



HAL
open science

Impact du glucomannane de konjac sur les interactions composés volatils - amidon de pomme de terre dans un gel hydraté

Céline Lafarge

► **To cite this version:**

Céline Lafarge. Impact du glucomannane de konjac sur les interactions composés volatils - amidon de pomme de terre dans un gel hydraté. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bourgogne, 2016. Français. NNT : 2016DIJOS007 . tel-01466858

HAL Id: tel-01466858

<https://theses.hal.science/tel-01466858>

Submitted on 13 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

AGROSUP DIJON

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Sciences de l'alimentation (Biochimie)

par Céline Lafarge

soutenue le 8 décembre 2016

Impact du glucomannane de konjac
sur les interactions composés volatils - amidon de pomme de
terre dans un gel hydraté

Directrice de thèse Nathalie Cayot

Co-directrice de thèse Patricia Le Bail

Pr Beney Laurent
Pr Desobry Stéphane
Pr Grisel Michel
Dr Lübke Markus
Pr Cayot Nathalie
Dr Le Bail Patricia

Agrosup Dijon
ENSAIA, Université de Lorraine
Université du Havre
Société Aromalyse
Agrosup Dijon
INRA Nantes

Examineur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse
Co-directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie Patrick Gervais, directeur de l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (UMR PAM), ainsi que Rémi Saurel (ancien directeur de l'équipe Procédés Alimentaires et Physicochimie (PAPC)) et Philippe Cayot (nouveau directeur de l'équipe Procédés Alimentaires et Physicochimie (PAPC) depuis janvier 2016) de m'avoir permis de consacrer mon tiers temps dédié à la recherche selon ma fiche de poste à cette thèse.

Je remercie tout particulièrement Nathalie Cayot, directrice de thèse, pour l'encadrement et le suivi quotidien de ce travail. Ce travail de thèse n'aurait pu voir le jour sans ton aide. Merci Nathalie de m'avoir accordé une pleine confiance, d'avoir cru en mes capacités en me donnant une véritable liberté scientifique pour la réalisation de cette thèse. Tu as toujours su te rendre disponible quand j'en avais besoin, me guider, m'encourager lors des moments difficiles. Nos nombreux échanges dans la bonne humeur, nos discussions constructives et tes conseils pertinents m'ont beaucoup apporté et m'ont permis de prendre plus confiance en moi-même. Cela a été un réel plaisir de travailler avec toi.

Je remercie Patricia Le Bail, co-directrice de thèse, qui malgré la distance entre Nantes et Dijon, m'a permis de bénéficier de son expertise en DSC et rayons X.

Je tiens à remercier les membres du jury, notamment Stéphane Desobry et Michel Grisel d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit ainsi que Laurent Beney et Markus Lübke d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je tiens également à remercier chaleureusement les membres du comité de pilotage : Céline Picard (Université du Havre) et Philippe Cayot (AgroSup Dijon) pour leurs avis, leurs conseils et leur soutien dans mes travaux de recherche.

Je remercie également les collègues de l'équipe BIA de l'INRA de Nantes, partenaires de ce projet : Bérénice Houinsou Houssou, Bruno Pointoire, Lucie Ribourg, qui ont réalisé toutes les études de diffractions des rayons X et DSC présentées dans ce document.

Je remercie également John Aldo Lee (Université Catholique de Louvain) et Ludovic Journaux (AgroSup Dijon) pour leurs appuis indispensables dans le traitement des images MEB. Merci Ludovic ! Sans ta collaboration, l'analyse des images n'aurait pas été possible.

Merci à Mesdames Aline Bonnotte, Jeannine Lherminier, Pascale Winkler (Centre de microscopie INRA Dijon / Université de Bourgogne) avec qui j'ai collaboré pour étudier les échantillons à l'échelle microscopique. Leurs expertises ont permis de gagner du temps sur les phases de mise au point de préparations d'échantillons

Merci à Mesdames Claire Chassefont, Liseth Goncalves, Chantal Hory, Olivia Jones (AgroSup Dijon) qui m'ont permis de mener à bien plusieurs expérimentations de ce projet :

Enfin, je remercie l'ensemble du personnel de l'équipe PAPC. Merci à tous pour votre soutien et votre participation directe ou indirecte à cette thèse.

RÉSUMÉ

L'objectif de ce travail est de démontrer que la présence de glucomannane de konjac (KGM) dans une matrice d'amidon de pomme de terre permet d'accroître sa stabilité physique sans inhiber l'encapsulation moléculaire de composés d'arôme par l'amylose. Pour cette étude, les deux polyosides choisis sont issus de tubercules de plantes abondantes dans la nature.

L'amidon est connu pour interagir avec des composés volatils, soit en les piégeant dans la zone amorphe, soit en formant des complexes d'inclusion. Ce phénomène est appelé encapsulation moléculaire. Cependant, les matrices amyloacées à forte teneur en eau présentent une synergie pouvant être néfaste sur la stabilité du piégeage des composés d'arôme dans le temps. Le KGM possède une capacité à former des solutions extrêmement visqueuses. L'ajout de KGM à faible concentration (0,2 %) à une suspension d'amidon (5 %) perturbe la gélatinisation de l'amidon, accélère la rétrogradation de l'amylose et ralentit la rétrogradation de l'amylopectine. Lors d'un vieillissement accéléré, la présence de KGM assure la stabilité de la suspension d'amidon.

Dans une matrice amidon – KGM, l'encapsulation moléculaire du carvacrol par l'amylose a été mise en évidence. Les complexes formés sont de type V6III. Leur formation est dépendante des conditions expérimentales. L'utilisation du propylène glycol favorise la formation de complexes amylose - carvacrol. Lors d'un vieillissement accéléré, le KGM assure la stabilité du piégeage du carvacrol.

La matrice amidon de pomme de terre – KGM avec un ajout du carvacrol en fin de process présente la stabilité physique du gel et la stabilité du piégeage du carvacrol les plus optimales.

Mots-clés : amidon de pomme de terre, glucomannane de konjac, composés volatils, carvacrol, complexe, piégeage, stabilité, propylène glycol.

ABSTRACT

The objective of this study is to demonstrate that the presence of konjac glucomannan (KGM) in a potato starch matrix enhances its physical stability without inhibiting the molecular encapsulation of aroma compounds by amylose. For that purpose, the two selected polysaccharides are from plant tubers, abundant in nature.

Starch is known to interact with volatile compounds either by trapping in amorphous phase or by forming inclusion complexes. This phenomenon is called molecular encapsulation. However, at high water content, these starchy matrices exhibit syneresis that can be harmful to the stability of the aroma compounds trapping over time. KGM has the ability to form highly viscous solutions. Our results show that the addition of KGM at low concentration (0.2 %) in starch dispersion (5 %) disrupts the gelatinisation of starch, accelerates the retrogradation of amylose and delays the one of amylopectin. During accelerate aging, the presence of KGM ensures stability of starch suspensions.

In starch – KGM matrix, the molecular encapsulation of carvacrol by amylose has been demonstrated. The complexes of carvacrol – amylose are V6III type structure. Their establishment is dependent on experimental conditions. The use of propylene glycol as carrier solvent of carvacrol promotes the formation of complexes between amylose and carvacrol. During accelerate aging, the presence of KGM ensures the stability of carvacrol trapping.

The potato starch – KGM matrix with an addition of carvacrol at the end of the process shows the best physical stability of the gel and the best carvacrol trapping.

Key words: potato starch, konjac glucomannan, volatile compound, carvacrol, complex, trapping, stability, propylene glycol.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|----|
| REMERCIEMENTS | 1 |
| RÉSUMÉ | 2 |
| ABSTRACT | 3 |
| TABLE DES MATIERES | 4 |
| LISTE DES FIGURES | 7 |
| LISTE DES TABLEAUX | 11 |
| LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS..... | 12 |
| INTRODUCTION..... | 13 |
| ETAT DE L'ART | 17 |
| 1 SYSTEMES POLYOSIDIQUES ETUDIES | 17 |
| 1.1 <i>Glucomannane de konjac</i> | 17 |
| 1.1.1 Origine – production..... | 17 |
| 1.1.2 Vertus médicinales | 17 |
| 1.1.3 Législation en Europe | 18 |
| 1.1.4 Structure des constituants chimiques du glucomannane de konjac..... | 20 |
| 1.1.5 Propriétés physicochimiques du glucomannane de konjac | 21 |
| 1.1.5.1 Solubilité | 21 |
| 1.1.5.2 Viscosité | 21 |
| 1.1.5.3 Mécanisme de gélification | 21 |
| 1.1.6 Propriétés fonctionnelles du glucomannane de konjac / applications technologiques..... | 23 |
| 1.1.6.1 Formuler des aliments :..... | 24 |
| 1.1.6.2 Contrôler un procédé de fabrication / Résister à un traitement thermique | 25 |
| 1.1.6.3 Permettre la libération contrôlée | 26 |
| 1.2 <i>Amidon de pomme de terre</i> | 28 |
| 1.2.1 Structure des constituants chimiques de l'amidon de pomme de terre | 30 |
| 1.2.1.1 Amylose..... | 30 |
| 1.2.1.2 Amylopectine | 31 |
| 1.2.2 Structure du grain d'amidon..... | 32 |
| 1.2.3 Traitements hydrothermiques de l'amidon..... | 37 |
| 1.2.3.1 Gélatinisation et empesage..... | 38 |
| 1.2.3.2 Gélification et rétrogradation | 43 |
| 1.3 <i>Système mixte amidon – glucomannane de konjac</i> | 44 |
| 2 INTERACTIONS AMIDON – COMPOSES VOLATILS..... | 48 |
| 2.1 <i>Composés d'arôme</i> | 49 |
| 2.1.1 Définition et caractéristiques physicochimiques | 50 |
| 2.1.2 Utilisation de solvants supports..... | 50 |
| 2.2 <i>Techniques spécifiques de quantification des interactions entre l'amidon et les composés d'arôme</i> | 51 |
| 2.2.1 Méthodes statiques d'analyse de l'espace de tête..... | 53 |
| 2.2.2 Méthodes dynamiques d'analyse de l'espace de tête | 54 |
| 2.3 <i>Structure moléculaire des complexes</i> | 55 |
| 2.3.1 Complexe amylose - composés volatils | 55 |
| 2.3.2 Complexe amylopectine - composés volatils | 63 |
| 2.4 <i>Impact des interactions physicochimiques sur la rétention des composés d'arôme</i> | 65 |
| 2.5 <i>Impact de la structure des systèmes amyliques sur la rétention des composés d'arôme</i> | 67 |
| 2.6 <i>Influence des interactions physicochimiques sur la structure des matrices amyliques</i> | 68 |

| | | |
|---------|---|-----------|
| 2.7 | <i>Stabilité des complexes</i> | 74 |
| 3 | CONCLUSION DE LA SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 76 |
| | DÉMARCHE EXPERIMENTALE MISE EN OEUVRE | 79 |
| | METHODES MISES EN OEUVRE | 82 |
| 1 | PREPARATION DES MATRICES..... | 82 |
| 1.1 | <i>Préparation des matrices non aromatisées</i> | 82 |
| 1.2 | <i>Préparation des matrices aromatisées</i> | 85 |
| 1.3 | <i>Conditions de préparation spécifiques pour les analyses de diffraction aux rayons X et les analyses enthalpiques différentielles</i> | 92 |
| 2 | CARACTERISATION DE LA STRUCTURE DES MATRICES..... | 92 |
| 2.1 | <i>Échelle macroscopique</i> | 92 |
| 2.1.1 | Observations au microscope optique | 93 |
| 2.1.2 | Détermination des indices de gonflement et de la fraction volumique. | 93 |
| 2.1.3 | Mesure de liquide de synérèse..... | 93 |
| 2.1.4 | Test de pénétrométrie..... | 94 |
| 2.1.4.1 | Principe | 94 |
| 2.1.4.2 | Protocole..... | 94 |
| 2.2 | <i>Échelle microscopique</i> | 95 |
| 2.2.1 | Viscoélasticimétrie..... | 95 |
| 2.2.1.1 | Principe | 95 |
| 2.2.1.2 | Protocole..... | 97 |
| 2.2.2 | Microscopie électronique à balayage (MEB) | 98 |
| 2.2.2.1 | Principe | 98 |
| 2.2.2.2 | Protocole..... | 98 |
| 2.2.3 | Modélisation mathématique des images obtenues via le MEB..... | 99 |
| 2.3 | <i>Échelle moléculaire</i> | 102 |
| 2.3.1 | Diffraction des rayons X..... | 102 |
| 2.3.1.1 | Principe | 102 |
| 2.3.1.2 | Protocole..... | 104 |
| 2.3.2 | Analyse enthalpique différentielle..... | 105 |
| 2.3.2.1 | Principe | 105 |
| 2.3.2.2 | Protocole..... | 106 |
| 3 | EXTRACTION ET QUANTIFICATION DES COMPOSES D'AROME | 107 |
| 3.1 | <i>Extraction</i> | 107 |
| 3.1.1 | Extractions solide - liquide..... | 107 |
| 3.1.1.1 | Protocole d'extraction du carvacrol non piégé | 107 |
| 3.1.1.2 | Conditions chromatographiques..... | 109 |
| 3.1.2 | Extractions liquide - liquide | 110 |
| 3.1.2.1 | Protocole d'extraction du propylène glycol localisé dans la phase continue..... | 110 |
| 3.1.2.2 | Conditions chromatographiques..... | 111 |
| 3.1.3 | Microextraction en phase solide (SPME)..... | 111 |
| 3.1.3.1 | Principe | 112 |
| 3.1.3.2 | Protocole de quantification du carvacrol dans le liquide de synérèse par SPME..... | 113 |
| 3.1.3.3 | Conditions chromatographiques..... | 114 |
| 3.1.4 | Extraction - distillation simultanée (Likens - Nickerson) | 114 |
| 3.1.4.1 | Principe | 115 |
| 3.1.4.2 | Protocole d'extraction du carvacrol et de l'hexanoate d'éthyle des matrices..... | 115 |
| 3.1.4.3 | Protocole d'extraction du carvacrol présent dans la phase continue des matrices | 117 |
| 3.1.4.4 | Conditions chromatographiques..... | 118 |
| 3.2 | <i>Quantification des composés d'arôme</i> | 118 |
| 3.2.1 | Principe de la méthode des ajouts dosés | 119 |
| 3.2.2 | Détermination de la quantité totale d'acétate d'éthyle présent dans les matrices | 120 |

| | | |
|--|--|------------|
| 3.2.3 | Détermination de la quantité de propylène glycol présent dans la phase continue des matrices et détermination de la quantité de propylène glycol présent dans la matrice..... | 120 |
| 3.3 | <i>Détermination des coefficients de partage gaz / matrice</i> | 121 |
| 3.3.1 | Principe..... | 121 |
| 3.3.1.1 | Protocole..... | 123 |
| 3.3.1.2 | Conditions chromatographiques..... | 124 |
| 4 | ANALYSES STATISTIQUES..... | 124 |
| 5 | SYNTHESE DES METHODES UTILISEES..... | 125 |
| RESULTATS ET DISCUSSION | | 127 |
| 1 | CARACTERISATION DE LA MATRICE MIXTE AMIDON DE POMME DE TERRE - GLUCOMANNANE DE KONJAC | 127 |
| 1.1 | <i>Résultats</i> | 128 |
| 1.1.1 | Caractérisation des matrices pendant le process et immédiatement en fin de process | 128 |
| 1.1.2 | Caractérisation des matrices immédiatement en fin de process et durant les 24 premières heures | 131 |
| 1.2 | <i>Conclusion</i> | 136 |
| 2 | ENCAPSULATION MOLECULAIRE DE COMPOSES VOLATILS PAR UNE MATRICE MIXTE AMIDON DE POMME DE TERRE - GLUCOMANNANE DE KONJAC | 140 |
| 2.1 | <i>Interactions composés volatils - polyosides</i> | 140 |
| 2.1.1 | Impact des composés d'arôme sur la gélatinisation de l'amidon de pomme de terre..... | 142 |
| 2.1.2 | Quantification des composés d'arôme dans la matrice..... | 142 |
| 2.1.3 | Etude de la présence ou non d'interactions entre les composés d'arôme et les polysaccharides | 143 |
| 2.1.3.1 | Interaction acétate d'éthyle et polysaccharides | 163 |
| 2.1.3.2 | Interaction hexanoate d'éthyle et polysaccharides | 163 |
| 2.1.3.3 | Interaction carvacrol et polysaccharides..... | 165 |
| 2.2 | <i>Impact du glucomannane de konjac et compétition entre le carvacrol et le propylène glycol pour la formation de complexes carvacrol - amylose d'amidon de pomme de terre</i> | 165 |
| 2.2.1 | Compétition entre le carvacrol et le propylène glycol pour former des complexes avec l'amylose d'amidon de pomme de terre. | 192 |
| 2.2.2 | Impact du glucomannane de konjac et du moment d'ajout du carvacrol sur la rétention du carvacrol. | 192 |
| 2.3 | <i>Efficacité du piégeage du carvacrol par la matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac</i> | 195 |
| 3 | STABILITE DU PIEGEAGE DU CARVACROL ET STABILITE PHYSIQUE DE LA MATRICE AMIDON DE POMME DE TERRE - GLUCOMANNANE DE KONJAC. | 201 |
| 3.1 | <i>Étude de la stabilité du piégeage du carvacrol par la matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac</i> | 232 |
| 3.2 | <i>Étude de la stabilité physique de la matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac</i> | 232 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... | | 236 |
| BIBLIOGRAPHIE | | 239 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Structure chimique du glucomannane de konjac | 20 |
| Figure 2 : Mécanisme de gélification du glucomannane de konjac. | 22 |
| Figure 3 : Aliments de la cuisine traditionnelle japonaise à base de konjac | 24 |
| Figure 4 : Effet de la viscosité apparente de solution de glucomannane de konjac sur les rendements d'encapsulation. | 27 |
| Figure 5 : Rendements d'encapsulation de différentes quantités de glucomannane de konjac combinées avec de la gomme arabique ou de la maltodextrine ou de l'amidon octényl succinate de sodium | 28 |
| Figure 6 : Utilisations multiples de l'amidon dans le secteur alimentaire | 29 |
| Figure 7 : Utilisations multiples de l'amidon dans le secteur non alimentaire. | 29 |
| Figure 8 : Structure de l'amylose | 30 |
| Figure 9 : Structure de l'amylopectine | 31 |
| Figure 10 : Représentation schématique des différents niveaux de structuration d'un grain d'amidon..... | 33 |
| Figure 11 : Représentation schématique des différents niveaux de structuration du grain d'amidon..... | 34 |
| Figure 12 : Schéma de structure d'un grain d'amidon | 35 |
| Figure 13 : Diagramme de diffraction aux rayons X de l'amidon de type A, B et V | 36 |
| Figure 14 : Structure de maille cristalline des doubles hélices d'amylose de type A et de type B. | 37 |
| Figure 15 : Représentation schématique des principales étapes de la transformation de l'amidon au cours d'un traitement hydrothermique en excès d'eau. | 38 |
| Figure 16 : Traitement thermique en excès d'eau d'un amidon de pomme de terre observé sous microscope optique | 39 |
| Figure 17 : Thermogrammes d'amidon de pomme de terre et d'amidon d'orge en excès d'eau obtenus par analyse enthalpique différentielle. | 40 |
| Figure 18 : Profils de gélatinisation de l'amidon de pomme de terre, l'amidon de tapioca, l'amidon de maïs, l'amidon de blé, l'amidon d'orge obtenus en utilisant le Rapid Visco Analyser® | 41 |
| Figure 19 : Représentation schématique d'un empois d'amidon rétrogradé et comparatif de rétrogradation entre l'amylose et l'amylopectine..... | 43 |
| Figure 20 : Courbes de gélatinisation de systèmes amidon de maïs - glucomannane de konjac). | 45 |
| Figure 21 : Représentation schématique des complexes de type V6I, V6II et V6III et leur localisation inter et intra hélices..... | 56 |
| Figure 22 : Diagrammes de diffraction du complexe amylose – linalol conditionné par désorption à une $A_w = 0,75$ et du complexe amylose – linalol lavé à l'éthanol avant d'être conditionné par désorption à $A_w = 0,75$ | 58 |
| Figure 23 : Diagrammes de diffraction du complexe amylose – menthone conditionné par désorption à une $A_w = 0,75$ et du complexe amylose – menthone lavé à l'éthanol avant d'être conditionné par désorption à $A_w = 0,75$ | 58 |

| | |
|--|-----|
| Figure 24 : Relation entre la rétention des composés volatils, l'hydrophobie et la concentration..... | 60 |
| Figure 25 : Schéma hypothétique de l'établissement de complexes menthone – amidon – limonène..... | 61 |
| Figure 26 : Représentation schématique de l'organisation du polymère d'amylose..... | 62 |
| Figure 27 : Représentation schématique de complexes d'amylose et localisation possible des ligands dans l'amorphe, dans l'espace intra ou inter - hélices..... | 63 |
| Figure 28 : Observations microscopiques de suspensions d'amidon de maïs standard ou d'amidon de pois suite à un traitement thermique à 85°C..... | 69 |
| Figure 29 : Apparence de dispersions d'amidon de pomme de terre à 2 % non complexé et complexé avec soit de la fenchone, de la menthone, ou du géraniol.. | 70 |
| Figure 30 : Dépendance temporelle de la structure d'amidon de tapioca complexé selon la concentration en menthone..... | 72 |
| Figure 31 : Vue d'ensemble de l'influence des interactions amidon - composé d'arôme à différents niveaux d'organisation selon différents niveaux de concentration en menthone. ... | 73 |
| Figure 32 : Libération de l'hexanal à partir de complexes d'inclusion d'amylose sous différentes conditions : 30°C, 50°C et 80°C et mesurée à une $A_w = 0$ | 74 |
| Figure 33 : Libération de l'hexanal à partir de complexes d'inclusion d'amylose sous différentes conditions : 30°C, 50°C et 80°C et mesurée à une $A_w = 1$ | 75 |
| Figure 34 : Représentation schématique de la démarche mise en œuvre..... | 80 |
| Figure 35 : Traitement thermomécanique appliqué pour fabriquer les matrices étudiées. | 84 |
| Figure 36 : Courbe représentative du RVA [®] | 85 |
| Figure 37 : Traitement thermomécanique appliqué et moment d'ajout des composés d'arôme pour fabriquer les matrices d'études aromatisées..... | 88 |
| Figure 38 : Test avec du colorant pour valider l'efficacité du couple vitesse d'homogénéisation / durée. | 89 |
| Figure 39 : Courbe typique obtenue par pénétrométrie des matrices étudiées..... | 95 |
| Figure 40 : Spectres mécaniques typiques G' et G'' en fonction de la fréquence des oscillations..... | 97 |
| Figure 41 : Passage du domaine spatial d'une image au domaine fréquentiel par la transformée de Fourier selon la fréquence basse ou élevée | 100 |
| Figure 42 : Illustration de la première étape de la transformée de Fourier..... | 101 |
| Figure 43 : Procédure simplifiée de détermination des descripteurs de Fourier généralisé... .. | 101 |
| Figure 44 : Schéma de principe d'un tube à rayons X | 102 |
| Figure 45 : Illustration de la loi de Bragg | 103 |
| Figure 46 : Association de chaque pic obtenu par diffraction en rayons X à un plan atomique imaginaire selon les indices de Miller..... | 104 |
| Figure 47 : Thermogramme de DSC typique d'une suspension d'amidon de maïs rétrogradé lors d'une cinétique de chauffage de 20°C à 180°C à 0,7°C/min | 106 |
| Figure 48 : Cinétique de refroidissement des matrices en bain-marie de 60°C à la température ambiante pendant 24 heures. | 108 |
| Figure 49 : Droite d'étalonnage utilisée pour la quantification du carvacrol suite à l'extraction solide - liquide..... | 109 |

| | |
|---|-----|
| Figure 50 : Droite d'étalonnage utilisé pour la quantification du propylène glycol suite à l'extraction liquide - liquide..... | 111 |
| Figure 51 : Principe de la microextraction en phase solide (SPME). | 112 |
| Figure 52 : Droite d'étalonnage du carvacrol en solution aqueuse par SPME | 114 |
| Figure 53 : Appareil de Likens - Nickerson. | 115 |
| Figure 54 : Droite d'étalonnage utilisée pour la quantification du carvacrol suite aux extractions – distillations simultanées (Likens - Nickerson)..... | 116 |
| Figure 55 : Droite d'étalonnage utilisée pour la quantification de l'hexanoate d'éthyle suite aux extractions – distillations simultanées (Likens - Nickerson)..... | 117 |
| Figure 56 : Représentation graphique de la méthode des ajouts dosés. | 119 |
| Figure 57: Illustration de la détermination graphique du coefficient de partage gaz / matrice (K) à l'équilibre thermodynamique de l'acétate d'éthyle dans la matrice amidon de pomme de terre selon la méthode PRV..... | 123 |
| Figure 58 : Récapitulatif de toutes les méthodes mises en œuvre..... | 126 |
| Figure 59 : Récapitulatif de différentes analyses réalisées à différents moments d'observations et à différents niveaux d'observation pour caractériser la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac..... | 127 |
| Figure 60 : Profils de viscosité apparente obtenus au RVA [®] de la matrice amidon de pomme de terre et de la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac..... | 128 |
| Figure 61 : Observation au microscope optique de la matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac colorée au lugol et diluée dans l'eau..... | 130 |
| Figure 62 : Observation au microscope optique de la matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac et de la matrice amidon de pomme de terre colorée au lugol.. | 130 |
| Figure 63 : Spectres mécaniques de la matrice amidon de pomme de terre et de la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac obtenus à 60C, et à 2,5 % de déformation. | 132 |
| Figure 64 : Suivi de gélification de la matrice amidon de pomme de terre et de la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac pendant 24 heures à 2,5 % de déformation et à 1 rad/s. | 133 |
| Figure 65 : Spectres mécaniques de la matrice amidon de pomme de terre et de la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac obtenus 24 heures après le traitement thermomécanique, à 25°C et à 2,5 % de déformation..... | 134 |
| Figure 66 : Valeurs moyennes et écart-types de Fmax pour la matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac et la matrice amidon de pomme de terre, obtenues à 25°C, 24H après la fin de la fabrication. | 134 |
| Figure 67 : Observations au MEB de la matrice amidon de pomme de terre, 24 heures après le traitement thermomécanique au grossissement X50 et X250 | 135 |
| Figure 68 : Observations au MEB de la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac, 24 heures après le traitement thermomécanique au grossissement X50 et X250. | 135 |
| Figure 69 : Projection 2D des descripteurs de l'état de surface de la matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac et la matrice amidon de pomme de terre obtenues par la transformée de Fourier Généralisé associée à la réduction des données..... | 136 |

| | |
|--|-----|
| Figure 70 : Évolution des paramètres viscosité finale et pic de viscosité obtenus au RVA [®] , indice de gonflement et Tan delta à 60°C et à 25°C selon l'ajout de 0,2 % (m/m) de glucomannane de konjac à une suspension d'amidon de pomme de terre à 5 % (m/m)..... | 137 |
| Figure 71 : Récapitulatif de la démarche expérimentale mise en œuvre pour valider ou non l'hypothèse N°1 : « l'encapsulation moléculaire de composés d'arôme dans une matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac est possible ». | 141 |
| Figure 72 : Méthodes mises en œuvre dans la démarche expérimentale mise en œuvre pour valider ou non l'hypothèse N°1 : « l'encapsulation moléculaire de composés d'arôme dans une matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac est possible ». | 142 |
| Figure 73 : Etude en diffraction des rayons X pour mettre en évidence la formation ou non de complexes hexanoate d'éthyle – amylose d'amidon de pomme de terre. | 164 |
| Figure 74 : Spectres de diffraction aux rayons X de la matrice amidon de pomme de terre en présence d'hexanoate d'éthyle pur ajouté en début de process et de la matrice amidon de pomme de terre en présence d'un mélange hexanoate d'éthyle et propylène glycol ajouté en début de process. | 164 |
| Figure 75 : Récapitulatif de la démarche expérimentale mise en œuvre pour étudier (i) la compétition éventuelle entre le propylène glycol et le carvacrol pour former des complexes avec l'amylose, (ii) le rôle du glucomannane de konjac sur la diminution de la rétention du carvacrol. | 166 |
| Figure 76 : Méthodes utilisées dans la démarche expérimentale mise en œuvre pour étudier (i) la compétition éventuelle entre le propylène glycol et le carvacrol pour former des complexes avec l'amylose, (ii) le rôle du glucomannane de konjac sur la diminution de la rétention du carvacrol. | 167 |
| Figure 77 : Méthode expérimentale mise en œuvre pour déterminer l'efficacité du piégeage du carvacrol par la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac à deux moments : immédiatement en fin de traitement thermomécanique et 24 heures après la fin du traitement thermomécanique. | 196 |
| Figure 78 : Pourcentage de carvacrol piégé dans la matrice amidon de pomme de terre et la matrice amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac. | 197 |
| Figure 79 : Combinaison des résultats de pourcentage de piégeage global du carvacrol avec les résultats de pourcentages de rétention du carvacrol calculés à partir des coefficients de partage obtenus par la méthode PRV selon la composition des matrices. | 198 |
| Figure 80 : Schéma de la démarche expérimentale mise en œuvre pour l'étude de la stabilité du piégeage du carvacrol par la matrice amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac et de la stabilité physique de ces gels. | 202 |
| Figure 81 : Méthodes mises en œuvre lors de la démarche expérimentale pour l'étude de la stabilité du piégeage du carvacrol par la matrice amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac et de la stabilité physique de ces gels. | 203 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| Tableau 1: Rôle du glucomannane de konjac dans le traitement de diverses pathologies, cibles, fonctions..... | 18 |
| Tableau 2: Spécifications du glucomannane de konjac selon le règlement de l'Union européenne . | 19 |
| Tableau 3: Influence des différents paramètres sur le mécanisme de gélification du glucomannane de konjac | 23 |
| Tableau 4: Méthodes de mesure des coefficients de partage gaz / matrice..... | 52 |
| Tableau 5: Exemples de ligands complexant l'amylose en type V6I, V6II ou V6III. | 57 |
| Tableau 6: Echelles et moments d'analyses appliqués au cours de la démarche expérimentale | 81 |
| Tableau 7: Formulations respectives des différentes matrices étudiées..... | 83 |
| Tableau 8: Caractéristiques physicochimiques des composés d'arôme de l'étude. | 86 |
| Tableau 9: Caractéristiques physicochimiques du propylène glycol. | 87 |
| Tableau 10: Concentration des solutions mères de chaque composé d'arôme préparées dans le propylène glycol..... | 87 |
| Tableau 11: Formulation de chaque matrice amylicée aromatisée fabriquée. Synthèse des tableaux 7 à 10..... | 90 |
| Tableau 12: Dénomination des différentes matrices de l'étude | 92 |
| Tableau 13: Lien entre les différents protocoles et les différents chapitres de la partie résultats et discussion. | 125 |
| Tableau 14: Valeurs moyennes et écart-types des paramètres extraits des courbes de viscosités apparentes obtenues avec le RVA [®] pour la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac et la matrice amidon de pomme de terre. | 129 |
| Tableau 15: Valeurs moyennes et écart-types de l'indice de gonflement et de la fraction volumique pour la matrice amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac et la matrice amidon de pomme de terre. | 131 |
| Tableau 16: Valeurs moyennes et écart-types de Tan δ pour la matrice amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac et la matrice amidon de pomme de terre obtenues à 60°C immédiatement en fin de process et à 25°C 24 heures plus tard..... | 132 |
| Tableau 17: Différences dans le protocole thermomécanique de préparation des matrices entre l'équipe de Nantes et l'équipe de Dijon. | 138 |
| Tableau 18: Valeurs moyennes et écart-types de la température de gélatinisation et d'enthalpies de la matrice amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac et la matrice amidon de pomme de terre obtenues par DSC. | 138 |
| Tableau 19: Quantités moyennes de carvacrol, d'hexanoate d'éthyle et d'acétate d'éthyle et écart-types respectifs exprimés selon le pourcentage de la quantité initiale de composés d'arôme (m/m) dosés dans les matrices amidon de pomme de terre et les matrices amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac | 143 |
| Tableau 20: Avantages et inconvénients de l'étude de la stabilité du piégeage du carvacrol par la matrice amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac par vieillissement naturel ou accéléré..... | 201 |

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABBREVIATIONS

| | |
|---------|---|
| Aw | Activité de l'eau |
| DRX | Diffraction des Rayons X |
| DSC | Differential Scanning Calorimetry (analyse enthalpique différentielle) |
| G' | Module de stockage (ou conservatif) (Pa) |
| G'' | Module de perte (ou dissipatif) (Pa) |
| GCMS | Gas Chromatography Mass Spectrometry (chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse) |
| K | Coefficient de partage air - matrice en fraction massique |
| KGM-ELA | Matrice d'étude glucomannane de konjac (0,2 % (m/m)) et carvacrol ajouté en début de process |
| KGM-LLA | Matrice d'étude glucomannane de konjac (0,2 % (m/m)) et carvacrol ajouté en fin de process |
| Log P | Constante d'hydrophobie correspondant au logarithme du coefficient de partage octanol - eau |
| MEB | Microscopie Électronique à Balayage |
| ppm | Partie par million |
| PRV | Phase Ratio Volume (variation du ratio de phase) |
| PS | Matrice d'étude amidon de pomme de terre (5 % (m/m)) |
| PS-ELA | Matrice d'étude amidon de pomme de terre (5 % (m/m)) et carvacrol ajouté en début de process |
| PS-LLA | Matrice d'étude amidon de pomme de terre (5 % (m/m)) et carvacrol ajouté en fin de process |
| RVA | Rapid Visco Analyser (Analyseur rapide de viscosité) |
| SK | Matrice d'étude glucomannane de konjac (0,2 % (m/m)) - amidon de pomme de terre (5 % (m/m)) |
| SK-ELA | Matrice d'étude glucomannane de konjac (0,2 % (m/m)) - amidon de pomme de terre (5 % (m/m)) et carvacrol ajouté en début de process |
| SK-LLA | Matrice d'étude glucomannane de konjac (0,2 % (m/m)) - amidon de pomme de terre (5 % (m/m)) et carvacrol ajouté en fin de process |
| SPME | Solid Phase MicroExtraction (microextraction en phase solide) |
| SSOS | Starch Sodium Octenyl Succinate (succinate d'octényle de sodium d'amidon) |
| tpm | Tours par minute |
| Φ | Fraction volumique |

INTRODUCTION

L'encapsulation regroupe l'ensemble des technologies permettant d'enrober une molécule d'intérêt par un ou des matériaux d'encapsulation ou de piéger la molécule d'intérêt à l'intérieur du ou des matériaux d'encapsulation. L'objectif de l'encapsulation est de préserver la stabilité de la molécule d'intérêt au cours des différentes étapes de fabrication et lors du stockage (Madene, 2006; Saravacos, Taoukis et al., 2011). En effet, par son encapsulation, la molécule d'intérêt est protégée contre les effets indésirables du milieu environnant tels que la lumière et l'oxygène, son oxydation étant ainsi limitée. Les interactions entre les molécules d'intérêt et les ingrédients de la matrice alimentaire sont également minimisées. Enfin, l'encapsulation de molécules d'intérêt permet de cibler leur lieu d'action ou encore de contrôler leur libération (Madene, 2006). De nombreuses applications d'encapsulation existent dans de nombreux secteurs tels que les industries agroalimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques ou chimiques (Raphaelides, Dimitreli et al., 2015).

Depuis les années 1950, les deux techniques d'encapsulation de composés volatils les plus couramment utilisées industriellement sont l'atomisation et l'extrusion (Madene, 2006; Saravacos, Taoukis et al., 2011; Belingheri, Curti et al., 2012; Raphaelides, Dimitreli et al., 2015). Ces techniques ont l'avantage de s'intégrer dans les procédés industriels continus. Les principaux matériaux encapsulants utilisés sont la gomme arabique, les maltodextrines et les amidons modifiés (Gouin, 2004; Belingheri, Curti et al., 2012). Cependant, les industriels sont en permanence à la recherche de méthodes et techniques alternatives d'encapsulation afin d'offrir constamment de nouveaux produits ciblés pour les besoins des clients, avec de nouvelles fonctionnalités, et afin de se différencier de concurrents (Belingheri, Curti et al., 2012).

L'amidon natif présente une alternative très intéressante. Il est abondant dans la nature, peu cher à produire, disponible dans le commerce en quantités énormes et entièrement biodégradable. En outre, la caractéristique la plus importante de l'amidon, le rendant idéal pour les applications d'encapsulation, est l'amylose, la composante linéaire de l'amidon, qui a la propriété unique parmi les autres biopolymères d'interagir physiquement avec des molécules d'intérêt telles que les acides gras, les composés volatils pour former des complexes d'inclusion. La complexation de molécules d'intérêt avec l'amylose peut être définie comme un principe d'encapsulation (Madene, 2006; Lesmes, Barchechath et al., 2008) et est aussi appelé encapsulation moléculaire (Wulff, Avgeanki et al., 2005; Kong and Ziegler, 2014; Le Bail, Houinsou-Houssou et al., 2015).

En outre, il existe un autre biopolymère capable d'encapsulation moléculaire. Il s'agit des cyclodextrines. Elles sont issues de l'hydrolyse de l'amidon et contrairement à l'amidon natif, sont considérées comme des additifs alimentaires. Leur absence de toxicité permet de nombreuses applications dans les technologies alimentaires. Cependant les principales limites de leur utilisation restent le coût et la faible solubilité des cyclodextrines dans l'eau (Madene, 2006). Le coût des cyclodextrines n'a jamais pu atteindre un niveau inférieur à 6 \$ / kg (Gouin, 2004). Leur efficacité d'encapsulation a été rapportée entre 6 à 15 % (m / m). Selon

Gouin (2004), sur la base de ces considérations, il semble peu probable que les cyclodextrines deviennent une technologie d'encapsulation commercialement viable dans un avenir proche.

Les complexes d'inclusion « molécules d'intérêt – amidon » ont été principalement étudiés à l'aide de procédés discontinus, ce qui a peu de pertinence industrielle. Pour résoudre cette difficulté liée à l'application à l'échelle industrielle, quelques études ont été réalisées et ont montré la faisabilité de deux procédés de production continus différents pour la formation en continu de complexes d'inclusion « amidon – molécule d'intérêt ». Le premier procédé repose sur la formation de complexes d'inclusion dans un système à écoulement continu via une homogénéisation sous pression d'une solution d'amidon et de molécules d'intérêt (Lesmes, Barchechath et al., 2008). Le deuxième procédé repose sur la cuisson – extrusion (Raphaelides, Dimitreli et al., 2015). Dans les deux procédés, les complexes d'inclusion obtenus sont sous forme de poudre. Ces process sont prometteurs puisqu'ils offrent la possibilité technologique d'être intégrés dans les lignes de fabrication existantes.

Une encapsulation efficace exige une bonne connaissance physicochimique des mécanismes par lesquels les composés sont piégés. De plus, la stabilité de matrices amylicées et leurs propriétés physiques peuvent influencer la stabilité de l'encapsulation pendant les procédés de fabrication et lors du stockage. En effet, il est connu que les matrices amylicées à forte teneur en eau, contrairement à celles à faible teneur en eau, présentent une forte synérèse ce qui limite leur utilisation. En agroalimentaire, les hydrocolloïdes sont fréquemment utilisés avec l'amidon afin de modifier la texture des aliments. Ils ont en effet la capacité de changer les propriétés rhéologiques de la suspension d'amidon non seulement en augmentant sa viscosité mais aussi en ralentissant la rétrogradation de l'amidon et donc l'apparition de synérèse. Il semble donc indispensable de concevoir des systèmes mixtes amidon - hydrocolloïdes pour stabiliser le système. Le glucomannane de konjac est un hydrocolloïde qui peut servir à cette fin. Il possède une capacité à former des solutions extrêmement visqueuses à faible concentration. Les conséquences de l'ajout du glucomannane de konjac sur la formation des complexes d'inclusion entre amidon et molécules d'intérêt sont encore mal connues. En effet, la présence d'un autre polymère dans une matrice amylicée peut modifier voire empêcher la formation des complexes d'inclusion.

Dans ce contexte, l'objectif général de ce travail de thèse est (i) de mieux comprendre la structure de la matrice mixte amidon de pomme de terre et glucomannane de konjac afin de concevoir une matrice hydratée stable dans le temps et (ii) de définir si cette matrice mixte amidon de pomme de terre et glucomannane de konjac est apte à l'encapsulation moléculaire de molécules d'intérêt.

Ce manuscrit est organisé en quatre chapitres.

Le premier chapitre présente un état de l'art sur les deux systèmes polyosidiques de l'étude : le glucomannane de konjac et l'amidon de pomme de terre, individuellement et en mélange. Puis dans un second temps, l'état de l'art sur les interactions amidon – composés volatils est abordé.

Le deuxième chapitre présente la problématique de thèse, les hypothèses posées et la démarche mise en œuvre pour y répondre.

Le troisième chapitre décrit les méthodes mises en œuvre dans cette thèse.

Le quatrième chapitre présente les résultats obtenus et est divisé en quatre parties. La première partie présente la caractérisation de la matrice amidon – glucomannane de konjac. La deuxième partie décrit la faisabilité de l'encapsulation moléculaire de composés volatils par la matrice amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac. La troisième partie traite de l'efficacité du piégeage de composés volatils. La dernière partie montre les résultats de l'étude de la stabilité du piégeage de composé d'arôme par la matrice amidon - glucomannane de konjac et de la stabilité physique de la matrice mixte amidon – glucomannane de konjac. Les résultats obtenus pour les deuxième et quatrième parties de ce chapitre sont présentés sous forme de publications.

Le document se termine par une conclusion générale et les perspectives qu'ouvre cette thèse.

Ce travail de thèse a fait l'objet des publications suivantes :

- articles dans des périodiques soumis à comité de lecture :
 - Céline Lafarge, Nathalie Cayot, Chantal Hory, Liseth Goncalves, Claire Chassemont, Patricia Le Bail. 2014. Effect of konjac glucomannan addition on aroma release in gels containing potato starch. *Food Research International*, volume 64, 412 – 419.
 - Céline Lafarge, Ludovic Journaux, Aline Bonnotte, Jeannine Lherminier, John Aldo Lee, Patricia Le Bail, Nathalie Cayot. Trapping of carvacrol by konjac glucomannan-potato starch gels: stability from macroscopic to microscopic scale, using image processing. *Food Hydrocolloids*, in press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.020>.
 - Céline Lafarge, Elias Bou-Maroun, Bruno Pontoire, Patricia Le Bail, Nathalie Cayot. Distribution and competition between carvacrol and propylene glycol for inclusion complexes in aqueous suspensions based on potato starch and konjac glucomannan (soumise le 03/01/2017 au journal *Food Hydrocolloids*).
- communication par affiche
 - Céline Lafarge, Nathalie Cayot, Patricia Le Bail. Encapsulation moléculaire du carvacrol par des systèmes polyosidiques : amidon de pomme de terre et glucomannane de konjac. 2015. Forum des jeunes chercheurs, Universités Bourgogne et Franche-Comté, 18-19 juin 2015, Dijon, France.

Cette thèse a été conduite dans l'équipe PAPC (Procédés Alimentaires et PhysicoChimie) de l'UMR A 02.102 entre AgroSup Dijon et l'Université de Bourgogne. Un des axes transversaux affichés pour cette unité concerne l'encapsulation de molécules actives. Cette thèse a été réalisée en partenariat avec l'unité BIA (Biopolymères – Interactions – Assemblages) de l'INRA de Nantes. L'objectif de cette unité est d'améliorer la qualité des produits alimentaires et non – alimentaires par une meilleure connaissance et maîtrise de l'organisation des biopolymères tout au long de la chaîne de production et de transformation.

ETAT DE L'ART

1 Systèmes polyosidiques étudiés

1.1 Glucomannane de konjac

1.1.1 Origine - production

La farine de konjac est obtenue à partir du tubercule d'*Amorphophallus konjac*, plante de la famille des *Araceae*. Cette plante est retrouvée à l'état sauvage et est cultivée comme un légume en Thaïlande, Chine, Viêt - Nam, Corée et Japon depuis le 9^{ième} siècle après JC. Le composé majoritaire des farines de konjac est le glucomannane, le polysaccharide de réserve du konjac. Les glucomannanes sont aussi présents sous le même type structural dans diverses espèces végétales : bulbes d'orchidées, lys, graines d'aloé vera (Dorthe, 2005).

