

U N I V E R S I T E P A R I S - S U D

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE CHIMIE THERAPEUTIQUE

ANNEE : 1981 - 1982

SERIE 3° Cycle N°45

T H E S E

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE
CHIMIE THERAPEUTIQUE

DE

L'UNIVERSITE PARIS-SUD

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE
DANS LES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

par

M. MALAN-KLA ANGLADE

Titre de la thèse :

DERIVES D'HYDROLYSE ET D'HYDROGENATION DE L'AMIDON
CONTROLE ANALYTIQUE DE LEUR QUALITE
et
ETUDE DES SUCRES DE REVERSION

soutenu le 16/06/82

JURY : Président : M. PR. F. PELLERIN - rapporteur
Membres : M. PR. M. HAMON - "
M. PR. M. GUERNET - "
M. PR. JC. GOUNELLE
M. P. LEROY

A Monsieur le Professeur F. PELLERIN

Professeur de Chimie Analytique à la Faculté de Pharmacie PARIS XI,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

qui depuis trois années nous a accueillis dans son laboratoire, nous a fait bénéficier de ses conseils dans le domaine de la Chimie Analytique et a bien voulu nous faire l'honneur de présider cette thèse ; qu'il trouve ici l'expression de notre vive gratitude et le témoignage de notre attachement.

A Monsieur le Professeur M. HAMON

Professeur de Chimie Analytique à la Faculté de Pharmacie PARIS XI,
Directeur scientifique de la Pharmacie Centrale des Hôpitaux de Paris.

Nous lui exprimons nos remerciements pour l'accueil bienveillant et pour l'honneur qu'il nous a fait de faire partie du Jury de thèse.

A Monsieur le Professeur M. GUERNET

Professeur de Chimie Analytique à la Faculté de Pharmacie PARIS XI,
Pharmacien des hôpitaux.

Nous exprimons nos remerciements d'avoir accepté de juger ce travail et de faire partie du Jury de thèse.

A Monsieur le Professeur J.C. GOUNELLE

Professeur de Physiologie à la Faculté de Pharmacie PARIS XI.

Nous lui adressons l'expression de notre reconnaissance pour avoir bien voulu juger ce travail et faire partie du Jury de thèse.

A Monsieur P. LEROY

De la Société ROQUETTE Frères,

qu'il trouve ici l'expression de notre sincère amitié pour toute sa sollicitude durant nos séjours à la Société ROQUETTE à LESTREM. Nous tenons aussi à le remercier d'avoir accepté de faire partie du Jury de thèse.

A Monsieur M. HUCHETTE

A Mademoiselle F. VERWAERDE

de la Société ROQUETTE Frères.

Nous exprimons notre reconnaissance et nos remerciements pour leur étroite collaboration.

A Madame D. BAYLOCQ

A Madame C. MAJCHERCZYK

Ainsi qu'à tous les amis du laboratoire de Chimie Analytique et de la Pharmacie de l'Hôpital d'EAUBONNE que nous tenons à assurer de notre profond attachement pour leur accueil chaleureux et la sympathie qu'ils nous ont manifestée au cours de notre séjour.

A Monsieur A. CONTIVAL

A Monsieur COVIN

de la Société TECHNICON.

Nous tenons à les remercier pour l'aide matériel qui nous a permis de réaliser la deuxième partie de ce travail.

A mes Parents,

A tous ceux qui me sont chers

A tous ceux qui m'ont aidé.

INTRODUCTION

Les produits d'hydrolyse de l'amidon sont utilisés pour leur pouvoir sucrant et figurent, à ce titre, parmi les édulcorants nutritifs, en raison de leur pouvoir calorique élevé. Leur emploi est lié aux qualités technologiques qui dépendent elles-mêmes du degré d'hydrolyse des produits obtenus.

Les méthodes d'hydrolyse permettent de préparer une gamme de produits destinés à des emplois multiples comme édulcorants ou comme aliments ; c'est ainsi que les maltodextrines, obtenues par hydrolyse enzymatique à l' α amylase, figurent parmi les produits destinés à l'alimentation par sonde et dans certaines préparations pour enfants.

L'hydrogénation de ces produits conduit à des dérivés qui sont employés en industrie comme sucre de remplacement du saccharose jugé trop cariogène. Cette utilisation a été envisagée en raison des propriétés biologiques intéressantes de ces dérivés hydrogénés pour la prévention de la carie. Les hexitols sont en effet connus comme dépourvus de propriété cariogène du fait de leur faible pouvoir fermentescible. Ce caractère est suffisant pour orienter l'emploi des dérivés hydrogénés, notamment dans les produits de confiserie consommés en quantité plus importante pour les enfants. Tel est le cas du Lycasin, couramment utilisé dans de nombreux pays européens pour la fabrication de bonbons.

Le Professeur F. PELLERIN nous a demandé d'entreprendre une étude analytique des hydrolysats d'amidon pour un contrôle de qualité et de rechercher les produits de réversion. Ce sont des produits de réaction secondaire formés par recombinaison de molécules de dextrose ou D glucose. Les travaux et vérifications expérimentales ont été entrepris dans le but d'établir une monographie définissant les critères d'identité et de pureté.

Cette étude a aussi pour objet de servir de base pour la fixation de normes officielles, soit à l'échelle internationale et mondiale - O.M.S (Organisation Mondiale de la Santé), F.A.O. (Organisation de l'Alimentation et de l'Agriculture), soit à l'échelon européen - C.E.E. (Communauté Economique Européenne), soit enfin à l'échelon national pour l'utilisation dans diverses pharmacopées. L'étude apporte ainsi la justification du choix des techniques employées pour l'analyse des échantillons.

La réalisation pratique de ce travail a bénéficié des acquis que constituent les travaux effectués dans le domaine général de l'analyse des glucides pour l'étude de qualité du produit ; alors que la mise en évidence des sucres de réversion n'a pas encore abouti à une solution satisfaisante. Elle a pu être menée grâce à l'obligeance de la Société ROQUETTE Frères qui nous a fait bénéficier de son expérience, nous a fourni les échantillons et a mis à notre disposition les appareils et le matériel nécessaires à des essais particuliers.

Le présent mémoire comportera trois parties :

Après les généralités sur la préparation industrielle des produits d'hydrolyse, seront envisagées les méthodes d'analyse qui permettent d'assurer un contrôle de qualité des hydrolysats ainsi obtenus. La troisième partie sera consacrée à la recherche des sucres de réversion par une étude

comparative de deux hydrolysats ; l'un obtenu par voie acide et l'autre par voie enzymatique. Ces "sucres particuliers" doivent servir de test qualitatif pour l'identification des procédés d'hydrolyse.

P, L A N

INTRODUCTION

Première Partie : LES HYDROLYSATS D'AMIDON

<u>I - STRUCTURE DE L'AMIDON ET NATURE DES PRODUITS D'HYDROLYSE</u>	
I.1 - STRUCTURE DE L'AMIDON	page 11
I.2 - HYDROLYSATS D'AMIDON	page 13
<u>II - METHODES D'HYDROLYSE</u>	
II.1 - GENERALITES SUR LES METHODES D'HYDROLYSE	page 14
II.2 - HYDROLYSE ACIDE	page 15
II.2.1 - <u>Principe de la méthode</u>	page 15
II.2.2 - <u>Produits de réversion</u>	page 17
II.3 - HYDROLYSE ENZYMATIQUE	page 21
II.3.1 - <u>Caractères généraux des enzymes</u>	page 21
II.3.2 - <u>Propriétés des trois glucosides hydrolases</u>	page 22
II.3.2.1 - α amylase	page 22
II.3.2.2 - β amylase	page 23
II.3.2.3 - amyloglucosidase	page 23
<u>III - COMPOSITION ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PRODUITS D'HYDROLYSE DE L'AMIDON</u>	
III.1 - LES PRODUITS D'HYDROLYSE DE L'AMIDON	page 26
III.1.1 - <u>Les Maltodextrines</u>	page 28
III.1.2 - <u>Les sirops de glucose</u>	page 28
III.1.3 - <u>Le dextrose</u>	page 29

III.2 - CARACTERES DES PRODUITS D'HYDROLYSE	page	30
III.2.1 - <u>Qualités technologiques</u>	page	30
III.2.2 - <u>Utilisations des produits d'hydrolyse</u>	page	32

Deuxième Partie : CONTROLE DE QUALITE DES HYDROLYSATS D'AMIDON

IV - OBJECTIF DU CONTROLE DES HYDROLYSATS D'AMIDON

IV.1 - CARACTERES LIES AUX CONDITIONS	page	37
IV.1.1 - <u>Caractères physico-chimiques</u>	page	37
IV.1.2 - <u>Caractères technologiques</u>	page	38
IV.2 - ETUDE ANALYTIQUE DE LA COMPOSITION DES HYDROLYSATS	page	
IV.2.1 - <u>Principes et méthodes</u>	page	41
IV.2.2 - <u>Méthodes utilisées</u>	page	42
IV.3 - INTERPRETATION DES CHROMATOGRAMMES	page	44
IV.4 - ETUDE COMPAREE DU COMPORTEMENT A LA SACCHARIFICATION	page	49

Troisième partie : LES PRODUITS DE REVERSION

V - MISE EN EVIDENCE ET IDENTIFICATION DES PRODUITS DE REVERSION

V.1 - REALISATION EXPERIMENTALE DE LA REVERSION	page	55
V.1.1 - <u>A partir d'une solution pure de dextrose</u>	page	55
V.1.2 - <u>A partir d'échantillons préhydrolysés</u>	page	60
V.2 - APPLICATION A DES HYDROLYSATS INDUSTRIELS	page	60
V.2.1 - <u>Conduite du traitement</u>	page	61
V.2.2 - <u>Fractionnement par C.C.M.</u>	page	61
V.2.3 - <u>Fractionnement sur colonne charbon-célite</u>	page	62
V.2.4 - <u>Traitement par concentration</u>	page	63

V.3 - ANALYSE DES ECHANTILLONS PAR C.G.L.	page 67
V.3.1 - <u>Principe de la méthode</u>	page 67
V.3.2 - <u>Résultats et interprétations</u>	page 68
V.4 - ANALYSE DES ECHANTILLONS PAR RESINE ECHANGEUSE D'ANIONS	page 70
V.4.1 - <u>Principe de la méthode</u>	page 71
V.4.2 - <u>Conditions d'application</u>	page 73
V.4.3 - <u>Résultats et interprétations</u>	page 74

Quatrième partie : INTERPRETATIONS GENERALES (VI)

VI.1 - CONTROLE DE QUALITE DES HYDROLYSATS	page 85
VI.2 - ETUDE DES SUCRES DE REVERSION	page 86
VI.2.1 - <u>Analyse par chromatographie gaz liquide</u>	page 87
VI.2.2 - <u>Chromatographie sur résine échangeuse d'anions</u>	page 88

<u>CONCLUSION</u>	page 89
-------------------	---------

Annexe I - METHODE LUFF SCHOORL	page 90
Annexe II - ESSAI LIMITE NICKEL	page 93
Annexe III - REACTIF AU AgNO_3 / NaOH	page 94
Annexe IV - CHROMATOGRAPHIE DE PERMEATION SUR GEL	page 95
Annexe V - CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR COLONNE CHARBON-CELITE	page 96
Annexe VI - CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE	page 97
Annexe VII - CHROMATOGRAPHIE GAZ LIQUIDE	page 98
Annexe VIII - SEPARATION DES HOLOSIDES	page 101

<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	page 107
----------------------	----------

Première Partie : LES HYDROLYSATS D'AMIDON

I - STRUCTURE DE L'AMIDON ET NATURE DES PRODUITS D'HYDROLYSE

Synthétisé par voie biochimique grâce au processus d'assimilation chlorophyllienne, l'amidon est une des principales sources de glucides pour l'organisme. Il représente à ce titre la réserve nutritionnelle la plus répandue du règne végétal. On le trouve surtout accumulé dans les graines de légumineuses et de céréales (généralement utilisées sous forme de farine), dans les tubercules et les racines.

Au plan chimique, l'amidon est un polyholoside complexe dont l'unité fondamentale est la molécule de dextrose ou D glucose, aldohexose de formule brute $C_6 H_{12} O_6$.

I.1 STRUCTURE DE L'AMIDON

L'édifice de l'amidon est habituellement décrit comme résultant de la constitution de deux fractions distinctes de polysaccharides dont les proportions relatives varient en fonction de l'origine = (fig. 1).

- Un constituant mineur : l'amylose, polymère non ramifié, formé d'une chaîne d'unités α D glucopyranosyl, chimiquement liés par des liaisons α 1 - 4 ; c'est-à-dire le type de liaison osidique du maltose.

L'amylose donne une coloration bleue avec l'iode.

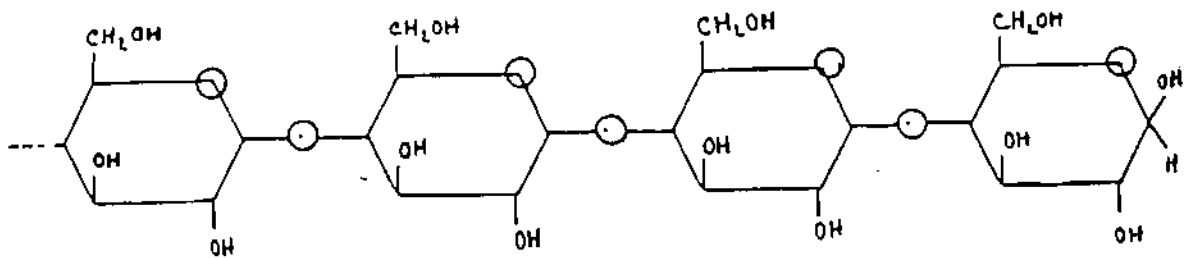
- Un constituant majeur : l'amylopectine, polymère ramifié, constitué de molécules de dextrose (α D glucose) également unies par des liaisons osidiques α 1 - 4 ; les ramifications étant assurées par des liaisons α 1 - 6 type isomaltose.

L'amylopectine donne une coloration rouge violacée en présence d'iode.

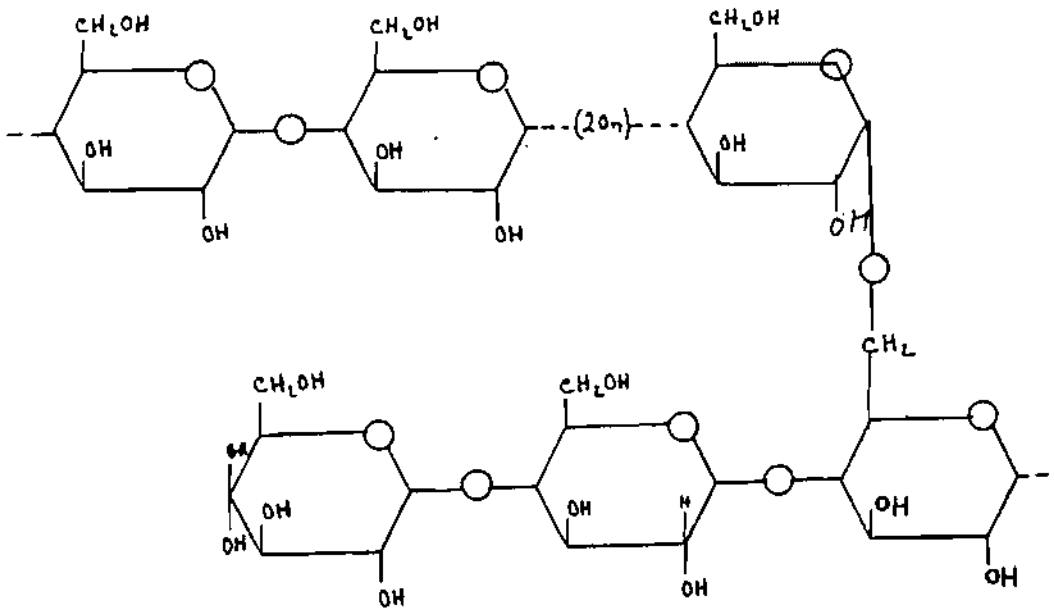
Les liaisons glucosidiques engagent les hydroxyles pseudoaldéhydiques porteurs de la propriété réductrice de la molécule de base et suppriment donc ce caractère dans les chaînes hautement polymérisées.

Figure 1 : STRUCTURES DES CHAINES MOLECULAIRES DE L'AMIDON

AMYLOSE



AMYLOPECTINE



Les études de structure de l'amidon effectuées par THOMPSON et WOLFROM (65) ont démontré la présence de liaison α 1 - 3 dans les chaînes d'amidon. Ces faits ont été confirmés par la détection de nigérose, diholoside à liaison α 1 - 3 , d'une part dans les hydrolysats acides obtenus dans des conditions peu agressives, et d'autre part dans des hydrolysats enzymatiques (1).

I.2 - LES HYDROLYSATS D'AMIDON

Les substances édulcorantes dérivées de l'amidon sont obtenues par dépolymérisation des composés par hydrolyse acide ou par hydrolyse enzymatique. Cette opération est une réaction au cours de laquelle la molécule d'amidon est scindée en dextrose et holosides de différents degrés de polymérisation, selon les conditions d'hydrolyse.

L'hydrolyse libère les fonctions aldéhydiques des unités dextrose constituant la molécule d'amidon et fait apparaître un pouvoir réducteur d'autant plus élevé que l'hydrolyse sera plus poussée.

Par hydrolyse ménagée, l'on aboutit à une gamme de produits aux applications multiples que nous développerons dans le chapitre traitant des produits d'hydrolyse.

L'hydrolyse complète de l'amidon conduirait à une solution de dextrose. Les études ultérieures montreront que l'hydrolyse complète n'est pas atteinte dans la pratique industrielle du fait de l'affinité des voies d'hydrolyse pour tel ou tel type de liaison et des réactions secondaires qui apparaissent dans le milieu.

En effet, certains auteurs dont KEER (31) pensent que cette voie, qui fut dans le passé la seule utilisable pour réaliser les hydrolyses, favorise la formation de produits de dégradation comme l'hydroxyméthylfurfural et des produits de recombinaison, dits produits de réversion. Le mécanisme exact de la formation de ces produits particuliers n'est pas encore élucidé quant aux conditions de leur apparition dans un milieu tel que l'hydrolysats.

L'évolution des connaissances sur l'utilisation des enzymes, leur facilité d'emploi tendent actuellement à préférer l'hydrolyse par voie enzymatique à l'hydrolyse par voie acide.

Parmi les problèmes liés à l'hydrolyse et aux facteurs qui affectent son efficacité, la spécificité d'action de l'agent hydrolysant, surtout lorsqu'il s'agit des enzymes, constitue à notre point de vue l'élément prépondérant.

Diverses opinions, parfois contradictoires ont été émises à partir d'observations effectuées sur la facilité de rupture des liaisons constituant la chaîne moléculaire de l'amidon.

Dans le cas de l'hydrolyse acide, par exemple, certains auteurs (20) estiment que la scission des liaisons α 1 - 6 est identique à celle des liaisons α 1 - 4. Pour PEAT et WHELAN (44), l'hydrolyse des liaisons α 1 - 6 est beaucoup plus lente que celle des α 1 - 4. Ces auteurs ont montré que les liaisons α 1 - 4 sont environ 4 fois plus sensibles que les liaisons α 1 - 6, et ceci compte tenu de la position de la liaison dans la molécule.

Les divergences d'observation proviennent, dans le cas des hydrolyses enzymatiques, de l'origine et du degré de pureté de l'enzyme, et dans le cas de l'acide, du type d'acide numéral utilisé.

II - METHODES D'HYDROLYSE

II.1 - GENERALITES SUR LES METHODES D'HYDROLYSE

Les méthodes d'hydrolyse, utilisées pendant plusieurs années dans les industries sucrières, étaient toutes basées sur l'utilisation de l'acide sulfurique ou de l'acide chlorhydrique à chaud.

Depuis quelques années, l'utilisation aisée de préparations commerciales d'enzymes telles que l' α amylase, la β amylase et l'amyloglucosidase, tend à faire de l'hydrolyse enzymatique la méthode industrielle de choix. Ces enzymes hydrolysent sélectivement les liaisons

glucosidiques, à l'inverse des acides minéraux, de telle sorte que les enzymes permettent l'obtention d'hydrolysats de composition variée, mais contrôlable. De plus, la saccharification enzymatique par l'amyloglucosidase permet une production quantitative de dextrose avec un rendement nettement supérieur à celui obtenu par la voie acide seule. Dès lors l'hydrolyse acide continue à n'être utilisée que pour l'obtention d'une gamme de produits moyennement hydrolysés.

Après ce rappel sur les structures de l'amidon et avant une étude approfondie d'une méthode d'hydrolyse, il nous paraît utile de préciser quelques notions nécessaires à la définition des produits dérivés de l'amidon.

Les dérivés d'hydrolyse sont caractérisés par leur degré d'hydrolyse qui est déterminée par le dosage du pouvoir réducteur de l'hydrolysate. Ce pouvoir est lié aux fonctions aldéhydiques libérées au cours de l'hydrolyse.

Notion de D.E. ou Dextrose équivalent :

On appelle Dextrose équivalent ou D.E., le pouvoir réducteur d'un produit exprimé en équivalent dextrose. Par exemple, un hydrolysate de DE = 25 est un hydrolysate dont 100 g de matière sèche ont un pouvoir réducteur identique à 25 g de dextrose pur.

Notion de Dx

La notion de Dx représente la teneur vraie en dextrose libre. La méthode la plus précise pour déterminer cette teneur est le dosage par la glucose oxydase (26).

II.2 - HYDROLYSE ACIDE

II.2.1 - Principe de la méthode

L'hydrolyse acide utilise l'action conjuguée de l'acidité du milieu $\text{pH} = 2$, de la température $\theta = 140^\circ$, et la durée du traitement (10 à 20 minutes) qui sont les conditions classiques d'hydrolyse en industrie.

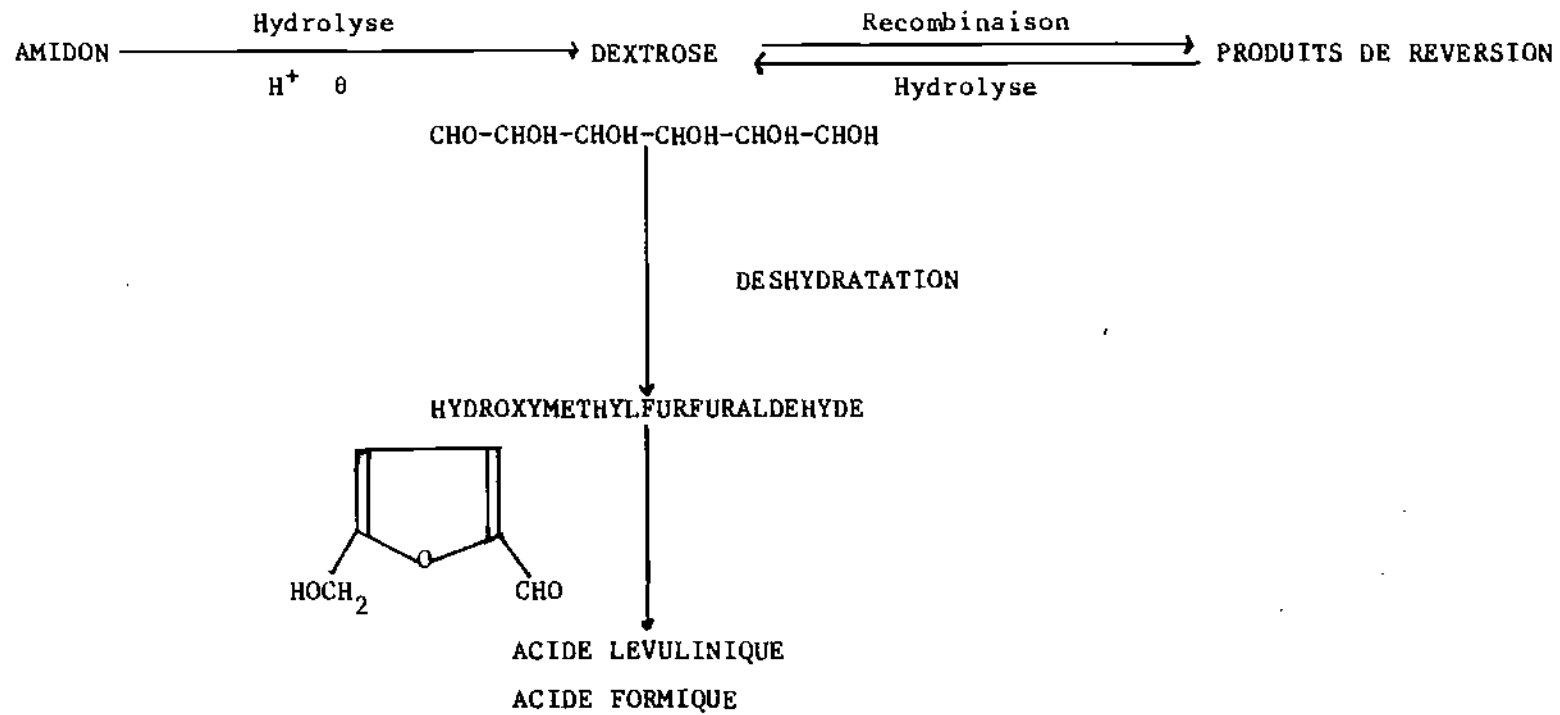


Figure 2

Le mécanisme d'attaque des liaisons est de type non spécifique, se traduisant par une coupure au hasard des liaisons α 1 - 4 et à un degré moindre, des liaisons α 1 - 6. La voie acide conduit à un mélange complexe de mono, di, triholosides, et à des oligoholosides ; certaines études ont permis de vérifier que l'hydrolyse acide ne laisse pas subsister dans l'hydrolysate de longues chaînes de polyholosides.

Lorsque l'hydrolyse acide devient intense, elle s'accompagne d'une destruction partielle des produits formés faisant apparaître dans le milieu des artefacts qui ne sont pas caractéristiques de la structure originelle de l'amidon tels que l'hydroxyméthylfurfuraldehyde et les produits de réversion. Ces produits sont des polyholosides qui se formeraient au cours de l'hydrolyse, par recombinaison de molécules de dextrose. Des travaux indiquent que les produits de réversion sont en équilibre avec les molécules de dextrose du milieu ; les conditions de cet équilibre sont la température, l'acidité du milieu et la concentration en glucose (fig.2).

II.2.2 - Produits de réversion

La recherche des produits de réversion dans les produits d'hydrolyse acide industrielle a été rendue nécessaire à la suite de difficultés rencontrées au cours de la séparation du glucose par cristallisation. En effet, selon SILIN et SAPENDINA (54), la présence de 1 g de produit de réversion dans les eaux mères de cristallisation ou "hydrolys", empêche la cristallisation de 2 g de glucose. En pratique, la présence de sucre de réversion affecte l'efficacité de la méthode d'hydrolyse car la perte totale en glucose représente le tiers de la quantité théoriquement attendue.

La notion de réversion introduite par WOHL (75) a été définitivement adoptée depuis 1953 à la suite des travaux de WOLFROM et COLL (77) sur la synthèse d'oligosaccharides, à partir de monosaccharides en milieu acide minéral.

