - et en chaînes internes ou chaînes B - liées comme les précédentes mais supportant d'autres chaînes au niveau du carbone 6 de certaines de leurs unités (fig. 1). La macromolécule d'amylopectine ne possède qu'un seul groupement réducteur situé sur la chaîne C; par contre, elle comporte autant d'extrémités sans groupement réducteur que de chaînes constitutives.

Le degré de polymérisation de la macromolécule d'amylopectine est très variable; il peut aller de 100 000 à 10^9 résidus anhydroglucopyranose : cette hétéromolécularité de masse est fonction de l'origine botanique de l'amidon et des méthodes de solubilisation et de mesure de la masse moléculaire. Les valeurs obtenues sont encore très discutées en raison des risques de dégradation au cours de l'isolement de l'amylopectine et en raison des possibilités d'agrégation des molécules. Quoi qu'il en soit, la macromolécule d'amylopectine est généralement considérée comme la plus volumineuse des molécules biologiques.

Une méthode enzymatique séquentielle (fig. 2) (LEE, MERCIER et WHELAN, 1968) par utilisation successive des enzymes déramifiantes (pullulanase, isoamylase), de la β -amylase et de l'amyloglucosidase (cf. § 4) et par fractionnement chromatographique sur gels de perméation, des chaînes constitutives, a permis de préciser la structure en grappes de l'amylopectine d'amidons de tubercules (pomme de terre (ROBIN *et al.*, 1974), manioc (HOOD et MERCIER, 1978)) et d'amidons de céréales (maïs cireux, normal, amylomaïs et blé (MERCIER, 1973; ROBIN *et al.*, 1975; ROBIN, 1976).

La déramification directe de l'amylopectine de maïs cireux conduit à 2 populations de chaînes linéaires de \overline{DP} 45 et 15 (fig. 3), le faible pic exclu du gel (2 %) correspond vraisemblablement aux longues chaînes de la macromolécule.

La déramification de la β -dextrine limite (cf. § 4.3) de l'amylopectine conduit à un profil d'éluion constitué de 3 populations de chaînes linéaires (fig. 4) dont les \overline{DP} (35; 10-12; 3) sont réduits par rapport au \overline{DP} des 2 populations de chaînes de l'amylopectine déramifiée. Le matériel de \overline{DP} 35 correspond à la réduction par la β -amylase de celui de \overline{DP} 45; celui de \overline{DP} 10-12 représente la longueur des chaînes internes comprises entre 2 liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et les chaînes de \overline{DP} 2-3 sont les résidus maltosyl et maltotriosyl des chaînes externes de l'amylopectine.

Soumis à l'hydrolyse acide ménagée (HCl 2,2N, 35°C pendant 40 jours), le grain d'amidon de maïs cireux présente une fraction résistante à l'acide (fig. 5). Ce matériel, différent selon l'origine botanique de l'amidon (fig. 6), est identifié comme constitué de 2 populations de chaînes (fig. 7), la fraction II, matériel uniramifié de \overline{DP} 25 et la fraction III, matériel linéaire de \overline{DP} 15.

La confrontation des différents résultats obtenus après déramification de l'amylopectine, de sa β -dextrine limite (tableau 3) et de ses résidus après hydrolyse acide ménagée a permis à ROBIN *et al.*, (1974, 1975) de proposer un modèle statistique de la structure primaire de la macromolécule d'amylopectine, schéma qui précise la structure "en grappes" (FRENCH, 1975).

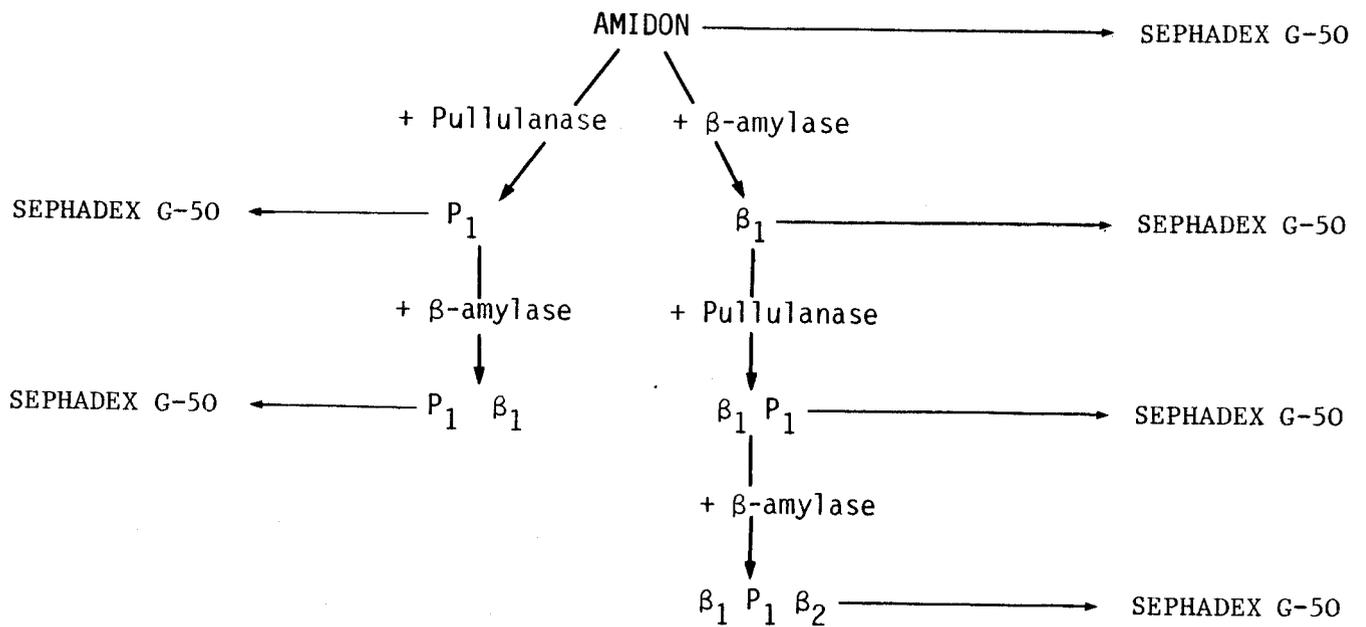


Fig. 2 - Représentation schématique du principe de la méthode séquentielle d'analyse enzymatique et chromatographique de l'amidon.

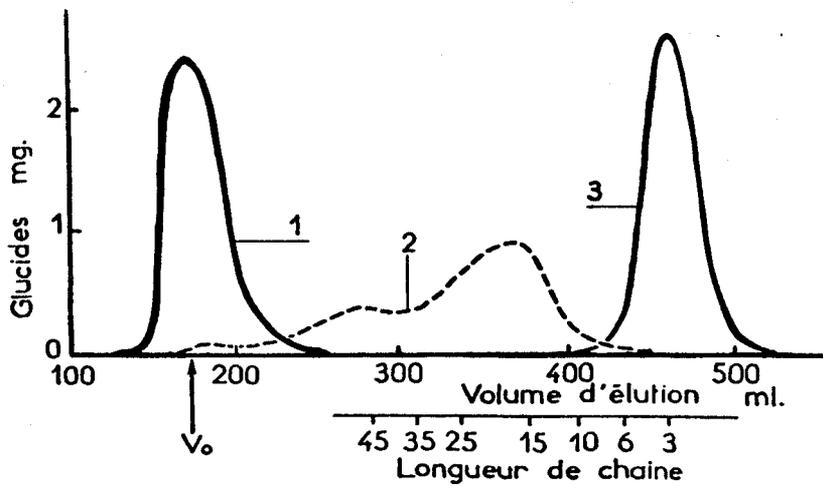


Fig. 3 - Diagrammes d'élution, sur Séphadex G-50, d'amidon de maïs cireux : 1) empesé; 2) après action de la pullulanase; 3) après actions successives de la pullulanase et de la β -amylase.

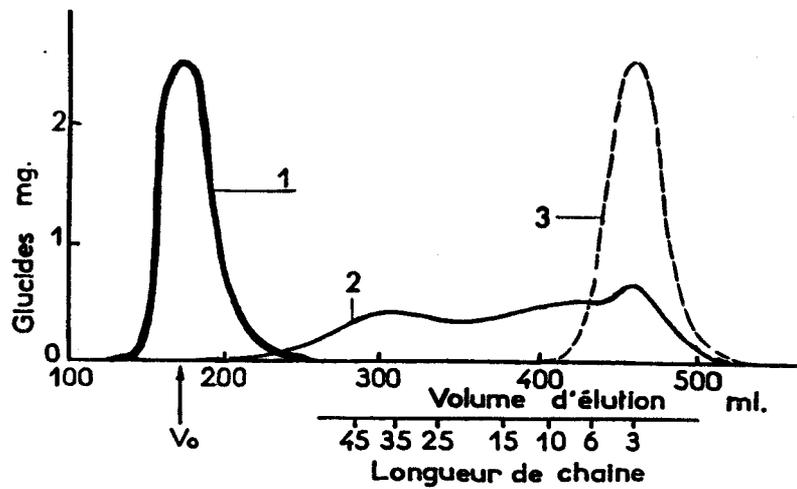


Fig. 4 - Diagrammes d'élution sur Séphadex G-50, de β -dextrines limites d'amidon de maïs cireux : 1) telles quelles; 2) après action de la pullulanase; 3) après actions successives de la pullulanase et de la β -amylase.

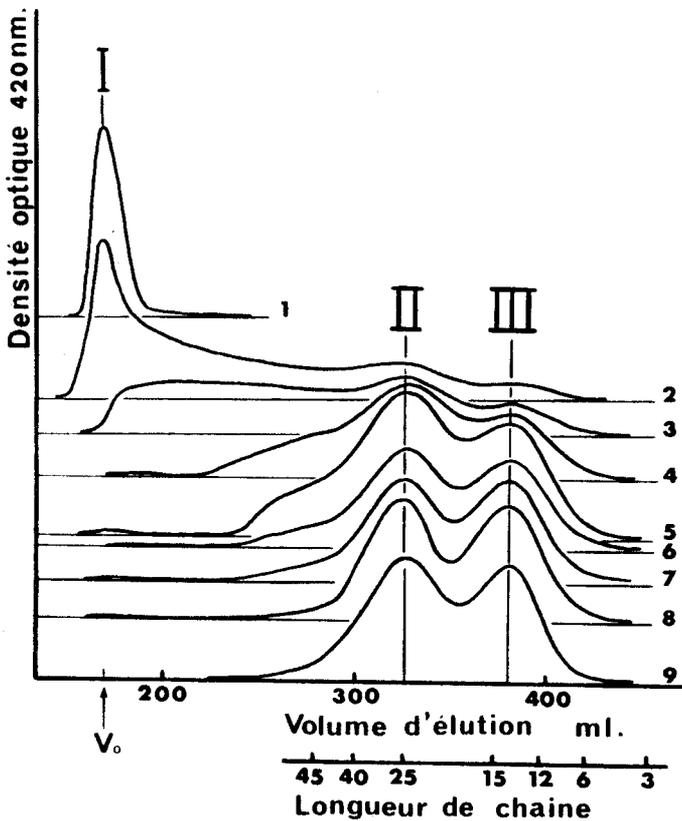


Fig. 5 - Diagrammes d'élution sur Séphadex G-50, des solutions aqueuses d'amidon de maïs cireux natif et de ses résidus (HCl 2,2N 35°C) à différents temps et taux d'hydrolyse; 1) natif; 2) 2j - 23 %; 3) 4j - 40 %; 4) 8j - 64 %; 5) 12j - 70 %; 6) 16j - 77 %; 7) 20j - 83 %; 8) 28j - 89 %; 9) 40j - 95 %.

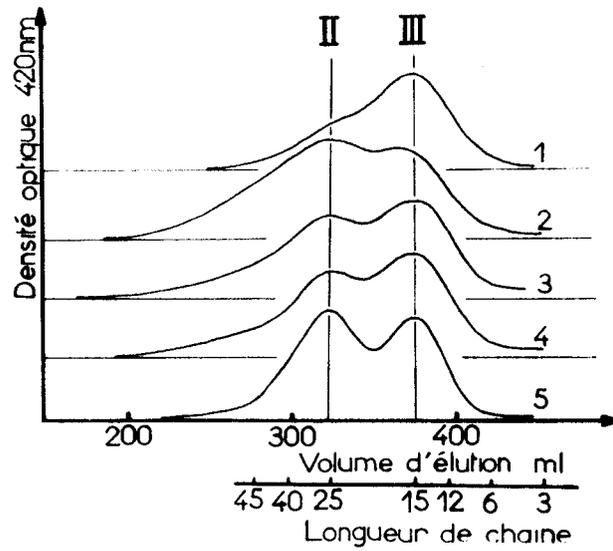


Fig. 6 - Diagrammes d'élution sur Séphadex G-50, des résidus acido-résistants (HCl 2,2N, 35°C, 40 jours) de différents amidons : 1) pomme de terre ; 2) blé ; 3) manioc ; 4) maïs ; 5) maïs cireux.

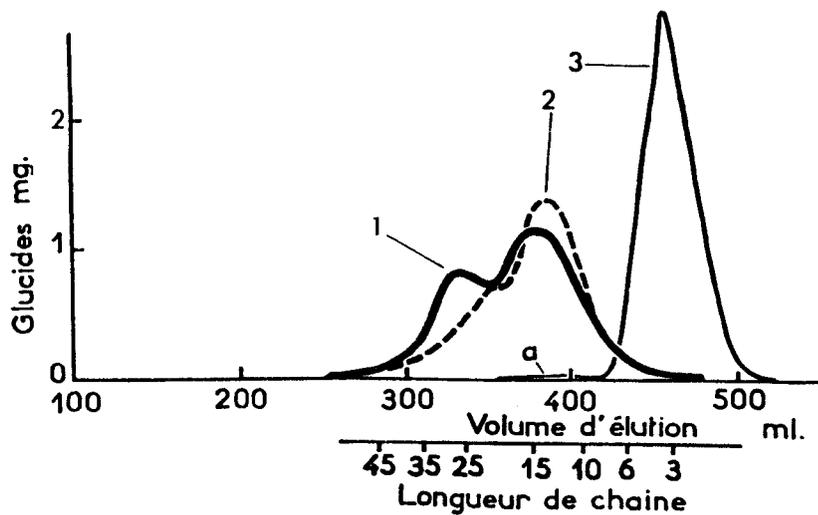


Fig. 7 - Diagrammes d'élution sur Séphadex G-50, du résidu acido-résistant (HCl 2,2 N, 35°C) de l'amidon de maïs cireux : 1) résidu solubilisé; 2) après action de la pullulanase; 3) après actions successives de la pullulanase et de la β -amylase.



TABLEAU 3

PROPRIETES DE L'AMYLOPECTINE DE DIFFERENTS AMIDONS
(Banks et Greenwood 1975)

Amidon	β -amylolyse %	DP ⁽¹⁾	$[\eta]$ ⁽²⁾ ml/g
Céréales			
Blé	57	19	140
Maïs cireux	58	20	145
Maïs normal	-	25 - 26	125 - 135
Amylomaïs	58	23	130
Orge	58	26	190
Avoine	57	20	-
Tubercules			
Pommes de terre	56	24	160
Légumineuses			
Fèverole	57	23	125
Pois lisse	58	26	150
Pois ridé	58	27	150
Fruits			
Banane	59	21	120
Mangue	56	21	150
Pomme	58	22	170

(1) Degré de polymérisation moyen obtenu après déramification.

(2) Mesurée en KOH 1M.



La macromolécule d'amylopectine (fig. 8) est constituée par deux types de chaînes : les chaînes A, internes ou externes, de \overline{DP} 15-20 et les chaînes B internes de \overline{DP} 45. Ces chaînes ne sont pas greffées au hasard les unes sur les autres. Les chaînes B forment l'ossature de la macromolécule d'amylopectine et supportent des "grappes" (2 en moyenne) constituées par des chaînes A. La mise en évidence de chaînes uniramifiées dans le résidu, dès le début de l'hydrolyse, conduit à penser que les chaînes A pourraient être associées deux à deux coaxialement - ou une chaîne A avec une chaîne B - pour constituer des doubles hélices (structure secondaire) entités conformationnelles de base dans la structure de l'amylopectine.

Les différences de structure fine existant entre les amylopectines d'amidon de diverses origines botaniques tiennent essentiellement au taux de ramification de la macromolécule. Ainsi, d'une façon générale, (ROBIN, 1976), l'amylopectine des amidons de spectre cristallin de type "B" est moins fortement ramifiée (rapport A/B en nombre de 5-6) que celle des amidons de spectre cristallin de type "A" (rapport A/B en nombre de 9-10).

1.2.3 - Le matériel intermédiaire

Divers auteurs (LANSKY, KOOI et SCHOCH, 1949; PEAT, PIRT et WHELAN, 1952a; COWIE et GREENWOOD, 1957; PERLIN, 1958; ERLANDER et FRENCH, 1958a; BANKS et GREENWOOD, 1975) indiquent l'existence dans le grain d'amidon d'un matériel présentant des propriétés différentes de celles de l'amylose et de l'amylopectine : capacité de liaison à l'iode (cf. § 3.2.1) plus élevée que celle de l'amylopectine et limite de β -amylolyse plus faible que celle de l'amylose. La structure et la quantité de ce matériel intermédiaire varient considérablement selon l'origine botanique et le degré de maturité de l'amidon. Mais pour l'amidon "à maturité", il semble que ce matériel intermédiaire soit en relation avec la teneur en amylose.

Dans le cas des amidons normaux (contenant 20 à 30 % d'amylose) de céréales et de pomme de terre, 5 à 7 % d'une fraction appelée "amylose ou amylopectine anormale" ont été isolés par recristallisation de l'amylose et l'amylopectine en présence de thymol (BANKS et GREENWOOD, 1975). Le matériel intermédiaire obtenu à partir de l'amidon de blé (fig. 9) présente une capacité de liaison à l'iode différente des fractions amylose et amylopectine, un degré de polymérisation de 30 à 40 et un taux de β -amylolyse qui n'atteint pas 100 %.

Ces observations conduisent les auteurs précités à suggérer que le matériel appelé "amylose anormale" est formé d'une gamme de structures dont le taux de ramification est intermédiaire entre celui de l'amylose et de l'amylopectine.

Les amidons riches en amylose (amylomaïs, pois ridé), selon le dosage à l'iode possèdent une teneur élevée en matériel intermédiaire, de degré de polymérisation compris entre 50 et 200. Cette fraction est elle-même hétérogène puisque la pré-

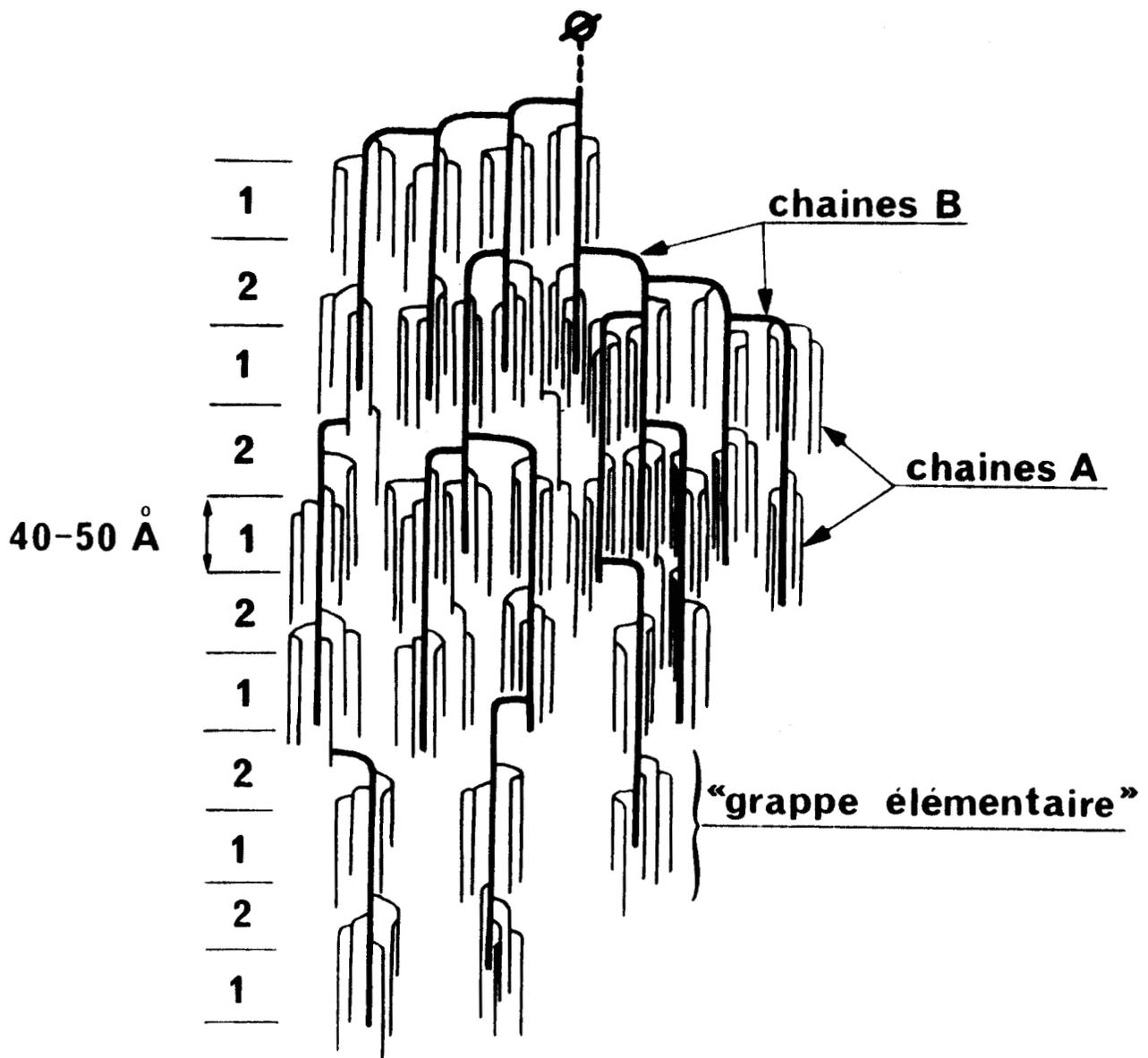


Fig. 8 - Schéma de la structure primaire de l'amylopectine de l'amidon de maïs cireux : 1) couche plus dense, plus "cristalline" ; 2) couche moins dense, moins organisée, riche en ramifications $\alpha(1\rightarrow6)$; \emptyset : groupement réducteur de la chaîne ; chaîne A = \overline{DP} 15 - 20, chaînes B = \overline{DP} 45 ; rapport A/B (en nombre) \approx 9 - 10 .

BINS
LILLE

(ROBIN *et al.*, 1975)

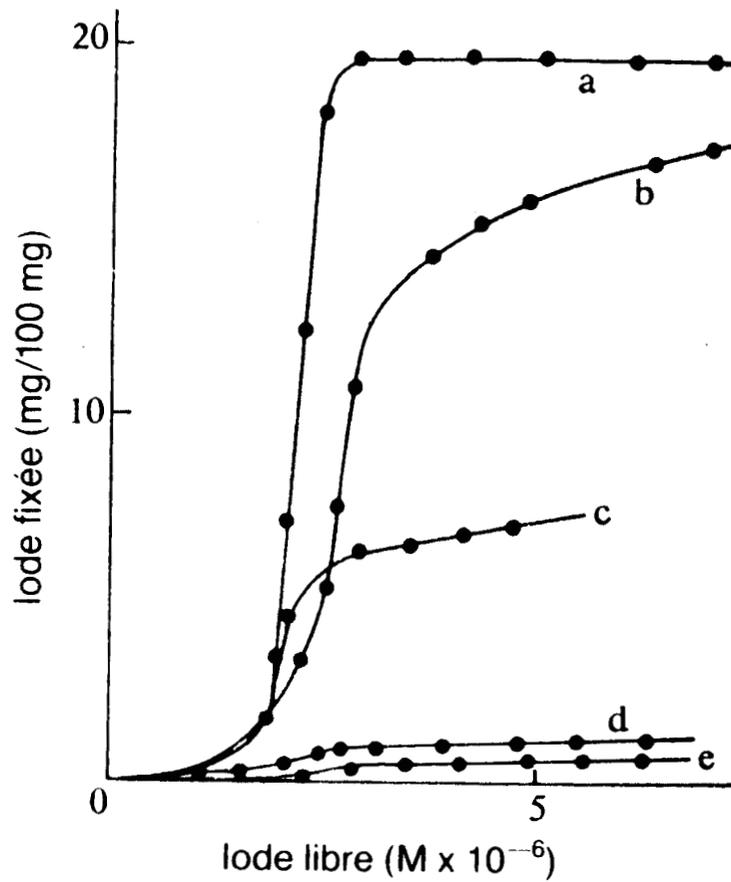


Fig. 9 - Courbes de titrages potentiométriques par l'iode des fractions obtenues à partir de l'amidon de blé.

- | | |
|---------------------------|----------------------|
| (a) amylose | (b) amylose anormale |
| (c) thymol-amylopectine | (d) amylopectine |
| (e) amylopectine anormale | |

(BANKS et GREENWOOD, 1967a)



sence de chaînes linéaires et d'un matériel faiblement ramifié à faible poids moléculaire ($< 10^6$), de structure intermédiaire entre celle de l'amylose et de l'amylopectine, a été mise en évidence.

2 - FRACTIONNEMENT DE L'AMIDON

Le fractionnement de l'amidon a fait l'objet de nombreuses revues bibliographiques : SCHOCH (1945), GREENWOOD (1956), MUETGEERT (1961), WHISTLER (1965), BANKS et GREENWOOD (1975).

Toutes les techniques de fractionnement sont fondées sur les différences de solubilité de ses constituants dans divers milieux.

Les deux méthodes couramment mises en oeuvre sont les suivantes :

2.1 - LA LIXIVIATION ("SELECTIVE LEACHING")

Cette méthode de fractionnement est basée sur le fait que l'amylose ou au moins une partie peut être extraite du grain d'amidon par action de l'eau chaude (60 - 80°C). La technique mise au point par MEYER *et al.* (1940, 1949) consiste à maintenir une suspension aqueuse d'amidon à une température légèrement supérieure à la température de gélatinisation. Le résidu granulaire est éliminé par centrifugation et l'amylose est précipitée de la solution par addition d'un alcool, généralement le butanol-1 (MEYER *et al.*, 1940, 1949). Du fait de la température assez faible à laquelle s'effectue le traitement, les risques de dégradation des chaînes macromoléculaires sont limités. Cependant, SCHOCH (1945) a reproché à cette méthode le fait que l'amylose obtenue est contaminée par de l'amylopectine et que l'amylose non extraite rétrograde *in situ*. Les deux critiques, bien que fondées, ne sont pas suffisantes pour éliminer la méthode. En effet, une fraction amylose très pure peut être obtenue par recristallisation du complexe amylose-butanol-1 initial. Quant à la rétrogradation de l'amylose *in situ*, c'est un phénomène très lent qui n'a pas lieu lorsque les manipulations sont effectuées successivement.

Le tableau 4 montre que des "leaching" aqueux successifs d'un amidon d'orge à des températures croissantes donnent des fractions amylose de propriétés différentes. Cet effet est général à tous les amidons.

Tous les auteurs s'accordent à dire que le leaching aqueux est un bon moyen pour obtenir une fraction amylose très pure (COWIE et GREENWOOD, 1957a ; ARBUCKLE et GREENWOOD, 1958a ; BANKS *et al.*, 1971a).

2.2 - FRACTIONNEMENT PAR DISPERSION DU GRAIN

Cette méthode, basée sur la précipitation sélective de l'amylose par un agent complexant (solvant organique ou polaire), a l'avantage de conduire à des fractions pures d'amylose et d'amylopectine.

TABLEAU 4

PROPRIETES DES FRACTIONS D'AMYLOSE OBTENUES PAR EXTRACTIONS SUCCESSIVES DE L'AMIDON D'ORGE
(Banks, Greenwood et Thomson 1959a)

Procédés	Amylose extraite (%)	Capacité de liaison à l'iode (%)	$[\eta]$ ⁽¹⁾ ml/g
Extrait à 70°C	22	19,6	95
Résidu extrait à 80°C	17	19,5	140
Première extraction du résidu à 90°C	25	19,5	250
Deuxième extraction du résidu à 90°C	18	19,5	300
Troisième extraction du résidu à 90°C	13	19,5	370
Dispersion du résidu	5	19,4	180

(1) Mesurée en KOH 1M à 22,5°C



Afin que l'amylose puisse être totalement complexée, les macromolécules doivent être complètement dispersées. Cette méthode nécessite donc la destruction totale de la structure granulaire de l'amidon.

On note, au cours de ces 40 dernières années, une évolution lente dans la maîtrise de ces mécanismes de fractionnement et les résultats qui paraissent les plus intéressants sont ceux de BANKS et GREENWOOD (1967a).