La farine de konjac est obtenue en broyant plus ou moins finement les tubercules. Ceux-ci sont récoltés après deux ou trois ans de développement de la plante. Les tubercules sont découpés, séchés, broyés et tamisés. La farine obtenue contient entre 51 et 72 % en masse sèche de glucomannane de konjac (Fang and Wu, 2004). Pour obtenir une farine pure contenant plus de 95 % de glucomannane de konjac en masse sèche, une étape de purification par lavage hydroalcoolique est indispensable.

La production de farine de konjac représente 25 000 tonnes par an avec la Chine et le Japon comme premiers producteurs et consommateurs de farine de konjac (Planétoscope, 2016). La Chine est devenue le premier producteur de konjac devant le Japon, exportant plus de la moitié de sa production. Le Japon conserve sa production de konjac pour sa consommation domestique et s'est spécialisé dans la production, plus limitée en volume, de farines de qualité pharmaceutique pour l'export.

1.1.2 Vertus médicinales

Au cours du 6^{ième} siècle après JC, le konjac a été introduit au Japon en tant que médicament précieux par une délégation religieuse envoyée par le roi de la Corée du Nord. Puis le konjac a été progressivement porté à la connaissance du grand public par la classe dirigeante au Japon : moines, autorités gouvernementales et samourais (Chua, Baldwin et al., 2010).

Les études pharmacologiques effectuées sur le glucomannane de konjac indiquent son potentiel pour le traitement de plusieurs pathologies courantes telles que l'obésité, le diabète, le cholestérol (tableau 1).

Tableau 1: Rôle du glucomannane de konjac dans le traitement de diverses pathologies, cibles, fonctions (Tester and Al-Ghazzewi, 2013; Tester and Al-Ghazzewi, 2016).

| Pathologies / cibles / fonctions | Rôle du glucomannane de konjac | Dose de glucomannane |
|----------------------------------|---|---|
| Cholestérol | Restreint l'absorption du cholestérol par l'intestin dans le sang. | 3 à 3,9 g / jour |
| Constipation | De par sa richesse en fibres non-digestibles (résistantes à l'hydrolyse des enzymes digestives du corps humain) et sa capacité à absorber jusqu'à deux cents fois son poids en eau, le glucomannane de konjac augmente le volume des selles et promeut le transit intestinal. | 100 mg / kg poids corporel / jour (maximum 5 g) |
| Diabète | Limite la diffusion du glucose dans le sang via l'intestin. Rôle de prévention et de traitement des hyperglycémies. | 3 à 3,9 g / jour |
| Système immunitaire | Réprime les symptômes de la rhinite allergique en limitant la production des immunoglobulines E et G. | 5 % (m / m) |
| Obésité et pertes de poids | Non calorique (3 g / 100 g), pauvre en vitamines et en graisses. Sa forte capacité d'absorption d'eau et sa haute viscosité, permettent au glucomannane de konjac d'occuper l'espace dans l'estomac entraînant la sensation de satiété. | 1,5 à 3 g / jour |
| Prébiotique | Impact bénéfique sur la flore intestinale en stimulant la croissance de <i>Lactobacillus</i> et de <i>Bifidobacterium</i> . Empêche les bactéries de se fixer dans la vessie et les voies urinaires. | 5 % (m / m) |

1.1.3 Législation en Europe

Le glucomannane de konjac, exclusivement issu de l'espèce *d'Amorphophallus konjac*, est autorisé en Europe comme additif épaississant sous le numéro E 425(ii) (Journal officiel de l'Union européenne, 2012a). En tant qu'additif, la quantité maximale spécifique est fixée à 10 g (seule ou mélange) / kg de denrée alimentaire (Journal officiel de l'Union européenne, 2011a).

Depuis 2002, suite à la mort par suffocation de plusieurs enfants et personnes âgées dans l'Union européenne après avoir consommé des produits de gelée en mini - barquettes, l'incorporation du glucomannane de konjac n'est plus autorisée dans les produits de gelée en mini - barquettes ni dans les confiseries gélifiées. En 2015, l'interdiction a été étendue à la production de denrées alimentaires déshydratées dont la réhydratation s'effectue au moment de l'ingestion (Journal officiel de l'Union européenne, 2015).

Deux allégations santé ont été attribuées au glucomannane de konjac (Journal officiel de l'Union européenne, 2012b) :

- « Le glucomannane de konjac contribue au maintien d'une cholestérolémie normale. L'allégation ne peut être utilisée que pour une denrée alimentaire qui garantit une consommation journalière de 4 g de glucomannane de konjac. L'allégation peut être utilisée si le consommateur est informé que l'effet bénéfique est obtenu par la consommation journalière de 4 g de glucomannane ».
- « Le glucomannane de konjac consommé dans le cadre d'un régime hypocalorique contribue à la perte de poids. L'allégation ne peut être utilisée que pour une denrée alimentaire contenant 1 g de glucomannane de konjac par portion quantifiée. L'allégation peut être utilisée si le consommateur est informé que l'effet bénéfique est obtenu par la consommation journalière de 3 g de glucomannane de konjac en trois doses de 1 g chacune, prises avec un à deux verres d'eau, avant les repas et dans le cadre d'un régime hypocalorique ».

Avec un taux de fibres de 95 % sur la base de la matière sèche, les denrées alimentaires à base de glucomannane de konjac peuvent prétendre aux allégations nutritionnelles suivantes (Journal officiel de l'Union européenne, 2011b) :

- « source de fibres » si l'aliment contient au moins 3 g de fibres par 100 g
- « riche en fibres » si l'aliment contient au moins 6 g de fibres par 100 g

Le règlement de l'Union européenne (Journal officiel de l'Union européenne, 2012a) fixe les spécifications relatives au glucomannane de konjac (tableau 2).

Tableau 2 : Spécifications du glucomannane de konjac (E425ii) selon le règlement de l'Union européenne (Journal officiel de l'Union européenne, 2012a).

| Critères | Spécifications |
|--|---|
| Aspect | Poudre fine de couleur blanche à légèrement brunâtre, fluide et inodore |
| Perte à la dessiccation | < 8 % (105°C pendant 3 heures) |
| Teneur en amidon | < 1 % |
| Teneur en protéines | < 1 % (N x 5,7) Le pourcentage d'azote dans l'échantillon déterminé par méthode de Kjeldahl multiplié par 5,7 donne le pourcentage de protéines de l'échantillon |
| Viscosité solution à 1 % | > 20 Pa.s |
| Matières solubles dans l'éther | < 0,5 % |
| Matières solubles dans l'alcool à 50 % | < 2 % |
| Sulfite (exprimé en SO ₂) | < 4 mg / kg |
| Chlorure | < 0,02 % |
| Plomb | < 1 mg / kg |
| Cendres totales | < 2 % (800°C, 3 à 4 heures) |

1.1.4 Structure des constituants chimiques du glucomannane de konjac

Le glucomannane de konjac est composé d'unités de D - mannose et de D - glucose reliées par des liaisons glycosidiques en β (1 - 4) (figure 1). Le rapport molaire mannose / glucose est de 1,6 (Takigami, 2009). La distribution des résidus glucose et mannose est aléatoire. Plus précisément, elle est majoritairement alternée avec une faible fréquence des résidus enchaînés. Dorthe (2005) a déterminé le nombre maximal de résidus d'un même type enchaînés : six glucoses et neuf mannoses au maximum.

Des groupements acétyles sont également présents tous les 19 résidus de mannose en position 2, 3, ou 6 (Dorthe, 2005).

Il semblerait que la chaîne principale soit ramifiée toutes les 50 ou 60 unités glucosyls environ au moyen de résidus hexose liés en β (1 - 3) (Takigami, 2009). Cependant, la nature des résidus, la longueur et la fréquence de ramification sont très controversées. Selon Katsuraya, Okuyama et al. (Katsuraya, Okuyama et al., 2003a), la chaîne principale serait ramifiée par des unités glucosyls liées par liaisons β (1 - 6). Selon Albrecht, Van Muiswinkel (2011) les ramifications se feraient à partir des résidus de glucose de la chaîne principale. Les branches ramifiées seraient principalement composées de mannose.

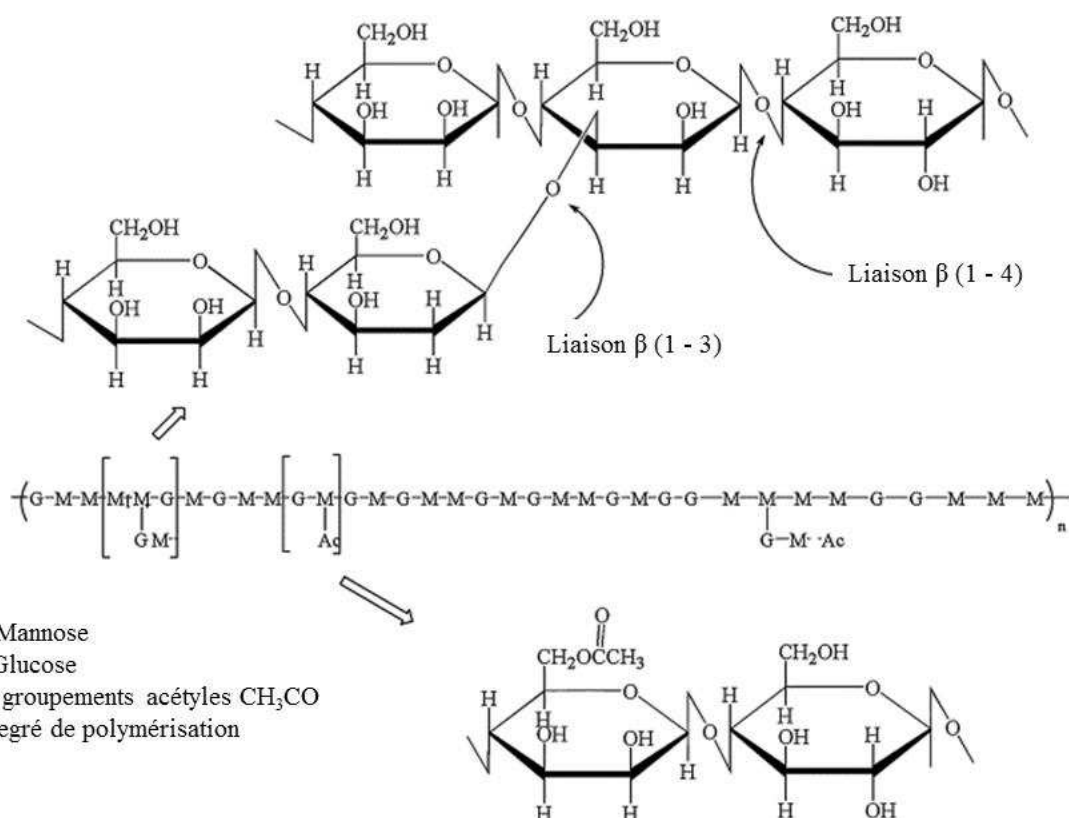


Figure 1 : Structure chimique du glucomannane de konjac selon Zhang, Chen et al. (2014).

La masse molaire moyenne est estimée à $13,2 \times 10^5$ Da. Elle varie selon les espèces, les zones de production, les procédés technologiques et le temps de stockage.

1.1.5 Propriétés physicochimiques du glucomannane de konjac

1.1.5.1 Solubilité

Bien que le glucomannane de konjac soit à la fois hydrophile (avec la présence de groupements hydroxyles) et hydrophobe (avec la présence de groupements acétyles), il est insoluble dans les solvants organiques tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone ou l'éther (Wang, Liu et al., 2015). Sa solubilité dans l'eau peut être réduite par la formation de fortes liaisons hydrogènes suite aux opérations unitaires de purification ou de séchage. En effet, le facteur le plus important affectant majoritairement la solubilité aqueuse du glucomannane de konjac est le degré d'acétylation. La présence de groupes acétyles dans le glucomannane de konjac inhibe la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires améliorant ainsi la solubilité du glucomannane de konjac (Alonso-Sande, Teijeiro-Osorio et al., 2009).

Le glucomannane de konjac est dispersable dans l'eau chaude ou froide, formant une solution très visqueuse, de pH compris entre 5,0 et 7,0. La solubilité augmente avec la chaleur et l'agitation mécanique (Journal officiel de l'Union européenne, 2012a).

1.1.5.2 Viscosité

La viscosité d'une solution aqueuse de glucomannane de konjac à 1 % (m / m) à température ambiante est de 31,6 Pa.s. (Takigami, 2009). À cette même concentration et température, le glucomannane de konjac forme des dispersions hautement visqueuses par rapport aux autres hydrocolloïdes : κ -carraghénane 0,3 Pa.s, gomme guar 4,2 Pa.s, xanthane 8,2 Pa.s (Nishinari, Williams et al., 1992).

Cette caractéristique hautement visqueuse du glucomannane de konjac est due notamment à sa forte capacité d'absorption d'eau : plus de 100 g d'eau par g de glucomannane de konjac. Cette absorption d'eau est diminuée quand le degré d'acétylation sur les chaînes du glucomannane de konjac augmente (Zhang, Chen et al., 2014). La viscosité d'une solution de glucomannane de konjac augmente de façon exponentielle selon la concentration en polymères : la viscosité d'une solution aqueuse à 2 % (m / m) est douze fois plus élevée qu'une solution à 1 % (m / m) (Takigami, 2009; Shah, Li et al., 2015).

La viscosité d'une solution de glucomannane de konjac est dépendante du temps d'agitation : deux heures sont nécessaires pour atteindre le palier de viscosité. La viscosité du glucomannane de konjac n'est pas affectée par la concentration en sel mais par le pH de la solution. La viscosité d'une solution de glucomannane de konjac diminue avec l'abaissement du pH. À pH élevé, la solution de glucomannane de konjac devient un gel irréversible (Takigami, 2009).

1.1.5.3 Mécanisme de gélification

Des gels de glucomannane de konjac sont obtenus par chauffage en présence de composés basiques (pH compris entre 11,3 et 12,6) ou de grandes quantités de sels (K_3PO_4 , Na_3PO_4) (Nishinari, Williams et al., 1992). Les composés basiques les plus couramment utilisés sont :

NaOH, KOH, Ca(OH)₂, Na₂CO₃, K₂CO₃ (Zhang, Chen et al., 2014). Les gels obtenus sont stables, fermes et thermo - irréversibles.

Le mécanisme exact de gélification nécessite des investigations supplémentaires mais au moins deux facteurs importants sont connus. Le premier facteur est les liaisons hydrogènes. En présence d'agent alcalin, la molécule de glucomannane de konjac perd irréversiblement les groupements acétyles de sa molécule. Cette désacétylation facilite l'établissement de liaisons hydrogènes entre les chaînes de glucomannane de konjac aboutissant à la formation d'un réseau gélifié structuré (Alonso-Sande, Teijeiro-Osorio et al., 2009). Le deuxième facteur est l'établissement d'interactions hydrophobes entre les molécules de glucomannane de konjac (figure 2) (Wang, Liu et al., 2015). La concentration critique la plus basse de glucomannane de konjac nécessaire pour former un gel alcalin est estimée à 0,5 % (m / m) (Nishinari, Williams et al., 1992).

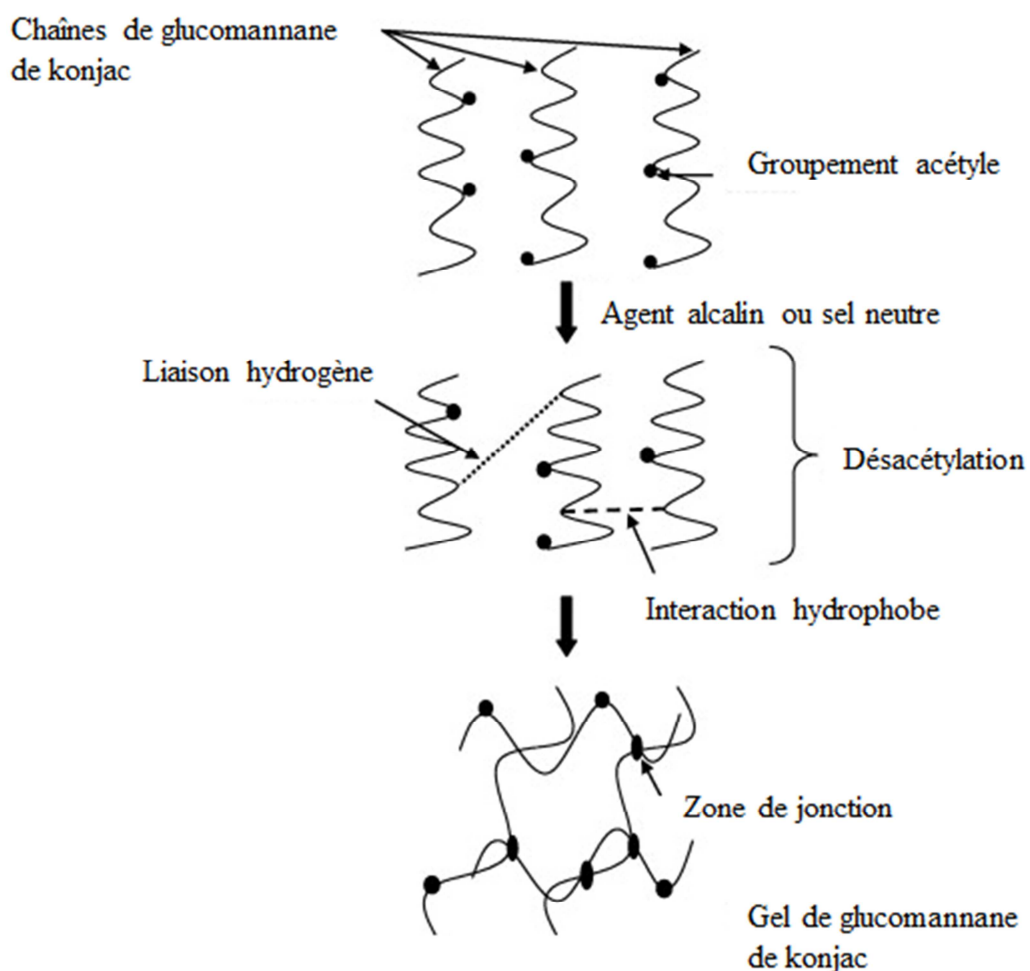


Figure 2 : Mécanisme de gélification du glucomannane de konjac (Alonso-Sande, Teijeiro-Osorio et al., 2009).

La gélification se produit après une période d'induction. La période d'induction est définie comme étant la somme de l'étape de désacétylation et de l'étape d'agrégation. La vitesse de la

période d'induction serait liée à la concentration en ions hydroxydes. Lorsque la vitesse est rapide, les deux étapes semblent impossibles à distinguer. (Yoshimura and Nishinari, 1999; Williams, Foster et al., 2000; Dorthe, 2005).

Un certain nombre de paramètres affecte le mécanisme de gélification et par conséquent les propriétés de la structure finale du gel : le degré d'acétylation, la température, la concentration et le poids moléculaire du glucomannane de konjac, la concentration en éléments basiques. Les influences spécifiques de chaque paramètre sont décrites dans le tableau 3.

Tableau 3 : Influence des différents paramètres sur le mécanisme de gélification du glucomannane de konjac (Alonso-Sande, Teijeiro-Osorio et al., 2009).

| Evolution des paramètres facilitant la formation d'un gel de glucomannane de konjac | Mécanisme explicatif |
|---|---|
| ↓ Degré d'acétylation | ↑ Formation de liaisons hydrogènes |
| ↑ Masse molaire | ↑ Nombre de zones de jonction ↑ Longueur de chaînes connectées |
| ↑ Concentration en glucomannane de konjac | ↑ Nombre de molécules ↑ Proximité entre molécules |
| ↑ Température | ↑ Formation de liaisons hydrogènes |
| ↑ Concentration en agent alcalin | ↑ Désacétylation ↑ Formation de liaisons hydrogènes |

Nishinari et al. (1992) ont montré que les gels formés par l'ajout de sels avaient une texture plus faible par comparaison avec les gels alcalins. La quantité de sels nécessaire à la formation de gel est beaucoup plus grande que la quantité de composés alcalins. Les auteurs rapportent également que l'agent alcalin n'est pas nécessaire pour former un gel si la concentration en glucomannane de konjac est supérieure à 8 % (m / m).

1.1.6 Propriétés fonctionnelles du glucomannane de konjac / applications technologiques

La farine de konjac est consommée depuis près de 2 000 ans en Asie, notamment lors des périodes de disette. Aujourd'hui, le konjac est toujours utilisé comme légume, à l'image de la pomme de terre. La farine de konjac est présente dans la cuisine traditionnelle japonaise sous différentes formes (Yoshimura and Nishinari, 1999) (figure 3).

- konnyaku : gel obtenu par ébullition d'un mélange farine de konjac et eau de chaux. Ce gel peut se déguster ainsi.
- shirataki : konnyaku transformé en vermicelles



Figure 3 : Aliments de la cuisine traditionnelle japonaise à base de konjac : à gauche konnyaku et à droite shirataki (Bien manger, 2016).

En Asie, l'utilisation du glucomannane de konjac est estimée à 2 - 3g / personne / jour (Shah, Li et al., 2015).

En raison de ses propriétés physicochimiques (forte capacité d'absorption d'eau, capacités épaississantes et gélifiantes), technologiques et de ses atouts potentiellement bénéfiques pour la santé, le glucomannane de konjac offre un grand potentiel d'applications technologiques. Elles peuvent être classées selon la finalité recherchée : formuler des aliments, contrôler un procédé de fabrication, résister à un traitement thermique, permettre la libération contrôlée.

1.1.6.1 Formuler des aliments :

- Créer ou contrôler une texture

Les atouts supplémentaires du glucomannane de konjac par rapport à d'autres épaississants sont : son absence de goût, la stabilité au pH sur une gamme de 3,5 à 8,5 et l'insensibilité aux variations de concentration en sel. En effet, contrairement aux polysaccharides texturants chargés comme les carraghénanes, les alginates ou le xanthane, le glucomannane de konjac est neutre. Les sels de sodium, potassium ou calcium ont donc peu d'effet sur ses propriétés rhéologiques (Dorthe, 2005).

Le glucomannane de konjac est un additif utilisé seul ou mélange avec d'autres polysaccharides. Ces mélanges aboutissent à des textures variées et nouvelles, recherchées par les industries agroalimentaires. Le glucomannane de konjac interagit synergiquement avec le xanthane, le κ -carraghénane (Penroj, Mitchell et al., 2005), l'alginate et l'agar pour former des gels thermoréversibles (Takigami, 2009). L'effet synergique est apporté par l'établissement d'interactions intermoléculaires entre les polyosides (Zhang, Chen et al., 2014). Agoub, Smith et al., (2007) suggèrent qu'un mélange à 0,25 % (m / m) de xanthane / 0,25 % (m / m) de glucomannane de konjac est un très bon substitut à la gélatine.

- Réduire une teneur en matière grasse

Les hydrocolloïdes sont largement utilisés en formulation d'aliments pour mimer la matière grasse et compenser les changements physicochimiques dus à la réduction des lipides. Plusieurs études ont montré l'efficacité du glucomannane de konjac comme analogue à la matière grasse dans la formulation de produits à teneur réduite en matière grasse pour des applications telles que les produits carnés (Jiménez-Colmenero, Cofrades et al., 2012), les saucissons secs (Ruiz-Capillas, Triki et al., 2012; Lorenzo, Munekata et al., 2016), la mortadelle (Chin, Keeton et al., 1998), la mayonnaise (Li, Wang et al., 2014), le fromage (Da Silva, De Souza Ferreira et al., 2016).

- Stabiliser les aliments sur le plan physicochimique

Tobin, Fitzsimons et al., (2011) ont montré que l'ajout de 0,03 % (m / m) de glucomannane de konjac à du lait écrémé pasteurisé ou UHT augmente la stabilité vis-à-vis de la sédimentation lors du stockage sans modifier la couleur du produit ni la taille des particules.

- Créer une couche barrière

Le glucomannane de konjac a une très bonne capacité à former des films. L'ajout de glucomannane de konjac à une solution d'alginate de sodium améliore la stabilité thermique et les propriétés mécaniques de résistance des films lors des tests de rupture (test de traction et test de résistance à l'allongement) (Xiao, Gao et al., 2000; Zhang, Xie et al., 2005).

Ces films sont comestibles et ont une bonne stabilité dans l'eau froide, l'eau chaude et même dans des solutions acides. Ils peuvent être utilisés comme matériaux d'emballage pour l'industrie agroalimentaire (Zhang, Chen et al., 2014). Cependant, Li, Jiang et al., (2015) ont montré que des films obtenus à partir de glucomannane de konjac pur sont vulnérables à l'adsorption de vapeur d'eau et sont facilement dissous dans l'eau

Yang, Yang et al., (2001) ont inventé un matériau de revêtement contenant un mélange de glucomannane de konjac et de cellulose pour la conservation des fruits. Ce matériau s'est montré efficace pour contrôler les échanges gazeux (oxygène, éthylène, dioxyde de carbone) et de vapeur (eau) dans et hors du produit, de manière à contrôler la maturation des fruits.

1.1.6.2 Contrôler un procédé de fabrication / Résister à un traitement thermique

Xiong, Cheng et al. (2009) ont étudié l'effet cryoprotecteur du glucomannane de konjac sur une protéine myofibrillaire pendant un stockage à -18°C ainsi que l'influence de cinq niveaux d'addition de glucomannane de konjac sur les propriétés de texture de gels de surimi et leur capacité de rétention d'eau. Les résultats ont montré que 1 % (m / m) de glucomannane de konjac avait le même effet cryoprotecteur qu'un cryoprotecteur conventionnel (10 % de saccharose - sorbitol, 1 / 1, m / m). Les propriétés de rétention d'eau des gels de surimi sont améliorées avec un ajout croissant de glucomannane de konjac. Selon les auteurs, la présence

de nombreux groupements hydroxyles du konjac pourrait réduire la formation de liaisons disulfures, de liaisons hydrogènes et de liaisons hydrophobes, atténuant ainsi l'agrégation des protéines et prévenant leur dénaturation. De plus, le glucomannane de konjac, du fait de sa bonne capacité à absorber l'eau, pourrait diminuer la quantité d'eau libre et donc la quantité de cristaux de glace formés, atténuant ainsi la dénaturation des protéines pendant le stockage à - 18°C.

1.1.6.3 Permettre la libération contrôlée

En plus de propriétés épaississantes intéressantes, le glucomannane de konjac présente une biodégradabilité particulière. Il est non dégradé dans l'intestin grêle, mais dégradé par une β - mannase, enzyme générée par les bactéries du côlon (Zhang, Chen et al., 2014). De fait, le glucomannane de konjac est un candidat prometteur pour la mise au point de systèmes de libération contrôlée de médicaments au niveau du côlon. Nakano, Takikawa et al. (1979) ont montré l'efficacité d'un gel de glucomannane de konjac pour contrôler la libération de dibucaine (médicament anesthésique). Alvarez – Mancenido, Braeckmans et al. (2006) et Alvarez - Mancenido, Landin et al. (2008) ont montré qu'un mélange glucomannane de konjac et xanthane limitait la diffusion du soluté en raison de son fort réseau gélifié.

Une étude de libération contrôlée d'ADN à partir de gel de glucomannane de konjac a été réalisée par Wen, Wang et al. (2008). Ces auteurs ont montré que la libération de l'ADN est durable et affectée par l'état physique du gel, ce qui signifie que la libération pourrait être contrôlée en modulant les concentrations de glucomannane de konjac ou d'ADN.

Toutes ces études montrent que les gels de glucomannane de konjac ont des applications prometteuses pour la libération contrôlée de molécules d'intérêt. Par contre, rares sont les études réalisées sur le potentiel d'application du glucomannane de konjac en tant que matériau d'encapsulation de composés volatils.

Yang, Xiao et al. (2009) ont étudié la capacité d'encapsulation d'huile d'orange douce par le glucomannane de konjac par atomisation. Les auteurs ont obtenu des solutions de glucomannane de konjac de différentes viscosités suite à une hydrolyse enzymatique. Ils ont montré que la viscosité apparente des solutions de glucomannane de konjac avait un effet significatif sur l'encapsulation des composés d'arôme (figure 4). Une viscosité apparente de 200 mPa.s a donné le meilleur rendement d'encapsulation. Si la viscosité est trop faible, la capacité filmogène du konjac est réduite. Si la viscosité est trop élevée, le processus d'atomisation est affecté (alimentation des pompes, durée de séchage).

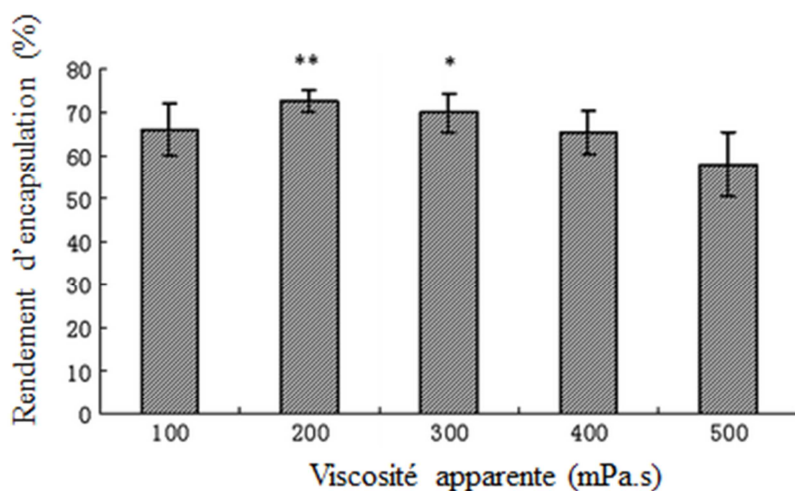


Figure 4 : Effet de la viscosité apparente de solution de glucomannane de konjac sur les rendements d'encapsulation. **P<0,01, *P<0,05, en prenant la viscosité apparente à 500 mPa.s comme référence (Yang, Xiao et al., 2009).

Le rendement d'encapsulation du glucomannane de konjac a été comparé avec les matériaux d'encapsulation couramment utilisés : gomme arabique, amidon modifié (Starch Sodium Succinate, noté SSOS) et maltodextrine. Le glucomannane de konjac présente significativement le même rendement d'encapsulation (82 %) que la gomme arabique et le SSOS ainsi qu'un ratio identique solide – matériau à encapsuler de 4/1.

Les auteurs ont testé des mélanges binaires en faisant varier la quantité de glucomannane de konjac de 20 % à 80 % (m / v) (figure 5). Les résultats montrent que la combinaison de 80 % de glucomannane de konjac avec de la gomme arabique ou du SSOS ou de la maltodextrine augmente significativement le rendement d'encapsulation par comparaison avec le glucomannane de konjac seul. Par contre avec des combinaisons contenant 40 % ou 60 % de glucomannane de konjac, les rendements d'encapsulation de toutes les matrices par comparaison avec la référence (le glucomannane de konjac seul) ne varient pas. Le rendement d'encapsulation de la combinaison de 20 % de glucomannane de konjac avec la maltodextrine diminue significativement. Selon les auteurs, cela suggère une faible compatibilité entre le glucomannane de konjac et la maltodextrine.

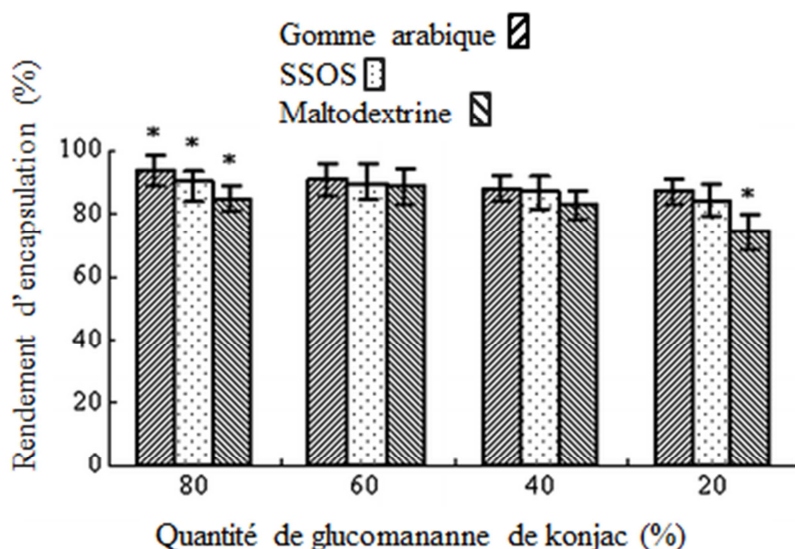


Figure 5 : Rendements d'encapsulation de différentes quantités de glucomannane de konjac combinées avec de la gomme arabique ou de la maltodextrine ou de SSOS (amidon octényl succinate de sodium), *P<0,01, en prenant le rendement obtenu avec du glucomannane de konjac pur comme référence (Yang, Xiao et al., 2009).

Le glucomannane de konjac a donc un grand potentiel en tant que matériau d'encapsulation de composés aromatisants.

1.2 Amidon de pomme de terre

L'amidon extrait des tubercules et des racines est appelé féculé, c'est le cas de la féculé de pomme de terre. En 2015, 3,35 millions de tonnes d'amidon de céréales et de féculé de pomme de terre ont été produits en France. La production de féculé de pomme de terre représente 6 % de la production annuelle française d'amidon (Passion céréales, 2016). En 2012, la France était le 3^{ème} producteur européen de féculé de pomme de terre (Union nationale des producteurs de pomme de terre, 2012).

Toutes origines d'amidon confondues, 50 % de la production est utilisée pour un usage alimentaire (figure 6) et 50 % pour un usage non alimentaire (figure 7).

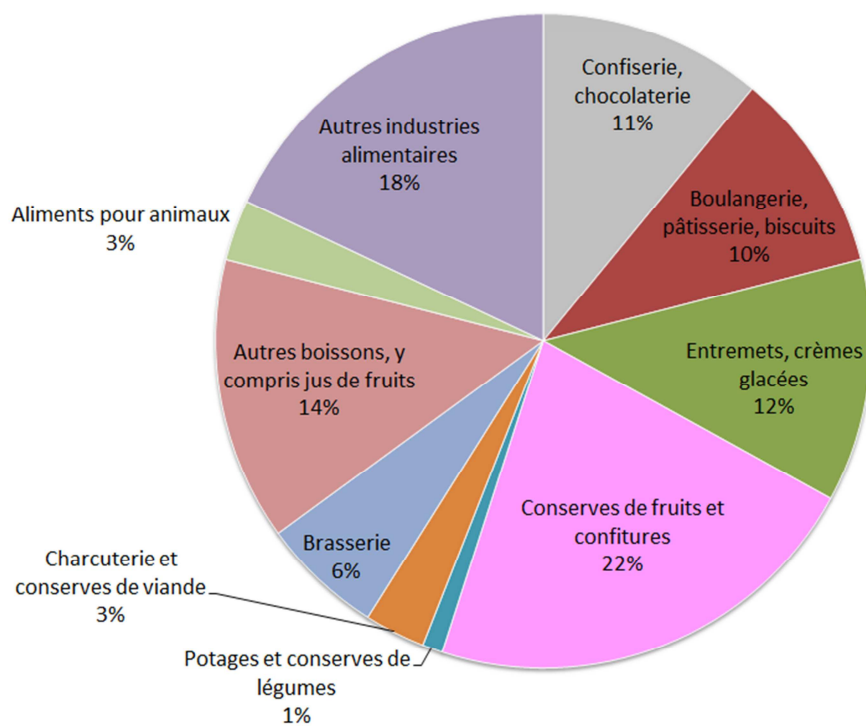


Figure 6 : Utilisations multiples de l'amidon dans le secteur alimentaire (Passion céréales, 2016).

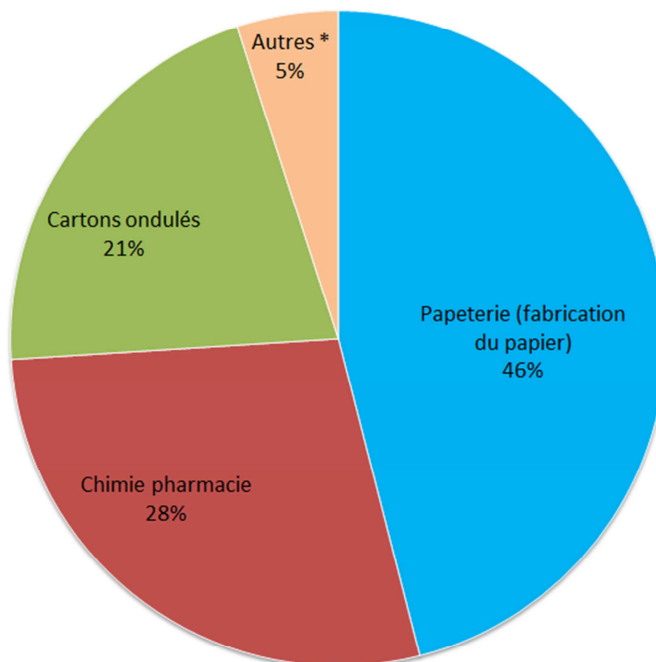


Figure 7 : Utilisations multiples de l'amidon dans le secteur non alimentaire. Autres* : cosmétiques, bioplastiques, textiles (Passion céréales, 2016).

La pomme de terre est composée en moyenne de 80 % d'eau, 16 % d'amidon, de 2 % de protéines, de 2 % de fibres. Elle contient également moins de 1 % de vitamines et minéraux et un très petit pourcentage de lipides (0,2 %). La fécule de pomme de terre est obtenue après une série d'opérations unitaires : lavage, râpage, décantation, tamisage et raffinage. Cinq tonnes de pommes de terre sont nécessaires pour obtenir une tonne de fécule de pomme de terre. Les coproduits sont les pulpes et les protéines essentiellement valorisées en nutrition animale (USIPA (Union des Syndicats des Industries des Produits Amylacés et de leurs dérivés), 2013).

Les amidons natifs sont considérés comme des ingrédients « clean label » dont la fonctionnalité peut être améliorée par un ensemble de modifications physiques, chimiques et/ou enzymatiques afin de répondre à des besoins technologiques et nutritionnels spécifiques. Dans ce cas de figure, les amidons modifiés deviennent des additifs alimentaires avec un code E.

1.2.1 Structure des constituants chimiques de l'amidon de pomme de terre

L'amidon est constitué de deux polymères : l'amylose et l'amylopectine dont les proportions varient avec l'origine botanique de l'amidon. Dans l'amidon de pomme de terre, le rapport amylose / amylopectine est de 21 / 79. L'amidon contient également un certain nombre de constituants mineurs (protéines, lipides, minéraux) présents en quantités variables selon l'origine botanique de la ressource et de la technique d'extraction (Buléon, Colonna et al., 1990). Ces constituants mineurs (lipides, protéines, éléments minéraux) bien que présents en faible quantité (inférieure à 1 %) sont susceptibles de modifier le comportement général de l'amidon. L'amidon de pomme de terre a l'avantage de contenir uniquement des traces de lipides (0,09 %) (Boursier, 2005).

1.2.1.1 Amylose

L'amylose est une molécule linéaire résultant de l'enchaînement de résidus α - D - glucosyls liés par liaisons α - (1 - 4) (figure 8). Quelques ramifications par des liaisons α - (1 - 6) ont été mises en évidence mais elles constituent moins de 1 % des liaisons (Bauer, Badoud et al., 2010).

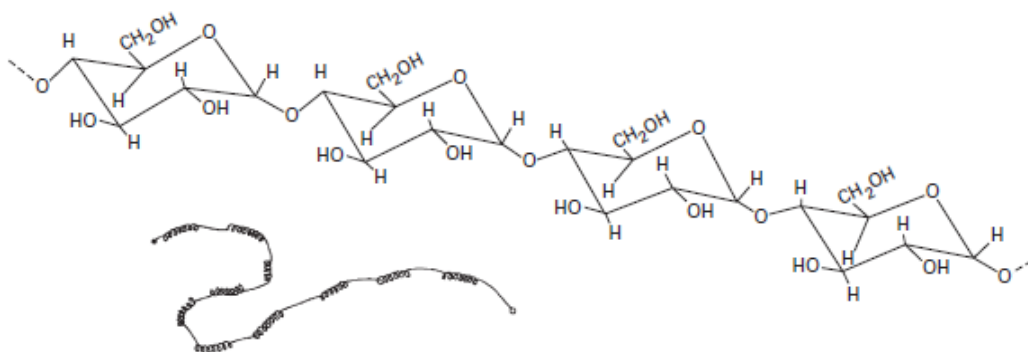


Figure 8 : Structure de l'amylose (Boursier, 2005).

Le degré de polymérisation moyen de l'amylose de l'amidon de pomme de terre est de 4 920 résidus glucosyls représentant une masse moléculaire de l'ordre de 10^5 à 10^6 Da (Boursier, 2005).

L'amylose en solution cristallise rapidement en quelques heures (van Soest, De Wit et al., 1994). Sa conformation et son mode de liaison lui permettent d'adopter des formes hélicoïdales comportant 6, 7 ou 8 unités glucose par tour, stabilisées par des liaisons hydrogènes entre les unités glucosyls. Les groupements hydrophiles de la chaîne sont tournés vers l'extérieur et les groupements hydrophobes vers l'intérieur. Les hélices formées sont des doubles hélices dans le cas des amidons rétrogradés (Imberty, Buléon et al., 1991) ou des simples hélices en présence de certains ligands. Cette simple hélice forme une cavité hydrophobe dans laquelle peuvent se complexer des alcools, des lipides, l'iode, des composés volatils... La description de la simple hélice sera développée dans le chapitre 2 « interactions amidon – composés volatils ».

La réaction de complexation de l'iode est à la base de sa caractérisation analytique. L'amylose est caractérisée par une capacité de fixation à l'iode de l'ordre de 20 mg pour 100 mg d'amylose. Le complexe formé, de couleur bleue, est détecté par spectrophotométrie d'absorption à une longueur d'onde comprise entre 620 et 640 nm (Buléon, Colonna et al., 1990; Boursier, 2005).

1.2.1.2 Amylopectine

Contrairement à la longue chaîne linéaire d'amylose, l'amylopectine est composée de résidus α -D-glucosyls liés par liaisons α -(1-4) sur lesquels viennent se greffer des liaisons α -(1-6) pour former une molécule arborescente (figure 9). Ces liaisons α -(1-6) représentent 5 à 6 % des ramifications (Boursier, 2005).

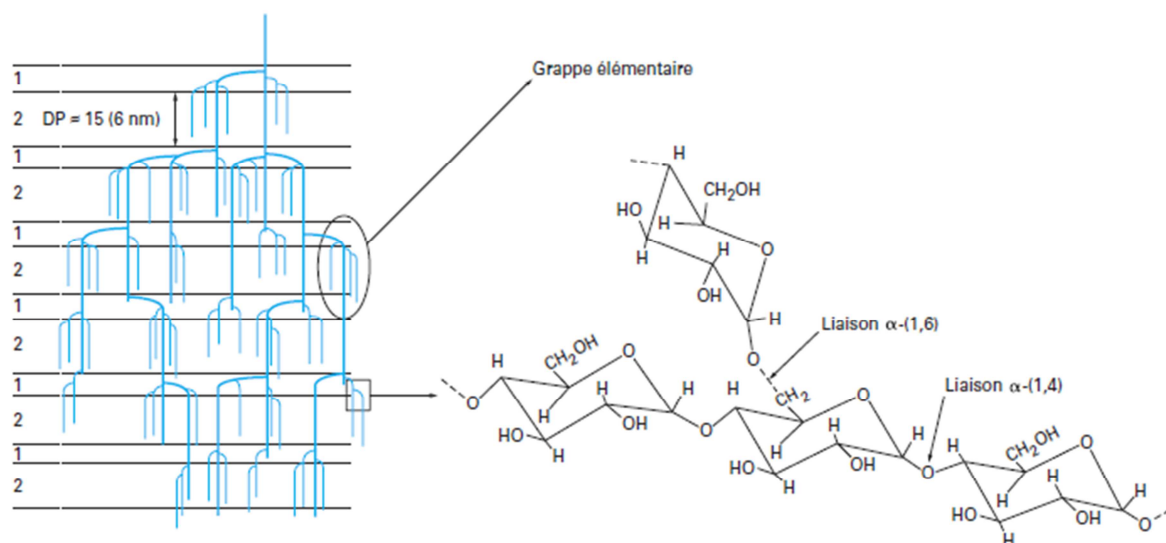


Figure 9 : Structure de l'amylopectine (Boursier, 2005).