Les premières expériences de synthèse de disaccharides, à partir de monosaccharides en milieu acide minéral, ont abouti à un nombre indéfini de produits probablement de plusieurs types, dont des

oligo et polyholosides. Les techniques d'analyse n'ayant pas permis de les séparer, ces produits ont été désignés sous des appellations diverses telles que gallisin, revertose, dextrinose et δ dextrose. Le premier disaccharide de synthèse a été identifié par FISCHER en 1890 (12) et nommé Isomaltose ; quelques années plus tard, fut isolé le gentiobiose qui était, au départ, confondu avec l'isomaltose. La formation du gentiobiose au cours de la réversion a été confirmée par les travaux de ISAJEV qui confirmaient également la formation préférentielle des liaisons 1 - 6 au cours du processus de réversion. Nous avons retenu quatre disaccharides qui peuvent résulter d'une réversion (fig. 1b).

Les travaux effectués avec d'autres oses ont montré que le phénomène de réversion est également possible avec des monosaccharides tels que : D galactose, xylose et arabinose.

Le mécanisme de formation des liaisons de réversion n'est pas encore exactement connu ; les travaux effectués à partir de solutions pures de dextrose, et cités précédemment, indiquent que le processus de formation est une réaction de condensation de molécules de dextrose catalysée par des ions hydrogène. Or, il n'est pas encore prouvé que la réversion se déroule de manière prépondérante à l'égard des monosaccharides. En effet, SROCYNSKI et COLL (59) ont montré, par analyse chromatographique sur couche mince avec du dextrose marqué au C_{14} , que la réversion au cours de l'hydrolyse pouvait s'effectuer selon deux voies :

- Condensation de deux molécules de dextrose accompagnée de la formation de diholosides avec des liaisons de type 1 - 6,

- Addition de molécules de dextrose, également par des liaisons 1 - 6, aux oligosaccharides présents dans la solution.

Cette étude est intéressante, mais les méthodes de détection ne permettent pas de se prononcer quant au mécanisme réel au niveau des polyholosides. La difficulté à définir parfois les produits de réversion relève du fait que certains diholosides (type Isomaltose) peuvent résulter aussi bien d'une réversion que d'une hydrolyse normale. A ce titre

citons deux travaux contradictoires : des études expérimentales, concernant la nature des liaisons résistant à l'hydrolyse acide, ont montré que l'Isomaltose des hydrolysats provient des liaisons α 1 - 6 de l'amidon, et non de la réversion (1 et 20) ; A l'inverse, SROCYNSKI et COLL(SB) ont constaté que l'isomaltose est le diholoside qui se forme de manière prépondérante au cours d'une attaque par voie acide.

A partir de ces observations, il convient d'envisager l'étude des sucres de réversion de manière précise, de façon à adapter la recherche à la composition de l'échantillon. C'est-à-dire qu'une telle étude ne sera effective que si sont pris en compte :

- la présence en faible quantité des sucres de réversion dans les hydrolysats, et donc de la nécessité de traiter les échantillons afin de les concentrer.

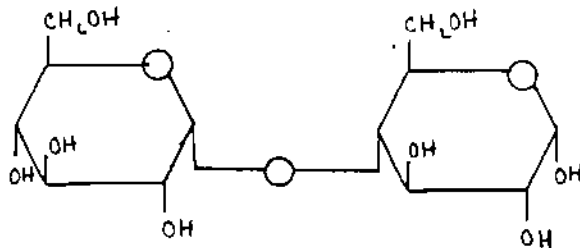
- la complexité du mélange de départ en holosides et des changements qu'il subit au cours des traitements.

Il est bon de noter que le comportement des oses diffère d'une solution pure de dextrose à un hydrolysats ; ceci a été montré par des études chromatographiques comparées d'une solution de dextrose soumise à la réversion pendant 5 heures à 120° et un hydrolysats traité dans des conditions analogues.

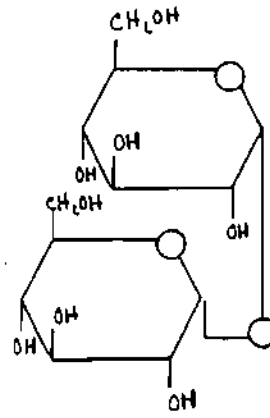
Munis de toutes ces données, nous avons estimé nécessaire de définir les produits de réversion comme étant des dérivés de repolymérisation du dextrose, formés par des liaisons autres que α 1 - 4, avec une prédominance des liaisons 1 - 6, étant entendu que le type α 1 - 6, en faible quantité, résulte des liaisons naturelles de l'amidon. La formation de ces produits est catalysée par l'acidité et la température du milieu.

Figure 1bis: SUCRE DE REVERSION

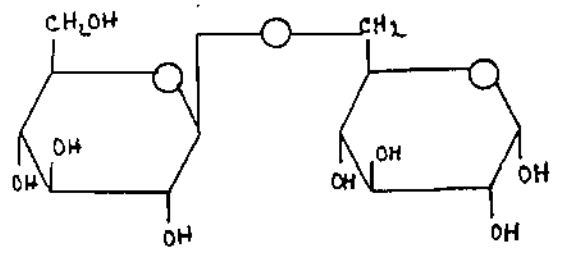
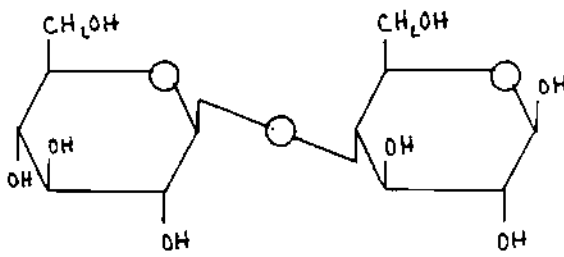
MALTOSE



TREHALOSE

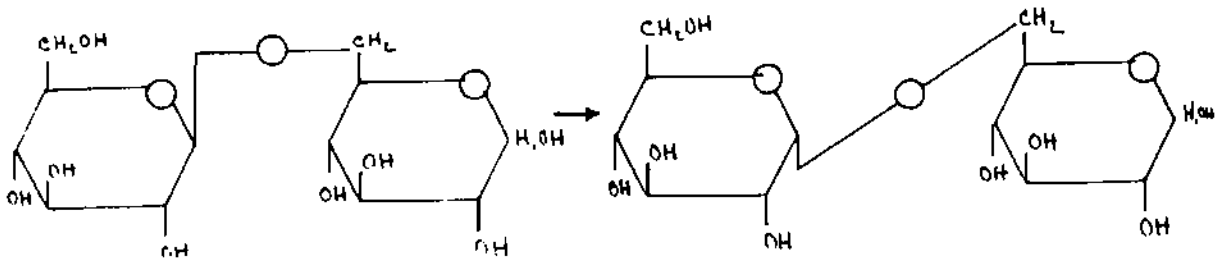


CELLOBIOSE



GENTIOBIOSE

ISOMALTOSE ET SON ANOMERE



II.3 - HYDROLYSE ENZYMATIQUE

II.3.1 - Caractères généraux des enzymes

La dégradation enzymatique de l'amidon a fait l'objet de multiples recherches pour élucider la structure de l'amidon et pour préciser les transformations qu'il subit au cours des processus digestifs et technologiques.

L'hydrolyse industrielle peut être comparée à l'hydrolyse enzymatique obtenue lors de la digestion. L'amidon subit en effet, à divers niveaux du tractus digestif, l'action des enzymes avec une transformation quantitative en glucose indispensable à l'organisme et véhiculé par le sang à la dose constante de 1 g/l (glycémie).

Les enzymes utilisées industriellement sont d'origines diverses, le plus souvent végétales ou produits par la fermentation de micro-organismes. Le mécanisme d'action est en général connu pour ces enzymes qui sont utilisées seules ou couplées en fonction des hydrolysats que l'on veut produire.

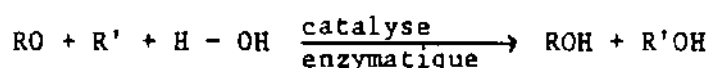
Nous envisageons l'étude des trois familles d'enzymes qui sont les plus utilisées en industrie pour préparer les hydrolysats. A l'intérieur de ces familles, nous décrirons les caractères principaux des enzymes qui entrent dans la fabrication ou le traitement des échantillons utilisés dans la partie analytique de notre travail.

Les trois enzymes sont des glucosides hydrolases, c'est-à-dire qu'elles hydrolysent les constituants macromoléculaires de l'amidon au niveau des liaisons glucosidiques ; ce sont :

- α amylase E.C. 3211
- β amylase E.C. 3212
- amyloglucosidase E.C. 3213

Leur action consiste à rompre, avec intervention d'une molécule d'eau, les liaisons glucosidiques des constituants macromoléculaires de l'amidon. Ces enzymes agissent comme catalyseurs en quantité infinitésimale ; c'est ainsi qu'une molécule de α amylase pure est capable d'hydrolyser 2.300.000 liaisons glucosidiques / minutes au voisinage de son optimum d'action.

Leur action est irréversible et répond au schéma réactionnel suivant :



R varie de 1 à n unités dextrose.

Cette méthode d'hydrolyse permet d'obtenir une variété de produits dont la composition dépend de paramètres tels que :

- la nature de l'enzyme, donc sa spécificité d'attaque des liaisons, caractère régissant la composition de l'hydrolysat.

- la durée de l'attaque enzymatique qui conditionne le degré d'hydrolyse.

- le pH du tampon et la température du milieu qui conditionnent la rapidité et l'efficacité d'action de l'enzyme. Ces conditions doivent être strictement définies pour que l'enzyme soit à son optimum d'action.

II.3.2 - Propriétés des trois glucosides hydrolases

II.3.2.1 - α amylase ou α D 1 - 4 glucane-glucanohydrolyse E.C. 3211

Les α amylases se rencontrent chez les animaux, les végétaux et les micro-organismes. Les α amylases utilisées en industrie sont obtenues à partir de micro-organismes tels que le bacillus subtilis et l'aspergillus oryzae. Les modes d'action et la spécificité de ces enzymes montrent une certaine diversité. L' α amylase qui est une exo-amylase catalyse la scission des liaisons glucosidiques α 1 - 4 dans les polysaccharides

contenant trois, ou plus, d'unités glucose, alors que l'hydrolyse des liaisons proches des unités terminales est très ralentie. Ceci explique la propension particulière de cette enzyme à former, à des stades intermédiaires, des holosides moyens, de degré de polymérisation (D.P.) 3 et 6. Le produit de la réaction est un mélange d'une faible quantité de glucose et maltose et d'oligoholosides. Elle sera le plus souvent utilisée pour la préparation des maltodextrines.

II.3.2.2. - β amylase ou α D 1 - 4 glucane-
maltohydrolase E.C. 3212

Présentes chez les végétaux supérieurs (malt, blé, soja), les β amylases ont été mieux connues grâce à THOMA et KOSHLAND (35) qui ont étudié leur activité et leur mécanisme.

La β amylase est une exo-amylase hautement spécifique des liaisons α 1 - 4, elle agit de façon méthodique en libérant des molécules de maltose à partir des extrémités non réductrices des chaînes d'anhydroglucose. Des attaques successives similaires se poursuivent jusqu'à une conversion totale en maltose. Il est reconnu que la β amylase pure ne convertit pas tout le polyholoside en maltose, son action reste bloquée au niveau des liaisons α 1 - 6, qui laissent subsister des fractions résistantes à l'enzyme, ce sont les "dextrines limites".

Cependant, la conversion ne s'effectue qu'à environ 80 %, la nature précise de l'obstacle à une β amylolyse totale n'est pas totalement élucidée ; parmi des origines possibles, citons le blocage de l'activité enzymatique au niveau des liaisons α 1 - 6 qui laissent subsister des fractions résistantes, appelées parfois β dextrines limites.

II.3.2.3. - Amyloglucosidase ou α 1 - 4 Glucano-
hydrolase E.C. 3213

Découvertes il y a une vingtaine d'années dans les moisissures (*Aspergillus niger*), les bactéries et les levures, les amylogluco-

sides sont actuellement bien connus quant à leur spécificité et leur mécanisme d'action.

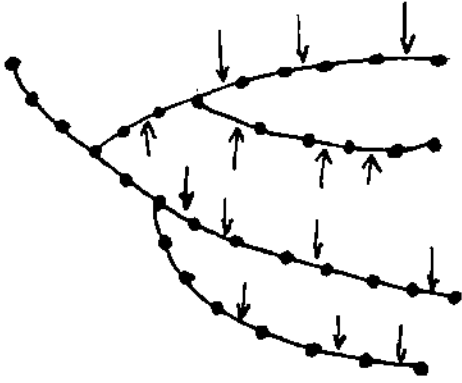
Cette enzyme n'est pas utilisée dans la pratique industrielle pour la préparation d'hydrolysats proprement dits, mais pour la saccharification totale enzymatique de l'amidon en vue d'une préparation quantitative du glucose (dextrose). On aboutit à une transformation presque totale du substrat en dextrose (taux de conversion théorique : 100 %), en fait, les techniques actuelles de saccharification enzymatique ne permettent d'atteindre que 97 de D.E.

Cette capacité de conversion tient de la faculté de l'enzyme à catalyser à la fois la rupture des liaisons α 1 - 4, α 1 - 6 et α 1 - 3. Selon PAZUR et KLEPPE (41), la vitesse d'hydrolyse des liaisons α 1 - 6 et α 1 - 3 est plus faible que celle des liaisons α 1 - 4. Ils estiment également que l'hydrolyse des longues chaînes est plus rapide que celle des courtes chaînes.

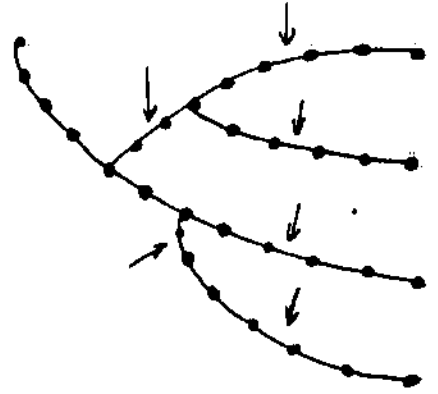
Avant de présenter un schéma des modes d'attaque des facteurs d'hydrolyse (Fig.3), il nous paraît important de signaler que l'expérience industrielle montre que la voie enzymatique est la méthode la plus utilisée en réalisant divers couplages, aussi bien pour la préparation d'hydrolysats intermédiaires que pour la conversion totale en glucose.

En préambule à la partie analytique de notre travail, et pour terminer ce chapitre des méthodes d'hydrolyse, il convient de préciser que l'hydrolyse enzymatique représente, pour les industries sucrières qui la réalisent, l'aboutissement de nombreuses années de recherches. Elle permet de produire des hydrolysats aux qualités précises et contrôlables en évitant les inconvénients rencontrés lors de l'hydrolyse acide. Dans ce cas, est-il possible de mettre en évidence, par une étude de la composition, un traceur qui permettrait de distinguer un hydrolysat ayant subi, à une étape intermédiaire de sa production, l'action d'un acide minéral d'un hydrolysat entièrement enzymatique ? Il nous a semblé que les produits de réversion dont la formation est favorisée par l'acidité et la température du milieu

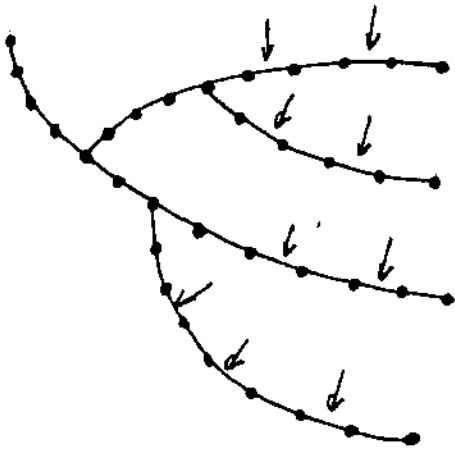
Figure 3 : METHODES D'HYDROLYSE



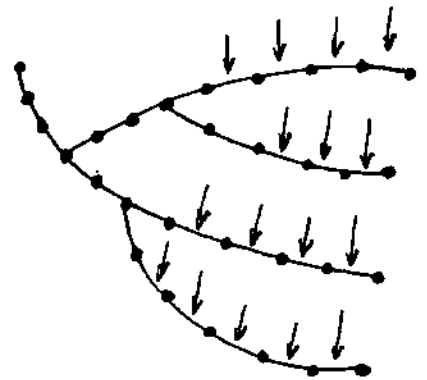
HYDROLYSE ACIDE



HYDROLYSE A α AMYLASE



HYDROLYSE A LA β AMYLASE



HYDROLYSE A L'AMYLOGLUCOSIDASE

sont utilisables à cette fin (74). Il est bien entendu que cette recherche sera envisagée comme test de qualité utilisable pour un contrôle de qualité.

III - COMPOSITION ET PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES PRODUITS D'HYDROLYSE DE L'AMIDON.

Utilisé depuis plusieurs années sous forme de poudre (fécule ou amidon) et de son unité de base D glucose, l'amidon a connu depuis quelques années un développement important pour ses dérivés résultant de l'hydrolyse partielle et ses dérivés d'hydrogénation. Ce regain d'intérêt correspond à la nécessité pour les industriels de trouver des sucres de remplacement du saccharose jugé trop cariogène pour certaines applications(2).

Doués d'un pouvoir calorique élevé, mais de saveur sucrée plus faible, ces dérivés d'hydrolyse de l'amidon possèdent en outre des particularités biologiques et technologiques qui leur permettent d'occuper une place importante dans les industries alimentaires et pharmaceutiques.

III.1 - LES PRODUITS D'HYDROLYSE DE L'AMIDON

Les produits d'hydrolyse de l'amidon sont des mélanges d'holosides dont la composition dépend à la fois de la méthode d'hydrolyse mise en oeuvre et de la durée de la réaction. Ces produits seront principalement caractérisés par leur D.E. ou Dextrose Equivalent, de telle sorte que l'on distingue trois familles de produits d'hydrolyse représentées dans le tableau I. Nous y décrivons aussi bien les dérivés d'hydrolyse que les dérivés d'hydrogénation

L'hydrolyse acide est utilisée en industrie pour préparer des hydrolysats de D.E. = 30 - 45, alors que l'hydrolyse enzymatique permet d'obtenir une gamme de produits de D.E. désiré. En effet, lorsque pour des raisons technologiques, il paraît nécessaire de rechercher un sirop de glucose à profil glucidique particulier, par exemple riche en maltose, ceci peut être obtenu par la voie enzymatique.

SCHEMA D'HYDROLYSE DE L'AMIDON
ET DERIVES HYDROGENES

DE = 0	AMIDON	Dérivés d'hydrolyse		Dérivés hydrogénés	
DE = 20		MALTODEXTRINES	I O N	MALTODEXTRINES HYDROGENES	
DE = 43	Glucose acide	HYDROLYSATS D'AMIDON OU SIROPS DE GLUCOSE	A T O G E N E S	LYCASIN 80/55	
DE = 65					
DE = 100					DEXTROSE

Glucose enzymatique

- TABLEAU I -

La connaissance de la composition des hydrolysats d'amidon a été rendue possible grâce aux méthodes chromatographiques qui ont connu un important développement depuis quelques années. Ces méthodes constituent un instrument indispensable pour l'analyse de tels produits dont la composition est parfois complexe.

Ces études permettent de donner des définitions en accord avec la Directive "Sucres" - J.O. des Communautés du 27/12/1973, déjà adoptée dans la plupart des pays membres (85). Ces définitions sont utiles pour distinguer les produits obtenus à divers stades de l'hydrolyse.

III.1.1 - Maltodextrines

Ce sont des hydrolysats de faible D.E. (entre 3 et 20), obtenus généralement par hydrolyse enzymatique (principalement α amylase) et présentés sous forme de poudre obtenue par atomisation et dont le taux d'humidité doit être inférieur à 5 %.

Le terme "Dextrine" est parfois utilisé pour remplacer le terme "Polysaccharide" dans l'appellation "Maltodextrine".

III.1.2. - Sirops de glucose

Les sirops de glucose sont définis au J.O. des Communautés comme des solutions aqueuses purifiées et concentrées de saccharides nutritifs, obtenus à partir d'amidon et / ou de fécule et répondant aux caractéristiques suivantes :

- matière sèche : pas moins de 70 % en poids,
- D.E. < 20 % en poids sur la matière sèche, exprimé en D glucose.
- Cendres sulfatées < 1 % en poids sur la matière sèche.
- SO₂ en général < 20 ppm, mais ce chiffre peut être limité selon les dispositions propres à chaque pays jusqu'à 400 ppm.

La concentration à 70 % de matière sèche permet d'assurer une meilleure stabilité bactériologique.

Cette définition regroupe tous les hydrolysats dont le D.E. se situe entre 20 et 100. En tenant compte des réalités industrielles, il nous paraît plus exact de dire que les sirops de glucoses sont des solutions aqueuses purifiées et concentrées de saccharides nutritifs de D.E. 20 à 70 obtenus par hydrolyse acide (30 à 45 de D.E.) ou enzymatique avec une teneur en matière sèche de 70 % au moins.

III.1.3. - Dextrose

Pour éliminer toute ambiguïté, on utilise dans l'industrie le terme "Dextrose" pour désigner le D glucose.

L'hydrolyse enzymatique la plus complète de l'amidon (α amylase + amyloglucosidase) conduit à un sirop riche en dextrose. Les cristaux de dextrose sont obtenus par concentration et cristallisation en plusieurs jets.

Par hydrogénation de ces dérivés d'hydrolyse il est possible de préparer une gamme de produits hydrogénés dont certains présentent un intérêt alimentaire particulier. A ce titre, le Lycasin 80/55 est utilisé en confiserie pour ses propriétés non cariogènes.

Le lycasin est un sirop de glucose hydrogéné obtenu à partir d'un hydrolysat résultant d'une hydrolyse enzymatique à l' α et β amylase jusqu'à D.E. de 48-52 et technologiquement fait pour la fabrication de bonbons.

Ces produits d'hydrolyse de l'amidon exigent une définition qui permette de les distinguer des autres produits existant sur le marché et produits, soit par des réactions d'addition comme le carboxyméthylamidon et le glycerol propylamidon, soit par polymérisation du dextrose comme le polydextrose.

Le polydextrose est obtenu par condensation au hasard de molécules de dextrose avec des molécules de sorbitol et d'acide citrique. Cette polymérisation se traduit par une prédominance des liaisons de type 1 - 6.

III.2 - CARACTERES DES PRODUITS D'HYDROLYSE

Deux propriétés expliquent l'intérêt porté aux produits d'hydrolyse de l'amidon. Ce sont leurs qualités technologiques et leurs propriétés biologiques.

III.2.1. - Qualités technologiques (Tableau II)

Quatre propriétés interviennent de manière prépondérante dans la définition des qualités technologiques des hydrolysats en vue de leur utilisation dans l'industrie alimentaire, ce sont :

- la viscosité
- le pouvoir liant
- le pouvoir anticristallisant
- la saveur sucrée.

Pour un faible degré d'hydrolyse, les polysaccharides supérieurs confèrent à l'hydrolysate une texture longue et filante, donc une viscosité élevée. Celle-ci varie en raison inverse du degré d'hydrolyse, de même que le pouvoir liant. En règle générale, pour des hydrolysats de moyen D.E., on peut atteindre des concentrations élevées en matière sèche sans qu'il y ait cristallisation. Les oligosaccharides assurent cet équilibre de telle sorte que les hydrolysats de D.E. élevé ont tendance à cristalliser.

La saveur sucrée des produits d'hydrolyse de l'amidon est inférieure à celle du saccharose considéré comme le sucre de référence ; ces produits doivent donc leur intérêt à d'autres qualités.

- Saccharose : 1
- sirop bas D.E. : 0,4
- Sirop haut D.E. : 0,6
- Dextrose : 0,7

PROPRIETES GENERALES DES DIFFERENTS SIROPS DE GLUCOSE -
MALTODEXTRINES - DEXTROSE

- d'après leur degré de transformation ou hydrolyse
par rapport à l'amidon -

PROPRIETES CONFEREES A L'UTILISATION	Amidon	Dextrose
	DE = 0 bas DE	DE élevé C6
	DE = 20	→
	MD 05	sirops de glucose
	MD 05	SG 25
		SG 50
	Maltodextrines	
VISCOSITE	←	
HYGROSCOPICITE	→	
POUVOIR LIANT - COHESION	←	
POUVOIR ANTI- CRISTALLISANT	←	
SAVEUR SUCREE	→	
VALEUR NUTRITIVE	←	
POUVOIR REDUCTEUR - BRUNISSEMENT	→	

- TABLEAU II -

III.2.2 - Utilisations des produits d'hydrolyse

L'hydrolyse de l'amidon donne des préparations sirupeuses plus ou moins transformées qui sont utilisées telles quelles ou soumises à l'hydrogénation ou à l'isomérisation pour donner une famille de produits utilisables dans de nombreux domaines, notamment en pharmacie et dans les industries alimentaires.

Les maltodextrines qui sont des hydrolysats de faible D.E. constituent d'excellents nutriments pour l'alimentation par sonde et pour les aliments destinés aux nourrissons. L'équipement enzymatique du tube digestif permet la transformation des polymères en dextrose. Il semble que la vitesse d'assimilation ne soit pas influencée par le degré d'hydrolyse. Dans le cas contraire, des problèmes de tolérance digestive et d'osmolarité auraient pu se poser. Ce chapitre n'a pas fait l'objet d'une étude dans le cadre de notre travail.

Par hydrolyse ménagée, on obtient des produits appelés sirops de glucose. Ces sirops constituent des matières premières importantes pour la chocolaterie et la confiserie. Ces produits entrent également dans la formulation galénique des pastilles et des dragées.

Les hydrolysats très riches en dextrose sont préparés par saccharification enzymatique et le dextrose, séparé par cristallisations successives, est utilisé pour la préparation de solutés massifs de glucose apyrogène pour perfusion.

A la Pharmacopée 1972, sont inscrits 3 "glucoses" regroupés sous deux définitions :

- glucose anhydre et le glucose monohydrate utilisés pour l'alimentation parentérale.

- sirop de glucose improprement appelé glucose liquide, utilisable dans les pâtes officinales (Pharmacopée 1965).

A côté de ces produits, se développe également l'utilisation des dérivés hydrogénés :

- le sorbitol est utilisé depuis longtemps comme cholagogue et régulateur du transit intestinal.

- le développement des sirops de glucose hydrogéné est plus varié et plus récent. Les sirops de sorbitol sont utilisés comme humectants dans les pâtes dentifrices et leur utilisation comme substitut de la glycérine connaît un important développement.

- le lycasin que nous avons défini précédemment fait également partie de cette famille. C'est un dérivé technologiquement apte pour la fabrication de bonbons, et déjà utilisé dans de nombreux pays étrangers.