Dans les lignes qui suivent, nous évoquons tout d'abord le problème de la dispersion du grain d'amidon. Nous traitons ensuite les questions de la complexation de l'amylose et du fractionnement des divers constituants.

2.2.1 - Dispersion du grain

Cette dispersion ne présente aucune difficulté pour les amidons de tubercules (pomme de terre, manioc). Par contre, pour les amidons normaux de céréales, une suspension aqueuse maintenue à 100°C présente encore, après plusieurs heures, une quantité importante de matériel non dispersé. C'est pourquoi SCHOCH, en 1945, préconise une dispersion aqueuse à l'autoclave; mais un tel traitement présente un risque important de dégradation des chaînes macromoléculaires. Les lipides, contaminant l'amidon, peuvent en effet dans de telles conditions provoquer une hydrolyse. Pour éviter l'autoclavage, des prétraitements sont utilisés.

Le traitement à l'ammoniaque (HODGE *et al.*, 1948) a été appliqué à un nombre important d'amidons de sources botaniques variées (GREENWOOD et THOMSON, 1960). Il permet de parvenir à une dispersion complète du grain.

Actuellement, l'utilisation du diméthylsulfoxyde (DMSO) (KILLION et FOSTER, 1960; ADKINS et GREENWOOD, 1969) qui conduit à une solution d'amidon limpide constitue la méthode la plus satisfaisante. Le DMSO non seulement rompt la structure granulaire, mais a aussi l'avantage d'éliminer les lipides qui contaminent l'amidon. Aucune autre méthode décrite dans la littérature n'est aussi efficace que le prétraitement au DMSO pour éliminer les lipides (BANKS, GREENWOOD et MUIR, 1971b). Ce type de prétraitement a été généralisé aux amidons de céréales normaux (BANKS et GREENWOOD, 1967a), il convient également très bien aux amidons à teneur en amylose élevée (ADKINS *et al.*, 1970).

Signalons également les études faites sur la solubilité de l'amidon en milieu DMSO (KURTZMAN *et al.*, 1973). Les amidons de pomme de terre et de manioc sont plus difficilement solubles dans le DMSO que les amidons de céréales. Mais la présence d'eau en faible quantité accélère la solubilisation de ces différents amidons (GEDDES *et al.*, 1964).

2.2.2 - Complexation de l'amylose. Fractionnement de l'amylose et l'amylopectine

SCHOCH (1945) a été le premier à mettre en évidence la complexation d'une fraction de l'amidon par les alcools aliphatiques, les acides gras... Cette com-

plexation a lieu lorsque la solution d'amidon est traitée par des substances organiques polaires contenant un groupement hydrophile (hydroxyle ou carboxyle) lié à un résidu hydrophobe. La fraction A adsorbe ce matériel par attraction polaire vers les groupes hydrophiles. Le complexe d'adsorption obtenu est insoluble en raison de sa charge hydrophobe et, par le fait même, se sépare de la solution.

Lorsque l'amidon est totalement dispersé, il est récupéré par précipitation au butanol. Ce précipité d'amidon non granulaire est ensuite dispersé dans l'eau bouillante. Le fractionnement consiste alors à ajouter un agent complexant à la solution aqueuse d'amidon. L'amylose complexée obtenue est encore contaminée par de l'amylopectine. L'eau pouvant éliminer l'alcool du complexe et entraîner ainsi l'association et l'insolubilisation des molécules linéaires, la fraction A peut être purifiée par reprécipitation dans un milieu aqueux saturé en alcool.

Pour l'amidon de maïs, un rendement de 21 - 23 % en fraction A est obtenu lorsque la séparation et la recristallisation sont faites avec le butanol. Si elles sont faites avec le pentasol, le rendement est 28 - 29 %. La différence représente un matériel de caractère strictement intermédiaire, suffisamment linéaire pour permettre la précipitation avec le pentasol mais avec un degré de branchement qui empêche la formation du complexe avec le butanol. C'est pourquoi SCHOCH préconise l'emploi de pentasol comme premier agent complexant pour éviter l'inclusion de matériel intermédiaire dans la fraction B. Par recristallisation avec le butanol-1, le matériel intermédiaire peut être éliminer de la fraction A. L'emploi de thymol comme premier agent complexant a été préconisé par BOURNE *et al.* (1948), le second agent complexant étant alors le cyclohexanol. En 1954, GREENWOOD et ROBERTSON montrent que l'emploi de thymol permet d'obtenir une amylopectine de grande pureté dans le surnageant tandis que des précipitations successives au butanol chaud conduisent également à une amylose très pure.

Actuellement, le procédé généralement utilisé et s'adaptant à la plupart des amidons est celui décrit par BANKS et GREENWOOD (1967) :

30 g d'amidon sont dispersés dans 500 ml de DMSO pendant 24 heures sous agitation magnétique. La solution est ensuite versée dans 1 l de butanol-1 et le précipité non granulaire obtenu est lavé plusieurs fois avec du butanol-1 pour éliminer le DMSO résiduel. Le précipité est ensuite dispersé dans 3 l d'eau bouillante sous agitation magnétique et sous azote pendant 1 heure. Après refroidissement de la dispersion à 60°C, le thymol pulvérisé (1 g/l) est ajouté. Après trois jours à température ambiante, le complexe amylose-thymol est récupéré et dispersé pendant 45 minutes dans de l'eau bouillante sous azote. La solution est refroidie et le butanol-1 est ajouté. Après une nuit, le complexe amylose-butanol est récupéré par centrifugation. Il peut alors être stocké tel quel ou déshydraté par lavage au butanol et séché. La fraction amylopectine se trouve dans le surnageant de la complexation par le thymol. L'excès de thymol est éliminé par extraction à l'éther,

l'amylopectine est obtenue par lyophilisation ou précipitation par un alcool.

Le matériel intermédiaire est obtenu à partir du surnageant de la recristallisation de l'amylose. Après recristallisation au butanol, BANKS et GREENWOOD (1967) récupèrent un surnageant contenant 4 à 9 % de l'amidon total. Cette première fraction appelée "thymol amylopectine" a des propriétés différentes de l'amylopectine. COWIE et GREENWOOD (1957b) ont obtenu, à partir de l'amidon de pomme de terre une fraction amylopectine et une fraction thymol-amylopectine dont les propriétés sont indiquées dans le tableau 5. La fraction thymol-amylopectine a des longueurs de chaînes plus courtes mais un taux de β -amylolyse semblable à celui de l'amylopectine. Il est difficile d'expliquer pourquoi cette fraction précipite avec le complexe amylose-thymol.

En 1967, BANKS et GREENWOOD obtiennent à partir d'amidons de céréales des fractions thymol-amylopectine dont les capacités de liaison à l'iode (cf. § 3.2.1) varient de 2,4 à 5 % suivant le type d'amidon (Tableau 6). Une proportion importante de l'amylose subsiste donc dans cette fraction. Contrairement au cas de l'amidon de pomme de terre, une reprécipitation de ce surnageant par le thymol achève le fractionnement dans le cas du blé et de l'avoine. Le matériel complexé appelé "amylose anormale" a les propriétés présentées dans le tableau 6. Le surnageant contient également une quantité importante de polysaccharides, "amylopectine anormale" (Tableau 6). Les caractéristiques de ces amylopectines sont assez comparables à celles du premier surnageant thymol bien que la longueur de chaînes soit légèrement supérieure ($CL \sim 25$ au lieu de 20 pour l'amylopectine normale).

Cette méthode comportant un prétraitement au DMSO, suivi d'un fractionnement au thymol et de recristallisation(s) au butanol conduit à une fraction amylopectine pure contenue dans le surnageant de la complexation par le thymol et à une fraction amylose pure après une ou deux recristallisations par le butanol. Néanmoins, ces 2 fractions ne représentent que 90 à 95 % de l'amidon total. Les 5 à 10 % complémentaires correspondent à 2 fractions "amylopectine anormale" et "amylose anormale" qui sont fractionnées plus difficilement et dont les caractéristiques sont intermédiaires entre celles de l'amylose et l'amylopectine.

2.3 - PROCEDE INDUSTRIEL

Les méthodes précédemment décrites sont intéressantes pour les fractionnements en laboratoire mais sont difficiles à mettre en oeuvre au niveau industriel. MUETGEERT (1961) préconise des méthodes de précipitation sélective à l'aide de sulfate de magnésium, d'ammonium ou de sodium. L'amylose AVEBE a été préparée industriellement selon le procédé développé par HIEMSTRA, BUS et MUETGEERT en 1956.

L'amidon est mis en suspension (5 - 10 %) dans une solution de sulfate de magnésium à 13 %. La suspension est autoclavée de façon que la température atteigne 160°C en 5 - 10 minutes. Si la concentration en sel est ajustée à 10 % par addition

TABLEAU 5

PROPRIETES DES FRACTIONS AMYLOPECTINE OBTENUES
A PARTIR D'UN AMIDON DE POMME DE TERRE
(Banks et Greenwood 1959a)

Amidon	Polysaccharides	Pourcentage amidon	Amylose contaminante (%)	\overline{CL}	$[\beta]$ %	$[\eta]$ (ml/g)
Pomme de terre	Amylopectine	~ 70	0,5	23	57	190
	Thymol-Amylopectine	5 - 10	1	13	53	170



TABLEAU 6

PROPRIETES DE L'AMYLOPECTINE ET DES FRACTIONS DE MATERIEL
INTERMEDIAIRE OBTENUES A PARTIR D'AMIDONS DE CEREALES
(Banks et Greenwood 1967a)

Amidon	Polysaccharide	%	CLI ⁽¹⁾ %	\overline{CL} ⁽²⁾	[β] %	[$\beta+\tau$] %	[η] ⁽³⁾ (ml/g)
Orge	Amylopectine	~ 65	0,6	20	57	56	160
	Thymol-amylopectine	4	2,6	-	-	-	-
	Amylopectine anormale	4	2,6	27	62	63	165
	Amylose anormale	0	-	-	-	-	-
Avoine	Amylopectine	~ 65	0,5	18	54	55	145
	Thymol-amylopectine	9	4,3	-	-	-	-
	Amylopectine anormale	4,5	0,8	25	60	60	145
	Amylose anormale	4,5	8,5	-	61	93	170
Seigle	Amylopectine	~ 65	0,4	20	58	57	150
	Thymol-amylopectine	4	2,6	-	-	-	-
	Amylopectine anormale	4	2,4	27	57	60	170
	Amylose anormale	0	-	-	-	-	-
Blé I	Amylopectine	~ 65	0,5	21	56	56	150
	Thymol-amylopectine	9	5,7	-	-	-	-
	Amylopectine anormale	5	1,2	27	62	64	135
	Amylose anormale	4	11,8	-	56	94	180
Blé II	Amylopectine	~ 65	0,6	20	54	55	150
	Thymol-amylopectine	6	5	-	-	-	-
	Amylopectine anormale	4	0,2	25	55	55	155
	Amylose anormale	2	12,5	-	66	97	185

(1) CLI : capacité de liaison à l'iode (cf. § 3.2.1)

(2) Déterminé par oxidation periodique

(3) Mesurée en KOH 0,15 M



d'eau, l'amylose précipite à 20°C et est récupérée par centrifugation. L'amylopectine est précipitée par addition de sulfate de magnésium dans le surnageant jusqu'à obtention d'une concentration en sel de 13 %.

Les caractéristiques de l'amylose AVEBE ainsi préparée ont été étudiées et sont rapportées dans le chapitre résultats.

3 - CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'AMYLOSE ET L'AMYOPECTINE

L'amylose étant linéaire et l'amylopectine étant ramifiée, ces deux polymères, bien que chimiquement semblables, présentent des propriétés différentes.

Dans ce paragraphe, nous étudions leurs solubilités dans différents solvants, leurs capacités à former des complexes et leurs propriétés viscosimétriques. Nous comparons également leur comportement sur gel de Sépharose.

3.1 - SOLUBILITE DANS DIFFERENTS SOLVANTS

3.1.1 - Solubilité en milieu aqueux et alcalin

L'amylopectine est soluble et conduit à des solutions stables dans l'eau. L'amylose, par contre, est insoluble dans l'eau à pH 7 et à température ordinaire. D'une façon générale, un polyholoside constitué de monomères identiques non substitués, rattachés entre eux par des liaisons 1→4, est insoluble dans l'eau car les macromolécules, du fait de cette régularité structurale, peuvent facilement s'associer entre elles par de nombreuses liaisons hydrogène.

L'amylose et l'amylopectine sont toutes les deux solubles en milieu alcalin (on utilise généralement NaOH ou KOH 0,1 à 1N). Il faut néanmoins prendre garde au phénomène d'oxydation (BOTTLE *et al.*, 1953; MACHELL et RICHARDS, 1958). La diminution lente et progressive de la viscosité intrinsèque de solutions alcalines d'amylose est la preuve d'une dépolymérisation.

Lors de la neutralisation d'une solution saline, l'amylose précipite lentement; ce phénomène connu sous le nom de rétrogradation est un phénomène intermoléculaire. Le taux de rétrogradation dépend fortement de la concentration. A concentration égale, les préparations d'amylose de très haut poids moléculaire rétrogradent plus lentement que les préparations de poids moléculaire moyen. Les fractions linéaires de \overline{DP} 50 - 100 sont les plus sensibles à la rétrogradation. Ceci est dû au fait que, dans les préparations de haut poids moléculaire, les interactions polymère-polymère sont certainement plus intramoléculaires qu'intermoléculaires.

3.1.2 - Solubilité dans les solvants organiques

De nombreux solvants organiques ont été utilisés pour étudier les propriétés physiques des constituants de l'amidon : le chloral et l'hydrazine hydraté et

surtout l'éthylène-diamine et le formamide (WHISTLER, 1965).

Le solvant le plus récemment employé est le DMSO. C'est un composé dipolaire non protonique qui a tendance (contrairement à l'eau et aux alcools) à accepter plutôt qu'à donner des électrons. Il est très utilisé car il est relativement inerte, il dissout l'amylose et l'amylopectine en donnant des associations solvant-soluté par interactions hydrophobes et conduit à des solutions stables (FOSTER, 1965).

3.2 - FORMATION DES COMPLEXES

3.2.1 - Complexation par l'iode

L'iode est un agent complexant de l'amylose (HOLLO et SZEJTLI, 1963). La couleur du complexe est caractéristique de la longueur de la chaîne impliquée : bleu si le \overline{DP} est supérieure à 40, rouge, brun ou jaune en deçà. Du point de vue analytique, la formation de ce complexe permet à la fois le dosage de l'amylose (dosage ampérométrique ou potentiométrique) et la mesure du \overline{DP} des dextrines (longueur d'onde du maximum d'absorption).

En solution aqueuse iodo-iodurée (I_2 , IK) diluée, l'amylose native absorbe environ 20 % de son poids d'iode alors que l'amylopectine n'en absorbe pratiquement pas (moins de 0,5 %). La proportion d'iode fixée dans le complexe dépend de la longueur moyenne des chaînes : vers 20°C, elle n'est que de 11 % pour des \overline{DP} 50 et 16 % pour des \overline{DP} 100. De plus, la formation de complexe est favorisée aux températures peu élevées (2°C) par rapport aux températures voisines de 20°C surtout dans le cas des chaînes courtes, ce qui peut aider à distinguer l'amylose des dextrines (BANKS et GREENWOOD, 1975).

La réaction correspond à une inclusion d'iode sous la forme $(I_2)_n$, I dans le canal de l'hélice. L'iodure est indispensable à la stabilisation des séquences d' I_2 et aux faibles concentrations, la forme monomérique de l'hôte est I_3^{2-} .

Expérimentalement, la complexation de l'amylose par l'iode est étudiée par les méthodes suivantes :

— la méthode spectrophotométrique (BAILEY et WHELAN, 1961) consiste à déterminer le maximum du spectre d'absorption (λ_{max}) d'une préparation d'amylose additionnée d'iode.

Le maximum d'absorption se situe à 624 nm pour l'amylose pure et à 530 nm pour l'amylopectine (BANKS et GREENWOOD, 1975). Il est à 580 nm pour un amidon à 20 - 25 % d'amylose. La position du maximum d'absorption permet donc de déterminer la pureté de ces fractions;

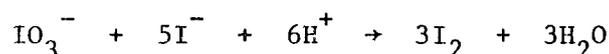
— les méthodes électrochimiques (SCHOCH, 1964; LARSON *et al.*, 1953) : elles permettent de déterminer de façon précise la quantité d'iode complexé par une quantité connue d'amylose.

. la capacité de liaison à l'iode est définie arbitrairement par le poids (mg) d'iode lié pour 100 mg de polyholoside lorsque la concentration d'iode libre est nulle. Sachant que l'amylose peut complexer environ 20 % de son poids d'iode, il est possible de déterminer la pureté d'un échantillon d'amylose donné.

. le principe de la méthode est le suivant : l'amylose complexe une partie de l'iode présent en solution. Lorsque la saturation est atteinte, l'état ionique de la solution est modifié radicalement par la présence des ions triodures libres. Il suffit donc de doser par électrochimie la quantité d'iode libre en solution en fonction de la quantité totale d'iode.

Deux catégories de méthodes sont basées sur ce principe : les méthodes potentiométriques et les méthodes ampérométriques. Une comparaison de ces 2 types de méthodes est présentée dans le tableau 7.

En dehors du principe même de détection, les 2 procédés diffèrent par leur mode opératoire : en potentiométrie, l'iode est ajouté directement à l'aide d'une solution d'iode-iodure titrée. En raison de l'instabilité chimique de l'iode en solution il est nécessaire de vérifier très fréquemment le titre de ces solutions. En ampérométrie, par contre, l'iode est libéré par la réaction d'oxydo-réduction suivante :



L'iodate est un réactif extrêmement stable qui ne présente donc pas les inconvénients que nous venons de signaler.

Cet avantage, conjugué à la rapidité et la simplicité du dosage, conduit à choisir la méthode ampérométrique lorsqu'on désire réaliser des dosages fréquents. Par contre, la méthode potentiométrique est plus précise.

BANKS, GREENWOOD et KHAN (1971a) ont synthétisé des amyloses de degré de polymérisation différents et ont mesuré la longueur d'onde de leurs maxima d'absorption (λ_{max}) à 20°C et leurs capacités de liaison à l'iode (CLI) à 20,4°C. Les résultats sont présentés dans le tableau 8 et la courbe $\lambda_{\text{max}} = f(\overline{\text{DP}})$ est représentée sur la figure 10. La forme de la courbe obtenue est celle généralement admise.

Notons la faible variation de λ_{max} lorsque le $\overline{\text{DP}}$ augmente après 100 unités glucose. Les courbes de dosages potentiométriques qui ont servi à déterminer les CLI des différentes amyloses ont été portées sur la figure 11. Remarquons que la CLI dépend du $\overline{\text{DP}}$ mais qu'elle atteint déjà 89 % de la valeur maximale de l'asymptote quand le $\overline{\text{DP}}$ n'est encore que de 134 unités glucose.

3.2.2 - Complexation par les composés organiques

L'amylose forme des complexes insolubles avec un grand nombre de molécules organiques polaires telles que les alcools aliphatiques ou les acides gras linéaires (TAKEO *et al.*, 1973). Le complexe précipite en général en cristallisant; cette pro-

TABLEAU 7

COMPARAISON DE LA METHODE AMPEROMETRIQUE ET
DE LA METHODE POTENTIOMETRIQUE
(Doublier 1978)

	AMPEROMETRIE (1)	POTENTIOMETRIE (2)
Appareillage	2 électrodes de platine	1 électrode de platine et une électrode au calomel
	Galvanomètres sensibilité de 0,2 μ Ampère	Potentiomètre sensibilité \pm 0,1 mV
Quantité d'échantillons (en amylose)	25 - 50 mg	40 - 50 mg ⁽³⁾
Réactifs	KIO ₃ (5 x 10 ⁻³ N)	I ₂ /I ⁻ (0,5 N de KI, 0,5 N de KCl et 2 mg/ml d'iode)
	KOH (1 N), HCl (1 N) KI (0,4 N)	KOH (1 N), HCl (1 N) KI (0,5 N)
Précision	-	\pm 0,08 % en C L I (4)
Durée du dosage	10 mn	assez longue (étalonnage nécessaire)

(1) d'après LARSON *et al.* (1953) et BEMILLER (1964).

(2) d'après SCHOCH (1964).

(3) La méthode potentiométrique semi-microdifférentielle décrite par BANKS *et al.* (1971) ne nécessite que 3 à 6 mg d'amylose.

(4) C L I : capacité de liaison à l'iode exprimée en pourcentage par rapport à l'amidon total.



TABLEAU 8

LONGUEURS D'ONDE DU MAXIMUM D'ABSORPTION (λ_{\max}) DU COMPLEXE AVEC L'IODE
 ET CAPACITES DE LIAISON A L'IODE OBTENUES POUR DES AMYLOSES DE DIVERS
 DEGRES DE POLYMERISATION SYNTHETISEES PAR VOIE ENZYMATIQUE

(Banks, Greenwood et Khan 1971a)

Echantillons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Amylose
λ_{\max} à 20°C (nm)	496	524	530	546	574	588	595	606	610	642
CLI à 20,4°C (1)	(2)	(2)				(3)				
	-	-	1,3	3,6	11,1	N.d.	16,2	16,4	17,3	19,5
\overline{DP}	22,2	28,9	31,3	36,4	50,7	71	93	105	134	1500

(1) CLI en mg d'iode lié pour 100 mg de polysaccharide

(2) Des CLI positives n'ont pu être obtenues par extrapolation des valeurs expérimentales (cf. Fig. 11)

(3) Non déterminé



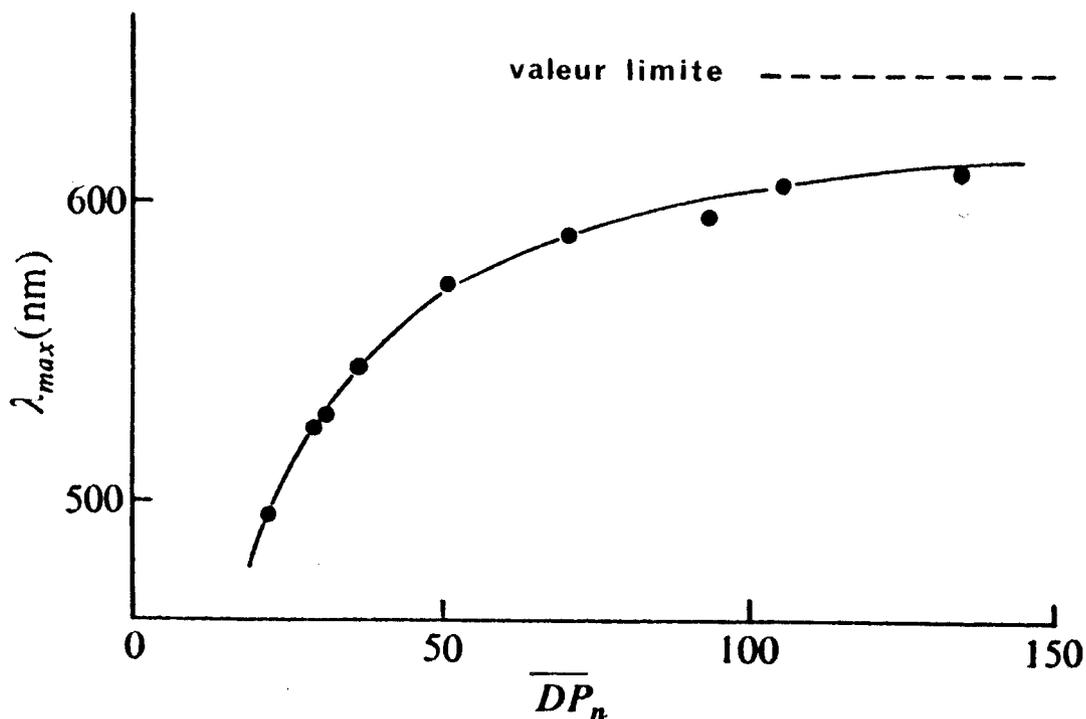


Fig. 10 - Variation de la longueur d'onde du maximum d'absorption λ_{max} en fonction du degré de polymérisation d'amyloses synthétisées par voie enzymatique.

(BANKS, GREENWOOD et KHAN, 1971a)

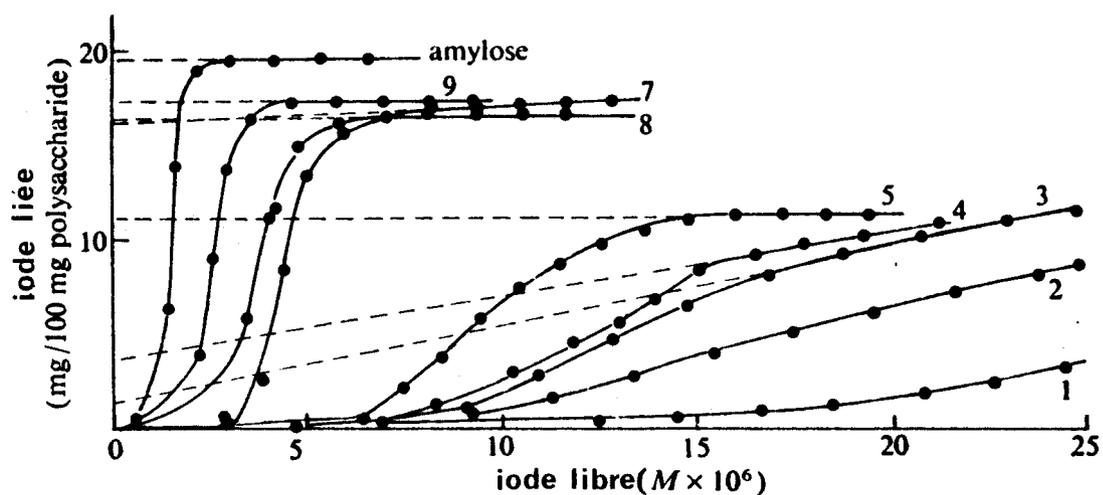


Fig. 11 - Courbes de dosages potentiométriques obtenues avec des amyloses de différents \overline{DP} synthétisées par voie enzymatique.

(BANKS, GREENWOOD et KHAN, 1971a)



priété de l'amylose sert à sa séparation de l'amylopectine (cf. § 2.2.2). Complexée, la macromolécule acquiert une structure hélicoïdale rigide autour de l'agent complexant (fig. 12.2), l'hélice est généralement à 6 résidus glucose par tour, elle est stabilisée par de fortes liaisons hydrogène intra-moléculaires. Dans le cas où le complexe se crée autour d'alcool butylique tertiaire, il y a 7 résidus glucose par tour.

L'hélice présente une surface intérieure hydrophobe, la molécule hôte peut remplir simplement la cavité centrale sans y être régulièrement dispersée. Le complexe d'alcool ou d'acide gras en contient 5 à 10 % en poids (DUPRAT *et al.*, 1980).

Les monoglycérides peuvent également donner lieu à une certaine complexation, mais leurs extrémités hydrophiles conduisent à une insolubilisation moindre de l'amylose. Les hélices formées sont plus courtes et le complexe ne cristallise pas. Ces complexants ne font que modifier le comportement rhéologique des gels d'amidon.

Dans le cas de l'amylopectine dispersée en milieu complexant, seules les chaînes externes (A) peuvent se complexer et la structure arborescente de la macromolécule empêche la cristallisation.

3.3 - PROPRIETES VISCOSIMETRIQUES DES MACROMOLECULES EN SOLUTION

La forme C_1 du cycle pyranose et la position en α de la liaison glucosidique (cf. fig. 1) imposent une rotation entre les plans de deux cycles glucose consécutifs. A grande distance, cette rotation impose à la macromolécule une structure torsadée qui peut, dans certaines conditions, conduire à des formes hélicoïdales.