La masse moléculaire est comprise entre 10^7 et 10^8 Da soit 10 à 1000 fois plus élevée que celle de l'amylose. Le degré de polymérisation de la fraction amylopectine est de 9 800.

Différents modèles d'organisation de l'amylopectine ont été proposés (Buléon, Colonna et al., 1990). Actuellement, l'organisation n'est toujours pas clarifiée (Vamadevan and Bertoft, 2015). Le modèle le plus décrit est le suivant. L'amylopectine est représentée par un ensemble de grappes de chaînes courtes internes ou externes (S « short », de degré de polymérisation moyen 15 - 20) reliées entre elles par des chaînes plus longues (L « long », de degré de polymérisation moyen 40 - 45). Il existerait également des chaînes de degré de polymérisation supérieur à 60 (Boursier, 2005). Les chaînes L forment l'ossature de la molécule d'amylopectine. Le rapport chaînes S / chaînes L est fonction de l'origine botanique de l'amidon et est voisin de 5 pour les amylopectines de tubercules.

Comme son homologue l'amylose, l'amylopectine, lors de la rétrogradation, forme également des doubles hélices stabilisées par interactions hydrogènes et interactions de van der Waals (Imberty, Buléon et al., 1991).

L'amylopectine possède une faible capacité à lier l'iode : 100 mg d'amylopectine lient moins de 1 mg d'iode car la complexation de l'iode se fait seulement sur les chaînes externes de l'amylopectine. Le complexe formé est de couleur brune et est détectable à une longueur d'onde de 540 nm (Boursier, 2005).

L'amylopectine de pomme de terre se distingue par le fait que certains résidus portent des groupements d'ester phosphorique. La présence de ces groupements chargés a une influence sur le comportement de l'amidon de pomme de terre (Bauer, Badoud et al., 2010).

1.2.2 Structure du grain d'amidon

La structure, l'organisation, la taille et la morphologie (sphérique, polyédrique...) du grain d'amidon sont complexes et sont fonction de l'origine botanique. C'est un moyen simple d'identification de l'origine botanique de l'amidon. La taille des grains varie de 1 μm à 100 μm et ceux-ci sont insolubles dans l'eau à température ambiante. Ils ont tous une caractéristique commune : observés en lumière polarisée, les grains d'amidon présentent une croix noire dite « croix de Malte » dont les branches se rejoignent au niveau du hile, le centre initial de croissance du grain d'amidon, indiquant l'existence d'une structure semi-cristalline.

À l'état natif, le grain d'amidon résulte de l'agencement de stries avec une alternance de structure amorphe et de structure semi-cristalline. Les stries sont disposées de manière concentrique à partir du hile (figure 10). Par observation des grains d'amidon en microscopie à contraste interférentiel, cette organisation apparaît plus marquée pour l'amidon de pomme de terre que pour l'amidon de maïs natif et l'amidon de maïs cireux (Li, Gultinan et al., 2006). Le hile est la région la moins organisée du grain d'amidon (Buléon, Pontoire et al., 1997; Baker, Miles et al., 2001).

Les stries concentriques sont communément appelées anneaux de croissance et sont d'une épaisseur de 100 à 400 nm (Vamadevan and Bertoft, 2015). L'organisation des anneaux de

croissance amorphes est peu connue mais il semble être admis qu'une grande proportion d'amylose les constitue (Vamadevan and Bertoft, 2015). Les anneaux de croissance de structure semi-cristalline sont composés d'un empilement de lamelles cristallines et amorphes. La somme des tailles d'une lamelle amorphe et d'une lamelle cristalline varie de 9 à 10 nm (Vamadevan and Bertoft, 2015). La structure des anneaux de croissance semi-cristalline serait principalement constituée des chaînes d'amylopectine. En effet, la succession des lamelles amorphes et cristallines peut être mise en relation avec la structure de l'amylopectine (Buléon, Colonna et al., 1998). Les chaînes courtes «S» occupent les lamelles cristallines tandis que les points de branchements de l'amylopectine occupent les lamelles amorphes. Les lamelles cristallines ont une épaisseur approximative comprise entre 4,1 nm et 6,4 nm (Vamadevan and Bertoft, 2015). Le rôle structural précis joué par l'amylose n'est pas clair. Selon Atkin, Cheng et al. (1999), l'amylose se situerait principalement au niveau des anneaux de croissance amorphes et l'amylopectine au niveau des anneaux de croissance cristallins, ceci en raison de l'incompatibilité thermodynamique entre les deux polymères. Néanmoins d'autres études suggèrent qu'une faible quantité d'amylose est présente avec l'amylopectine dans les lamelles cristallines (Jenkins and Donald, 1995; Gallant, Bouchet et al., 1997; Buléon, Colonna et al., 1998).

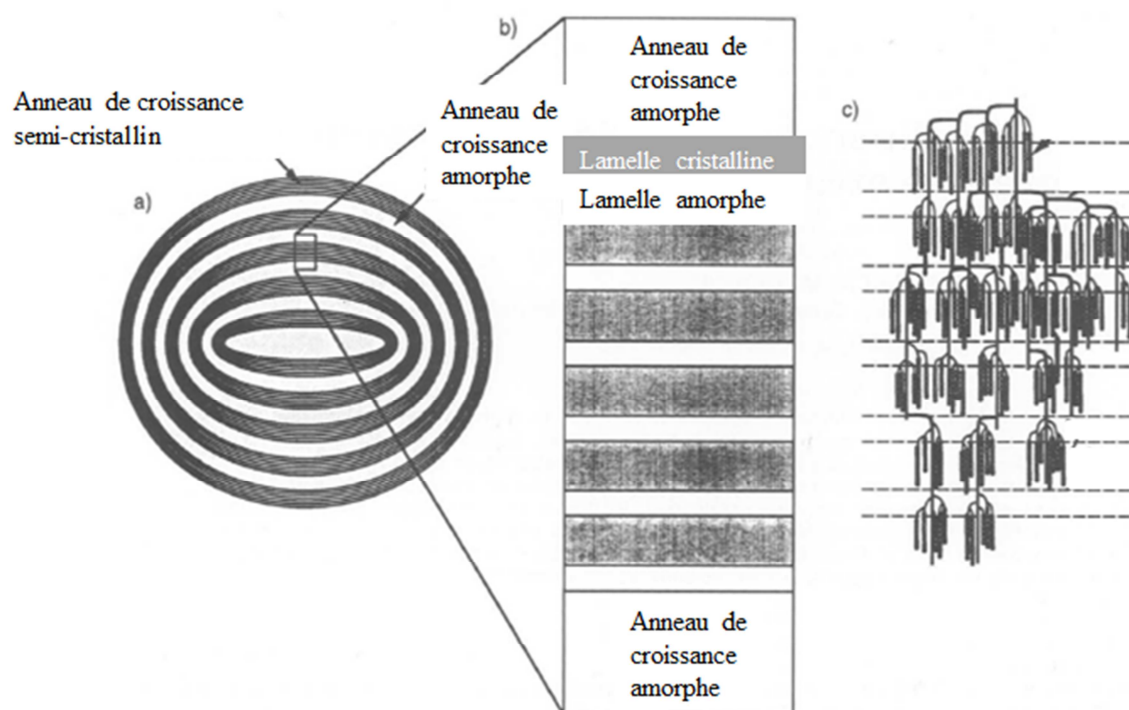


Figure 10 : Représentation schématique des différents niveaux de structuration d'un grain d'amidon. (a) alternance des anneaux de croissance amorphes et semi-cristallins. (b) vue de la structure interne d'un anneau de croissance semi-cristallin composé de lamelles cristallines et amorphes. (c) représentation du positionnement de la structure de l'amylopectine dans les anneaux de croissance semi-cristallins (Jenkins and Donald, 1995).

Gallant, Bouchet et al. (1997) ont étudié l'ultrastructure du grain d'amidon natif, par microscopie électronique à balayage et par microscopie à force atomique. Les auteurs

définissent un niveau d'organisation basé sur des unités cristallines dénommées « Blocklets » (ou microcristallites) qui s'assembleraient pour constituer les anneaux de croissance amorphes et cristallins (figure 11). La taille des microcristallites est comprise entre 20 et 500 nm, selon l'origine botanique de l'amidon et de leur localisation dans le grain d'amidon. Les microcristallites présents dans les anneaux de croissance cristallins sont plus gros (80 à 120 nm) que ceux présents dans les anneaux de croissances amorphes (25 nm).

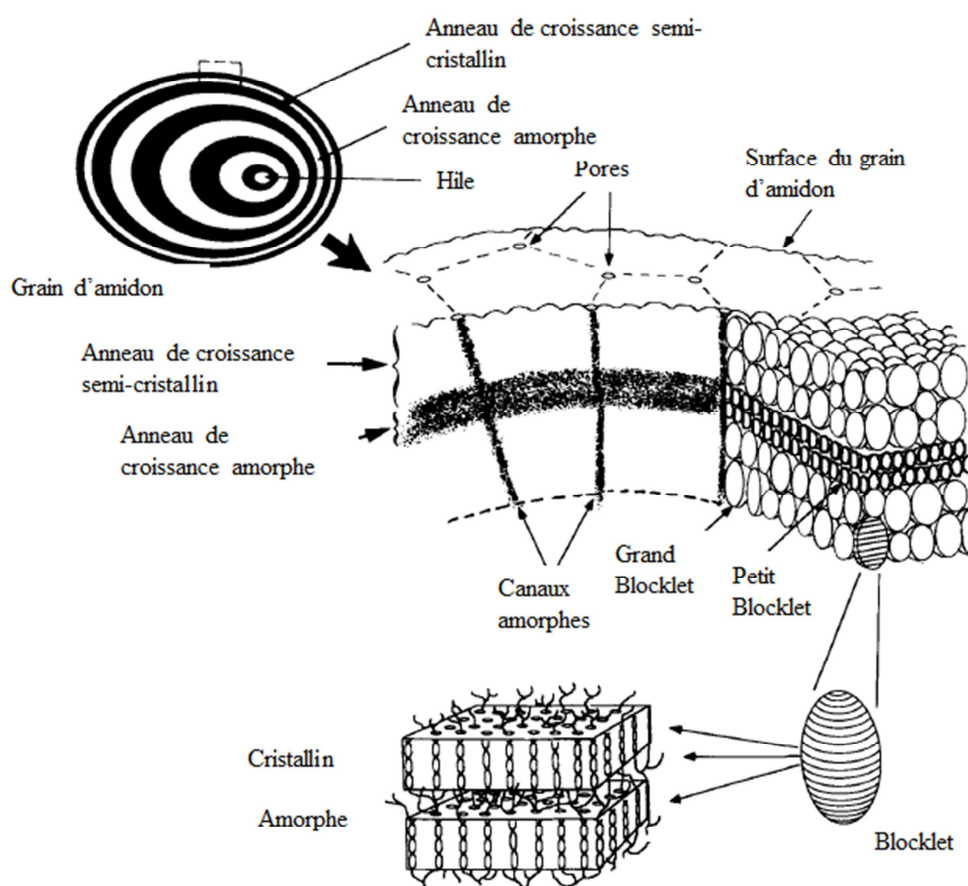


Figure 11 : Représentation schématique des différents niveaux de structuration du grain d'amidon (Gallant, Bouchet et al., 1997).

Les travaux de Ridout, Parker et al. (2003) et de Tang, Mitsunaga et al. (2006) confirment cette organisation en microcristallites. L'amylopectine joue un rôle principal dans l'architecture des microcristallites, tandis que l'amylose localisée entre les microcristallites contribue à la force et la flexibilité des grains d'amidon en connectant les différentes microcristallites entre eux. Selon Tang, Mitsunaga et al. (2006), les lamelles amorphes seraient constituées de microcristallites déficientes (figure 12). Ces dernières sont moins cristallines en raison de la présence d'amylose perturbant l'établissement des lamelles cristallines de l'amylopectine.

La présence de pores à la surface du grain a été mise en évidence (Gallant, Bouchet et al., 1997). Ces pores ($0,05 \mu\text{m}$ à $0,1 \mu\text{m}$ de diamètre), extrémités finales des canaux amorphes de la microstructure du grain d'amidon, pourraient permettre à l'amylose de s'échapper du grain lors des traitements thermiques. Selon Tang, Mitsunaga et al. (2006), les pores seraient des microcristallites déficients (figure 12).

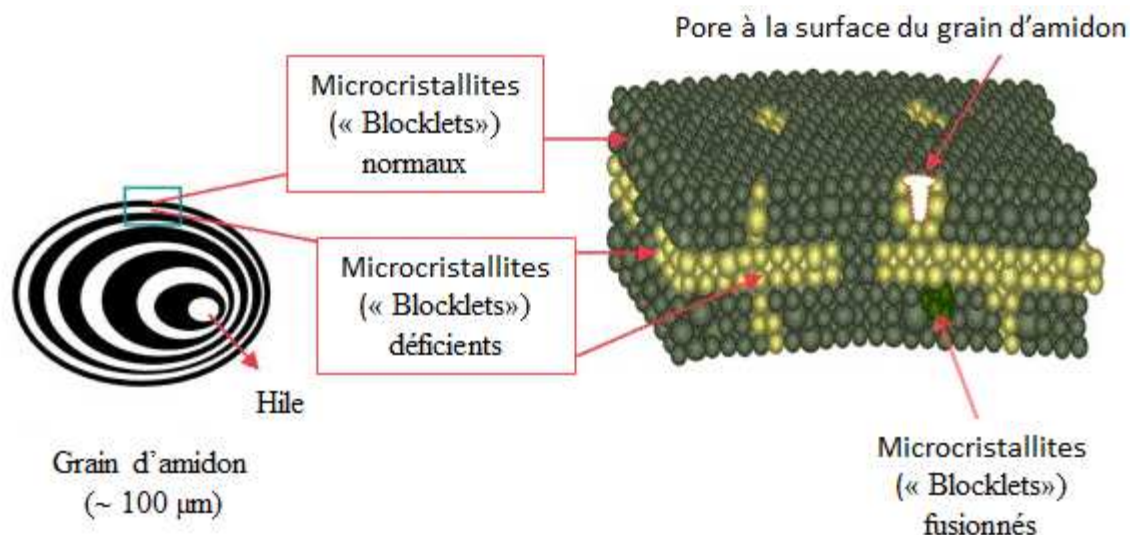


Figure 12 : Schéma de structure d'un grain d'amidon selon Tang, Mitsunaga et al. (2006).

À l'état natif, les grains d'amidon ont une cristallinité faible variant de 15 à 45 %. La cristallinité du grain d'amidon est notamment due à l'amylopectine. La cristallinité joue un rôle primordial dans l'architecture et les propriétés physicochimiques du grain d'amidon (Boursier, 2005). Les grains d'amidons natifs présentent trois formes de structure cristallines référencées A, B, C selon les spectres de diffraction des rayons X obtenus (figure 13) :

- type A : pour les amidons de céréales présentant une teneur en amylose inférieure à 40 %. Son diagramme de diffraction des rayons X présente des pics caractéristiques aux angles 2θ ($\lambda = 1,54 \cdot 10^{-10} \text{ m}$) : $10,1$; $11,3$; $14,9$; 17 ; $18,1$; 23 ; $23,9$ et 26° ;
- type B : pour les tubercules (féculé de pomme de terre) et les amidons riches en amylose, ainsi que pour les amidons rétrogradés. Son diagramme de diffraction des rayons X présente des pics de diffraction caractéristiques aux angles 2θ ($\lambda = 1,54 \cdot 10^{-10} \text{ m}$) : $5,6$; $10,1$; $11,3$; 14 ; $14,9$; 17 ; $19,5$; 22 ; $23,9$ et 26° ;
- Type C : pour les légumineuses et certains amidons de céréales cultivés sous des conditions spécifiques de température et d'hydratation (Buléon, Colonna et al., 1998). Cette structure correspond soit un mélange de grains d'amidon de type A et de type B, soit un mélange de cristallites de types A et B au sein de la structure granulaire (Buléon, Colonna et al., 1990). En effet, l'amidon de pois

présente un granule contenant des cristallites de type B au centre et de type A en périphérie (Bogracheva, Morris et al., 1998). Son diagramme de diffraction des rayons X présente des pics de diffraction caractéristiques aux angles 2θ ($\lambda = 1,54 \cdot 10^{-10}$ m) : 5,6 ; 10,1 ; 11,3 ; 14 ; 14,9 ; 17 ; 18,1 ; 19,5 ; 22 ; 23 ; 23,9 et 26° (Biais, 2006).

Il existe une autre forme de structure cristalline référencée V selon le spectre de diffraction des rayons X. Le type V est caractéristique de l'amylose complexée (complexe amidon - ligand). Ces complexes apparaissent pendant le traitement thermique de l'amidon et en présence d'un ligand susceptible de complexer avec l'amylose. Ces structures de type V sont composées d'une simple hélice gauche à 6, 7 ou 8 résidus formant une cavité hydrophobe dans laquelle s'inclut le plus souvent le ligand. Chaque ligand impose ses propres dimensions de diamètre et de conformation d'hélice. Ce type est rarement détecté dans les amidons natifs. Cependant, Morrison, Law et al., (1993) ont prouvé par résonance magnétique nucléaire que des complexes amylose – lipide endogènes étaient présents dans les amidons natifs de maïs, riz et avoine. La description de ces structures de type V sera développée dans le chapitre 2.3 « Structure moléculaire des complexes ».

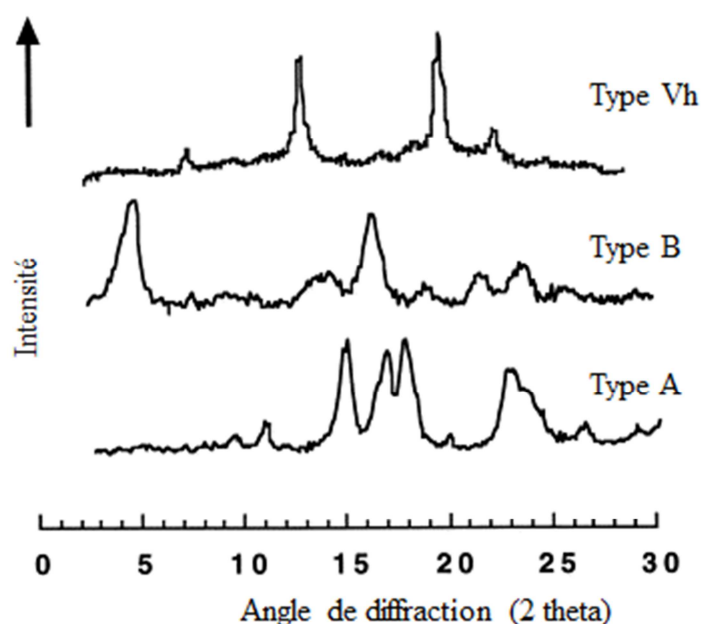


Figure 13 : Diagramme de diffraction aux rayons X de l'amidon de type A, B et V (Buléon, Colonna et al., 1998).

Les diagrammes de diffraction aux rayons X des amidons natifs donnent des résultats difficiles à interpréter de par leur faible cristallinité et la complexité de leur structure moléculaire. De nombreux modèles ont été établis à partir d'amylose cristallisée.

Les structures de types A et B sont basées sur des doubles hélices gauches à 6 unités glucose par tour et sont orientées parallèlement (Hsein-Chih and Sarko, 1978; Hsien-Chih and Sarko,

1978; Imberty, Chanzy et al., 1988; Imberty and Perez, 1988). La structure est stabilisée par des interactions de faible énergie. La différence entre le type A et B réside dans l'empilement des doubles hélices dans la maille cristalline et dans la quantité d'eau présente entre ces doubles hélices (Buléon, Colonna et al., 1990; Buléon, Colonna et al., 1998). Le type A est organisé suivant une maille monoclinique aux dimensions $a = 2,12$ nm, $b = 1,17$ nm, $c = 1,07$ nm compacte et peu hydratée (8 molécules d'eau / tour d'hélice) (figure 14A) (Imberty, Chanzy et al., 1988; Buléon, Colonna et al., 1990). Le type B a une structure de maille cristalline hexagonale aux dimensions $a = b = 1,85$ nm, $c = 1,04$ nm (figure 14B). Cette arrangement génère un canal central occupé par 36 molécules d'eau par tour d'hélice (Imberty and Perez, 1988; Buléon, Colonna et al., 1990).

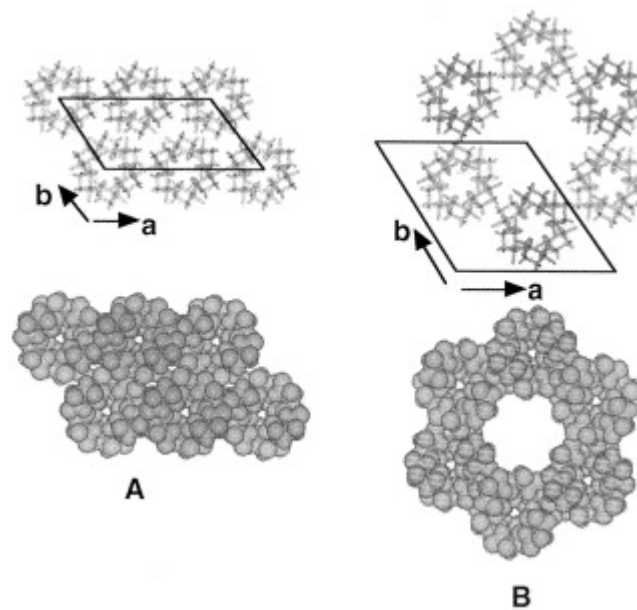


Figure 14 : Structure de maille cristalline des doubles hélices d'amylose de type A (A) et de type B (B). Projection selon le plan (a,b) (Buléon, Colonna et al., 1998).

1.2.3 Traitements hydrothermiques de l'amidon

À température ambiante, les grains d'amidons natifs sont insolubles dans l'eau. L'amidon acquiert ses propriétés texturantes sous l'action d'un traitement hydrothermique. Les phases de gélatinisation et d'empesage sont présentes lors de la montée en température (figure 15). Les phases de rétrogradation et de gélification apparaissent lors du refroidissement et du stockage.

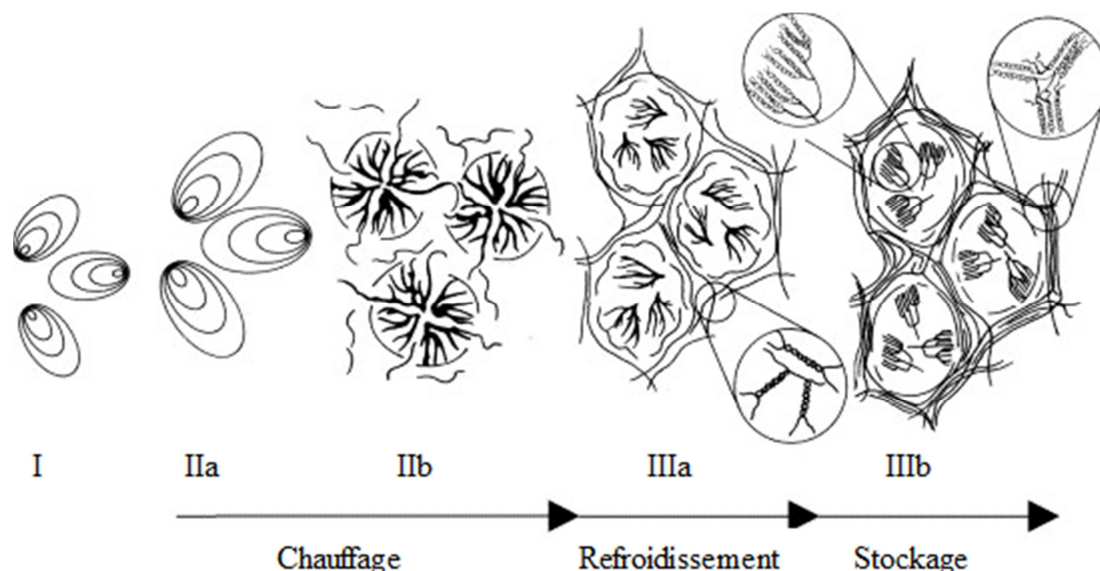


Figure 15 : Représentation schématique des principales étapes de la transformation de l'amidon au cours d'un traitement hydrothermique en excès d'eau. (I) grains d'amidon natif ; (II) gélatinisation, associée avec le gonflement (a) et la destruction partielle des grains d'amidon et solubilisation de l'amylose (b), aboutissant à la formation de l'empois d'amidon ; (III) rétrogradation : formation d'un réseau d'amylose lors du refroidissement de l'empois d'amidon (a) et formation d'une structure cristalline pendant le stockage (b) (Goesaert, Brijs et al., 2005).

1.2.3.1 Gélatinisation et empesage

Lorsque l'amidon est chauffé au-delà de 60°C, en présence d'un excès d'eau (teneur supérieure à 60 %), et sous agitation modérée pour éviter la sédimentation des grains, il se produit un phénomène irréversible appelé gélatinisation (Boursier, 2005). Il s'agit de la disparition de l'état cristallin accompagné d'un gonflement irréversible des grains d'amidon et à la solubilisation de l'amylose.

Les liaisons hydrogènes au sein des grains d'amidon, assurant la structure cristalline de l'amidon, sont fragilisées entraînant une absorption d'eau et le gonflement irréversible des grains d'amidon (Olkku and Rha, 1978). La température à laquelle se produit ce phénomène est la température de gélatinisation. Elle correspond à la température à laquelle la structure cristalline disparaît. La gélatinisation est ainsi facilement détectée par la perte progressive et simultanée de la croix « noire » de polarisation (figure 16) et de la cristallinité des grains d'amidon. Le gonflement très rapide du grain d'amidon est limité sur une plage de température de 1 à 1,5°C. Le gonflement de tous les grains est obtenu sur une plage de température de 10 à 15°C (Boursier, 2005).

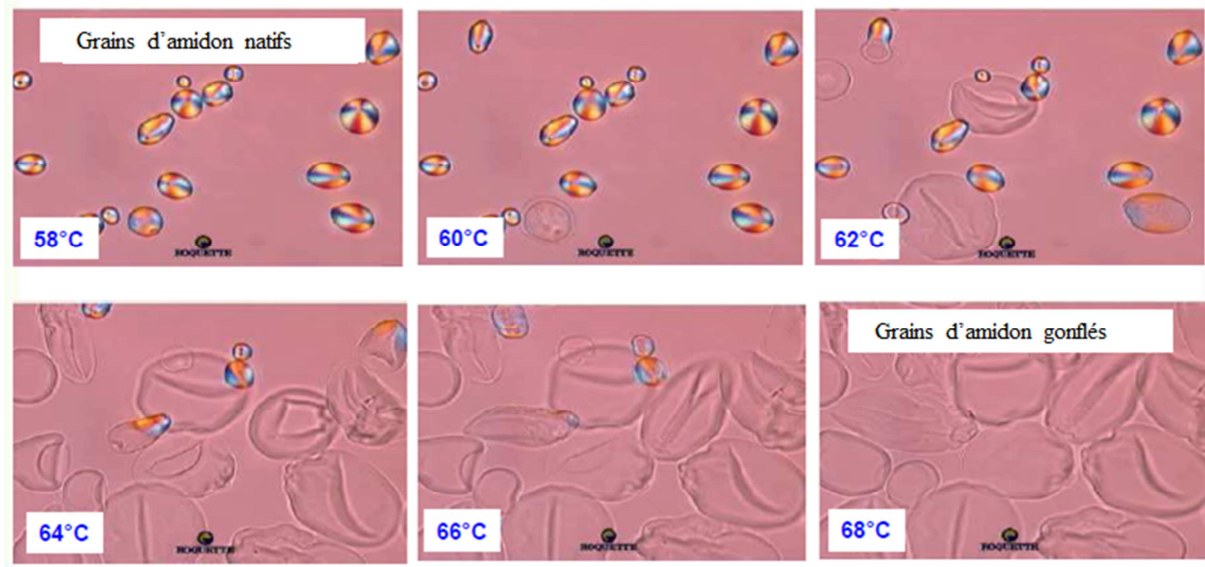


Figure 16 : Traitement thermique en excès d'eau d'un amidon de pomme de terre observé sous microscope optique (Dubal, 2016).

Au-delà de cette température de gélatinisation, la viscosité augmente et conduit à la destruction de la structure granulaire. Il s'agit de l'empesage. L'amylose s'échappe du grain d'amidon via les canaux amorphes et la structure poreuse du grain d'amidon. Ce phénomène conduit à la formation de l'empois d'amidon. Au-delà de l'empesage, si la température continue à augmenter, les grains résiduels éclatent provoquant une chute de la viscosité et une solubilisation supplémentaire des constituants de l'amidon. La solubilisation est totale au-delà de 100°C.

L'empois d'amidon est défini comme étant une suspension de grains gonflés, enrichis en amylopectine, et partiellement éclatés dans un milieu continu de macromolécules solubilisées, principalement de l'amylose, qui ont diffusé hors des grains, (Buléon, Colonna et al., 1990). Le fait que la phase continue soit constituée d'amylose solubilisée et la phase discontinue de fantômes de grains d'amidon enrichis en amylopectine s'explique en grande partie par l'incompatibilité thermodynamique de l'amylose et de l'amylopectine.

Le comportement de gélatinisation de l'amidon de pomme de terre (de type B) est caractérisé par la concomitance de la solubilisation de l'amylose et du gonflement du grain d'amidon. A l'opposé, les amidons de céréales (de type A) sont caractérisés par une première étape de gonflement limité à la température de gélatinisation, suivie à 90°C d'un second gonflement accompagnée d'une solubilisation plus marquée (Buléon, Colonna et al., 1990).

La gélatinisation est une réaction endothermique, elle peut s'observer par analyse enthalpique différentielle. Cette technique est couramment utilisée pour détecter les transitions de phase. La transition de gélatinisation se présente sous la forme d'un endotherme caractérisé par des températures caractéristiques (température initiale, température du pic et température finale) et une enthalpie de gélatinisation. La figure 17 présente les thermogrammes de l'amidon de pomme de terre et de l'amidon d'orge. Généralement, une haute température de gélatinisation

et un pic endothermique étroit suggèrent un ordre moléculaire important (Vamadevan and Bertoft, 2015). La température de gélatinisation de l'amidon de pomme de terre évaluée par analyse enthalpique différentielle est de 65°C (Bauer, Badoud et al., 2010).

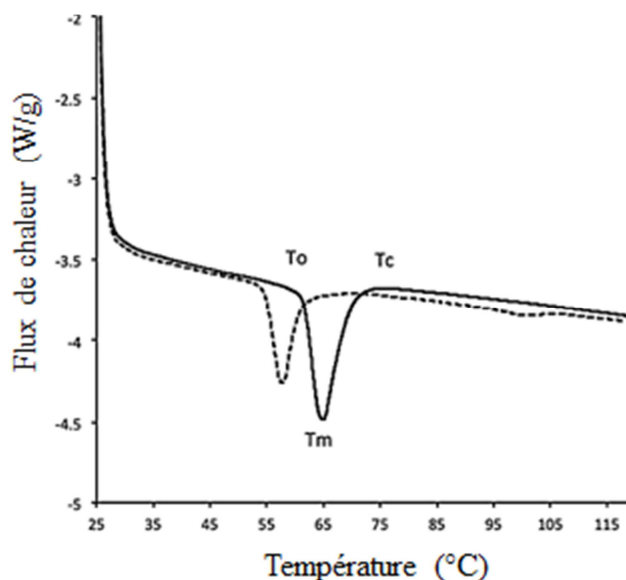


Figure 17 : Thermogrammes d'amidon de pomme de terre (trait plein) et d'amidon d'orge (trait pointillé) en excès d'eau obtenus par analyse enthalpique différentielle. Les températures de transition de gélatinisation sont notées T_o pour la température initiale, T_m pour la température du pic et T_c pour la température finale (Vamadevan and Bertoft, 2015).

L'un des outils les plus couramment employés pour suivre la gélatinisation de l'amidon est le Rapid Visco Analyser® (RVA, analyseur rapide de viscosité, Perten, Suède). Cet instrument est configuré pour simuler les profils de chauffage et de refroidissement des process industriels. Le profil de gélatinisation obtenu est un enregistrement de la viscosité en fonction de la température, de la vitesse de cisaillement et du temps. Ces profils (figure 18) fournissent une multitude d'informations dont notamment la température de gélatinisation, le pic de viscosité (Vamadevan and Bertoft, 2015). On peut noter que le pic de viscosité de l'amidon de pomme de terre est le plus important (550 RVU) par comparaison avec les autres amidons testés. Cette différence est attribuée aux groupes phosphates estérifiés présents dans l'amidon de pomme de terre et à une plus grande quantité d'amylose solubilisée dans la phase continue en raison du fort degré de gonflement des grains d'amidon de pomme de terre (Vamadevan and Bertoft, 2015). Le pic de viscosité est une mesure du pouvoir épaississant de l'amidon. Par contre, la perte de viscosité suite au pic de viscosité est plus importante pour l'amidon de pomme de terre que pour les autres amidons. Cette information est indicative de la faible résistance de l'amidon de pomme de terre à la cuisson et au cisaillement, par rapport aux autres amidons testés (Bauer, Badoud et al., 2010).

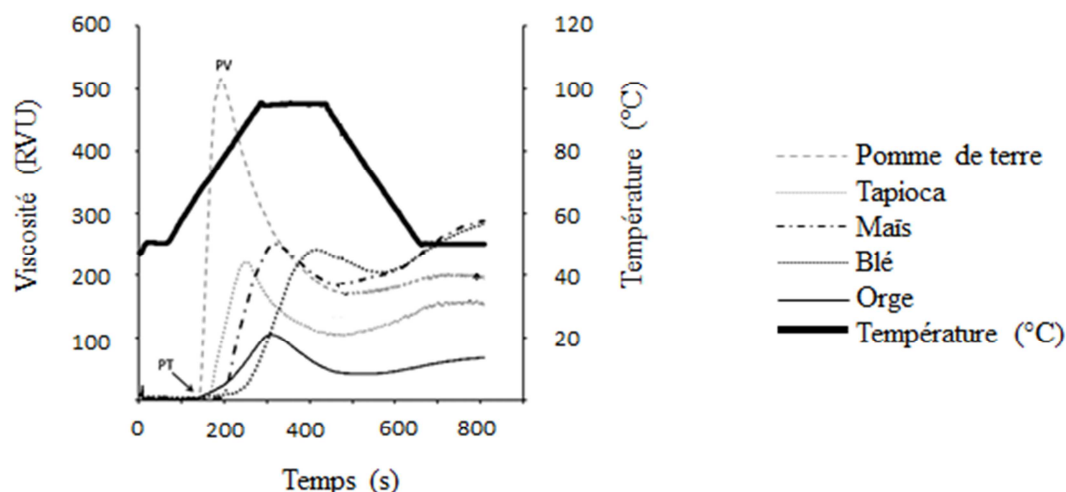


Figure 18 : Profils de gélatinisation de l'amidon de pomme de terre, l'amidon de tapioca, l'amidon de maïs, l'amidon de blé, l'amidon d'orge obtenus en utilisant le Rapid Visco Analyser®. La température de gélatinisation est notée PT, le pic de viscosité est noté PV (Vamadevan and Bertoft, 2015).

Le gonflement des grains d'amidon et la solubilisation de l'amylose et amylopectine sont affectés par les conditions de traitement thermomécanique, la concentration en amidon et la présence d'autres constituants dans le milieu. Une variation de l'un des facteurs entraîne une modification de la structure des suspensions d'amidon.

✓ Influence de la température et de la durée de chauffage

Plus la température est élevée, plus la quantité d'amylose solubilisée et le gonflement des grains sont importants (Keetels, van Vliet et al., 1996). La viscosité des empois d'amidon augmente avec le gonflement des grains. Si la température continue à augmenter, les grains résiduels éclatent provoquant une chute de la viscosité. La température de chauffage affecte également la vitesse de rétrogradation et donc la structure de l'amidon (Doublier, 1981; Doublier, 1987).

✓ Influence de la vitesse de cisaillement

Une agitation modérée lors de la gélatinisation est nécessaire pour éviter la sédimentation des grains d'amidon. En jouant sur la vitesse de cisaillement, il est possible de modifier considérablement la solubilisation des macromolécules. Doublier (1981) a montré que la vitesse de cisaillement agit en complément du traitement thermique et permet ainsi d'obtenir des solubilités, des taux de gonflement et des consistances variables. Cette dépendance est influencée par le type d'amidon utilisé et sa concentration. Mais l'augmentation du cisaillement conduit souvent à une altération des grains et à la libération d'amylopectine en solution.

✓ Influence de la concentration en amidon

En dessous d'une concentration seuil en amidon, estimée à 6 % (m / m) par Ring (1985), les grains d'amidon peuvent arriver à leur stade de gonflement maximal sans remplir la totalité

du volume disponible. Au-dessus de cette concentration seuil, leur gonflement est limité. Les grains gonflés sont alors imbriqués les uns dans les autres réduisant ainsi la solubilisation de l'amylose.

Doublier (1987) a montré que les propriétés rhéologiques d'empois d'amidon sont gouvernées par deux paramètres principaux : la concentration de la phase continue et la fraction volumique de la phase continue elle-même dépendante de la déformabilité des grains d'amidon gonflés de la phase dispersée. Cet auteur a proposé d'estimer la fraction volumique d'une suspension de grains d'amidon gonflé (notée ϕ) à partir des valeurs de solubilité et du pouvoir gonflant des grains d'amidon. Selon la valeur de la fraction volumique des grains gonflés (ϕ), trois types de comportement ont été observés :

- $\phi < 0,7$: régime dilué. La viscosité du système dépend principalement de la fraction volumique des grains d'amidon gonflés.
- $0,7 < \phi < 0,9$: régime concentré. Le comportement rhéologique est fonction de la fraction volumique, de la concentration de la phase dispersée et de la déformabilité du grain d'amidon.
- $\phi > 0,9$: régime hautement concentré. Il y a un entassement maximal des grains gonflés.

Il faut souligner que cette description suppose que les grains d'amidon sont très déformables de telle façon que leur entassement aboutit à une occupation à peu près complète de l'espace disponible. Par ailleurs, la fraction volumique (ϕ) ne peut pas excéder l'unité puisque cela signifierait que toutes les particules gonflées occuperaient tout l'espace. La détermination des indices de gonflement et de solubilité est la base de la description structurale des systèmes. Les conditions du traitement thermomécanique conditionnent les quantités d'amylose et d'amylopectine solubilisées, ainsi que le gonflement des grains d'amidon. Par conséquent, elles ont une influence importante sur les propriétés rhéologiques des empois amyliacés.

✓ Influence de la présence d'autres constituants dans le milieu

Dans les aliments où l'amidon est présent, la gélatinisation et la rétrogradation de l'amidon sont modulées par la teneur en eau réellement disponible et par la présence d'autres macromolécules. En effet, les protéines, les lipides, le sel et le saccharose affectent la gélatinisation de l'amidon (Olkku and Rha, 1978). Les hydrocolloïdes sont également connus pour affecter la gélatinisation et la rétrogradation de l'amidon. Ces propriétés sont importantes dans le développement de produits alimentaires et plus particulièrement dans la modification de la texture des systèmes alimentaires composites (Biliaderis, Arvanitoyannis et al., 1997). En effet, les associations amidons avec les monoglycérides ou les hydrocolloïdes ont pour but de renforcer les propriétés épaississantes ou gélifiantes et de pallier les inconvénients de synergie (Buléon, Colonna et al., 1990).

De nombreuses synergies entre l'amidon et les hydrocolloïdes tels que les galactomannanes, carraghénanes, ou encore gomme xanthane ont été démontrées (Christianson, Hodge et al., 1981; Biliaderis, Arvanitoyannis et al., 1997; Baranowska, Sikora et al., 2011; Šubarić, Babić et al., 2011). Elles se traduisent par une augmentation de la viscosité des suspensions mixtes

amidon - hydrocolloïde, une réduction de la synérèse et une modification de la vitesse de rétrogradation de l'amidon (Buléon, Colonna et al., 1990). L'ampleur de ces changements est liée à la nature de l'amidon et de l'hydrocolloïde utilisé ainsi qu'à leurs concentrations respectives (Buléon, Colonna et al., 1990; Biliaderis, Arvanitoyannis et al., 1997). Un focus sur les matrices mixtes amidon – glucomannane de konjac est développé dans le chapitre 1.3 « système mixte amidon – glucomannane de konjac ».

Enfin, la présence de ligands susceptibles de complexer avec l'amylose peut également affecter la gélatinisation et la rétrogradation de l'amidon (Hoover and Hadziyev, 1981; Eliasson and Krog, 1985). Cette partie sera développée dans le chapitre 2 « interactions amidon - composés volatils »

1.2.3.2 Gélification et rétrogradation

Après traitement thermique, le refroidissement de l'empois d'amidon provoque une insolubilisation des macromolécules d'amylose et d'amylopectine, une séparation de phases liées à leur incompatibilité puis une recristallisation (tendance à un retour à un état organisé) (Kalichevsky and Ring, 1987; Boursier, 2005). C'est la rétrogradation.

Lors du refroidissement de l'empois d'amidon, à une concentration supérieure ou égale à 6 % (m/m), une augmentation de la viscosité est observée aboutissant très rapidement à la formation à froid d'un gel opaque mixte formé d'une phase continue d'amylose emprisonnant des fantômes de grains riches en amylopectine (figure 19) (Miles, Morris et al., 1985).

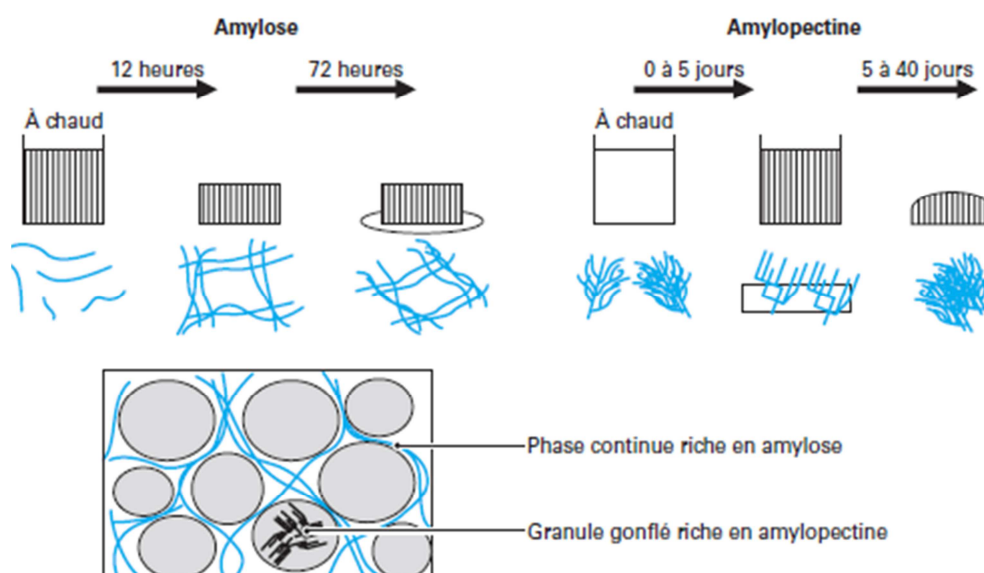


Figure 19 : Représentation schématique d'un empois d'amidon rétrogradé et comparatif de rétrogradation entre l'amylose et l'amylopectine (Boursier, 2005).

Ce gel est un réseau tridimensionnel stabilisé par la formation de liaisons hydrogènes entre les chaînes de résidus glucosyls. La gélification s'effectue en deux étapes : le passage d'une pelote statistique à un enroulement double hélice, puis l'association de plusieurs doubles hélices conduisent à une cristallisation. Cette étape conduit généralement à une libération d'eau, phénomène appelé synérèse.