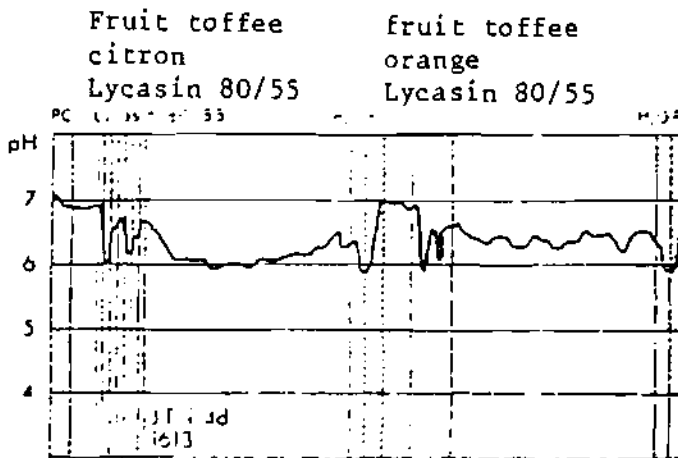
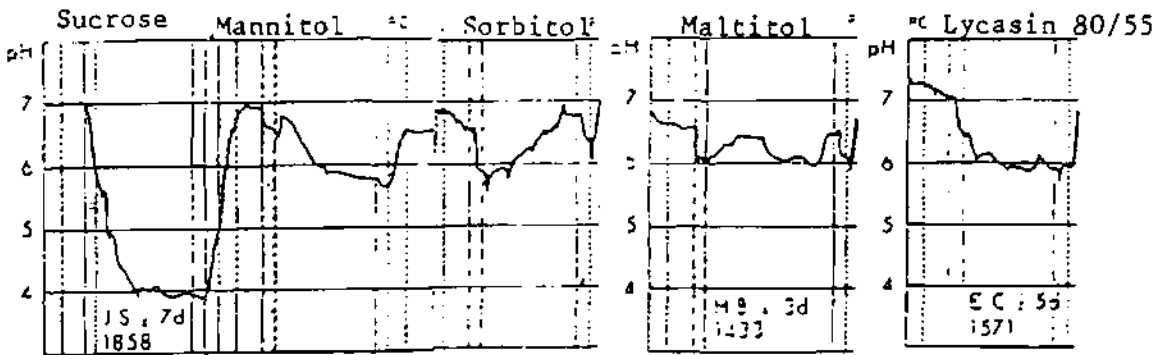
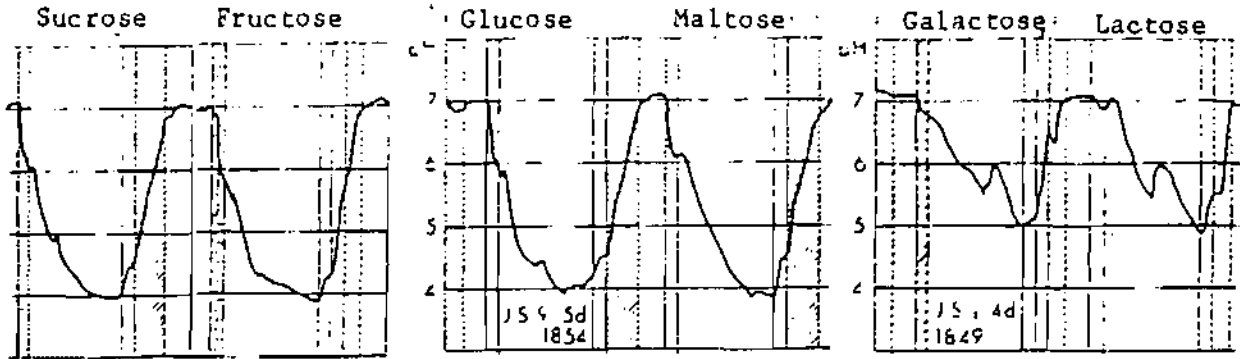
Son utilisation en confiserie est devenue recommandable parce que les itols sont connus pour leur faible pouvoir cariogène, en raison des propriétés moins acidogènes en présence des bactéries de la plaque dentaire (*Streptococcus mutans*).

Pour l'histoire, nous dirons que le lycasin a démarré sa carrière en Suède et dans les Pays Scandinaves, puis en Suisse où la mise au point de techniques sophistiquées d'étude de pH intraoral par le Professeur MULHEMAN a confirmé cette propriété. Les mesures effectuées par microélectrode et radiotéléométrie ont en effet confirmé la chute du pH au niveau de la plaque dentaire, plus faible avec le lycasin qu'après ingestion de saccharose (Fig. 4).

Ces études ont permis de donner au lycasin les caractéristiques physicochimiques pouvant satisfaire aux qualités biologiques "inoffensifs pour les dents" exigées par la réglementation des pays utilisateurs.

Les courbes suivantes indiquent les variations de pH au niveau de la plaque dentaire, après ingestion de divers produits sucrés, en comparaison avec le LYCASIN.

Figure 4



Deuxième Partie : CONTROLE DE QUALITE DES HYDROLYSATS D'AMIDON

Il n'est certes pas possible de définir dans l'absolu la qualité et de concevoir les produits adaptés à satisfaire ces normes. Néanmoins, nous proposons ici deux appréciations qui apparaissent à la lecture du dictionnaire et qui orientent l'esprit de notre travail.

La qualité est définie comme étant :

- la manière d'être d'une chose, ce qui détermine sa nature : attribut, caractère, propriétés.
- ou l'excellence d'une chose, d'un produit, c'est-à-dire son degré de perfection.

Ces deux sens de la qualité nous conduisent à envisager l'appréciation de la qualité en référence à un modèle implicite qui, pour des raisons technologiques, s'est imposé comme norme.

La qualité ne se contrôle pas, mais elle se fabrique. et le contrôle analytique rend compte de la constance de fabrication et de l'ensemble des spécifications définies à tous les stades. La qualité est donc un acquis et son contrôle consiste en fait à décrire les caractéristiques du produit et à les fixer comme normes.

Celles-ci sont fixées en fonction des conditions de fabrication industrielle et de l'expérience acquise quant à l'homogénéité des lots et de la constance des résultats. Cette conception de la notion de qualité autorise à envisager le contrôle de qualité :

- dans le cas d'une vérification de la composition d'un hydrolysat obtenu industriellement et destiné à un usage précis, pour s'assurer qu'il correspond au produit attendu.
- conformité du produit aux caractéristiques technologiques exigées pour satisfaire à l'emploi.

Les méthodes de contrôle doivent permettre de s'assurer, d'une part des caractéristiques physico-chimiques, et d'autre part de la composition moyenne du produit, étant entendu que les techniques employées doivent être rapides, efficaces et peu onéreuses. Ce contrôle doit être perçu comme une détection d'écart par rapport aux limites fixées, qui sont celles de la qualité du produit affecté à tel ou tel usage, afin de les compenser. Il ne constitue donc pas seulement une mesure absolue, mais une vérification de la conformité à l'intervalle des limites fixées.

Ce type d'étude fait appel à des méthodes d'analyse nombreuses et variées (physique, chimique et bactériologique), de réalisation parfois délicate. Dans cet ensemble, nous avons tenté de faire un choix des méthodes faciles à interpréter, avec l'espoir que l'exécution soit simple et rapide. Dans le domaine de l'analyse des holosides, la chromatographie est devenue un moyen courant d'analyse qualitative et quantitative. Ces techniques sont employées au Laboratoire et dans l'Industrie, aussi bien pour l'analyse proprement dite que pour la préparation et la purification de constituants.

La structure de ces produits leur confère des caractères qui posent des problèmes pour certains types d'analyse ; c'est ainsi que l'absence de groupement chromophore ne permet pas la détection des glucides en spectrophotométrie ultra-violette.

IV - OBJECTIF DU CONTROLE DES HYDROLYSATS D'AMIDON

Il ne s'agit pas de mesurer des constantes au sens physique du terme, mais d'établir des spécifications (teneurs maximales ou teneurs minimales) qui peuvent être assurées par une bonne pratique de fabrication.

Les méthodes analytiques utilisées pour effectuer ce contrôle seront, d'une part des méthodes classiques de mesures des propriétés physico-chimiques, et d'autre part des techniques chromatographiques qui, grâce à l'automatisation des systèmes (chromatographie liquide à haute performance) permettent des analyses rapides et d'application pratique.

IV.1 - CARACTÈRES LIES AUX CONDITIONS D'HYDROLYSE

Les hydrolysats d'amidon sont obtenus par hydrolyse acide chlorhydrique ou par hydrolyse enzymatique dans des conditions de pH obtenues par le choix d'un tampon adéquat. Ces sels minéraux sont capables de perturber la séparation des glucides de l'échantillon à analyser. Ils doivent être éliminés par passage sur des résines échangeuses d'ions à lit mixte, avant toute analyse.

IV.1.1 - Caractères physico-chimiques

Les méthodes utilisées pour vérifier ces caractères sont, pour la plupart, des méthodes simples, employées dans de nombreux domaines et applicables aux hydrolyses pour contrôler leur aptitude à l'usage industriel auquel ils sont destinés.

IV.1.1.1 - Mesure du pH

Cette détermination est effectuée par pH-métrie à l'électrode combinée (verre/calomel) sur une solution d'hydrolysat amenée à 40 % de matière sèche.

Sa détermination est importante pour la fixation des caractères des produits hydrogénés destinés à la confiserie.

Résultat : le résultat varie de pH 6 à 7.

IV.1.1.2 - Mesure de résistivité

Déterminée par les méthodes conductimétriques, cette mesure renseigne sur la teneur résiduelle en ions minéraux de l'hydrolysat. Elle n'exclut pas la recherche individuelle des ions lorsque ceux-ci ont été introduits au cours de la préparation de l'hydrolysat.

IV.1.1.3 - Recherche d'éléments toxiques :
Arsenic

- Effectuée suivant la méthode B de la Pharmacopée IX,
page II 250. -

On peut signaler cependant que cette recherche, ainsi que celle d'autres métaux, comme le plomb, est liée à l'origine de l'acide minéral (acide sulfurique) utilisé dans le passé pour réaliser les hydrolyses acides. Cette recherche ne représente plus le même intérêt dans la mesure où l'acide chlorhydrique est celui actuellement utilisé dans l'industrie pour réaliser les hydrolyses et que, de plus, les hydrolyses entièrement enzymatiques se généralisent.

Résultat : inférieur à 1 ppm.

IV.1.1.4 - Recherche et dosage du Nickel

Cette recherche est surtout effectuée sur les hydrolysats hydrogénés afin de doser les résidus du catalyseur utilisé pour la réaction d'hydrogénation. La méthode à la diméthylglyoxime est d'application courante, la spectrophotométrie par absorption atomique constitue une technique de dosage rapide et beaucoup plus précise.

Résultat : essai limite : 1 ppm

IV.1.2 - Caractères technologiques

IV.1.2.1 - Matière sèche

Comme nous l'avons indiqué dans la définition des hydrolysats d'amidon, la matière sèche intervient dans le maintien de la stabilité bactériologique et physique car il peut apparaître des phénomènes de rétrogradation pour les maltodextrines (d'où leur conservation sous forme de poudre ou de cristallisation pour les hydrolysats à haut D.E.). Trois méthodes sont utilisables pour déterminer cette teneur :

1/- Dosage de l'eau par la micro-méthode de KARL FISCHER

2/- Détermination de l'indice de réfraction et calcul de la matière sèche d'après un facteur de correction.

3/- Dessiccation de l'hydrolysate à 100°C jusqu'à poids constant.

Parmi toutes ces méthodes, la détermination de la matière sèche par mesure de l'indice de réfraction a été utilisée le plus souvent durant notre travail, car elle a le mérite d'être simple, rapide et surtout facile à réaliser. Les autres méthodes sont, dès lors, utilisées pour une confirmation.

IV.1.2.2 - la viscosité

La viscosité des produits d'hydrolyse constitue un caractère technologique important car elle conditionne l'aptitude à l'emploi. Elle règle en effet, de façon certaine, la fluidité, le pouvoir liant et la cohésion de l'hydrolysate. En somme, sa détermination est capitale pour la connaissance des propriétés rhéologiques du produit.

De plus, elle donne sur le plan analytique des indications sur la masse moléculaire moyenne du produit, et varie en raison inverse du degré d'hydrolyse.

A la Pharmacopée 1972, la mesure de la viscosité s'effectue par le viscosimètre capillaire d'OTSWALD. Cependant, il est apparu préférable de recourir à la méthode du viscosimètre à bille ; celle-ci est fondée sur la durée de chute d'une bille par comparaison à une gamme témoin.

Ce type d'appareil, très répandu pour l'étude des fluides newtonniens, est basé sur la vitesse de chute d'une bille dans un cylindre rempli du liquide à étudier. Le diamètre de la bille étant petit par rapport à celui du cylindre, on peut utiliser la Loi de STOKES :

$$\eta = \frac{2}{9} (\rho_s - \rho) \frac{g R^2}{V}$$

En pratique, on chronomètre le temps de passage de la

bille entre deux repères (le liquide ne doit donc pas être opaque) situés suffisamment loin des extrémités du tube, c'est-à-dire dans la zone où la bille se déplace à vitesse constante.

De nombreuses corrections sont indispensables, c'est pourquoi il est préférable d'effectuer des mesures d'étalonnage en utilisant un liquide de masse volumique et de viscosité connus.

Ce procédé se révèle particulièrement mieux adapté à l'interprétation pour l'étude de viscosité.

IV.1.2.3 - Détermination du degré d'hydrolyse

La détermination du degré d'hydrolyse est effectuée par le dosage du pouvoir réducteur de l'hydrolysate selon la méthode de Gabriel BERTRAND, décrite à la Pharmacopée.

Ce dosage utilise la propriété réductrice des oses et de certains oligosaccharides dont la fonction aldéhyde ou cétone est libre vis-à-vis des ions métalliques, en particulier des ions cuivriques, en milieu alcalin. Cette réaction non stoechiométrique peut cependant être utilisée quantitativement en respectant des conditions précises et en opérant par comparaison avec des solutions étalons de sucre à doser.

Une deuxième méthode, préconisée par LAYNE et EYNON, est couramment utilisée dans les industries sucrières. C'est une variante de la méthode utilisant la liqueur de Fehling, rendue plus précise par l'emploi du bleu de méthylène comme réactif indicateur (erreur maximum : 1 %).

Dans le cadre de notre travail, cette détermination a été effectuée par la méthode de LUFF SCHOORL dont l'usage comme méthode internationale officielle est envisagé dans le domaine de l'analyse alimentaire. (Annexe 1).

Les méthodes que nous venons de traiter sont classiquement utilisées pour contrôler les qualités premières des hydrolysats ; il paraît nécessaire d'ajouter, suivant la méthodologie envisagée, des études faites dans le cadre d'une analyse plus poussée en vue d'une meilleure connaissance des produits d'hydrolyse.

Cette étude consiste à déterminer la répartition des poids moléculaires dont les proportions varient avec les méthodes d'hydrolyse. Les méthodes utilisées seront développées avec précision car elles ne figurent pas comme telles parmi les méthodes officielles d'analyse, et ont nécessité parfois une mise au point particulière.

IV.2 - ETUDE ANALYTIQUE DE LA COMPOSITION DES HYDROLYSATS

IV.2.1 - Principes et méthodes

Les très nombreux procédés d'analyse qualitative et quantitative de glucides figurent dans la bibliographie ; dans notre travail, nous avons élaboré la méthodologie à suivre pour l'analyse des hydrolysats d'amidon.

Le principe général des méthodes décrites repose sur les techniques chromatographiques :

- les techniques simples servant de test qualitatif, comme la chromatographie sur couche mince ou CCM.
- les techniques automatisées comme la chromatographie sur colonne avec auto-analyseur et la chromatographie liquide à haute performance ou HPLC.

La chromatographie sur couche mince est utilisée comme test qualitatif sensible pour l'analyse de glucides simples ; mais s'avère insuffisante pour l'analyse de produits complexes comme les hydrolysats composés en partie de hauts polymères. Elle s'impose, néanmoins, comme la première technique d'analyse basée sur la séparation de composés.

La chromatographie gaz liquide, du fait de sa sensibilité élevée, est largement utilisée pour l'analyse des traces de glucides mais elle nécessite un traitement de l'échantillon qui doit être rendu volatil ; de plus, elle ne permet pas de mettre en évidence les polymères supérieurs aux diholosides.

La chromatographie sur colonne constitue l'outil de choix pour l'analyse des sucres car elle permet une analyse réelle de l'échantillon sans traitement préalable. De plus, grâce à l'automatisation de système comme l'HPLC, ce type d'analyse devient rapide et d'application pratique.

IV.2.2 - Méthodes utilisées pour l'étude analytique de la composition

Selon le procédé que nous proposons, la CCM représente la première étape d'une investigation car elle donne des indications sur la répartition des produits à analyser.

IV.2.2.1 - Chromatographie sur couche mince

- Plaque de cellulose
- Le système de solvant utilisé est le suivant :
 - . Acétate d'éthyle : 65
 - . Pyridine : 35
 - . Eau : 20
 - . Acide acétique : 7
- Quantité déposée : 5 μ l d'une préparation de l'échantillon en essai à 50 mg/ml
- Réactif : AgNO_3 / NaOH (Annexe III).

La révélation est obtenue par pulvérisation du réactif au Nitrate d'argent et séchage à l'étuve à 110° pendant 5 minutes pour fixer les taches. Ce réactif n'est pas spécifique et les taches apparaissent en brun.

D'après nos essais, la séparation des oligoholosides jusqu'à un degré de polymérisation 10 ou D.P. 10 et l'élution sont d'autant plus améliorées que l'on réalise plus de migrations successives de longues durées. La séparation obtenue dépend des poids moléculaires ; cela nous permet d'envisager les méthodes chromatographiques sur colonne.

IV.2.2.2. Chromatographie d'exclusion. Filtration ou chromatographie de perméation sur gel (Annexe IV)

La chromatographie sur colonne constitue, pour l'analyse des hydrolysats, une méthode de choix parce qu'elle est d'application pratique et ne nécessite pas de transformation préalable des échantillons à analyser.

Avant d'envisager l'aspect pratique du sujet, il paraît nécessaire de rappeler les trois principes de séparation, utilisables en chromatographie sur colonne :

- la chromatographie d'adsorption (charbon-célite)
- la chromatographie de perméation sur gel (Biogel P₂)
- la chromatographie de partage (par résine échangeuse d'ions).

L'étude analytique de la composition des hydrolysats ne peut être envisagée qu'à travers ses caractéristiques moléculaires. C'est pourquoi, nous proposons la chromatographie d'exclusion diffusion ou la chromatographie de perméation sur gel qui, sans être sélective, réalise un tamisage moléculaire et donne avec précision la répartition moléculaire des constituants de l'hydrolysat.

La séparation effectuée sur colonne de Biogel P₂ : gel de polyacrylamide est décrite à l'annexe IV.

Après séparation, les différents polymères sont identifiés par la méthode colorimétrique à l'Orcinol sulfurique. Le principe de la méthode originale de TILLMANS et PHILLIPI (67) repose sur la condensation de l'orcinol (dihydroxytoluène) avec les produits de dégradation des

hexoses par l'acide sulfurique.

La méthode a été plusieurs fois remaniée puis automatisée par TOLLIER et ROBIN (68). Cette méthode de détection colorimétrique est actuellement d'usage répandue en analyse alimentaire.

La colonne de Biogel P₂ permet une séparation plus étendue des divers polymères, cependant, la durée de la manipulation (5 heures), nous a conduits le plus souvent à pratiquer la chromatographie liquide à haute performance d'application rapide et de mise en oeuvre facile.

Elle réalise néanmoins une séparation moins étendue et la détection est effectuée par réfractométrie différentielle, car les sucres ne possèdent pas de groupements chromophores et ne sont donc pas dosables par des détecteurs à UV. Cette méthode doit être considérée comme la plus adaptée à une analyse de routine.

IV.3 - INTERPRETATION DES CHROMATOGRAMMES

La chromatographie de filtration-exclusion fournit des renseignements précieux, à la fois sur la complexité des hydrolysats et sur la distribution des masses moléculaires des divers holosides (Fig. 5,6,7 - Tableau III).

L'examen des chromatogrammes montre que pour un même D.E., la composition des hydrolysats varie en fonction du type d'hydrolyse, et dans le cas des hydrolysats enzymatiques, en fonction de l'enzyme utilisée.

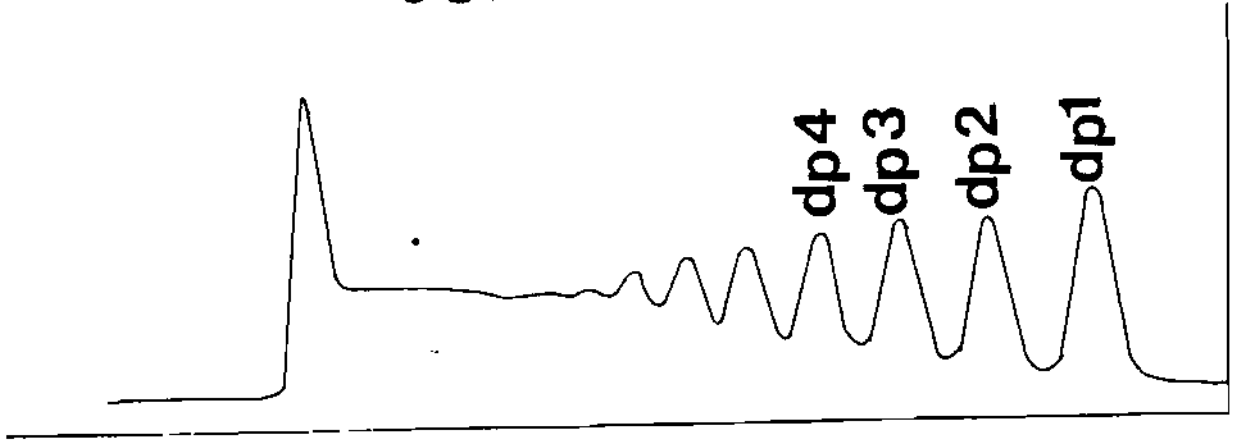
La composition de l'hydrolysat acide semble plus équilibrée ; les oligosaccharides possèdent, en effet, presque tous la même hauteur de pic. De plus, l'hydrolysat acide contient très peu de polysaccharides supérieurs.

L'hydrolysat obtenu par l'action de la β amylase présente un pic élevé en disaccharides, ce qui correspond à la propriété de l'enzyme de produire des hydrolysats riches en maltose.

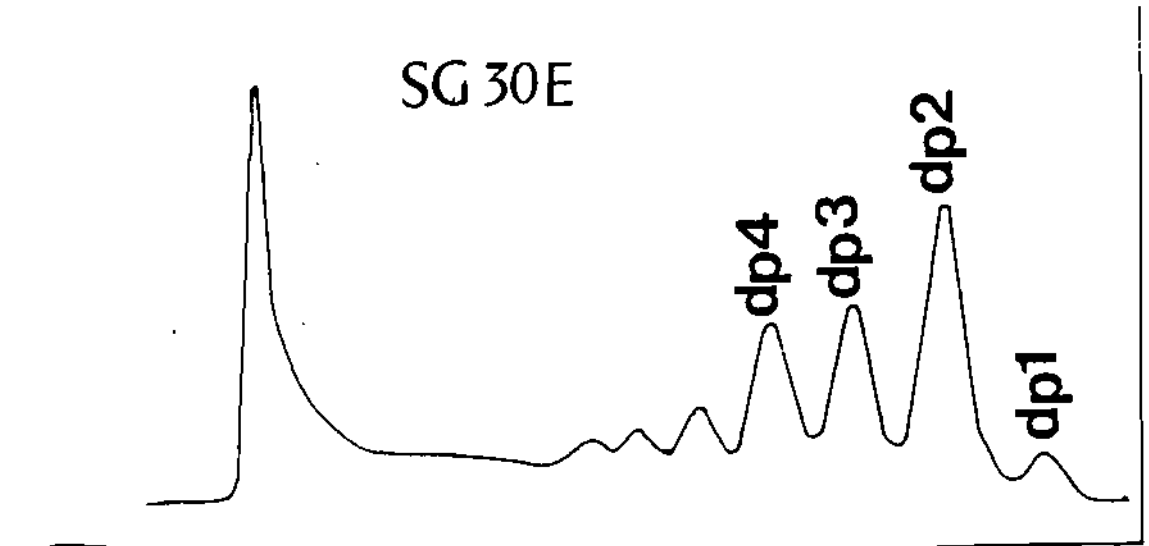
Figure 5

ETUDE DE LA REPARTITION DES OLIGOSACCHARIDES DE DEUX HYDROLYSATS

SG 33

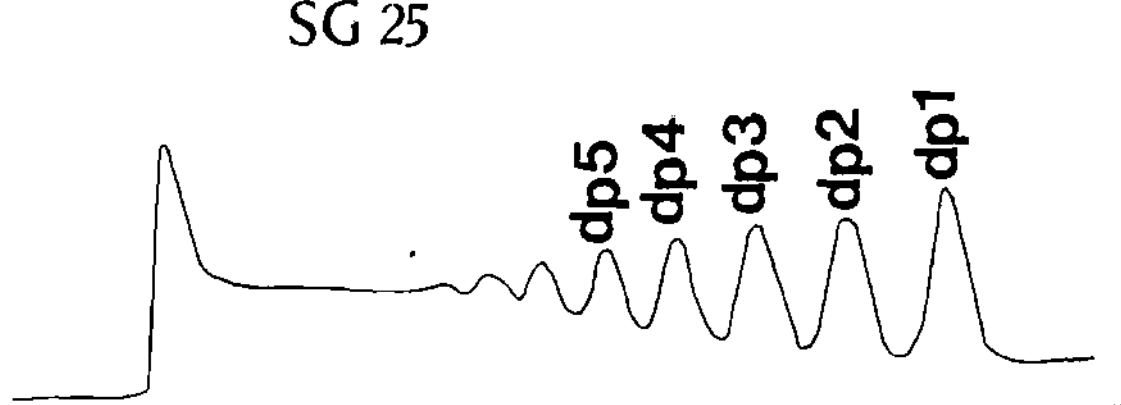


SG 30E



ETUDE DE LA REPARTITION DES OLIGOSACCHARIDES DE DEUX HYDROLYSATS

SG 25



MD 05

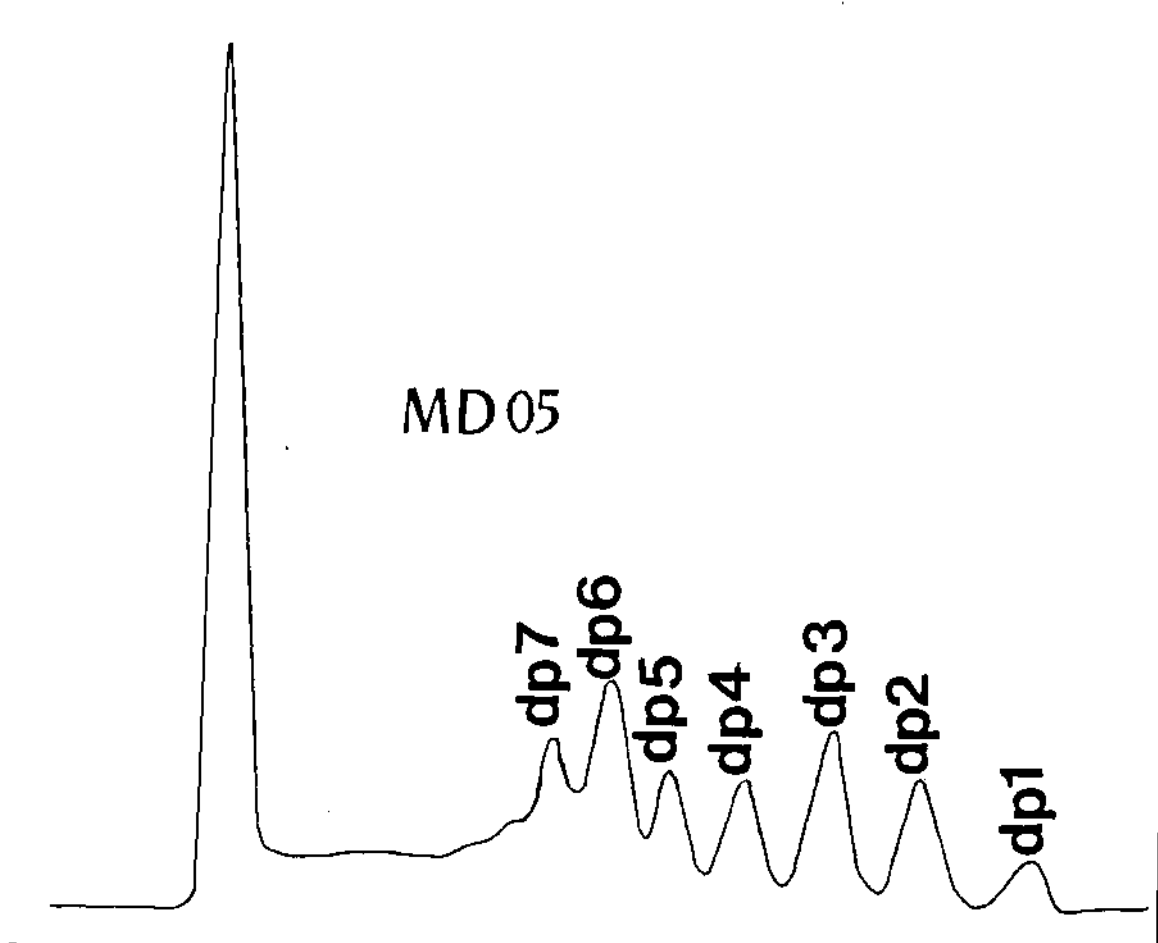
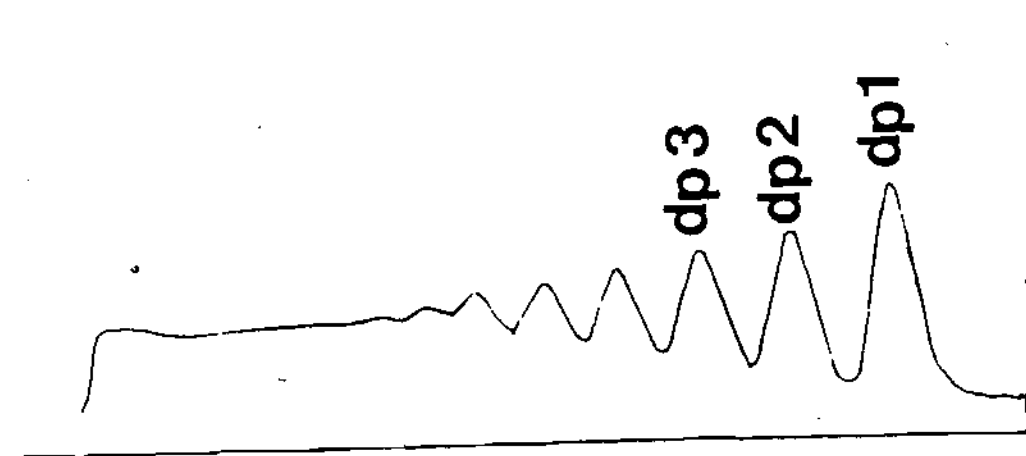