Lorsque l'amylose est dispersée dans l'eau ou dans des solutions salines diluées (0,5 M KCl), la chaîne comporte comme une série de segments hélicoïdaux séparés par des zones de pelotes statistiques. Entre les tours d'hélice, il y a peu de liaisons hydrogène directes, l'hélice est stabilisée grâce à des pontages par molécules d'eau. Cette structure souple est due à la capacité de la liaison $\alpha(1\rightarrow4)$ de se stabiliser à plusieurs niveaux énergétiques faibles; selon la composition de la solution, la molécule peut se rencontrer dans tous les états intermédiaires entre la pelote statistique et l'hélice compacte si la solution contient un agent complexant. L'organisation la plus stable, rigidifiée par des liaisons entre les hydroxyles OH_2 et OH_3 (fig. 1) des cycles consécutifs est une hélice gauche (fig.12)

La structure de l'amylose permet l'obtention de solutions dont les viscosités peuvent varier dans une large mesure en fonction de la concentration et du \overline{DP} des chaînes (BANKS et GREENWOOD, 1975). La viscosité intrinsèque $[\eta]$ qui est l'une des grandeurs physiques les plus simples et les plus utilisées pour caractériser les macromolécules linéaires est liée à la masse moléculaire viscosimétrique \overline{M}_V par la relation de MARK-HOUWINK :

$$[\eta] = K \overline{M}_V^a$$

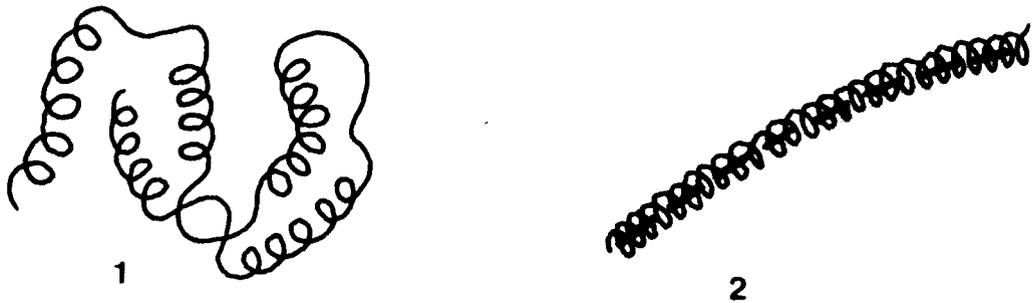


Fig. 12 - Conformation de l'amylose

- 1) en solution diluée de KCl ; hélice souple et pelote statistique.
- 2) complexée, hélice rigide, continue et compacte.

où a et K sont des paramètres empiriques qui dépendent des interactions polymères - solvant.

Dans le cas de l'amylose, de nombreuses relations $[\eta] - \overline{M}_v$ ont été déterminées mais on n'observe pas toujours un très bon accord entre elles (BANKS et GREENWOOD, 1975).

La viscosité intrinsèque est définie par :

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{C}$$

où η_{sp} représente la viscosité spécifique, c'est-à-dire l'augmentation de la viscosité due à l'addition du polymère au solvant,

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$$

où η est la viscosité de la solution de concentration C et η_0 la viscosité du solvant.

Dans la zone des faibles concentrations et lorsque le comportement est newtonien (concentration inférieure à un certain seuil variable suivant le solvant), la viscosité réduite η_{sp}/c suit la loi de HUGGINS (1942) :

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + \lambda_H [\eta]^2 C$$

où λ_H est la constante de HUGGINS, elle dépend des interactions polymères - solvant et polymère - polymère.

Pour déterminer la viscosité intrinsèque, il suffit donc de suivre les variations de la viscosité réduite en fonction de la concentration. Pour l'amylose, la relation de MARK-HOUWINK ayant été établie, la valeur de \overline{M}_v peut être calculée.

En ce qui concerne l'amylopectine, l'étude de sa conformation est plus délicate du fait de ses nombreuses ramifications. Si les chaînes externes "A" peuvent acquiescir toutes les conformations possibles, leur faible \overline{DP} ne leur permet pas de déterminer le comportement global de la macromolécule. En outre, l'amylopectine peut atteindre des masses moléculaires tellement élevées (10^9) qu'il est difficile, dans les mesures physiques de distinguer les agrégats des macromolécules isolées. L'amylopectine, cependant, peut se comparer au glycogène. Le glycogène, molécule sphérique, rigide, hydratée (70 à 80 %), a une viscosité intrinsèque de l'ordre de $10 \text{ cm}^3/\text{g}$ indépendante de sa masse moléculaire. A l'inverse, l'amylopectine a une viscosité élevée (environ $100 \text{ cm}^3/\text{g}$) qui dépend de sa masse moléculaire. Cela indique qu'en solution, la macromolécule d'amylopectine n'est pas sphérique, mais plutôt allongée et est beaucoup plus hydratée et moins rigide que le glycogène (BANKS et GREENWOOD, 1975).

Pour une même masse moléculaire, les solutions d'amylopectine sont bien moins visqueuses que celles d'amylose. Ceci est montré dans le tableau 9 où sont indiquées, pour divers amidons, les valeurs des viscosités intrinsèques de l'amylose et l'amylopectine.

3.4 - COMPORTEMENT DES CONSTITUANTS DE L'AMIDON SUR GEL D'AGAROSE

3.4.1 - La filtration sur gel

Depuis son apparition il y a une vingtaine d'années (PORATH et FLODIN, 1959), la filtration sur gel a occupé une place déterminante dans la purification de milliers d'enzymes, de polysaccharides, d'acides nucléiques, de protéines et d'autres macromolécules biologiques.

La chromatographie de filtration sur gel est une méthode simple, très fiable, par laquelle les molécules sont séparées selon leur taille et leur encombrement.

* Principe

Le principe de la filtration sur gel repose sur les capacités différentes des molécules à pénétrer dans les pores et la phase stationnaire. Les très grosses molécules ne pénètrent jamais dans le gel et traversent plus rapidement le support chromatographique. Les plus petites entrent dans les pores du gel et se déplacent plus lentement. Les molécules sont éluées dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes.

* Caractérisation du comportement d'un soluté

Les résultats, lors d'une filtration sur gel, sont généralement exprimés sous la forme d'un diagramme d'éluion montrant la variation de concentration du soluté en fonction du volume d'éluion. A partir de cette courbe, on peut connaître le volume d'éluion V_e d'une molécule donnée. Lorsque le volume de l'échantillon déposé est négligeable par rapport au volume d'éluion, le maximum du pic d'éluion du soluté détermine le volume d'éluion. Normalement, lors d'une filtration sur gel de Sépharose, les solutés ont des isothermes de partage linéaires et donnent des pics symétriques. Les volumes d'éluion sont alors facilement mesurables.

Le volume d'éluion V_e n'est pas suffisant en lui-même pour définir le comportement chromatographique d'un soluté. Il dépend du volume total V_t , du lit du gel et de la façon dont la colonne a été remplie. Par analogie avec d'autres types de chromatographie de partage, le coefficient K_{av} caractérise mieux l'éluion d'un soluté :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_o est le volume mort, il correspond au volume d'éluion de très grosses molécules qui ne pénètrent pas les pores de la phase stationnaire.

K_{av} représente la fraction du volume de gel stationnaire où diffuse une molécule donnée.

TABLEAU 9

VALEURS DES VISCOSITES INTRINSEQUES MESUREES EN KOH 1M
DES AMYLOSES ET AMYLOPECTINES DE DIVERS AMIDONS
(Greenwood et Thomson 1962)

Amidon	$[\eta]$ cm ³ /g amylose	$[\eta]$ cm ³ /g amylopectine
Amylomaïs	180	130
Orge	250	190
Avoine	180	-
Blé	280	140
Pois lisse	180	150
Pois ridé	140	150
Pomme de terre	410	160



3.4.2 - Chromatographie de filtration sur gel d'agarose des constituants de l'amidon

La filtration sur gel a été peu utilisée jusqu'à présent dans le domaine des macromolécules glucidiques à cause de leur solubilité faible dans les éluants neutres. Avec l'apparition de gels d'agarose réticulé (Sépharose 2B-CL, 4B-CL, 6B-CL), il est possible d'employer des éluants acides ou basiques ($3 < \text{pH} < 14$) ou des solvants organiques. Cette technique a été récemment appliquée à l'amidon et à ses produits de dégradation.

EBERMANN et SCHWARZ en 1975 utilisent une colonne d'agarose pour fractionner des amidons natifs de pomme de terre (Sépharose 2B) et d'amylomaïs (Sépharose 4B). La solution d'amidon injectée est préparée par solubilisation de l'amidon dans une solution de soude puis neutralisation par addition d'acide acétique. L'éluant utilisé est une solution aqueuse d'urée ou de sulfate de magnésium. Ils caractérisent les fractions obtenues par leurs CLI, leur λ_{max} et leur taux de β -amylolyse (cf. §4.2).

Ils obtiennent ainsi par fractionnement de l'amidon sur gel d'agarose la séparation de l'amylose et de l'amylopectine et constatent que le poids moléculaire de l'amylopectine est plus élevé que la limite du fractionnement de l'agarose et semble être supérieur à 20×10^6 .

En 1976, YAMADA et TAKI fractionnent par chromatographie sur gel de Sépharose 2B les quatre types d'amidon de maïs : normal, waxy, amylo et amylo-waxy. Ils améliorent la méthode en utilisant l'acide perchlorique comme solvant pour préparer la solution d'amidon. Ils fractionnent également les constituants de l'amidon, l'amylose et l'amylopectine qu'ils ont préparés par la méthode de SCHOCH mettant ainsi en évidence l'insuffisance de cette méthode, chacun des constituants de l'amidon étant contaminé par l'autre (fig. 13).

BILIADERIS *et al.* en 1979 étudient la distribution de poids moléculaire par chromatographie sur gel de Sépharose 2B des constituants de l'amidon de 9 légumineuses (pois lisse et ridé, fêverole, diverses variétés de haricots, lentille), obtenus par la méthode de BANKS et GREENWOOD (1967). La colonne a été calibrée par des dextrans de poids moléculaires connus. Ils confirment que la fraction amylopectine est exclue du gel, son poids moléculaire est donc supérieur à $20 \cdot 10^6$. Les profils obtenus sont tous semblables entre $K_{\text{av}} = 0,2$ et $K_{\text{av}} = 0,9$, sauf ceux des constituants des amidons de pois lisse et ridé pour lesquels le matériel de poids moléculaire compris entre $2 \cdot 10^6$ et $20 \cdot 10^6$ est plus important.

PRAZNIK et EBERMANN (1979) ont synthétisé des amyloses à partir de maltoheptaose et de glucose-1-phosphate par action de la phosphorylase de pomme de terre. Ces amyloses, caractérisées par β -amylolyse, diffusion de la lumière, mesure de viscosité intrinsèque, sont linéaires et les rapports, degré de polymérisation moyen en poids \overline{DPw} sur degré de polymérisation moyen en nombre \overline{DPn} , sont compris entre 1 et 1,15, ce qui correspond à une distribution de Poisson. Ces amyloses ont donc pu

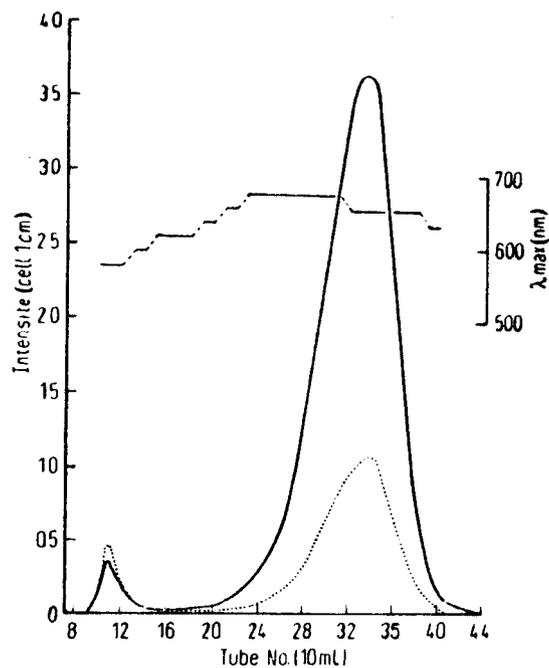


Fig. 13a- Diagramme d'élution sur Sépharose 2B de l'amylose obtenue selon la méthode de SCHOCH.

(YAMADA et TAKI, 1976)

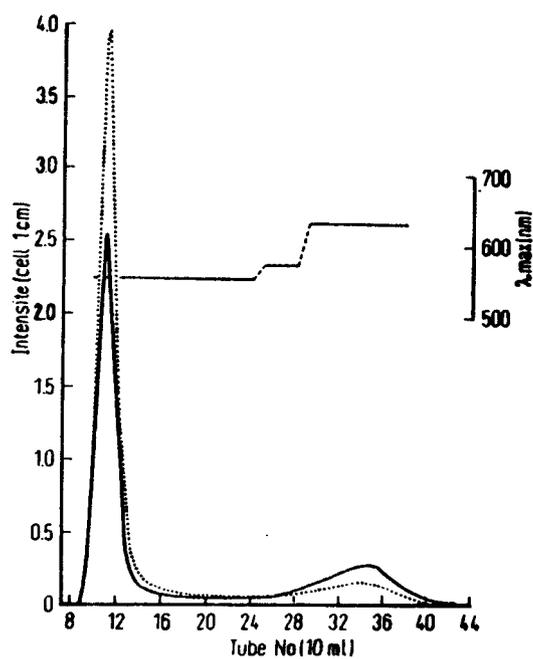


Fig. 13b- Diagramme d'élution sur Sépharose 2B de l'amylopectine obtenue selon la méthode de SCHOCH.

(YAMADA et TAKI, 1976)



être utilisées comme étalon pour calibrer une colonne de Sépharose 4B-CL. Elles ont conduit à des résultats exacts et précis. Ce qui prouve l'intérêt d'une calibration avec des amyloses synthétiques du fait de leur ressemblance structurale avec les substances fractionnées.

Alors que les dextrans, qui sont des polysides ramifiés, constitués de D-glucose, liés entre eux principalement par des liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et par quelques liaisons $\alpha(1\rightarrow2)$ $\alpha(1\rightarrow3)$ $\alpha(1\rightarrow4)$, n'ont pas exactement le même comportement sur gel de Sépharose que l'amidon et ses constituants. Ils sont donc probablement moins intéressants pour calibrer la colonne.

4 - HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE L'AMYLOSE ET L'AMYLOPECTINE

4.1 - ENZYMES

4.1.1 - Enzymes spécifiques de la liaison $\alpha(1\rightarrow4)$

α -amylase : E.C.3.2.1.1.

L' α -amylase, enzyme d'origine végétale, animale ou microbienne, hydrolyse au hasard des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ des chaînes d'amylose et d'amylopectine à l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes. Elle provoque la libération de glucose et d'oligosides de 2 à 7 unités anhydroglucose sous la configuration α de l'atome de carbone anomérique. C'est une endo-enzyme dont l'action s'effectue à la fois sur plusieurs chaînes et en plusieurs endroits d'une même chaîne.

Dans le cas de l'amylose, les produits finals sont essentiellement du maltose et du glucose. Par contre, dans le cas de l'amylopectine, en plus des oligosides précédents, il persiste des dextrans limites ramifiées (α dextrans limites) dont la structure dépend de l'origine de l' α -amylase utilisée. Cette enzyme appelée enzyme "liquéfiante" ou "dextrinisante", lorsque l'amidon est empesé, attaque également l'amidon à l'état granulaire. Son action sur l'amidon natif semble être liée aux possibilités de pénétration de l'enzyme à l'intérieur du grain et, en particulier, à ses possibilités d'attaque en surface. De ce fait, chaque grain appartenant à une population d'un type d'amidon donné à sa propre sensibilité à l'attaque de l'enzyme.

β -amylase : E.C.3.2.1.2.

La β -amylase ou $\alpha(1\rightarrow4)$ glucane malto-hydrolase, jusqu'à présent extraite des végétaux (orge, patate douce), a été mise en évidence très récemment dans certaines souches de microorganismes (HIGASHIHARA et OKADA, 1974; MARSHALL, 1975; FORGATY et GRIFFIN, 1975; SHINKE *et al.*, 1977).

Elle hydrolyse les chaînes de l'amidon à partir de leur extrémité non réductrice en libérant du β -maltose (enzyme "saccharifiante"). Elle convertit ainsi les chaînes linéaires en maltose si celles-ci comportent un nombre pair d'unités anhydroglucose

et en maltose et glucose si elles en comportent un nombre impair. Du type exoenzyme, la β -amylase agit par attaques multiples sur la même chaîne : le nombre moyen de ruptures de liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ est de 4 avec des amyloses à faible poids moléculaire et nettement plus élevé avec des amyloses à haut poids moléculaire. L'action de l'enzyme est bloquée lorsqu'elle rencontre une liaison $\alpha(1\rightarrow6)$; à l'approche d'une ramification, la vitesse d'hydrolyse se ralentit.

La β -amylase dégrade l'amidon empesé à un taux voisin de 60 %; par contre, elle n'a pas d'action sur le grain d'amidon natif si celui-ci est intact. Tout traitement ayant pour effet de détruire la structure du grain rend celui-ci sensible à cette enzyme.

4.1.2 - Enzymes spécifiques de la liaison $\alpha(1\rightarrow6)$

Ces enzymes généralement appelées enzymes déramifiantes ont, mis à part la R-enzyme d'origine végétale, été découvertes récemment à partir de très nombreuses souches de microorganismes (notamment bactéries) (FRENCH 1975).

Elles hydrolysent les liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ assurant les ramifications des chaînes d'amylopectine ou de glycogène et celles des chaînes d' α ou de β -dextrines limitées avec des vitesses qui dépendent de la longueur de la ramification et de la spécificité liée à l'origine de l'enzyme. L'encombrement stérique semble être le facteur prépondérant responsable de la plus ou moins grande facilité de pénétration de l'enzyme à l'intérieur du réseau macromoléculaire du substrat.

La pullulanase (E.C.3.2.1.41)

La pullulanase (E.C.3.2.1.41), extraite à partir d'une culture d'*Enterobacter (Aerobacter) aerogenes* et purifiée par MERCIER *et al.* (1972), a été ainsi dénommée en raison de son aptitude à produire du maltotriose à partir du pullulane, α -glucane produit par une levure (*Pullularia pullulans*) et constituée par des séquences de maltotriose reliées par des liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$. Des enzymes de spécificité analogue ont été trouvées dans d'autres bactéries.

La pullulanase hydrolyse facilement l'amylopectine mais elle est incapable, du fait de son volume hydrodynamique, d'hydrolyser complètement le glycogène, macromolécule deux fois plus ramifiée que l'amylopectine. Elle ne peut scinder une liaison $\alpha(1\rightarrow6)$ reliant un résidu anhydroglucose à une chaîne d' $\alpha(1\rightarrow4)$ anhydroglucose, son plus petit substrat est donc le 6_2 - α -D-maltosylmaltose.

L'isoamylase (E.C.3.2.1.68)

L'isoamylase (E.C.3.2.1.68), enzyme déramifiante extraite de *Cytophaga* (GUNJASMITH *et al.*, 1970) ou de *Pseudomonas* (YOKOBAYASHI *et al.* 1970), peut par contre déramifier complètement aussi bien l'amylopectine que le glycogène; cependant, son plus petit substrat est le 6_2 - α -D-maltotriosylmaltose.

Ces enzymes déramifiantes complètent à 100% les actions dextrinisantes et saccharifiantes des α - et β -amylases lorsqu'elles agissent sur l'amidon empesé ou

solubilisé. Elles sont complètement actives dans un milieu solvant eau-DMSO à 20 % (MERCIER et KAINUMA, 1975).

L'action de ces enzymes sur le grain d'amidon n'a pas été très étudiée; il semble qu'elles ne peuvent pas agir sur le grain intact (UEDA et OHBA, 1976).

4.1.3 - Enzyme spécifique des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ et $\alpha(1\rightarrow6)$

L'amyloglucosidase, encore appelée glucoamylase, glucamylase ou γ -amylase, hydrolyse les liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ et $\alpha(1\rightarrow6)$ de l'amylose et de l'amylopectine en libérant du D-glucose. Elle provient également de très nombreuses souches de microorganismes (notamment de moisissures du genre *Rhizopus* et *Aspergillus*).

Son mécanisme d'action et sa spécificité sont moins bien connus que ceux des α - et β -amylases et varient aussi en fonction de l'origine de l'enzyme. Elle agit plus rapidement sur les longues chaînes que sur les courtes chaînes et hydrolyse les liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ plus rapidement que les liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$.

MARSHALL et WHELAN (1970) montrent que l'enzyme à l'état purifié et cristallisé ne peut agir sur la liaison $\alpha(1\rightarrow6)$ de certaines oligosides ramifiés de faible degré de polymérisation. Des traces d' α -amylase sont indispensables pour obtenir une dégradation complète de l'amylopectine et une méthode de dosage de l'amidon a été développée par THIVEND *et al.* (1972), en utilisant ces 2 types d'enzymes.

L'amyloglucosidase est capable de dégrader partiellement le grain d'amidon intact. Par addition de pullulanase (UEDA et OHBA, 1976) ou d' α -amylase bactérienne (FUWA *et al.* (1978) ou fongique (TAKAYA *et al.*, 1978) à l'amyloglucosidase, le taux de dégradation de l'amidon granulaire est fortement augmenté.

4.2 - HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE L'AMYLOSE

Taux de β -amylolyse

Un des critères de linéarité de l'amylose est qu'elle est totalement hydrolysée en maltose et glucose sous l'action de la β -amylase. Cependant, PEAT *et al.* en 1952 découvrent que la β -amylase de patate douce cristallisée hydrolyse l'amylose à 70 % seulement. Ils expliquent la complète dégradation de l'amylose en maltose par la présence d'une seconde enzyme, la Σ -enzyme.

COWIE et GREENWOOD (1957a), ARBUCKLE et GREENWOOD (1958a), après avoir obtenu les mêmes résultats, montrent en plus qu'au moins une fraction de l'amylose est totalement linéaire. Deux sortes d'amylose seraient présentes dans le grain d'amidon : l'une présentant une barrière à l'action de l' α -amylase, l'autre consistant en une chaîne linéaire d'unités anhydroglucose reliées en $\alpha(1\rightarrow4)$. La présence de groupements ou liaisons anormales dans l'amylose n'ayant pas encore été universellement reconnue, la dégradation incomplète de l'amylose par la β -amylase semble être expliquée par la contamination éventuelle de l'amylose par de l'amylopectine ou la présence de phénomènes physiques d'associations moléculaires (rétrogradation).

La méthode généralement utilisée, le titrage potentiométrique à l'iode, n'est pas assez sensible pour mettre en évidence la présence de 2 ou 3 % d'amylopectine contaminante. BANKS et GREENWOOD (1967b) montrent alors que la seule façon de prouver que l'amylose n'est pas contaminée par de l'amylopectine est de la soumettre à l'action de la β -amylase d'une part, et de la β -amylase et de la Z -amylase d'autre part. Un taux de conversion de 100 % en maltose indiquera l'absence d'amylopectine.

Ainsi, le tableau 10 montre que toutes les amyloses obtenues par dispersion du grain présentent une barrière à l'action de la β -amylase. BANKS et GREENWOOD (1975) ont montré qu'elle n'est due ni à la présence d'amylopectine contaminante, ni au phénomène de rétrogradation.

Cette hétérogénéité naturelle de l'amylose peut être due à la présence de :
1) groupes ester-phosphate 2) modification oxydante de résidus glucose 3) liaison anormale 4) combinaison de 1) et 3).

BANKS et GREENWOOD (1975) ont montré que la présence de groupes ester-phosphate n'en est pas la cause : bien que la barrière à l'action de la β -amylase puisse provenir de phénomènes d'oxydation, ceux-ci peuvent être évités en travaillant dans des conditions anaérobies.

L'identification de la nature de ces barrières est d'autant plus difficile que BANKS *et al.* (1960) ont montré que la Z -enzyme n'est pas spécifique et qu'elle se comporte comme un type d'alpha-amylase.

BANKS et GREENWOOD (1967b) ont montré l'existence d'un certain degré de ramification dans l'amylose au cours de sous-fractionnement par précipitation. Les ramifications sont constituées de centaines, voire même de milliers de résidus glucose. De plus, les propriétés hydrodynamiques des β -dextrines limites des fractions "amylose anormale" sont différentes de celles de macromolécules linéaires, ce qui indique que le matériel résistant à la β -amylolyse est très ramifié. D'autres travaux de BANKS et GREENWOOD (1975) ont montré que les fractions anormales ont des poids moléculaires situés dans deux domaines différents.

L'existence d'un certain degré de ramification de l'amylose a également été mis en évidence par l'utilisation d'enzymes déramifiantes. KJOLBERG et MANNERS (1963) soumettent l'amylose à la pullulanase, BANKS et GREENWOOD (1967b) la soumettent à l'isoamylase. Ce qui entraîne une augmentation de la sensibilité de l'amylose à l'action de la β -amylase et une diminution de la viscosité intrinsèque correspondant au débranchement de longues chaînes linéaires. L'action combinée des 2 enzymes conduit à la conversion totale de l'amylose en maltose.

4.3 - HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE L'AMYLOPECTINE

Taux de β -amylolyse

L'action de la β -amylase étant bloquée lorsqu'elle rencontre une liaison $\alpha(1\rightarrow6)$, elle n'agit que sur les chaînes externes ou sur les portions externes de

TABLEAU 10

TABLEAU DES TAUX DE β -AMYLOLYSE DES AMYLOSES ET AMYLOPECTINES
DE DIVERS AMIDONS

(Greenwood et Thomson 1962)

Amidon	Amylose		Amylopectine β %
	β %	($\beta + \alpha$) %	
Amylomaïs	77	101	58
Orge	73	98	58
Avoine	77	101	57
Blé	68	100	57
Pois lisse	81	100	58
Pois ridé	82	101	58
Pomme de terre	76	100	56



chaînes internes de la macromolécule d'amylopectine. La vitesse d'hydrolyse se ralentit à l'approche d'une ramification, son action étant limitée :

- dans le cas d'une chaîne externe, à deux ou trois unités anhydroglucose, selon que cette chaîne comporte un nombre pair ou impair d'unités anhydroglucose;
- dans le cas d'une portion externe de chaîne interne, à une ou deux unités anhydroglucose, selon que cette portion de chaîne comporte un nombre impair ou pair d'unités anhydroglucose.

Le produit final, résultat de l'attaque de la molécule d'amylopectine, dénommé β -dextrine limite, représente entre 32 et 34 %.

Dans le tableau 10, nous indiquons les taux de β -amylolyse des amylopectines de divers amidons.

Le travail que nous avons entrepris a pour objet :

- de fractionner un amidon de pomme de terre par voie chimique;
- d'étudier l'évolution du fractionnement par l'analyse et la caractérisation des fractions obtenues à chaque étape.

Dans ce but, l'amidon de pomme de terre a été fractionné selon le procédé, mis au point par BANKS et GREENWOOD en 1967, qui semble être le plus satisfaisant. La caractérisation des fractions obtenues a été effectuée, d'une part par des méthodes classiques de type enzymatique ou physico-chimique, d'autre part par une méthode plus récente, la chromatographie de filtration sur gel d'agarose qu'il semble intéressant de mettre en oeuvre pour suivre l'évolution de la purification de l'amylose. Celle-ci a également été comparée à deux amyloses industrielles étudiées à l'aide des mêmes méthodes.

Dans une première partie, nous décrivons le matériel et les méthodes utilisés au cours de l'étude. Nous présentons ensuite, dans un deuxième chapitre, les résultats relatifs au fractionnement et à la caractérisation des divers produits obtenus et des amyloses industrielles. Dans une dernière partie, nous dégageons l'intérêt des méthodes utilisées et nous comparons les résultats à ceux obtenus par d'autres procédés de fractionnement.

MATERIEL ET METHODES

1 - MATERIEL

1.1 - AMIDON ET AMYLOSES

Notre étude a porté sur :

- un amidon de pomme de terre commercialisé de la Féculerie ROHAN à 19,8 % d'eau.
Au cours des travaux ont également été utilisés :
- un amidon de maïs cireux des Etablissements ROQUETTE à 13,9 % d'eau.
- une amylose de pomme de terre de la Société AVEBE (Pays-Bas) à 7,8 % d'eau.
- une amylose de pomme de terre ($\overline{DP} = 130$) de la Société HAYASHIBARA (Japon) à 7,7 % d'eau.

1.2 - SOLVANTS

Le fractionnement a nécessité l'utilisation de :

- Diméthylsulfoxyde (DMSO) pour analyses - MERCK - Pureté : 99,5 %.
- Butanol - 1 pour analyses - MERCK - Pureté : 99,5 %.
- Thymol cristallisé - MERCK.
- Ethanol absolu pour analyses - PROLABO - Pureté : 99,85 %.

1.3 - GELS ET PRODUITS DIVERS

- Gel Sépharose 2B-CL - PHARMACIA.
diamètre des particules : 60 - 250 μm
limite d'exclusion approximative en masse moléculaire
déterminée avec des dextrans : $2 \cdot 10^7$ daltons
- Sel d'ammonium de l'acide 2,2-azino-di (3-éthyl-benzathiazoline 6 sulfonique) (ABTS) cristallisé - BOEHRINGER.
- D (+) - glucose anhydre - FLUKA.
- Maltose monohydrate - MERCK.

1.4 - ENZYMES

Les enzymes utilisées au cours de l'étude sont :

- β -amylase d'orge en poudre (E.C.3.2.1.2) (FLUKA)
. Activité, 1000 UI/mg de produit
- Amyloglucosidase (1,4 α -D-Glucane glucohydrolase E.C.3.2.1.3)
d'*Aspergillus niger* lyophilisée (MERCK)
. Activité, 50 UI/mg de produit
- Glucose-oxydase (GOD) (β -D-Glucose : oxygène 1 oxydo-réductase, E.C.1.1.3.4)
d'*Aspergillus niger* (Sigma, type II).

- Peroxydase (POD) (donneur, hydrogène peroxyde oxydo-réductase, E.C.1.11.1.7) du raifort (Sigma, type I).