Miles, Morris et al. (1985) ont montré que la rétrogradation de l'amidon est successivement dominée par le comportement de l'amylose puis par celui de l'amylopectine. L'amylose gélifie en quelques heures. L'amylopectine quant à elle se réorganise en plusieurs jours (figure 19). La vitesse de rétrogradation est d'autant plus rapide que la température finale est basse et que la différence entre la température de chauffage et la température après refroidissement est basse.

Les spectres des gels d'amylose et des gels d'amylopectine obtenus par la diffraction des rayons X montrent que la recristallisation de l'amylose et celle de l'amylopectine sont de type B. La température de fusion pour le gel d'amylose se situe vers 120°C - 140°C. C'est un gel stable. À l'opposé, la température de fusion pour le gel d'amylopectine se situe vers 45°C. C'est un gel instable (Miles, Morris et al., 1985).

1.3 Système mixte amidon – glucomannane de konjac

L'unique donnée bibliographique relatant une étude entre l'amidon de konjac présent dans les tubercules et le glucomannane de konjac est présentée dans les travaux de Dorthe (2005). L'auteur a comparé les viscosités en écoulement des solutions de glucomannane de konjac à 10 g/L contenant de 0 à 1,1 % (m/m) d'amidon de konjac après traitement thermique par autoclave. Aucune différence de valeur de viscosité n'a été observée. Ce résultat suppose qu'aucune synergie en matière de viscosité n'existe entre l'amidon de konjac et le glucomannane de konjac.

Tous les résultats présentés à partir de ce paragraphe ont été obtenus à partir de glucomannane de konjac purifié. Plusieurs études ont montré l'impact du glucomannane de konjac lors de la gélatinisation de l'amidon.

Le glucomannane de konjac est caractérisé par une grande affinité pour l'eau et un grand volume hydrodynamique. En raison de ces caractéristiques, comme la plupart des hydrocolloïdes, le glucomannane de konjac ne peut pas pénétrer dans le grain d'amidon. Il reste ainsi localisé dans la phase continue qui entoure les grains d'amidon. Pendant l'empesage, le gonflement des grains d'amidon entraîne une réduction du volume disponible pour l'hydrocolloïde entraînant ainsi une augmentation de sa concentration dans la phase continue (Alloncle, Lefebvre et al., 1989).

L'effet de l'ajout de glucomannane de konjac à différentes teneurs (0,4 % à 1,5 % m / m) a été étudié lors de la gélatinisation de divers amidons : blé, maïs, maïs cireux et tapioca (gel à 7 % m / m) (Bahnassey and Breene, 1994). Pour cette étude ; le Rapid Visco-Analyser[®] (RVA, Perten, Suède) a été utilisé. Pour tous les amidons, la viscosité a augmenté. Cette

augmentation est croissante avec la concentration en glucomannane de konjac. Xu, Zhong et al. (2012) ont confirmé ces résultats en étudiant l'effet de l'ajout de glucomannane de konjac - 1 %, 2 % et 3 % par rapport à la quantité d'amidon - sur la gélatinisation d'amidon de maïs (8 %, m/v) au moyen d'un rhéomètre. L'ajout croissant de glucomannane de konjac augmente le pic de viscosité des matrices. Une augmentation de 46 % du pic de viscosité est observée en passant de 1 % et 2 % de glucomannane de konjac (figure 20). Par contre, la température de gélatinisation n'est pas affectée. Ceci montre que la capacité de rétention d'eau du glucomannane de konjac n'affecte pas la vitesse initiale de gonflement des grains d'amidon.

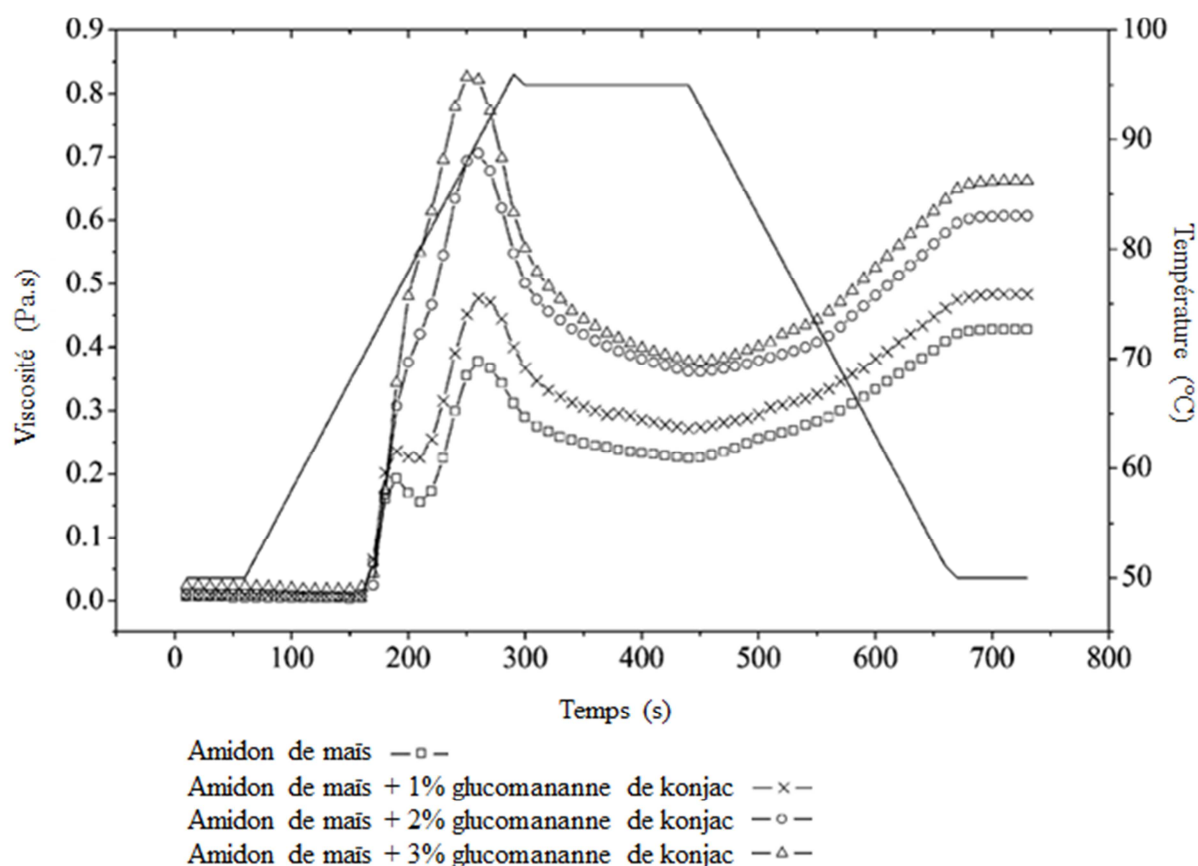


Figure 20 : Courbes de gélatinisation de systèmes amidon de maïs - glucomannane de konjac. La viscosité de la dispersion à 8 % d'amidon de maïs et celle des dispersions contenant un ajout de 1 %, 2 % et 3 % de glucomannane de konjac ont été obtenues au moyen d'un rhéomètre. Le trait plein correspond au profil de température (Xu, Zhong et al., 2012).

Khanna et Tester (2006) ont étudié l'effet du glucomannane de konjac sur la gélatinisation de différents amidons (maïs cireux, maïs, maïs à forte teneur en amylose et pomme de terre) par analyse enthalpique différentielle. L'ajout de glucomannane de konjac, quel que soit l'amidon testé, a provoqué une diminution de l'enthalpie de gélatinisation et un décalage du pic de gélatinisation vers des températures plus élevées. Ces résultats s'expliqueraient par une gélatinisation incomplète de l'amidon en présence de glucomannane de konjac qui diminuerait la quantité d'eau disponible nécessaire au gonflement du grain d'amidon. Le même résultat a été obtenu via une autre méthode d'analyse. En effet, Funami, Kataoka et al.

(2005) ont étudié l'effet du glucomannane de konjac (0,5 % m / v) sur la gélatinisation d'amidon de blé (5 % m / v) en dosant notamment la quantité d'amylose solubilisée dans la phase continue par dosage spectrophotométrique à une longueur d'onde de 620 nm après coloration avec une solution d'I₂ - KI. Les résultats montrent que peu d'amylose a été solubilisée. Les résultats suggèrent que l'augmentation de la viscosité de la phase continue empêche la diffusion de l'amylose hors du grain d'amidon diminuant de fait la quantité d'amylose libérée.

L'influence de l'ajout de 0,5 % (m / m) de glucomannane de konjac sur la structure microscopique d'un gel d'amidon de riz (8 %, m / m) a été étudié par Charoenrein, Tatirat et al. (2010). Les matrices ont été colorées par une solution de FITC - dextrane (isothiocyanate de fluorescéine – dextrane) puis observées par microscopie confocale à balayage laser. Dans une matrice de riz sans glucomannane de konjac, les grains d'amidon gonflés sont proches, ce qui facilite leur association. L'ajout de 0,5 % de glucomannane de konjac engendre des grains d'amidon moins gonflés, équitablement répartis et par conséquent un réseau moins dense.

Un lien peut être fait entre ces observations microscopiques et des mesures rhéologiques dynamiques. Yoshimura, Takaya et al. (1998b) ont étudié les propriétés rhéologiques de suspensions mixtes d'amidon de maïs et de glucomannane de konjac (concentration totale en polysaccharide 3,5 % (m / m) avec des ratios amidon de maïs / glucomannane de konjac de 10/0, 9/1, 8/2, 7/3, 6/4). Ils ont montré que le glucomannane de konjac n'interagissait pas en synergie avec l'amidon de maïs pour promouvoir la formation d'une structure ordonnée. Ils ont obtenu un gel composite où le glucomannane de konjac est dispersé dans la phase continue. Le comportement rhéologique des mélanges amidon de maïs – glucomannane de konjac est intermédiaire entre celui d'une solution de polymère concentrée et celui d'un gel faible.

Toutes ces études montrent que la présence de glucomannane de konjac dans une suspension d'amidon perturbe la gélatinisation de l'amidon : diminution du gonflement des grains d'amidon et par conséquent diminution de la quantité d'amylose solubilisée. L'ajout de glucomannane de konjac a augmenté la viscosité de la suspension d'amidon de pomme de terre aboutissant à gel de faible structuration. Aucune synergie entre les deux polysaccharides n'a été mise en évidence.

D'autres études ont montré l'impact du glucomannane de konjac lors de la rétrogradation de l'amidon.

Yoshimura, Takaya et al. (1996) ont étudié les propriétés physiques de gels mixtes d'amidon de maïs et de glucomannane de konjac (concentration totale en polysaccharide 15 % (m / m), ratio amidon / glucomannane de konjac 13,5 / 1,5) par rhéologie dynamique et analyse enthalpique différentielle. Les auteurs ont également étudié l'effet du glucomannane de konjac sur la production de synérèse. La capacité de rétention d'eau du glucomannane de konjac empêche l'apparition de synérèse. La rétrogradation de l'amidon de maïs est favorisée par le glucomannane de konjac qui absorbe l'eau du gel mixte lors d'un stockage de courte durée (1 à 3 jours). Au-delà de sept jours de stockage, la rétrogradation de l'amidon de maïs est ralentie par le glucomannane de konjac. Ce dernier peut interagir avec l'amylose ou

l'amylopectine et empêche la formation d'une structure ordonnée retardant ainsi la réorganisation des molécules d'amylopectine. De même, Funami, Kataoka et al. (2005) ont observé la rétrogradation d'un gel mixte amidon de blé - glucomannane de konjac (0,5 % m / v) par analyse enthalpique différentielle et analyse rhéologique. Ils ont montré, qu'en raison des propriétés épaississantes du glucomannane de konjac et de ses capacités de rétention d'eau, la concentration de l'amylose dans la phase continue augmente, accélérant la rétrogradation « à court terme », c'est-à-dire la rétrogradation de l'amylose. Par contre, le glucomannane de konjac ralentit la rétrogradation de l'amidon à « long terme », c'est-à-dire la rétrogradation de l'amylopectine. Khanna et Tester, (2006) ont également montré par analyse enthalpique différentielle que le glucomannane de konjac inhibait la rétrogradation de l'amylopectine présent dans l'amidon après un stockage pendant 28 jours à une température inférieure à 5°C. Le comportement du glucomannane de konjac est similaire à une barrière physique pour empêcher l'association des chaînes d'amylopectine. Cependant, selon l'origine botanique et la nature de l'amidon, les résultats varient. En effet, à concentration équivalente en amidon (2 % m / m), l'ajout de 1 % (m / m) de glucomannane de konjac a presque complètement inhibé la rétrogradation des gels d'amidon de maïs cireux (0,4 % d'amylose) et d'amidon de maïs à haute teneur en amylose (63 % d'amylose). Par contre 10 % de glucomannane de konjac ont été nécessaires pour inhiber la rétrogradation des gels d'amidon de maïs. Quant à l'amidon de pomme terre, la rétrogradation est progressivement ralentie par l'addition du glucomannane de konjac. Cependant, contrairement aux autres amidons testés dans l'étude, l'ajout de 10 % de glucomannane de konjac n'a pas été suffisant pour inhiber sa rétrogradation. Enfin, Xu, Zhong et al. (2012) ont également observé par analyse enthalpique différentielle que le glucomannane de konjac a retardé la rétrogradation de gels d'amidon de maïs en raison des interactions entre l'amidon et le glucomannane de konjac.

Huang, Kennedy et al. (2007) ont étudié l'effet de quantités croissantes de glucomannane de konjac (0,1 % à 0,4 % m / m) sur les propriétés rhéologiques de gels d'amidon de riz (3,5 % m / m) par la méthode de l'analyse du profil de texture (TPA, Texture Profil Analysis) après une nuit de stockage à 4°C. Les résultats ne montrent aucune variation des paramètres rhéologiques quelle que soit la concentration de glucomannane de konjac. Ce résultat a été confirmé par Charoenrein, Tatirat et al. (2010). Les auteurs ont également montré que l'ajout de glucomannane de konjac n'augmente pas la fermeté des gels contrairement à l'ajout de gomme guar. Cette différence est due à la propriété non gélifiante du glucomannane de konjac à faible concentration ou en absence d'alcalin.

En résumé, le glucomannane de konjac a un impact sur la rétrogradation de l'amidon. La présence de glucomannane de konjac dans des dispersions d'amidon limite l'apparition de synérèse de par sa capacité de rétention d'eau. Dans les gels mixtes amidon – glucomannane de konjac, la rétrogradation de l'amylose est accélérée et celle de l'amylopectine est ralentie. Ce phénomène semble varier selon l'origine botanique de l'amidon.

2 Interactions amidon – composés volatils

En présence d'un ligand et sous certaines conditions, les chaînes linéaires d'amylose prennent la forme d'une simple hélice enroulée à gauche, stabilisée par liaison hydrogène, et connue sous le nom de V-amylose. Ce mode d'interaction est appelé complexe d'inclusion ou encapsulation moléculaire. La cavité hydrophobe des hélices peut accueillir des ligands de petite taille. Alternativement, le ligand peut induire la simple hélice et être localisé entre les hélices (Nuessli, 1998).

La nature de ces ligands est variée : acide gras, alcool, iode, composés volatils. Schoch et Williams (1944) sont les premiers auteurs à avoir mis en évidence les complexes amylose - acide gras. Les complexes sont réversibles. Ils peuvent être formés pendant la gélatinisation de l'amidon ou lors du refroidissement qui suit (Kugimiya and Donovan, 1981). Ces complexes sont insolubles dans l'eau à température ambiante. De plus, les complexes formés ont la propriété de cristalliser au cours de la rétrogradation. Les cristaux ainsi formés peuvent être de différents types et être révélateurs du type d'interaction mis en jeu. Le fait que les complexes amidon - ligand tendent à former des agrégats insolubles a été utilisé dans le passé pour détecter la capacité complexante de ligand (Kuge and Takeo, 1968). Toutes ces propriétés ont permis d'étudier les complexes. Les techniques de caractérisation et de quantification le plus largement employées pour l'étude des complexes amylose - ligand sont :

- la diffraction des rayons X, qui permet de vérifier la formation de complexes et de montrer l'état des arrangements cristallins et amorphes de l'amidon et des complexes amidon – ligand (Yamashita, 1965; Yamashita and Hirai, 1966; Rondeau-Mouro, Le Bail et al., 2004; Le Bail, Rondeau et al., 2005) ;
- l'analyse enthalpique différentielle qui permet de suivre la fusion et la formation des complexes amidon – ligand (Biliaderis, Page et al., 1985; Nuessli, 1998; Le Bail, Rondeau et al., 2005) ;
- la capacité de liaison à l'iode (Rutschmann and Solms, 1990c), qui permet la quantification des complexes amidon – ligand. Cette technique présente l'inconvénient majeur d'être sensible aux compétitions éventuelles entre les composés d'arôme et les lipides. Une autre technique de quantification est basée sur l'extraction et la détermination quantitative de ligand complexé après désorption des ligands libres et dégradation enzymatique de l'amidon. Ainsi les isothermes de liaisons peuvent être établis (Rutschmann, Heiniger et al., 1989) ;

À partir de ces techniques, les constantes d'association notées K_a sont calculées (équation 1). Leurs valeurs déterminent l'importance des interactions (Belitz and Grosch, 1987).

$$K_a = \frac{[\text{complexe matrice - ligand}]}{[\text{matrice}] \cdot [\text{ligand}]} \quad \text{Équation 1 ;}$$

- les méthodes rhéologiques, qui donnent des informations de l'impact de la complexation à un niveau macroscopique et microscopique (Doublie, 1987; Alloncle, Lefebvre et al., 1989; Nuessli, Conde-Petit et al., 1995).

- la modélisation moléculaire qui permet de prédire les caractéristiques structurales de l'amylose et de l'amylopectine ainsi que les interactions entre l'amidon et les ligands (Imberty and Pérez, 1989; Godet, Tran et al., 1993; Immel and Lichtenthaler, 2000; Biais, 2006)

Les ligands endogènes (lipides contenus notamment dans les amidons de céréales) et les ligands exogènes peuvent complexer l'amylose lors d'un traitement thermique. Pour notre étude, l'amidon de pomme de terre a été choisi en raison de sa teneur négligeable en lipides (ligand endogène). Par conséquent, cet état de l'art est centré uniquement sur les « complexes amidon - ligand exogène », ce dernier étant les composés volatils.

2.1 Composés d'arôme

Selon la législation (Journal officiel de l'Union européenne, 2008b), les composés d'arôme sont définis comme « *des produits non destinés à être consommés en l'état, qui sont ajoutés aux denrées alimentaires pour leur conférer une odeur et/ou un goût ou modifier ceux-ci. Ils sont issus ou constitués des catégories suivantes : substances aromatisantes, préparations aromatisantes, arômes obtenus par traitement thermique, arômes de fumée, précurseurs d'arôme ou autres arômes ou leurs mélanges. On entend par substance aromatisante une substance chimique définie possédant des propriétés aromatisantes. On entend par substance aromatisante naturelle une substance aromatisante obtenue par des procédés physiques, enzymatiques ou microbiologiques appropriés, à partir de matière végétale, animale ou microbologique prises en l'état ou après leur transformation pour la consommation humaine. On entend par précurseur d'arôme est un produit ne possédant pas nécessairement lui-même des propriétés aromatisantes ajouté intentionnellement à une denrée alimentaire dans le seul but de produire un arôme par décomposition ou par réaction avec d'autres composants pendant la transformation alimentaire* ».

Cette législation ne s'applique pas aux substances ayant exclusivement un goût sucré, acide ou salé ainsi qu'aux mélanges d'épices et/ou d'herbes fraîches, séchées ou surgelées, aux mélanges de thés et/ou infusions.

La croissance de l'industrie des arômes est estimée entre 4 à 6 % par an. Cette croissance est très largement liée au développement des Produits Alimentaires Intermédiaires (PAI) et à la mise sur le marché de toute une gamme d'aliments résultant de l'assemblage de ces produits alimentaires intermédiaires comme par exemple, le surimi aromatisé au crabe, à la langouste ou au homard, les desserts lactés à la vanille ou aux arômes de fruits, les sauces déshydratées prêtes à l'emploi (Crouzet, 1998).

Les composés d'arôme sont présents dans les aliments en très faibles quantités (10 à 15 mg/kg). Cependant, ils sont souvent présents en très grand nombre. On dénombre ainsi 360 composés dans l'arôme de fraise, plus de 600 dans celui du café et 850 dans celui du vin (Crouzet, 1998). Les composés d'arôme peuvent également être ajoutés pour compenser la perte pendant la fabrication, ou pour renforcer la note aromatique de l'aliment.

2.1.1 Définition et caractéristiques physicochimiques

Les composés d'arôme sont des molécules organiques de faible masse moléculaire (< 400 Da) dont la tension de vapeur à la pression atmosphérique et à la température ambiante est suffisamment élevée pour qu'elles se retrouvent en partie à l'état de vapeur dans l'atmosphère gazeuse et puissent, au contact de la muqueuse olfactive, provoquer un stimulus (Richard and Multon, 1992). Ces molécules appartiennent à différentes classes chimiques : alcools, éthers ou oxydes, aldéhydes, cétones, acides carboxyliques, esters, amines, amides, hydrocarbures et divers hétérocycles.

Plusieurs paramètres permettent de caractériser les composés d'arôme purs :

- L'hydrophobie

L'hydrophobie représente l'absence d'affinité d'un composé pour un milieu aqueux. Elle est souvent caractérisée par le log P, P étant le coefficient de partage du soluté entre l'eau et le n - octanol à température constante. Plus le composé a une hydrophobie élevée, plus la valeur de log P augmente. Une valeur négative indique le caractère hydrophile de la molécule (Seuvre, Goubet et al., 2002).

- La solubilité

La solubilité d'une molécule est son aptitude à former avec les molécules de solvant une phase homogène à une température donnée.

- La pression de vapeur saturante

La pression de vapeur saturante représente la volatilité d'une molécule à une température donnée. Plus un composé a une valeur de pression de vapeur saturante élevée, plus il se libérera aisément vers la phase vapeur.

2.1.2 Utilisation de solvants supports

Afin d'être incorporés dans les aliments à des concentrations acceptables pour le consommateur, les composés d'arôme sont dilués dans des solvants supports. Les plus couramment utilisés sont : l'éthanol, les huiles végétales, le propylène glycol et la triacétine (DGCCRF, 2006). Ils sont considérés comme des additifs alimentaires et sont donc soumis à réglementation. Par exemple, la teneur du propylène glycol (E1520) est limitée à 1 g/kg de denrée alimentaire (Journal officiel de l'Union européenne, 2008a). Le support de préparation aromatisant peut également être sous forme de poudre : lactose, sel, maltodextrines, gel de silice, amidons modifiés (Crouzet, 1998).

Le choix du solvant support va dépendre de la nature des composés d'arôme et de la nature de la matrice. Le choix du solvant n'est pas neutre vis-à-vis de la rétention des composés d'arôme. Belingheri, Ferillo et al. (2015) ont étudié l'impact du propylène glycol, de la triacétine et de triglycérides à chaînes moyennes sur la rétention de 10 composés d'arôme aux propriétés physicochimiques différentes (butyrate d'éthyle, α - pinène, camphène, myrcène, α - terpinène, γ - terpinène, cymène, β - ocymène, estragole, β - ionone) introduits dans une matrice amyliacée. Les études ont été faites en analyse sensorielle et par analyse de l'espace de

tête par microextraction sur phase solide (SPME, Solid Phase MicroExtraction). La rétention des composés d'arôme α - pinène, myrcène, α - terpinène, cymène, β - ocymène, estragol et β - ionone avec le propylène glycol est très faible en comparaison de la rétention obtenue avec les deux autres solvants supports. Un solvant de polarité similaire aux molécules présentes doit donc être choisi.

Une deuxième étude réalisée cette fois avec un composé d'arôme hydrophile, la diacétine, en présence de propylène glycol, de triacétine, de triglycérides à chaînes moyennes ou encore d'éthanol, confirme ces résultats (Belingeri, Curti et al., 2012). La rétention de la diacétine augmente avec la polarité du solvant utilisé. Les auteurs ont également suivi la stabilité de cette rétention à trois et six mois. À trois mois, la rétention diminue significativement de 50 % avec la triacétine et de 60 % avec les triglycérides à chaînes moyennes. Sur cette même période, cette rétention diminue également avec le propylène glycol et l'éthanol mais de façon moindre, respectivement de 15 % et 22 %. À six mois, la rétention de la diacétine avec le propylène glycol est équivalente à celle obtenue à trois mois. La polarité du solvant est donc un facteur clé pour la rétention des composés d'arôme et pour sa stabilité dans le temps.

En plus de leur interaction avec les composés d'arôme, les solvants supports de composés d'arôme ne sont pas neutres vis-à-vis de la matrice. De fortes interactions entre l'éthanol et l'amidon (Dries, Gomand et al., 2016) et entre le propylène glycol et l'amidon (Biais, 2006) ont été mises en évidence.

2.2 Techniques spécifiques de quantification des interactions entre l'amidon et les composés d'arôme

Les méthodes de mesure des interactions amidon - composés volatils peuvent être basées sur les propriétés physicochimiques des composés volatils. La libération des composés volatils est influencée notamment par des mécanismes thermodynamiques qui reposent sur le partage des composés d'arôme entre la matrice et la phase gazeuse sous des conditions d'équilibre (De Roos, 1994).

A l'équilibre gaz / matrice, le constituant i est présent dans les deux phases.

La pression partielle du composé i en solution (noté P_i) suit la loi de Henri (équation 2).

$$P_i = x_i \cdot \gamma_i \cdot P_i^S \quad \text{Équation 2}$$

Avec x_i représentant la fraction molaire du composé i dans la matrice

P_i^S représentant la pression de vapeur saturante du composé i

γ_i représentant le coefficient d'activité du composé i . C'est un coefficient sans dimension qui rend compte des forces de répulsion entre les molécules de soluté de même nature ou de nature différente, des interactions soluté - solvant, de l'effet des autres phases et des interfaces, de la température et de la pression. L'écart relatif par rapport à 1 mesure l'écart

du système par rapport à l'idéalité d'une solution. La mesure d'un coefficient d'activité égal à 1 traduit l'absence d'interactions entre les composés d'arôme et matrice.

La pression partielle du composé i dans la phase gazeuse (noté P_i) suit l'équation 3 en supposant que la phase gazeuse soit un gaz parfait

$$P_i = y_i \cdot P \quad \text{Équation 3}$$

Avec y_i représentant la fraction molaire du composé i dans la phase gazeuse

P représentant la pression totale dans le système (pression atmosphérique)

En combinant les équations 2 et 3, le coefficient d'activité γ_i est défini par l'équation 4.

$$\gamma_i = \frac{y_i}{x_i} \cdot \frac{P}{P_i^s} \quad \text{Équation 4}$$

Le rapport $\frac{y_i}{x_i}$ correspond au coefficient de partage vapeur / matrice exprimé en fraction molaire (Crouzet, 1998). À partir de l'analyse de la phase vapeur et de la phase liquide à l'équilibre, il est ainsi possible de calculer le coefficient de partage.

Différentes méthodes d'analyse de la phase vapeur, appelée également espace de tête, existent. Elles peuvent être classées en deux catégories (tableau 4).

Tableau 4 : Méthodes de mesure des coefficients de partage gaz / matrice.

| Méthodes d'analyse de l'espace de tête | | |
|--|---|---|
| Statiques | | Dynamiques |
| Directes | Indirectes | |
| Analyse de l'espace de tête (prélèvement gazeux ou SPME) | Méthode de variation du rapport de phase (PRV, Phase Ratio Variation) | Dilution exponentielle Analyse de l'espace de tête par la méthode « purge and trap » Spectrométrie de masse couplée à la réaction de transfert de proton - Spectrométrie de masse (PTR-MS) Spectrométrie de masse couplée à l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI-MS) |

Les méthodes utilisées sont statiques si la mesure est réalisée à l'équilibre thermodynamique, ou dynamiques si l'équilibre thermodynamique n'est pas atteint au moment de la mesure.

2.2.1 Méthodes statiques d'analyse de l'espace de tête

L'analyse de l'espace de tête à l'équilibre thermodynamique est la technique la plus commune et la plus simple. Une fois que l'équilibre thermodynamique est atteint, c'est-à-dire à partir du moment où l'équilibre entre les molécules en solution et les molécules dans la phase gazeuse est atteint, un volume donné de la phase vapeur est prélevé et analysé en chromatographie gazeuse (Arvisenet, 2001; Savary, 2006). Ainsi la quantité des composés d'arôme dans la phase gazeuse est connue. La détermination des coefficients de partage air / matrice permet de mettre en évidence les interactions qui peuvent exister entre un composé et les constituants d'un milieu. Cela se traduit par une diminution du coefficient de partage par rapport à la valeur obtenue dans l'eau. À l'équilibre thermodynamique, la structure et la texture n'ont plus d'effet sur la volatilité des composés d'arôme. Le coefficient de partage dépend alors uniquement de la composition de la matrice. Il est alors possible de calculer un pourcentage de rétention selon l'équation 5. Une valeur positive indique que le composé d'arôme est retenu par la matrice.

$$\text{Rétention} = \frac{K_{\text{eau}} - K_{\text{matrice}}}{K_{\text{eau}}} \quad \text{Équation 5}$$

Cette technique nécessite des échantillons assez concentrés. Depuis les années 1996, la microextraction en phase solide (SPME, Solid Phase MicroExtraction) est une technique de plus en plus utilisée pour analyser la phase vapeur (Murat, Gourrat et al., 2012; Nguyen, Lafarge et al., 2014). C'est une méthode d'extraction sans solvant qui respecte l'environnement et la structure des échantillons. Les composés sont extraits par adsorption sur une fibre de silice fondue revêtue d'un polymère (Burgot and Pellerin, 2003). L'extraction des composés à partir de l'espace de tête introduit un équilibre supplémentaire. Des études interlaboratoires ont été réalisées pour valider cette technique. Dans l'une d'entre elles, onze laboratoires américains et européens ont pris part à l'essai en analysant des échantillons de pesticides dont la concentration était de l'ordre de quelques parties par trillion (ppt). L'exactitude et les études de répétabilité / reproductibilité se sont révélées satisfaisantes. D'autres études de validation selon les normes ISO ont été conduites sur des composés organiques volatils dans l'eau par comparaison avec les méthodes normalisées : « purge and trap » et analyse de l'espace de tête en mode statique. La linéarité de la microextraction en phase solide est aussi bonne que celles obtenues avec les autres techniques (Alpendurada, 2000; Burgot and Pellerin, 2003).

Bien qu'indirecte, la méthode de variation du rapport de phase (PRV, Phase ratio volume) est encore plus simple à mettre en œuvre car il n'est pas nécessaire de réaliser le dosage des composés d'arôme contenus dans la matrice contrairement à la méthode de l'analyse de l'espace de tête décrite ci-dessus. De plus, il n'est pas nécessaire de réaliser une calibration externe du chromatographe en phase gazeuse. Cette méthode repose sur le fait que la concentration des composés d'arôme dans l'espace de tête varie en fonction du ratio

volumique phase gazeuse / phase matrice alors que le coefficient de partage reste constant (Savary, 2006). Par comparaison avec les performances de l'analyse de l'espace de tête en mode direct, la méthode de variation du rapport de phase s'est montrée plus précise (Athès, Peña y Lillo et al., 2004).

2.2.2 Méthodes dynamiques d'analyse de l'espace de tête

Le mode dynamique de l'analyse de l'espace de tête avec la technique « purge and trap » consiste en un balayage de la matrice par un gaz inerte. Les composés volatils entraînés par le gaz vecteur sont alors piégés à froid sur un piège à -120°C , puis le chauffage du piège désorbe les composés d'arôme. Leur quantification est alors faite par analyse chromatographique (Cayot, Taisant et al., 1998; Savary, 2006). Une étape de calibration est nécessaire de la même façon que pour l'analyse de l'espace de tête en mode statique.

La dilution exponentielle suit l'épuisement dans le temps du composé présent dans la matrice par balayage avec un gaz inerte. La concentration en composés d'arôme dans la phase gazeuse diminue de façon exponentielle en fonction du temps (Langourieux and Crouzet, 1994; Jouquand, Ducruet et al., 2006).

De nouvelles techniques d'analyse de l'espace de tête en mode dynamique ont été développées ces dernières années telles que la spectrométrie de masse couplée à la réaction de transfert de proton - Spectrométrie de masse (PTR - MS, Proton Transfert Reaction - Mass Spectrometry) (Tietz, Buettner et al., 2008) ou l'ionisation chimique à pression atmosphérique - Spectrométrie de masse (APCI - MS, Atmospheric Pressure Chemical Ionisation - Mass Spectrometry) (Aznar, Tsachaki et al., 2004). À partir des courbes de libération obtenues, des modèles mathématiques mécanistiques basés sur les équations de transfert de matière peuvent être appliqués. Le modèle de Harrisson et Hills est particulièrement adapté à la libération des composés d'arôme par des solutions macromoléculaires (Harrisson and Hills, 1997). De ce modèle, le coefficient de partage et le coefficient de transfert de masse peuvent être déduits (Lafarge, Bard et al., 2008).

Toutes ces techniques peuvent s'appliquer pour tous types de matrices. Par contre, pour l'étude des interactions dans des matrices peu hydratées, les mesures de sorption (Le Thanh, Thibeau et al., 1992), et la chromatographie inverse en phase gazeuse (Boutboul, Giampaoli et al., 2002) sont plus adaptées.

Toutes les méthodes citées dans le tableau 4 permettent de mettre en évidence et de quantifier les interactions physicochimiques entre les composés d'arôme et les autres constituants par la détermination d'un pourcentage de rétention ou d'une quantité de composés d'arôme fixés par la matrice, mais elles ne permettent pas d'identifier la nature des interactions mises en jeu. Les méthodes spectrales telles que l'analyse enthalpique différentielle, la diffraction des rayons X sont complémentaires et permettent d'identifier la nature des interactions mises en jeu. Elles seront abordées dans le chapitre suivant.

2.3 Structure moléculaire des complexes

2.3.1 Complexe amylose - composés volatils

Dans la littérature, différents types de Vamylose ont été décrits et caractérisés. Des complexes dont la structure est spécifique de l'agent complexant - l'iode (Bluhm and Zugenmaier, 1981), le diméthyle sulfoxyde (Winter and Sarko, 1974), l'hydroxyde de potassium (Sarko and Biloski, 1980) et le bromure de potassium - ont été décrits. Ces complexes possèdent une hélice simple gauche constituée de six résidus glucose par tour. Chaque structure de complexe est spécifique du ligand. Pour ces quatre complexes, l'agent complexant est à l'intérieur de la cavité de l'amylose.

Excepté ces quatre complexes spécifiques, le type Vamylose le plus connu et le plus décrit est le type Vh amylose (h = hydraté). L'amylose se présente en simple hélice gauche constituée de six résidus glucose par tour d'un diamètre externe de 13,5 Å (Buleon, Duprat et al., 1984; Brisson, Chanzy et al., 1991; Immel and Lichtenthaler, 2000). Des interactions hydrogènes intramoléculaires stabilisent l'hélice d'amylose. Une cavité hydrophobe, d'un diamètre interne de 5,4 Å (Immel and Lichtenthaler, 2000), est formée par l'arrangement des groupements (CH) hydroxyles vers l'intérieur et des groupements (OH) hydrophiles vers l'extérieur de l'hélice.

Trois autres structures cristallines ont été identifiées : Vbutanol, Visopropanol et Vnaphthol. Vbutanol, Visopropanol présentent également 6 résidus glucose par tour mais avec un espace inter - hélice variable. Vnaphthol présente une simple hélice avec huit résidus par tour.

Helbert (1994) a proposé une classification de ces complexes cristallins en deux familles appelées V6 et V8 dans lesquelles 6 et 8 représentent le nombre de résidus glucose par tour. Le type V6 est subdivisé en trois selon le mode de piégeage du ligand et de l'espace entre les hélices.

- Pour le type V6I (équivalent au type Vh), les ligands sont piégés seulement à l'intérieur de la cavité hydrophobe de l'hélice. Cette structure est induite par des molécules linéaires telles que les alcools linéaires, les acides gras qui sont alors inclus dans l'hélice (Le Bail, Rondeau et al., 2005). Cependant, le piégeage de la molécule dans l'hélice requiert une longueur minimale de la chaîne aliphatique (Godet, Tran et al., 1993). Les dimensions de la maille de type V6I diffèrent selon les auteurs : $a = 1,37 \text{ nm}$, $b = 2,37 \text{ nm}$, $c = 0,80 \text{ nm}$ selon Rappenecker et Zugenmaier (1981) ou $a = 1,37 \text{ nm}$, $b = 1,37 \text{ nm}$, $c = 0,80 \text{ nm}$ selon Brisson et al., (1991).
- Pour les types V6II (équivalent au Vbutanol), les ligands peuvent être piégés entre les hélices et dans les hélices (Escher, Nuessli et al., 2000; Rondeau-Mouro, Le Bail et al., 2004). En effet, à la différence du type V6I, dans la maille cristalline d'amylose de type V6II les simples hélices d'amylose sont séparées les unes des autres d'une distance de 3,1 Å permettant une inclusion de molécules entre les hélices (Helbert and Chanzy, 1994). Les dimensions de

la maille de type V6II sont : $a = 2,74$ nm, $b = 2,65$ nm, $c = 0,80$ nm (Helbert and Chanzy, 1994).

- V6III (équivalent au Visopropanol), les ligands peuvent être piégés entre les hélices et dans les hélices. La distance entre les simples hélices d'amylose est plus importante dans le type V6III par rapport au type V6II (Buléon, Delage et al., 1990). Les dimensions de la maille de type V6III sont : $a = 2,83$ nm, $b = 2,93$ nm, $c = 0,80$ nm (Buléon, Delage et al., 1990).

Rares sont les études portant sur le complexe type V8. Cette structure est caractérisée par un diamètre interne de l'hélice de 8\AA , pour une hélice à huit résidus glucose par tour. Ce diamètre interne plus important permettrait l'inclusion de ligand plus volumineux (Ruschmann and Solms, 1990). Les dimensions de la maille de type V8 sont $a = 2,28$ nm, $b = 2,28$ nm, $c = 0,78$ (Cardoso, Putaux et al., 2007).

Les trois grands types de complexes cristallins V6I, V6II, V6III présentent des spectres de diffraction des rayons X caractéristiques (figure 21) :

- Le type V6I est caractérisé par les angles 2θ ($\lambda = 1,54 \cdot 10^{-10}$ m) = $7,4^\circ$, $12,9^\circ$; $19,8^\circ$ et $22,4^\circ$.
- Le type V6II est caractérisé par les angles 2θ ($\lambda = 1,54 \cdot 10^{-10}$ m) = $7,3$; $9,4^\circ$, 12° ; $13,4$; $16,5$; 18 ; 20 ; $20,8$; $21,2$ et $22,1$.
- Le type V6III est caractérisé par les angles 2θ ($\lambda = 1,54 \cdot 10^{-10}$ m) = $6,9$; $8,8^\circ$, $9,6$; 10 ; $11,1$; $12,5$; 13 ; $15,2$; 17 ; $18,1$; $19,2$; $19,9$; $24,5$ et $25,2$ (Biais, 2006).

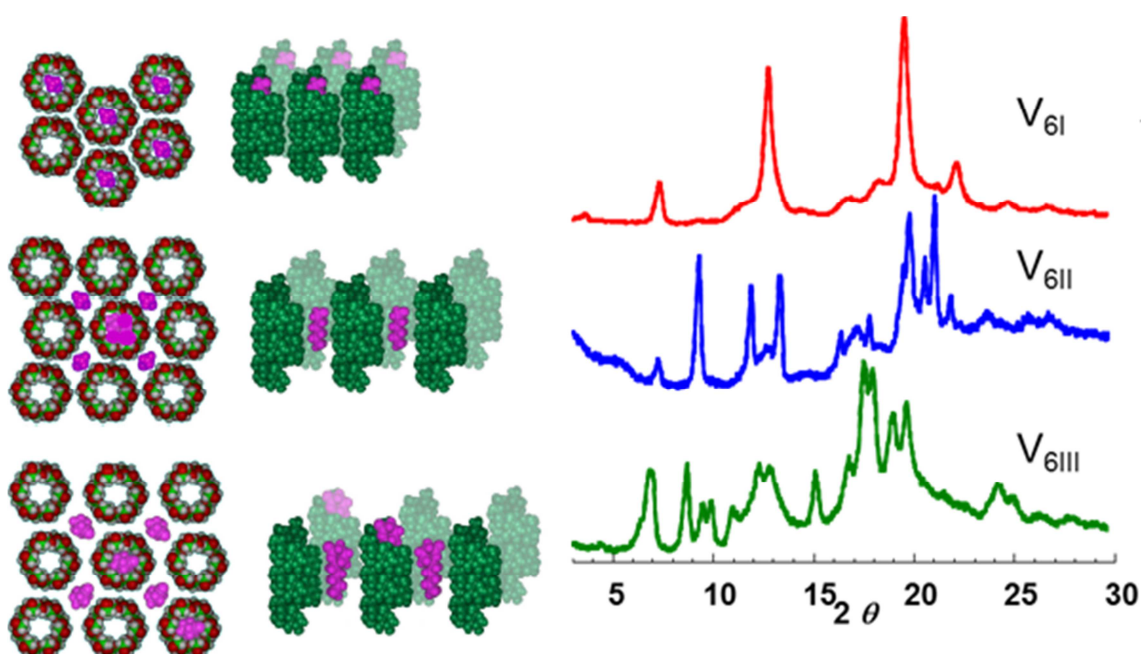


Figure 21 : Représentation schématique des complexes de type V6I, V6II et V6III et leur localisation inter et intra hélices (Biais, 2006)

Le tableau 5 recense quelques exemples de composés d'arôme complexant l'amylose de type V6I, V6II ou V6III. Un même composé d'arôme peut être caractérisé par différents types V-amylose selon les auteurs. Par exemple, le complexe « amylose – hexanal » a été caractérisé comme type V6I et V6II. Le complexe « amylose - hexanoate d'éthyle » a été caractérisé comme type V6II et V6III. Ces différences montrent que selon les conditions expérimentales (température, vitesse d'agitation, concentrations...) les ligands peuvent se comporter différemment avec l'amylose (Nuessli, Putaux et al., 2003; Biais, 2006; Itthisoponkul, Mitchell et al., 2007; Yeo, Thompson et al., 2016).

Tableau 5 : Exemples de ligands complexant l'amylose en type V6I, V6II ou V6III (Conde-Petit, Escher et al., 2006). Les ligands marqués avec * ont été mis en évidence par Jouquand, Ducret et al. (2006). Les ligands marqués avec ♦ ont été mis en évidence par Biais (2006).

| Type de V-amylose | Exemple de ligand |
|-------------------|---|
| V6I | Ethanol Décanal Hexanal Lactone Propylène glycol ♦ Acide décanoïque ♦ |
| V6II | Butanol Hexanal* 3-butène-1-ol* Hexanol* Hexanoate d'éthyle ♦ Acide hexanoïque ♦ |
| V6III | Isopropanol Menthone Fenchone Géraniol Thymol Linalol Hexanoate d'éthyle δ-decalactone ♦ |

Les types V6II et V6III peuvent se convertir en type V6I sous l'action du séchage (Le Bail, Rondeau et al., 2005). Biais (2006) a montré également lors des lavages des complexes par un mélange éthanol / eau que le type V6I était plus stable que les types V6II et V6III. Au cours des lavages, une transition du type V6II en V6I et du type V6III en V6I a été observée. Une partie des ligands entre les hélices est facilement éliminée au cours des lavages. Les molécules piégées entre les hélices semblent donc interagir moins fortement avec l'amylose que celles présentes à l'intérieur de l'hélice. L'auteur a également mis en évidence que le type V6I est moins sensible à l'hydrolyse enzymatique que les types V6II et V6III.