Figure 6

ETUDE DE LA REPARTITION DES OLIGOSACCHARIDES DE DEUX HYDROLYSATS

SG 37



SG 40 E

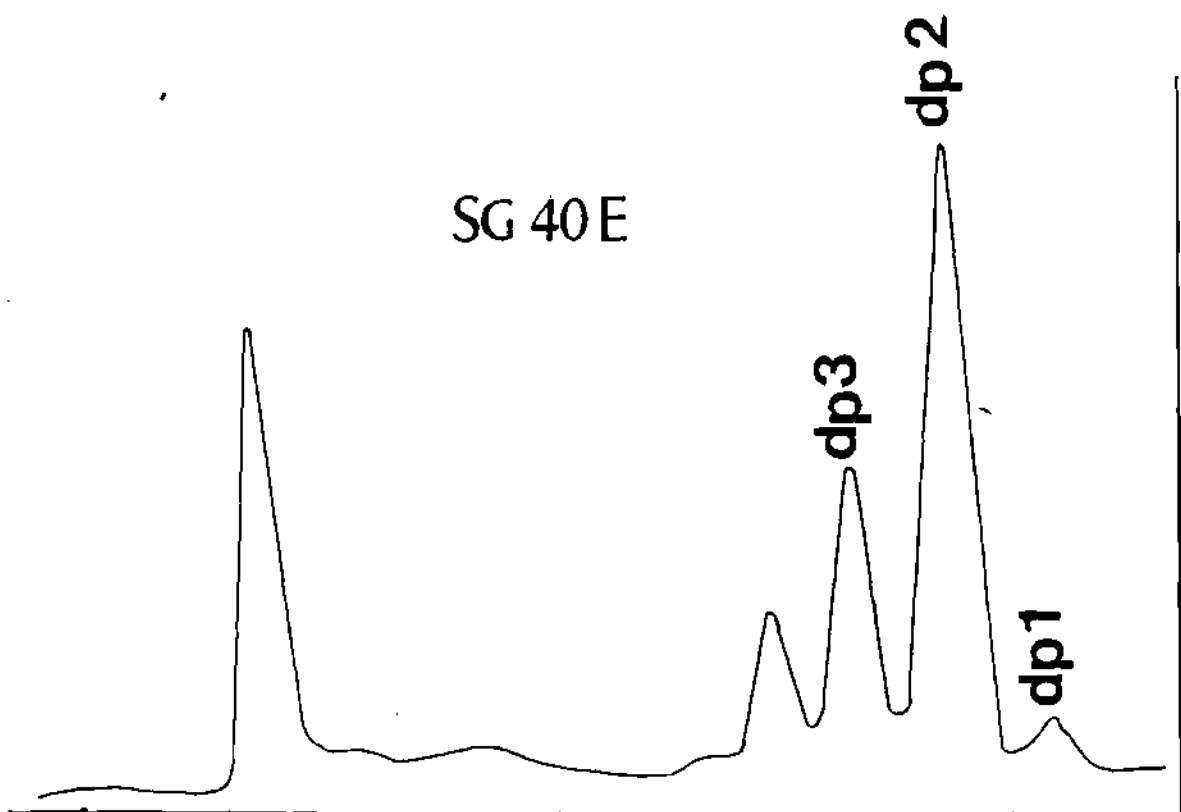


Figure 7

MALTODEXTRINES ET SIROPS DE GLUCOSE DE D.E. MOYEN

REPARTITION DES OLIGOHOSIDES

	* MD 05	* MD 07	* SG 25	* SG 33	* SG 30E	* SG 37	* SG 40E	* ROCLYS
D.E	18-20	25-28	28-31	31-34	31-34	36-39	38-41	40-43
DP 1	2.0	3.0	10.0	11.0	4.0	13.0	3.0	11.0
DP 2	6.5	9.5	7.5	9.5	18.0	12.0	37.0	20.0
DP 3	8.0	10.0	7.0	9.0	14.0	10.0	18.0	11.0
DP 4	6.5	7.5	7.0	8.2	11.0	8.0	8.5	9.0
DP 5	6.0	9.5	6.5	7.5	6.0	7.5	1.1	5.5
DP 6	12.0	15.0	6.0	6.5	5.0	6.5	0.9	4.8
DP 7	9.0	6.0	5.0	6.0	4.0	5.5	1.2	4.5
DP 8	4.0	2.5	4.0	5.0	2.5	5.0	1.6	4.0
DP 9	3.0	1.5	3.0	4.0	2.0	4.0	2.0	4.0
DP 10	2.0	1.5	2.0	3.5	1.5	3.0	1.2	3.5
DP 10 à 20	5.0	5.0	23.0	20.0	9.0	15.0	7.0	11.5
DP > 20	36.0	29.0	19.0	10.0	23.0	10.5	18.0	11.2

* Acide

* α Amylase

* β Amylase

TABLEAU III

A partir de cette étude de composition, il nous a paru opportun de comparer le comportement des hydrolysats ayant subi, soit une liquéfaction acide, soit une liquéfaction enzymatique, lorsqu'ils sont soumis à une saccharification complète à l'amyloglucosidase.

IV.4 - ETUDE COMPAREE DU COMPORTEMENT A LA SACCHARIFICATION

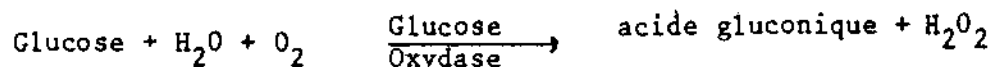
Comme signalé dans le chapitre traitant la réversion, l'hydrolyse acide a été décrite comme inductrice de produits de réversion. Pour vérifier ce phénomène, nous avons entrepris une étude comparée du comportement à la saccharification d'hydrolysats obtenus par voie acide et/ou enzymatique.

Les produits de la liquéfaction sont saccharifiés dans les conditions optimales d'activité de l'amyloglucosidase (pH 4,3 - $\theta = 60^\circ$ - enzyme à 2°/oo).

La détermination du degré d'hydrolyse ou D.E. est effectuée par le dosage du pouvoir réducteur par la méthode du LUFF SCHOORL (Annexe I) et celle de la teneur en dextrose vrai, par la méthode à la glucose oxydase.

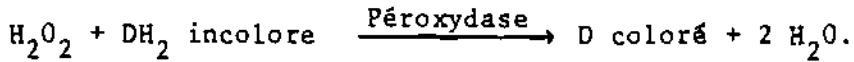
- Principe de la méthode de détermination de la teneur en glucose vrai ou Dx -

Les réactions peuvent se résumer ainsi :



La glucose oxydase oxyde le glucose en gluconolactone avec libération de peroxyde d'hydrogène. En présence d'eau, la gluconolactone se transforme en acide gluconique.

Ensuite une peroxydase décompose le peroxyde d'hydrogène et oxyde catalytiquement un donateur d'hydrogène (O. toluidine, O. dianisidine) par le passage de la forme réduite incolore à la forme oxydée colorée.



La glucose oxydase n'agissant que sur le glucose, permet un dosage hautement spécifique. Par contre, la deuxième étape peut être perturbée par des oxydants ou des réducteurs tels que le glutathion et la vitamine C.

Les résultats obtenus (Tableaux IV et V et Fig. 8 et 9) indiquent que la saccharification enzymatique est beaucoup plus efficace après liquéfaction à l' α amylase et identique pour tous les échantillons quels qu'aient été leur Dextrose Equivalent de départ.

Dans le cas des échantillons ayant subi une liquéfaction acide, les résultats montrent que le D.E. final diminue lorsque le degré d'hydrolyse initial est élevé.

Ils indiquent aussi que la saccharification est moins efficace après la liquéfaction acide, D.E final : 94,5 - valeur inférieure à celle de la liquéfaction enzymatique : 97,4.

Une augmentation de la teneur en polysaccharides apparaît pour les échantillons acides ayant subi une liquéfaction plus poussée au détriment du dextrose.

Ces observations nous ont conduits à envisager la recherche de facteurs pouvant être responsables de tels phénomènes ; ceci par comparaison de deux hydrolysats (Acide, enzyme) dans le but de mettre en évidence un polymère "particulier" qui peut être considéré comme traceur d'une voie d'hydrolyse, en particulier de l'hydrolyse acide. Cette recherche constitue, dans notre hypothèse de travail, un contrôle de qualité par le fait de l'existence de produits de réversion.

COMPARAISON DE LA SACCHARIFICATION DE L'AMIDON
APRES LIQUEFACTION ACIDE ET LIQUEFACTION ENZYMATIQUE

LIQUEFACTION A L' α AMYLASE

D.E. de Départ	12	17	20	22	27	31
D.E. final	97.4	97.5	97.3	97.4	97.5	97.3
Dextrose vrai Dx	93.3	94.1	93.6	93.7	93.0	93.3
Polysaccharides	6.7	5.9	6.4	6.3	7.0	6.7

TABLEAU IV

LIQUEFACTION PAR L'ACIDE

D.E. de Départ	12	15	20	27	38	42
D.E. final	94.5	93.0	92.5	91	89	87.5
Dx	91	88	85	83	80	77
Polysaccharides	9	12	15	17	20	23

TABLEAU V

Troisième Partie : LES PRODUITS DE REVERSION

V - MISE EN EVIDENCE ET IDENTIFICATION DES PRODUITS DE REVERSION

L'étude bibliographique permet de donner deux hypothèses de formation des produits de réversion. En effet, WHISTLER et COLL (74) d'une part, SROCYNSKI et COLL (58) d'autre part, estiment que les produits de réversion apparaissent dans certaines conditions de pH et de température par :

- recombinaison de molécules de dextrose entre elles,
- ou par liaison d'une molécule de dextrose aux oligosaccharides présents dans la solution.

En fait, seul le premier mécanisme de formation a pu être vérifié. Les recherches connues actuellement et qui ont été entreprises à partir de solutions de dextrose pur soumises à la réversion en milieu acide et à température élevée, ont permis de vérifier ce phénomène.

Selon THOMPSON et COLL (65) dont les travaux regroupent les études antérieures, les diholosides ci-dessous cités peuvent être formés au cours d'un processus de réversion, par recombinaison de deux molécules de dextrose. La connaissance de ces produits : isolement et identification, a bénéficié de l'introduction des méthodes chromatographiques qui se sont révélées d'usage très pratique.

Diholosides de réversion :

- Isomaltose : α D 1 - 6
- Gentiobiose : β D 1 - 6
- Trehalose : β D 1 - 1
- Cellobiose : β D 1 - 4
- Kojibiose : α D 1 - 2

INFLUENCE DE LA LIQUÉFACTION

Figure 9

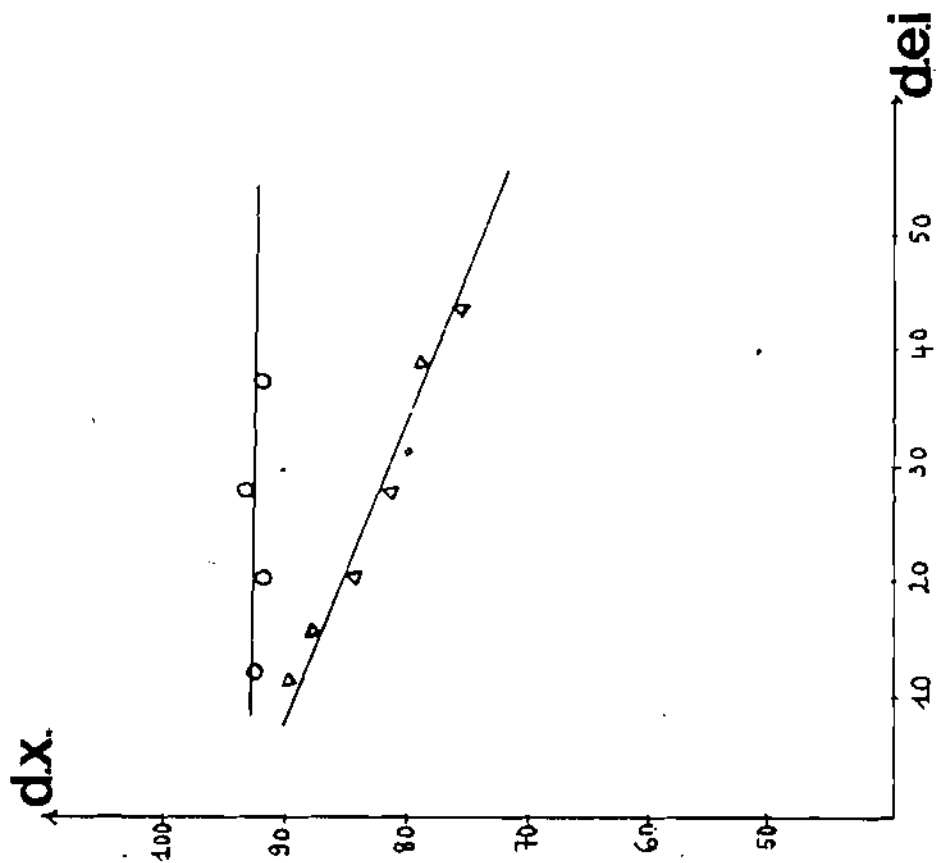
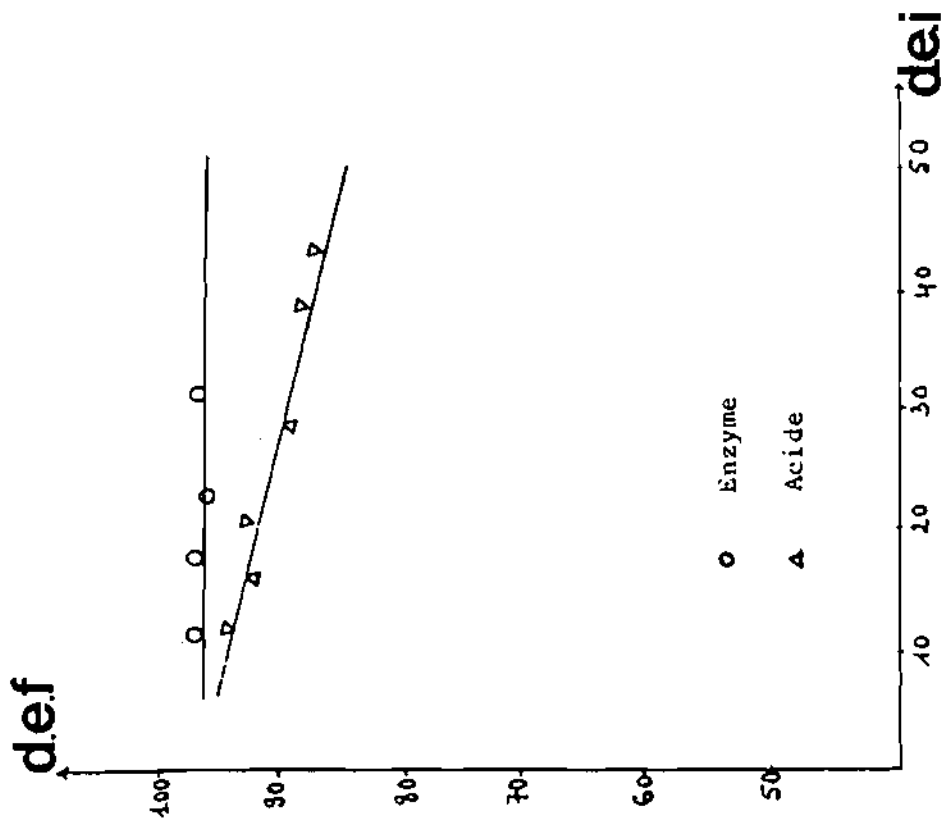


Figure 8



Il paraît évident que l'interprétation des phénomènes observés dans ces conditions reste discutable lorsqu'il s'agit de les transposer aux hydrolysats dont la composition est parfois très complexe. Ceci explique sans doute pourquoi la mise en évidence de ces sucres de réversion dans les hydrolysats n'a pas abouti à des solutions satisfaisantes dans les ouvrages relatifs aux problèmes liés aux conditions d'hydrolyse et à l'analyse des sucres issus d'une telle transformation.

Nous avons donc entrepris de rechercher les sucres de réversion à partir d'hydrolysats obtenus dans les conditions d'hydrolyse en industrie, afin d'étudier les conditions de formation, leur niveau de formation et leur influence sur la qualité finale du produit.

La difficulté de cette méthode est double :

- Les produits de réversion, s'ils existent, le sont en faible quantité et, comme nous l'avons dit précédemment, leur étude ne sera effectuée que si l'on tient compte de cette caractéristique.

- Les études connues actuellement ont été réalisées à partir de solution pure de dextrose ou d'hydrolysat acide ayant dépassé le stade d'hydrolyse complète.

Nous avons choisi de rechercher les sucres de réversion sur des hydrolysats partiels constituant les plus faibles hydrolysats acides utilisables en industrie alimentaire.

Les échantillons SG 25 et MD 05 ont été choisis car ils constituent les produits au D.E. les plus voisins qui peuvent être obtenus industriellement, soit par la voie acide (SG 25), soit par la voie enzymatique (MD 05). Cette étude a pour objectif de trouver un test qualitatif sûr, qui permette de distinguer un dérivé d'hydrolyse préparé par voie entièrement enzymatique d'un autre ayant subi, à un stade intermédiaire, la plus faible attaque acide. Dès lors, la deuxième partie du travail devra montrer qu'une faible attaque acide est suffisante pour faire apparaître des sucres de réversion.

Nous ne reviendrons pas sur les nombreux problèmes que pose la mise en évidence de ces "sucres particuliers", ils ont été développés dans les chapitres précédents. Nous insisterons sur le fait que les sucres de réversion, même lorsqu'ils existent dans un hydrolysat, le sont en très faible quantité. C'est pourquoi la tentative de leur mise en évidence ne pourra être envisagée que si l'on procède à une élimination au moins partielle du glucose qui représente environ 90 % en poids sec d'un produit d'hydrolyse complète. Ceci sera réalisé soit par concentration obtenue par levuration du glucose, soit par fractionnement de l'échantillon à analyser.

Parmi les méthodes chromatographiques utilisables pour l'analyse des sucres, nombreuses sont celles qui utilisent la séparation suivant le poids moléculaire. Or, l'étude envisagée ici se propose d'accomplir une séparation de diholosides, donc de poids moléculaires identiques. Deux méthodes nous permettront de la réaliser :

- Chromatographie gaz liquide,
- Chromatographie sur résine échangeuse d'ions.

V.1.- REALISATION EXPERIMENTALE DE LA REVERSION

V.1.1 - A partir d'une solution pure de dextrose

Cette réversion a été accomplie dans les conditions de préparation industrielle des dérivés d'hydrolyse par la voie acide en faisant toutefois varier la durée de la réaction.

La solution de dextrose pur est à 5 % de matière sèche et amenée à pH = 2 par l'acide chlorhydrique 2 N. Les échantillons sont ensuite soumis à la température de 120° pendant 1/2 heure, 1 heure et 2 heures.

La réaction terminée, les produits obtenus sont neutralisés par la soude NaOH 2 N et dessalés sur des résines à lit mixte (BIOREX R.G. Grade 501 x 8, 20-50 mesh), afin d'éviter les perturbations que les sels pourraient provoquer pendant la séparation chromatographique.