1.5 - APPAREILLAGE

Les dosages ampérométriques ont été réalisés avec :

- Un ensemble TACUSSEL comportant :
 - . une paire d'électrodes de platine (n° 18) de 4 cm séparées d'environ 1 mm montées en permanence.
 - . une cuve thermostatée à $25^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.
 - . une burette automatique de 2 ml.
 - . un système d'enregistrement asservi à cette burette.
 - . un générateur de tension.

Les mesures viscosimétriques ont été effectuées avec :

- Un viscosimètre manuel OSWALD de constante $K = 0,7 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$.
Temps d'écoulement de l'eau à $25^{\circ}\text{C} = 111,5$ secondes.

Les chromatographies de filtration sur gel ont été réalisées avec :

- Une colonne WRIGHT (100 x 2,2 cm) munie d'une pompe et d'un collecteur automatique GILSON.
- Une chaîne TECHNICON pour dosage automatique à l'orcinoï sulfureux.

2 - METHODES

2.1 - PROCÉDE DE FRACTIONNEMENT DE L'AMIDON

Le procédé utilisé a été initialement mis au point par BANKS et GREENWOOD (1967) pour fractionner les amidons de céréales. Quelques modifications ont été apportées au niveau du prétraitement et du nombre de recristallisations.

L'amidon a été fractionné selon le schéma fig. 14.

2.1.1 - Prétraitement

L'amidon a été dispersé comme suit :

dans un erlen de 500 ml sont introduits 300 ml de DMSO 95 % (DMSO = 95; eau = 5 en volume) et 15 grammes (g) d'amidon humide. L'erlen bouché est maintenu à une température voisine de 20°C sous agitation magnétique pendant 24 heures. La solution limpide obtenue est transvasée dans un erlen d'un litre contenant 2 volumes (600 ml) de butanol sous agitation magnétique. Après 24 heures, le précipité non granulaire obtenu par centrifugation 20 minutes (mn) à 35 000 g à 15°C

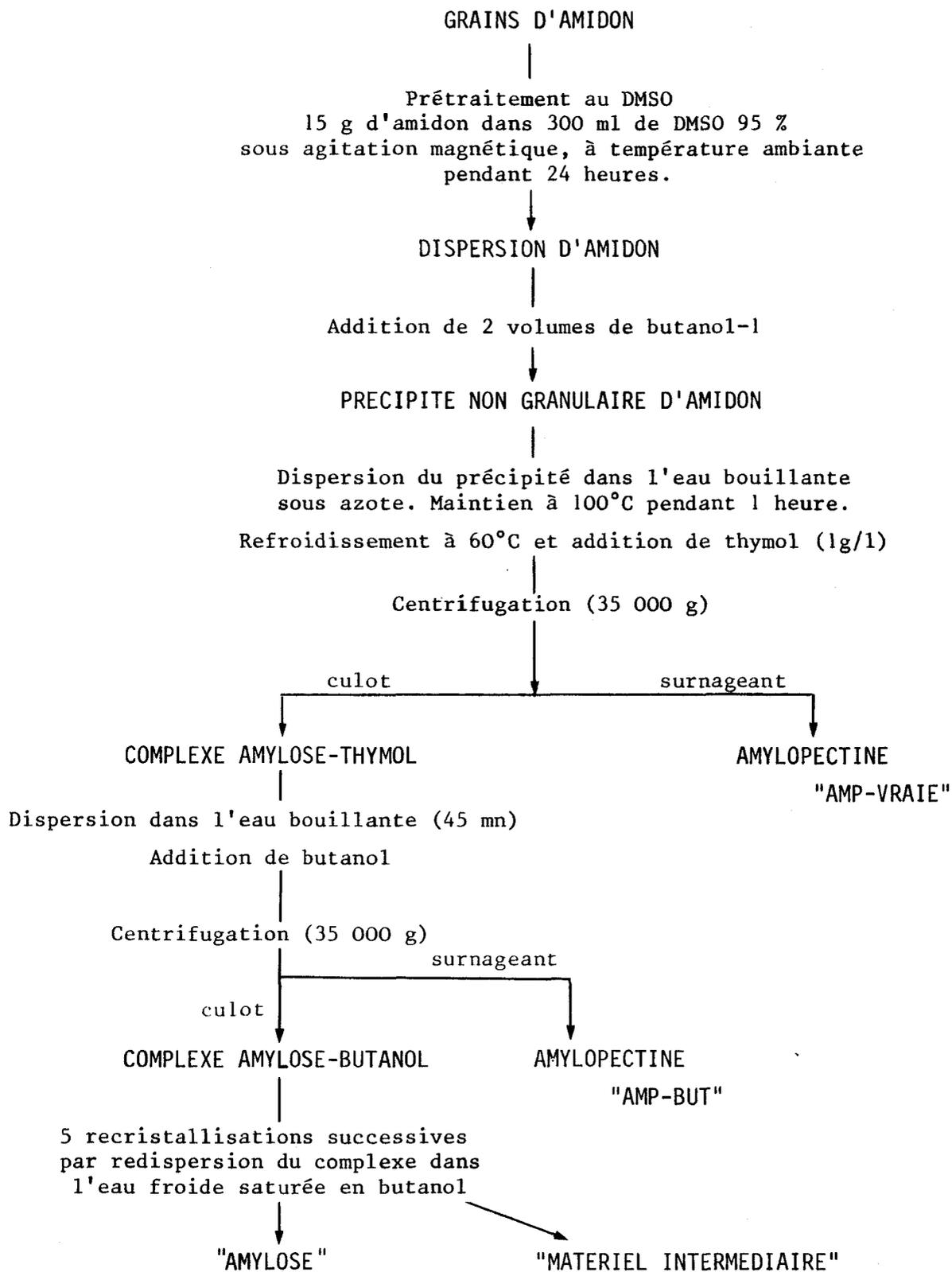


FIG. 14 - Schéma du fractionnement de l'amidon par dispersion du grain et complexation par le thymol.

dans des pots préalablement tarés, est lavé au butanol pour éliminer les dernières traces de DMSO, puis pesé. Une partie aliquote est prélevée et stockée à température ambiante; le fractionnement est poursuivi sur l'autre partie.

2.1.2 - Complexation par le thymol

Dans un erlen d'un litre muni d'un bouchon à 2 tubulures, et plongeant dans un bain d'huile à 100°C, le précipité d'amidon obtenu est dispersé dans 400 ml d'eau bouillante. L'ébullition est maintenue 1 heure sous agitation magnétique sous azote. L'erlen est alors sorti du bain d'huile lorsque la température est redescendue à 60°C, le thymol pulvérisé (1 g/l soit 0,4 g) est ajouté. Après 3 jours à température voisine de 20°C, le complexe amylose-thymol est séparé du surnageant par centrifugation 20 mn à 35 000 g à 15°C dans des pots tarés, puis pesé. Une partie aliquote étant prélevée et stockée à température ambiante, l'autre partie sera redispersée et complexée par le butanol. Le surnageant contient la fraction amylopectine "amp-vraie". Après extraction à l'éther (100 ml) pour éliminer le thymol, l'amylopectine est dosée (cf. § 2.1.5) puis récupérée soit par lyophilisation, soit après précipitation par 3 volumes d'éthanol.

2.1.3 - Complexation par le butanol

Dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites, le complexe amylose-thymol obtenu est redispersé dans un erlen de 500 ml dans 250 ml d'eau bouillante. L'ébullition est maintenue 45 mn sous azote sous agitation magnétique. Après refroidissement à température ordinaire, un excès de butanol (50 ml) est ajouté. Après 24 heures, le complexe amylose-butanol est séparé du surnageant par centrifugation 20 mn à 35 000 g à 15°C dans des pots préalablement tarés. Le gel est pesé. Une fraction aliquote est prélevée et stockée à température ambiante. L'autre fraction sera recristallisée. Le surnageant contient une fraction amylopectine appelée "amp-but". Après dialyse contre de l'eau permutée, la fraction amylopectine est dosée (cf. § 2.1.5), puis récupérée par lyophilisation.

2.1.4. - Recristallisations

Le complexe amylose-butanol est redispersé à température voisine de 20°C dans 200 ml d'eau saturée en butanol (180 ml d'eau et 20 ml de butanol) sous agitation magnétique. Après 24 heures à température ordinaire, le complexe est séparé du surnageant par centrifugation 20 mn à 35 000 g dans des pots tarés, et pesé. Une fraction aliquote est prélevée et stockée à température ambiante, l'autre fraction sera recristallisée de nouveau. Le surnageant contenant un matériel intermédiaire est dialysé contre de l'eau permutée, dosé et lyophilisé.

Quatre recristallisations successives effectuées dans ces conditions sont encore nécessaires pour obtenir la fraction amylose appelée "amylose vraie".

2.1.5 - Dosage et conservation des produits obtenus au cours du fractionnement. Préparation et dosage de leurs solutions

2.1.5.1 - Fractions "amylopectine" et "matériel intermédiaire"

Les surnageants contenant les fractions "amylopectine" et "matériel intermédiaire" étant en milieu aqueux sont dosés par les méthodes chimiques décrites au § 2.2.2.1. Les fractions "amylopectine" et "matériel intermédiaire" obtenues par lyophilisation ou précipitation de ces surnageants sont stockées telles quelles à température ordinaire. Elles peuvent être aisément remises en solution jusqu'à 15 mg/ml en milieu KOH N ou DMSO sous agitation magnétique. Elles sont alors dosées par les méthodes enzymatiques ou chimiques indiquées au § 2.2.

2.1.5.2 - Complexes et fractions amylose

Ils sont obtenus sous forme de gels qui peuvent être soit déshydratés, soit stockés tels quels. L'avantage des gels est qu'ils sont plus facilement solubles que les produits déshydratés. Ils seront donc stockés tels quels à température ambiante. Pour les doser, environ 100 mg de gel pesés exactement sont dispersés dans un ml de KOH N sous agitation magnétique à température ordinaire. La solution est portée à 10 ml par addition d'eau, puis dosée, éventuellement après dilution, par les méthodes de dosages chimiques indiquées au § 2.2.2.1. Les gels ont été mis en solution jusqu'à, au plus, 200 mg de gel par ml de KOH N.

2.2 - METHODES DE DOSAGE

2.2.1 - Méthodes de dosages enzymatiques

2.2.1.1 - Dosage de l'amidon et des oligosides et polysides provenant de son fractionnement

Ils peuvent être dosés en hydrolysant totalement les solutions par l'amyloglucosidase selon LEE et WHELAN (1966); le glucose, quantitativement libéré est dosé par la glucose-oxydase. L'hydrolyse par l'amyloglucosidase se fait de la façon suivante. Dans un tube à essai, introduire :

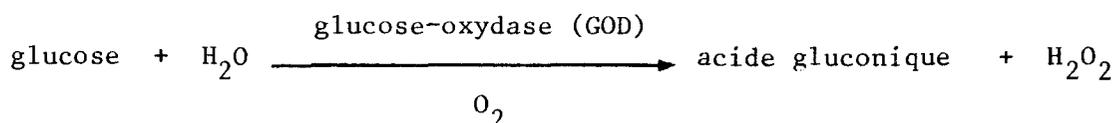
- 0,75 ml au maximum de solution à doser de concentration comprise entre 0 et 50 µg/ml.
- 50 µl de solution d'amyloglucosidase correspondant à 7,5 UI/ml (solution mère à 3 mg/ml : dans un tube de 10 ml, dissoudre 30 mg soit 150 UI/ml d'amylogluco-

sidase dans 10 ml d'eau distillée bouillie refroidie. Conserver à 4°C).
 - 0,2 ml de tampon acétate 0,2 M pH = 4,8. Laisser agir l'amyloglucosidase pendant 3 heures à 30°C et doser ensuite le glucose libéré.

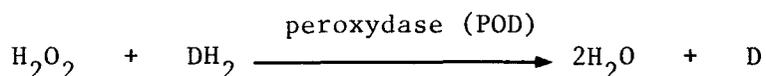
2.2.1.2 - Dosage du glucose

* Principe

Selon LLOYD et WHELAN (1969), par une réaction d'oxydation catalysée par la glucose-oxydase, le glucose est transformé en acide gluconique avec libération d'eau oxygénée.



L'eau oxygénée en présence de peroxydase réagit avec un donneur d'hydrogène l'ABTS :



Il se forme une coloration verte dont la densité optique mesurée à 560 nm varie linéairement avec la quantité de glucose mise en oeuvre jusqu'à 50 µg/ml.

* Réactifs

- Solution mère de glucose 500 µg/ml, soit 50 mg dans 100 ml. Conserver à 4°C et attendre 4 heures avant utilisation pour que la mutarotation soit complète.

- Tampon "tris-phosphate". Dissoudre :

- . 36,3 g de "tris" (tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane)
- . 45,5 g de NaH₂PO₄ anhydre
- ou . 50 g de NaH₂PO₄ , H₂O
- ou . 56 g de NaH₂PO₄ , 2H₂O

dans 900 ml d'eau distillée. Ajuster le pH à 7 avec de l'acide orthophosphorique avant de compléter à 1 l avec de l'eau distillée.

- Mélange tampon-enzyme-chromogène : dissoudre dans 100 ml de tampon "tris-phosphate"

- . 100 mg de GOD
- . 3 mg de POD
- . 50 mg d' ABTS

* Mode opératoire

A 1 ml de la solution de glucose à doser (comprenant de 10 à 50 µg), ajouter 2 ml d'eau distillée et 2 ml du mélange tampon-enzyme-chromogène. Laisser la réaction se développer à l'obscurité à température voisine de 20°C pendant 30 mn. Mesurer ensuite au spectrophotomètre l'intensité de la coloration à 560 nm en la comparant à celle d'un blanc où la solution de glucose est remplacée par le solvant (eau ou DMSO 20 %).

. Courbe d'étalonnage

Diluer 10 fois la solution mère de glucose soit avec de l'eau distillée, soit avec le solvant DMSO 20 %. Prélever des volumes de la solution diluée correspondant à 10, 20, 30, 40, 50 µg; compléter éventuellement à 1 ml avec l'eau distillée ou le solvant DMSO 20 % et opérer comme indiqué ci-dessus.

2.2.2 - Méthodes de dosages chimiques

2.2.2.1 - Dosage des glucides totaux

Les glucides totaux sont dosés par :

- la méthode manuelle à l'anthrone de LOEWUS (1952) modifiée par TOLLIER (1965) qui a l'avantage de pouvoir être utilisée aussi bien en milieu aqueux, KOH 0,1N, qu'en milieu alcoolique et DMSO.

* Principe

L'acide sulfurique concentré transforme à chaud les glucides en dérivés furfuriques. Dans des conditions déterminées, les hexoses et leurs homologues supérieurs produisent des dérivés donnant une coloration verte avec l'anthrone. Cette coloration présente un maximum d'absorption à 625 nm et suit la loi de BEER pour des concentrations en glucides allant de 20 à 100 µg.

- la méthode automatique à l'orcinol sulfurique décrite par KESLER (1967) et adaptée au dosage automatique des glucides totaux par TOLLIER et ROBIN (1979). Elle est utilisée en milieu aqueux et KOH 0,1N. Le principe de cette méthode est identique à celui de la méthode à l'anthrone. La coloration obtenue avec l'orcinol présente un maximum d'absorption à 480 nm dont l'intensité varie linéairement avec la quantité de glucose mise en oeuvre dans la prise d'essai (de 10 à 50 µg).

2.2.2.2 - Dosage du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des oligosides, glucose et maltose, libérés au cours des dégradations enzymatiques est mesuré selon la méthode de NELSON (1944).

* Principe

En milieu alcalin, le groupement pseudo-aldéhydique des sucres réduit les ions cuivriques Cu⁺⁺ en ions cuivreux Cu⁺ ; ces derniers réagissent avec le réactif arséniomolybdique en donnant une coloration bleue dont la densité optique mesurée à 520 nm varie linéairement avec la concentration en oses de 0 à 250 µg/ml.

Les courbes d'étalonnage ont été établies avec du glucose et du maltose en milieu aqueux et DMSO 20 %.

2.3 - METHODES DE CARACTERISATION DES PRODUITS DE FRACTIONNEMENT

2.3.1 - Détermination des profils d'élution sur gel de Sépharose 2B-CL

260 ml de gel sont mis en suspension dans 300 ml de KOH 0,1N. L'ensemble est dégazé à température ambiante pendant 1 heure sous agitation magnétique. La colonne est remplie selon la technique classique.

La colonne est placée à l'obscurité dans une pièce dont la température est de 20°C ± 2°. Elle est éluée par un écoulement ascendant de KOH 0,1N. Le débit d'élution est fixé à 15 ml/h. La solution est introduite par la partie inférieure de la colonne. Les tubes (60 tubes par fractionnement) sont collectés toutes les 20 mn par un collecteur automatique GILSON. La quantité de glucides présents dans chaque fraction est dosée par la méthode automatique à l'orcinol ou manuelle à l'anthrone (cf. § 2.2.2.1). Le profil d'élution est obtenu en portant la quantité de glucides récupérés (en µg de glucose) par mg de substrat fractionné (exprimé en glucose) en fonction du volume d'élution (en ml).

2.3.2 - Détermination du maximum du spectre d'absorption du complexe amylose-iode

Elle est réalisée selon la méthode de BAILEY et WHELAN (1961) modifiée comme suit :

. Solution

{	200 µg d'échantillon (exprimé en amidon), soit X ml en milieu	KOH 0,1 N
	X/10 ml HCl N	
	$\frac{0,8 - X/10 \text{ ml}}{0,33}$	KCl 0,33 M
	0,208 ml de solution I ₂ /IK (à 0,2 % I ₂ - 2 % IK)	

Compléter à 10 ml avec de l'eau distillée.

. Référence

{	2 ml KOH 0,1 N
	0,2 ml HCl N
	1,82 ml KCl 0,33 M
	0,208 ml I ₂ /IK

Compléter à 10 ml avec de l'eau distillée.

Le spectre d'absorption est enregistré à l'aide d'un spectrophomètre entre 450 et 700 nm

2.3.3 - Détermination de la capacité de liaison à l'iode (CLI) par ampérométrie

La méthode ampérométrique originale décrite par LARSON *et al.* (1953) nécessite des solutions relativement concentrées (10 mg/ml). La méthode a été modifiée et, grâce à l'appareillage dont nous disposons, des dosages ampérométriques ne nécessitant que des solutions à 1 ou 2 mg/ml ont pu être réalisés.

* Mode opératoire

- Préparer une solution mère de l'échantillon à doser à environ 1 mg/ml (exprimé en amidon) en milieu KOH 1N. La conserver à température ambiante.
- Déterminer la concentration de la solution mère par la méthode à l'antrone (cf. § 2.2.2.1).
- Enregistrer la courbe ampérométrique avec l'ensemble TACUSSEL. Pour cela :

- . Introduire dans la cuve thermostatée à 25°C et placée sur un agitateur

- magnétique : 1 ml de solution à 1 mg/ml en KOH 1N

- 2 ml HCl N

- 15 ml d'eau distillée

- 1 ml KI (0,4N)

- . Remplir la burette avec 2 ml de KIO_3 $5 \cdot 10^{-3}\text{N}$ ($8,33 \cdot 10^{-4}\text{M}$)

- . Fixer l'ensemble burette - électrodes sur la cuve. Imposer entre les 2 électrodes une différence de potentiel de 10 mV. Mettre sous agitation.

- . Mettre en marche le système enregistreur.

- . Ajouter la solution d'iodate de potassium en continu avec un débit de 1 μl /seconde.

- . Faire un blanc en remplaçant la solution d'amylose dans la cuve par une solution de potasse normale et opérer de la même façon.

* Calcul de la capacité de liaison à l'iode

La courbe ampérométrique, intensité (en $\mu\text{Ampère}$ (μA)) en fonction du volume d'iodate ajouté, est directement tracée par l'enregistreur. L'allure de cette courbe est représentée sur la fig. 15.

Soit : A le point de saturation en iode de l'amylose

B le point de saturation en iode du blanc

x_A la quantité d'iodate en ml versée au point A

x_B la quantité d'iodate en ml versée au point B

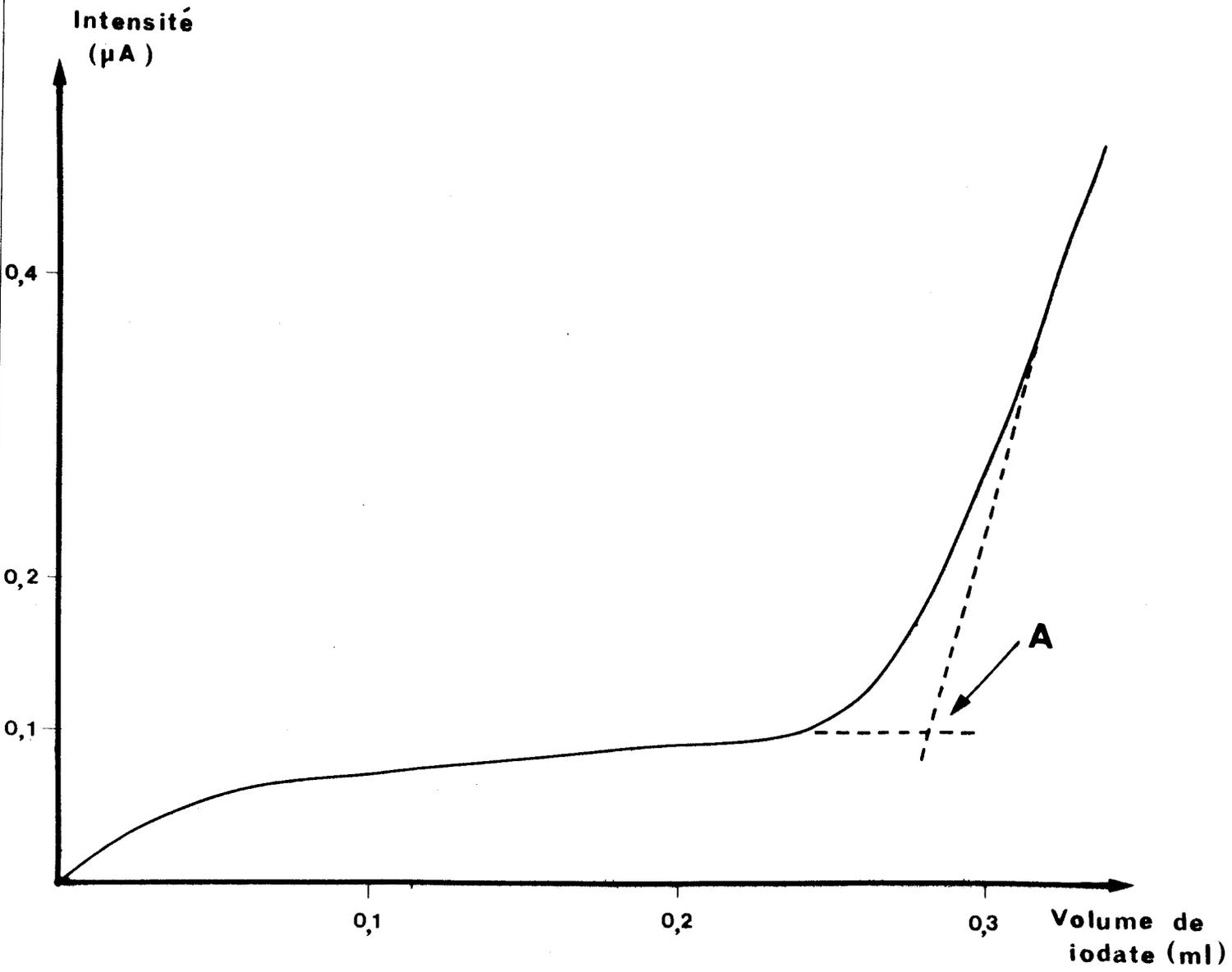


FIG.15- VARIATION DE L'INTENSITE EN FONCTION DU VOLUME DE IODATE AJOUTE.



La quantité d'iode libérée et complexée par l'échantillon est :

$$(x_A - x_B) \times 8,33 \cdot 10^{-4} \times 253,84 = (x_A - x_B) \times 0,634$$

$$\text{d'où CLI \%} = \frac{(x_A - x_B) \times 0,634 \times 100}{C \text{ mg/ml} \times \text{P.E.}}$$

P.E. étant la prise d'essai en ml.

2.3.4 - Détermination des caractéristiques viscosimétriques

Pour déterminer la viscosité intrinsèque d'un polymère, il faut :

- Préparer des solutions dans un milieu approprié à différentes concentrations;
- Les filtrer;
- Déterminer leurs concentrations;
- Mesurer leurs temps d'écoulement.

* Mode opératoire

. Préparation des solutions.

Préparer une solution mère à 2,5 mg/ml et en concentration finale de KOH 0,2N. Les autres solutions sont obtenues en introduisant dans 4 fioles de 10 ml, 2, 4, 6, 8 ml de la solution mère en complétant à 10 ml avec une solution de KOH 0,2N et en homogénéisant. Les solutions sont conservées à température ambiante.

. Filtration des solutions sur verre fritté n° 2.

. Détermination des concentrations par la méthode automatique à l'orcinol sulfurique ou manuelle à l'anthrone (cf. § 2.2.2.1).

. Mesure des temps d'écoulement.

Les temps d'écoulement du solvant KOH 0,2N et des solutions sont mesurés à 25°C immédiatement après leur préparation et filtration. Pour chaque solution, la mesure est répétée 4 fois.

* Calcul de la viscosité intrinsèque

La courbe $\frac{\eta_{sp}}{c} = f(c)$ (cf. travaux antérieurs § 3.3) étant tracée, l'extrapolation à $c = 0$ conduit à la viscosité intrinsèque.

Pour l'amylose, la relation $[\eta] = KM_V^a$, où a et K sont les coefficients utilisés par BANKS et GREENWOOD (1975), permet de déterminer M_V .

2.3.5 - Détermination du taux de β -amylolyse

La détermination du taux de β -amylolyse nécessite la préparation du substrat puis la préparation de la digestion et la mesure de son pouvoir réducteur au cours

du temps.

2.3.5.1 - Préparation du substrat

Pour chaque échantillon, un substrat contenant de 0,5 à 2 mg de glucides par ml en DMSO 20 % est préparé. Le mode de préparation, différent selon que l'échantillon à étudier est un gel ou un produit lyophilisé, est décrit ci-dessous.

- Gels (amidon précipité par le butanol, complexes amylose-thymol, amylose-butanol)

La β -amylase étant une enzyme inhibée par le thymol et le butanol, ces derniers doivent préalablement être éliminés. Les gels sont traités comme suit : de 50 à 150 mg de gel (selon la teneur en amidon) sont pesés dans un pot de centrifugeuse en verre de 50 ml. 30 ml d'éthanol sont ajoutés. Après 6 heures à 4°C, l'ensemble est centrifugé à 750 g à 15°C. Le gel est séparé de l'éthanol et remis en suspension dans 30 ml d'éthanol. Après une nuit à 4°C, le précipité est récupéré par filtration sur büchner, repris par 2 ml de DMSO pur. Après dispersion sous agitation au Vortex, 8 ml d'eau distillée bouillie refroidie sont ajoutés.

- Produits lyophilisés (amylopectine et matériel intermédiaire)

De 5 à 15 mg d'échantillon sont pesés dans un tube de 10 ml et dispersés dans 2 ml de DMSO pur. 8 ml d'eau bouillie refroidie sont ajoutés.

2.3.5.2 - β -amylolyse

La digestion maintenue à 30°C contient par ml :

0,5 à 2 mg de glucides (substrat en DMSO 20 %);

100 UI de β -amylase (solution à 1 mg/ml préparée dans de l'eau distillée fraîchement bouillie refroidie).

Le pH est voisin de 5,6. L'évolution de la β -amylolyse est suivie par la mesure selon NELSON de l'augmentation du pouvoir réducteur due à la libération du maltose. Après 12 heures, le pouvoir réducteur est constant, le taux de β -amylolyse est calculé ainsi :

$$T = \frac{\Delta PR'}{g}$$

$\Delta PR'$ est l'augmentation du pouvoir réducteur exprimé en mg de maltose par ml de solution; g, la concentration de la digestion exprimée en mg de glucose par ml de solution (concentration obtenue par la méthode à l'amyloglucosidase (cf. § 2.2.1.1))

RESULTATS

Notre travail a consisté à étudier le fractionnement de l'amidon de pomme de terre par précipitation sélective.

La méthode mise au point par BANKS et GREENWOOD a été utilisée puis complétée afin d'obtenir une amylose très pure. Les fractions obtenues à chaque étape ont été analysées quantitativement puis caractérisées à l'aide de méthodes enzymatiques et physico-chimiques. Afin de suivre l'évolution de la purification de l'amylose, nous avons notamment employé la chromatographie de perméation sur gel de Sépharose 2B, méthode récemment développée pour fractionner les macromolécules glucidiques. Les deux amyloses industrielles Avebe et Hayashibara ont également été étudiées par ces méthodes afin de pouvoir les comparer à l'amylose obtenue.