Rondeau - Mouro, Le Bail et al. (2004) ont montré que tous les complexes V6III, soumis à des lavages à l'éthanol, se comportaient de façon différente. Le complexe « amylose – linalol » de type V6III n'a pas été impacté par les lavages à l'éthanol (figure 22) alors qu'une transition du type V6III en V6I a été observée pour le complexe « amylose – menthone »

(figure 23). La stabilité du complexe « amylose – linalol » serait due à une association plus forte avec l'amylose que le complexe « amylose – menthone ».

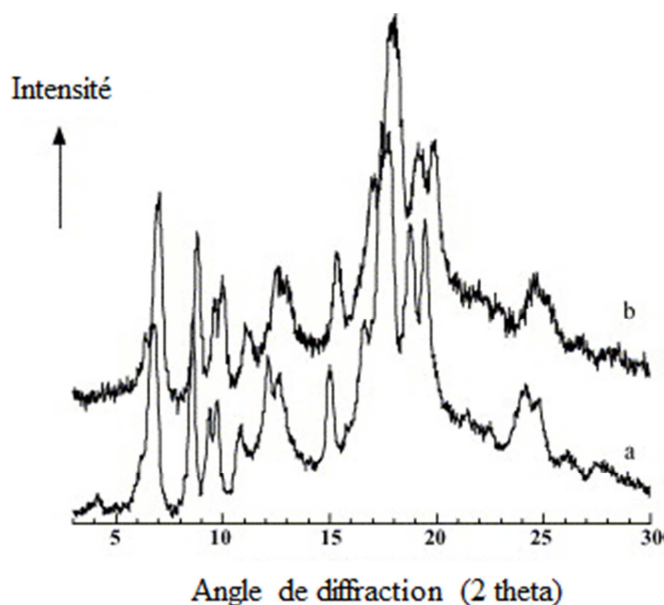


Figure 22 : Diagrammes de diffraction du complexe amylose – linalol conditionné par désorption à une $A_w = 0,75$ (a) et du complexe amylose – linalol lavé à l'éthanol avant d'être conditionné par désorption à $A_w = 0,75$ (b) (Rondeau-Mouro, Le Bail et al., 2004).

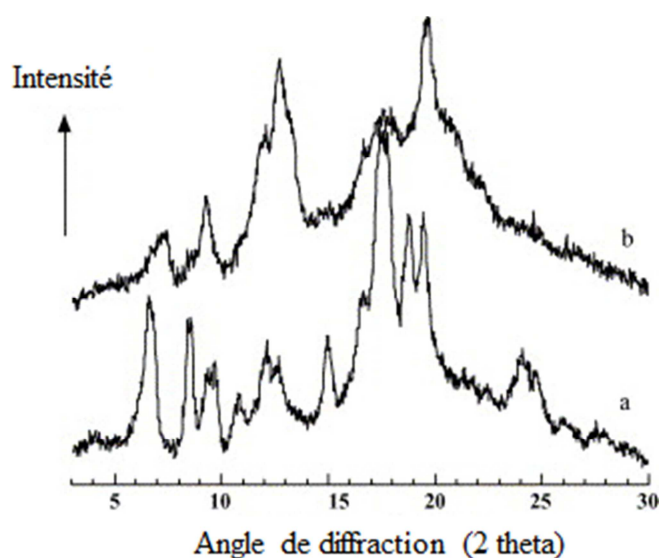


Figure 23 : Diagrammes de diffraction du complexe amylose – menthone conditionné par désorption à une $A_w = 0,75$ (a) et du complexe amylose – menthone lavé à l'éthanol avant d'être conditionné par désorption à $A_w = 0,75$ (b) (Rondeau-Mouro, Le Bail et al., 2004).

Les complexes d'inclusion se forment à partir de concentrations faibles en ligand. En effet, Osman-Ismaïl et Solms (1973) ont observé des précipités à des concentrations relativement

faibles variant de 0,2 à 4 g.L⁻¹ selon la nature des composés d'arôme, dans des suspensions d'amidon à 1 %. Cette concentration est propre à chaque composé d'arôme et correspond à la concentration nécessaire pour initier l'interaction entre les composés volatils et l'amylose (Yeo, Thompson et al., 2016). La fixation des premières molécules de ligand induit des changements de conformation de l'amylose augmentant l'affinité de celle-ci pour le ligand (Rutschmann and Solms, 1990b), et permettant la phase de propagation et de stabilisation de la conformation hélicoïdale. Selon Nuessli (1998), 50 à 100 mmoles de ligands par mole d'équivalent glucose sont nécessaires pour saturer les hélices.

Enfin, si toutes les conditions sont favorables à la complexation, la vitesse de cette réaction peut être très rapide (de l'ordre de quelques minutes ou dizaines de minutes). En revanche, la cristallisation est un phénomène nécessitant plusieurs heures (Biais, 2006).

Il existe toutefois des composés inaptes à former des complexes comme par exemple l'acétate d'éthyle (Arvisenet, Le Bail et al., 2002), ou le benzaldéhyde (Biais, 2006). Cette propriété dépend de la nature des molécules, de ses propriétés physicochimiques (polarité, taille). Kuge et Takeo (1968) ont montré que la majorité des alcools forment des complexes d'inclusion avec l'amylose. Les cétones et les aldéhydes ont des comportements variables. Ces résultats sont confirmés par les travaux d'Itthisoponkul, Mitchell et al. (2007). Les auteurs ont montré par analyse enthalpique différentielle que les alcools avaient une plus grande capacité à complexer l'amylose que les cétones. Leur capacité de complexation augmente avec l'allongement de la chaîne carbonée. Selon Kuge et Takeo (1968), la solubilité des ligands n'est pas le seul paramètre à prendre en compte pour déterminer la capacité de complexation, mais également l'hydrophobie des molécules. Yeo, Thompson et al. (2016) ont étudié comment l'hydrophobie, la solubilité et la concentration des composés d'arôme étaient liées aux complexes d'inclusion d'amidon de maïs à haute teneur en amylose. Les auteurs ont montré que la formation des complexes d'inclusion au sein de leur système d'étude était gouvernée par l'hydrophobie des composés d'arôme et la concentration critique en ligand, déterminées respectivement par la mesure des coefficients de partage octanol-eau et l'analyse de l'espace de tête. Même si le composé d'arôme présente une hydrophobie adéquate pour favoriser la complexation, une concentration critique en composés d'arôme (solubilité) est également nécessaire. Dans leur étude (figure 24), sur les neuf composés d'arôme testés, seuls le menthol, la menthone et le thymol avaient une concentration suffisante et une hydrophobie adéquate pour obtenir une forte rétention, associée à l'établissement de complexes d'inclusion.

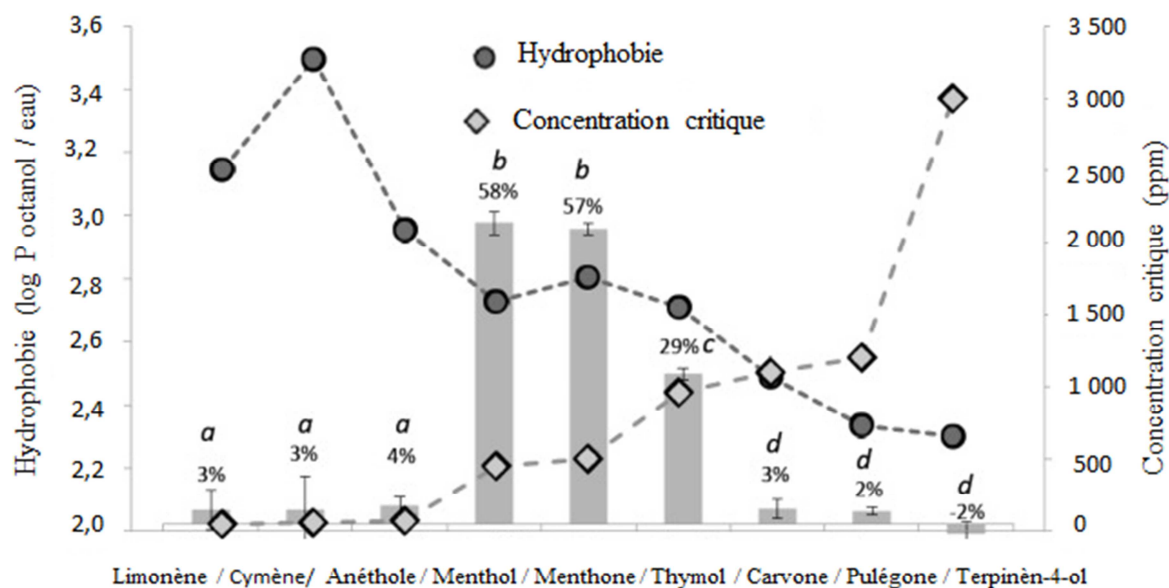


Figure 24 : Relation entre la rétention des composés volatils (barres), l'hydrophobie (log P, symbolisée par des ronds) et la concentration (µL/L, symbolisée par des losanges). Les lettres différentes indiquent une différence significative de rétention de composés d'arôme (Yeo, Thompson et al., 2016).

Ruschmann et Solms (1990d; 1990a) ont étudié la formation de complexes d'inclusion en système ternaire dans des dispersions d'amidon de pomme de terre à 1 % et en présence de deux ligands de natures différentes : soit deux composés d'arôme soit un mélange « de monostéarate de glycérol et de composé d'arôme ». Plusieurs comportements de complexation ont été observés : compétition (dans le cas du mélange « menthone – naphthol » et « menthone - monostéarate de glycérol ») et synergie (dans le cas du mélange « menthone - limonène » à concentrations équivalentes).

Les travaux de Pozo-Bayon, Biais et al. (2008) soulignent l'apparition de phénomènes compétitifs entre les composés d'arôme vis-à-vis de l'amylose. Les complexes « amylose - mélange d'acide décanoïque (type V6I) et δ - decalactone (type V6III) » ont été étudiés par analyse de diffraction aux rayons X. Différents ratios du mélange « acide décanoïque et δ - decalactone » ont été étudiés. Avec un mélange 50 / 50, la structure cristalline obtenue est de type V6I. Au-delà de 75 % et 85 % de δ - decalactone, la présence des deux composés d'arôme induit une structure de type V6II.

La co-complexation (comportement synergique) a été observée dans des dispersions d'amidon de maïs natif à haute teneur en amylose (Yeo, Thompson et al., 2016). La rétention du thymol et de la menthone en mélange était supérieure à la rétention de ces deux composés ajoutés seuls. Les auteurs ont également montré que le limonène ne formait pas de complexe d'inclusion avec l'amidon. Par contre, il formait des complexes lorsqu'il était ajouté en mélange avec la menthone ou le thymol. Le mécanisme proposé par les auteurs est présenté en figure 25. L'augmentation de la rétention du limonène en présence soit de la menthone ou du thymol pourrait être due à la présence de simples hélices stables en raison de la présence

de menthone ou thymol. Ces simples hélices seraient alors en mesure d'accueillir le limonène. Le limonène pourrait alors avoir une aussi forte affinité de liaison avec l'amidon que le thymol ou la menthone.

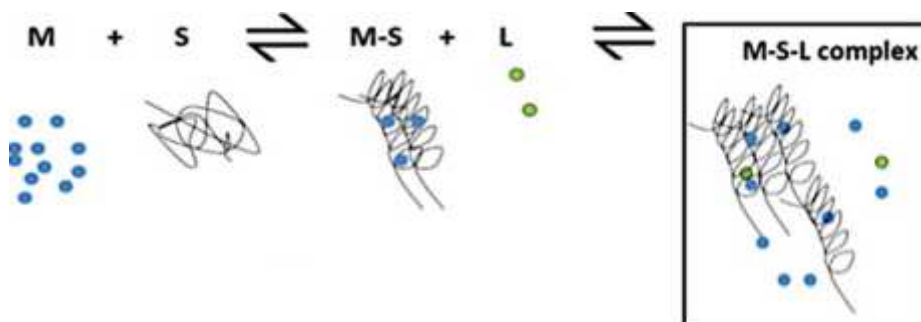


Figure 25 : Schéma hypothétique de l'établissement de complexes menthone – amidon – limonène. L = limonène, M = menthone ou thymol, S = amidon (Yeo, Thompson et al., 2016).

En revanche, Wulff, Avgeanki et al., (2005) ont montré que les complexes avec trois ligands pouvaient impacter la co-complexation. En effet, la quantité de molécules complexées en mélange était plus faible comparée à celle obtenue avec les molécules complexées individuellement. Les auteurs recommandent de préparer tous les complexes individuellement et de les mélanger ensuite pour obtenir le bouquet aromatique désiré. La même étude a été réalisée mais à des concentrations cent fois plus faibles (concentration « alimentaire ») (Tietz, Buettner et al., 2008). Aucune interaction compétitive, synergique ou antagoniste n'a été observée. Selon les auteurs, la concentration en ligand serait trop faible pour observer ce phénomène, le nombre de sites de liaison disponibles étant largement excédentaire dans ce cas.

Les complexes amylose - ligand peuvent également être mis en évidence par analyse enthalpique différentielle. Deux montées successives en température sont effectuées avec des rampes de l'ordre de 1 à 3°C/min. Un refroidissement est effectué entre les deux montées, généralement avec une rampe plus rapide, de l'ordre de 10°C/min. La formation de complexes amylose - composé d'arôme est thermoréversible, tout comme les complexes amylose - lipide (Biliaderis, Page et al., 1985; Le Bail, Rondeau et al., 2005). L'endotherme obtenu lors de la première montée en température est utilisé pour mettre en évidence la fusion de complexes pendant le process alors que l'endotherme obtenu lors de la deuxième montée en température montre la fusion des complexes formés lors du refroidissement. L'exotherme observé lors du refroidissement est utile pour étudier la recristallisation des complexes (Le Bail, Rondeau et al., 2005). Biliaderis et Galloway (1989) ont mis en évidence deux formes de complexes : le type I et le type II. La forme I correspondrait à la forme amorphe caractérisée par des températures de fusion à basse température (89-100°C) alors que le complexe de type II correspondrait à la forme cristalline caractérisée par des températures de fusion à plus haute

température (113-115°C). Ceci a été confirmé par la diffraction aux rayons X : le type I ne présente pas de diagramme caractéristique et correspondrait donc à des complexes à l'état amorphe.

Itthisoponkul, Mitchell et al. (2007) ont étudié les complexes d'inclusion d'alcools et de cétones dans une suspension d'amidon de tapioca. Selon la nature du composé d'arôme et les conditions expérimentales, des complexes de type I et II ont été mis en évidence. Un écart de température de fusion d'environ 10 à 30°C peut être observé entre le type I et le type II (Whittam, Orford et al., 1989; Itthisoponkul, Mitchell et al., 2007).

La diffraction aux rayons X et l'analyse enthalpique différentielle ne sont pas adaptées pour détecter les complexes amidon – composés volatils à faible niveau de complexation de l'amylose. C'est la raison pour laquelle de fortes concentrations d'arôme sont appliquées lors de ces analyses.

La localisation des ligands dans les complexes amylose - composés volatils est complexe. Selon Biais (2006), l'organisation du polymère d'amylose est semi-cristalline : alternance de régions semi-cristallines et de régions amorphes. Les régions semi-cristallines sont elles-mêmes constituées de lamelles cristallines et de lamelles amorphes (figure 26).

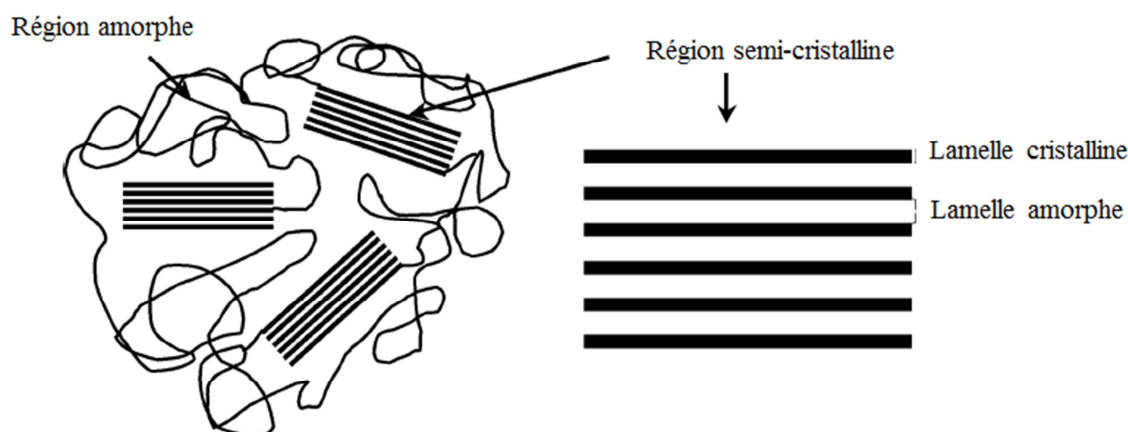


Figure 26 : Représentation schématique de l'organisation du polymère d'amylose (Biais, 2006)

Lorsque l'amylose est complexée avec un ligand, celui-ci est localisé soit dans les régions amorphes, soit dans les régions semi-cristallines. Dans ces dernières, le ligand peut être localisé dans les lamelles cristallines ou amorphes. Le schéma présenté en figure 27 résume les différentes localisations possibles du ligand dans l'une des régions semi-cristallines de l'amylose.

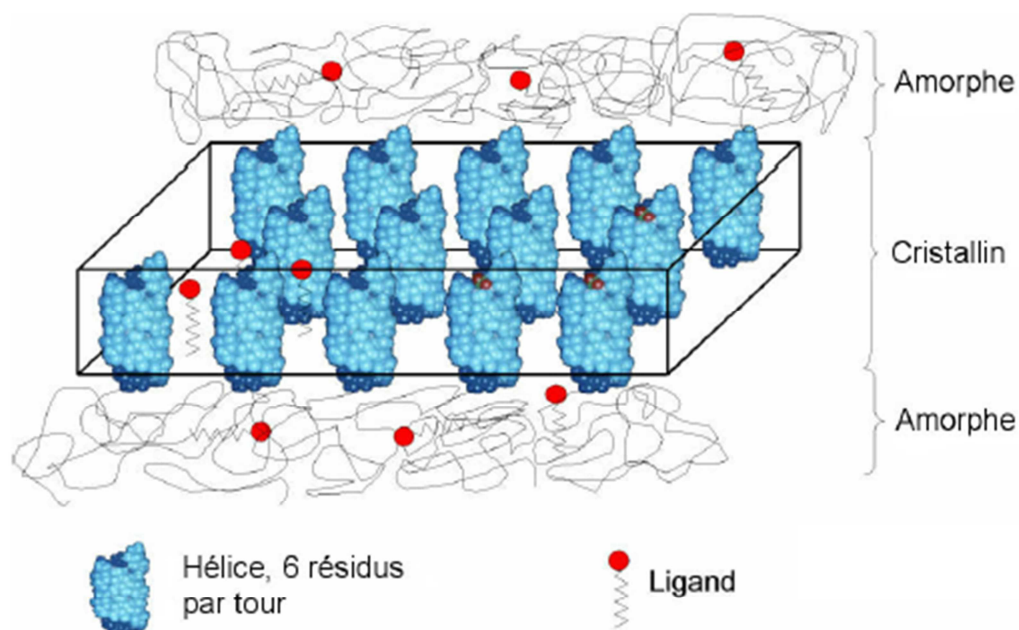


Figure 27 : Représentation schématique de complexes d'amylose et localisation possible des ligands dans l'amorphe, dans l'espace intra ou inter - hélices (Biais, 2006).

2.3.2 Complexe amylopectine - composés volatils

Bien que la complexation des ligands ait lieu principalement avec l'amylose, des interactions avec l'amylopectine ne sont pas à exclure. Eliasson et Ljunger (1988) ainsi que Gudmundsson et Eliasson (1990) ont montré, par analyse enthalpique différentielle, la formation de complexes entre l'amylopectine et un émulsifiant (sodium dodécyle sulfate, SDS). L'expérience a été réalisée à partir d'une suspension pure d'amylopectine. Cette complexation a été confirmée par la diffraction aux rayons X où les échantillons avaient une signature du type Vamylose. Cependant, la complexation ligands - amylopectine est restreinte dans un mélange mixte d'amylose et d'amylopectine. La complexation avec l'amylose s'établirait en premier. Cependant la complexation simultanément avec l'amylose et l'amylopectine n'est pas à exclure. Selon les auteurs, les branches externes de l'amylopectine prennent une structure hélicoïdale et forment des complexes d'inclusion avec les ligands. Ces conclusions rejoignent celles de Rutschmann, Heiniger et al. (1989) et Rutschmann et Solms (1990b). En étudiant l'inclusion de composé d'arôme avec l'amylose, ils ont remarqué la formation de liaisons supplémentaires de faible stabilité en présence de concentrations élevées en ligand. Ils ont émis l'hypothèse d'une inclusion de composé d'arôme à l'intérieur de branches externes non ramifiées de l'amylopectine.

Des complexes obtenus à partir de solutions pures d'amylopectine et d'émulsifiants ont été mis en évidence par analyse enthalpique différentielle (Gudmundsson and Eliasson, 1990). Ceci est en accord avec Heinemann, Escher et al. (2003) qui ont mis en évidence la présence de complexes entre des solutions pures d'amylopectine de pomme de terre et la

δ - dodécalactone par diffraction aux rayons X et mesures rhéologiques dynamiques. Cependant, les complexes d'amylopectine se formeraient moins facilement que les complexes d'amylose (Evans, 1986; Gudmundsson and Eliasson, 1990; Heinemann, Escher et al., 2003).

Morrison, Tester et al. (1993) affirment que l'interaction entre les ligands et l'amylopectine ne peut pas être de la nature des complexes d'inclusion. La taille des chaînes extérieures non ramifiées d'amylopectine est trop petite. Bien que ces chaînes puissent prendre une structure hélicoïdale, le nombre de tours formés serait insuffisant pour accueillir un ligand. De même, selon Nuessli, Handschin et al. (2000), les chaînes d'amylopectine sont en mesure de former des interactions avec les émulsifiants (monostéarate de glycérol), mais la nature de ces interactions reste à élucider.

D'autres études suggèrent l'existence d'interactions entre l'amylopectine et les ligands. Arvisenet, Le Bail et al. (2002) ont étudié la rétention du linalol, de l'hexanoate d'éthyle et de l'acétate d'éthyle par une suspension d'amidon de maïs cireux (pauvre en amylose, teneur en amylose d'environ 1 %). Leurs résultats suggèrent l'établissement d'interactions entre l'amylopectine et le linalol ou l'hexanoate d'éthyle. L'acétate d'isoamyle, connu comme étant une molécule non complexante de l'amidon, interagit également avec l'amylopectine. Les mêmes conclusions sur la probabilité d'interaction entre l'amylopectine et l'acétate d'éthyle ont été faites suite à une étude des interactions entre notamment l'acétate d'éthyle et l'amidon de maïs en utilisant la technique par dilution exponentielle (Langourieux and Crouzet, 1994). Par contre, par analyse enthalpique différentielle, aucune complexation avec l'amylopectine n'a été montrée dans une suspension d'amidon de maïs cireux en présence de n - octanol et de n - octyl acétate (Golovnya, Yuryev et al., 2001).

Pour conclure, une étude récente sur les propriétés de liaisons à l'iode des chaînes internes et externes de l'amylopectine a mis en évidence, qu'en présence d'iode, toutes les chaînes d'amylopectine prenaient une structure hélicoïdale. La complexation avec l'iode a été observée avec les chaînes internes et externes de la molécule d'amylopectine (Shen, Bertoft et al., 2013; Bertoft, Annor et al., 2016).

Comme nous venons de le voir, les composés d'arôme peuvent être piégés par complexe d'inclusion avec l'amylose. Ils se situent alors à l'intérieur de la cavité hélicoïdale ou dans l'espace entre les hélices. Les composés d'arôme sont aussi potentiellement piégés par l'amylopectine mais la nature des interactions mises en jeu reste à élucider. Des composés d'arôme peuvent également être présents dans les lamelles amorphes des complexes semi-cristallins. Des liaisons hydrogènes pourraient s'établir entre le groupe hydroxyle de l'amylose et les composés d'arôme (Arvisenet, Le Bail et al., 2002; Boutboul, Giampaoli et al., 2002).

2.4 Impact des interactions physicochimiques sur la rétention des composés d'arôme

Les interactions physicochimiques qui s'établissent entre un composé d'arôme et les constituants de la matrice sont des liaisons de faible énergie et réversibles. Ces interactions physicochimiques vont se traduire à l'échelle macroscopique par des modifications des équilibres thermodynamiques qui régissent certaines propriétés comme la volatilité, la solubilité, entraînant une modification de la perception sensorielle de l'aliment. Les principales interactions physicochimiques rencontrées entre les composés d'arôme et l'amidon sont :

- Les forces de Van der Waals. Elles sont de très faible énergie (0,8 à 2 kJ. mole⁻¹) et existent lorsque les atomes sont très proches. Ces forces génèrent un potentiel attractif entre les molécules. Les électrons qui circulent autour du noyau d'un atome créent des dipôles électriques. Ces dipôles électriques génèrent un champ électrique qui influence les électrons d'une seconde molécule (Adrian, Potus et al., 1995; Bauer, Badoud et al., 2010).
- Les interactions dipôle - dipôle appelées également interactions hydrogènes. Elles s'établissent entre un atome électronégatif (oxygène, azote) et un atome d'hydrogène (10 à 40 kJ.mol⁻¹). Les interactions hydrogène peuvent être intramoléculaires et intermoléculaires.
- Les interactions hydrophobes. Ce ne sont pas à proprement parler des liaisons. Les molécules apolaires fuient l'eau en s'agrégeant, expulsant ainsi les molécules d'eau de leur environnement immédiat. Ces interactions seront d'autant plus fortes que la quantité d'eau exclue sera importante (3 à 5 kJ.mol⁻¹). Les molécules apolaires s'associeraient par des liaisons de Van der Waals et les molécules d'eau s'associeraient par des interactions hydrogènes (Adrian, Potus et al., 1995; Bauer, Badoud et al., 2010).

Une autre hypothèse concernant la rétention des composés d'arôme est l'effet « structure des matrices ». En effet, la matrice alimentaire peut également interagir avec les composés d'arôme par des mécanismes physiques : « enfermement » des molécules d'arôme dans les mailles d'un réseau de macromolécules pour les matrices gélifiées. Plus le gel sera ferme et structuré, et moins la vitesse de libération des composés d'arôme sera importante (Roberts, Elmore et al., 1996). De même, l'augmentation de la viscosité d'une solution de polysaccharide gêne la mobilité des molécules d'arôme et entraîne une diminution de la vitesse de libération des composés d'arôme dans l'espace de tête (Pangborn and Szczesniak, 1974).

Les interactions physicochimiques spécifiques ou non entre les composés d'arôme et l'amidon et les propriétés physicochimiques des composés d'arôme gouvernent en partie la rétention des composés d'arôme.

L'influence des interactions entre l'hexanal, l'hexanol, le *t*-2-hexenal, l'2-hexanone (à faible concentration, 25 ppm) et une dispersion d'amidon de pomme de terre (3 %, m / m) a été étudiée en mesurant la rétention des composés d'arôme par la méthode de dilution

exponentielle (Jouquand, Ducruet et al., 2006). En parallèle, la mise en évidence de la complexation a été réalisée par analyse enthalpique différentielle et analyse de diffraction aux rayons X. L'étude a été réalisée sur des dispersions aromatisées avec un composé d'arôme. La rétention de l'hexanal, du *t*-2-hexenal et de l'hexanol est d'environ de 30 % alors que celle du 2-hexanone est faible (environ 10 %). Le 2-hexanone ne forme pas de complexe avec l'amidon de pomme de terre (type B). Ceci peut expliquer la faible rétention de ce composé d'arôme. Dans le cas de l'hexanol et de l'hexanal, ces deux composés forment des interactions avec l'amidon de pomme de terre (type V6II). Leur forte rétention pourrait être expliquée par ces complexes d'inclusion. Le *t*-2-hexenal a une faible affinité pour l'amylose. L'analyse en diffraction aux rayons X montre une signature de type B avec trace de V6I. La rétention de ce composé est équivalente à celle de l'hexanol et de l'hexanal. Ce résultat met en avant l'impact des interactions physicochimiques avec l'amylose (autres que des complexes d'inclusion) et/ou avec l'amylopectine.

Arvisenet, Le Bail et al. (2002) ont mesuré la rétention de l'acétate d'éthyle, de l'hexanoate d'éthyle et du linalol dans des gels à 7 % (m / m) d'amidon à teneurs en amylose différentes : amidon de maïs (26 % amylose), amidon de maïs cireux (1 % amylose) et amidon de maïs riche en amylose (58 % amylose). Les matrices ont été aromatisées uniquement avec un composé d'arôme. Dans les gels contenant de l'amylose, la rétention de l'hexanoate d'éthyle (type V6III) et du linalol (type V6III) sont significativement plus importantes que celle de l'acétate d'éthyle (non complexant, type B). Dans les gels contenant peu d'amylose, la rétention est significativement diminuée pour l'hexanoate d'éthyle et le linalol. Cette différence de rétention s'expliquerait par la formation des complexes d'inclusion entre l'hexanoate d'éthyle - amylose et le linalol - amylose. Néanmoins, la quantité retenue de composé n'est pas proportionnelle à la teneur en amylose de l'amidon. Les auteurs émettent deux hypothèses à ce phénomène : l'influence de la texture et/ou les interactions avec l'amylopectine.

L'influence de l'amylopectine et celle de la quantité d'amidon sur la libération de 20 composés volatils ont été étudiées par analyse de l'espace de tête à l'équilibre thermodynamique (Van Ruth and King, 2003). Pour cette étude, des gels d'amidon de pomme de terre à teneur variable (0 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 % et 5 % (m / v)) et de gels purs d'amylopectine de pomme de terre aromatisés avec 0,001 % (v / v) de chaque composé d'arôme ont été réalisés. Les auteurs ont montré qu'à la fois la nature du polysaccharide et sa concentration affectent significativement la libération des composés volatils. L'augmentation de la concentration en amidon de pomme de terre était corrélée avec une diminution du coefficient de partage, donc une meilleure rétention des composés d'arôme. Le phénomène inverse est observé avec l'amylopectine. L'amidon montre donc une meilleure rétention des composés d'arôme que l'amylopectine. Comme l'amidon de pomme de terre est composé de 80 % d'amylopectine et que les résultats obtenus avec des gels d'amylopectine pure montrent une faible rétention des composés volatils, les auteurs affirment que ce sont majoritairement les complexes « amylose – composés d'arôme » qui jouent un rôle dans la rétention des composés volatils par une matrice amyliée.

Pozo-Bayon, Biais et al. (2008) ont essayé d'établir le lien entre les interactions amidon - composé d'arôme et la cinétique de libération de ces composés d'arôme par analyse de l'espace de tête en mode dynamique (piégeage sur polymère Tenax®). Le modèle d'étude est un modèle complexe : une génoise aromatisée à 1 % (m / m) avec neuf composés d'arôme en mélange. La libération du butanoate d'éthyle est plus importante que celle de l'hexanoate d'éthyle. Cette différence s'expliquerait par la grande volatilité du butanoate d'éthyle comparée à celle de l'hexanoate d'éthyle ou par la capacité de complexation avec l'amylose de l'hexanoate d'éthyle en type V6II, contrairement au butanoate d'éthyle (non complexant, type B). Le cis-3-hexen-1-ol (type V6II) montre la même cinétique de libération que l'hexanoate d'éthyle (type V6II). Cependant, leurs profils de libération sont identiques à ceux de molécules non complexantes aux propriétés physicochimiques voisines, telles que l'acétoïne ou le cinnamate de méthyl. La libération du propylène glycol est nulle. Cela pourrait s'expliquer par sa complexation de type I avec l'amylose. La dihydrocoumarine (type V6III) et la vanilline (non complexant, type B) sont les deux composés d'arôme les plus rapidement libérés. La dihydrocoumarine est le composé d'arôme le moins retenu de tous. La capacité de complexation de la dihydrocoumarine avec l'amylose de signature V6III ne semble pas favoriser sa rétention. Cette étude met en lumière que la combinaison de plusieurs paramètres pourrait expliquer en partie la rétention de composés d'arôme : les propriétés physicochimiques des composés d'arôme et le type de complexation.

2.5 Impact de la structure des systèmes amylicés sur la rétention des composés d'arôme

En raison de ses propriétés technofonctionnelles, l'ajout d'amidon va augmenter la viscosité d'une solution et, à haute concentration, aboutir à un gel. Cette modification physique provoque une réduction de la libération des composés d'arôme. Plusieurs études traitent de l'impact de la structure et de la texture sur la libération des composés d'arôme.

Boland, Buhr et al. (2004) ont suivi la libération de 11 composés d'arôme par analyse de l'espace de tête en mode statique en faisant varier la texture des matrices par des formulations différentes. La libération des composés d'arôme est significativement affectée par la texture des gels : les gels les plus rigides montrent la plus faible rétention. Les deux gels de textures similaires mais de compositions différentes (pectine et amidon) montrent des différences de libération. Les composés d'arôme hydrophiles sont davantage libérés dans les gels de pectines que dans les gels d'amidon alors que l'opposé est observé pour les composés hydrophobes. Ces différences sont attribuées aux interactions physicochimiques entre les composés d'arôme et la matrice dans les gels d'amidon et dans les gels de pectine.

Cayot, Pretot et al. (2004) et Arvisenet (2001) ont étudié la libération de l'acétate d'isoamyle à partir de dispersions d'amidon de maïs standard (21 % amylose) et de dispersions d'amidon de maïs cireux (1 % amylose). Ce composé volatil est connu pour ne pas complexer avec l'amidon. La vitesse de libération de l'acétate d'isoamyle est plus faible dans les matrices à base d'amidon de maïs standard. Ceci s'explique par les propriétés rhéologiques des deux dispersions : l'amidon de maïs standard forme des gels fermes alors que l'amidon de maïs

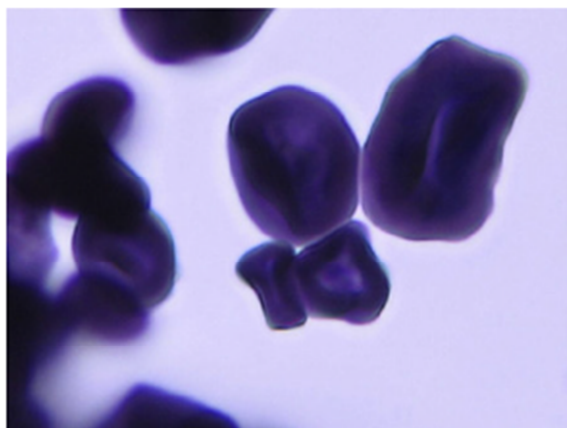
circieux forme des solutions très visqueuses. La formation d'un réseau gélifié d'amylose limiterait la mobilité de l'acétate d'éthyle. Une relation positive entre la teneur en amylose d'un amidon et la rétention de l'acétate d'isoamyle a également été mise en évidence.

L'impact de la structure de dispersion d'amidon de maïs sur la libération du linalol (type V6III) et de l'acétate d'isoamyle (non complexant, type B) a été étudié par Lafarge, Bard, et al. (2008). L'application d'un cisaillement additionnel en cours de process a permis d'obtenir des matrices de structures différentes sans en modifier la formulation. Ce cisaillement additionnel a induit une rupture des grains d'amidon engendrant une solubilisation totale de l'amylose et partielle de l'amylopectine. Ceci a pour conséquence une augmentation de la viscosité de la phase continue. La rétention du linalol est constante quelle que soit la structure des systèmes. Par contre, la rétention de l'acétate d'isoamyle varie suivant la structure de la matrice. La libération de l'acétate d'isoamyle de la suspension soumise au cisaillement additionnel est significativement plus faible que celle de la suspension non soumise au cisaillement additionnel. L'augmentation de la teneur en matière sèche de la phase continue en raison du cisaillement additionnel affecte la mobilité de l'acétate d'isoamyle. La rétention de l'acétate d'isoamyle semble donc liée à la structure de la matrice.

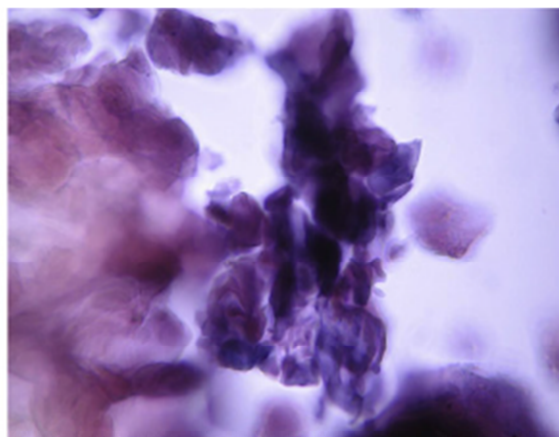
2.6 Influence des interactions physicochimiques sur la structure des matrices amyliées

Les interactions amidon – ligand sont connues pour affecter la gélatinisation et la rétrogradation de l'amidon.

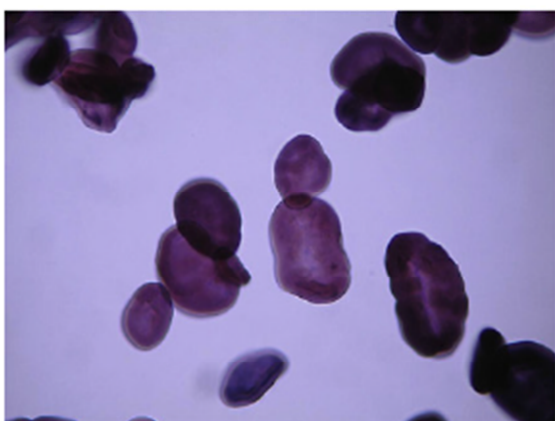
Vasiliadou, Raphaelides et al. (2015) ont étudié l'impact du moment d'ajout d'un acide gras à des dispersions d'amidons de maïs à haute teneur en amylose (70 % amylose). Le ligand a été ajouté soit avant le chauffage de l'échantillon soit après. Les auteurs ont montré que l'ajout de ligand en début de process diminue le gonflement des grains d'amidon et par conséquent moins d'amylose est solubilisée et la viscosité des empois diminue. Par contre, si le ligand est ajouté en fin de process, la viscosité de la suspension est intermédiaire entre celle du témoin et celle de la matrice où le ligand est ajouté avant le chauffage. Selon les auteurs, comme les complexes amylose - ligand occupent un plus petit volume hydrodynamique, la viscosité est réduite. Des suspensions d'amidon de maïs - acide stéarique (C18:0) ou d'amidon de pois - acide stéarique (C18:0) ont été préparées en ajoutant l'acide gras en début ou en fin de chauffage (Exarhopoulos and Raphaelides, 2012). L'observation au microscope optique après coloration des matrices avec une solution d'iode (figure 27) montre pour les deux amidons que l'ajout des ligands en début de process retarde la destruction du grain d'amidon, ce dernier étant moins gonflé. Selon Eliasson (1985), la complexation amidon - acide gras tend à former un film insoluble à la surface des grains d'amidon retardant ainsi le transfert d'eau vers le grain d'amidon et son gonflement.



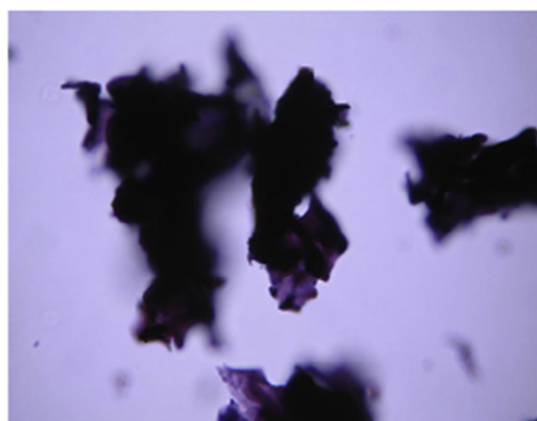
Amidon de maïs standard – 85°C – ajout C18 avant chauffage



Amidon de maïs standard – 85°C – ajout C18 après chauffage



Amidon de pois – 85°C – ajout C18 avant chauffage



Amidon de pois – 85°C – ajout C18 après chauffage

Figure 28 : Observations microscopiques de suspensions d'amidon de maïs standard ou d'amidon de pois suite à un traitement thermique à 85°C. L'acide stéarique (C18) a été ajouté avant le chauffage ou après le chauffage. Les matrices ont été colorées avec une solution d'iode (Exarhopoulos and Raphaelides, 2012).

Par analyse de diffraction aux rayons X, Vasiliadou, Raphaelides et al. (2015) et Chang, He et al. (2013) ont mis en évidence une cristallinité plus importante dans les matrices où le ligand a été ajouté en fin de process par comparaison avec un ajout en début de cuisson. Dans ces deux études, le ratio amidon / ligand est compris entre cinq et six. Par contre, Exarhopoulos et Raphaelides (2012) ont montré l'inverse : les matrices où le ligand a été ajouté en début de chauffage montraient une meilleure cristallinité. Dans cette étude, le ratio amidon / ligand est de deux. Les trois études montrent que le moment d'ajout de ligand impacte la structuration des matrices. Actuellement aucun consensus n'est établi mais le ratio amidon / ligand semble jouer un rôle.

Escher, Nuessli et al. (2000) ont montré que des concentrations élevées en ligand modifiaient les propriétés rhéologiques des dispersions aqueuses d'amidon. Cette complexation amidon - ligand avec de fortes concentrations en ligand a également une influence sur les

propriétés colloïdales de dispersions d'amidon. Cela se manifeste visuellement sur l'apparence des dispersions d'amidon (Nuessli, 1998). En effet, suivant la nature du ligand, l'apparence visuelle et les propriétés rhéologiques d'une suspension d'amidon de pomme de terre à 2 % varient. Les ligands ont été ajoutés en excès selon leur concentration critique respective. La concentration critique correspond à la concentration à laquelle toute l'amylose est saturée. Cette valeur a été déterminée par la méthode de capacité de liaison à l'iode. Trois types de comportements rhéologiques, confirmés par analyse rhéologique dynamique, ont été obtenus. La référence, dépourvue de ligand, est transparente et liquide (figure 28).

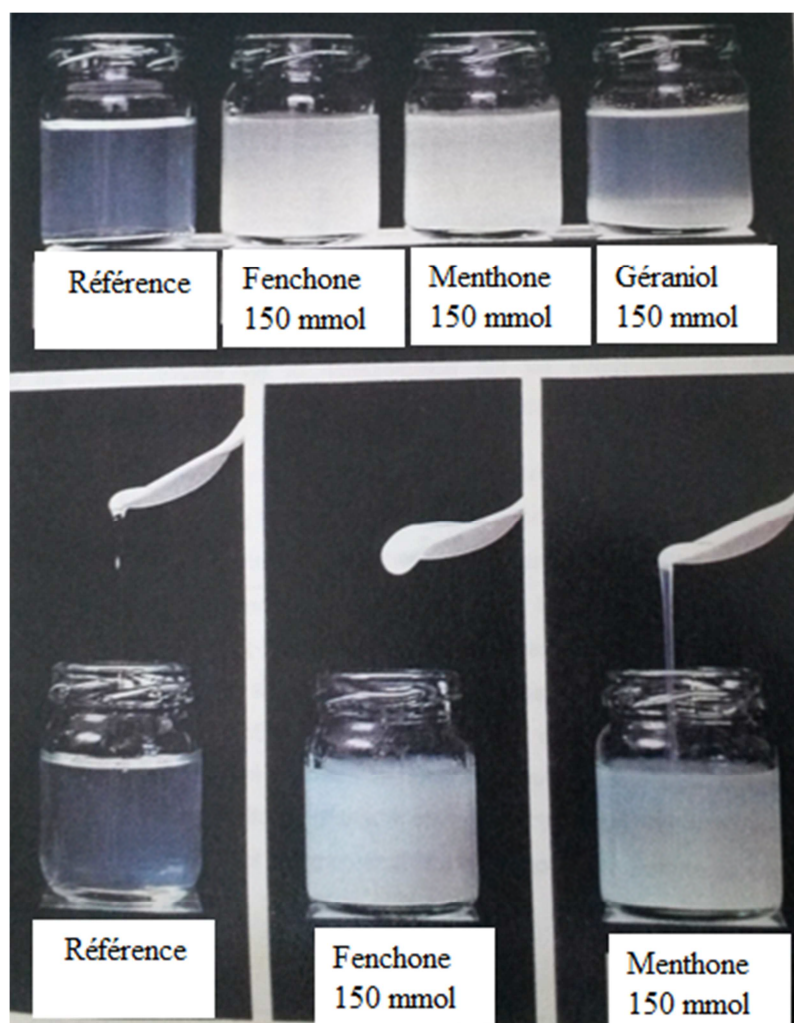


Figure 29 : Apparence de dispersions d'amidon de pomme de terre à 2 % non complexé et complexé avec soit de la fenchone, de la menthone, ou du géraniol. Les ligands ont été ajoutés en excès par rapport à leur concentration critique respective (Nuessli, 1998).