Figure 10

COMPARAISON REVERSION EXPERIMENTALE

1 h et 2 h

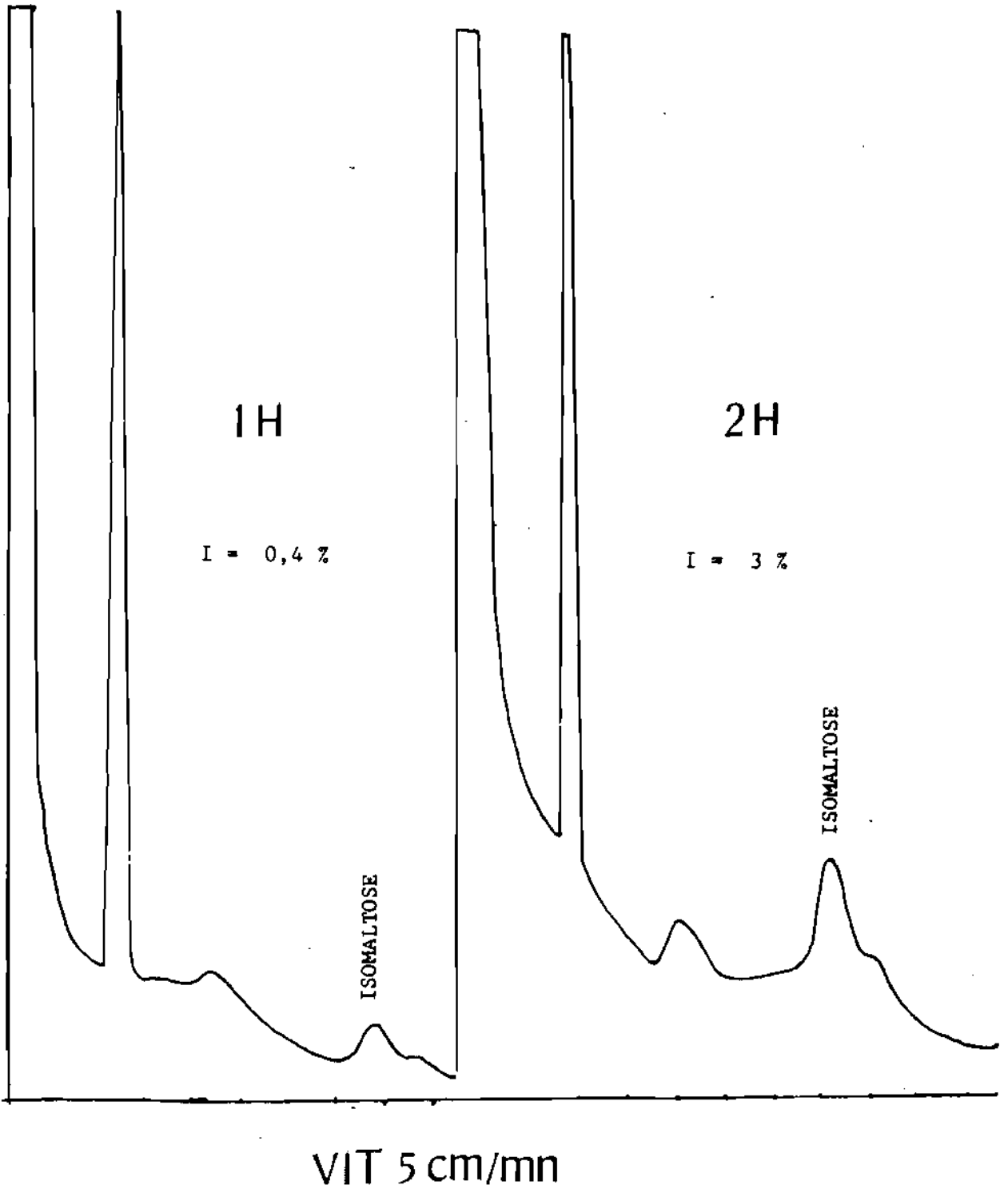


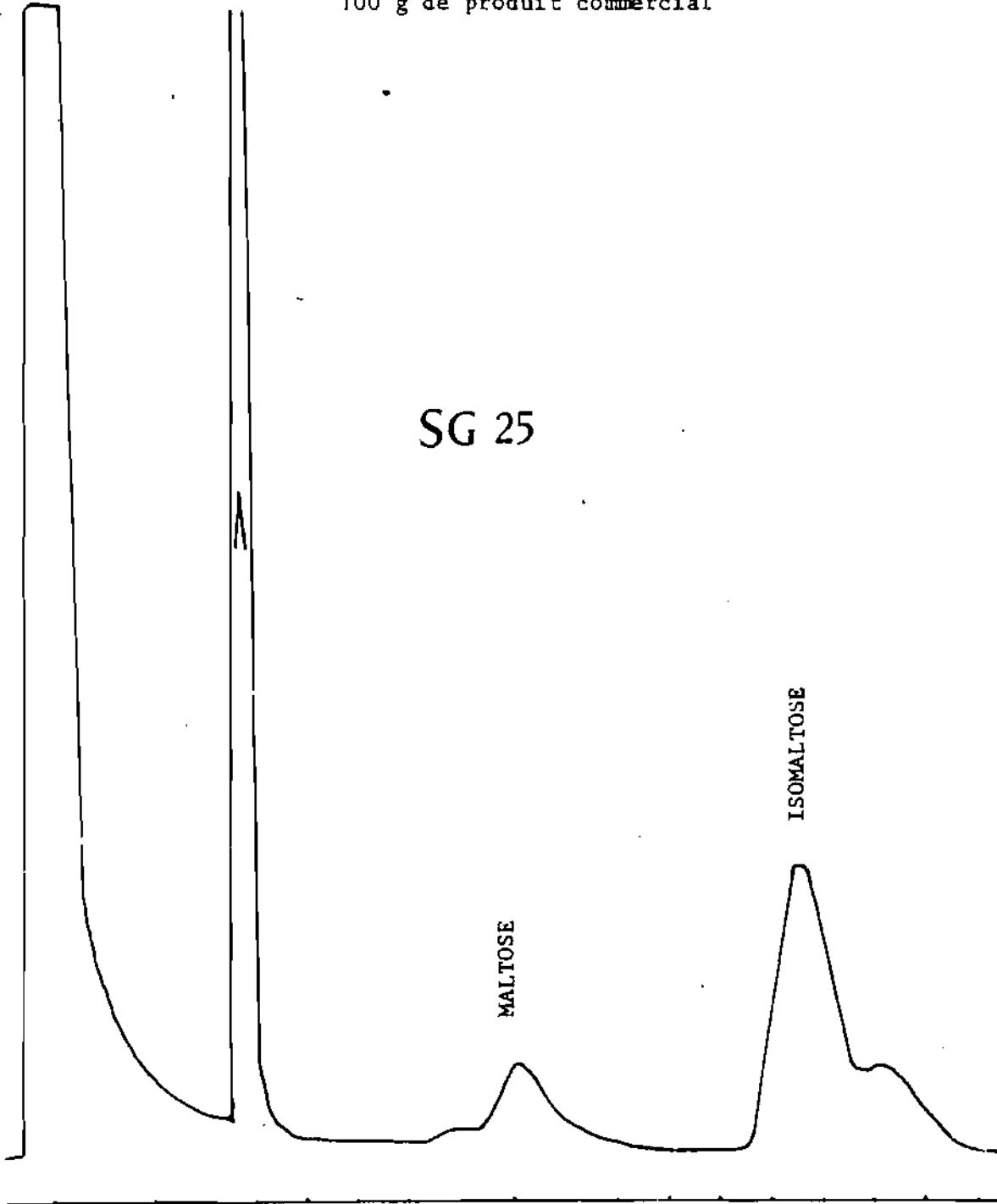
Figure 11

SG 25 HYDROLYSE ACIDE COMPLETE

Isomaltose : 12,7 %

Maltose : 3 %

100 g de produit commercial



VIT. 10 cm/mn

Figure 12

MD 05 HYDROLYSE ENZYMATIQUE COMPLETE

Isomaltose : 4,8 %

Maltose : 1 %

par 100 g de produit commercial

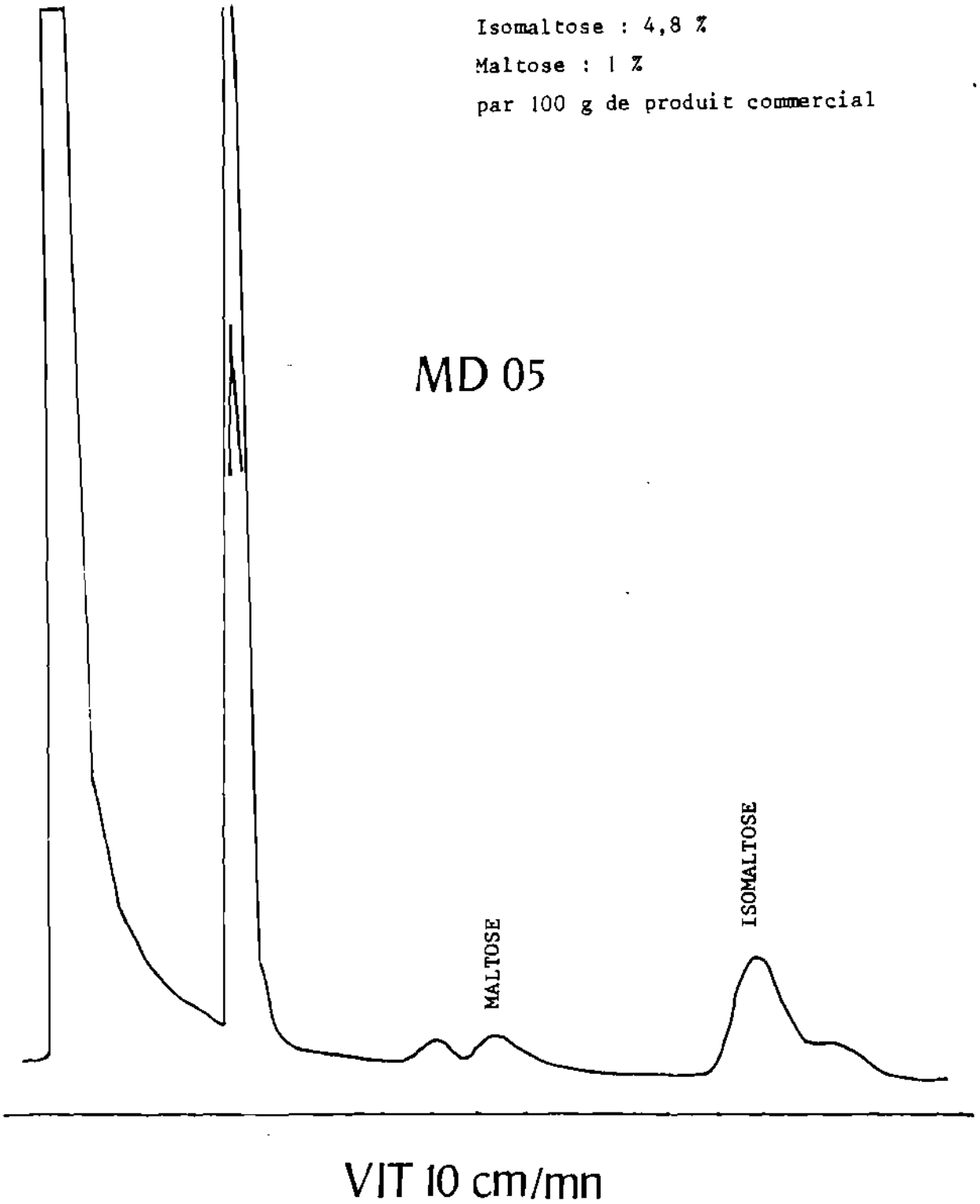
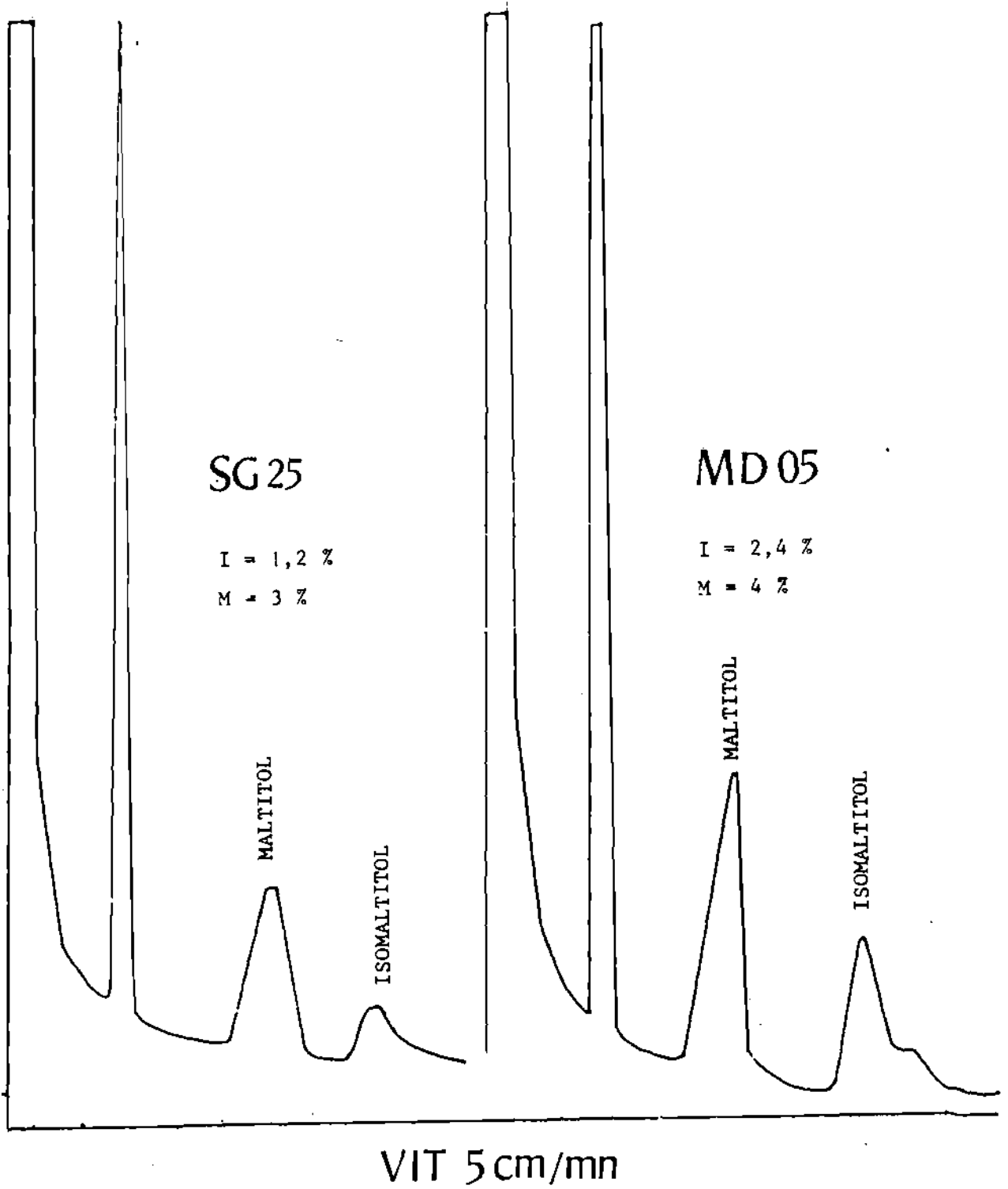


Figure 13

Comparaison produits d'hydrolyse directe



Les échantillons sont ensuite analysés par chromatographie gaz liquide après oxydation et silylation dans les conditions définies à l'annexe VII).

Résultat (Fig. 10) : Teneur Isomaltose : 1 h - 0,4 %
2 h - 3,0 %

V.1.2 - A partir d'échantillons préhydrolysés

Deux hydrolysats industriels qui ont subi, l'un une liquéfaction acide SG 25, et l'autre une liquéfaction enzymatique MD 05, sont soumis à une hydrolyse complète.

L'échantillon SG 25 est hydrolysé en milieu acide chlorhydrique pH = 2 et à 120°, jusqu'à un D.E. \approx 75 - 80.

L'échantillon MD 05 est attaqué par l'amyloglucosidase, enzyme saccharifiante, jusqu'à un D.E. de 90 - 95.

Les échantillons sont neutralisés et désionisés sur des résines à lit mixte avant d'être soumis à une levuration (*saccharomyces cerevisiae*), afin de diminuer leur teneur en glucose, étant entendu que les sucres de réversion ne sont pas fermentescibles. Les résidus ainsi obtenus sont analysés par chromatographie gaz liquide après oxydation et silylation.

Résultat MD 05 : Isomaltose : 4,8 %
Maltose : 1,0 %

Résultat SG 25 : Isomaltose : 12,7 %
Maltose : 3,0 %

V.2 - APPLICATION A DES HYDROLYSATS INDUSTRIELS

Cette recherche a été appliquée aux hydrolysats industriels afin de déceler, par analyse chromatographique, un pic particulier pouvant correspondre à un polymère du dextrose, et présent uniquement dans l'échantillon SG 25.

V.2.1 - Conduite du traitement

L'analyse directe a été effectuée de manière à faire apparaître les disaccharides autres que le maltose, normalement présents en faible quantité dans les hydrolysats. Ceci sera possible sur une prise d'essai suffisante pour permettre la détection de l'isomaltose. Les échantillons sont analysés après hydrogénation et silylation (Fig. 13).

Résultat SG 25 : Isomaltitol : 1,2 %

Maltitol : 3,0 %

Résultat MD 05 : Isomaltitol : 2,4 %

Maltitol : 4,0 %

Cette étude paraît insuffisante pour conclure quant à la présence des sucres de réversion dans les échantillons analysés. Pour cela, et en raison de la complexité des hydrolysats, un traitement en vue d'enrichir les échantillons en sucre de réversion a été entrepris. Il aura pour but :

- d'éliminer le dextrose de l'échantillon soumis à une hydrolyse complète. Il représente en effet 90 % du produit final,
- et de fractionner les hydrolysats pour rechercher le niveau de formation de ces sucres de réversion.

V.2.2 - Fractionnement par chromatographie sur couche mince

- Chromatographie sur couche mince de silice G 60 F.
- Le mélange solvant utilisé pour la migration est le suivant :

. Propanol : 70

. Ethanol : 10

. Eau distillée : 20

- Quantité déposée :

- . 5 μ l d'une solution à 50 mg/ml sur le côté,
- . 300 μ l de la même solution, étalés en bande centrale sur 10 cm.

Après la migration, les taches latérales sont révélées par carbonisation des glucides à chaud (110°) après pulvérisation du réactif à l'acide sulfurique concentré dissous dans l'éthanol.

La plaque est ensuite découpée en différentes zones de manière à pouvoir isoler les holosides de degré de polymérisation (DP) 1 à 3. Ces zones sont grattées, éluées, filtrées et concentrées, avant d'être analysées après oximation et silylation suivant la méthode de dosage des diholosides en chromatographie gaz liquide.

V.2.3 - Fractionnement sur colonne Charbon-Célite

Le fractionnement des holosides peut être également réalisé par chromatographie d'absorption sur colonne de Charbon-Célite 50/50 -(Annexe V).

Cette technique constitue une méthode de choix pour la séparation des sirops de sucre. L'avantage du charbon réside dans sa capacité de chargement, mais la colonne doit être renouvelée après chaque élution. Un inconvénient cependant : son incapacité à séparer les isomères de même degré de polymérisation.

Le gradient est réalisé par la variation de la composition de l'éluant en éthanol. Deux gradients ont été utilisés de manière à séparer deux fractions :

- fraction 1 : eau / éthanol à 25 %
- fraction 2 : eau / éthanol à 40 %.

L'analyse des deux fractions obtenues par chromatographie liquide à haute performance sur une colonne de résine échangeuse de cations (BIORAD AG 50W x 4 sous forme Ca^{2+}) - (Annexe VI) a permis de conclure à la composition suivante (Fig 15 et 16) :

- fraction 1 : D.P. 1 - 8
- fraction 2 : D.P. < 9

Les deux fractions sont analysées par chromatographie gaz liquide après saccharification à l'amyloglucosidase. Cette attaque a pour but de réduire la longueur des chaînes afin de les rendre dosables par C.G.C.

V.2.4 - Traitement par concentration

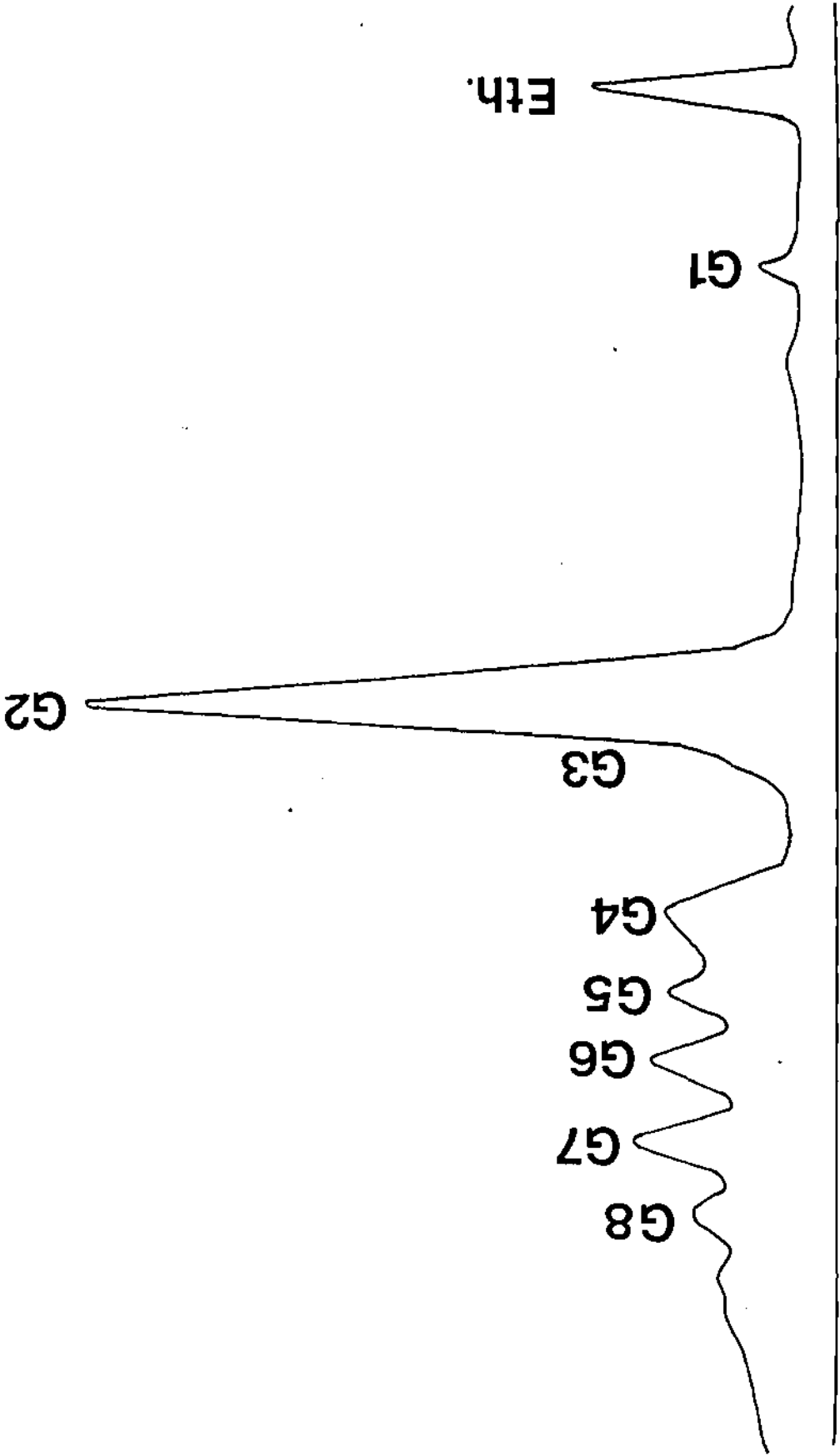
Les deux échantillons SG 25 et MD 05 sont soumis à une saccharification totale enzymatique dans les conditions optimales d'activité de l'amyloglucosidase ($\text{pH} = 4,3 - \theta = 60$) jusqu'à un D.E. = 90, le degré d'hydrolyse étant déterminé par le dosage du pouvoir réducteur par la méthode de LUFF SCHOORL. (Annexe I).

Les hydrolysats ainsi obtenus sont soumis à la fermentation par l'action de la levure de boulangerie (*saccharomyces cerevisiae*) en présence de phosphate de potassium, sous aération pour éviter la formation d'une quantité trop importante d'alcool. L'élimination du glucose est suivie par la technique de dosage à la glucose oxydase (27).

Lorsque le glucose n'est plus décelable, la solution est filtrée et désionisée sur des résines à lit mixte (BIORAD Grade R.G. 501 x 8) avant d'être concentrée sous vide à environ 70 % de matière sèche, ceci afin d'assurer la stabilité bactériologique des échantillons traités. L'analyse des produits ainsi obtenus par HPLC nous a conduits à limiter notre recherche aux disaccharides. (Fig.14).

sucres résiduels

Figure 14
H.P.L.C.



H.P.L.C

fraction 1

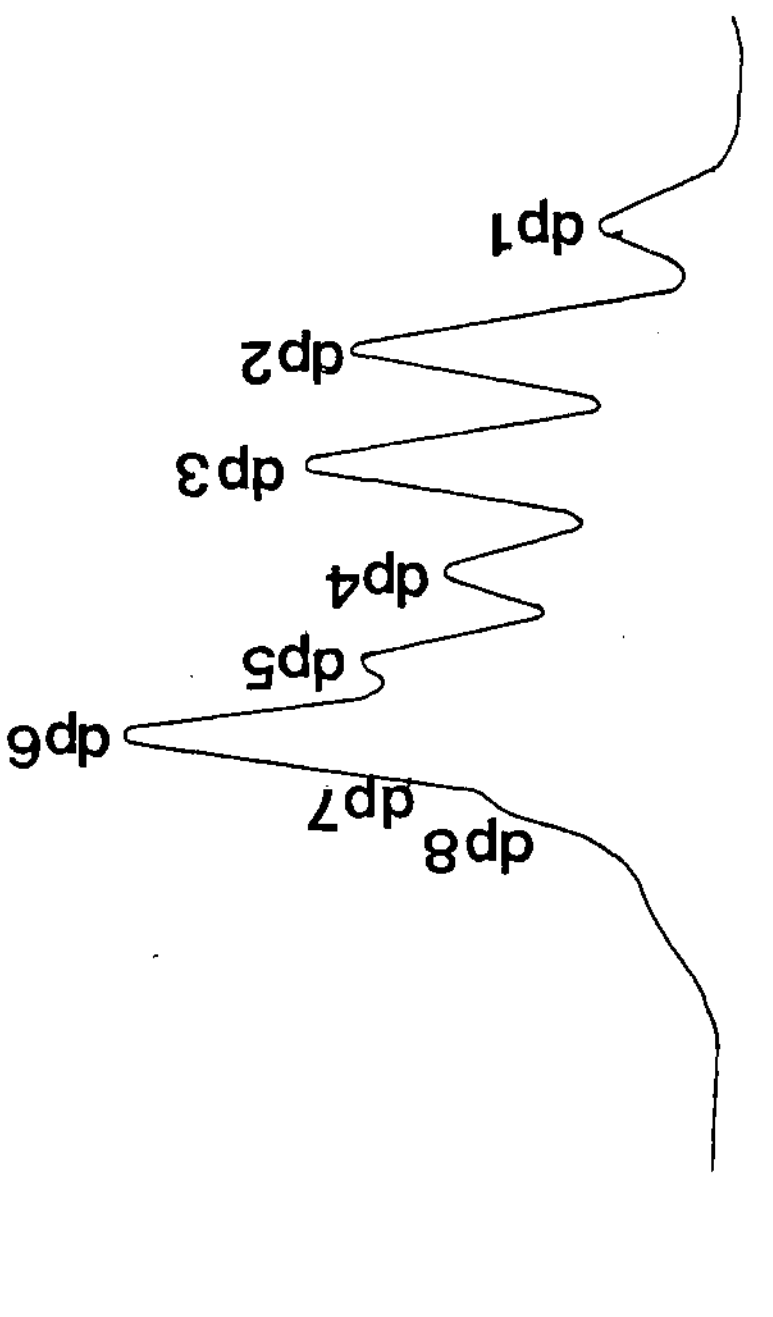


Figure 15

H.P.L.C.

fraction 2

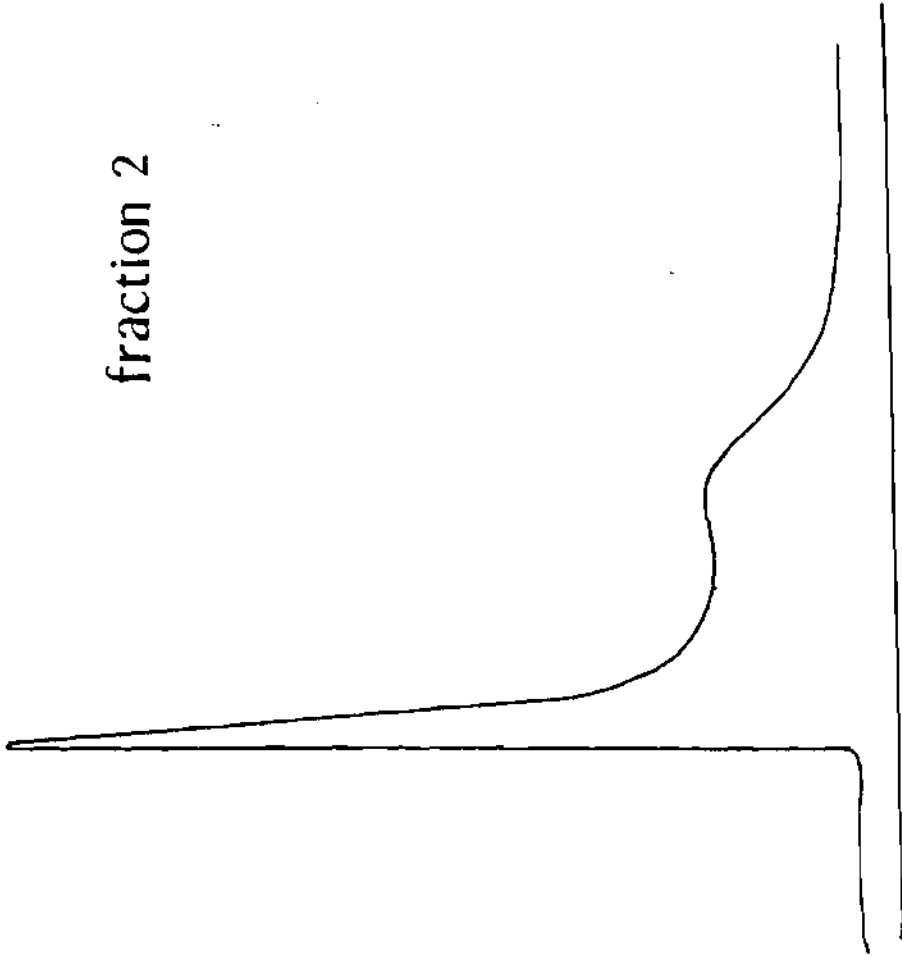


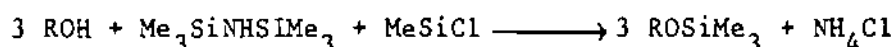
Figure 16

V.3 - ANALYSE DES ECHANTILLONS PAR CHROMATOGRAPHIE GAZ LIQUIDE

V.3.1 - Principe de la méthode

La chromatographie gaz liquide est largement utilisée du fait de sa sensibilité pour l'analyse de traces de certains sucres dans les aliments. Son champ d'application a été élargi considérablement par l'utilisation de dérivés triméthylsilylés qui ont permis de rendre les sucres volatils. L'adjonction de ce radical apolaire confère à la molécule une grande volatilité et une meilleure stabilité au choc thermique que constitue l'injection.