Dans ce chapitre, nous rapportons les résultats relatifs d'une part à l'analyse quantitative du fractionnement, d'autre part à la caractérisation des produits obtenus à chaque étape du fractionnement. La dernière partie est consacrée à l'interprétation des résultats et à la discussion.

1 - COMPOSITION DE L'AMIDON DE POMME DE TERRE

La composition chimique de l'amidon de pomme de terre que nous avons utilisé a été déterminée au laboratoire. Elle est la suivante (les résultats sont exprimés en g pour 100 de produit sec) :

Amidon de pomme de terre :

H ₂ O	19,8
Azote	0,05
Matières minérales	0,29
Lipides	0,04
Amidon	99,0
Amylose	22,2

Les déterminations de la teneur en eau, de l'azote et des matières minérales sont effectuées selon les techniques décrites dans "les méthodes analytiques des céréales, farines et produits dérivés" CNRS - 1958.

Le dosage des lipides est effectué selon la méthode de SCHOCH (1942).

La teneur en amylose a été déterminée par la méthode ampèrométrique de LARSON *et al.* (1953), sachant que 100 mg d'amylose complexe 19,5 mg d'iode.

2 - ANALYSE QUANTITATIVE DU FRACTIONNEMENT

L'amidon de pomme de terre a été fractionné selon la méthode indiquée au § 2.0 chapitre Matériels et Méthodes, conduisant aux diverses fractions : précipité

d'amidon, complexe amylose-thymol, complexe amylose-butanol, fractions amylopectine et matériel intermédiaire, complexes amylose-butanol recristallisés; le complexe amylose-butanol obtenu au cours de la 5ème recristallisation étant "l'amylose".

Ces fractions ont été dosées selon les méthodes indiquées au § 2.1.5 - Ch. Matériel et Méthodes .

La teneur en amidon des gels est obtenue en dispersant environ 100 mg de gel (masse exacte M) dans 1 ml de KOH N. La solution portée à 10 ml par addition d'eau est dosée par la méthode à l'antrone (cf. § 2.2.2.1 - Ch. Matériel et Méthodes). C étant la concentration en amidon de cette solution, la teneur en amidon du gel considéré est calculée ainsi :

$$T = \frac{C \times 10}{M} \quad \text{où} \quad \begin{array}{l} M \text{ est en mg} \\ C \text{ en mg/ml} \end{array}$$

Les divers surnageants contenant les fractions "amylopectine" et "matériel intermédiaire" ont été analysés, éventuellement après dilution, par la méthode à l'antrone.

Le pourcentage d'amidon total que représente chaque produit obtenu au cours du fractionnement a également été calculé. Soit M' la masse d'amidon fractionné (exprimée en g de substance sèche).

- Soit Q la masse en g du gel obtenu,

T la teneur du gel calculée comme indiqué ci-dessus.

Le gel représente $\frac{Q \times T}{M'}$ pour cent de l'amidon initial.

- Soit V le volume en ml du surnageant obtenu,

C' la concentration du surnageant en mg/ml.

Le surnageant représente $\frac{V \times C'}{M'}$ pour cent de l'amidon initial.

Le fractionnement, pour être quantitatif, exige une bonne qualité de manipulation. 3 fractionnements ont été effectués au cours desquels une certaine maîtrise du procédé a été acquise. C'est pourquoi le 3ème s'est avéré le plus satisfaisant du point de vue quantitatif tant au niveau des rendements par étape que du rendement global. Ce sont les résultats relatifs au 3ème fractionnement que nous rapportons ici.

15,0658 g, soit 12,0816 g en substance sèche d'amidon, ont été fractionnés. Le schéma du fractionnement est représenté sur la fig. 16. La quantité obtenue pour chaque fraction (en g pour les gels, en ml pour les surnageants) y a été indiquée ainsi que la quantité d'amidon qu'elle représente.

Dans le tableau 11 ont été rassemblés les résultats relatifs à l'analyse quan-

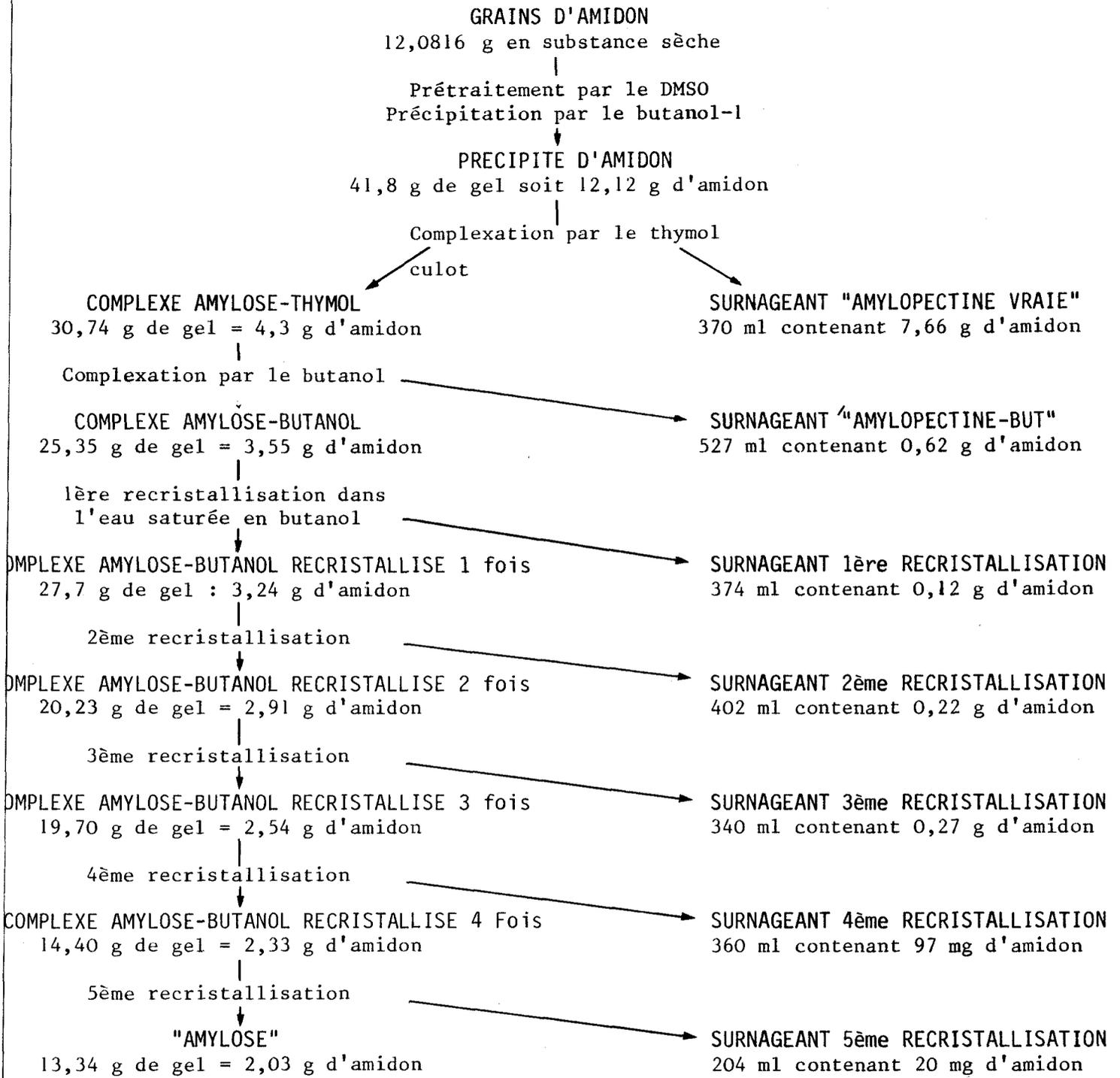


Fig. 16 - Schéma du fractionnement de l'amidon de pomme de terre

TABLEAU 11

ANALYSE QUANTITATIVE DU FRACTIONNEMENT CHIMIQUE DE L'AMIDON DE POMME DE TERRE

Fractions	Teneur en amidon		Quantité d'amidon g	Quantité d'amidon
	Gel %	Surnageant mg/ml		Amidon initial(1) %
Précipité d'amidon	29,0		12,12	100,3
Complexe Amylose-Thymol	14,2		4,36	36,1
Surnageant "Amylopectine-Vraie"		20,70	7,66	63,4
Complexe Amylose-Butanol	14,0		3,55	29,4
Surnageant "Amylopectine-But"		1,18	0,62	5,2
Complexe Amylose-Butanol Recristallisé 1 fois	11,7		3,24	26,8
Surnageant 1ère recristallisation		0,45	0,12	1,4
Complexe Amylose-Butanol Recristallisé 2 fois	14,4		2,91	24,2
Surnageant 2ème recristallisation		0,54	0,22	1,8
Complexe Amylose-Butanol Recristallisé 3 fois	12,9		2,54	21,0
Surnageant 3ème recristallisation		0,82	0,27	2,3
Complexe Amylose-Butanol Recristallisé 4 fois	15,5		2,23	18,5
Surnageant 4ème recristallisation		0,27	0,10	0,8
Complexe Amylose-Butanol Recristallisé 5 fois	15,2		2,23	16,8
Surnageant 5ème recristallisation		0,09	0,02	0,15

(1) L'amidon initial étant exprimé en matière sèche soit 12,0816 g.



titative du fractionnement. Pour chaque fraction ont été indiquées la teneur en amidon, la quantité d'amidon contenue dans cette fraction et la proportion de l'amidon initial qu'elle représente.

Le procédé conduit aux fractions amylopectine, matériel intermédiaire et amylose correspondant respectivement à 68,6 % , 6,5 % et 16,8 % de l'amidon initial. Le rendement du fractionnement est donc de 92 %.

Remarquons que le taux d'amylose obtenue après fractionnement chimique (16,8 %) est inférieur à la teneur apparente en amylose (22,2%) déterminée sur l'amidon par la méthode ampèrométrique.

3 - CARACTERISATION DES FRACTIONS OBTENUES AU COURS DU FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE DE PERMEATION SUR GEL DE SEPHAROSE 2B-CL

La chromatographie de perméation sur gel permettant de contrôler l'homogénéité macromoléculaire d'un composé, l'évolution du fractionnement a été suivie en déterminant les profils d'élution des produits obtenus à chaque étape sur une colonne de gel de Sépharose 2B-CL.

La colonne a d'abord été calibrée, les divers échantillons ont ensuite été étudiés.

3.1 - PROCEDE UTILISE POUR CHAQUE CHROMATOGRAPHIE

* Préparation de la solution injectée

Le fractionnement de chaque produit a nécessité la préparation selon la méthode indiquée au § 2.1.5 de 5 ml d'une solution de concentration comprise entre 2 et 5 mg/ml en KOH 0,1N. La concentration exacte est déterminée par un dosage à l'anthrone (cf. § 2.2.2.1 Ch. Matériel et Méthodes).

* Détermination du profil d'élution (cf. Travaux Antérieurs § 3.4.1)

V ml de la solution préparée comme indiqué ci-dessus sont injectés sur la colonne. Les fractions collectées sont dosées par la méthode à l'anthrone ou à l'orcinol et le profil d'élution est établi selon la méthode décrite au § 2.3.1. Pour faciliter leurs comparaisons, les profils ne seront pas établis en fonction du volume d'élution V_e qui dépend de la taille de la colonne, de la hauteur du gel... Nous introduisons le coefficient $K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$ qui est indépendant de ces paramètres et permettra de comparer plus aisément la position des pics de plusieurs profils

* Identification des pics

Lorsque les fractions collectées seront suffisamment concentrées, un spectre à l'iode pourra être effectué selon la méthode indiquée au Ch. Matériel et Méthodes § 2.3.2 pour identifier la nature du matériel élué.

* Détermination du rendement de la colonne et de la fraction de glucides élués à un K_{av} donné.

Soit [C] la concentration de la solution injectée en mg/ml

V le volume injecté en ml

Q la quantité totale de glucides récupérés en mg.

le rendement de la colonne est :
$$\frac{Q}{[C] \times V}$$

Le profil d'élution étant établi, la fraction en poids de macromolécules éluées au volume V_e est égale au rapport de l'aire du pic situé au V_e à l'aire totale de la courbe.

3.2 - CALIBRAGE DE LA COLONNE

Le calibrage de la colonne a été effectué par la détermination d'une part des V_o et V_t , d'autre part des K_{av} de 2 amyloses référencées.

3.2.1 - Détermination des V_o et V_t

Le volume d'exclusion V_o et le volume total V_t de la colonne ont été déterminés par injection d'une solution de glucose et d'amidon de maïs cireux.

* Préparation de la solution : 5 mg d'amidon de maïs cireux (soit 4,3 mg en substance sèche) ont été dispersés à 4°C sous agitation magnétique dans 0,5 ml de KOH N. 8,5 mg de glucose et 4,5 ml d'eau distillée sont ajoutés conduisant à une solution en KOH 0,1N dont la concentration déterminée par un dosage à l'antrone est 2,62 mg/ml exprimée en glucose.

* Profil d'élution : 2,5 ml de la solution de glucose et d'amidon de maïs cireux sont injectés sur la colonne. Après dosage des fractions collectées, le profil d'élution obtenu (fig. 17) présente 2 pics. L'un situé à 95 ml soit au volume d'exclusion V_o : la masse moléculaire des particules éluées à ce niveau est selon le fournisseur Pharmacia $2 \cdot 10^7$, il s'agit donc bien de l'amylopectine. Le second pic, correspondant au glucose, est à 258 ml et correspond au volume total de la colonne.

* Rendement : la quantité de glucides totaux récupérés étant 6,45 mg, le rendement de la colonne est 98,5 %. La quantité de glucose récupéré (fractions éluées entre 0,78 et 1,4) est 4,078 mg soit 96 % de la masse de glucose pesé et 63,2 % de

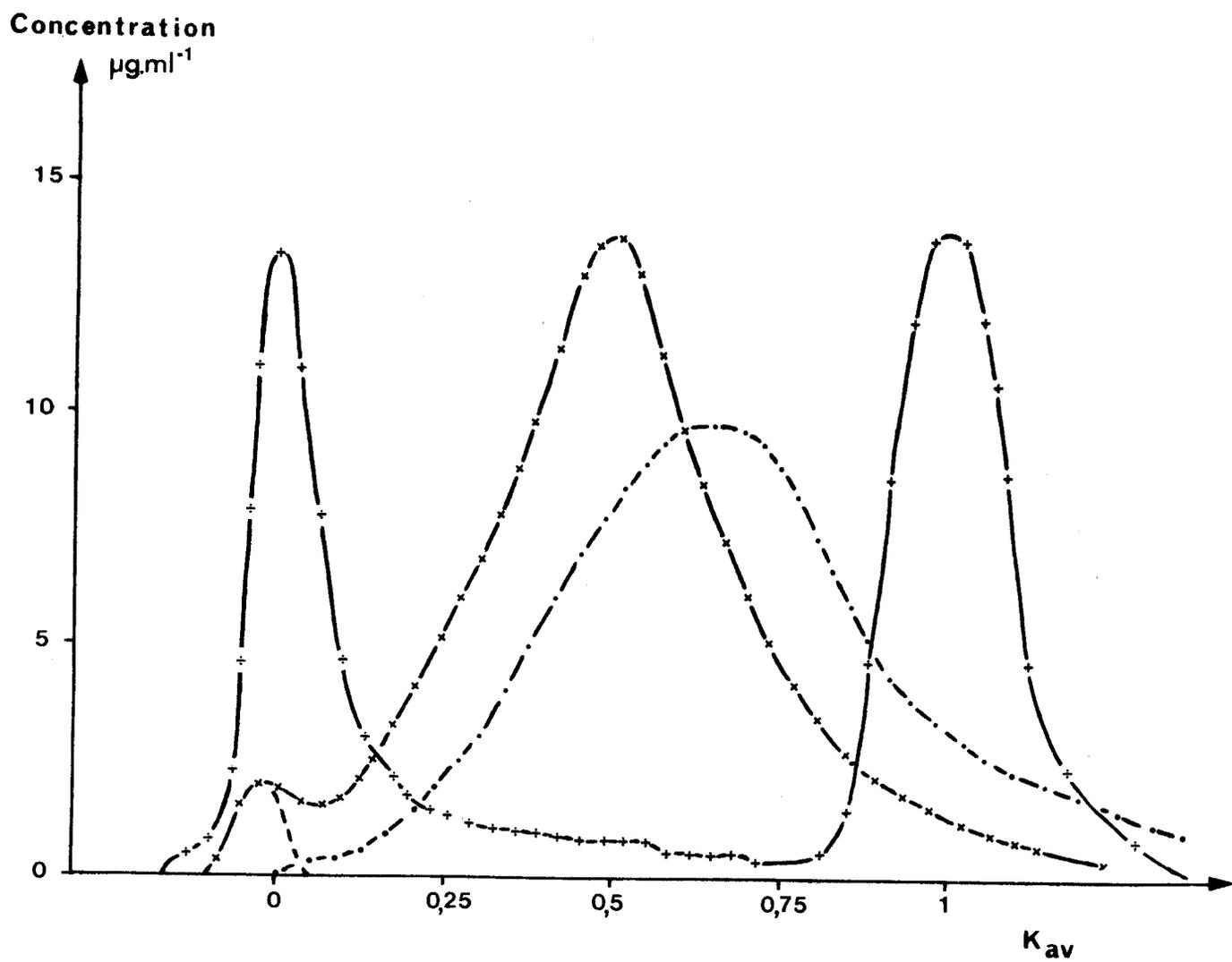


Fig. 17 - Diagrammes d'élution sur Sépharose 2B-CL

. d'une solution de glucose et de maïs cireux (+-+--+)

. de l'amylose Avebe (*-x---*)

. de l'amylose Hayashibara (·-·-·-·)



la quantité totale de glucides récupérés. Les 36,8 % complémentaires correspondent donc à l'amidon de maïs cireux : 30 % (obtenus en faisant le rapport de l'aire du 1^{er} pic à l'aire de la courbe totale) sont élués au 1^{er} pic.

3.2.2 - Détermination des K_{av} de 2 amyloses industrielles

Les profils d'éluion de l'amylose Avebe et de l'amylose Hayashibara ont été déterminés.

* L'amylose Avebe

Préparation de la solution : 12,2 mg d'amylose, soit 11,25 mg en substance sèche, sont dispersés à 4°C sous agitation magnétique dans 0,5 ml de KOH N. 4,5 ml d'eau distillée sont ajoutés conduisant à une solution en KOH 0,1N dont la concentration déterminée par dosage à l'antrone est 2,435 mg/ml en équivalent glucose.

Détermination du K_{av}

3,5 ml de la solution d'amylose sont injectés sur la colonne. 8,719 mg de glucides sont récupérés d'où le rendement de la colonne 102 %.

Le profil d'éluion obtenu (fig. 17) présente 2 pics.

Le 1^{er} pic, de surface très faible, est situé au V_0 ($K_{av} = 0$).

Le 2nd pic est à $K_{av} = 0,495$.

Un spectre à l'iode ne peut être effectué sur les fractions éluées au 1^{er} pic car elles ne sont pas suffisamment concentrées. Le spectre à l'iode effectué sur 2 ml de la fraction éluée à $K_{av} = 0,495$ conduit à un λ_{max} de 620 nm, qui selon la littérature correspond à l'amylose.

Le 1^{er} pic situé au volume d'exclusion du gel correspond probablement à une fraction amylopectine contaminant l'amylose. La proportion de cette fraction obtenue en faisant le rapport de l'aire du 1^{er} pic (cf. Fig. 17) à l'aire de la courbe totale est égale à 3 %.

* L'amylose Hayashibara

Préparation de la solution : 12,65 mg d'amylose soit 11,67 mg en substance sèche sont dispersés par agitation au Vortex à température ambiante dans 0,5 ml de KOH N. 4,5 ml d'eau distillée sont ajoutés conduisant à une solution en KOH 0,1N de concentration déterminée par dosage à l'antrone 2,566 mg/ml.

Détermination du K_{av}

3 ml de la solution d'amylose sont injectés sur la colonne. 7,588 mg de glucides sont récupérés d'où le rendement de la colonne 98,5 %.

Le profil d'éluion obtenu (fig. 17) présente un maximum à $K_{av} = 0,65$.

3.2.3 - Influence sur le profil d'élution de la masse de glucides injectés sur la colonne

Pour que la chromatographie soit effectuée dans les meilleures conditions possibles, le volume de l'échantillon doit être inférieur, d'après Pharmacia, à 5 % du volume du gel soit ici 12 ml.

L'influence sur le profil d'élution de la masse de glucides déposés sur la colonne a été étudiée en injectant 3,5 ml de solution d'amylose Avebe de concentrations différentes.

Nous avons déposé sur la colonne 5,2 - 8,72 - 11,12 - 14,27 - 22,35 mg d'amylose Avebe. Les solutions ont été préparées comme indiqué dans le paragraphe précédent. Les rendements obtenus sont compris entre 96 et 102 %. Les profils sont représentés sur la figure 18.

Remarquons que, au-dessus de 8,7 mg, le second pic correspondant à l'amylose (cf. § 3.2.2) est déplacé dans le sens des K_{av} croissants quand la masse de produit injecté augmente (cf. Tableau 12). Pour comparer les profils d'élution de 2 échantillons, il faudra donc veiller à injecter les mêmes quantités sur la colonne.

3.3 - CHROMATOGRAPHIE DE PERMEATION SUR GEL DE SEPHAROSE 2B-CL DES PRODUITS OBTENUS AU COURS DU FRACTIONNEMENT DE L'AMIDON DE POMME DE TERRE

L'évolution du fractionnement de l'amidon a été suivie en déterminant à chaque étape les profils d'élution des fractions obtenues et en les comparant à celui de l'amidon de pomme de terre.

Pour chaque échantillon, nous avons procédé comme indiqué au paragraphe 3.1. Dans le tableau 13, figurent la quantité de produit dispersé par ml de solution injectée, la concentration de la solution injectée, la masse de glucides injectés et le rendement de la colonne.

Les rendements sont compris entre 93 et 106 %. Ceci s'explique par le manque de précision du dosage à l'antrone pour les faibles concentrations.

3.3.1 - Chromatographie de l'amidon de pomme de terre natif

Le profil obtenu (fig. 19) présente un pic important à $K_{av} = 0$ suivi d'une longue trainée. La fraction d'amidon élué au volume d'exclusion du gel est l'amylopectine (cf. § 3.2.1). L'allure du profil ne permet pas d'évaluer précisément la proportion de cette fraction.

3.3.2 - Chromatographie des complexes de l'amylose

* Complexe amylose-thymol

Le profil d'élution du complexe amylose-thymol (fig. 19) présente 2 pics. Pour

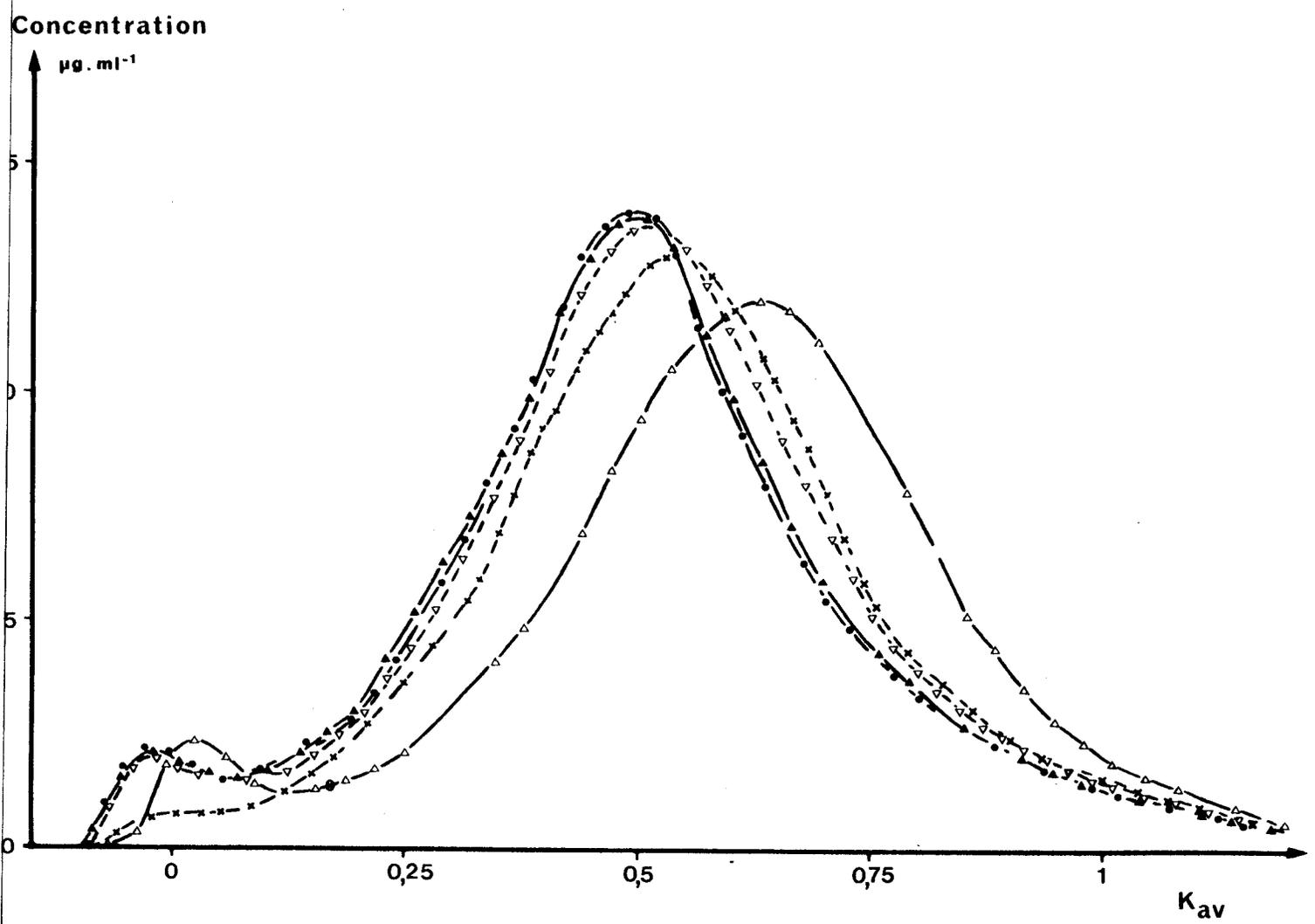


Fig. 18 - Diagrammes d'élution sur Sépharose 2B-CL de solutions contenant différentes quantités d'amylose Avebe :
 5 mg (●—●—●) ; 8,7 mg (▲—▲—▲) ; 11 mg (▽—▽—▽) ;
 14 mg (×—×—×) ; 22 mg (△—△—△).