L'échantillon contenant le fenchone se comporte comme un gel faible. La dispersion riche en menthone présente les mêmes caractéristiques rhéologiques que la référence (liquide). Cependant, en raison de la complexation, la suspension est trouble. Une séparation de phase est observée dans les dispersions complexées avec le géraniol. En se plaçant à une autre

échelle d'observation, les analyses par diffraction aux rayons X ont confirmé l'existence de complexes d'inclusion de type V pour les trois composés d'arôme testés.

Toujours dans des conditions d'excès de ligand, les complexes « amidon de pomme de terre – lactone » ont été étudiés à un niveau microscopique. La complexation a permis la formation d'une structure cristalline de forme sphérique : les sphérulites. Ce sont des structures supramoléculaires bien organisées, composées d'amylose, et pouvant atteindre des tailles de 100 μm . Elles sont constituées d'empilements de nombreux cristaux lamellaires, chaque cristal étant séparé par une mince couche intermédiaire amorphe (Conde-Petit, Escher et al., 2006). Selon les auteurs, les sphérulites sont vraiment spécifiques de la complexation amylose – ligand puisqu'ils n'existent pas dans les suspensions d'amidon en absence de ligand. La croissance et la forme des sphérulites est contrôlée par la concentration du ligand, la concentration de l'amidon et les conditions expérimentales (température, cinétique de chauffage et de refroidissement) (Heinemann, Escher et al., 2003; Bhosale and Ziegler, 2010). La formation des sphérulites est également possible dans une matrice complexe de type crème dessert composée de saccharose, de protéine de lait écrémé et d'amidon (Heinemann, Zinsli et al., 2005). Cependant, des sphérulites ont été observés en absence de ligand. En effet, Ziegler, Nordmark et al., (2003) ont démontré que des dispersions d'amidons (10 à 20 % (m/m)) de type B ou C formaient facilement des sphérulites suite à un traitement thermique. Par contre, aucune sphérulite n'a été observée dans les dispersions d'amidons de type A (maïs cireux, avoine, riz, tapioca). Le développement des sphérulites est favorisé dans les amidons riches en amylose. Enfin, la forme et la taille des sphérulites varient selon l'origine botanique de l'amidon. La dispersion d'amidon d'haricot mungo (type C) présente des sphérulites de taille uniforme (10-30 μm) avec de faible agglutination alors que la dispersion d'amidon de pomme de terre présente des sphérulites de tailles variés et agglutinées.

À des concentrations en ligand de niveau alimentaire, c'est-à-dire 50 à 100 fois plus faibles que dans les études précédentes, Lafarge, Bard et al. (2008) ont montré que l'ajout d'acétate d'isoamyle (non complexant) à une suspension d'amidon de maïs ne modifie ni les propriétés rhéologiques des empois d'amidon, ni les propriétés intrinsèques du grain d'amidon (indice de gonflement et indice de solubilité). Par contre l'ajout de linalol (complexant de l'amylose) modifie les propriétés d'écoulement des empois et les propriétés rhéologiques des gels lors de la rétrogradation. Les matrices contenant du linalol sont moins bien structurées. Les interactions linalol – amylose perturberaient voire ralentiraient la réorganisation de l'amylose non complexée lors de la gélification et/ou de la rétrogradation.

L'influence des interactions physicochimiques sur la structure a également été étudiée sur des matrices complexes de type crème dessert, constituées de saccharose, de poudre de lait écrémé et d'amidon (7 % (m / m)). Différents types d'amidon de teneurs en amylose variables ont été testés : amidon de maïs standard, amidon de pomme de terre, amidon de maïs cireux et amidon de maïs modifié. L'impact de l'ajout de limonène (complexant), de vanilline (non complexant), de linalol (complexant) et d'acétate d'isoamyle (non complexant) sur les propriétés rhéologiques des suspensions a été mesuré par différents tests rhéologiques : pénétrométrie, compression à la fracture et mesure de viscosité (Cayot, Lafarge et al., 2000; Arvisenet and Cayot, 2001). Aucun impact de l'ajout de ligand n'a été mis en évidence,

excepté avec le linalol. En effet, la fermeté des matrices a été accentuée par la présence des complexes « amidon - linalol ». Par contre, lors d'un vieillissement accéléré des crèmes desserts par une succession de trois cycles de congélation / décongélation, seul l'acétate d'isoamyle a ralenti l'apparition de la rétrogradation (Cayot, Lafarge et al., 2000). Les auteurs mettent en avant les interactions amylopectine - acétate d'isoamyle pour expliquer ce résultat. À l'opposé, lors d'un vieillissement naturel sur 18 jours, la quantité de synérèse dans les matrices non aromatisées augmente significativement et linéairement avec la durée. Les mêmes résultats sont observés pour les matrices aromatisées avec l'acétate d'isoamyle et l'hexanoate d'éthyle. Par contre, la présence de linalol a retardé de 48 heures l'apparition de synérèse. Les interactions linalol - amidon semblent modifier la vitesse de rétrogradation de l'amylopectine plutôt que celle de l'amylose qui se déroule en quelques heures (Arvisenet and Cayot, 2001).

Nous venons de voir que la rétention des composés d'arôme est largement influencée par la nature et la concentration en composé d'arôme, par les interactions physicochimiques (spécifique ou non) et la structure de la matrice. Il est difficile de dissocier ces phénomènes. De plus, l'ajout de composés d'arôme impacte la gélatinisation et la rétrogradation de l'amidon. Ces différences de résultats montrent également l'importance des concentrations d'amidon et de ligand mises en œuvre, aboutissant à des cinétiques de complexations différentes. Ces dernières sont propres à chaque ligand et dépendantes des conditions opératoires. Il semblerait en effet qu'indépendamment de la concentration en ligand, ce dernier se comporte comme agent de nucléation (Tietz, 2007). Une étude réalisée sur 24h, 48h et 90h montre qu'il faut du temps pour atteindre l'équilibre de la complexation des hélices d'amylose et la mise en place d'une structuration stable (figure 29).

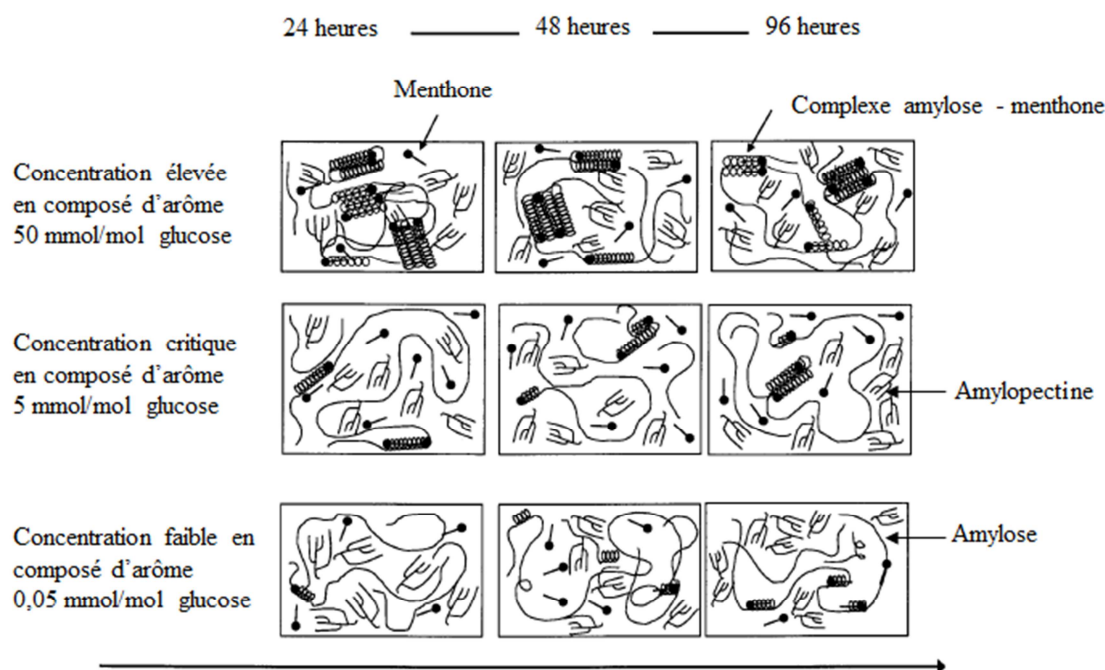


Figure 30 : Dépendance temporelle de la structure d'amidon de tapioca complexé selon la concentration en menthone (Tietz, 2007).

Une vue d'ensemble de l'influence des interactions amidon - composé d'arôme à différents niveaux d'organisation (moléculaire, microstructure, macrostructure) selon différents niveaux de concentration en menthone (complexant de type V6III) a été proposée par Tietz (2007). La concentration critique pour la menthone est de 5 mmol/mol d'équivalent glucose. Ce schéma (figure 30) est transposable à d'autres composés d'arôme en ajustant la concentration critique propre à chaque ligand.

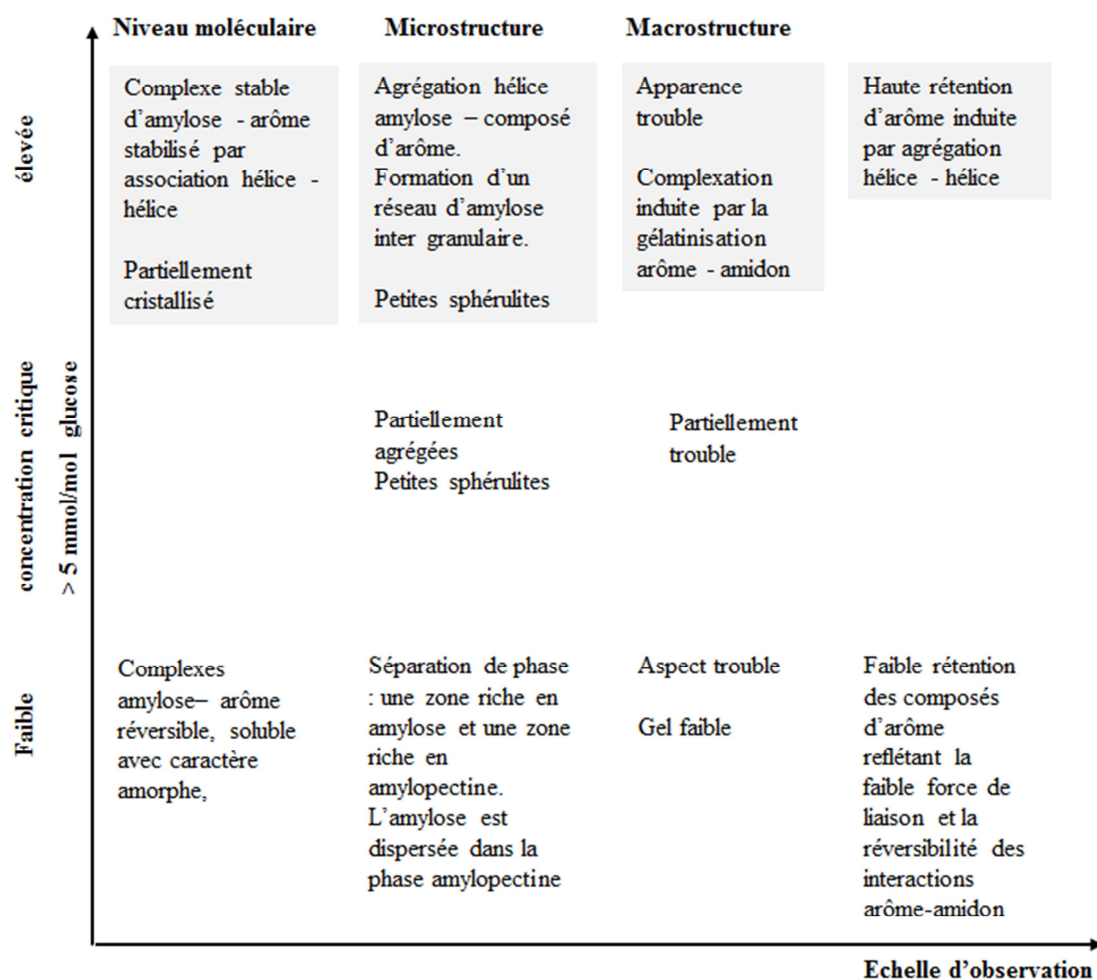


Figure 31 : Vue d'ensemble de l'influence des interactions amidon - composé d'arôme à différents niveaux d'organisation (moléculaire, microstructure, macrostructure) selon différents niveaux de concentration en menthone (complexant de type V6III) (Tietz, 2007).

À des concentrations en ligand supérieures à la concentration critique, les complexes « amylose – ligand » formés sont stables en raison de l'agrégation des hélices d'amylose. Cette agrégation tend à former des structures ordonnées partiellement cristallines avec présence de sphérulites. Cette structuration favoriserait la rétention des composés d'arôme. Les complexes ont une faible solubilité dans l'eau. En conséquence directe, les complexes « ligand – amylose » forment un réseau intergranulaire qui tend à gélifier et la turbidité de l'échantillon s'accroît.

À des concentrations en ligand inférieures à la concentration critique, les complexes formés ont une structure peu ordonnée. La liaison « composé d'arôme – ligand » est réversible, ce qui contribue à augmenter la libération des composés d'arôme. Les échantillons ont une apparence trouble mais non opaque. Ceci confirme que même à faible concentration en ligand, comme celle utilisée dans les aliments, des réarrangements structurels ont lieu.

2.7 Stabilité des complexes

En vue d'applications industrielles, un paramètre important est la stabilité des complexes « amidon – ligand » dans le temps.

Wulff, Avgeanki et al. (2005) ont étudié la stabilité de complexes d'inclusion « amylose – hexanal ». Les complexes ont été obtenus par précipitation puis déshydratation. Les complexes obtenus sont stables aux températures ambiantes et à des A_w inférieures à 0,5 pendant un an. Aucune dégradation oxydative n'a été observée. Ainsi, le stockage, sous ces conditions, offre une bonne protection contre l'oxydation et l'évaporation des composés d'arôme. Les tests de stabilité réalisés à une A_w de zéro montrent une libération des composés d'arôme à partir de températures supérieures ou égales à 80°C (figure 31). Par contre, si les complexes sont dilués dans de l'eau (solution aqueuse à 9 % (m/v)), une libération rapide des complexes est observée dès 30°C (figure 32).

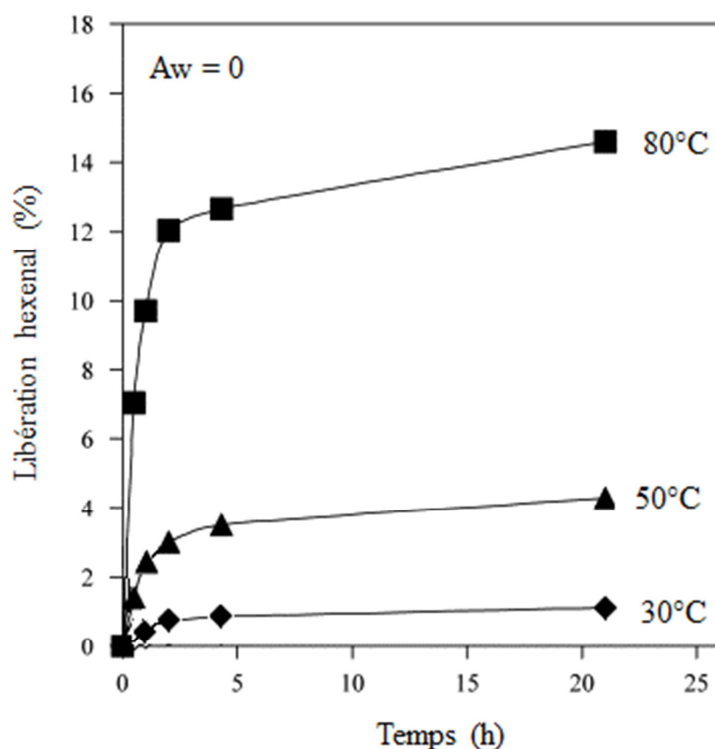


Figure 32 : Libération de l'hexanal à partir de complexes d'inclusion d'amylose sous différentes conditions : 30°C, 50°C et 80°C et mesurée à une $A_w = 0$ (Wulff, Avgeanki et al., 2005).

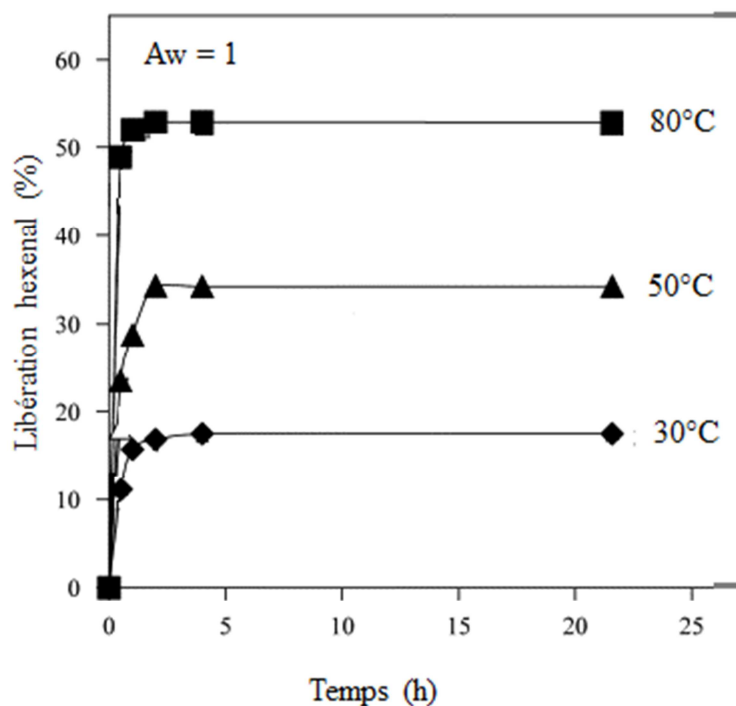


Figure 33 : Libération de l'hexenal à partir de complexes d'inclusion d'amylose sous différentes conditions : 30°C, 50°C et 80°C et mesurée à une $A_w = 1$ (Wulff, Avgeanki et al., 2005)

La stabilité du complexe menthone avec un amidon à haute teneur en amylose (70 % d'amylose) et du complexe menthol avec le même amidon a été testée sous différents pH, températures et durées de stockage (Ades, Kesselman et al., 2012). Ces complexes de type V6I ont été obtenus par précipitation puis lyophilisation. Pour l'étude de l'effet du pH, les complexes lyophilisés ont été réhydratés dans diverses solutions tampons de pH 3, 5, 7,2 ou 8. La stabilité a été étudiée pendant 4 heures. Aucune variation n'est observée. Pour l'étude de l'impact de la température, les complexes ont été réhydratés dans une solution tampon de pH 7,2 et soumis à 4°C, 25°C, 50°C, 80°C pendant 4 heures. À partir de 80°C, les complexes ne sont plus stables. Ces résultats montrent qu'un stockage à 4°C n'est pas nécessaire pour préserver la stabilité des complexes à pH 7,2. La limite de stabilité à 80°C confirme les travaux cités précédemment de Wulff, Avgeanki et al. (2005). La stabilité à 80°C des complexes réhydratés à pH 7,2 est un atout pour de potentielles applications agroalimentaires (par exemple stabilité lors d'une pasteurisation). Enfin, la stabilité des complexes sur 120 jours a été étudiée à différentes A_w (0, 0,32 et 0,53) et à différentes températures (4°C et 25°C). Quelles que soient les conditions, le complexe avec de la menthone est stable pendant 120 jours alors que le complexe avec du menthol reste stable sur la même période uniquement à une A_w de 0,53. Le menthone forme des complexes plus stables avec l'amidon que le menthol. Les mêmes stabilités au pH et à la température ont été obtenues avec le même type d'amidon et un ligand de type V6III (Cohen, Orlova et al., 2008). Le polymorphisme des complexes d'inclusion formés ne semble pas impacter la stabilité des complexes lors de modifications de pH ni de température.

Des complexes d'inclusion avec du thymol et du géraniol et de l'amidon modifié ou de la β - cyclodextrine ont été obtenus par lyophilisation. Aucune dégradation oxydative du thymol ni du géraniol n'a été observée par analyse enthalpique différentielle, quel que soit le polymère testé (Mourtzinou, Kalogeropoulos et al., 2008).

L'efficacité de l'encapsulation par divers matériaux (paroi de levure, β - cyclodextrine, amidon modifié) pour protéger la curcumine des dégradations dues à la chaleur, à la lumière et à l'oxygène, a montré que tous les matériaux testés protègent la curcumine contre l'oxydation dans des environnements à humidité relative élevée. La cellule de levure offre une meilleure protection que l'amidon et β - cyclodextrine contre les détériorations dues aux réactions photochimiques et à la chaleur (Paramera, Konteles et al., 2011). À nouveau, dans cette étude, les complexes étaient sous forme de poudre. Aucune étude sur la stabilité des complexes d'inclusion amidon – composés d'arôme dans des matrices à forte teneur en eau n'a été trouvée.

3 Conclusion de la synthèse bibliographique

Le glucomannane de konjac, classé comme épaississant E425 (ii) a la propriété de développer de fortes viscosités en raison de sa capacité de rétention d'eau nettement supérieure aux autres polysaccharides utilisés en industrie agroalimentaire. Le glucomannane de konjac a un grand potentiel en tant que matériau d'encapsulation de composés aromatisants. Sa capacité de rétention de composés aromatisants est comparable à celles des matériaux d'encapsulation couramment utilisés lors des process d'atomisation, comme la gomme arabique ou la maltodextrine.

L'amidon est également fréquemment utilisé comme matériau d'encapsulation des composés aromatisants. Notamment, l'amidon a la propriété de créer des complexes amylose - ligand avec certains ligands. Ces complexes sont réversibles. Ils peuvent être formés pendant la gélatinisation de l'amidon ou lors du refroidissement et à partir de concentrations faibles en ligand. Une caractéristique essentielle des complexes « amylose – ligand » est la formation d'une simple hélice d'amylose enroulée à gauche, stabilisée par interactions hydrogènes, et connue sous le nom Vamylose. Il existe différents types de structures pour cette amylose complexée : V6I, V6II, V6III, et V8. Lors de lavages des matrices ou d'hydrolyse enzymatique, le type V6I est plus stable que les types V6II et V6III. Néanmoins, certains complexes V6III semblent plus stables que d'autres. Cette stabilité serait due à une association plus forte du ligand avec l'amylose. Selon les conditions expérimentales (température, vitesse d'agitation, concentration en amidon, ratio amylose / amylopectine, concentration en ligand), les ligands peuvent se comporter différemment avec l'amylose : former ou pas des complexes d'inclusion avec l'amylose, présenter des polymorphismes différents. Il existe toutefois des composés d'arôme inaptes à former des complexes.

Les composés d'arôme sont retenus par les matrices amyloacées par complexes d'inclusion avec l'amylose. Ils se situent alors à l'intérieur de la cavité hélicoïdale ou dans l'espace entre

les hélices. Les composés d'arôme pourraient aussi potentiellement interagir avec l'amylopectine et/ou être piégés dans la zone amorphe. En effet, la rétention des composés d'arôme peut aussi être due à la structure des matrices. La matrice peut interagir avec les composés d'arôme par des mécanismes physiques d'enfermement des molécules d'arôme dans les mailles du réseau de macromolécules pour les matrices gélifiées.

Enfin, la rétention des composés d'arôme dépend également de leurs propriétés physicochimiques, du ratio amylose / amylopectine, de la concentration en ligand et en amidon. Les interactions composés d'arôme – amidon perturbent également la réorganisation de l'amylose pendant la gélification et la rétrogradation, impactant par conséquent la structuration des matrices d'une échelle macroscopique à une échelle moléculaire. Il est difficile de dissocier tous ces phénomènes. Cependant toutes les études montrent l'importance des concentrations d'amidon et de ligand mises en œuvre et aboutissant à des cinétiques de complexation différentes.

Les solvants supports des composés d'arôme ne sont pas neutres vis-à-vis de la matrice. Ils peuvent également créer des complexes d'inclusion avec l'amidon. Des phénomènes compétitifs, antagonistes ou synergiques existent.

Lorsque l'on constitue un système mixte amidon – glucomannane de konjac, la viscosité des suspensions est augmentée. Par contre, l'ajout de glucomannane de konjac n'augmente pas la fermeté des gels d'amidon en raison des propriétés non gélifiantes du glucomannane de konjac à faible concentration ou en absence d'alcalin. Le glucomannane de konjac n'interagit pas en synergie avec l'amidon. En raison de ses caractéristiques physicochimiques, le glucomannane de konjac ne peut pénétrer dans le grain d'amidon. Il reste ainsi localisé dans la phase continue qui entoure les grains d'amidon. Le comportement rhéologique du mélange amidon - glucomannane de konjac est intermédiaire entre une solution de polymère concentrée et un gel faible.

La gélatinisation de l'amidon est incomplète en présence de glucomannane de konjac. Ce dernier diminue la quantité d'eau disponible, augmente la viscosité de la phase continue limitant le gonflement du grain d'amidon. De fait, peu d'amylose est solubilisée.

La rétrogradation de l'amidon est également impactée par la présence de glucomannane de konjac. La rétrogradation de l'amylose est promue par le glucomannane de konjac qui absorbe l'eau du gel mixte. Puis dans un deuxième temps (durée supérieure à 3 jours), la rétrogradation de l'amidon est ralentie par la présence du glucomannane de konjac. Il semble interagir avec l'amylose ou l'amylopectine et empêche la formation d'une structure ordonnée retardant ainsi la réorganisation des molécules d'amylopectine. Le glucomannane de konjac empêche l'apparition de synérèse.

L'influence de la présence de glucomannane de konjac sur l'encapsulation moléculaire de composés volatils par de l'amidon n'est pas connue.

Ce travail de thèse repose donc sur l'étude de la formation de complexes « ligand – amylose d'amidon de pomme de terre » en présence de glucomannane de konjac. L'ajout de ce

polysaccharide doit permettre d'assurer une bonne stabilité physique des matrices amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac en limitant l'apparition de synérèse. Selon les travaux antérieurs, le glucomannane de konjac semble avoir également un potentiel intéressant d'encapsulation. L'étude de la stabilité physique des matrices amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac et de la stabilité du piégeage des composés volatils seront réalisées sur ces matrices riches en eau aux propriétés de solutions épaisses ou de gels faibles, ce qui est une originalité par rapport aux études publiées dans ce domaine.

DÉMARCHE EXPERIMENTALE MISE EN OEUVRE

Pour cette étude, les molécules d'intérêt choisies étaient des composés d'arôme. Nous avons travaillé à des concentrations alimentaires, c'est-à-dire sensoriellement acceptables. Nous étions donc loin de la concentration critique de complexation totale de l'amidon.

L'amidon de pomme de terre a été choisi en raison de sa teneur en lipides négligeable. Le glucomannane de konjac utilisé pour l'étude était pur. Les concentrations choisies de ces deux polysides étaient proches de celles d'un produit alimentaire type crème dessert simplifiée. La concentration choisie pour le glucomannane de konjac respecte la réglementation en vigueur.

L'expression de la problématique de la thèse est la suivante : la présence de glucomannane de konjac dans une matrice d'amidon de pomme de terre permet d'accroître sa stabilité physique sans inhiber l'encapsulation moléculaire de composés d'arôme par l'amylose de pomme de terre. Deux hypothèses sont à vérifier pour valider cette thèse :

- hypothèse N°1 : l'encapsulation moléculaire de composés d'arôme dans une matrice amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac est possible.
- hypothèse N°2 : l'ajout de glucomannane de konjac améliore la stabilité physique des matrices à base d'amidon de pomme de terre et la stabilité du piégeage des composés d'arôme.

La démarche mise en œuvre est présentée en figure 34.

La première étape a consisté à caractériser la matrice amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac avant l'ajout de composés d'arôme.

Dans un deuxième temps, des composés d'arôme ont été ajoutés à la matrice afin de valider ou non l'hypothèse N°1 : à savoir, est ce qu'il y a bien encapsulation moléculaire entre les composés d'arôme de l'étude et l'amylose d'amidon de pomme de terre en présence de glucomannane de konjac. Les composés d'arôme ont été étudiés individuellement et non en mélange. Ils ont été choisis selon deux critères : leur capacité de complexation avec l'amylose et leurs propriétés physicochimiques. Nous avons vu que les conditions opératoires influent sur l'établissement des complexes amylose - ligand et sur le type de polymorphisme obtenu. Pour notre étude, nous avons donc choisi d'ajouter les composés d'arôme selon deux modalités, en début et en fin de process.

Les coefficients de partage de chaque composé d'arôme ont été déterminés afin de mettre en évidence la présence d'interactions entre les composés d'arôme et les polysides. Pour affiner la compréhension des systèmes, la localisation et la quantification des composés d'arôme dans les différentes phases de notre matrice d'étude ont également été abordées.

Le solvant support des composés d'arôme choisi était le propylène glycol. Son interaction potentielle avec l'amidon de pomme de terre a également été étudiée.

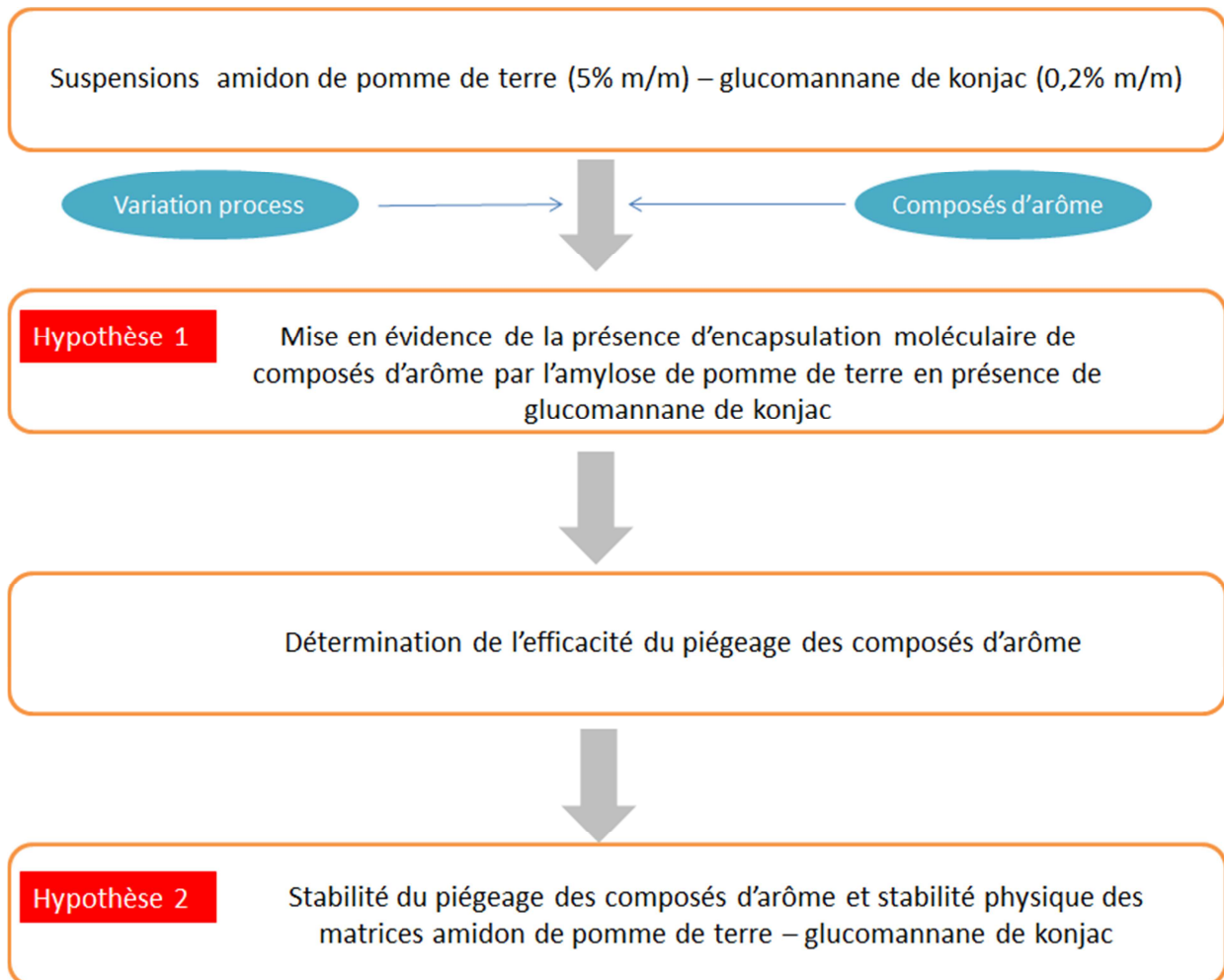


Figure 34 : Représentation schématique de la démarche mise en œuvre

Dans un troisième temps, si l'hypothèse N°1 se vérifie, la détermination de l'efficacité du piégeage des composés d'arôme par la matrice « amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac » a été réalisée.

Dans un quatrième temps, la stabilité du piégeage des composés d'arôme par la matrice « amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac » et la stabilité physique de cette matrice a été étudiée afin de valider l'hypothèse N°2. Pour cette étude, en raison des données rares de la littérature sur la stabilité du piégeage des composés d'arôme dans des matrices à forte teneur en eau, le choix a été fait de conserver les matrices à l'état de gel ou de solutions épaisses. Nous aurons ainsi des informations sur la stabilité du piégeage des composés d'arôme dans un système hydraté.

À travers cette démarche expérimentale, différents niveaux d'observation (macroscopique, microscopique et moléculaire) ainsi que différents moments d'analyse (pendant et immédiatement en fin de process, à 24 heures, et au-delà de 24 heures) ont été utilisés et ont permis une meilleure compréhension des phénomènes (tableau 6).

Tableau 6 : Echelles et moments d'analyses appliqués au cours de la démarche expérimentale

| Niveaux d'observations | Méthodes | Moments d'analyse | | | |
|------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------|-----|-------|
| | | Pendant process | Fin process | 24H | > 24H |
| Échelle macroscopique | Viscosimétrie | X | | | |
| | Rhéologie | | | X | X |
| | Analyse physicochimique | | X | X | X |
| | Microscopie optique | | X | | |
| Échelle microscopique | Microscopie électronique à balayage | | | X | X |
| | Rhéologie dynamique | | X | X | |
| Echelle moléculaire | Analyse chromatographique | | | X | X |
| | Diffraction des rayons X (WAXS) | | | X | |
| | Analyse enthalpique différentielle | | | X | |

METHODES MISES EN OEUVRE

1 Préparation des matrices

1.1 Préparation des matrices non aromatisées

Pour cette étude, l'amidon natif de pomme de terre (Sigma Aldrich, S4251) et le glucomannane de konjac (fourni par le Pr. Georges Srzednick (Université de Nouvelle - Galles du Sud, Sydney, Australie) ont été utilisés.

L'amidon de pomme de terre se caractérise par un ratio amylose / amylopectine de 23 / 77 % et une humidité relative de 18 % (Norme internationale ISO 1666., 1996). Il a été choisi en raison de sa teneur négligeable en lipides. La concentration en amidon (5 % (m/m totale)) a été choisie pour mimer les aliments tels qu'une crème dessert.

Le glucomannane de konjac brut de notre étude contenait initialement 30 % d'amidon (m/m). Des lavages avec des solutions hydroalcooliques ont permis d'obtenir une poudre de glucomannane de konjac purifiée ne contenant plus du tout d'amidon (Jianrong, Donghua et al., 2009). Cette purification a également permis d'obtenir une poudre de glucomannane de konjac sans odeur. Son humidité relative, déterminée à 105°C, était de 11 %. Le glucomannane de konjac purifié était également caractérisé par la présence de groupements acétyles. La quantification de ces groupements acétyles n'a pas été réalisée. La concentration d'étude de 0,2 % (m/m totale) a été choisie afin d'obtenir une texture très proche de celle obtenue dans les produits sans glucomannane de konjac et de rester également dans la gamme de concentration tolérée pour les aliments. En effet, la législation tolère une concentration maximale en glucomannane de konjac de 1 % (m/m) dans les aliments (Journal officiel de l'Union européenne, 2011a).

Les formulations respectives des différentes matrices étudiées sont présentées en tableau 7.

Le pH moyen des matrices est de $6,0 \pm 0,1$.

Tableau 7 : Formulations respectives des différentes matrices étudiées. La masse volumique pour les matrices polysidiques a été déterminée à l'aide d'un pycnomètre.

| Matrice | Masse d'amidon g et (% (m/m)) | Masse de glucomannane de konjac g et (% (m/m)) | Masse d'eau MilliQ® (g) | Masse volumique (g/L) |
|---|-------------------------------|--|-------------------------|-----------------------|
| Témoin (eau MilliQ) | | | 25 | 1000 |
| Amidon de pomme de terre | 1,25 (5 %) | | 25 | 1053 |
| Glucomannane de konjac | | 0,05 (0,2 %) | 25 | 1100 |
| Amidon de pomme de terre - Glucomannane de konjac | 1,25 (5 %) | 0,05 (0,2 %) | 25 | 1021 |

Les suspensions d'amidon de pomme de terre, de konjac glucomannane et les matrices mixtes d'amidon de pomme de terre - konjac glucomannane ont été préparées en utilisant le Rapid Visco Analyser® Super 4 (RVA, Perten, Suède). Cet appareil permet de contrôler la température du produit et la vitesse d'agitation tout en mesurant en continu la viscosité.

Le programme du RVA® choisi était le programme classique recommandé par le fabricant pour les empois amylicés appelé « STD1 » (figure 35). La durée totale était de 16 minutes avec une température maximale de 95°C. Le programme était le suivant :

- 1 minute à 50°C
- Chauffage de 50°C à 95°C à 12°C/min
- Plateau de 3,5 minutes à 95°C
- Refroidissement de 95°C à 60°C à 12°C/min
- Plateau de 3 minutes à 60°C

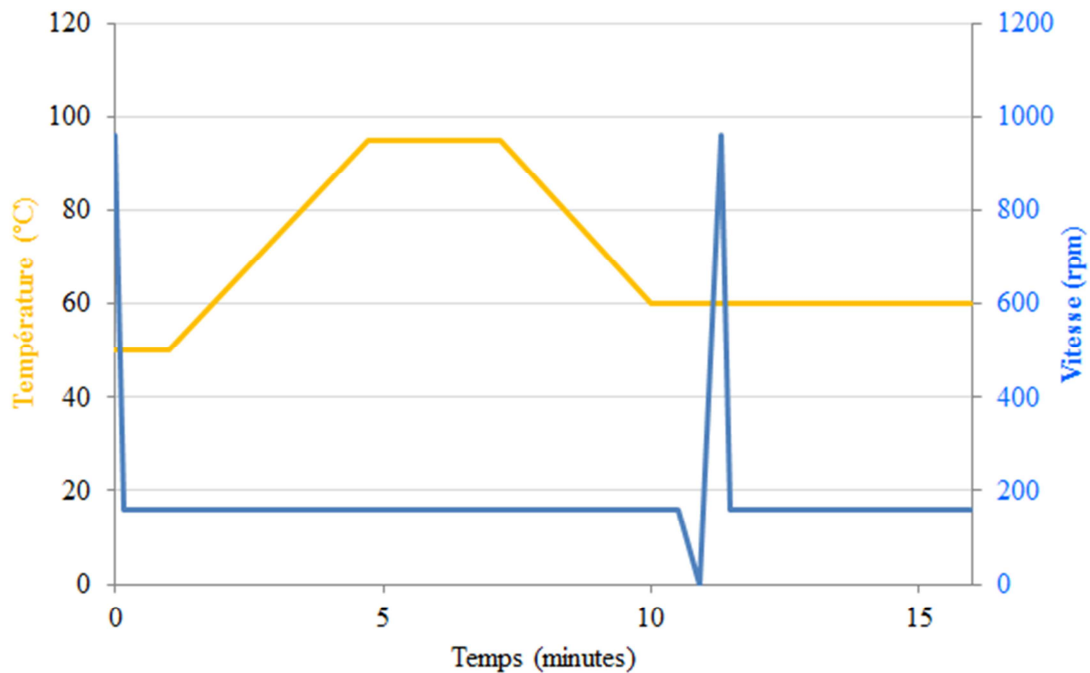


Figure 35 : Traitement thermomécanique appliqué pour fabriquer les matrices étudiées.

L'agitation était réglée à 150 tpm. Cette vitesse de rotation était de 960 tpm pendant 10 secondes au tout début du process et juste avant le plateau à 60°C (vers 11 minutes) pour permettre l'homogénéisation de la suspension (figure 35). En programmant le moteur à une plus forte vitesse au démarrage, les poudres de l'échantillon sont mises efficacement en suspension dans le solvant (Crosbie, Ross et al., 2007). Le paragraphe suivant (1.2. « Préparation des matrices aromatisées ») explique l'intérêt de la deuxième agitation à 960 tpm vers 11 minutes.

Les paramètres relevés à partir des courbes de viscosité obtenues sont la température de gélatinisation, le pic de viscosité, la viscosité finale et le setback (figure 36).

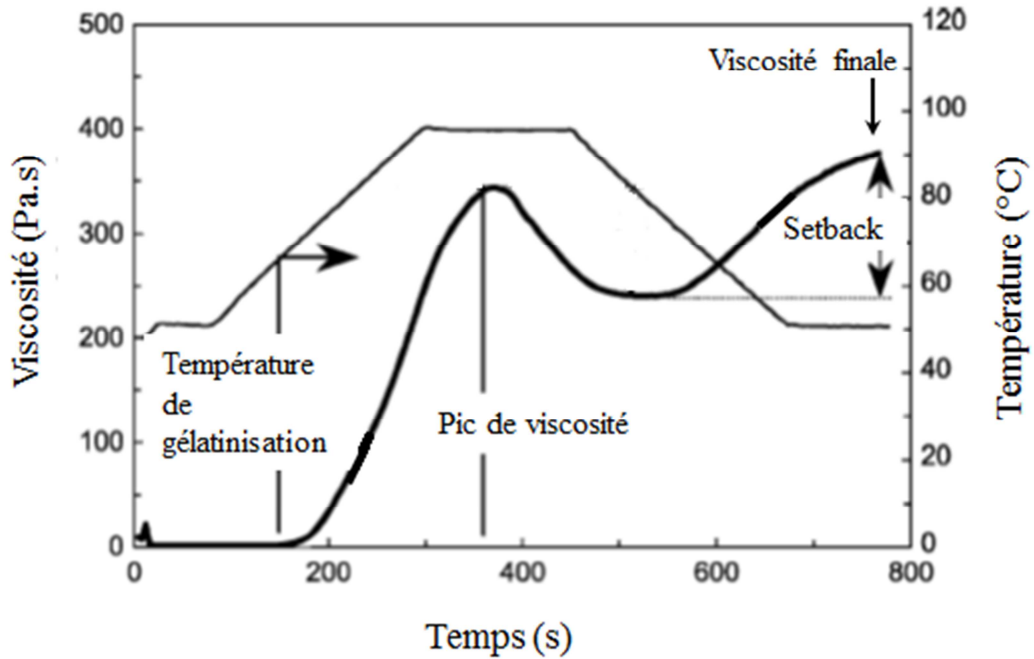


Figure 36 : Courbe représentative du RVA®. En gras, la courbe de viscosité typique d'un amidon lors d'un traitement thermomécanique en excès d'eau. En trait fin, la courbe de température appliquée (Bahnassey and Breene, 1994).