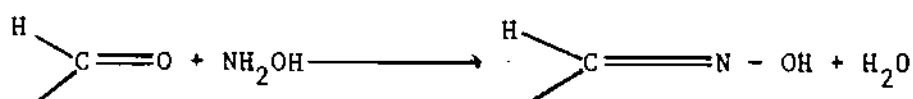
La silylation des sucres est réalisée classiquement par l'hexaméthylidisilazane (HMDS), dans la pyridine, suivant le schéma réactionnel suivant :



Cette réaction est très sensible aux traces d'humidité et les hydrolysats doivent être évaporés à siccité avant d'effectuer la réaction d'éthérification. L'eau, présente en faible quantité dans nos échantillons, ne gêne pas la réaction lorsque celle-ci est catalysée par l'acide trifluoroacétique.

Lors du dosage des disaccharides par chromatographie gaz liquide, certains holosides apparaissent sous forme de deux anomères α et β (liés à la position du OH en 1), ce qui conduit à un chromatogramme complexe. Pour éviter cet inconvénient, l'holoside est réduit en polyol ou converti en oxime avant la silylation.

L'oximation est une réaction de condensation d'une amine I : Hydroxylamine avec l'aldehyde des hexoaldoses.



V.3.2 - Résultats et interprétations

Les chromatogrammes, obtenus à partir des échantillons, ayant subi une réversion expérimentale, montrent que :

- La composition de l'échantillon est uniquement constituée de dextrose après une 1/2 heure de réversion,
- un pic ayant les caractéristiques analytiques de l'isomaltose (temps de rétention, dédoublement de pic) apparaît après 1 heure de réversion (Fig. 11).
- il n'y a pas d'évolution notable après 2 heures de réaction ; une diminution de la teneur en isomaltose a été observée sur certains échantillons.

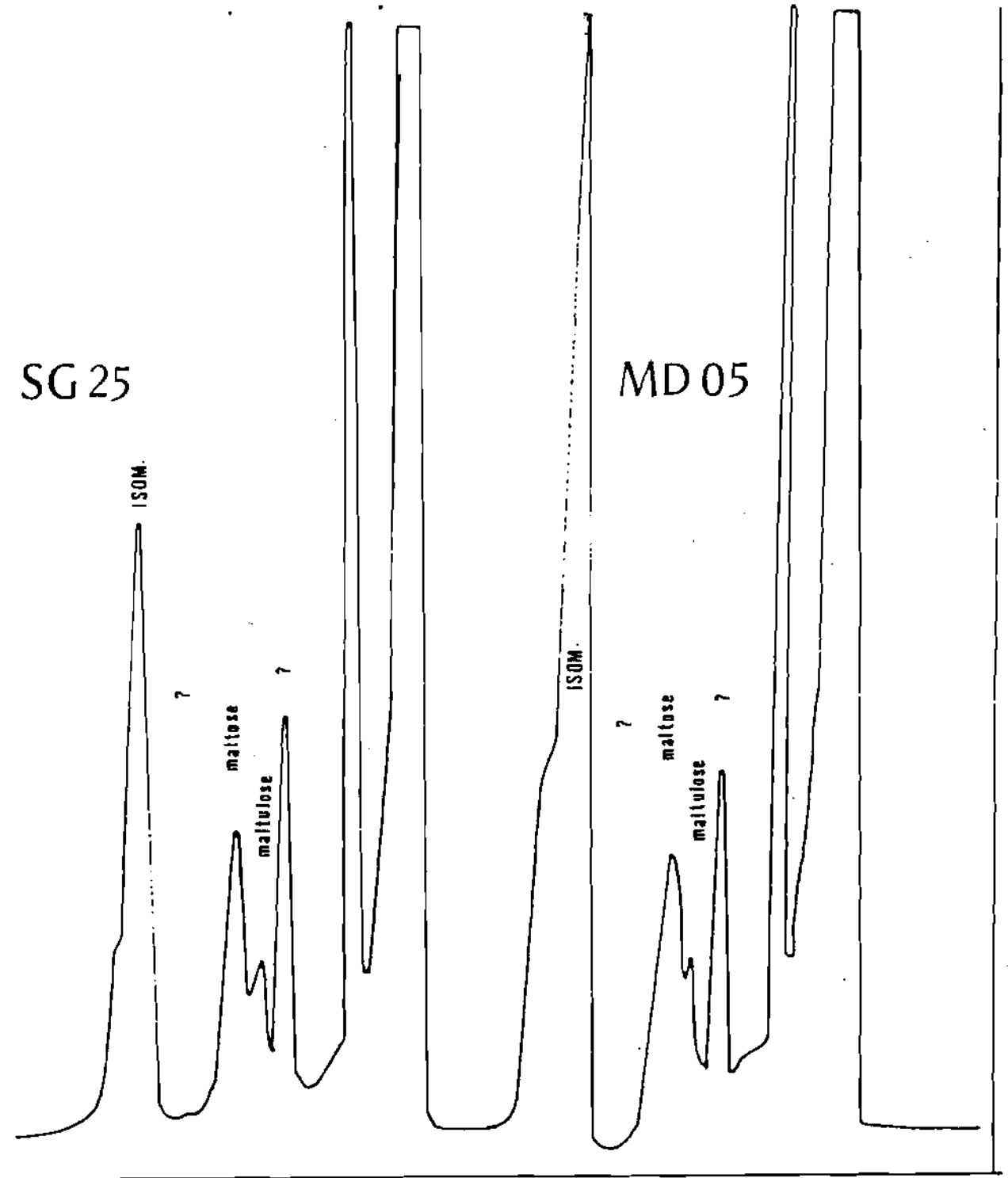
Ces résultats permettent d'affirmer que l'isomaltose est un diholoside qui peut résulter d'une réversion, et permettent de confirmer que la recombinaison est possible en milieu acide pH + 2, et à chaud $\theta = 120^\circ$.

Cette étude ne correspond pas exactement à l'objectif que nous poursuivons ; elle montre en effet la formation de produits de réversion à partir du dextrose. Inversement, nous recherchons ces produits de réversion à partir de l'hydrolyse de l'amidon. C'est pourquoi dans l'étape suivante de notre démarche, deux hydrolysats liquéfiés industriellement ont été soumis, l'un à la réversion expérimentale SG 25, l'autre à une hydrolyse enzymatique complète MD 05.

Les chromatogrammes montrent une teneur importante en isomaltose de l'échantillon SG 25 : la quantité trouvée (12,7 %) ne permet pas d'attribuer sa présence au seul fait des liaisons naturelles $\alpha 1 - 6$ de l'amidon. Il apparaît donc que sur un produit d'hydrolyse soumis à des conditions sévères, la réversion est possible.

L'étude par fractionnement entreprise pour élucider la zone de formation des sucres de réversion n'a pas donné de résultat intéressant, car elle a été pratiquée sur des hydrolysats industriels dont l'analyse a montré la formation de deux diholosides - Isomaltose et Maltose - que ce soit sur la fraction obtenue par séparation sur chromatographie sur couche

CHROM. LIQ. GAZ



Vit 5Mm/mn

Figure 17

mince, ou sur colonne de Charbon-Célite.

L'analyse des échantillons soumis à une concentration par levuration et évaporation indique la présence de maltose, maltulose et isomaltose (Fig. 17).

	MD 05	SG 25	SIROP DE GLUCOSE
MALTOSE	0,78 %	0,75 %	0,85 %
ISOMALTOSE	5,00 %	3,30 %	3,55 %
MALTULOSE			
2 PICS INCONNUS			

La présence de ces pics inconnus dans les deux types d'hydrolysats ne permet pas de les utiliser comme traceur et de conclure quant aux conditions probables de leur apparition.

Les analyses effectuées précédemment ne permettent pas d'affirmer la présence de produits résultant d'une réversion dans les échantillons MD 05 et SG 25 à analyser. De plus, la méthode résolutive utilisée pour l'analyse des échantillons est la chromatographie gaz liquide dont la capacité de détection se limite aux mono et diholosides. Or, elle nécessite un chauffage de l'échantillon pour le rendre volatil, ceci suppose une destruction partielle du produit. Il nous a semblé nécessaire, pour ces raisons, d'envisager une méthode complémentaire d'analyse, moins agressive et susceptible de permettre la séparation des triholosides ; en l'occurrence, la chromatographie de partage sur résine échangeuse d'ions.

V.4 - ANALYSE DES ECHANTILLONS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR RESINE ECHANGEUSE D'ANIONS (Annexe VIII)

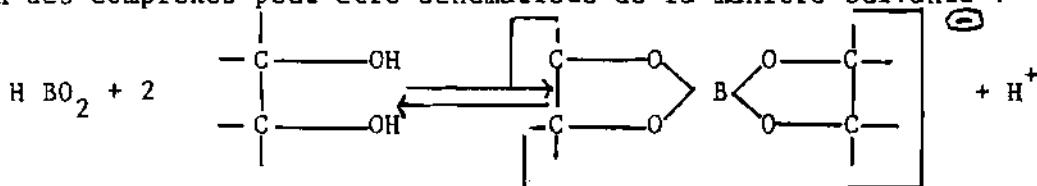
L'analyse par cette méthode a été entreprise car, par chromatographie gaz liquide, les chromatogrammes obtenus montrent de nombreux pics inconnus dont la présence peut être liée aux conditions de réaction (silylation et chauffage).

V.4.1 - Principe de la méthode

Le principe de la méthode est fondé sur la séparation de complexes acides formés par les diholosides avec les ions borate, sur une résine anionique base forte.

L'utilisation de réactions chimiques en solution permet, en effet, d'accroître sensiblement la sélectivité des résines échangeuses d'ions et offre un éventail de possibilités pour la séparation de composés voisins.

Le caractère particulier des glucides qui ne sont pas ionisés normalement, mais capables de former des anions en se complexant avec les ions borate, est bien connu. La fixation donne lieu à une réorganisation de la structure moléculaire des espèces complexables et la formation des complexes peut être schématisée de la manière suivante :



L'équilibre de la réaction montre que la stabilité du complexe est fonction du pH.

La méthode de séparation des holosides par chromatographie sur résine échangeuse d'ions sous forme boratée a été introduite par KHYM et ZILL, puis développée par de nombreux auteurs dont SAMUELSON et JOHNSON (48-49) qui ont mis au point un procédé permettant de séparer les mono, les di et les triholosides. La technique est actuellement automatisée sur des chaînes Technicon (64).

La capacité de fixation des complexes boratés sur les résines est fonction de divers paramètres :

- Poids moléculaire des éléments à séparer,
- nombre de radicaux hydroxylés,
- configuration spatiale des molécules.

L'augmentation du nombre de OH entraîne une diminution marquée de l'affinité de la molécule pour la résine. Il a été démontré que l'OH en cis joue un rôle très important dans la formation de ces complexes.

L'élution est obtenue au moyen d'un gradient de tampon borate de pH 8 à 9,5. le pH optimal adopté est de 9,5, afin de limiter les risques de dégradation des glucides que pourrait entraîner un tampon de pH trop basique. L'ordre d'élution obtenu dépend de la nature des holosides et du nombre d'ions borate complexés.

Les monosaccharides qui possèdent un plus grand coefficient de distribution que les diholosides seront plus fortement retenus et ainsi de suite.

Après la séparation, les glucides sont dosés par la méthode colorimétrique à l'orcinoI sulfurique avec mesure de l'absorbance à 420 nm ; cette longueur d'onde correspond à l'absorbance du complexe boraté avec le réactif.

Le mélange passe dans un colorimètre à cuve à flux continu, et les variations de la densité optique du mélange à analyser sont enregistrés en continu.

Les paramètres de la séparation sont les suivants :

- changement de la résine : un mauvais tassement affecte l'efficacité de la résine.

- gradient d'élution : le pH et la force ionique doivent croître de manière progressive et régulière.

- température de la colonne : elle conditionne la résolution de la résine. Une température trop importante dénature les propriétés de la résine.

- débit d'élution ; il doit être moyen car un débit trop important entraîne une mauvaise séparation. En pratique, le débit sera choisi en fonction du mélange à analyser.

V.4.2 - Conditions d'application

Avant d'effectuer l'analyse proprement dite des échantillons, une étude rapide en vue de tester l'efficacité des résines a été pratiquée sur deux types de résines anioniques base forte :

- Résine BIORAD AG 1x8 - 200-400 mesh, constituée par un copolymère de styrène et divinylbenzène, avec un taux de réticulation de 8 % et une granulométrie de 30 à 40 µm. Le groupement échangeur est un ammonium quaternaire.

- Résine chromobeads S. constituée de polystyrène sulfoné avec les chaînes latérales en divinylbenzène. Le taux de réticulation est de 8 % et la granulométrie est de 22 µm.

Cet essai a consisté en une séparation de 12 holosides que la plupart des méthodes d'analyse ne permettent pas de séparer aisément. Les nombreux essais effectués mettent en évidence la bonne qualité de la séparation des diholosides avec la résine type chromobeads S. En effet, les passages sur la résine AG 1x8 du mélange étalon ont conduit à un chromatogramme avec des pics aplatis que les modifications de débit et de hauteur de colonne n'ont pas améliorées. En revanche, la séparation sur la résine de chromobeads S., après un conditionnement effectué avec les précautions décrites à l'Annexe VIII, a abouti à une bonne résolution dès les premières analyses.

Dans le système utilisé pour l'analyse, les paramètres de l'élution varient de façon continue, ce qui améliore le pouvoir de résolution.

Ce gradient continu de pH et de force ionique est fourni par un module appelé Autograd.

L'Autograd est constitué de 9 chambres isolées mais pouvant communiquer à leur base. Le remplissage des cuves est réalisé de manière à établir dans le temps un gradient continu (Annexe VIII). La quantité de tampon doit être suffisante pour éluer la totalité des holosides à séparer.

Les tampons sont préparés à partir de solutions de concentration croissante en acide borique, et la force ionique est assurée par une solution de chlorure de sodium (NaCl). Le pH des tampons est ajusté avec une solution de NaOH 3N.

Les glucides élués forment un complexe avec l'orcinol en milieu sulfurique (70 % V/V) et à chaud (Température : 95°C), se colorent et absorbent à 420 nm. Le mélange étalon utilisé pour évaluer la capacité de séparation des résines est un mélange de 12 holosides présents dans la solution à 0,50 mg/ml. Les chromatogrammes obtenus indiquent une bonne qualité de séparation et une bonne sensibilité de la méthode.

V.4.3 - Résultats et interprétations

Le chromatogramme étalon peut être interprété de la manière suivante :

- les composés polyhydroxylés et non réducteurs, tels que le saccharose et le tréhalose qui n'ont pas d'hydroxyle adjacent en cis, ont une faible affinité pour la résine anionique. Ils sont, de ce fait, élués en premier.

- le cellobiose, le maltose et le lactose possèdent un hydroxyle en cis par mutarotation et sont fortement ionisés. De ce fait, ces diholosides ont une affinité plus grande que le tréhalose et le saccharose ; ils seront élués après ces derniers.

- le gentiobiose avec une liaison β 1 - 6 peut former un isomère du furanose et possède une affinité plus grande que les monosaccharides. Son élution sera postérieure à celle du glucose.

L'application de la méthode à l'analyse des échantillons MD 05 et SG 25 concentrés par levuration après hydrolyse complète à l'amyloglucosidase, a permis d'obtenir les chromatogrammes que nous avons interprétés de la manière suivante :

La chromatographie gaz liquide utilisée précédemment pour l'analyse des échantillons a montré que les produits étaient composés de nombreux holosides. Trois ont été identifiés à partir de leurs paramètres chromatographiques : ce sont la maltose, l'isomaltose et le maltulose.

Etant donné la composition identique des deux échantillons, comme en témoigne le même nombre de pics, il nous a paru nécessaire de compléter l'identification des pics inconnus par une séparation sur les résines échangeuses d'ions. Cette méthode présente, en effet, l'avantage de séparer les composés sans la nécessité de les chauffer pour les rendre volatils. De ce fait, elle évite la dégradation éventuelle des composés et l'apparition d'artefacts.

Les nombreux essais effectués sur les résines échangeuses d'ions ont montré que les échantillons analysés ont une composition identique. Ces résultats ne peuvent donc pas être exploités en vue d'une identification du type d'hydrolyse qui a permis de produire l'échantillon ; tout au moins si cette distinction est envisagée de manière qualitative. (Fig. 18 à 24).

Les holosides séparés correspondent au maltose, glucose et gentiobiose dont les caractéristiques analytiques sont bien définies pour cette technique d'analyse. (Temps de rétention, position par rapport à l'étalon interne).

La méthode des ajouts dosés a permis d'identifier trois pics inconnus apparus sur le chromatogramme. Ils correspondent au maltotriose, à l'isomaltose et au gentiobiose. En effet, l'addition d'une quantité connue d'holoside témoin pouvant résulter soit d'une Hydrolyse partielle, soit d'une réversion, permet de conclure de façon certaine sur l'identité du produit dont la teneur se trouve ainsi accrue.

Il subsiste un pic inconnu qui ne se superpose ni au cellobiose ni au tréhalose qui peuvent résulter d'une réversion ou d'une réaction secondaire à l'hydrolyse par certaines enzymes. Il semble que ce pic correspond au maltulose que nous avons identifié par chromatographie gaz liquide. Malheureusement, l'absence de témoin maltulose ne nous a pas permis de confirmer cette opinion.

En dehors du fait que cette analyse permet de démontrer qu'il ne peut pas apparaître de produit de réversion dans un hydrolysat moyen, il convient de faire quelques remarques concernant les teneurs en maltose et isomaltose.

Pour traiter ces échantillons, il a fallu utiliser la capacité du *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulangerie) à fermenter le glucose. Cette levure est capable de fermenter l'isomaltose et les produits de réversion, mais elle hydrolyse le maltose en glucose qui sera fermenté ensuite ; ceci explique la très faible teneur en maltose observée dans les échantillons analysés.

La seconde remarque concerne la teneur en isomaltose dont l'utilisation comme traceur d'hydrolyse acide a été envisagée pour l'identification des hydrolysats à haut D.E. En effet, il représente le premier disaccharide qui a été obtenu après la réversion expérimentale pratiquée sur une solution de dextrose pour et sur l'hydrolysat. Ce choix ne fait pas perdre de vue que l'isomaltose peut résulter de l'hydrolyse normale de l'amidon du fait de la présence de liaisons α 1 - 6 dans la structure de l'amidon. En effet, les nombreux essais que nous avons effectués ont montré une teneur relativement constante (3 à 5 %) dans les produits d'hydrolyse enzymatique complète. Ces valeurs correspondent à la proportion de liaison α 1 - 6 dans la structure de l'amidon. Par contre, les échantillons préparés par la voie acide ont atteint des teneurs en isomaltose de 10 à 12 %.

Compte tenu de ce résultat, il nous a semblé intéressant d'utiliser l'isomaltose comme traceur de l'hydrolyse acide sur des hydrolysats à haut D.E. lorsque sa teneur excède 5 %. L'application de ce test aux hydrolysats de D.E. moyen ne peut être envisagée de façon certaine du fait de la présence d'oligoholisides qui gênent l'analyse directe.