TABLEAU 12

INFLUENCE DE LA MASSE DE GLUCIDES DEPOSES SUR SEPHAROSE 2B-CL
SUR LA POSITION DU 2nd PIC DU PROFIL D'ELUTION DE L'AMYLOSE AVEBE

Masse de glucides injectés mg	K_{av} du pic d'amylose	Rendement du fractionnement %
5,20	0,495	96
8,72	0,495	102
11,12	0,510	98
14,27	0,540	99
22,35	0,625	99



TABLEAU 13

ANALYSE QUANTITATIVE DES FRACTIONNEMENTS SUR SEPHAROSE 2B CL DES PRODUITS OBTENUS

Echantillons	[c] mg/ml exprimé en glucose	volume injecté ml	Quantité de glucides injectés mg	Quantité de glucides récupérés mg	rendement %
Amidon de pomme de terre	2,352	3	7,056	6,902	97,8
Complexe Amylose-Thymol	3,195	3	9,586	9,203	96,0
Complexe Amylose-Butanol	2,937	3	8,811	8,700	98,0
Complexe Amylose-Butanol Recristallisé 1 fois	3,170	3	9,510	9,400	99,0
Complexe Amylose-Butanol Recristallisé 2 fois	1,862	6	11,172	11,489	108,0
Complexe Amylose-Butanol Recristallisé 3 fois	3,647	3	10,941	11,045	101,0
Complexe Amylose-Butanol Recristallisé 4 fois	4,487	3	13,500	14,325	106,0
"Amylose"	3,978	3	11,936	11,478	96,2
"Amylopectine-Vraie"	4,918	1,5	7,377	7,495	103,0
"Amylopectine-But"	3,56	2,5	8,900	8,310	93,4
Surnageant 1ère recristallisation	2,133	3	6,400	6,336	99,0
Surnageant 2ème recristallisation	3,200	3	9,600	9,513	99,0
Surnageant 3ème recristallisation	2,900	3	8,700	8,679	99,8

BUS
JILLE

Concentration
 $\mu\text{g. ml}^{-1}$

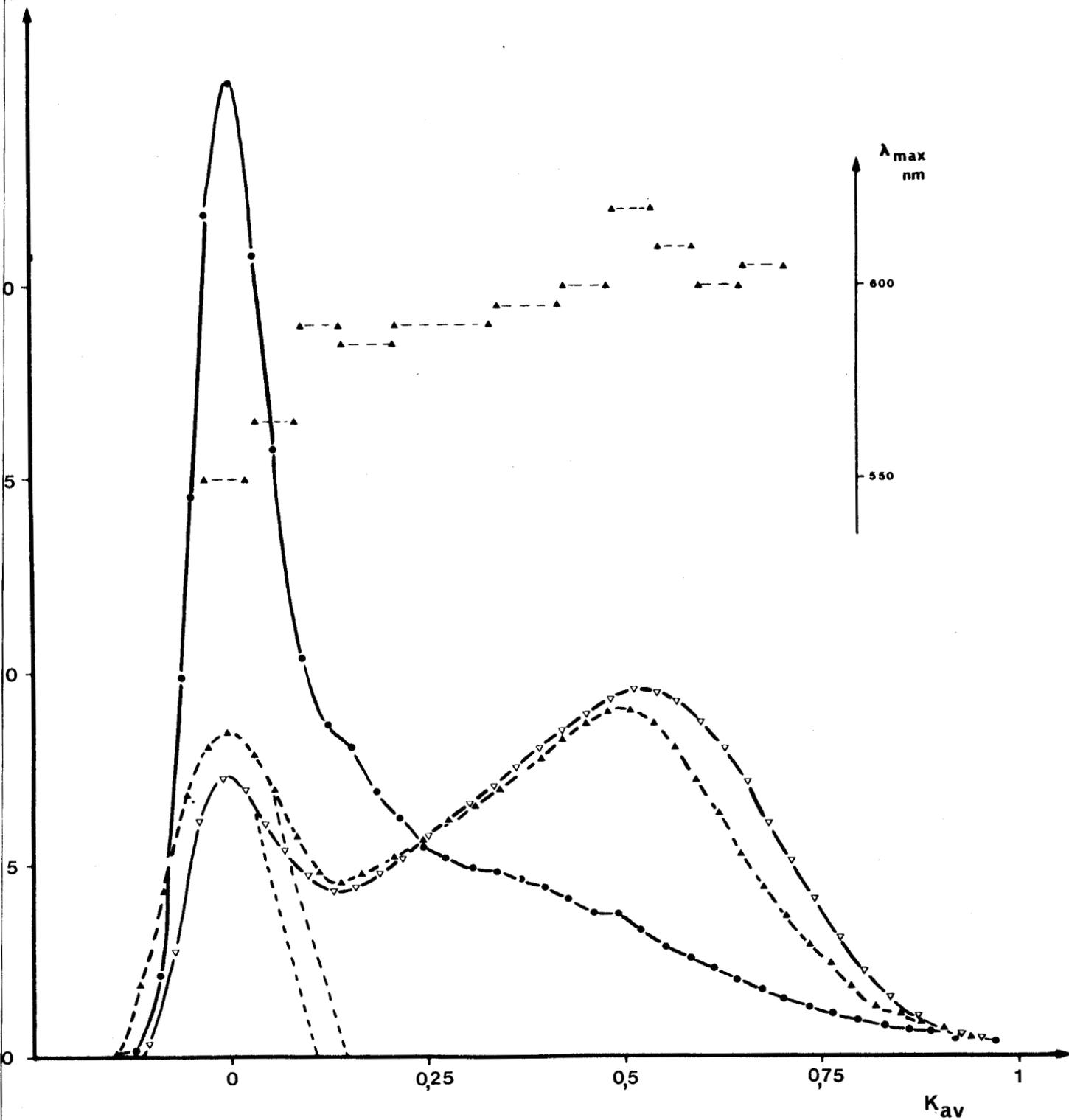


Fig. 19 - Diagrammes d'élution sur Sépharose 2B-CL

. de l'amidon de pomme de terre ROHAN (●—●—●)
. du complexe amylose-thymol (▲—▲—▲) } obtenus au
. du complexe amylose-butanol (▽—▽—▽) }
cours du fractionnement chimique de l'amidon de pomme de
terre.



les identifier, des spectres à l'iode ont été effectués sur les fractions de concentration suffisante. Le maximum d'absorption du spectre λ_{\max} est égal à 550 nm à $K_{av} = 0$, puis augmente progressivement jusqu'à 620 nm à $K_{av} = 0,5$ et décroît ensuite (cf. fig. 18). Le 1er pic correspond donc à une fraction amylopectine contaminant la fraction "amylose" éluée au 2nd pic. La proportion d'amylopectine obtenue en faisant le rapport de l'aire du 1er pic (fig. 19) à l'aire de la courbe totale est égale à 25 %.

* Complexe amylose-butanol

Après dispersion du complexe amylose-thymol et complexation au butanol, "l'amylose", comme le montre le profil d'élution (fig. 19) est encore fortement contaminée par l'amylopectine. L'aire du 1er pic (fig. 19) représente en effet 15,7 % de l'aire de la courbe totale.

Il est donc indispensable de recrystalliser.

* Complexes amylose-butanol recrystallisés

Les profils d'élution des complexes amylose-butanol recrystallisés ont été portés sur la figure 20 ainsi que l'évolution pour chaque complexe du λ_{\max} en fonction de K_{av} (pour les complexes obtenus au cours des 2 dernières recrystallisations, les fractions collectées à $K_{av} = 0$ sont trop peu concentrées pour permettre d'effectuer un spectre à l'iode).

La figure 20 montre que la fraction amylopectine (1^{er} pic) contaminant l'amylose (2^{ème} pic) diminue progressivement au cours des recrystallisations pour disparaître totalement lors de la 5ème.

Après la 1^{ère} recrystallisation, la fraction amylopectine représente 11,2 % du mélange.

Elle est de 5,3 % pour le complexe amylose-butanol recrystallisé 2 fois.

Les 2 profils suivants ne présentent plus qu'un épaulement et "l'amylose" finale obtenue après 5 recrystallisations ne présente qu'un pic.

Remarquons également qu'au cours des recrystallisations, le pic d'amylose est déplacé vers les K_{av} croissants (cf. Tableau 14). Signalons que ce décalage ne provient pas de la différence de quantités injectées sur la colonne puisque, excepté pour le complexe amylose-butanol recrystallisé 4 fois, les masses de glucides déposées varient entre 9,4 et 11,5 mg (Tableau 13), zone où il a été montré (Tableau 12) que le K_{av} des pics varie de 0,02. Ce décalage des pics est peut-être le signe d'une dégradation survenant au cours du fractionnement. Nous étudierons ceci plus en détail à la fin de ce chapitre.

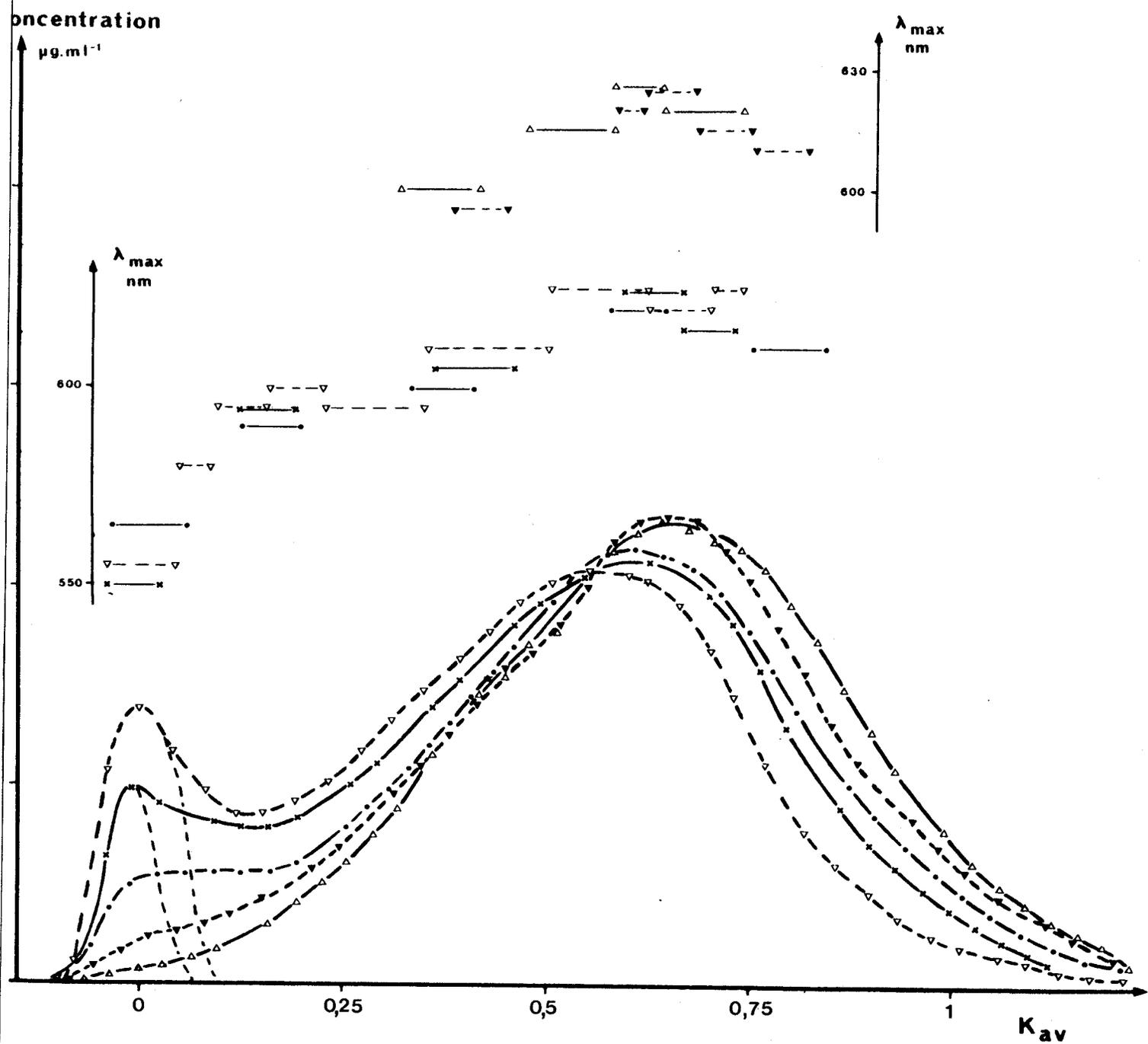


Fig. 20 - Diagrammes d'élution sur Sépharose 2B-CL des complexes amylose-butanol recristallisés et de l'amylose obtenus au cours du fractionnement chimique de l'amidon de pomme de terre.

- complexe amylose-butanol recristallisé 1 fois (▽-▽-▽)
- " " " " 2 " (x-x-x)
- " " " " 3 " (•-•-•)
- " " " " 4 " (▼-▼-▼)
- amylose (Δ-Δ-Δ)



TABLEAU 14

VARIATION DU K_{av} DU PIC D'AMYLOSE DU
 COMPLEXE AMYLOSE-BUTANOL AU COURS
 DES RECRISTALLISATIONS

N° de recristallisation	K_{av}
1	0,56
2	0,60
3	0,61
4	0,65
5	0,66



3.3.3 - Chromatographie des fractions amylopectine

Les profils d'élution obtenus à partir de "Amylopectine-vraie" et "Amylopectine-but" sont portés sur la fig. 21. La variation de λ_{\max} en fonction de K_{av} a également été étudiée. Les 2 profils présentent un pic important au volume d'exclusion du gel suivi d'une longue trainée. La variation de λ_{\max} en fonction de K_{av} a également été étudiée. Les 2 profils présentent un pic important au volume d'exclusion du gel suivi d'une longue trainée. Le λ_{\max} au sommet des pics est de l'ordre de 550 nm, ce qui correspond bien à l'amylopectine. Les 2 profils sont quasiment superposables.

3.3.4 - Chromatographie des fractions de matériel intermédiaire

Les chromatographies des surnageants des 1ère, 2ème et 3ème recrystallisations ont été réalisées. Les profils d'élution sont présentés sur la figure 22 ainsi que les λ_{\max} des spectres à l'iode effectués sur les fractions les plus intéressantes (le λ_{\max} n'a pu être déterminé pour les fractions éluées à $K_{av} = 0$ dans le cas du surnageant de la 3ème recrystallisation car ces fractions ne sont pas suffisamment concentrées).

Les profils d'élution présentent tous 2 pics. Le 1er situé à $K_{av} = 0$ et dont λ_{\max} est égal à 550 et 555 nm correspond à une fraction amylopectine dont la proportion dans le mélange diminue au cours des recrystallisations.

Ce 1^{er} pic (cf. fig. 22) représente :

- 7 % de la courbe totale dans le cas du surnageant de la 1^{ère} recrystallisation,
- 5,4 % dans le cas de surnageant de la 2^{ème} recrystallisation,
- 2,7 % dans le cas de surnageant de la 3^{ème} recrystallisation.

Le second pic est déplacé vers les K_{av} croissants lorsque le nombre de recrystallisations augmente. Il se situe successivement à 0,565, 0,59 et 0,605. Le λ_{\max} au sommet du pic varie de 615 à 625, ces fractions sont donc en partie constituées d'amylose. Cependant, le λ_{\max} reste faible tout le long du profil surtout dans le cas du surnageant de la 1ère recrystallisation. Donc ces fractions sont également constituées d'une quantité non négligeable d'amylopectine de bas poids moléculaire.

4 - CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES PRODUITS DU FRACTIONNEMENT DE L'AMIDON DE POMME DE TERRE ET DES 2 AMYLOSES INDUSTRIELLES

Tous les produits obtenus au cours du fractionnement chimique de l'amidon - précipité d'amidon, complexes de l'amylose, fractions amylopectine et matériel

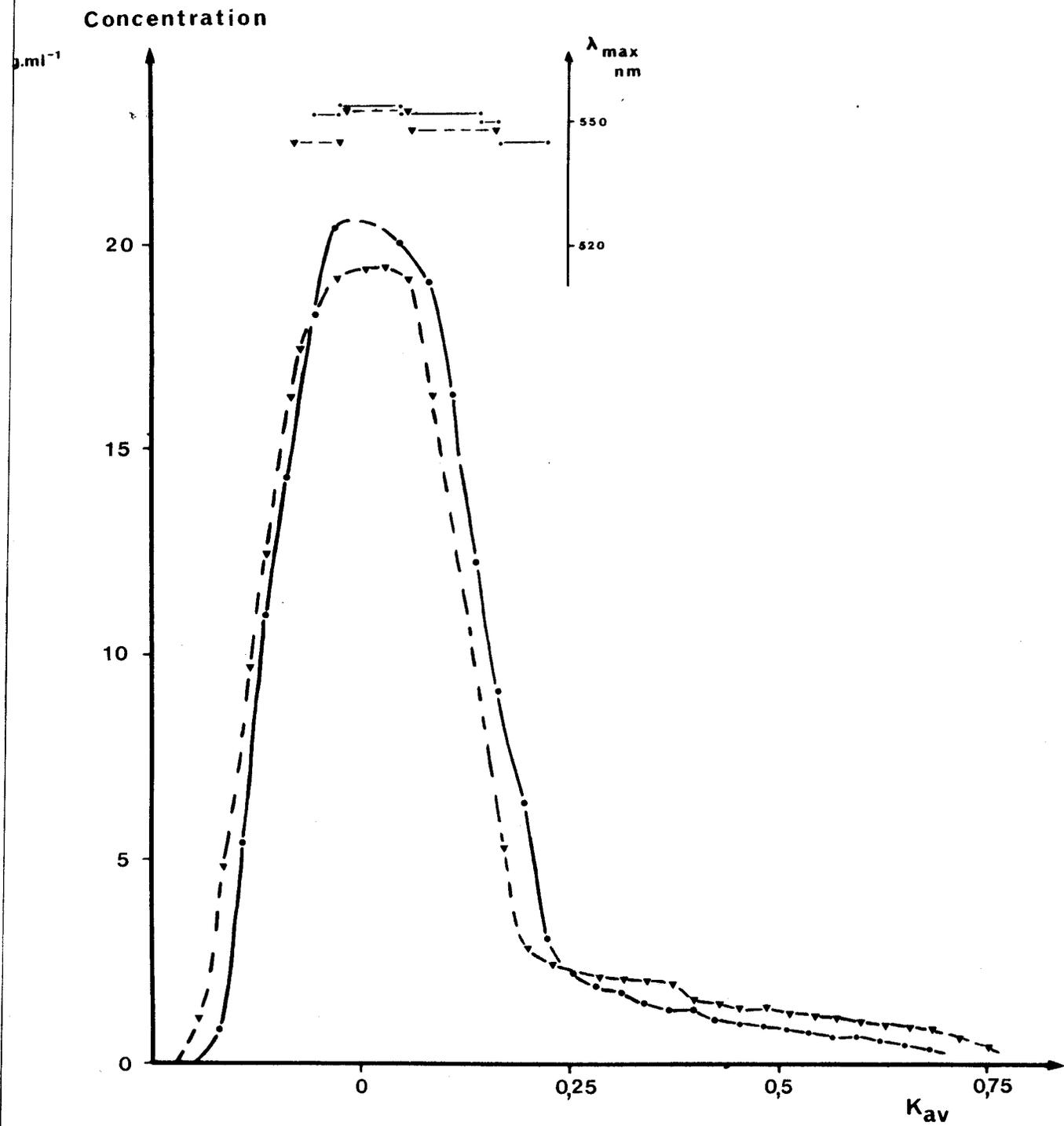


Fig. 21 - Diagrammes d'élution sur Sépharose 2B-CL des fractions amylopectine obtenues au cours du fractionnement chimique de l'amidon de pomme de terre.

. fraction "amylopectine-vraie" (●—●—●)

. fraction "amylopectine-but" (▼—▼—▼)



concentration

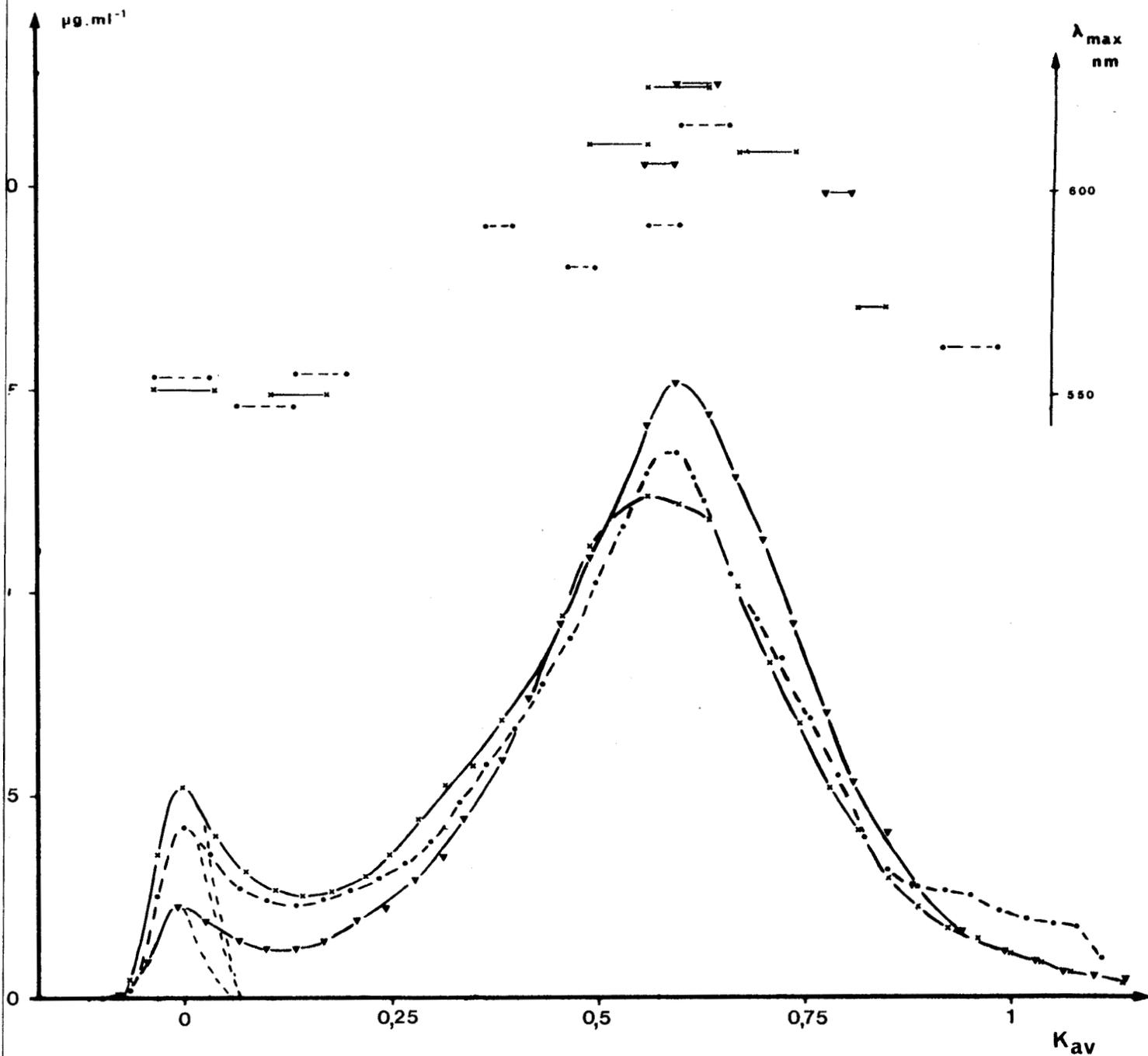


Fig. 22 - Diagrammes d'élution sur Sépharose 2B-CL, des différentes fractions de matériel intermédiaire obtenues au cours du fractionnement chimique de l'amidon de pomme de terre.

. fraction contenue dans le surnageant de la 1ère recristallisation (x-x-x)

. fraction contenue dans le surnageant de la 2ème recristallisation (•-•-•)

. fraction contenue dans le surnageant de la 3ème recristallisation (▼-▼-▼)



intermédiaire - ont été caractérisés par :

- le maximum du spectre d'absorption du complexe formé avec l'iode : λ_{\max}
- la capacité de liaison à l'iode : CLI
- la viscosité intrinsèque $[\eta]$

Ces caractéristiques ont également été déterminées pour l'amylose Avebe et l'amylose Hayashibara.

4.1 - DETERMINATION DU MAXIMUM DES SPECTRES D'ABSORPTION DES COMPLEXES FORMES AVEC L'IODE : λ_{\max}

Pour chaque échantillon, une solution à 100 $\mu\text{g/ml}$ en KOH 0,1N a été préparée. 2 ml sont prélevés pour réaliser les spectres en milieu KCl 0,08 M (cf. Matériel et Méthodes § 2.3.2). Les valeurs des λ_{\max} obtenus pour les divers produits du fractionnement et les 2 amyloses industrielles sont rassemblées dans le tableau 15. Les spectres ayant la même allure, seuls sont représentés sur la figure 23, ceux de l'amylose Avebe, l'amidon de pomme de terre et ceux des fractions amylose et amylopectine obtenues au cours du fractionnement.

Remarquons la très nette évolution du λ_{\max} des fractions obtenues au cours du fractionnement : de 590 nm pour l'amidon de pomme de terre à 625 nm pour "l'amylose" finale.

4.2 - DETERMINATION DES CAPACITES DE LIAISON A L'IODE (CLI) DES AMYLOSES INDUSTRIELLES ET DES PRODUITS DU FRACTIONNEMENT DE L'AMIDON DE POMME DE TERRE

Les CLI ont été déterminées à partir de solutions à 1 mg/ml pour les amyloses, les complexes de l'amylose et à 5 mg/ml pour les fractions amylopectine, selon la méthode indiquée au Ch. Mat. et Méthodes §2.3.2. L'allure des courbes étant semblable pour les différentes fractions étudiées, seules les courbes relatives à l'amidon et aux fractions amylose et amylopectine sont représentées (Fig.24). Les valeurs obtenues pour chaque dosage ont été rapportées dans le tableau 16. Notons l'augmentation de la CLI de 14,8 % pour le complexe amylose-thymol à 19,5 % pour "l'amylose" finale, qui montre bien l'évolution de la purification de l'amylose.

4.3 - DETERMINATION DES CARACTERISTIQUES VISCOSIMETRIQUES DES AMYLOSES INDUSTRIELLES ET DES FRACTIONS OBTENUES AU COURS DU FRACTIONNEMENT DE L'AMIDON DE POMME DE TERRE

Des mesures de viscosité ont été effectuées selon la méthode indiquée au chapitre Matériel et Méthodes § 2.3.4 sur, d'une part les amyloses industrielles, d'autre part le précipité d'amidon, les complexes de l'amylose, le matériel intermédiaire et les fractions amylopectine obtenus au cours du fractionnement de l'amidon.

TABLEAU 15

VALEURS DU MAXIMUM DES SPECTRES D'ABSORPTION DES COMPLEXES
DES AMYLOSES INDUSTRIELLES ET DES PRODUITS DU FRACTIONNEMENT
DE L'AMIDON DE POMME DE TERRE FORMES AVEC L'IODE

Echantillons	λ_{max} nm
Amidon précipité par le butanol	590
Complexe amylose-thymol	610
Complexe amylose-butanol	615
"Amylose"	625
"Amylopectine-Vraie"	555
"Amylopectine-But"	555
Amylose Avebe	625
Amylose Hayashibara	600



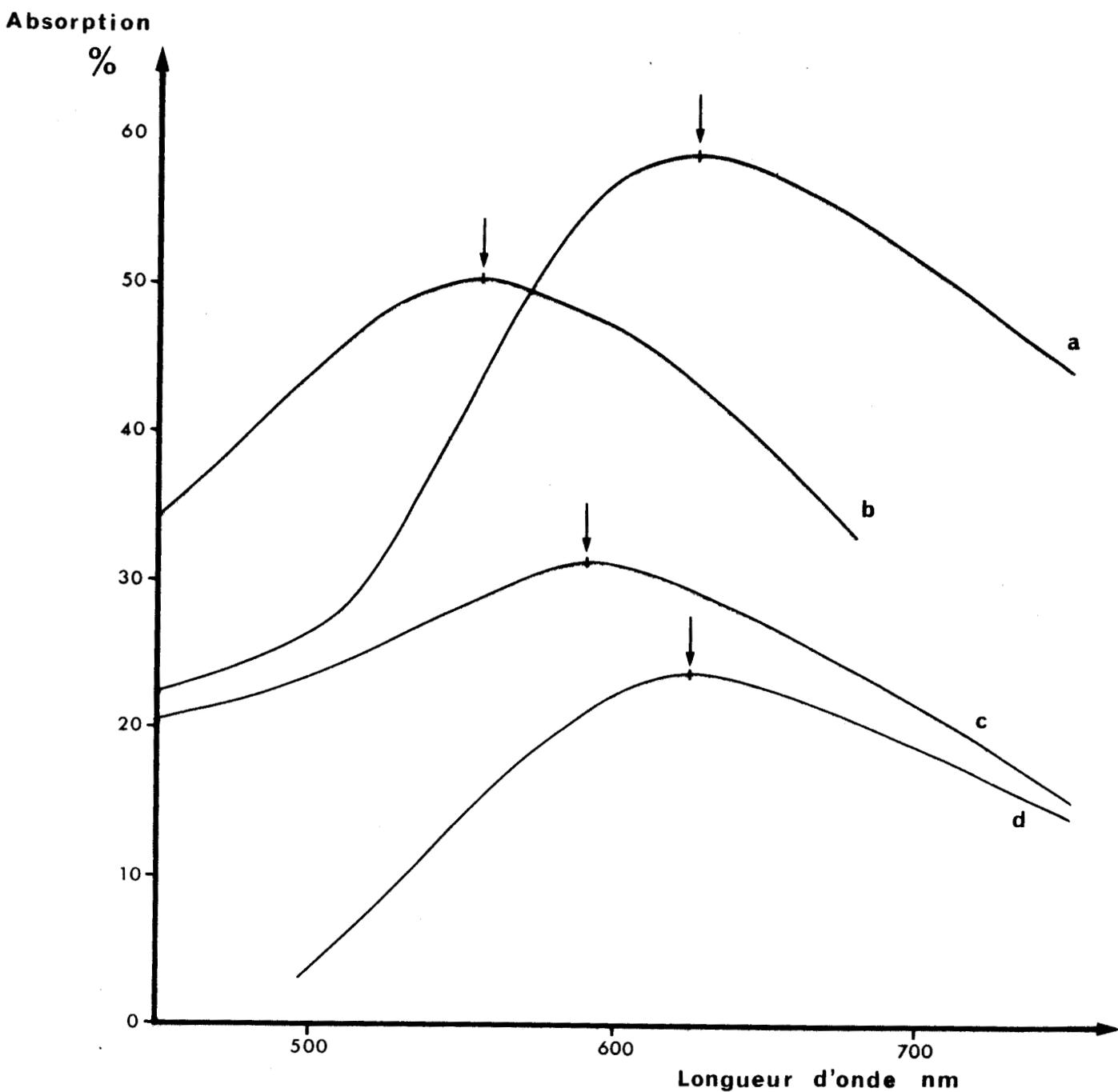


Fig. 23 - Spectres d'absorption des complexes avec l'iode de :

- a - l'amylose Avebe.
- b - la fraction "amylopectine-but" obtenue au cours du fractionnement chimique de l'amidon de pomme de terre.
- c - l'amidon de pomme de terre.
- d - "l'amylose" obtenue par fractionnement chimique de l'amidon de pomme de terre.