La répétabilité du process a été testée en prenant en compte le paramètre viscosité finale. Le coefficient de variation de ce paramètre était de 4,5 %. Le godet échantillon du RVA® utilisé n'étant pas étanche, l'évaluation de la perte en eau lors du process a également été déterminée. Elle s'élevait à 0,6 % (m/m). Elle a été considérée comme négligeable tout au long de cette étude. Le process était donc répétable.

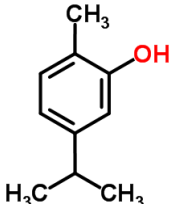
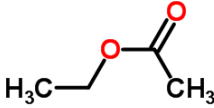
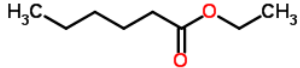
1.2 Préparation des matrices aromatisées

Les composés d'arôme choisis pour l'étude étaient : l'acétate d'éthyle, l'hexanoate d'éthyle et le carvacrol. Ils ont été choisis pour leur usage très répandu en industrie agroalimentaire. L'acétate d'éthyle et l'hexanoate d'éthyle ont respectivement des notes sensorielles de fruité - floral et de fraise (tableau 8). Le carvacrol a une note sensorielle de thym - origan. Le carvacrol est également une molécule connue pour ses propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. Ces molécules ont également été choisies en fonction de leurs propriétés physicochimiques et de leur comportement avec l'amylose (tableau 8).

L'acétate d'éthyle présente le plus faible $\log P_{\text{octanol/eau}}$, le carvacrol le plus élevé. L'hexanoate d'éthyle est le composé le moins soluble dans l'eau.

Selon la littérature, l'acétate d'éthyle ne forme pas de complexe avec l'amylose. L'hexanoate d'éthyle complexe l'amylose en signature V6II, c'est à dire que le ligand est situé en inter et intra - hélice. Le carvacrol complexe l'amylose en signature V6III, c'est-à-dire qu'il est situé en inter et intra - hélice mais l'espace entre les hélices est plus grand qu'en V6II.

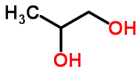
Tableau 8 : Caractéristiques physicochimiques des composés d'arôme de l'étude. * selon Biais (2006) et • selon Arvisenet (2001).

| | Carvaerol | Acétate d'éthyle | Hexanoate d'éthyle |
|--------------------------------------|---|--|---|
| Nature chimique | Phénol monoterpénoïde | Ester | Ester |
| Formule brute | C ₁₀ H ₁₄ O | C ₄ H ₈ O ₂ | C ₈ H ₁₀ O ₂ |
| Formule développée |  |  |  |
| Note aromatique | Thym, origan | Floral | Fraise |
| Propriété antioxydante | oui | non | non |
| Masse molaire (g/mol) | 150 | 88 | 144 |
| Log P _{octanol/eau} à 25°C | 3,49 | 0,73 | 2,83 |
| Pression de vapeur à 25°C (mm Hg) | 0,003 | 98 | 1,8 |
| Solubilité dans l'eau à 25°C (g/L) | 1,25 | 82 | 0,48 |
| Concentration dans la matrice (mg/L) | 77 | 41 | 65 |
| Comportement avec l'amylose | Type V6III * | Non complexant • | Type V6II * |

Pour cette étude, des concentrations de composés odorants de niveau « alimentaire » c'est-à-dire acceptables au niveau sensoriel, ont été choisies. Les travaux antérieurs d'Arvisenet (2001) ont montré qu'une concentration de 2 mmol de composé volatil/mol d'équivalent glucose était satisfaisante, c'est-à-dire suffisante et acceptable au niveau sensoriel mais largement inférieure à la saturation des hélices d'amylose. L'équivalent glucose donne une indication de la quantité molaire de l'amidon. Afin de palier la difficulté de calculer la masse molaire de l'amidon, il est d'usage d'utiliser la masse molaire du glucose. Les concentrations en composés d'arôme dans les matrices étudiées sont présentées en tableau 8.

Ces composés d'arôme ont été étudiés un par un. Le solvant choisi comme support des composés d'arôme était le propylène glycol. Nous avons vu dans l'étude bibliographique que le solvant support n'est pas neutre par rapport aux comportements des composés volatils et par rapport à l'amidon. Il a été montré que le propylène glycol forme des complexes de type V6I avec l'amylose (Biais, 2006; Pozo-Bayon, Biais et al., 2008). Comme il s'agit du solvant support, sa concentration dans les préparations était 50 fois plus élevée que celle des composés d'arôme (tableau 9).

Tableau 9 : Caractéristiques physicochimiques du propylène glycol.

| Propylène glycol | |
|------------------------------------|---|
| Nature chimique | Diol |
| Formule brute | $C_3H_8O_2$ |
| Formule développée |  |
| Masse molaire (g/mol) | 76 |
| Log $P_{octanol/eau}$ à 25°C | -0,92 |
| Pression de vapeur à 25°C (mm Hg) | 0,3 |
| Solubilité dans l'eau à 25°C (g/L) | 811 |
| Quantité dans la matrice (g/L) | 4 |

Des solutions mères de chaque composé d'arôme ont été préparées dans le propylène glycol à 25°C sous agitation magnétique pendant plusieurs heures (tableau 10). Ces solutions mères ont ensuite été stockées à 4°C. Avant chaque utilisation, chaque solution mère était agitée pendant quelques minutes à température ambiante.

Tableau 10 : Concentration des solutions mères de chaque composé d'arôme préparées dans le propylène glycol.

| | Carvacrol | Acétate d'éthyle | Hexanoate d'éthyle |
|---|-----------|------------------|--------------------|
| Concentration de la solution mère (g/L) | 18 | 14 | 9 |

100 μ L de solution mère ont été ajoutés à la préparation amyliée, soit en début de traitement thermomécanique, soit en fin du traitement thermomécanique (figure 37). Cet ajout a été réalisé lorsque l'agitation du RVA[®] était arrêtée.

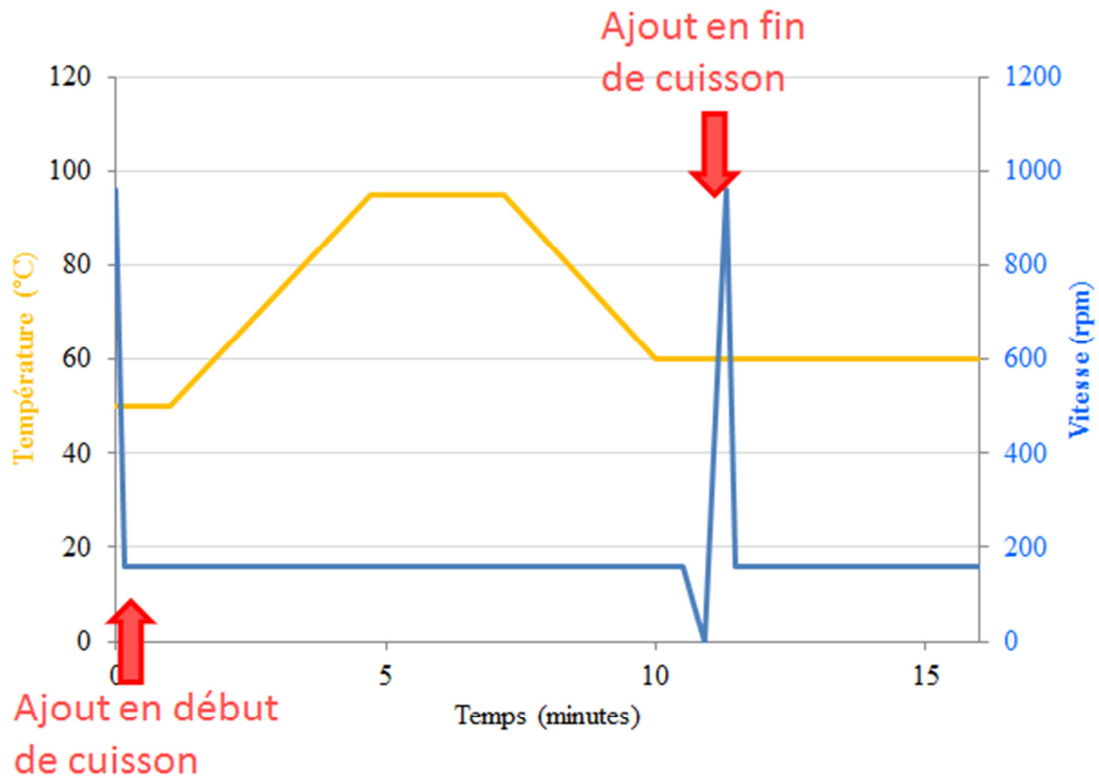


Figure 37 : Traitement thermomécanique appliqué et moment d'ajout des composés d'arôme pour fabriquer les matrices d'études aromatisées.

La seconde agitation à 960 tpm pendant 10 secondes à 11 minutes du programme (figure 37) avait pour but d'homogénéiser correctement la préparation polyosidique suite à l'ajout de la solution mère « composé d'arôme - propylène glycol ». Comme, à ce stade, la matrice était très visqueuse, il était important de vérifier la bonne homogénéité de la suspension suite à cet ajout. Pour cela, la solution « composé d'arôme - propylène glycol » a été substituée par un colorant alimentaire de couleur bleue (Vahiné®). 100 μL de colorant (volume injecté identique au volume de la solution mère injectée) ont été ajoutés vers 11 minutes c'est-à-dire au tout début du plateau à 60°C et où l'agitation du RVA® est arrêtée. Le premier essai a été effectué en conservant le couple vitesse d'homogénéisation / durée initialement utilisé au tout début du programme. Il a permis une homogénéisation efficace (figure 37). Ces conditions ont donc été conservées pour la suite de l'étude.

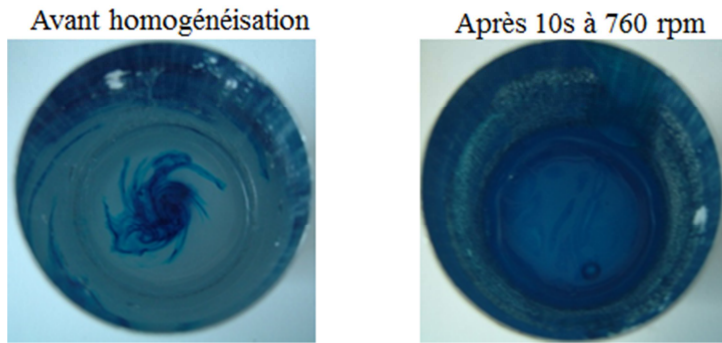


Figure 38 : Test avec du colorant pour valider l'efficacité du couple vitesse d'homogénéisation / durée.

Six matrices d'étude ont donc été fabriquées par composé d'arôme. Un récapitulatif de la formulation de chaque matrice amyliacée aromatisée est présenté en tableau 11.

Tableau 11 : Formulation de chaque matrice amyliacée aromatisée fabriquée. Synthèse des tableaux 7 à 10.

| Composé d'arôme ajouté dans la matrice | Moment d'ajout du composé d'arôme | Matrice | Masse d'amidon g et (% (m/m)) | Masse de glucomannane de konjac g et (% (m/m)) | Masse d'eau MilliQ® (g) | Concentration de la solution mère en composé d'arôme (g/L) | Concentration en composé d'arôme dans la matrice (mg/L) |
|--|--------------------------------------|---|-------------------------------|--|-------------------------|--|---|
| carvacrol | début du traitement thermo-mécanique | amidon de pomme de terre | 1,25 (5 %) | | 25 | 18 (préparé dans propylène glycol) | 77 (= 2 mmoles d'équivalent glucose) |
| | | glucomannane de konjac | | 0,05 (0,2 %) | 25 | | |
| | fin du traitement thermo-mécanique | amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac | 1,25 (5 %) | 0,05 (0,2 %) | 25 | | |
| | | amidon de pomme de terre | 1,25 (5 %) | | 25 | | |
| | | glucomannane de konjac | | 0,05 (0,2 %) | 25 | | |
| | | amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac | 1,25 (5 %) | 0,05 (0,2 %) | 25 | | |
| acétate d'éthyle | début du traitement thermo-mécanique | amidon de pomme de terre | 1,25 (5 %) | | 25 | 14 (préparé dans propylène glycol) | 41 (= 2 mmoles d'équivalent glucose) |
| | | glucomannane de konjac | | 0,05 (0,2 %) | 25 | | |
| | fin du traitement thermo-mécanique | amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac | 1,25 (5 %) | 0,05 (0,2 %) | 25 | | |
| | | amidon de pomme de terre | 1,25 (5 %) | | 25 | | |
| | | glucomannane de konjac | | 0,05 (0,2 %) | 25 | | |
| | | glucomannane de konjac | | 0,05 (0,2 %) | 25 | | |

| Composé d'arôme ajouté dans la matrice | Moment d'ajout du composé d'arôme | Matrice | Masse d'amidon g et (% (m/m)) | Masse de glucomannane de konjac g et (% (m/m)) | Masse d'eau MilliQ® (g) | Concentration de la solution mère en composé d'arôme (g/L) | Concentration en composé d'arôme dans la matrice (mg/L) |
|--|--------------------------------------|---|-------------------------------|--|-------------------------|--|---|
| hexanoate d'éthyle | début du traitement thermo-mécanique | amidon de pomme de terre | 1,25 (5 %) | | 25 | 9 (préparé dans propylène glycol) | 65 (= 2 mmoles d'équivalent glucose) |
| | | glucomannane de konjac | | 0,05 (0,2 %) | 25 | | |
| | fin du traitement thermo-mécanique | amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac | 1,25 (5 %) | 0,05 (0,2 %) | 25 | | |
| | | amidon de pomme de terre | 1,25 (5 %) | | 25 | | |
| | | glucomannane de konjac | | 0,05 (0,2 %) | 25 | | |
| | | amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac | 1,25 (5 %) | 0,05 (0,2 %) | 25 | | |

Les dénominations adoptées pour chaque matrice selon la formulation et le process sont présentées en tableau 12.

Tableau 12 : Dénomination des différentes matrices de l'étude

| Moment d'ajout du composé d'arôme | Matrice | Dénomination |
|-------------------------------------|---|--------------|
| début du traitement thermomécanique | témoin (eau MilliQ) | STD-ELA |
| | amidon de pomme de terre | PS-ELA |
| | glucomannane de konjac | KGM-ELA |
| | amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac | SK-ELA |
| fin du traitement thermomécanique | témoin (eau MilliQ) | STD-LLA |
| | amidon de pomme de terre | PS-LLA |
| | glucomannane de konjac | KGM-LLA |
| | amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac | SK-LLA |
| sans ajout de composé d'arôme | amidon de pomme de terre | PS |
| | amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac | SK |

1.3 Conditions de préparation spécifiques pour les analyses de diffraction aux rayons X et les analyses enthalpiques différentielles

Pour ces deux techniques, les composés d'arôme ont été étudiés seuls ou en mélange avec le propylène glycol et à des concentrations très nettement supérieures à celles présentées précédemment en raison de la limite de sensibilité de ces deux techniques. Entre 3 % et 10 % (m/m d'amidon sec) de composés d'arôme purs ou en mélange 50 / 50 avec le propylène glycol ont été ajoutés aux préparations polyosidiques. Le RVA[®] a été utilisé pour fabriquer les échantillons. Puis les matrices ont été conditionnées sous atmosphère contrôlée par une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium (CAS 7647-14-5, $A_w = 0,75$ à 25°C).

2 Caractérisation de la structure des matrices

L'étude de la structure de la matrice a été menée à différentes échelles d'observation : macroscopique, microscopique et moléculaire.

2.1 Échelle macroscopique

Plusieurs méthodes ont été mises en œuvre pour la caractérisation de la structure de la matrice à l'échelle macroscopique : la microscopie optique, des tests rhéologiques et la détermination des indices de gonflement, de la fraction volumique et de la masse de synérèse.

2.1.1 Observations au microscope optique

L'état de gonflement des grains d'amidon de pomme de terre et la dispersion de l'amylose dans les matrices ont été évalués par microscopie optique immédiatement après le traitement thermomécanique. Quelques mg de matrices ont été dilués dans deux à trois gouttes de lugol (solution d'iodure de potassium et iode, Sigma, référence L6146), directement sur lame de verre. L'ensemble a été recouvert d'une lamelle et observé au grossissement X40 du microscope LABOPHOT[®] 2 (Nikon, Japon).

2.1.2 Détermination des indices de gonflement et de la fraction volumique.

Immédiatement après le traitement thermomécanique, trois grammes de chaque suspension ont été dilués dans 17 g d'eau MilliQ[®] pour obtenir une concentration d'amidon de 0,9 % (m/m). Le but de cette dilution était d'obtenir une concentration en polysaccharide permettant l'optimisation de la sédimentation de la phase dispersée. Après agitation manuelle et homogénéisation au vortex, les échantillons dilués ont été centrifugés à 4 997 g pendant 15 minutes à 25°C. Puis le surnageant a été prélevé délicatement. Les extraits secs des surnageants et des culots ont été obtenus après 24 heures à 105°C. À partir de ces valeurs, les extraits secs, l'indice de gonflement et la fraction volumique ont été calculés.

L'indice de gonflement (Q) est défini par Bagley et Christianson (1982) comme la masse des grains d'amidon gonflés, divisée par la masse des grains secs. Il est obtenu directement par le rapport de la masse de culot humide sur la masse de culot sec.

La fraction volumique a été calculée selon l'équation 6 (Doublier, 1981) :

$$\Phi = \left(1 - \frac{S}{100}\right) \cdot C \cdot Q \quad \text{Équation 6}$$

Avec :

Φ représentant la fraction volumique des grains d'amidon dans la suspension ;

S représentant l'indice de solubilité (%). Il est obtenu directement par le rapport de la quantité de matière solubilisée (extrait sec des surnageants) par rapport à la quantité initiale de polysaccharide introduit ;

C est la concentration en amidon dans la suspension (g/g) ;

Q est l'indice de gonflement (g/g).

Les mesures ont été réalisées cinq fois par échantillon.

2.1.3 Mesure de liquide de synérèse

Le liquide de synérèse des matrices a été recueilli suite à une centrifugation de 10 g d'échantillon à 8 000 g pendant 15 minutes à 25°C. Le pourcentage de synérèse correspond au

ratio de la masse de liquide exsudé par la masse totale de l'échantillon avant centrifugation. Trois répétitions par matrice ont été effectuées.

2.1.4 Test de pénétrométrie

2.1.4.1 Principe

Les propriétés mécaniques des matrices mixtes amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac ont été mesurées par des méthodes rhéologiques. À l'échelle macroscopique, les propriétés rhéologiques des gels ont été évaluées par des tests de pénétrométrie. Ce test est le plus ancien test de mesure de la texture (Joël, 2006). Il consiste à faire pénétrer une contrainte (force par unité de surface) dans le gel et à mesurer la force nécessaire pour atteindre une certaine profondeur.

2.1.4.2 Protocole

Les propriétés mécaniques à grande déformation des matrices de l'étude ont été déterminées avec l'analyseur de texture TA-HD+[®] (Stable Micro Systems, Royaume-Uni) équipé d'un capteur de 5 kN à température ambiante via un test de pénétrométrie.

En fin de traitement thermomécanique, les matrices étaient aliquotées dans des pots de 28 mm de diamètre et 55 mm de hauteur. Certains pots ont été stockés 24 heures à température ambiante avant d'être étudiés. D'autres ont subi un vieillissement accéléré par des cycles de congélation / décongélation avant d'être étudiés. Un cycle de vieillissement accéléré correspond à : 24 heures à -18°C puis 2 heures à 30°C.

Lors du test, une géométrie cylindrique de 10 mm de diamètre pénètre dans l'échantillon à une vitesse de 1 mm/s jusqu'à 60 % de la hauteur initiale de l'échantillon. Puis la sonde retourne à sa position initiale. À partir des courbes forces (N) en fonction du temps obtenues, la force maximale notée F_{max} (N) est extraite.

La géométrie était nettoyée après chaque test avec de l'eau et de l'éthanol. Le diamètre de la géométrie était suffisamment petit comparé au diamètre du pot pour ne pas induire d'effet de bord. Cinq répétitions par matrice ont été réalisées.

Une courbe typique représentant la contrainte en fonction du temps est présentée en figure 39. À partir de ces courbes, la force maximale (F_{max}) est extraite.

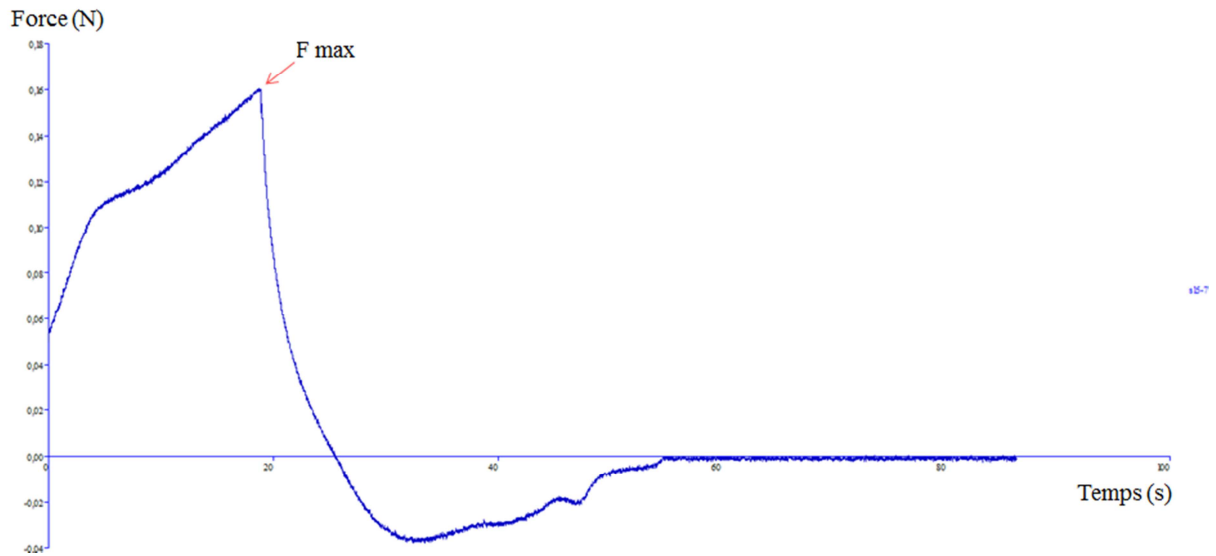


Figure 39 : Courbe typique obtenue par pénétration des matrices étudiées.

2.2 Échelle microscopique

Deux méthodes ont été mises en œuvre pour la caractérisation de la structure de la matrice à l'échelle microscopique : la viscoélasticimétrie et la microscopie électronique à balayage.

2.2.1 Viscoélasticimétrie

2.2.1.1 Principe

Les propriétés mécaniques des matrices mixtes amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac ont été déterminées à l'échelle microscopique par la viscoélasticimétrie. Cette méthode permet de caractériser les systèmes à très faible déformation c'est-à-dire en conditions non destructives et ainsi d'appréhender leur structure. Les systèmes viscoélastiques soumis à une contrainte restituent une partie de l'énergie fournie, ce qui est caractéristique d'un comportement élastique, et dissipent le reste en se déformant, ce qui est caractéristique d'un comportement visqueux. Les mesures rhéologiques en régime dynamique consistent à appliquer une contrainte (ou déformation) sous forme d'une fonction sinusoïdale du temps (équation 7)

$$\tau(t) = \tau_0 \cos(\omega t) \quad \text{Équation 7}$$

où ω est la pulsation des oscillations égale à $2\pi \cdot \text{fréquence}$

τ_0 est l'amplitude maximale de la contrainte.

La déformation (ou contrainte) résultante est également une fonction sinusoïdale du temps avec la même pulsation ω , mais présentant un décalage de phase δ (équation 8).

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cos(\omega t + \delta) \quad \text{Équation 8}$$

γ_0 est l'amplitude maximale de la déformation.

Les valeurs du décalage de phase δ entre la contrainte et la déformation sont comprises entre 0 et $\frac{\pi}{2}$ et caractérisent le système.

Pour les matériaux purement élastiques, la contrainte et la déformation sont en phase ($\delta = 0$). Un solide élastique idéal conserve sans perte l'énergie fournie au cours de la phase de déformation, ce qui lui permet un retour instantané à l'état initial lorsque la contrainte est supprimée.

Dans le cas des matériaux purement visqueux, la contrainte et la déformation sont en opposition de phase ($\delta = \frac{\pi}{2}$). L'énergie fournie à un liquide visqueux pur pour assurer son écoulement sert à surmonter les forces de frottement et est totalement dissipée sous forme de chaleur.

Dans les matériaux viscoélastiques, comme les suspensions d'amidon, la déformation est déphasée par rapport à la contrainte d'un angle δ compris entre 0 et $\frac{\pi}{2}$. Les matériaux viscoélastiques ont un comportement s'apparentant à la fois à celui d'un solide élastique idéal et à celui d'un liquide visqueux pur. Ils ont ainsi des propriétés intermédiaires. Une partie de l'énergie fournie lors de la phase de déformation est dissipée, le reste étant conservé et permettant un retour au moins partiel mais non instantané vers l'état initial. Un module complexe G^* peut alors être défini tel que :

$$G^* = \frac{\tau^*}{\gamma^*} = G' + iG'' \quad \text{Équation 9}$$

Avec :

τ^* la contrainte complexe définie selon l'équation 10 :

$$\tau^* = \tau_0 (\cos(\omega t + \delta) + i \sin(\omega t + \delta)) \quad \text{Équation 10}$$

γ^* la déformation complexe définie selon l'équation 11 :

$$\gamma^* = \gamma_0 \cos(\omega t) + i \sin(\omega t) \quad \text{Équation 11}$$

G' représente la partie réelle de G^* . Il s'agit du module élastique ou module conservatif
 G'' représente la partie imaginaire de G^* . Il s'agit du module visqueux ou module dissipatif.

Enfin le rapport de G'' sur G' correspond à $\tan \delta$. Ce paramètre reflète la contribution de G' et G'' et est par conséquent un très bon indicateur du niveau de structuration de la matrice.

Toutes ces relations (équations 7 - 11) ne sont valables que dans le domaine de linéarité entre la contrainte et la déformation. Celle-ci doit être vérifiée dans la pratique.

Les variations des modules G' et G'' d'un système macromoléculaire en fonction de la fréquence, appelé spectre mécanique, permettent de caractériser le comportement viscoélastique du système et donnent une indication quant à sa structure (Figure 40).

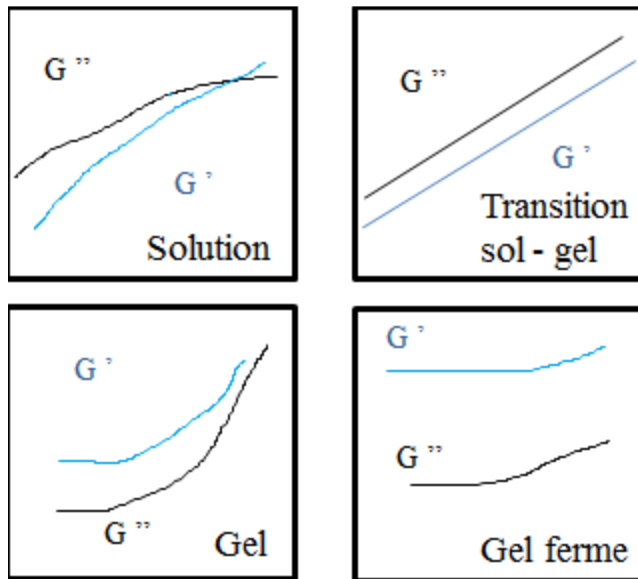


Figure 40 : Spectres mécaniques typiques G' et G'' en fonction de la fréquence des oscillations (Nayouf, 2003).

Nous avons quatre systèmes différents (Figure 40) :

- l'état de solution macromoléculaire est caractérisé par G'' supérieur à G' aux faibles fréquences et une variation importante des modules avec la fréquence. Les deux courbes peuvent se croiser aux fréquences élevées.
- la transition sol – gel est caractérisée par des courbes de G' et G'' parallèles en fonction de la fréquence.
- l'état de gel est caractérisé par G' supérieur à G'' avec G' indépendant de la fréquence dans les basses fréquences. G'' peut être supérieur à G' pour des fréquences élevées.
- l'état de gel ferme est caractérisé par G' très nettement supérieure à G'' avec G' indépendant de la fréquence quelle que soit la fréquence.

2.2.1.2 Protocole

Les propriétés viscoélastiques des suspensions ont été déterminées en fin de process et 24 heures plus tard à l'aide d'un rhéomètre à contrainte imposée SR5[®] (Rheometric Scientific, France) équipé d'un cône plan en polytétrafluoroéthylène (PTFE, 4 cm de diamètre, 0,02 rad) et d'un régulateur de température Peltier. Afin d'éviter la déshydratation de l'échantillon au cours de l'analyse, l'échantillon était recouvert d'un film d'huile de paraffine.

Les mesures débutaient immédiatement à la fin de la préparation des matrices au RVA[®], c'est-à-dire à 60 °C. Une aliquote de la suspension était délicatement posée sur le plan du rhéomètre thermostaté à 60°C. Le protocole suivant regroupant trois tests enchaînés a été appliqué :

- Balayage en fréquence de 50 à 0,1 rad/s à 60°C et à 2,5 % de déformation

- Balayage dynamique en fonction du temps à 1 rad/s à 2,5 % de déformation
- Balayage en fréquence de 50 à 0,01 rad/s à 25°C et à 2,5 % de déformation

Ce protocole a été effectué pour chaque préparation. Deux répétitions ont été faites par matrice. Au préalable, le domaine linéaire a été vérifié.

2.2.2 Microscopie électronique à balayage (MEB)

2.2.2.1 Principe

La microscopie électronique à balayage MEB (ou Scanning Electron Microscopy SEM) est une technique d'observation de la topographie de surface d'échantillons en balayant cette surface à l'aide d'un faisceau électronique. L'image est formée de façon séquentielle et repose sur la détection des électrons secondaires émergents de la surface d'un échantillon sous l'impact d'un très fin faisceau d'électrons primaires qui balaie la surface observée et permet d'obtenir des images point par point (Jacky, 2013).

Cette technique, en raison du vide dans le MEB, nécessite une préparation rigoureuse des échantillons riches en eau : ajout de fixateur chimique pour préserver la texture de l'échantillon et déshydratation de l'échantillon jusqu'au point critique.

De plus, l'énergie du faisceau d'électron se dissipe essentiellement sous forme de chaleur et dégrade la surface de l'échantillon. Pour éviter cet effet délétère, la surface de l'échantillon doit être rendue conductrice si l'échantillon n'est pas conducteur. C'est l'étape de métallisation. Un film métallique très fin, de quelques nm à 30-50 nm, en or, alliage or-palladium ou carbone, est pulvérisé à la surface de l'échantillon (Jacky, 2013).

2.2.2.2 Protocole

En fin de traitement thermomécanique, les matrices ont été :

- stockées 24 heures à température ambiante avant d'être étudiées,

ou

- ont subi un vieillissement accéléré par des cycles de congélation/décongélation avant d'être étudiées. Un cycle de vieillissement accéléré correspond à : 24 heures à -18°C puis 2 heures à 30°C.

Puis, la structure a été fixée avec une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % et pH 7 (Aldrich, CAS n°111-30-8) pendant plusieurs heures à température ambiante. Les échantillons ont ensuite été déshydratés graduellement dans 10 %, 30 %, 50 %, 70 % et 100 % d'éthanol absolu (Sigma, CAS n°64-17-5) à température ambiante. Cette déshydratation a été suivie d'une dessiccation par la méthode du point critique. Enfin, une fraction de l'échantillon a été découpée délicatement au cutter et recouverte d'un film de carbone. L'observation a été réalisée en utilisant le microscope JEOL JSM 7600F[®] (Massachusetts, USA) avec une tension

d'accélération de 5 kV. Plus de neuf vues ont été réalisées par échantillon (grossissement X50 et X250).

Ces analyses en microscopie électronique à balayage ont été réalisées en collaboration avec la Plateforme DImaCell, Centre de Microscopie, INRA Dijon / Université de Bourgogne.

2.2.3 Modélisation mathématique des images obtenues via le MEB

L'analyse de l'état de surface des matrices via les images MEB a été réalisée à travers l'analyse des caractéristiques texturales extraites des images microscopiques. Pour cela, les Descripteurs Généralisés de Fourier ont été utilisés. Cette modélisation a été réalisée en partenariat avec le Dr Ludovic Journaux de l'équipe LE2I (Laboratoire d'Electronique, d'Informatique et de l'Image, CNRS, Arts et Métiers, Université de Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon). Les différentes équations utilisées pour cette modélisation sont présentées dans la publication III. Les grandes lignes du principe de cette modélisation sont présentées ci-après.

Une image est une répartition d'intensités lumineuses dans un plan, donc un signal à deux dimensions. La transformée de Fourier de cette image est une opération mathématique qui permet de passer d'une représentation spatiale à la représentation de l'image dans le domaine fréquentiel (figure 41). L'image ayant un nombre de pixels fini, l'intensité lumineuse des pixels est donc un signal à support borné. De plus, dans une image, nous avons des basses et des hautes fréquences. Les basses fréquences représentent les grandes surfaces homogènes, de grands motifs d'image larges alors que les hautes fréquences représentent les contours, les surfaces hétérogènes, les motifs répétés de façon rapprochée. Le spectre obtenu alors par la transformée de Fourier représente l'intensité des différentes fréquences de l'image.

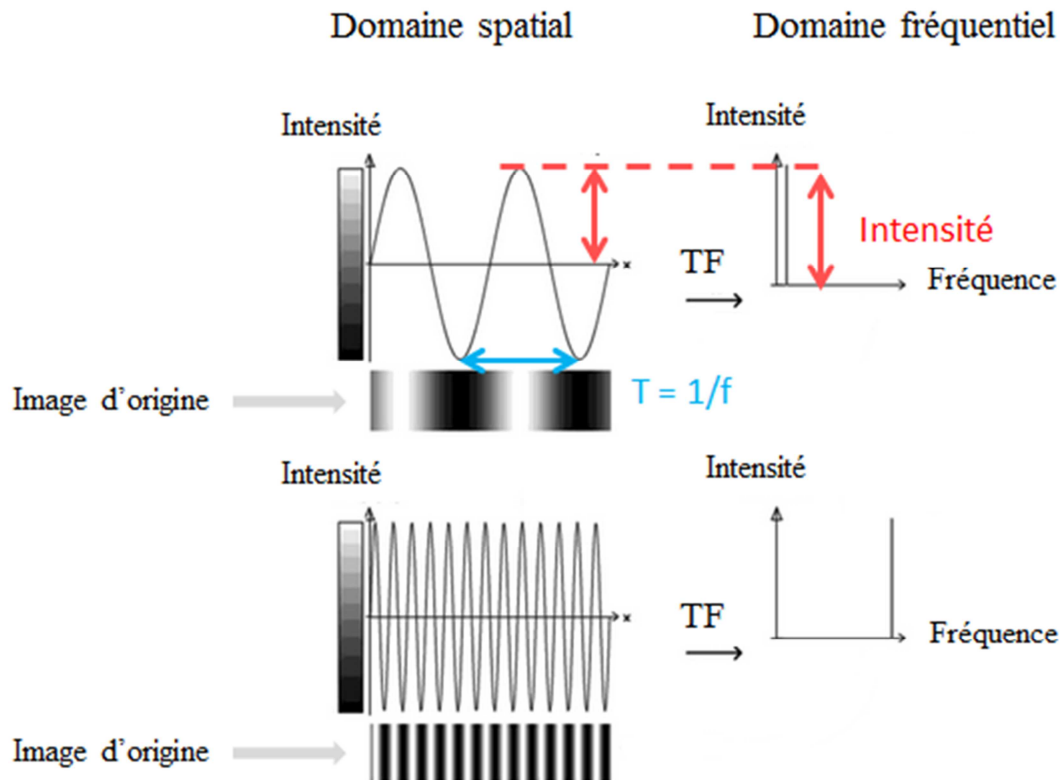


Figure 41 : Passage du domaine spatial d'une image au domaine fréquentiel par la transformée de Fourier (TF) selon la fréquence basse ou élevée (Hoa, Micheau et al., 2007).

La transformée de Fourier d'une image s'effectue en deux étapes :

- La première étape consiste à appliquer la transformée de Fourier dans une première direction, par exemple ligne par ligne (figure 42). Dans l'exemple présenté en figure 42, les fréquences spatiales basses sont prédominantes dans la composition de la ligne de cette image : ce sont elles qui ont des variations d'intensité les plus grandes. Par contre, les fréquences spatiales hautes ont des variations beaucoup moins importantes. Dans ce spectre, la majeure partie de l'information est contenue dans les basses fréquences spatiales.
- La deuxième étape consiste à appliquer une nouvelle transformée de Fourier sur le résultat obtenu à la première étape selon une deuxième direction, cette fois-ci, dans l'exemple donné, par colonne.

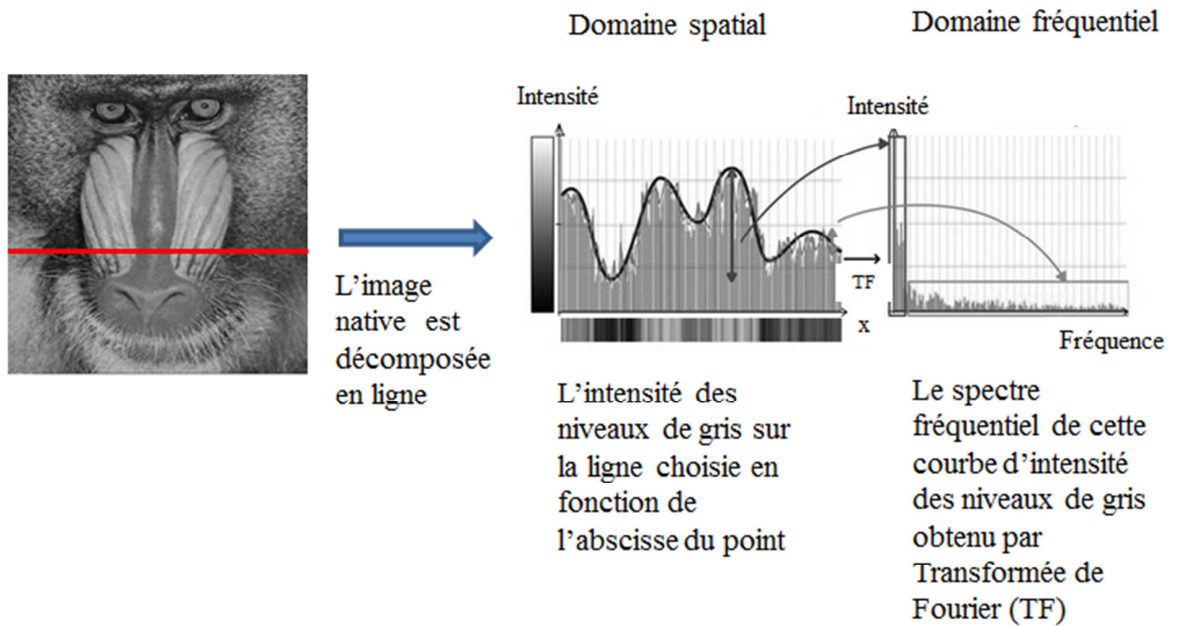


Figure 42 : Illustration de la première étape de la transformée de Fourier (FT) : décomposition d'une image par ligne (Hoa, Micheau et al., 2007).

Le résultat de la transformée de Fourier est appelé plan de Fourier comprenant les intensités et les fréquences, avec les basses fréquences localisées au centre du plan de Fourier et les hautes fréquences dans les coins du plan de Fourier (figure 43). À partir de ce plan, chaque vecteur caractéristique des Descripteurs de Fourier Généralisé est extrait. Ces vecteurs caractérisent l'état de surface des échantillons de chaque image (figure 43).

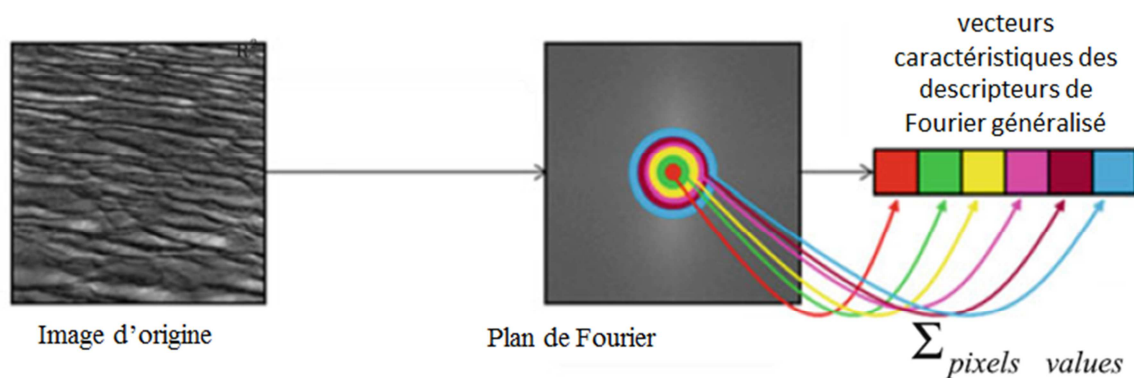


Figure 43 : Procédure simplifiée de détermination des descripteurs de Fourier généralisé (Journaux, Simon et al., 2011).

Comme le nombre de vecteurs obtenus est considérable (1 260 vecteurs dans notre étude), une étape de réduction de dimension est appliquée. On obtient alors une classification des échantillons selon leurs caractéristiques de l'état de surface.

2.3 Échelle moléculaire

Deux méthodes ont été mises en œuvre pour la caractérisation de la structure de la matrice à l'échelle moléculaire : la diffraction des rayons X et l'analyse enthalpique différentielle.

2.3.1 Diffraction des rayons X

2.3.1.1 Principe

Les rayons X sont des ondes électromagnétiques. La diffraction des rayons X (DRX) est une technique sans effet destructeur utilisée pour caractériser la structure des matériaux cristallins. Un état cristallin correspond à un arrangement d'atomes, d'ions ou de molécules constitutives de façon périodique et ordonnée. Cette répartition ordonnée constitue des plans parallèles et équidistants que l'on nomme plans réticulaires. Les distances interatomiques sont de l'ordre de l'Angström (10^{-10} m), du même ordre de grandeur que les longueurs d'onde des rayons X. Un cristal constitue donc un réseau 3D qui peut diffracter les rayons X (Norbert, 1996).

Les rayons X sont générés par un tube à rayons cathodiques (figure 44). La source d'électrons (cathode) est constituée par un filament de tungstène, chauffé à environ 2 000°C par un courant d'une dizaine d'ampères. Les électrons produits sont accélérés sous l'effet d'un champ électrique intense (50 kV) et vont bombarder une anode en métal pur (molybdène, cuivre, argent...). Les électrons, émis par le filament, perdent leur énergie sous forme de chaleur et de rayonnement X (Haziza and Deleporte, 2014).

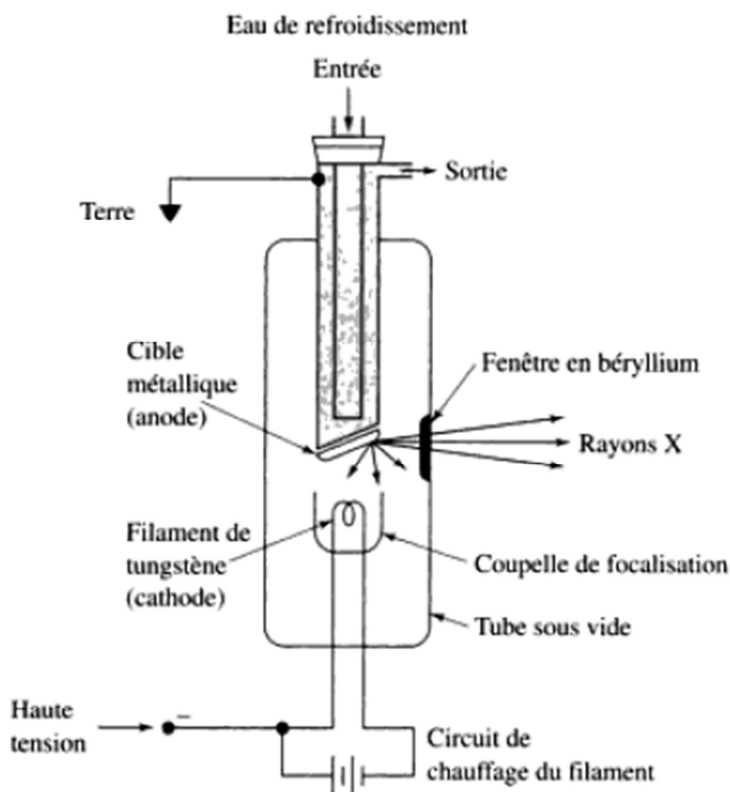


Figure 44 : Schéma de principe d'un tube à rayons X (Haziza and Deleporte, 2014).