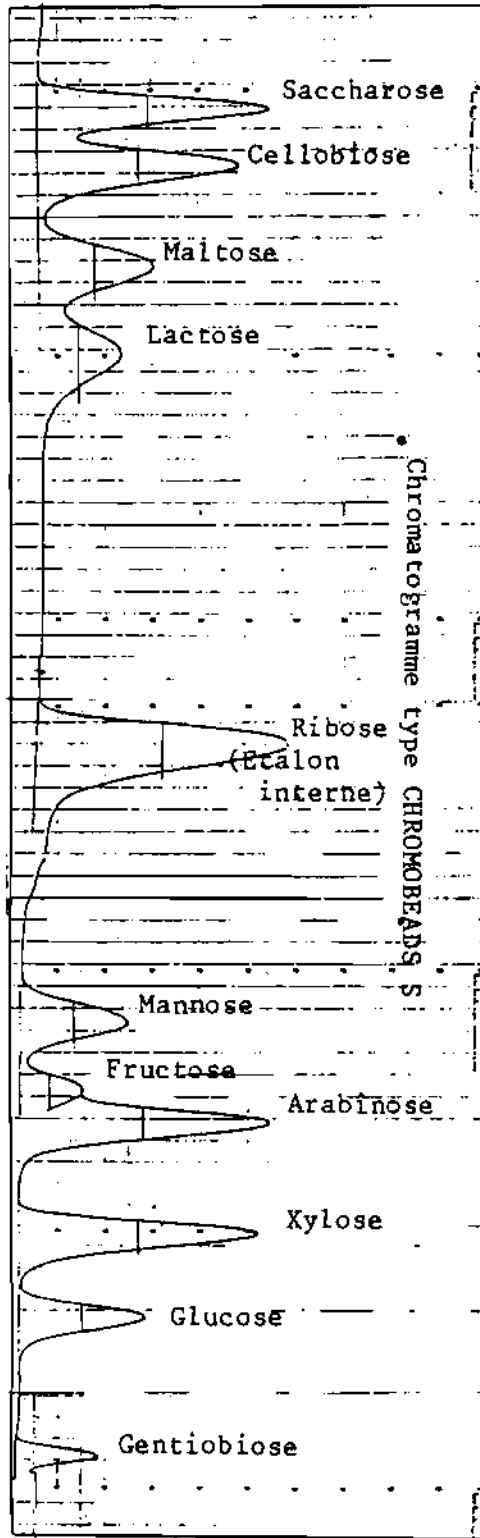


Figure 18

Figure 19

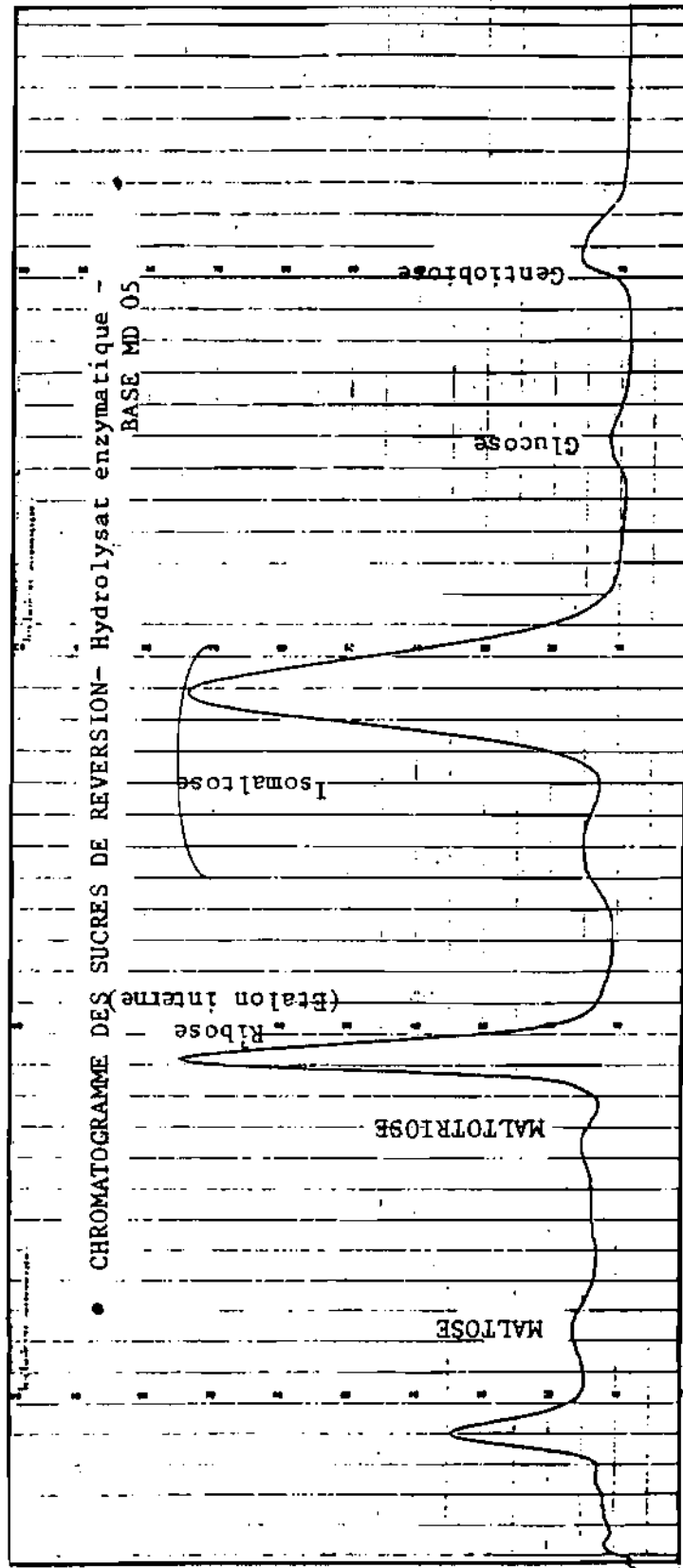


Figure 20

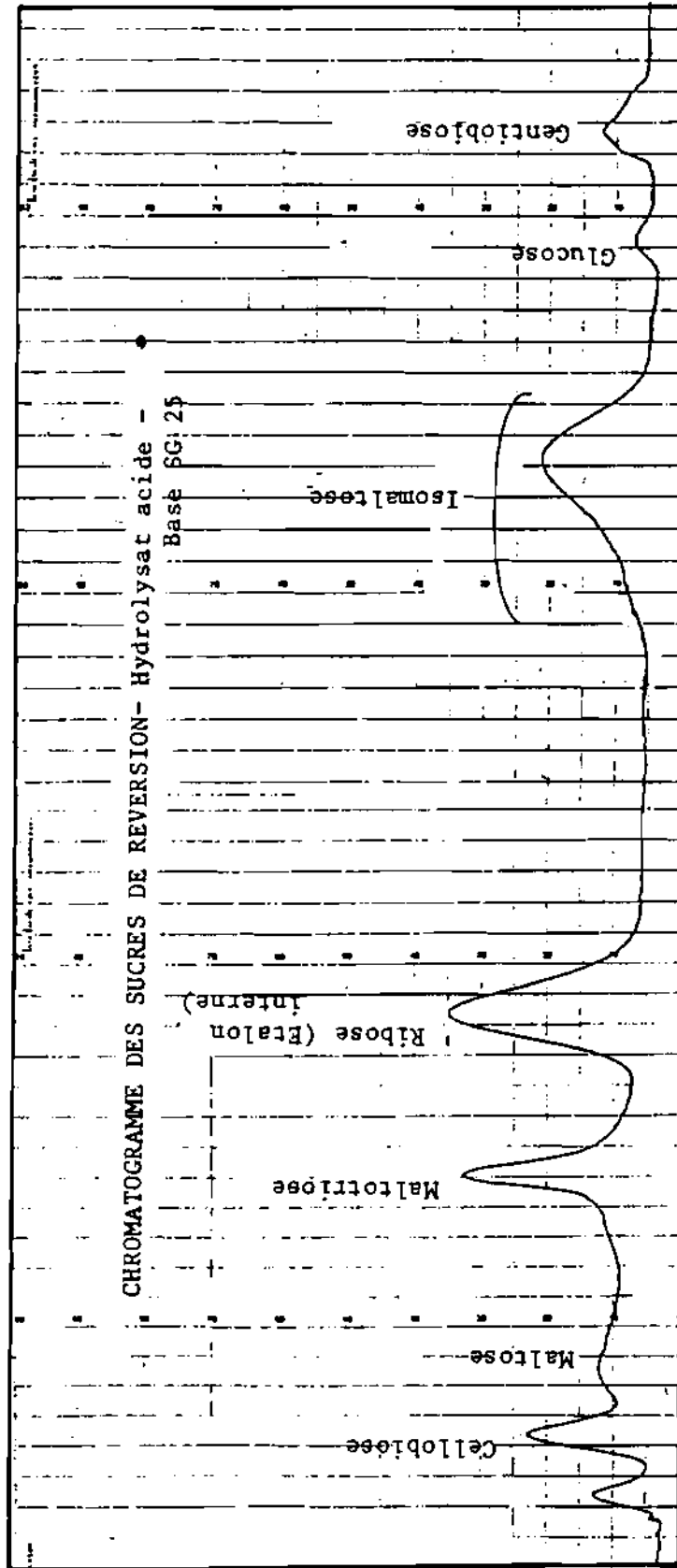


Figure 22

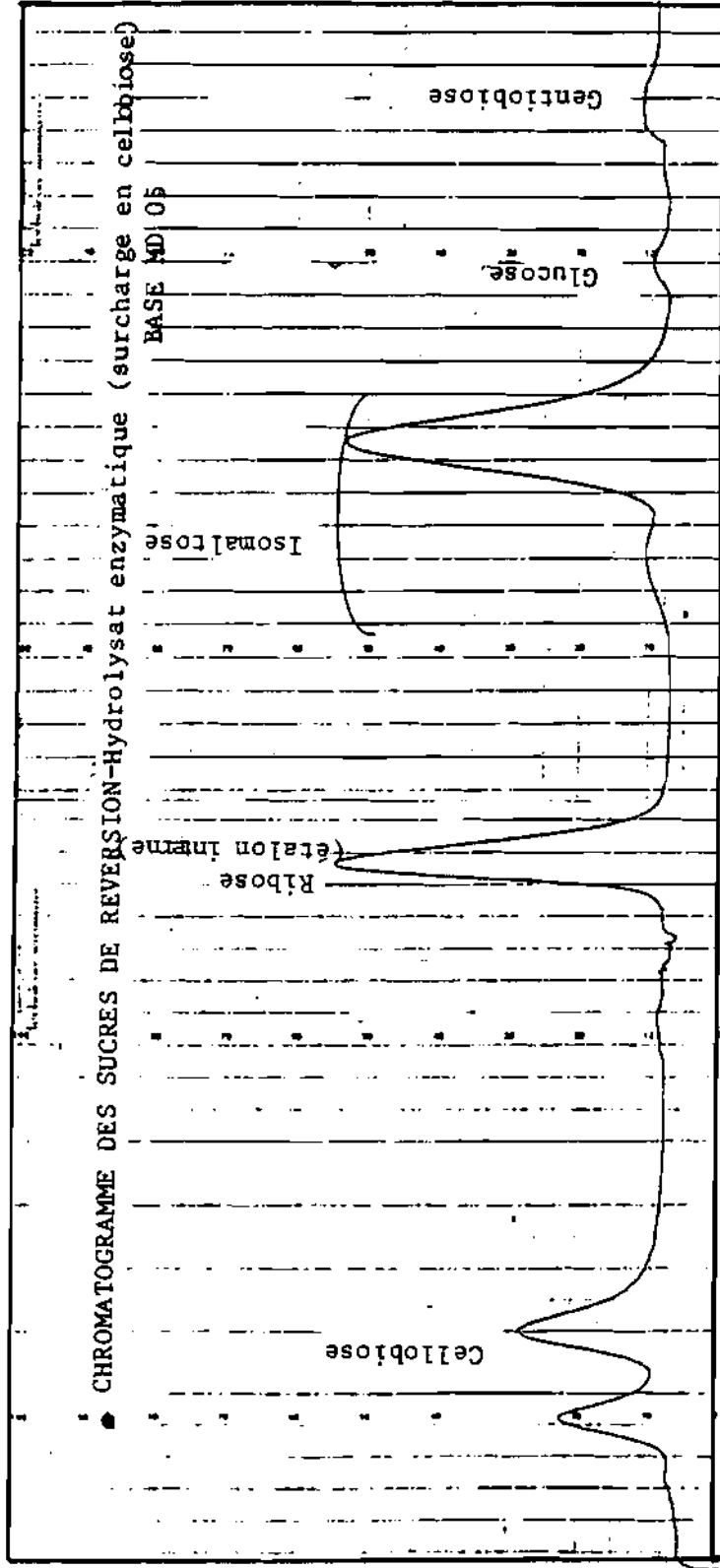


Figure 23

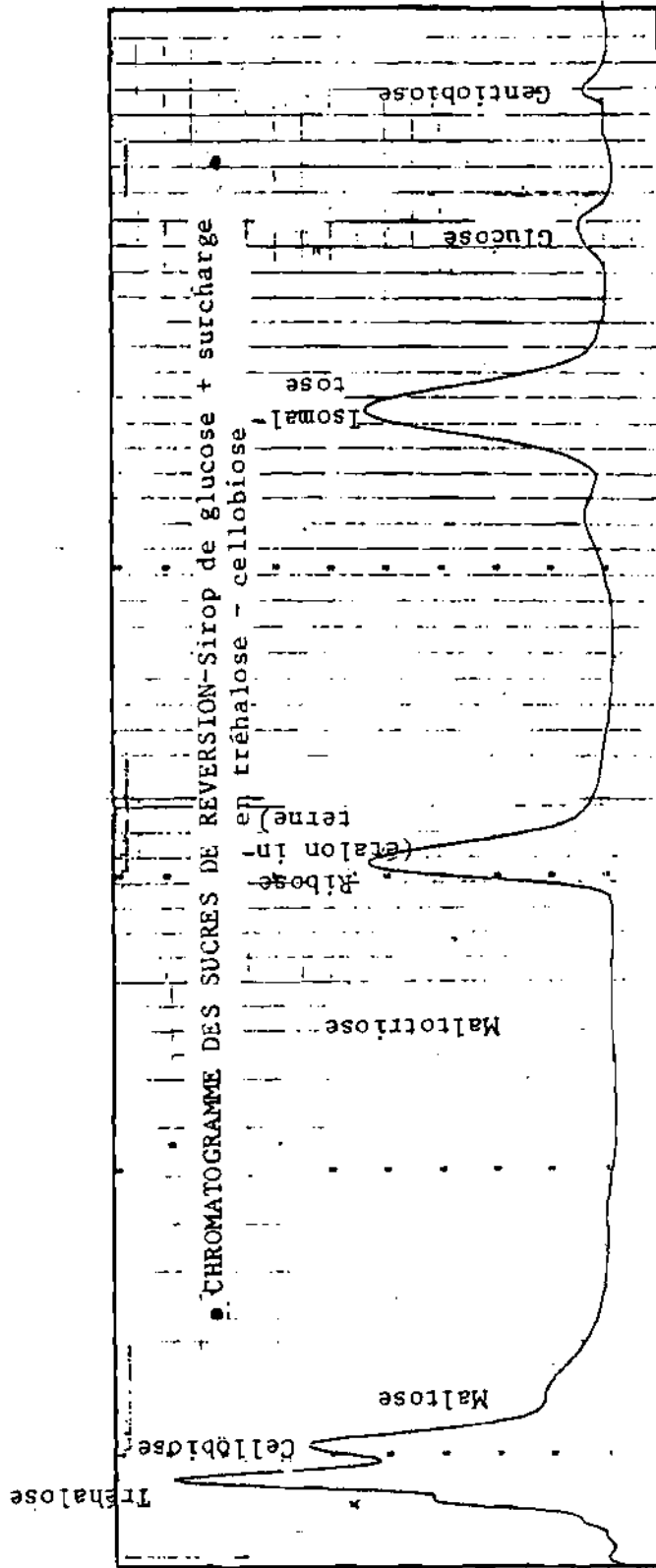


Figure 21

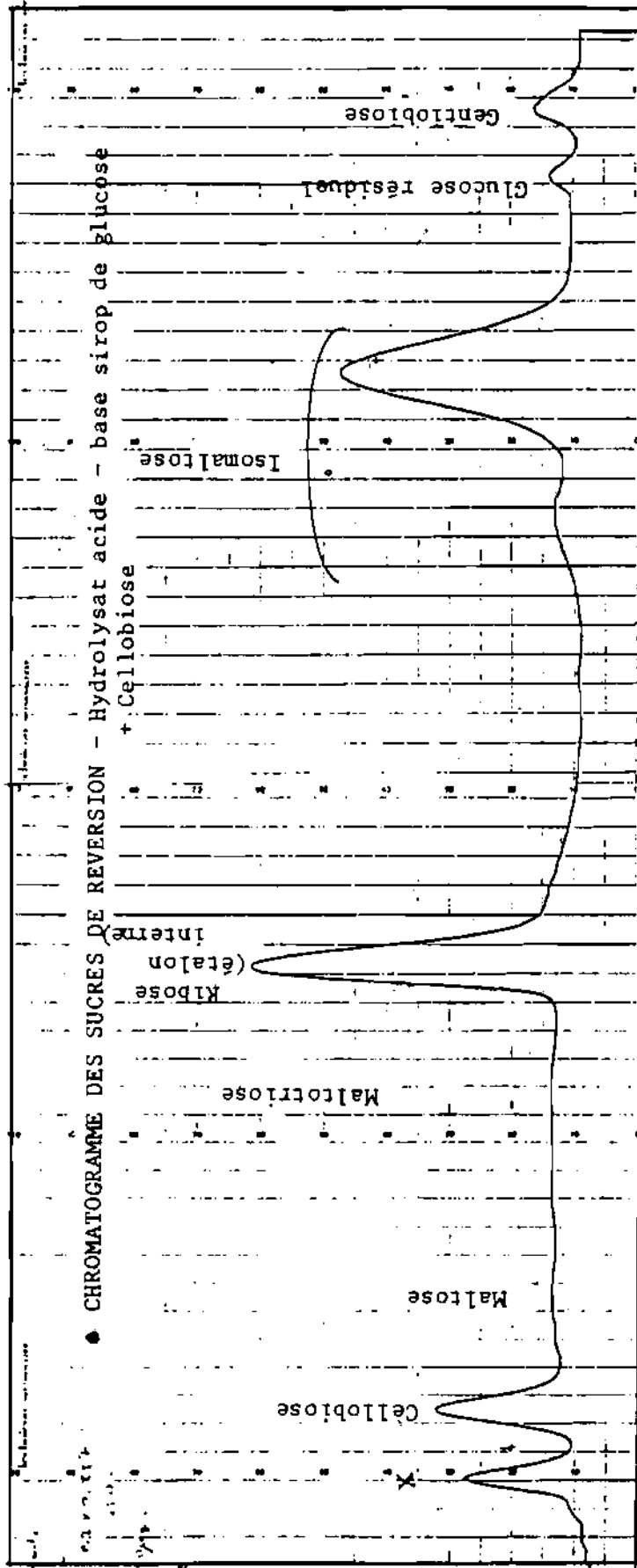
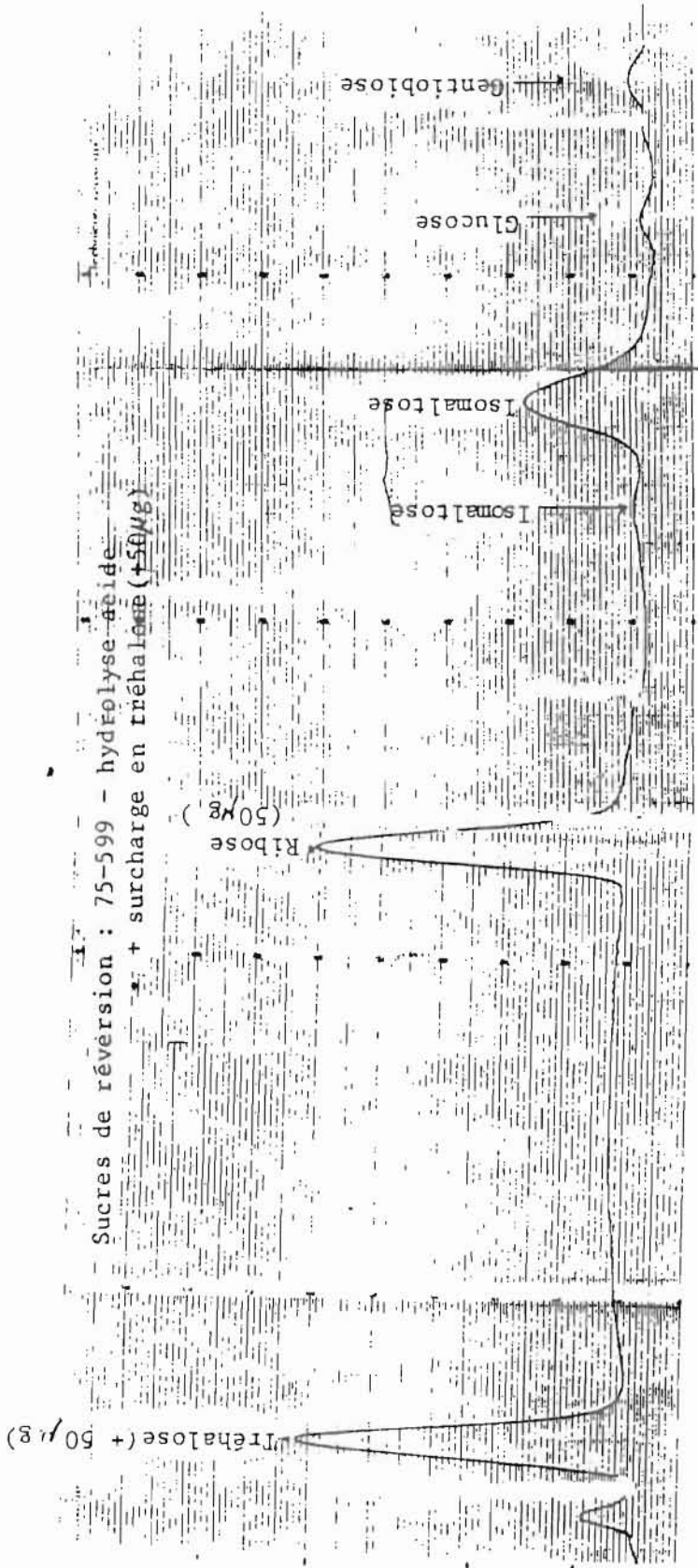


Figure 24



Quatrième Partie. : INTERPRETATIONS GENERALES (VI)

Ainsi que nous l'avons indiqué au début de notre travail, notre étude a été entreprise dans le but de retenir les méthodes analytiques qui permettent d'assurer un contrôle de qualité des produits d'hydrolyse de l'amidon dont l'emploi en alimentation et en pharmacie ne cesse de se développer. Ce contrôle de qualité est assuré par la détermination de la composition des hydrolysats et par l'évaluation des propriétés technologiques.

L'étude de la composition du produit, et donc de la répartition moléculaire, a été possible grâce aux méthodes chromatographiques, qu'elles soient simples comme la chromatographie sur couche mince, ou plus fiables comme la chromatographie d'exclusion-diffusion sur colonne de Biogel P₂ et la chromatographie liquide à haute performance. Ces méthodes permettent, les unes, d'assurer une séparation des divers holosides de DP 1 à 20, c'est le cas de la chromatographie d'exclusion-diffusion -mais sa mise en oeuvre (préparation de la colonne et durée de la séparation) ne permet pas de l'utiliser en analyse de routine, et d'autres, d'assurer une séparation suffisante des oligosaccharides, comme la chromatographie liquide à haute performance, d'application plus aisée et rapide et qui a été utilisée durant notre travail pour les analyses de routine. Nous ne reviendrons pas sur l'aspect technique du sujet qui a été largement développé dans les chapître précédents.

La chromatographie liquide à haute performance et la chromatographie d'exclusion-diffusion sont des méthodes peu résolutive mais très utiles pour étudier la répartition moléculaire des hydrolysats. Les analyses effectuées par chromatographie et pour l'étude des caractères technologiques permettent de tirer un certain nombre de conclusions relatives au contrôle de la qualité.

VI.1 - CONTROLE DE QUALITE DES HYDROLYSATS

Les chromatogrammes obtenus indiquent que la composition des produits d'hydrolyse varie de manière très appréciable suivant la méthode d'hydrolyse utilisée.

En effet, la chromatographie d'exclusion-diffusion et la chromatographie liquide à haute performance ont montré que les hydrolysats obtenus en industrie par l'action de l' α amylase sont riches en oligoholosides de DP 3 et DP 6, avec une faible teneur en glucose.

Elles permettent de confirmer que la β amylase est bien spécifique des liaisons α 1 - 4 avec libération de diholosides, de telle sorte que le produit d'hydrolyse est quasiment constitué de maltose.

L'analyse des hydrolysats résultant d'une attaque par l'acide chlorhydrique a montré une répartition plus homogène et une disparition des polysaccharides supérieurs en faveur des oligosaccharides. Dans une certaine mesure, si l'hydrolysat n'a subi aucun traitement ultérieur, cette caractéristique constitue un indice et peut être considérée comme critère d'identification d'un hydrolysat acide.

Nous avons défini les produits d'hydrolyse comme étant caractérisés par leur degré d'hydrolyse déterminé à partir du pouvoir réducteur. Celui-ci sera d'autant plus élevé que l'hydrolyse aura été plus poussée. Ce paramètre a été déterminée par la méthode de LUFF SCHOORL (Annexé I).

Les résultats obtenus permettent de donner la composition du produit d'hydrolyse complète obtenue par saccharification enzymatique :

- glucose : 92 - 95 %
- disaccharide : 3 %

Les hydrolysats à haut D.E. employés en industrie et obtenus par la voie acide, possèdent un D.E. = 44. Au-delà, nous assistons à une dégradation des produits formés et à une formation de sucres de réversion. Ceci sera développé dans la deuxième partie de ce chapitre.

A côté des études qui permettent de rendre compte de la composition du produit, il nous a paru nécessaire de rechercher des tests qui permettent d'évaluer les qualités technologiques des hydrolysats (matière sèche et viscosité). C'est dans cet objectif que nous avons envisagé la détermination de la viscosité qui conditionne les propriétés rhéologiques des hydrolysats. Celle-ci est d'autant plus élevée que l'hydrolysate contient plus de polyholosides à DP moyennement élevé. Cette propriété est en relation étroite avec le pouvoir anticristallisant des produits d'hydrolyse. Le viscosimètre à bille, utilisé pour effectuer nos mesures, est de mise en oeuvre aisée et constitue un outil simple et bien adapté pour une meilleure évaluation de la qualité du produit.

Deux types d'étude s'imposent pour le contrôle des dérivés hydrogénés ; ce sont la recherche du Ni comme résidu de catalyseur et la mesure du pH pour les produits destinés à la confiserie. Le pH doit être compris entre 6 - 7 ; cela constitue un critère important pour l'évaluation des tests de carie.

Pour terminer l'étude de la composition des produits d'hydrolyse de l'amidon et des critères assurant leur qualité, nous avons entrepris une étude comparative de l'influence de la liquéfaction sur la saccharification. Les résultats obtenus ont conduit à impliquer les produits de réversion dans le phénomène de résistance à l'hydrolyse. Il apparaît, en effet, que la saccharification enzymatique est d'autant plus incomplète que la préhydrolyse acide aura été plus poussée.

VI.2 - ETUDE DES SUCRES DE REVERSION

La recherche des sucres de réversion a donc été envisagée dans le but de les utiliser comme traceurs de l'hydrolyse acide. Les travaux effectués dans le domaine de l'analyse des dérivés d'hydrolyse ont montré que l'hydrolyse acide produit, dans certaines conditions (concentration en glucose, acidité du milieu et température), des sucres de réversion ou produits de recombinaison.

Notre objectif était de rechercher ces produits et de mettre en évidence l'hydrolyse acide par un test qualitatif. La nature des échantillons, d'une part, et les méthodes d'analyse, d'autre part, apportent la justification de la recherche au niveau des disaccharides et des traitements auxquels ont été soumis les échantillons.

La chromatographie gaz liquide, bien qu'elle nécessite une longue préparation de l'échantillon, constitue une méthode d'une bonne résolution pour l'analyse de traces de sucre.

En complément à cette analyse, la chromatographie sur résine échangeuse d'ions sera utilisée car elle présente l'avantage par rapport à la chromatographie gaz liquide d'éviter le chauffage de l'échantillon et permet une analyse plus spécifique dans la mesure où elle met en jeu l'affinité des holosides vis-à-vis des groupements fonctionnels de la résine.

VI.2.1 Analyse par chromatographie gaz liquide (CGL)

L'analyse directe des deux échantillons par CGL ne montre aucune différence quant à leur composition. Une étude expérimentale réalisée, d'une part à partir de glucose pur, et d'autre part à partir d'échantillons soumis à la réversion, a montré que la réversion est possible puisqu'il apparaît dans le milieu de l'isomaltose en quantité importante.

Les hydrolysats moyens industriels soumis également à la réversion ont présenté une teneur plus élevée en isomaltose pour le SG 25 que la fraction MD 05. Ceci nous permet de conclure que dans les produits d'hydrolyse à haut D.E., l'isomaltose est utilisable comme traceur d'une attaque acide lorsque sa teneur dans le produit d'hydrolyse excède 5 %, valeur maximale observée sur des hydrolysats enzymatiques.

L'analyse d'hydrolysats moyens industriels, dont les saccharides résistant à l'hydrolyse enzymatique ont été concentrés par lévuration après saccharification enzymatique, montre que les échantillons SG 25 et MD 05 ont une composition identique. Mais à côté des diholosides normalement attendus, comme le maltose et l'isomaltose, nous avons décelé la présence de maltulose et de deux produits inconnus.

Pour compléter ces identifications et afin d'éviter les traitements nécessaires pour le dosage en chromatographie gaz liquide, il nous a semblé intéressant d'entreprendre une recherche par chromatographie sur résine échangeuse d'anions qui offre l'avantage d'analyser d'emblée les mono, di et triholosides.

VI.2.2 - Chromatographie sur résine échangeuse d'anions

Les nombreux essais comparatifs en vue de tester les résine AG 1x8 et chromobeads S. nous ont conduit à adopter cette dernière qui assure une meilleure séparation des diholosides.

Les chromatogrammes obtenus ne sont pas distincts et possèdent le même nombre de substances. Certains holosides tels que le glucose et le maltose ont été facilement identifiés alors que le gentiobiose, l'isomaltose et le maltotriose ne l'ont été qu'après addition d'une quantité connue de témoin. Cette manière de procéder par des ajouts dosés a permis de montrer que le dernier pic inconnu ne correspond ni au cellobiosé, ni au tréhalose. En tenant compte du résultat obtenu par chromatographie gaz liquide, nous avons émis l'hypothèse suivant laquelle le pic pourrait correspondre au maltulose. L'absence de témoin maltulosé n'a pas permis de le prouver.

Cette analyse confirme la difficulté d'utiliser les produits de réversion comme traceur de l'hydrolyse acide ménagée. Elle permet de conclure que ces produits ne peuvent pas être utilisés comme traceurs d'hydrolyse acide sur des Hydrolysats moyens. Par contre, lorsque des conditions d'hydrolyse acide plus sévères (préparation de dextrose) sont utilisées pour la préparation de ceux-ci, la teneur en isomaltose, interprétée de manière quantitative, peut être utilisée à cette fin.

CONCLUSION

L'objectif de ce présent travail a été de colliger les méthodes analytiques et de choisir les mieux adaptées en analyse alimentaire pour l'étude des produits d'hydrolyse.

Les méthodes retenues nous ont permis d'étudier, d'une part la composition des produits et d'évaluer leurs qualités technologiques, d'autre part de rechercher les produits secondaires des réactions d'hydrolyse.

Les méthodes chromatographiques utilisées (chromatographie d'exclusion-filtration et chromatographie liquide à haute performance) pour l'analyse des échantillons, ont permis de rendre compte de la composition bien définie des hydrolysats. Dans une certaine mesure, ce type d'analyse peut permettre d'identifier un hydrolysat acide qui se caractérise toujours par une composition équilibrée. Etant entendu que cette distinction est effectuée sur un hydrolysat n'ayant pas subi de traitement ultérieur.

Les études effectuées pour la mise en évidence d'un traceur d'hydrolyse acide ont permis également de montrer que les liaisons 1-6 sont celles qui se forment de façon prépondérante en milieu acide et à chaud, à partir du dextrose. Du fait de la présence naturelle des liaisons α 1 - 6 (type isomaltose) dans la structure de l'amidon, son apparition dans certaines limites (inférieur à 5 %) ne peut être interprétée comme résultant d'une réversion.

D'après nos essais effectués sur des hydrolysats liquéfiés industriellement et soumis à la réversion, il est permis de conclure que la présence d'isomaltose à une teneur supérieure à 5 % dans les hydrolysats à haut D.E. est le signe d'une attaque acide.

L'utilisation de l'isomaltose dans les tests de différenciation est donc envisageable de manière quantitative, et sur des échantillons qui ont subi une hydrolyse poussée.

ANNEXE I

DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS PAR LA METHODE DE LUFF SCHOORL

Cette méthode a été utilisée pour le dosage des sucres réducteurs parce-
qu'elle tend maintenant à remplacer les méthodes de Gabriel BERTRAND et
de TAYNE et EYNON dans l'analyse alimentaire ; son application comme
méthode internationale officielle est actuellement envisagée.

Préparation du réactif

- Dissoudre séparément :

- . 50 g d'acide citrique dans 50 ml d'eau,
- . 25 g de sulfate cuivrique dans 100 ml d'eau,
- . 388 g de carbonate sodique pur cristallisé dans 400 ml d'eau
chaude.

- Verser ensuite prudemment la solution d'acide citrique dans la solution
de carbonate sodique, et, au mélange obtenu, ajouter la solution de sulfate
cuivrique.

- Compléter ensuite à 1 L.

Avant d'utiliser le réactif, il est nécessaire de vérifier certains
paramètres :

1 - Le réactif doit être N/10 en cuivré.

A 25 ml de réactif, ajouter 3 g de KI
et 25 ml de H_2SO_4 25 %.

Titrer ensuite par le thiosulfate de Na N/10 en présence
d'empois d'amidon introduit en fin de titrage.

$nT < 25$ ml

2 - Le réactif doit être 1.2 à 1.5 N en Na_2CO_3 et $NaHCO_3$

A 1 ml de réactif, ajouter 9 ml d'eau et 25 ml d'HCl N/10.

Chauffer 1 h au bain-marie bouillant dans un erlenmeyer
ouvert.

Refroidir et ramener au volume primitif.

Titre par NaOH N/10 en présence de Phénol phtaléine.

$$nN \approx 6 \text{ ml}$$

3 - Le réactif doit être 1.2 N à 1.5 N en Na_2CO_3 .

Titre en présence de Phénol phtaléine 1 ml de réactif pur HCl N/10 en agitant.

Le terme de la réaction est marqué par la disparition de la coloration violette.

$$6 \text{ ml} < n\text{HCl} < 7.5 \text{ ml}$$

Mode opératoire

- Introduire dans un matras d'erlenmeyer de 250 ml, 25 ml exactement mesurés de la solution à doser (renfermant environ 30 mg de glucose) et 25 ml exactement mesurés du réactif de LUFF SCHOORL.
 - Après addition de pierre ponce, surmonter le matras d'un réfrigérant ascendant et maintenir celle-ci pendant 10 minutes exactement. La solution est refroidie puis additionnée de 3 g de I K dissous dans un peu d'eau et ensuite 25 ml de H_2SO_4 à 25 % introduit avec précaution par petites fractions.
 - Titrer l'iode libéré par le thiosulfate de Na N/10 en présence d'empois d'amidon \approx 5 ml ajoutés en fin de titrage. N
 - Titrer en parallèle un témoin traité dans les mêmes conditions en remplaçant la solution sucrée par de l'eau distillée. N'.
- La teneur en élément réducteur est donnée suivant le tableau (pg2). N'-N.