BUS
LILLE

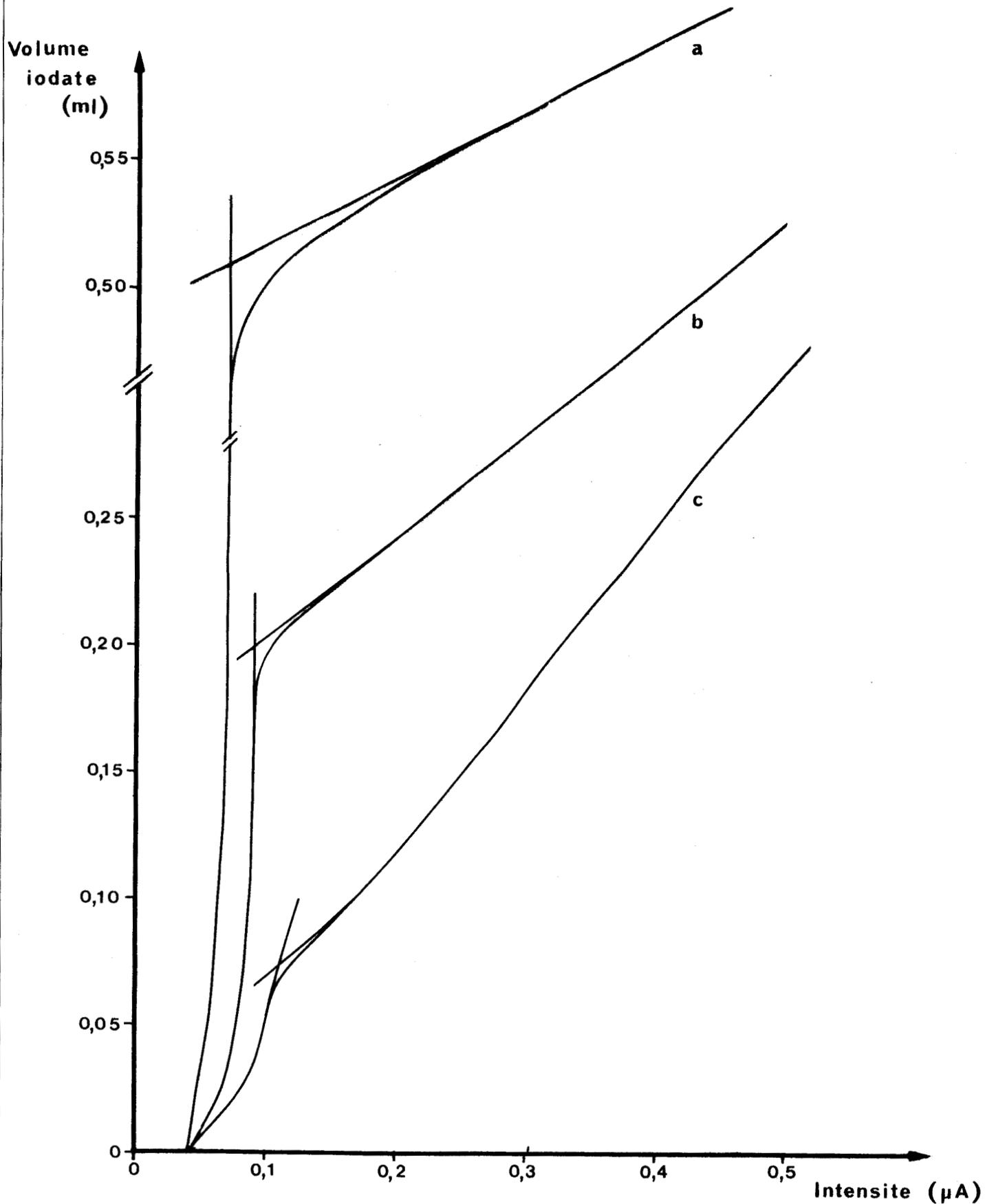


Fig. 24 - Courbes ampérométriques de :

- a - l'amylose obtenue par fractionnement chimique de l'amidon de pomme de terre.
- b - l'amidon de pomme de terre natif.
- c - la fraction "amylopectine-but".



TABLEAU 16

CAPACITES DE LIAISON A L'IODE DES AMYLOSES INDUSTRIELLES ET DES FRACTIONS
OBTENUES AU COURS DU FRACTIONNEMENT DE L'AMIDON DE POMME DE TERRE

Fractions	Volume de K IO ₃ ml	Volume du blanc ml	ΔV	[c] mg/ml en amidon	CLI %	CLI moyen %
Amidon de pomme de terre	0,200	0,02	0,180	2,635	4,33	4,33
Complexe amylose-thymol	0,1871 "	0,022 0,024	0,165 0,163	0,702	14,9 14,7	14,8
Complexe amylose-butanol	0,310 0,312	0,015 0,016	0,295 0,296	1,130	16,55 16,6	16,57
"Amylopectine-Vraie"	0,064 "	0,020 "	0,044 "	5,147 "	0,54 "	0,54
"Amylopectine-But"	0,072 0,074	0,018 0,020	0,054 0,054	4,542	0,75	0,75
"Amylose"	0,510 0,510	0,024 0,020	0,486 0,490	1,584	19,45 19,6	19,52
Amylose Avebe	0,337 0,337	0,026 0,027	0,311 0,310	1,005	19,62 19,56	19,59
Amylose Hayashibara	0,152 0,152	0,034 0,031	0,118 0,121	0,7815	9,57 9,82	9,69



de pomme de terre. L'amidon natif a également été étudié afin de vérifier qu'il n'a subi aucune dégradation au cours du prétraitement au DMSO et de la précipitation par le butanol.

Pour chaque échantillon, on étudie la variation de $\eta_{sp} = \frac{t_c - t_s}{t_s}$

où t_c est le temps d'écoulement de la solution de concentration C;

t_s le temps d'écoulement du solvant KOH 0,2N en fonction de la concentration.

Les courbes $\frac{\eta_{sp}}{C} = f(c)$ et $\frac{1}{C} \text{Log}(\eta_{sp} + 1) = f(c)$ sont établies.

Chaque échantillon donne lieu à 2 droites dont l'intersection sur l'axe des ordonnées correspond à la valeur de la viscosité intrinsèque $[\eta]$ conformément à la

relation de HUGGINS : $\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + \lambda_H [\eta]^2 C$

et celle de KRAMER, MEAD et FUOSS $\frac{1}{C} \text{Log} \frac{\eta}{\eta_0} = [\eta] - K [\eta]^2 C$

Sur les figures 25,26 sont représentées les droites correspondant à l'amidon et aux fractions amylose et amylopectine obtenues au cours du fractionnement.

Dans le tableau 17 sont rassemblées les viscosités intrinsèques des divers échantillons. Remarquons les valeurs très proches de celles de l'amidon natif et de l'amidon précipité par le butanol. L'amidon n'a donc pas été endommagé. Les valeurs obtenues pour l'amylose, les fractions amylopectine et l'amidon sont en accord avec celles indiquées dans la littérature. L'amidon étant constitué d'amylose et d'amylopectine, sa viscosité intrinsèque devrait être intermédiaire entre celles de ces deux polymères. Or, elle leur est toujours supérieure. Des études ont été faites sur des mélanges d'amylose et d'amylopectine dans des proportions variables (DOUBLIER, résultats non encore publiés). La variation de la viscosité intrinsèque en fonction de la teneur en amylose ou amylopectine du mélange est linéaire. L'amidon ne suit pas cette loi probablement à cause des interactions polymère-polymère que subissent l'amylose et l'amylopectine à l'intérieur du grain.

La viscosité intrinsèque de l'amylose ayant été déterminée, la masse moléculaire viscosimétrique est calculée à partir de la relation de MARK-HOUWINK

$[\eta] = K \overline{M}_V^a$ où selon BANKS et GREENWOOD (1975), en milieu KOH 0,2N à 25°C, $a = 0,78$ et $K = 0,00692$.

$$[\eta] = 185 \text{ ml/g} \quad \text{donc} \quad \overline{M}_V = 474 \text{ 000}$$

Le degré de polymérisation moyen \overline{DP}_V est déduit de \overline{M}_V ,

$$\overline{DP}_V = \frac{\overline{M}_V}{M_0} \quad \text{où} \quad M_0 \text{ est la masse moléculaire du monomère soit } 162 \text{ g (180 g}$$

masse moléculaire du glucose - 18 masse moléculaire de l'eau).

$$\text{D'où} \quad \overline{DP}_V = 2930$$

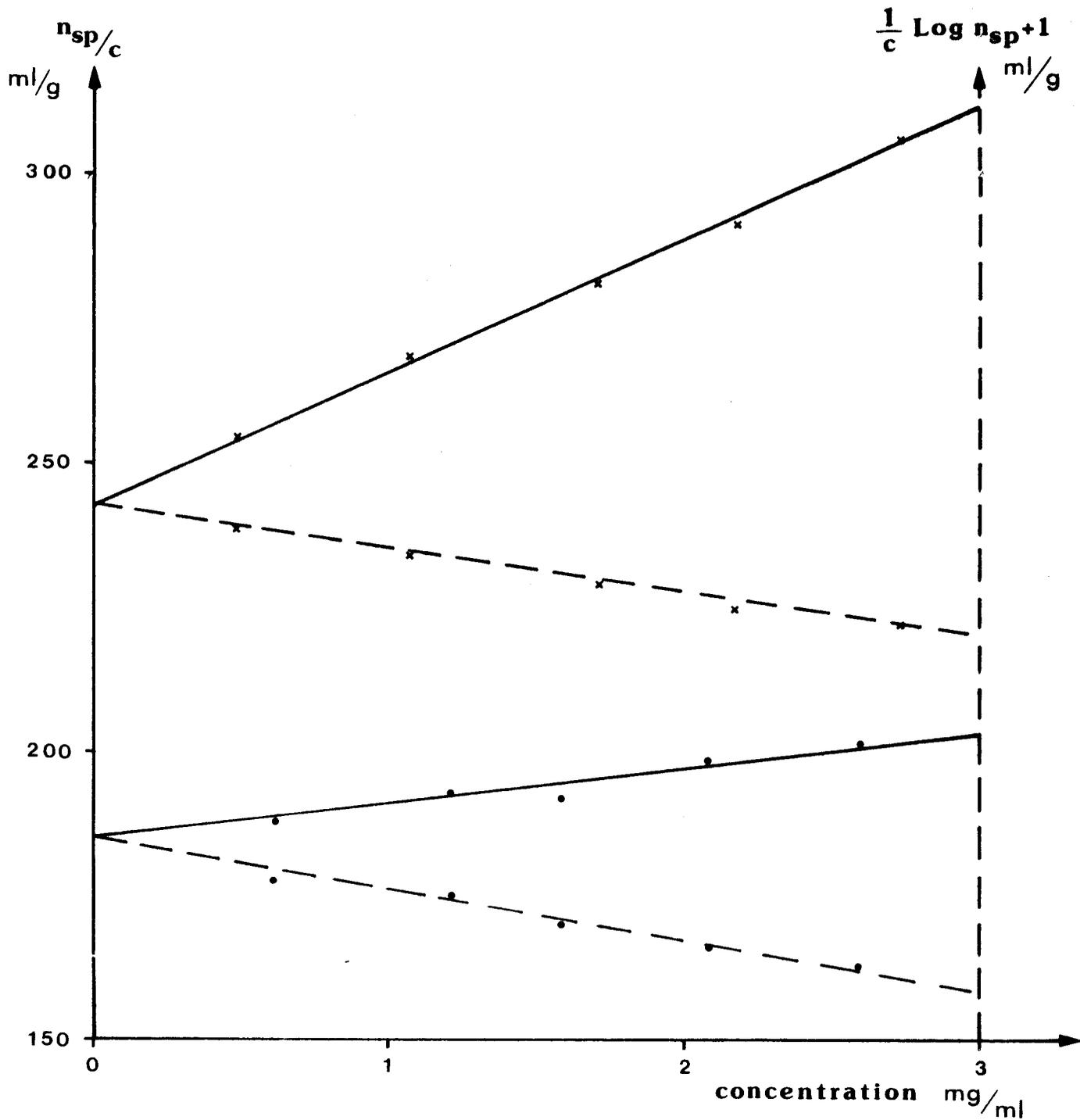


Fig. 25 - Etude de la variation de la viscosité spécifique η_{sp}/c et de la quantité $\frac{1}{c} \text{Log} (\eta_{sp} + 1)$ en fonction de la concentration pour :

- l'amidon de pomme de terre précipité par le butanol. (x x x)
- l'amylose obtenue par fractionnement chimique de l'amidon de pomme de terre. (. . .)



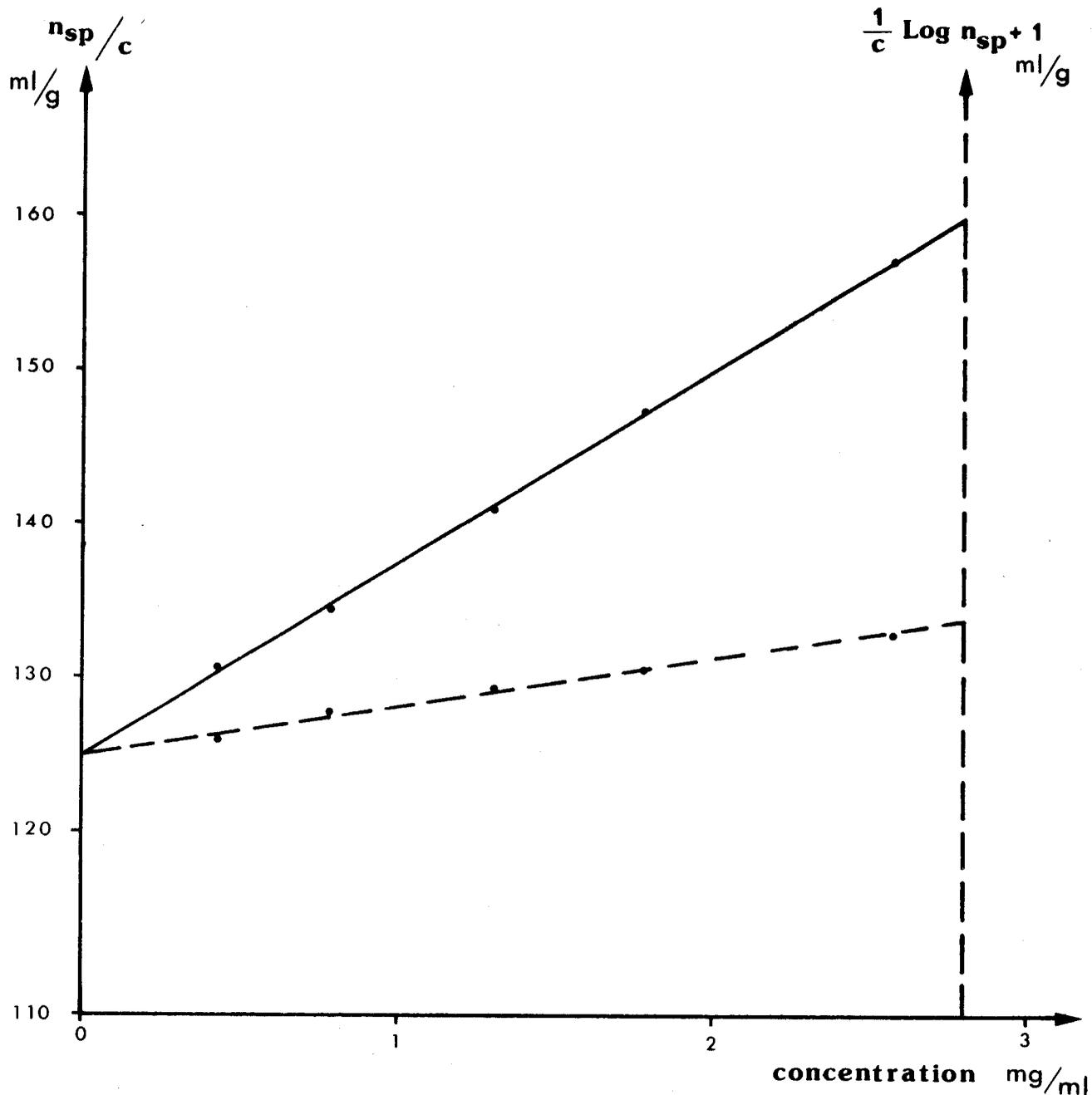


Fig. 26 - Etude de la variation de la viscosité spécifique η_{sp}/c et de la quantité $\frac{1}{c} \text{Log } (\eta_{sp} + 1)$ en fonction de la concentration de la fraction "amylopectine-vraie" obtenue au cours du fractionnement chimique de l'amidon de pomme de terre.

TABLEAU 17

VISCOSITES INTRINSEQUES DES AMYLOSES INDUSTRIELLES ET DES FRACTIONS
OBTENUES AU COURS DU FRACTIONNEMENT DE L'AMIDON DE POMME DE TERRE
(Mesures de viscosité effectuées à 25°C en milieu KOH 0,2 N)

Echantillons	$[\eta]$ ml/g
Amidon natif	241
Précipité d'amidon	243
Complexe amylose-thymol	196
Complexe amylose-butanol	145
"Amylose"	185
"Amylopectine-Vraie"	125
"Amylopectine-But"	132,5
Matériel intermédiaire : surnageant 2ème recristallisation	113
Amylose Avebe	139
Amylose Hayashibara	53



De la même façon on obtient pour :

- l'amylose Avebe $\overline{M}_v = 327\ 000$ et $\overline{DP}_v = 2000$
- l'amylose Hayashibara $\overline{M}_v = 95\ 000$ et $\overline{DP}_v = 580$

5 - DETERMINATION DES TAUX DE β -AMYLOLYSE

Les amyloses industrielles et les produits obtenus au cours du fractionnement de l'amidon de pomme de terre ont été soumises à l'action de la β -amylase dans les conditions indiquées au § 2.3.5.2. chapitre Matériel et Méthodes.

L'évolution du pouvoir réducteur de chaque digestion enzymatique déterminé par la méthode de NELSON (cf. Matériel et Méthodes § 2.3.5.2.) a été suivie pendant 20 heures. Dès 12 heures, il est constant. Le taux de β -amylolyse de chaque échantillon est alors calculé suivant la méthode décrite. Dans le tableau 18 ont été indiquées, pour chaque fraction, la quantité pesée par ml de substrat, la concentration de la digestion enzymatique exprimée en glucose et déterminée par la méthode à l'amyloglucosidase, le pouvoir réducteur en mg de maltose par ml et le taux de β -amylolyse.

Le taux de β -amylolyse augmente très nettement au cours de la purification de l'amylose. De 77 % pour le complexe amylose-thymol, il atteint 95 % pour l'amylose finale ce qui montre qu'elle est quasiment linéaire. Les valeurs obtenues pour l'amidon et les fractions amylopectine sont semblables à celles trouvées dans la littérature.

TABLEAU 18

TAUX DE β -AMYLOLYSE DES AMYLOSES INDUSTRIELLES ET DES FRACTIONS OBTENUES
AU COURS DU FRACTIONNEMENT DE L'AMIDON DE POMME DE TERRE

Echantillons	Masse d'échantillon utilisé mg/ml de substrat	[c] en équivalent glucose mg/ml	Pouvoir réducteur mg de maltose/ml	Taux de β -amylolyse %
Amidon précipité par le butanol	4,75	1,368	0,846	62
Complexe amylose-Thymol	7,02	0,998	0,768	77
Complexe amylose-butanol	11,3	1,612	1,370	85
"Amylose"	7,1	1,214	1,153	95
"Amylopectine-Vraie"	1,4	1,4	0,762	54
"Amylopectine-But"	1,32	1,318	0,738	56
Matériel	surageants			
Intermédiaire	1ère recristallisation	-	-	-
2ème	"	0,615	0,605	68
3ème	"	0,51	0,507	79
4ème	"	0,36	0,361	72
5ème	"	-	-	-
Amylose Avebe		1,036	0,725	70
Amylose Hayashibara		0,943	0,717	76



DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Le procédé de fractionnement de l'amidon le plus satisfaisant est celui fondé sur la dispersion du grain. BANKS et GREENWOOD en 1967 ayant obtenu à partir d'amidon de céréales des fractions pures d'amylose et d'amylopectine, le même procédé a été mis en oeuvre pour fractionner l'amidon de pomme de terre.

L'évolution du fractionnement a été suivie par l'analyse quantitative et la caractérisation des fractions obtenues à chaque étape par des méthodes enzymatiques et physico-chimiques.

Parmi les méthodes de caractérisation des constituants de l'amidon, la méthode ampérométrique de LARSON et al. (1953), utilisée pour déterminer de façon précise la quantité d'iode complexée par une quantité d'amidon nécessite au minimum, pour chaque dosage, 10 mg d'amylose. Grâce à la sensibilité de détection de l'appareillage utilisé (l'enregistreur peut déceler des variations d'intensité de l'ordre de 0,04 microampère, sensibilité nettement supérieure à celle fixée par LARSON et al. qui est de 0,2 microampère), la méthode a pu être modifiée permettant ainsi de réaliser des dosages ne nécessitant que des quantités limitées d'amylose de 1 à 2 mg dans les prises d'essai.

Alors que les méthodes classiques de caractérisation des constituants de l'amidon rendent compte de leurs propriétés physico-chimiques (complexation par l'iode, viscosité...) ou enzymatiques (susceptibilité enzymatique), la chromatographie de perméation sur gel d'agarose a l'avantage de mettre en évidence l'homogénéité ou l'hétérogénéité d'un produit. Grâce aux propriétés du gel d'agarose, cette méthode de séparation des macromolécules glucidiques permet d'employer des éluants basiques (PH = 13), milieux dans lesquels ces macromolécules sont facilement mises en solution.

Notre étude effectuée sur l'amylose AVEBE a montré que cette méthode est reproductible et donne des résultats quantitatifs : les rendements obtenus, qui ne dépendent pas de la quantité de glucides mise en oeuvre, sont compris entre 93 et 106%. Par contre, la quantité de glucides déposés interfère sur la position du pic d'amylose (fig.18). Un phénomène d'agrégation même en milieu basique intervient vraisemblablement au dessus d'une certaine quantité déposée qui est de 11 mg d'amylose, dans notre cas. D'où l'intérêt de calibrer la colonne avec des polysides de structure chimique définie, c'est-à-dire des polymères du glucose liés en $\alpha(1 \rightarrow 4)$ plutôt que des dextrans polymères de D-glucose reliés principalement en

.../...

$\alpha(1 \rightarrow 6)$ avec lesquels sont généralement effectués les calibrages de tels gels.

Le fractionnement de l'amidon de pomme de terre a consisté à disperser le grain par un prétraitement au DMSO puis à complexer l'amylose par le thymol et à recristalliser par le butanol, les complexes obtenus.

Alors que le prétraitement en DMSO préconisé par BANKS et GREENWOOD nécessite 3 jours de dispersion sous agitation magnétique, nous avons amélioré la technique par addition de 5% d'eau au DMSO pur, ce qui a conduit après 24 heures, à une solution limpide, signe d'une dispersion totale des grains d'amidon.

La précipitation par le butanol de l'amidon solubilisé dans le DMSO est quantitative puisque le rendement est de 100%. Le précipité d'amidon obtenu a la même viscosité intrinsèque (243 ml/g), mesuré en KOH 0,2N que l'amidon natif (241 ml/g). Ce qui indique que les traitements successifs de solubilisation par le DMSO et de précipitation par le butanol détruisent la structure physique de l'amidon mais n'ont aucune action sur la structure chimique et simultanément permettent d'extraire les traces de lipides présents dans l'amidon, ces traces de lipides étant susceptibles d'interférer sur les dosages ultérieurs par complexation à l'iode.

La complexation par le thymol a conduit à un surnageant contenant la fraction appelée "amylopectine vraie" représentant 63,6% de l'amidon total. Cette fraction est éluée sur Sépharose 2B-CL au même volume que l'amylopectine (fig.21). Ses propriétés de caractérisation par l'iode ($\lambda_{\max} = 555 \text{ nm}$), de capacité de liaison à l'iode (CLI = 0,54%) de viscosité ($\{\eta\} = 125 \text{ ml/g}$) et de β -amylolyse ($\beta = 54\%$) correspondent à celles d'une amylopectine et sont très proches de celles obtenues par BANKS et GREENWOOD (1967) pour la même fraction isolée à partir d'amidons de céréales. Ce matériel est quasiment pur et avec GREENWOOD et ROBERTSON (1954), nous pouvons affirmer que l'emploi de thymol comme premier agent complexant permet d'obtenir, à partir du surnageant, une amylopectine de grande pureté.

Par contre, le complexe amylose-thymol représentant 36,4% de l'amidon initial est supérieur à la teneur en amylose apparente (22,2%) déterminée par ampérométrie. La capacité de liaison à l'iode (14,8%) et le diagramme d'élu-tion sur Sépharose 2B-CL indiquent en effet que la fraction amylose éluée au $K_{av} = 0,5$ est contaminée par 25% (Tableau 19, fig : 19) d'un matériel élué au $K_{av} = 0$. De plus, le matériel élué au $K_{av} = 0,5$ correspond à une certaine fraction d'amylose puisqu'elle n'est pas complètement linéaire, son taux de

.../...

TABLEAU 19

RAPPORT DE LA SURFACE DE CHAQUE PIC A L'AIRES DE LA COURBE TOTALE D'ELUTION
CALCULE A PARTIR DES CHROMATOGRAMMES DES PRODUITS ETUDIES

Echantillons	Matériel représenté par le 1 ^{er} pic ($K_{av} = 0$) %	Matériel représenté par le 2 nd pic (1) ($0,495 < K_{av} < 0,660$) %
Amidon de pomme de terre	N.D. (2)	0
Complexe amylose-thymol	25,0	75,0
Complexe amylose-butanol	15,7	84,3
Complexe amylose-butanol Recristallisé 1 fois	11,2	88,8
Complexe amylose-butanol Recristallisé 2 fois	5,3	94,7
Complexe amylose-butanol Recristallisé 3 fois	N.D.	N.D.
Complexe amylose-butanol Recristallisé 4 fois	N.D.	N.D.
"Amylose"	0	100,0
"Amylopectine-Vraie"	N.D.	N.D.
"Amylopectine-But"	N.D.	N.D.
Surnageant 1 ^{ère} recristallisation	7,0	93,0
Surnageant 2 ^{ème} recristallisation	5,4	94,6
Surnageant 3 ^{ème} recristallisation	2,7	97,3
Amylose Avebe	3,0	97,0
Amylose Hayashibara	0	100

(1) Obtenu en faisant le complément à 100 du pourcentage figurant dans la 1^{ère} colonne.

(2) Non déterminé.



β -amylolyse n'étant que de 77%. Le spectre d'absorption avec l'iode de la fraction contaminante présente un maximum à 550 nm indiquant la présence d'un matériel de type amylopectine. BANKS et GREENWOOD (1967), à partir d'amidons de céréales, obtiennent des complexes amylose-thymol dont la proportion d'amylopectine contaminante déterminée par voie enzymatique (utilisant la β -amylase et un mélange de β -amylase et de Z-enzyme (cf. Travaux antérieurs (§ 4-2)) varie de 11 à 22% selon la nature de l'amidon. En 1957, COWIE et GREENWOOD, après dispersion en milieu aqueux d'un amidon de pomme de terre et addition de thymol, obtenaient un complexe contaminé par 26% d'amylopectine déterminé par dosage potentiométrique de la quantité d'iode complexé. Notre étude par chromatographie sur Sépharose 2B-CL confirme ce dernier résultat.

Ceci indique que la séparation amylose-amylopectine par le thymol est plus efficace pour les amidons de céréales que pour l'amidon de pomme de terre. Le volume des molécules d'amylopectine contaminante est probablement suffisamment faible pour que celles-ci soient emprisonnées dans les mailles du gel où demeure une forte proportion d'eau. D'où l'avantage de posséder une méthode plus fine, telle la chromatographie sur Sépharose 2B-CL, que la complexation par le thymol pour séparer les 2 types de macromolécules.

Afin d'éliminer le matériel contaminant du type amylopectine, certains auteurs ont préconisé de redisperser le gel et de complexer l'amylose par un autre agent.