TABLE DE LUFF-SCHOORL

	<u>Glucose</u> <u>Fructose</u> <u>Sucre inverti</u>	<u>Galactose</u>	<u>Maltose</u>	<u>Lactose</u> <u>anhydre</u>	<u>Lactose</u> <u>hydraté</u>	
	$\frac{\text{ml}}{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ N/10	$\frac{\text{mg}}{\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6}$	$\frac{\text{mg}}{\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6}$	$\frac{\text{mg}}{\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}}$	$\frac{\text{mg}}{\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}, \text{H}_2\text{O}}$	
1	2.4	2.7	3.0	3.6	3.8	1
2	4.8	5.5	7.3	7.3	7.7	2
3	7.2	8.3	11.7	11.0	11.6	3
4	9.7	11.2	15.6	14.7	15.5	4
5	12.2	14.1	19.6	18.4	19.4	5
6	14.7	17.0	23.5	22.1	23.3	6
7	17.2	20.0	27.5	25.8	27.2	7
8	19.8	23.0	31.5	29.5	31.1	8
9	22.4	26.0	35.5	33.2	35.0	9
10	25.0	29.0	39.5	37.0	39.0	10
11	27.6	32.0	43.5	40.8	43.0	11
12	30.3	35.0	47.5	44.6	47.0	12
13	33.0	38.1	51.6	48.4	51.0	13
14	35.7	41.2	57.7	52.2	55.0	14
15	38.5	44.4	59.8	56.0	59.0	15
16	41.3	47.6	63.9	59.9	63.1	16
17	44.2	50.8	68.2	63.8	67.2	17
18	47.1	54.0	72.2	67.7	71.3	18
19	50.0	57.3	76.5	71.7	75.5	19
20	53.0	60.7	80.9	75.7	79.7	20
21	56.0	64.2	85.4	79.8	84.0	21
22	59.1	67.7	90.0	83.9	88.3	22
23	62.2	71.3	94.6	88.0	92.6	23

ANNEXE II

ESSAI LIMITE DU NICKEL

Méthode au diméthylglyoxime

- Peser 1 g de diméthylglyoxime, ajouter environ 50 ml d'alcool absolu et de l'ammoniaque jusqu'à dissolution : environ 10 ml.
- réaliser la minéralisation sèche de 1 g de produit. Reprendre par 5 ml d'eau et ajouter 10 ml de solution de diméthylglyoxime.
- Homogénéiser et comparer à un témoin réalisé de la manière suivante :
 - . Ajouter 1 ml de solution à 0.01 g/100 de Ni à 4 ml d'eau et 10 ml de la solution de diméthylglyoxime.
 - . Homogénéiser, la coloration de l'essai doit être égale ou moins intense que celle du témoin (10 ppm).

ANNEXE III

REACTIF AU AgNO_3 / NaOH

Réactif 1

0.5 ml d'une solution saturée de nitrate d'argent (AgNO_3),
Compléter à 100 ml avec de l'acétone,
Dissoudre ensuite le précipité avec 5 ml d'eau distillée.

Réactif 2

2 g d'hydroxyde de sodium (NaOH) dans un peu d'eau,
Compléter ensuite à 100 ml avec du méthanol.

Pulvériser le réactif 1 puis le réactif 2 et laisser développer les taches
à l'étuve à 100° C pendant 2 minutes.

ANNEXE IV

CHROMATOGRAPHIE DE PERMEATION SUR GEL

Biogel P₂ : Polyacrylamide de granulométrie <37 μ .

Colonne

- . Longueur : 2 m
- . Diamètre : 1.5 cm
- . θ calotte : 65 cm

Eluant : Eau bidistillée

- débit : 0.42 ml/mn

Solution à déposer : 50 ml d'une solution à 1.5 g/100 ml d'eau, de l'hydrolysate à analyser.

Détection par auto-analyseur Technicon :

Réactif : Orcinol sulfurique à 1 g/l dans H₂SO₄ 70 % V/V.

Schéma : Le principe de la détection est le même utilisé pour l'analyse de résine échangeuse d'anion.

ANNEXE V

CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR COLONNE CHARBON-CELITE

- Le charbon joue le rôle d'absorbant.
- La célite (terre de diatomées) renferme environ 95 % de SiO_2 .
La célite est utilisée pour éviter un tassement trop important du charbon et donc pour faciliter l'élution.

La séparation sur cette colonne sera réalisée de la manière suivante : ce sont les molécules contenant le plus grand nombre de groupement polaire qui sont les plus facilement adsorbées. Les monosaccharides seront élués en premier, puis les di et les triholosides.

Colonne : Charbon - Célite 50/50

- . Hauteur : 50 cm
- . Diamètre : 4 cm
- . Débit : 1 ml/mn

Eluant 1 : 1.2 L d'un mélange eau-éthanol 25 %

Eluant 2 : 1.2 L d'un mélange eau-éthanol 40 %.

Quantité déposée : 50 ml d'une solution de maltodextrine à 12 g/30 ml d'eau.

Préparation de la colonne

- . Remplir la colonne avec la quantité nécessaire d'un mélange charbon - célite 50/50, laisser stabiliser plusieurs heures par gravité.
- . Retirer ensuite l'excédent d'éluant et déposer la substance à analyser.
- . Faire ensuite passer l'éluant 1 au moyen d'une pompe péristaltique à un débit de 1 ml/mn.

ANNEXE VI

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE

- Résine échangeuse de cation AG50W x 4 sous forme de Ca^{2+} 200-400 mesh.
- Résine échangeuse cationique d'acide fort avec des groupements fonctionnels acide sulfonique attachés à un copolymère styrène divinylbenzène 4 %.

Colonne : pour obtenir une bonne séparation, il est nécessaire d'utiliser 2 colonnes placées en série.

- . Longueur : 30 cm
- . Diamètre : 7.8 mm
- . Température
de l'élution : 85°C
- . Débit : 1 ml/min

Eluant : Eau bidistillée dégazée.

Quantité injectée : 10 μl

Les hydrolysats sont dilués à 10 bx et filtrés sur millipore de 22 μ avant d'être injectés.

Détecteur : Réfractomètre différentiel.

ANNEXE VII

CHROMATOGRAPHIE GAZ LIQUIDE

Cette méthode a été utilisée tout au long de notre travail pour une recherche précise des disaccharides.

Colonne : Gaz chrom Q 100 - 120 mesh

5 % OV 225.

. Longueur : 1.5 m

. Diamètre : 1/8.

Débits :

N₂ : 30 ml/mn

Air : 400 ml/mn

H₂ : 28 ml/mn

Température :

θ_e : 200° - pour assurer une ligne de base constante

θ_d : 250°

θ_i : 250°

Quantité injectée : 1 µl

Déroutement : 5 mm/mn.

Afin d'obtenir des pics biens séparés et reproductibles, les substances à chromatographier ont été soumises à une oximation ou une hydrogénation avant d'être silylées.

La prise d'essai dépend de l'importance relative des produits recherchés, de telle sorte que pour un hydrolysats H₀ qui n'a subi aucun traitement.

P.e. = 250 mg.

Alors que pour un hydrolysats H₁ qui a subi une cristallisation,
P.e. = 150 mg.

OXIMATION

. Réactifs :

- 1 /- β Phényl D glucoside à 1 g/l dans la pyridine
- 2 /- Chlorhydrate d'hydroxylamine à 85 g/l dans la pyridine.

A une prise d'essai de 150 mg, ajouter 10 ml exactement mesurés de la solution étalon de β Phényl D glucoside et agiter.

Dans une éprouvette, reprendre 1 ml de la solution ainsi obtenue et ajouter 1 ml d'une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine.

Mettre au bain-marie à 70°, pendant 40 minutes exactement.

Laisser refroidir et faire le dérivé silylé.

SILYLATION

Au produit obtenu précédemment, ajouter 1 ml d'hexaméthylidisylazane + 0.1 ml d'acide trifluoroacétique avec beaucoup de précaution.

Agiter prudemment et laisser reposer 30 minutes à 20°C.

Injecter 1 µl du surnageant.

HYDROGENATION

Dans un erlenmeyer de 100 ml, peser 150 mg de produit sec, soit en tenant compte de la matière sèche :

$$P_e = \frac{150 \times 100}{MS}$$

Ajouter 150 mg de borohydrure de Na et diluer à 50 ml avec de l'eau.

Agiter 1/2 heure.

Faire cesser l'hydrogénation en versant de l'acide acétique jusqu'à cessation du bouillonnement.

Passer ensuite sur une résine échangeuse de cation Amberlite AG50W x 4 sous forme H et éluier avec 50 ml d'eau.

Evaporer à sec et laver avec du méthanol. S'il apparaît un précipité blanc, évaporer le méthanol et reprendre par 1 ml d'une solution étalon contenant 25 mg de squalane/ml de Pyridine et ajouter 9 ml du pyridine. Agiter fortement et faire un dérivé silylé.

ANNEXE VIII

SEPARATION DES MONO, DI et TRIHOLOSIDES

Cette étude a été entreprise dans le but de séparer les holosides résiduels après saccharification et levuration de 2 maltodextrines MD05 et MD25. Cette séparation a été envisagée parce que la chromatographie sur résine échangeuse d'ion permet une analyse réelle de l'échantillon sans nécessité de chauffage, comme ce fut le cas pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Les résines sont mises sous forme boratée et l'élution est obtenue par un gradient en acide borique dont la force ionique est améliorée par des solutions de NaCl de concentration croissante.

Les glucides sont dosés, à la sortie de la colonne après réaction avec l'orcinol en milieu sulfurique et à chaud, par calorimétrie à 420 nm.

Le mélange de réactif et la détection sont automatisés sur des chaînes Technicon.

Réactifs

- . Solution d'orcinol sulfurique à 1 g/1000 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) 70 %.
Diluer d'abord l'acide, laisser refroidir avant d'ajouter l'orcinol afin d'éviter une coloration trop intense du réactif.
- . Solution de régénération
Tétraborate de Potassium $K_2B_4O_7 \cdot 4H_2O$ en solution à 10 g/1000 ml.
- . NaOH 4N.

Tampons d'élution

. Tampon 1	: Acide borique 0,1 M	: 6.184 g/l
	ajusté à pH = 8	
. Tampon 2	: Acide borique 0,1 M	: 6.184 g/l
	+ NaCl 0,05 M	: 2.922 g/l
	ajusté à pH = 8	
. Tampon 3	: Acide borique 0,1 M	: 6.184 g/l
	+ NaCl 0,1 M	: 5.844 g/l
. Tampon 4	: Acide borique 0,2 M	: 12.368 g/l
	ajusté à pH = 8	
. Tampon 5	: Acide borique 0,2 M	: 12,368 g/l
	+ NaCl 0,2 M	: 11,688 g/l
	ajusté à pH = 9,5	

Le pH final a été ajusté à pH = 9,5.

Solution étalon

. Etalon interne Ribose

Prise d'essai : 0,1 ml d'une solution à 50 mg/100 ml soit 50 mg.

. Etalons sucres témoins

Prise d'essai : 50 mg de chaque sucre.

Echantillon à analyser

0,1 ml d'une solution à 50 mg/100 ml d'eau.

Solution de rinçage

NaOH 1 N.

Résine : Chromobeads S - 20 µm

Résine échangeuse d'anion de base forte : Styrène divinylbenzène 8%.

Colonne

. hauteur C. 750 mm

R. 700 mm

Débit : environ 0.80 ml/mm

Il nous paraît nécessaire de signaler qu'un débit trop important affecte la résolution ; en revanche, un faible débit améliore la séparation mais les pics sortent en traînée.

Température de la calotte : 53.5°C - 55°C

La colonne est maintenue à une température constante par une double enveloppe dans laquelle circule un liquide.

Mode opératoire Thermostaté

- Préparation de la colonne

Le diamètre des particules étant $< 20\mu$, la colonne est remplie par la méthode de la voie humide.

La résine est mise à gonfler dans de l'eau bidistillée quelques heures avant le remplissage de la colonne.

La résine se tasse par gravité d'abord, ensuite à l'aide d'une micropompe réglée au débit d'utilisation de la colonne. L'eau est utilisée comme éluant dans la première phase du tassement, ensuite une solution N de NaOH en quantité suffisante pour déplacer les ions Cl^- de la résine (environ 20 fois le volume de résine).

Le lit de résine est soumis à la fixation de l'ion tétraborate par régénération pendant 24 h, avec une solution de tétraborate de Potassium à 10 %.

La résine est alors prête à l'analyse.

Avant l'introduction de l'échantillon, il est nécessaire d'assurer l'équilibre de la résine ; ceci est obtenu par passage du tampon n°1 au débit fixé précédemment pendant 1 h.

En travaillant de cette manière, nous avons obtenu une bonne résolution dès les premiers dépôts.

- Introduction de l'échantillon

. Enlever le liquide surnageant au-dessus de la résine avec précaution, pour éviter de mettre en suspension des particules.

. Déposer au sommet de la résine, 0.1 ml exactement mesuré et rincer les parois avec 0.1 ml de tampon n°1.

. Faire pénétrer le dépôt dans la résine en exerçant une pression d'air au haut de la colonne.

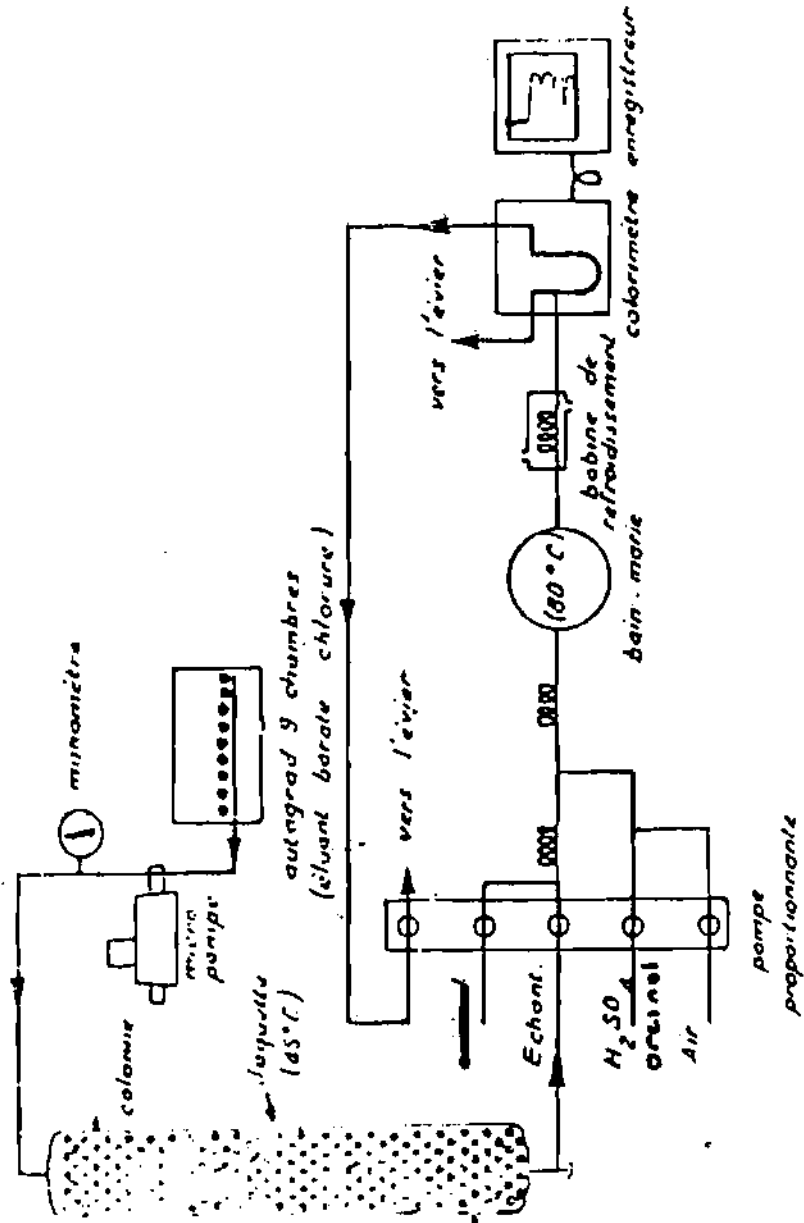
. Remplir ensuite la colonne jusqu'à débordement et adapter le haut de colonne en prenant soin de chasser l'air dont la présence sous forme d'une simple bulle annule la pression.

. Enfin, brancher le système autograde des gradients.

Entre chaque analyse d'échantillon, laisser régénérer la résine durant 8 heures, par passage d'une solution de tétraborate à 10 %, et équilibrer 1 heure avec le tampon n°1.

GRADIENT D'ELUTION POUR LA CHROMATOGRAPHIE DES SUCRES

CHAMBRES	PH 8 TAMPON I	PH 8 TAMPON II	PH 8 TAMPON III	PH 8 TAMPON IV	PH 9,5 TAMPON V
1	50 ml				
2	50 ml				
3	25 ml	25 ml			
4			20 ml	30 ml	
5				25 ml	25 ml
6				25 ml	25 ml
7				25 ml	25 ml
8					50 ml
9					50 ml



B I B L I O G R A P H I E

- 1 - BANKS W., GREENWOOD C.T., MUIR D.D.,
Die Stärke 25 Jan. 1973, N. 12
- 2 - BERCY P.,
Cahier Nut. Diet., XV, 1, 1980
- 3 - BERLIN H.,
J. Am. Chem. Soc., 1926, 48, 1107
J. Am. Chem. Soc., 1926, 47, 2647
- 4 - BINKLEY W.W.,
Adv. Carbohydr. Chem., 1955, 10, 55
- 5 - BRUCKNER J.,
Biochem. J., 1955, 60, 200-205
- 6 - CHUMS S.C.,
Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem., 1970, 25, 13
- 7 - COWIE J.M.G., FLEMING I.D., GREENWOOD C.T., MANNERS D.S.
J. Am. Soc., 1958, 697
- 8 - DAMONTE A., LOMBARD A., TOURN M.L., CASSONNE M.C.,
J. Chromatogr., 1971, 56, 203
- 9 - DUTTON G.S.
Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem., 1974, 28, 9
- 10 - EVANS M.E., LONG L., PARRISH F.W.,
J. Chromatogr., 1968, 32, 602
- 11 - FAGUSSON I., SABBAGH N.K.,
J. of Chromatogr., 1973, 86, 184
- 12 - FISHER E. Ber., 1890, 23, 3687
- 13 - FLORIDI A.,
J. of Chromatogr., 1971, 59, 61-70
- 14 - FOISSAC L.
Chim. Analyt., vol 19, n°12, 1967, 649
- 15 - GEORGES L.W., MILLER I.L., WOLFROM M.L.,
J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 125

- 16 - GUERIN B.
Série de synthèse bibliographique n°18
SIROPS. CDIUPA.
- 17 - GREENWOOD C.T.
Die Stärke, 1960, 12, 169
- 18 - HEYRAUD A., RINAUDO M.,
J. of Chromatogr., 1978, 166, 149-158
- 19 - HILL A.C.
J. Am. Chem. Soc. 1903, 83, 58
- 20 - HOLLO J.
Die Stärke 25, Januar 1973, 1-11
- 21 - HOPKINS R.H.,
Wallest lab. Comm., 1954, XVIII, n°59, 229
- 22 - JANDERA P., CHURACEK J.,
J. of Chromatogr., 1974, 98, 55-104
- 23 - JEMMALI M.
Ind. Agr. et Alim., 1965, 12, 1271
- 24 - JOHN M., TRENEL G., DELLWEG H.
J. Chromatogr. 1969, 42, 476-484
- 25 - JONES R.W., DUNKER R.J., RIST C.E.,
J. Am., Chem. Soc., 1955, 77, 1659
- 26 - KEARSLY M.W., SATTI S.H., TREGASKIS I.,
Starch 1980, 32, 5, 169-174
Starch 1980, 41, 10
- 27 - KEILLING D., HARTREE E.F.,
Biochem. J. 1945, 39, 293-301
- 28 - KENNEDY J.F.,
Biochem. Soc. Trans. 1974, 2, 54-64
- 29 - KENNEDY F.F., FOX J.E.,
Mesh. Carbohydr. Chem. 1980, 8, 13
- 30 - KENNEDY J.F., FOX J.E., SKIRIOW J.C.
Stärke 1980, 32, 9, 309 - 316
- 31 - KEER R.W.. In Chemistry and Industry of Starch.
Acad. Press. 1950

- 32 - KESSLER R.B.,
Anal. Chem. 1967, 39, 1416 - 1422
- 33 - KHYM J.X., ZILL L.P.
J. Am. Chem. Soc. 1952, 74, 2090 - 2094
- 34 - KHYM J.X., ZILL L.P., CHENIAL G.M.,
J. Am. Chem. Soc. 1953, 75, 1339
- 35 - KOSHLAND D.E. Jr. in die Enzym
Acad. Press. int. Vol. 1. 305
- 36 - LILJAMAA J.J., HALEN A.A.,
J. Chromatogr. 1972, 64, 247 - 252
- 37 - MANSFIELD C.T., Mc ELROY H.G.,
Anal. Chem., 1971, 43, 586
- 38 - MISAKI A., TORII M., SAKAKIBARA K., MIYAJI H.,
Carbohydr. Res., 1972, 25, 443 - 451
- 39 - PARKER K.J., BIRCH G.G.,
Science and Technology
4 - 7 avril 1978
- 40 - PAZUR J.H., ANDO T.,
J. Biol. Chem. 1959, 234, 1966
- 41 - PAZUR J.H., KLEPPE K.,
J. Biol. Chem. 1962, 237, 1002
- 42 - PAZUR J.H., WHISTLER R.L., PACHAL E.F.,
Die Aktion J. Amyloglucosidase on starch on malto-oligosaccharides
Acad. Press. New-York, 1965.
- 43 - PEAT S., TURVEY J.R., EVANS J.M.
J. Chem. Soc., 1959, 3223 - 3341
- 44 - PEAT S., WHELAN W.J., EDWARDS T.E., OVEN O.,
J. Chem. Soc., 1958, 556
- 45 - PEAT S., WHELAN W.J., HINSON K.A.,
Chem. and Ind. (London) 1955, 18
- 46 - SAMUELSON O., Exchange separation in analytical chemistry
Academic Press. New-York 1962
- 47 - SAMUELSON O.
Mesh. of Carbohydr. Chemist., 1972, 6, 65
- 48 - SAMUELSON O., SAMUELSON J.
Anal. Chem., 1967, 39, 10, 1156 - 1158

- 49 - SAMUELSON O., STROMBERG H.,
Z. Anal. Chem. 1968, 236, 506 - 513
- 50 - SAMUELSON O. HAVLICEK J.,
J. Inst. Brew, 1975; 81, 466 - 470
- 51 - SAUNDERS R.M.,
Carbohydr. Res., 1968, 7, 76 - 79
- 52 - SCHMIDT F.,
Calsberg Res. Comm. 1976, vol 41, n°2
- 53 - SEYMOUR F.R., SLODKI M.E., PLATTNER R.D., JEANES A.,
Carbohydr. Res. 1977, 53, 153 - 166
- 54 - SILIN P.M., SAPENDINA E.A.
Isviesta Toniskovo Technologist Cheskovo
Institutua 1924, 45, 3
- 55 - SINNER M., SIMATUPANG M.H., DIETRICH H.H.,
Worl. Sci. Technol. 1975, 9, 307
- 56 - SINNER M., PULS J.,
J. of chromatogr. 1978, 156, 197 - 204
- 57 - SOWDEN J.C., SPRIGGS A.S.,
J. Am. Chem. Soc. 1956, 78, 2503
- 58 - SROCYNSKI A. BORUCH M.,
Die Stärke 1964, 7, 215
- 59 - SROCYNSKI B., DRUCH M., REIMSWELSEL W.
Chim. et Ind. Gen. Chim. 1966, 96, n°1
- 60 - SWADON M.A., CORI C.F.,
J. Biol. Chem. 1948, 172 - 797
- 61 - SYAMANANDA R., STAPLES R.C., BLOCK R.J.,
Contrib. Boyce. Thompson Inst. 1962, 21, 363
- 62 - TANAKA M.,
Carbohydr. Res. 1981, 88, 1 - 8
- 63 - TATE L.,
Progrès dans le domaine des glucides alimentaires
Applied Science Publishers 1980
- 64 - Technicon. 1966, Technics in amino-acid
monogr. n°1 et 2 - 147
Technicon Instrument Company LTD
Cherstsey - ENGLAND

- 65 - THOMPSON A., WOLFROM M.L., QUINN E.J.,
J. Am. Chem. Soc. 1954, 76, 3003
- 66 - THOMPSON A., ANNO K., WOLFROM M.L., INATOME M.
J. Am. Chem. Soc. 1954, 76, 1309
- 67 - TILLMANS J. PHILLIPI F.,
Biochem. Z., 1929, 215, 36 - 60
- 68 - TOLLIER M.T., ROBIN J.P.,
Ann. Technol. Agr. 1979, 28, 1
- 69 - TORII M., SAKAKIBARA K.
J. of Chromatogr. 1954, 96, 255 - 257
- 70 - TORII M. BLESILA P.A., TANAKA S. TSUMURAYAY., MISAKI A., SAWAI T.
J. Biochem. 1979, 85, n°3, 883 - 886
- 71 - UNUKI K., YAMAMOTO T.
J. Biochem. 1975, 78, 897 - 903
- 72 - WANISKA R.D., KINSELLA J.E.,
J. of Food Sciences 1980, 45, n°5, 1259 - 1284
- 73 - WHELAN W.J.
Biochem. Soc. Symposium II, 1953, 17
- 74 - WHISTLER R.L. PASCHALL. E.F.,
Starch, Chemistry and Technology
Academic Press. London 1965
- 75 - WOHL A., Ber 1890, 23, 2084
- 76 - WOLFROM M.L., SCHWAB G.,
Carbohydr. Res. 1969, 9, 407-413
- 77 - WOLFROM M.L., THOMPSON A. and BROWNSTAIN A.M.,
J. Am. Chem. Soc. 1958, 80, 2015
- 78 - WOLFROM M.L., THOMPSON A. BROWNSTAIN A.
J. AM. Chem. Soc. 1956, 78, 2503.
- 79 - WOLFROM M.L., THOMPSON A. BROWNSTAIN A.,
J. Am. Chem. Soc. 1957, 79, 4212
- 80 - WOLFROM M.L, THOMPSON A., TIMBERLAKE C.E.,
Cereal. Chem. 1963, 40, 82
- 81 - WOLFROM M.L., LASSATRE E.N., O. NEILL A.N.
J. Am. Chem. Soc. 1951, 73, 595
- 82 - ZILIC Z.
J. Chromatogr. 1979, 164

- 83 - ZIMMERMAN M.
Bios 1976, 7, 7 - 8, 3 - 12
- 84 - ZURCHER K., HADOR H.,
Mitt. Geb. Lebenswisse lunlers Hyg. 1977, 68, n°2, 200 - 212
- 85 - Journal officiel des communautés européennes
Directrice du Conseil du 11 Décembre 1973.