La complexation par le butanol du matériel préalablement complexé par le thymol, sépare dans le surnageant une fraction appelée "amylopectine-but" représentant 5,2% de l'amidon total. Son profil d'élution sur Sépharose 2B-CL (fig.21) présente un pic unique situé au $K_{av} = 0$, superposable à celui obtenu avec la fraction amylopectine précédemment isolée. Le spectre du complexe du matériel élué sous ce pic avec l'iode présente un maximum à 555 nm. Ceci ainsi que les caractéristiques de liaison à l'iode ($CLI = 0,75\%$, $\lambda_{max} = 555$ nm), de viscosité ($\{\eta\} = 132$ ml/g) et de β -amylolyse ($\beta = 56\%$) indiquent que ce matériel est une fraction amylopectine. Conformément à la littérature, elle a des propriétés voisines mais cependant différentes de celles de la fraction "amylopectine-vraie". Elle est légèrement contaminée par du matériel de type amylose comme le montrent ses taux de β -amylolyse, capacité de liaison à l'iode et viscosité intrinsèque plus élevés (Tableau 20).

Le complexe amylose-butanol qui représente 29,4% de l'amidon initial a des caractéristiques de complexation par l'iode ($CLI = 16,6\%$, $\lambda_{max} = 615$ nm),

.../...

TABLEAU 20

ANALYSE QUANTITATIVE DU FRACTIONNEMENT DE L'AMIDON DE POMME DE TERRE.
 CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHEMIQUES ET ENZYMATIQUE DES
 PRODUITS OBTENUS ET DES AMYLOSES INDUSTRIELLES

Echantillons	Pourcentage de l'amidon initial	λ_{\max} nm	CLI %	η ml/g	DP _v	Taux de β -amylolyse %
Amidon natif			4,33	241		
Amidon précipité par le butanol	100	590		243		62
Complexe amylose-thymol	36,1	610	14,8	196		77
Complexe amylose-butanol	29,4	615	16,6	145		85
"Amylose"	16,8	625	19,5	185	2930	95
"Amylopectine-Vraie"	63,4	555	0,54	125		54
"Amylopectine-But"	5,2	555	0,75	132		56
Matériel surnageants 1ère recristallisation 2ème " " Intermé- diaire 3ème " " 4ème " " 5ème " "	1,4 1,8 2,3 0,8 0,15	623 602 625 620 595	6,5%	113		68 79 72
Amylose Avebe		625	19,7	139	2000	70
Amylose Hayashibara		600	9,7	53	580	76

de β -amylolyse (85%) inférieures à celles de l'amylose. Le profil d'élution sur Sépharose 2B-CL (fig.19) indique que ce complexe est encore contaminé par 15,7% d'un matériel élué au même volume que l'amylopectine. Le complexe avec l'iode des fractions éluées sous ce pic présente un maximum d'absorption à 555 nm, correspondant à un matériel de type amylopectine. Notons que BANKS et GREENWOOD (1967) avec des amidons de céréales obtiennent dès cette étape un complexe de capacité de liaison à l'iode élevée (supérieure à 19,3%). Par contre, le taux de β -amylolyse ne dépasse pas 80%. Le même procédé de fractionnement appliqué à l'amidon de pomme de terre conduit dans notre étude à une amylose encore fortement contaminée par de l'amylopectine.

La purification de ce matériel a été poursuivie et 5 recristallisations de la fraction amylose complexée ont été nécessaires pour obtenir une fraction linéaire. Le matériel élué au $K_{av} = 0$ diminue progressivement (fig.20); simultanément au cours des recristallisations, les complexes présentent des caractéristiques de plus grande linéarité. Les 5 recristallisations ont conduit à 16,8% d'un matériel élué sur Sépharose 2B-CL au $K_{av} = 0,66$. Le spectre d'absorption avec l'iode de la fraction éluée au sommet du pic présente un maximum à 625 nm. Les caractéristiques de ce matériel ($\lambda_{max} = 625$ nm, CLI = 19,5%, $\beta = 95\%$) indiquent de plus que l'on est en présence d'une fraction amylose quasiment pure et linéaire. La valeur de la viscosité intrinsèque conduit à un \overline{DP}_v de 2930.

Lorsque l'amidon de pomme de terre est fractionné selon le procédé de BANKS et GREENWOOD, 5 recristallisations sont encore nécessaires pour purifier l'amylose alors que pour les amidons de céréales, d'après la littérature, des recristallisations répétées de solutions saturées en butanol n'améliorent pas la séparation. Cependant, par superposition des profils d'élution des complexes amylose-butanol recristallisés, on remarque que le pic correspondant à l'amylose est déplacé au cours des recristallisations, dans le sens des K_{av} croissants (fig.20). Il est difficile d'attribuer ce déplacement des K_{av} à une dégradation éventuelle puisque les complexes étant des mélanges d'amylose et d'amylopectine, on ne pourrait rien conclure quant à la variation des viscosités intrinsèques. D'autre part, une dégradation semble cependant peu probable puisque les recristallisations se font à température ambiante. Les risques d'oxydation sont donc très faibles. Ce déplacement vers les K_{av} croissants est plutôt dû à une diminution de l'encombrement stérique du fait de la diminution du taux d'amylopectine.

../...

Le matériel intermédiaire séparé des complexes au cours des recristallisations représente 6,5% de l'amidon alors que COWIE et GREENWOOD en obtiennent 7% à partir de l'amidon de pomme de terre. Les profils d'éluion indiquent que ce matériel est hétérogène (fig.22). Une fraction est éluee au même volume que l'amylopectine, l'autre à celui de l'amylose. Au cours des recristallisations, le pourcentage de la 1^{ère} fraction diminue (Tableau 19). Le spectre d'absorption des complexes avec l'iode des fractions éluees aux différents volumes, présente un maximum à 555 nm pour la fraction éluee au sommet du 1^{er} pic, ce maximum se déplace ensuite de 600 vers 620 nm, valeur obtenue pour le sommet du second pic. Ce matériel intermédiaire est donc constitué d'amylose, d'amylopectine de faible poids moléculaire et de quelques pourcents (2 à 7) d'amylopectine de haut poids moléculaire. Ce qui est confirmé par le taux de β -amylolyse de ce matériel qui varie de 68 à 79%.

Une étude enzymatique des différentes fractions séparées par chromatographie sur Sépharose 2B-CL permettrait de préciser davantage la structure des constituants de ce matériel intermédiaire.

La caractérisation des constituants de l'amidon appliquée aux 2 amyloses industrielles met en évidence que l'amylose Avebe est un produit hétérogène. La chromatographie sur Sépharose 2B-CL (fig.17) sépare de l'amylose éluee au $K_{av} = 0,495$ une fraction amylopectine éluee au $K_{av} = 0$ et représentant 3% de la préparation. L'amylose Avebe est caractérisée par une CLI (19,5%), un λ_{max} (625 nm) et une viscosité intrinsèque (139 ml/g) comparables à ceux généralement rencontrés dans la littérature mais cependant un taux de β -amylolyse faible (70%) confirme qu'elle n'est pas totalement linéaire.

L'amylose Hayashibara est éluee sur Sépharose 2B-CL au $K_{av} = 0,65$, ne présentant qu'un seul pic (fig.17), indice d'un matériel homogène par gel filtration. Les valeurs de λ_{max} (600 nm), CLI (9,7%) et β (76%) correspondent à une macromolécule partiellement ramifiée. Cependant la différence entre le \overline{DP}_n de 130, déterminée par le dosage des groupements réducteurs et le \overline{DP}_v de 580, mesuré à partir de la viscosité intrinsèque, traduit une assez grande hétérogénéité de masse moléculaire. On sait, selon la Société Hayashibara, que la préparation de cette amylose est obtenue par déramification enzymatique d'amidon qui conduit à un mélange de chaînes de différents \overline{DP} (>60,45 et 15), déramification suivie de complexations et de précipitations. Ces derniers

.../...

traitements ne sont pas suffisamment sélectifs et vraisemblablement conduisent à un matériel encore contaminé de chaînes de faibles \overline{DP} tels que 45 et 15.

Il s'avère d'après nos résultats que le terme "amylose" est utilisé couramment pour des fractions aussi différentes que celles obtenues par complexation par les alcools (telle celle de notre étude) par précipitation par le sulfate d'ammonium (l'amylose Avebe) et par déramification enzymatique de l'amidon (l'amylose Hayashibara). Notre étude, grâce à l'intervention de différentes techniques de caractérisation, a permis de mettre en évidence que si certaines caractéristiques physico-chimiques telles que la capacité d'absorption à l'iode sont identiques pour 2 "amyloses", leur homogénéité et leurs structures chimiques peuvent être différentes.

Il est intéressant de comparer l'amylose de pomme de terre que nous avons préparée à l'amylose Avebe. Leurs CLI et λ_{\max} sont identiques mais la 1^{ère} est plus linéaire ($\beta = 95\%$ au lieu de 70%) et a un \overline{DP} plus élevé (2930 au lieu de 2000) que la 2^{nde}. Cependant, il est à remarquer que l'amylose Avebe est éluée sur Sépharose 2B-CL à un volume plus faible ($K_{av} = 0,495$) que l'amylose préparée ($K_{av} = 0,66$). Ceci est dû au fait que celle-ci est quasiment linéaire ; l'amylose Avebe, ramifiée, du fait de l'encombrement stérique, est éluée plus rapidement.

L'amylose Hayashibara avec un taux de β -amylolyse (76%) proche de celui de l'amylose Avebe (70%) et constituée de chaînes plus courtes, est retenue davantage sur le gel.

Le comportement de telles macromolécules sur gel d'agarose dépend par conséquent de leur structure et de leur degré de ramification, ce qui a déjà été observé par le comportement différent sur Biogel P2 d'oligosides linéaires en $\alpha(1 \rightarrow 4)$, d'oligosides uniramifiés et multiramifiés en $\alpha(1 \rightarrow 6)$ (KAINUMA et al., 1976).

L'étude par chromatographie doit donc être couplée avec une étude physico-chimique ou enzymatique des composés permettant de préciser la nature des facteurs susceptibles d'influencer leurs comportements sur gel.

De nombreux auteurs ont étudié l'amylose et ses caractéristiques physico-chimiques et enzymatiques. Ils affirment que certes la taille moléculaire de l'amylose dépend de sa source botanique, mais elle dépend aussi du mode d'extraction de l'amidon et de son schéma de fractionnement.

La plupart des auteurs distinguent les amidons commerciaux des amidons préparés au laboratoire qui conduisent en général à des amyloses moins "dégradées" (\overline{DP} de 4000 au lieu de 2500). COWIE et GREENWOOD en 1957 par

.../...



lixiviation obtiennent à partir d'un amidon commercial de pomme de terre une amylose de \overline{DP} 2400 et de taux de β -amylolyse 100% ; ces valeurs sont identiques quand le grain est dispersé à 98°C. Avec un amidon extrait au laboratoire à 70°C, l'amylose obtenue a un \overline{DP} de 1800 et un taux de β -amylolyse de 86%. Les mêmes auteurs, après dispersion de l'amidon en milieu aqueux, complexation par le thymol et recristallisations (au nombre de 3) par le butanol, sous N_2 , obtiennent :

- à partir d'un amidon extrait au laboratoire, une amylose de \overline{DP} 3200 et de β -amylolyse, 77% ;

- à partir d'un amidon commercial, une amylose de \overline{DP} 2500 et de β -amylolyse, 95%.

En conséquence, bien que sur bon nombre de points nos résultats soient en accord avec la littérature, l'amylose, que nous avons obtenue à partir d'un amidon de pomme de terre commercial et par la modification du fractionnement chimique, est à la fois plus linéaire et a un \overline{DP} plus élevé que celles préparées jusqu'à maintenant.

Ceci pourrait présenter un intérêt certain pour la préparation de fractions complètement linéaires susceptibles d'être texturées sous forme de films. Ces films biodégradables pourraient avoir une utilisation comme emballages de produits alimentaires par exemple.

Le fractionnement de l'amidon, par prétraitement au DMSO pour disperser le grain, complexation de l'amylose par le thymol, recristallisations par le butanol, dans des conditions permettant d'éviter les risques d'oxydation, a conduit à une amylose pure représentant 16,8% de l'amidon initial. Ce taux est inférieur à la teneur obtenue par dosage ampérométrique (22,2%). Ce qui démontre que l'iode est capable de complexer, en plus de l'amylose pure, un autre matériel de linéarité intermédiaire représentant 5,4% de l'amidon initial ; ce matériel correspond vraisemblablement au matériel intermédiaire qui a été isolé au cours de recristallisations de l'amylose de pomme de terre (6,5%). Une étude de la structure chimique fine de ce matériel intermédiaire par la méthode séquentielle enzymatique et chromatographique développée en milieu DMSO par MERCIER et KAINUMA (1975) devrait permettre d'expliquer cette différence entre la fraction amylose pure et l'amylose "apparente".

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADKINS G.K. et GREENWOOD C.T., 1969. Studies on starches of high amylose-content. Part 10. An improved method for the fractionation of maize and amylo maize starches by complex formation from aqueous dispersion after pretreatment with methyl sulphoxide. *Carb. Res.*, 11, 217-224.
- ADKINS G.K., GREENWOOD C.T. et HOURSTON D.J., 1970. Studies on starches of high amylose-content. Part 11. Some physicochemical properties of dispersions of amylo maize starch and observations on the nature of high amylose starches. *Cereal Chem.*, 47, 13-18.
- ARBUCKLE A.W. et GREENWOOD C.T., 1958. Physicochemical studies on starches. Part 13. The fractionation of oat and wheat starches. *J. Chem. Soc.* 2626-2629.
- BADENHUIZEN N.P., 1971. Struktur und Bildung des Starkekorns dans Handbuch der Stärke in Einzeldarstellungen, tome VI, 2. ed. Verlag Paul Parey - Berlin et Hambourg.
- BAILEY J.M. et WHELAN W.J., 1961. Physical properties of starch. 1. Relationships between iodine stain and chain length. *J. Biol. Chem.*, 236, 969-973.
- BANKS W. et GREENWOOD C.T., 1959. Physicochemical studies on starches. Part 20. On the existence of an anomalous amylopectin in starch. *J. Chem. Soc.*, 3436-3439.
- BANKS W., GREENWOOD C.T. et THOMSON J., 1959. Physicochemical studies on starches. Part 18. The properties of amylose as related to the fractionation and subfractionation of starch. *Die Makromolekulare Chemie* 31, 197-213.
- BANKS W. et GREENWOOD C.T., 1967a. Physicochemical studies on starches. Part 36. The fractionation of laboratory -isolated Cereal Starches using Dimethylsulfoxide. *Die Stärke*, 19, 394-397.
- BANKS W. et GREENWOOD C.T., 1967b. Physicochemical studies on starches. Part 32. The incomplete beta-amylolysis of amylose : a discussion of its cause and implications. *Die Stärke*, 19, 197-206.
- BANKS W., GREENWOOD C.T. et KHAN K.M., 1971. Physicochemical studies of starches. Part 56. The interaction of linear amylose oligomers with iodine. *Carbohydrate Res.*, 17, 25-33.
- BANKS W., GREENWOOD C.T. et MUIR D.D., 1971a. Studies on starches of high -amylose content. Part 14. The fractionation of amylo maize starch by aqueous leaching. *Die Stärke*, 23, 199-201.
- BANKS W., GREENWOOD C.T. et MUIR D.D., 1971b. The characterisation of starch and its components. Part 3. The technique of semi-micro, differential potentiometric, iodine titration and the factors affecting it. *Die Stärke*, 23, 118-124.
- BANKS W. et GREENWOOD C.T., 1975. Starch and its components. ed. Edimburgh University Press, Edimburgh.
- BEMILLER J.N., 1964. Iodometric determination of amylose in *Methods In Carbohydrate Chemistry*. Vol. 4, 165-169, ed. Academic Press New-York and London.

- BILIADERIS C.G., GRANT D.R. et VOSE J.R., 1979. Molecular weight distributions of legume starches by gel chromatography. *Cereal Chem.* 56, 475-480.
- BOTTLE R.T., GILBERT G.A., GREENWOOD C.T. et SAAD K.N., 1953. The degradation of potato amylose in neutral and alkali solution. *Chem. and Ind.* 541-542.
- BOURNE E.J., DONNISON G.H., HAWORTH W.N. et PEAT S., 1948. Thymol and cyclohexanol as fractionating agents for starch. *J. Chem. Soc.*, 1687.
- BROWN B.T. et BROWN D.H., 1974. In *Metabolic Endocrine and Genetic Disorders of Children*. Vol. 2, ch. 39, 733.
- COWIE J.M.G. et GREENWOOD C.T., 1957a. Physicochemical studies on starches. Part VI. Aqueous leaching and the fractionation of potato starch. *J. Chem. Soc.*, 2862-2866.
- COWIE J.M.G. et GREENWOOD C.T., 1957b. Physicochemical studies on starches. Part VIII. Further observations on the fractionation of potato starch. *J. Chem. Soc.*, 4640-4644.
- DOUBLIER J.L., 1978. Rapport interne INRA.
- DUPRAT F., GALLANT D., GUILBOT A., MERCIER C. et ROBIN J.P., 1980. L'amidon. Dans : *Les Polymères Végétaux*. 176-231. ed. Gauthier-Villars, Paris.
- EBERMANN R. et SCHWARZ R., 1975. Fractionation of starch by gel filtration on agarose beads. *Die Stärke*, 27, 11, 361-363.
- ERLANDER, S.R. et FRENCH D., 1958. Dispersion of starch granules and the validity of light scattering results on amylopectin. *J. Amer. Chem. Soc.*, 80, 4413.
- FORGATY W.M. et GRIFFIN P.J., 1975. Purification and properties of β -amylase produced by *Bacillus polymyxa*. *J. Appl. Ch. B.*, 25, 3, 229-238.
- FOSTER J.F., 1965. Physical properties of amylose and amylopectine in solution in "Starch : Chemistry and Technology", Vol. 1, ch. 15, 349-389, ed. R.L. WHISTLER and E.F. PASCHALL, Academic Press, New-York.
- FRENCH D., 1975. Chemistry and biochemistry of starch in *MTP International Review of Science Biochemistry of Carbohydrate*, série 1. 5, chapitre 6, 267-335, ed. Butterworths University Park Press.
- FUWA H., GLOVER D.V., SUGIMOTO Y., NISHIMURA R. et TANAKA M., 1978. Comparative susceptibility to amylases of starch granules of several single Endosperm Mutants and their double - Mutant combinations with opaque-2 in four inbred lines of maïze. *Die Stärke*, 30, 11, 367-371.
- GEDDES R., GREENWOOD C.T., MacGREGOR A.W., PROCTER A.R. et THOMSON J., 1964. Physicochemical studies on starches. Part 31. Observations on the isolation and subfractionation of amylose : the presence in amylose of a natural barrier to β -amylolysis. *Die Makromolekulare Chemie*, 79, 189-206.
- GREENWOOD C.T., 1956. Aspects of the physical chemistry of starch. *Adv. Carbohydrate Chem.*, 11, 336.
- GREENWOOD C.T., 1976. *Advances in Cereal Science and Technology*, Vol. 1, ch. 3, 119-157, ed. Y. POMERANZ.

../...

- GREENWOOD C.T. et ROBERTSON J.S.M., 1954. Physicochemical studies on starches. Part. 1. The characterisation of the starch present on the seeds of the rubber tree, *Hevea Brasiliensis*. J. Chem. Soc. 3769-3778.
- GREENWOOD C.T. et THOMSON J., 1960. Observations on starch of high amylose-content ; the properties of the amylopectin component. Chemistry and Industry, 1110-1111.
- GREENWOOD C.T. et THOMSON J., 1962. Physicochemical studies on starches. Part 24. The fractionation and characterisation of starches of various plant origins. J. Chem. Soc., 222-229.
- GUNJA-SMITH Z., MARSHALL J.J., SMITH E.E. et WHELAN V.J., 1970. A glycogen debranching enzyme from *Cytophaga*. Febs Letters, 12, 2, 96-100.
- HIEMSTRA P., BUS W.C. et MUETGEERT J., 1956. Fraktionierung von Stärke. Die Stärke, 8, 235.
- HIGASHIHARA M. et OKADA S., 1974. Studies on β -amylase of *Bacillus megaterium* strain n°32. Agr. Biol. Chem., 38, 5, 1023-1029.
- HODGE, J.E., MONTGOMERY E.M. et HILBERT G.E., 1948. Hydrolysis of the amylopectins from various starches with β -amylase. Cereal Chem. 25, 19.
- HOLLO, J. et SZEJTLI J., 1968. In starch and its Derivatives, ed. J.A. RADLEY, 203, London : Chapman and Hall Ltd.
- HOOD L.F. et MERCIER C., 1978. Molecular structure of unmodified and chemically modified manioc starches. Carb. Res. 61, 53-66.
- KAINUMA K., NOGAMI A. et MERCIER C., 1976. Gel permeation chromatography of maltosaccharides of various structures by polyacrylamide gel. J. of chromatog. 121, 361-369.
- KESLER R.B., 1967. Rapid quantitative anion-exchange chromatography of carbohydrates. Anal. Chem., 39, 1416-1422.
- KILLION P.J. et FOSTER J.F., 1960. Isolation of high molecular weight amylose by dimethylsulfoxide dispersion. J. Polymer Sci., 46, 65-73.
- KJOLBERG O. et MANNERS D.J., 1963. Studies on carbohydrate-metabolizing enzymes. 9. The action of isoamylase on amylose. Biochem. J., 86, 258.
- KURTZMAN R.H., JONES F.T. et BAILEY G.F., 1973. Dissolution of starches in dimethylsulfoxide and variations in starches of several species, varieties and maturities. Cereal Chem. 50, 50, 312-322.
- LANSKY S., KOOI M. et SCHOCH T.J., 1949. Properties of the fractions and linear subfractions from various starches. J. Am. Chem. Soc. 71, 4066
- LARSON B.L., GILLES K.A. et JENNESS R., 1953. Amperometric method for determining the sorption of iodine by starch. Analytical Chem. 25, 802-804.
- LEE E.Y.C et WHELAN W.J., 1966. Enzymic methods for the micro determination of glycogen and amylopectin and their unit chain lengths. Arch. Biochem. Biophys. 116, 162-167.
- LEE E.Y.C., MERCIER C. et WHELAN W.J., 1968. A method for the investigation of the fine structure of amylopectin. Arch. Biochem. Biophys., 30, 467-470.
- LLYOD J.B. et WHELAN W.J., 1969. An improved method for enzymic determination of glucose in the presence of maltose. Anal. Biochem., 30, 467-470.

- LOEWUS F.A., 1952. Improvement in anthrone method for determination of carbohydrates. Anal. Chem. 24, 219.
- MACHELL, G. et RICHARDS G.N., 1958. The alkaline degradation of polysaccharides. Part 3. Action of sodium hydroxide on amylose. J. Chem. Soc., 1199.
- MANNERS K.J. et MERCER G.A., 1963. Observations on the possible presence of $\alpha(1-3)$ glucosidic linkages in starch-type polysaccharides. Biochem. J., 89, 34P-35P. (Proc. of the 3rd Intern. Meeting and 430th. Meeting of the Bioch. Society. University of Oxford, 20-7-1963).
- MARSHALL J.J., 1975. Starch-degrading enzymes, old and new. Die Stärke, 27, 11, 377-383.
- MARSHALL J.J. et WHELAN W.J., 1970. Incomplete conversion of glycogen and starch by crystalline amyloglucosidase and its importance in the determination of amylose polymers. Febs Letters, 9, 2, 85-88.
- MERCIER C., 1973. The fine structure of corn starches of various amylose percentage : waxy, normal and amylose maize. Die Stärke, 25, 3, 78-83.
- MERCIER C., FRANTZ B.M. et WHELAN W.J., 1972. An improved purification of cell-bound pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. Eur. J. Biochem. 26, 1, 1-9.
- MERCIER C. et KAINUMA K., 1975. Enzymatic debranching of starches from maize of various genotypes in high concentration of dimethylsulfoxide. Die Stärke, 27, 9, 289-292.
- MEYER K.H. et BERNFELD P., 1940. Recherches sur l'amidon. L'amylopectine. VII. Sur la structure fine du grain d'amidon et sur les phénomènes de gonflement. Helv. Chim. Acta., 23, 875-890.
- MEYER K.H., BERNFELD P., BOISSONNAS R.A., GÜRTLER P. et NOELTING G., 1949. Starch solutions and pastes and their molecular interpretation. J. Phy. Colloid. Chem., 53, 319-334.
- MORRISON W.R., 1978. Cereal Lipids dans "Advances in Cereal Science and Technology, vol.2, ch.4, 221-348, ed. Y. Pomeranz.
- MUETGEERT I., 1961. The fractionation of starch. Adv. Carbohydrate chem., 16, 299. (M.L. Wolfrom, editor. New-York and London : Academic Press).
- NELSON N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153, 375-379.
- PEAT S., PIRT S.J. et WHELAN W.J., 1952. Enzymic synthesis and degradation of starch. Part XV. β -amylase and the constitution of amylose. J. Chem. Soc., 705.
- PERLIN, A.S., 1958. Radio chemical evidence for heterogeneity in wheat starch. Canad. J. Chem. 36, 810.
- PORATH J. et FLODIN P., 1959. Gel filtration : a method for desalting and group separation. Nature, 183, 1657-1659.
- PRAZNIK W. et EBERMANN R., 1979. Die Verwendung Synthetischer Amylosen als Bezugssubstanzen bei der Gelchromatographischen Molekulargewichtsbestimmung von Stärken. Die Stärke, 31, 9, 288-293.

- RADLEY J.A., 1976. Examination and analysis of starch and starch products, ed. Applied Science Publishers LTD London.
- ROBIN J.P., 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 es-Sciences Physiques, Paris, N° CNRS. A.O. 12534
- ROBIN J.P., MERCIER C., CHARBONNIERE R. et GUILBOT A., 1974. Lintnerized starches gel filtration and enzymatic studies of insoluble residue from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal. Chem.*, 51, 389-406.
- ROBIN J.P., MERCIER C., DUPRAT F., CHARBONNIERE R. et GUILBOT A., 1975. Etudes chromatographiques et enzymatiques des résidus insolubles provenant de l'hydrolyse chlorhydrique d'amidons de céréales, en particulier de maïs cireux. *Die Stärke*, 27, 2, 36-45.
- SCHOCH T.J., 1942. Non carbohydrate substances in the cereal starches. *J. Amer. Chem. Soc.*, 64, 2954-2956.
- SCHOCH T.J., 1945. The fractionation of starch. *Adv. Carbohydrate Chem.*, 1, 247.
- SCHOCH T.J., 1964. Iodometric determination of amylose. Potentiometric titration : standard method. *Methods in Carbohydrate Chem.* WHISTLER R.L. ed. 4, 157-160.
- SHINKE R., KUMINI Y., ADRI K. et NISHIRA H., 1977. Studies on microbial β -amylase. IV. Filamentation in *Bacillus cereus* during β -amylase production. *J. Ferment. Technol.*, 55, 103-109.
- TAKATA T., SUGIMOTO Y., IMO E., TOMINAGA Y., NAKATANI N. et FUWA H., 1978. Degradation of starch granules by alpha-amylases of fungi. *Die Stärke*, 30, 9, 289-293.
- TAKEO K., TOKUMURA A. et KUGE T., 1973. Complexes of starch and its related materials with organic compounds. Part 10. X-ray diffraction of amylose-fatty acid complexes. *Die Stärke*, 25, 11, 357-362.
- THIVEND P., MERCIER C. et GUILBOT A., 1972. Determination of starch with gluco-amylase in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, vol VI, ch. 4, 100-105.
- THOMA J.A., 1965. Oligo- and megalo sacharides. Chap. VIII, 177-208 in : *starch-chemistry and Technology* R.L. WHISTLER and E.F. Paschall. Academic Press, New-York and London.
- TOLLIER M.T., 1965. Contribution à l'étude de l'action du rayonnement gamma sur les caractères physico-chimiques de l'amidon et sa sensibilité aux amylases. Thèse d'ingénieur, Cons. Nat. des Arts et Métiers Paris.
- TOLLIER M.T., 1965 et ROBIN J.P., 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. Techn. Agric.*, 28, 1, 1-17.
- UEDA S. et OHBA R., 1976. Pullulanase responsible for digesting raw starch. *Die Stärke*, 28, 1, 20-22.
- ULMANN M., 1971. Die Fraktionierung der Stärke dans *Handbuch der Stärke in Einzeldarstellungen*. Vol. VII 1. ed. Verlag. Paul Parey. Berlin et Hanbourg.

- VINEYARD M.L. et BEAR R.P., 1952. II. Reports from cooperations (Bear hybrids corn Compagny Decatur II.) Amylose content. Maïze Genetics Coop. News Letter, 26, 5.
- WHISTLER R.L., 1965. Fractionation of starch. In : "Starch : Chemistry and technology", ed. by R.L. Whistler and E.F. Paschall ; Vol. I. p 331-347. Academic Press. New-York.
- WOLFROM M.L. et THOMPSON A., 1957. Degradation of glycogen to isomaltotriose and nigerose. J. Amer. Chem. Soc. 79, 4212-4215.
- YAMADA T. et TAKI, M., 1976. Fractionation of maïze starch by gel chromatography. Die stärke, 28, 11, 374-377.
- YOKOBAYASHI K.. MISAKI A. et HARADA T., 1970. Purification and properties of *Pseudomonas* iso-amylase. Biochim. Biophys. Acta, 212, 458-469.