Cet ensemble est enfermé dans une enceinte sous un vide secondaire (environ 10^{-6} mbar). Le rayonnement émis est extrait du tube par une fenêtre en béryllium et est filtré pour produire un rayonnement monochromatique.

Les deux métaux les plus communément utilisés en diffraction des rayons X sont le cuivre ($\lambda = 1,54 \cdot 10^{-10}$ m) et le molybdène ($\lambda = 0,71 \cdot 10^{-10}$ m). Pour avoir une diffraction optimale, il faut utiliser une longueur d'onde ayant le même ordre de grandeur que l'espace interatomique étudié (Aronica, 2010).

Lorsque les rayons X frappent un cristal, cela donne une émission de rayonnement dans toutes les directions de même longueur d'onde et de phase cohérente. Ces interférences vont être constructives dans certaines directions (c'est-à-dire que les ondes s'additionnent), destructives dans d'autres (c'est-à-dire que les ondes s'annulent). Ces interférences d'ondes diffusées forment le phénomène de diffraction. Les directions du faisceau diffracté dans lesquelles les interférences constructives donnent des pics de diffraction, sont définis par la loi de Bragg (Norbert, 1996) (figure 45).

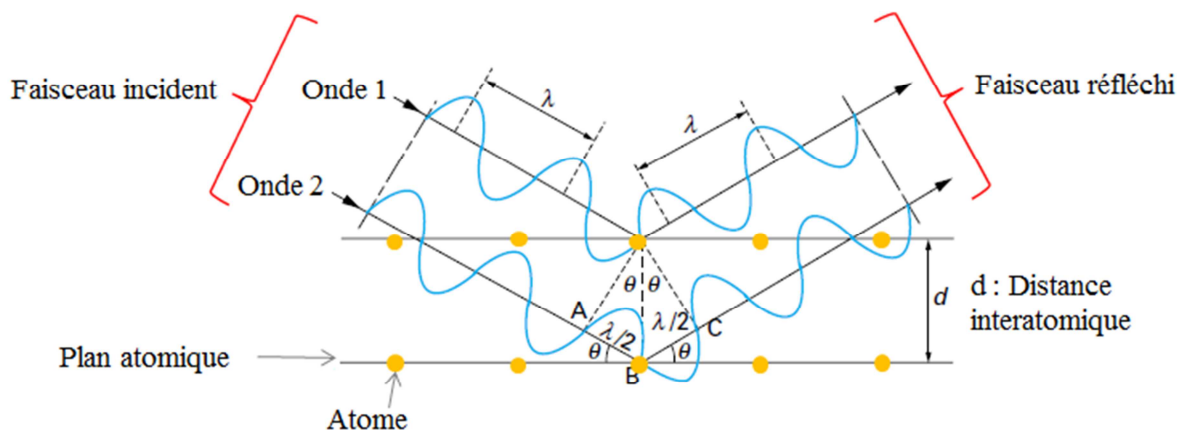


Figure 45 : Illustration de la loi de Bragg (schéma adapté de Norbert (1996)).

Sur la figure 45, la différence de chemin notée Δ entre les ondes 1 et 2 correspond à l'équation 12.

$$\Delta = AB + BC = 2AB \quad \text{Équation 12}$$

Or,

$$AB = d \cdot \sin \theta \quad \text{Équation 13}$$

θ = demi - angle de déviation (la moitié de l'angle entre le faisceau incident et le faisceau réfléchi)

Donc, l'équation 12 devient :

$$\Delta = 2d \cdot \sin \theta \quad \text{Équation 14}$$

Si la différence de chemin parcouru des interférences constructives est égale à un multiple entier de la longueur d'onde λ , la loi Bragg est satisfaite et s'exprime selon l'équation 15.

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin \theta \quad \text{Équation 15}$$

Avec :

d = la distance interatomique

n = ordre de réflexion (nombre entier),

λ = longueur d'onde des rayons X.

Le diffractogramme obtenu représente l'intensité diffractée en fonction de l'angle 2θ formé. La nature des bandes de diffraction (position, largeur, intensité) renseigne sur l'état cristallin de l'échantillon. Les intensités des pics déterminent la distribution des atomes à l'intérieur de l'état cristallin. Plus les raies de diffraction sont fines, plus le réseau est cristallin. Par la loi de Bragg, la position en 2θ est convertie en distance. Chaque pic peut alors être associé à un plan atomique imaginaire selon les indices de Miller (figure 46) qui désignent la face d'un cristal (Norbert, 1996; Aronica, 2010; Haziza and Deleporte, 2014).

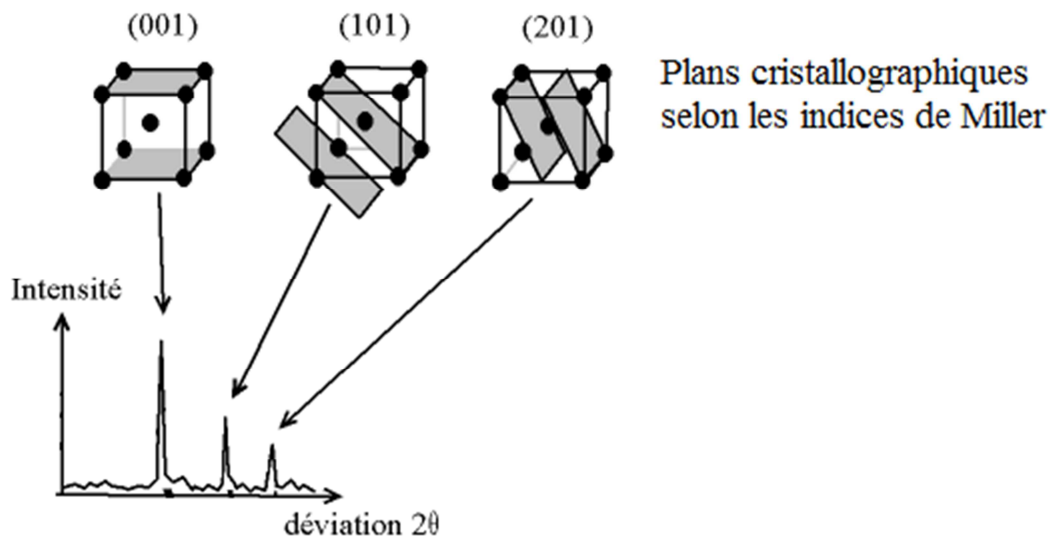


Figure 46 : Association de chaque pic obtenu par diffraction en rayons X à un plan atomique imaginaire selon les indices de Miller (Bahrani, 2012).

2.3.1.2 Protocole

30 à 50 mg d'échantillons équilibrés à une Aw de 0,75 ont été placés dans une rondelle en cuivre entre deux feuilles de ruban adhésifs afin d'éviter une perte d'eau en cours d'analyse. Les échantillons ont été examinés à température ambiante par la diffraction des rayons X aux grands angles (Wide Angle X-ray Scattering (WAXS)). Les diagrammes de diffraction ont été enregistrés sur un diffractomètre Bruker D8 Discover. Le rayonnement $\text{CuK}_{\alpha 1}$ ($\lambda=1,5405 \text{ \AA}$) a été produit dans un tube scellé à 40kV et 40mA, et était sélectionné au moyen de miroirs croisés de Göbel, le rendant parallèle et collimaté pour produire un faisceau de 500 μm de

diamètre. Les diagrammes de diffraction des rayons X ont été enregistrés en transmission en utilisant un détecteur bidimensionnel Gaddas. Le temps d'acquisition était de 10 minutes. Les spectres obtenus ont été normalisés pour des angles 2θ compris entre 3 et 30° .

La diffraction des rayons X a été réalisée par l'équipe de recherche « Interfaces et systèmes dispersés (ISD) » de l'unité BIA (Biopolymères – Interactions – Assemblages) de l'INRA de Nantes.

2.3.2 Analyse enthalpique différentielle

2.3.2.1 Principe

Cette technique s'appelle également « analyse calorimétrique différentielle ». Toutefois, la norme ISO 11357 recommande l'utilisation de la dénomination anglaise DSC (Differential Scanning Calorimetry) (Norme internationale ISO 11357-1, 2009; Grenet and Legendre, 2010).

La DSC est une technique d'analyse thermique permettant d'étudier les transitions thermiques de molécules (protéines, amidon, eau...) afin de déterminer notamment les propriétés comme par exemple la température de cristallisation ou la température de fusion.

Le principe de la DSC repose sur la différence de flux de chaleur qui s'établit entre l'échantillon et la référence inerte, lors d'un chauffage ou d'un refroidissement, tout en maintenant leurs températures égales sous atmosphère contrôlée. En pratique, cela consiste à mesurer la quantité d'énergie requise pour chauffer (ou refroidir) un échantillon en fonction de la température, par rapport à une référence. L'appareil ajuste donc la quantité d'énergie transmise à l'échantillon afin que sa température demeure semblable à celle de la référence. Cette analyse se déroule en présence d'un gaz inerte (azote ou argon) pour éviter les réactions d'oxydation de l'échantillon avec l'air de la chambre. Cette différence de flux est enregistrée en fonction du temps. Chaque variation de flux observée sur le thermogramme correspond à un changement de phase spécifique : des phénomènes de cristallisation se traduisent par des pics exothermiques, les phénomènes de fusion par des pics endothermiques (Perla, 2006).

Ce flux de chaleur est directement proportionnel à la capacité calorifique de l'échantillon analysé. L'enthalpie mise en jeu lors de la réaction est donc proportionnelle à la surface du pic (Grenet and Legendre, 2010).

La DSC est couramment utilisée pour caractériser la gélatinisation et la retrogradation des molécules de l'amidon, ainsi que pour la mise en évidence des complexes amylose - ligand. Un exemple de thermogramme typique de suspension d'amidon de maïs rétrogradé (34 % m/m) chauffée de 30°C à 180°C est présenté en figure 47.

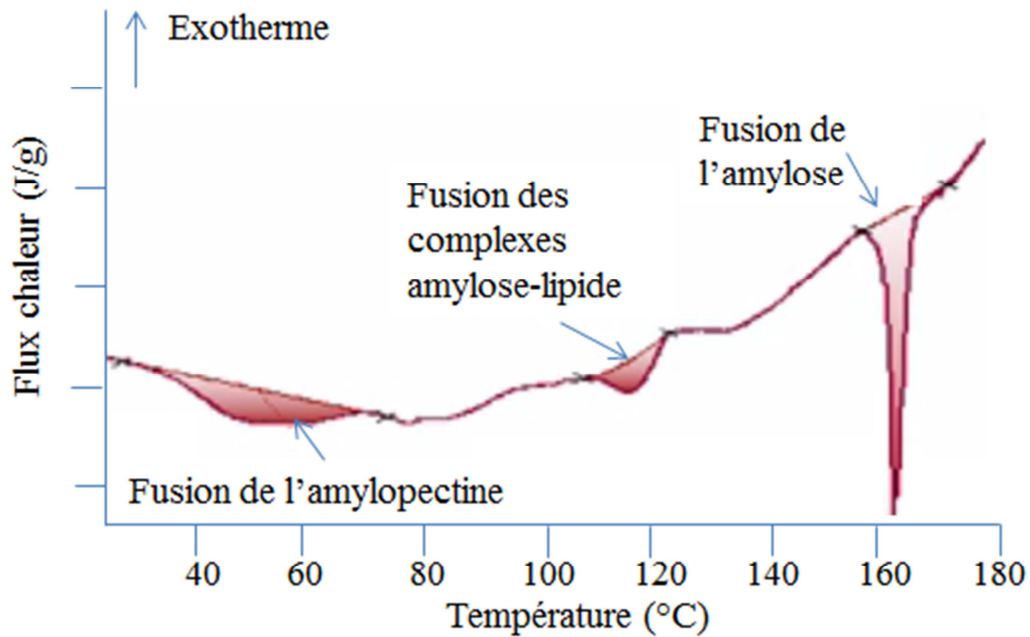


Figure 47 : Thermogramme de DSC typique d'une suspension d'amidon de maïs rétrogradé (34 % m/m) lors d'une cinétique de chauffage obtenu par un microcalorimètre de la marque Setaram de 20°C à 180°C à 0,7°C/min (André Rémi de la société Setaram Instruments France, 2016).

Le thermogramme présente trois endothermes correspondant aux transitions hydrothermiques de l'amidon. À faible température (environ 50°C), le pic endothermique correspond à la fusion de l'amylopectine. À environ 120°C, le deuxième pic endothermique correspond à la fusion des complexes amylose – lipide. Enfin, à haute température (environ 160°C), il s'agit de la fusion de l'amylose.

Les complexes amylose - ligand sont thermoréversibles. Un exotherme est observé lors du refroidissement (Ahmadi-Abhari, 2013).

2.3.2.2 Protocole

Les mesures ont été réalisées avec un microcalorimètre SETARAM™ MicroDSC7® (SETARAM 161 instrumentation, France).

30 mg d'échantillons équilibrés à une A_w de 0,75 et 500 μL d'eau MilliQ® ont été déposés dans une capsule en inox. La capsule en inox de référence contenait 500 μL d'eau MilliQ®. Les capsules ont ensuite été scellées, déposées dans le four de l'appareil et soumises à un chauffage et un refroidissement contrôlé. Les thermogrammes ont été enregistrés au cours du cycle suivant :

- montée en température de 10°C à 120°C à 1°C/min
- descente en température de 120°C à 10°C à 1°C/min

- montée en température de 10°C à 120°C à 1°C/min dans le but de déterminer si les transitions thermiques observées sont réversibles.

Les analyses DSC ont été réalisées par l'équipe de recherche « Interfaces et systèmes dispersés (ISD) » de l'unité BIA (Biopolymères – Interactions – Assemblages) de l'INRA de Nantes.

3 Extraction et quantification des composés d'arôme

3.1 Extraction

L'extraction des composés d'arôme a été réalisée à partir des matrices étudiées et d'échantillons liquides obtenus suites aux divers protocoles mis en œuvre. Les méthodes d'extraction ont donc été adaptées selon la nature de l'échantillon : extraction liquide - liquide et extraction solide – liquide. Ces extractions ont été réalisées à température ambiante.

En plus de ces deux méthodes d'extraction, la microextraction en phase solide (SPME, Solid Phase MicroExtraction) et l'extraction - distillation simultanée (Likens – Nickerson) ont également été mises en œuvre.

3.1.1 Extractions solide - liquide

Les extractions solide – liquide ont été réalisées dans l'objectif de déterminer l'efficacité du piégeage du carvacrol par la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac.

3.1.1.1 Protocole d'extraction du carvacrol non piégé

En fin de traitement thermomécanique, les matrices ont été aliquotées dans des flacons à raison de cinq grammes par flacon. L'extraction solide - liquide a été réalisée soit immédiatement en fin de traitement thermomécanique, soit 24 heures après la fin du traitement thermomécanique. Dans ce dernier cas, le refroidissement a été effectué dans un bain-marie afin de contrôler et de standardiser la rampe de refroidissement entre tous les échantillons. La température finale était la température ambiante. La cinétique de refroidissement est présentée en figure 48.

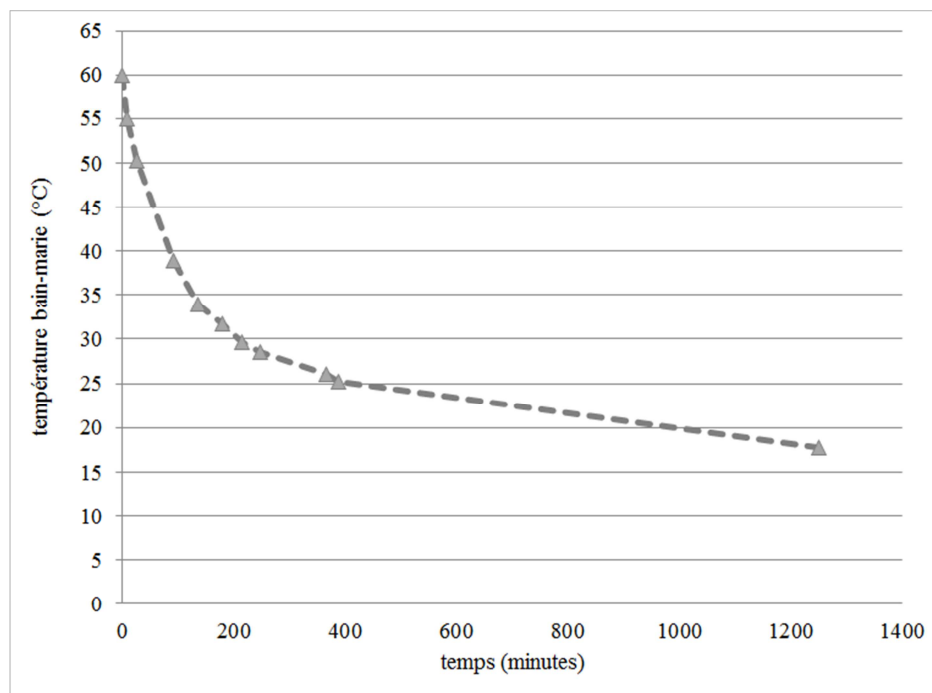


Figure 48 : Cinétique de refroidissement des matrices en bain-marie de 60°C à la température ambiante pendant 24 heures.

Les extraits obtenus à T0 (immédiatement en fin de traitement thermomécanique) seront appelés T(0h) ; T(24h) pour ceux obtenus à T24 (24 heures après la fin du traitement thermomécanique).

Les étalons d'extraction de chromatographie utilisés étaient les mêmes que ceux utilisés lors des extractions liquide - liquide et des extractions - distillations simultanées (Likens - Nickerson). Une solution de linalol (Fluka, CAS 78-70-6, pureté 99 %) préparée à 4 g/L dans de l'éthanol absolu a été utilisée comme étalon d'extraction. Une solution d'octanoate d'éthyle (Aldrich, CAS 106-32-1, pureté 98 %) préparée à 4 g/L dans le mélange d'acétate d'éthyle / éthanol (3/1, v/v) a été utilisée comme étalon de chromatographie.

Pour cette extraction solide - liquide, le choix du solvant d'extraction ainsi que le protocole repose sur les travaux de Cayot, Lafarge, Bou-Maroun & Cayot (2016). En effet, le choix avait été fait de ne plus utiliser le dichlorométhane (CAS 75-09-2) en raison de sa toxicité. Le solvant retenu selon les résultats de l'étude était un mélange d'éthyle acétate / éthanol (3/1, v/v) (Sigma, pureté de 99 %, CAS éthyle acétate 141-78-6, CAS éthanol 64-17-5).

Les extractions solide - liquide ont été conduites sur des matrices non déstructurées au préalable. 25 mL du mélange d'acétate d'éthyle / éthanol (3/1, v/v) et 250 µL d'étalon d'extraction ont été ajoutés aux cinq grammes d'échantillon. L'ensemble a été placé cinq minutes dans un bain à ultrasons Branson Mod 5210® (Branson, USA) à une fréquence fixe de 47 kHz ± 6 %. Immédiatement après la sonication, les échantillons ont été centrifugés à 6 660 g pendant 10 minutes à 20°C. Le surnageant de centrifugation a été prélevé, déshydraté en utilisant du sulfate de sodium anhydre (Sigma, CAS 7757-82-6) puis filtré sur laine de

verre (Sigma 20383, Supelco Glass Wool, Phosphoric Acid Treated). 250 μ L d'octanoate d'éthyle ont été ajoutés et le volume final a été ajusté à 25 mL. Les extractions ont été faites quatre fois à partir de deux batches de fabrication.

Les extraits ont été analysés par GCMS (Gas Chromatography Mass Spectrometry, chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse). Les rendements d'extraction ont été corrigés selon l'étalon d'extraction. La quantification du carvacrol a été calculée selon l'étalon de chromatographie. Pour cela, une courbe de calibration en six points a été réalisée et est présentée en figure 49.

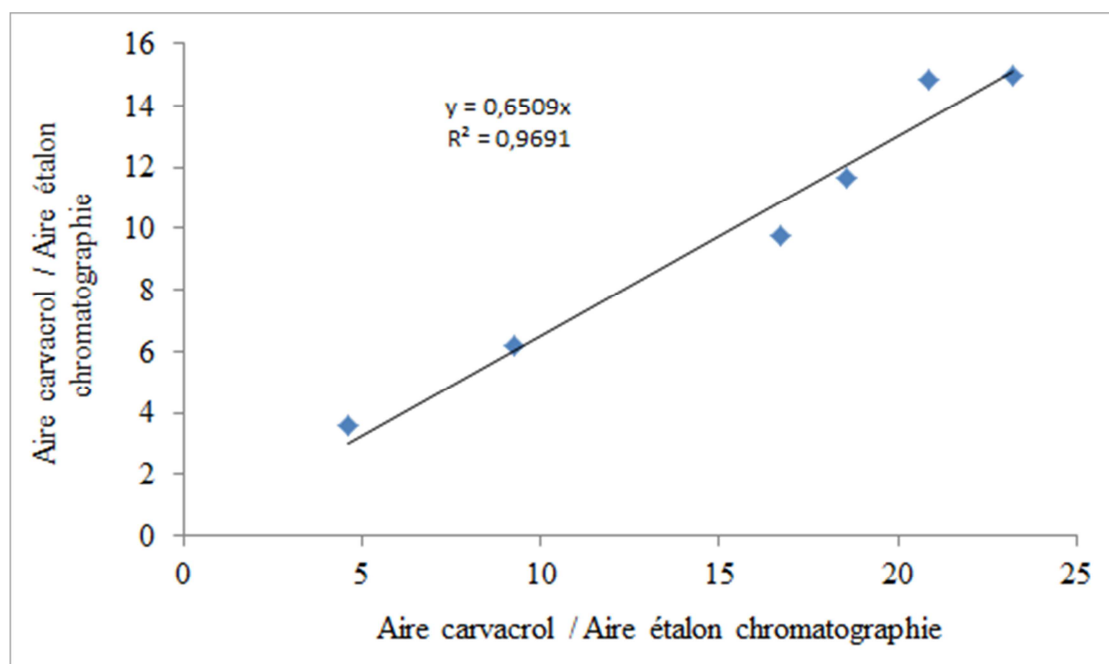


Figure 49 : Droite d'étalonnage utilisée pour la quantification du carvacrol suite à l'extraction solide - liquide

3.1.1.2 Conditions chromatographiques

Un μ L de chaque extrait a été analysé à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse 5973 (Hewlett – Packard, USA) équipé d'un injecteur split / splitless (240°C) en mode split (ratio de 5), d'une colonne capillaire DB-WAX (30 m x 0,32 mm de diamètre interne, 0,5 μ m d'épaisseur de film, J&W Scientific) et couplé à un détecteur spectromètre de masse HP 5973 (impact électronique à 70 eV, température de la source d'ionisation chimique à 230°C et température de la ligne de transfert à 240°C). Le gaz vecteur utilisé était l'hélium à un débit de 1,5 mL/min (44 cm/sec).

La température du four était programmée de 55°C à 120°C à 5°C/min puis de 120°C à 240°C à 20°C/min et isotherme à 240°C pendant 10 minutes. La quantification a été réalisée en mode « total ion » (de 29 à 500 unités de masse atomique).

3.1.2 Extractions liquide - liquide

Les extractions liquide – liquide ont été très peu employées au profit de la technique de microextraction en phase solide (SPME). Les extractions liquide – liquide ont été utilisés uniquement pour extraire le propylène glycol localisé dans la phase continue de la matrice amyliacée.

3.1.2.1 Protocole d'extraction du propylène glycol localisé dans la phase continue

Comme précédemment, le solvant retenu était un mélange d'éthyle acétate / éthanol (3/1, v/v) (Cayot, Lafarge, Bou-Maroun & Cayot (2016)). .

Le linalol (Fluka, CAS 78-70-6, pureté de 99 %, préparé à 4 g/L dans l'éthanol absolu) a été utilisé comme étalon d'extraction et l'octanoate d'éthyle (Aldrich, CAS 106-32-1, pureté de 98 %) comme étalon de chromatographie (préparé à 4 g/L dans le mélange d'éthyle acétate / éthanol (3/1, v/v)).

Cette extraction a été réalisée à partir des résidus des extraits aqueux obtenus lors de l'extraction - distillation simultanée (Likens-Nickerson) (chapitre 3.1.4).

140 g de résidus des extraits aqueux de l'extraction - distillation simultanée (Likens - Nickerson), 140 g du solvant d'extraction (mélange d'éthyle acétate / éthanol (3/1, v/v)) et 250 µL de linalol (étalon d'extraction) ont été fortement agités par agitation magnétique pendant cinq minutes. En raison de la forte vitesse d'agitation, un vortex dans la solution agitée apparaissait. Immédiatement en fin d'agitation, la phase organique a été prélevée et déshydratée avec du sulfate de sodium anhydre (Sigma, CAS 7757-82-6). Des expériences préliminaires avaient montré qu'un seul lavage permettait une extraction optimale du propylène glycol. Les extraits ont ensuite été filtrés sur laine de verre (Sigma 20383, Supelco Glass Wool, Phosphoric Acid Treated) et concentrés à un volume final de 9 mL via un rotavapor[®] (Buchi, France, 40°C, 120 mbar). 500 µL d'octanoate d'éthyle ont été ajoutés comme étalon de chromatographie. Le volume de l'extrait a été ajusté à 10 mL Les extractions ont été réalisées trois fois. Chaque répétition correspond à fabrication différente préparée au RVA[®].

Les extraits ont été analysés par GCMS. Les rendements d'extraction ont été corrigés selon l'étalon d'extraction. La quantification du propylène glycol a été calculée selon l'étalon de chromatographie. Pour cela, une courbe de calibration en six points a été réalisée et est présentée en figure 50.

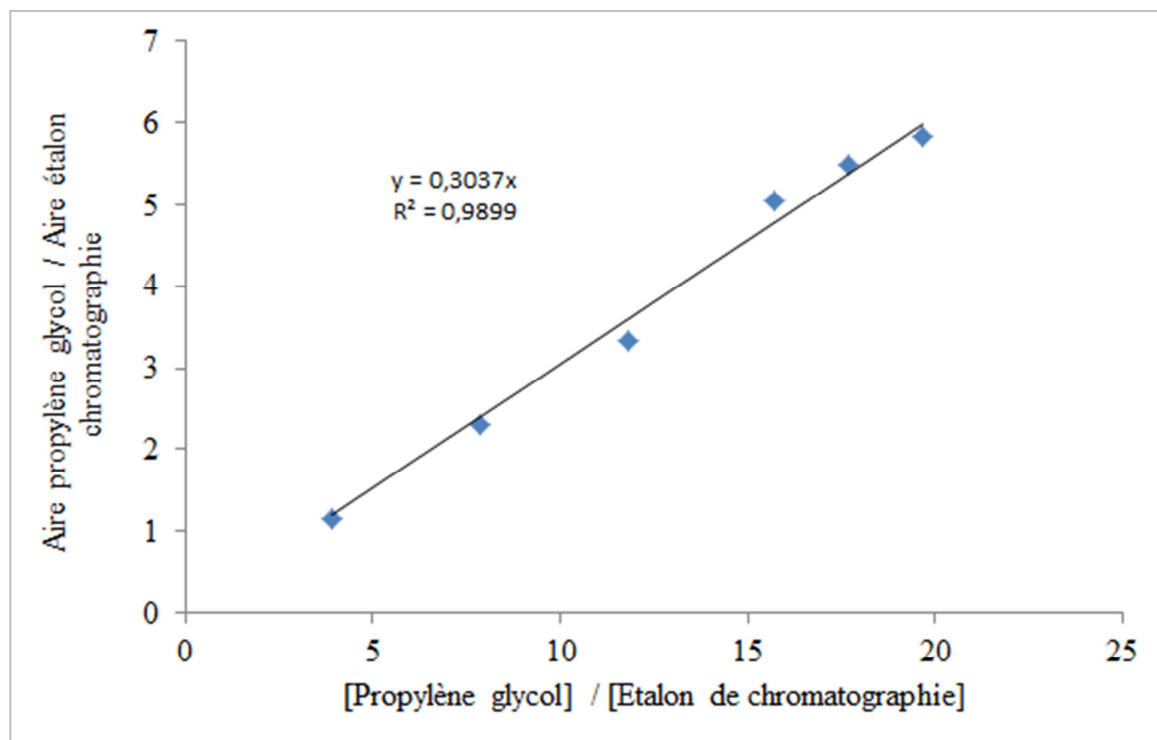


Figure 50 : Droite d'étalonnage utilisé pour la quantification du propylène glycol suite à l'extraction liquide - liquide

3.1.2.2 Conditions chromatographiques

Un μL de chaque extrait a été analysé à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse 5973 (Hewlett – Packard, USA) équipé d'un injecteur split / splitless (240°C) en mode split (ratio de 5), d'une colonne capillaire DB-WAX (30 m x 0,32 mm de diamètre interne, $0,5\ \mu\text{m}$ d'épaisseur de film, J&W Scientific) et couplé à un détecteur spectromètre de masse HP 5973 (impact électronique à 70 eV, température de la source d'ionisation chimique à 230°C et température de la ligne de transfert à 240°C). Le gaz vecteur utilisé était l'hélium à un débit de 1,5 mL/min (44 cm/sec).

La température du four était programmée de 55°C à 120°C à $5^\circ\text{C}/\text{min}$ puis de 120°C à 240°C à $20^\circ\text{C}/\text{min}$ et isotherme à 240°C pendant 10 minutes. La méthode SIM (Selected Ion Monitoring, enregistrement d'ion spécifique) a été utilisée comme méthode de détection en raison de sa haute sensibilité. Les rapports de masse/charge (m/z) retenus correspondant aux ions moléculaires protonés (ion quantification / ion confirmation) étaient : m/z 93/121 (linalol), m/z 88/127 (octanoate d'éthyle), m/z 45/61 (propylène glycol).

3.1.3 Microextraction en phase solide (SPME)

Contrairement aux méthodes précédemment citées, la technique de microextraction en phase solide (SPME) est une méthode d'extraction sans solvant à partir d'échantillons aqueux, solides ou gazeux, nécessitant peu de préparation d'échantillon et un faible volume d'échantillon (quelques millilitres). Les composés sont extraits directement de l'échantillon

par adsorption sur une fibre de silice fondue revêtue d'un polymère. La fibre s'utilise immergée dans l'échantillon ou dans l'espace de tête au-dessus de l'échantillon. C'est cette dernière modalité qui a été retenue. La technique de microextraction en phase solide (SPME) ne correspond pas à une extraction totale du composé mais à une extraction suite à un double équilibre entre la matrice et la phase gazeuse, et entre la phase gazeuse et le polymère de la fibre.

Cette méthode a été utilisée pour déterminer la quantité de carvacrol présent dans le liquide de synérèse. Elle a également été employée simultanément avec la méthode des ajouts dosés. Cette dernière modalité est développée dans le paragraphe concernant la méthode des ajouts dosés (chapitre 3.2 « Quantification des composés d'arôme »).

3.1.3.1 Principe

Cette méthode d'analyse de l'espace de tête est simple, pratique, rapide, sans solvant et ne requiert pas de grandes quantités d'échantillons (Fernandez and Cabrol-Bass, 2007).

Le principe est basé sur le partage des composés d'arôme entre une phase gazeuse et un film polymérique de faible épaisseur. Il s'agit d'une fibre de silice (1 à 2 cm de long) recouverte d'un film polymérique. Il existe différentes natures de films polymériques suivant la nature du composé volatil à extraire (Fernandez and Cabrol-Bass, 2007). La quantité de polymère enrobant la fibre et la nature de ce polymère influent sur la quantité extraite.

L'échantillon est placé dans un flacon hermétique clos par un septum. L'aiguille de la fibre SPME perce le septum pour permettre l'introduction de la fibre dans l'espace de tête de l'échantillon (figure 51). Une fois l'extraction terminée, la fibre est retirée et désorbée directement dans l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse.

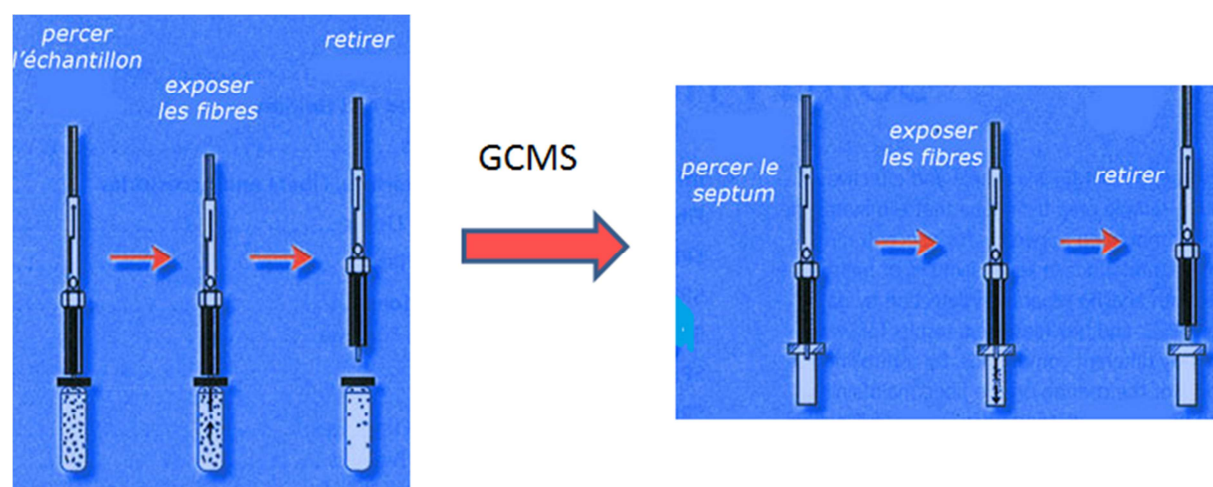


Figure 51 : Principe de la microextraction en phase solide (SPME) (Chromoptic, 2016).

La fibre est ensuite reconditionnée par chauffage dans l'injecteur (200 à 250°C) pendant 5 à 10 minutes. Les fibres peuvent être ainsi réutilisées (Fernandez and Cabrol-Bass, 2007).

Dans le but d'obtenir une extraction optimale, il est nécessaire d'optimiser plusieurs paramètres (Gwenola and Fernand, 2003) :

- le temps d'extraction selon la température et l'agitation appliquée;
- la force ionique de l'échantillon. Comme dans d'autres procédés d'extraction, des sels comme NaCl, K₂CO₃ et Na₂SO₄ augmentent le rendement de l'extraction des composés très hydrophiles
- la température et le temps de désorption des composés du polymère.

Parmi les inconvénients le plus souvent avancés figurent la reproductibilité et la fragilité des fibres. Mais, avec des coefficients de variation de 0,5 à 10 %, la reproductibilité reste meilleure que celles de l'extraction liquide - liquide (10 à 50 %) et de l'extraction solide - liquide (5 à 20 %).

3.1.3.2 Protocole de quantification du carvacrol dans le liquide de synérèse par SPME

Il existe différentes méthodes pour récupérer le liquide de synérèse : la centrifugation (Varavinit, Shobsngob et al., 2002), la filtration sous vide (Lee, Baek et al., 2002), l'analyse gravimétrique (Chen, Schols et al., 2003), la mesure du diamètre du front d'eau libérée sur le papier filtre mis en contact de l'échantillon (Ferrero, Martino et al., 1994). Cependant, pour toutes ces méthodes, si les conditions opératoires ne sont pas maîtrisées, les résultats obtenus seront imprécis (Charoenrein, Tatirat et al., 2008).

La méthode la plus couramment employée en raison de sa simplicité de mise en œuvre est la centrifugation de la matrice (Charoenrein, Tatirat et al., 2008). C'est cette méthode qui a été retenue pour notre étude. Une étude préliminaire a permis de déterminer les conditions optimum. Le liquide de synérèse des matrices a été recueilli suite à une centrifugation à 8 000 g pendant 15 minutes à 25°C de la matrice âgée de 24 heures ou ayant subi un vieillissement accéléré par des cycles de congélation (24 heures à -18°C) / décongélation (2 heures à 30°C). Le liquide de synérèse a ensuite été filtré sur laine de verre (sigma 20383, Supelco Glass Wool, Phosphoric Acid Treated) et sur filtre nylon de 45 µm (VWR, référence 514-0067). Un mL de l'échantillon filtré a été transféré dans un flacon de 22 ml (Supelco, USA) contenant 4 µL d'étalon interne d'extraction : 4-sec-butylphénol (Sigma, pureté de 96 %, CAS 99-71-8) préparé à 12 g/L dans du diméthylsulfoxyde (Sigma, pureté 99,5 %, CAS 67-68-5). Le flacon a été immédiatement scellé avec un septum en silicone et agité pendant une minute. Au bout de cinq minutes de mise en équilibre à 40°C, le carvacrol et le sec-butylphenol ont été extraits de l'espace de tête en utilisant une fibre SPME (75 µm DVB/Carboxen/PDMS, réf. 57329, Supelco, USA) pendant cinq minutes à 40°C. Enfin, la fibre a été introduite dans l'injecteur du GCMS et désorbée pendant 15 minutes.

Les rendements d'extraction ont été corrigés selon l'étalon d'extraction. La quantification du carvacrol a été effectuée par rapport à un étalonnage de la méthode en six points avec le carvacrol (figure 52).

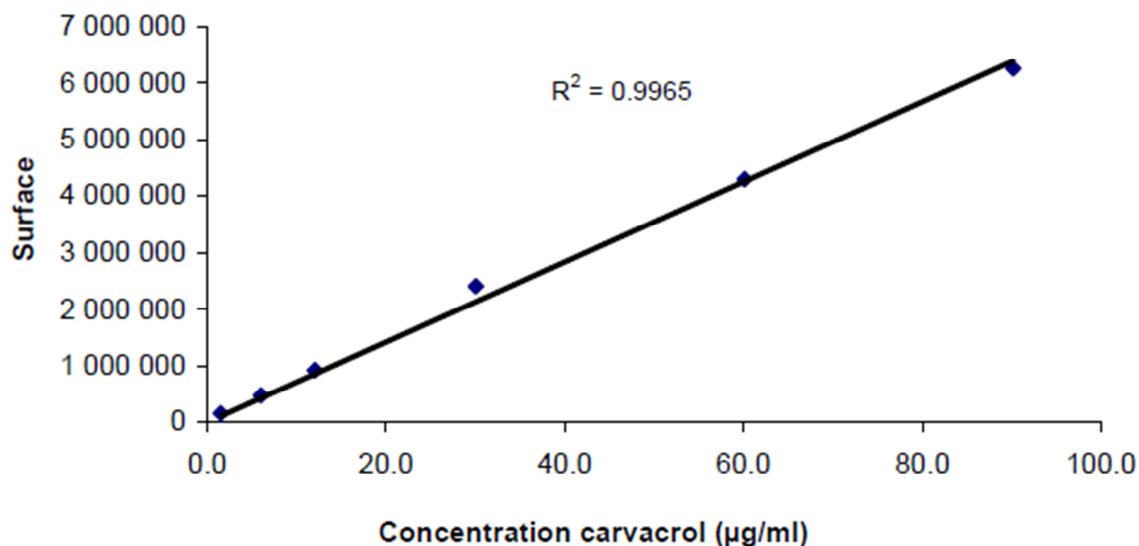


Figure 52 : Droite d'étalonnage du carvacrol en solution aqueuse par SPME (fibre : 75 µm DVB/Carboxen/PDMS, réf. 57329, Supelco, USA).

3.1.3.3 Conditions chromatographiques

Les fibres SPME ont été analysées avec un chromatographe en phase gazeuse Shimadzu 2010 (Japon) équipé d'un injecteur split/splitless injecteur (240°C, 0,115 bar) en mode split (ratio de 20 / 1) et d'un détecteur Shimadzu QP2010+ (impact électronique à 70 eV, température de la source d'ionisation à 200°C). Le chromatographe est équipé d'une colonne capillaire FFAP (30 m × 0.32 mm diamètre interne, épaisseur de film de 0.25 µm, J and W Scientific). L'hélium était le gaz vecteur avec une vitesse de 53 cm / sec. La méthode SIM (Selecte Ion Monitoring, enregistrement d'ion spécifique) a été utilisée comme méthode de détection en raison de sa haute sensibilité. Le rapport de masse/charge (m/z) retenu correspondant aux ions moléculaires protonés était de 91.

3.1.4 Extraction - distillation simultanée (Likens - Nickerson)

La méthode simultanée d'extraction - distillation (Likens - Nickerson) a été employée pour quantifier la quantité totale de composés d'arôme présents dans les matrices amylicées ainsi que la quantité de carvacrol présent dans la phase continue des matrices amylicées.

Elle présente l'avantage d'obtenir un extrait ne contenant que les composés volatils, ce qui a facilité l'étape d'analyse chromatographique. En effet, lors de l'extraction solide - liquide, des composés de la matrice peuvent se solubiliser dans le solvant d'extraction, ce qui peut conduire à des difficultés lors de l'étape d'analyse chromatographique.

3.1.4.1 Principe

L'échantillon à extraire est dispersé dans de l'eau et placé dans un ballon qui est chauffé directement (hydrodistillation). Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau. En parallèle, le ballon contenant le solvant d'extraction non miscible à l'eau est chauffé (figure 53). Les vapeurs d'eau enrichies en composés d'arôme se mélangent avec les vapeurs de solvant dans la chambre de mélange puis se condensent et se séparent selon leurs densités respectives

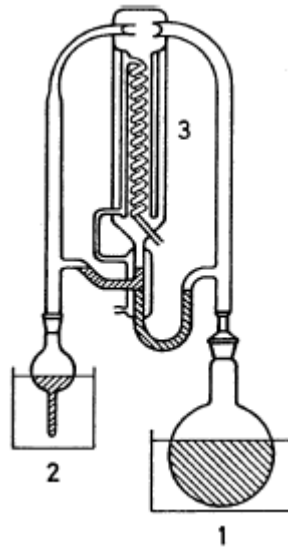


Figure 53 : Appareil de Likens - Nickerson. 1 : ballon chauffé contenant l'échantillon à extraire et de l'eau ; 2 : ballon chauffé contenant le solvant d'extraction 3 : réfrigérant (Belitz and Grosch, 1987).

Les avantages de cette technique sont d'éviter l'extraction des composés non volatils et d'utiliser des quantités limitées en solvant.

Bien que tout solvant organique non miscible à l'eau puisse être utilisé (en ajustant l'appareil en fonction de sa densité), le dichlorométhane (CAS 75-09-2) est le plus adapté (Fernandez and Cabrol-Bass, 2007).

L'inconvénient majeur de cette méthode réside dans la formation possible d'artefacts dus au chauffage de la matrice en milieu aqueux, notamment en présence de protéines (Fernandez and Cabrol-Bass, 2007). Les études précédentes conduites au laboratoire ont permis de valider l'efficacité de cette méthode pour les matrices à base d'amidon (Arvisenet, 2001).

3.1.4.2 Protocole d'extraction du carvacrol et de l'hexanoate d'éthyle des matrices

Pour cette extraction, le solvant utilisé était du dichlorométhane (Sigma, pureté 99,8 %, CAS 75-09-2). Une solution de linalol (Fluka, CAS 78-70-6, pureté 99 %) préparée à 4 g/L dans de l'éthanol absolu a été utilisée comme étalon d'extraction. Une solution d'octanoate d'éthyle (Aldrich, CAS 106-32-1, pureté 98 %) préparée à 2 g/L dans du dichlorométhane a été utilisée comme étalon de chromatographie.

Après 24 heures de stockage à température ambiante, huit grammes de matrices ont été dispersés dans 100 mL d'eau MilliQ[®] saturé en NaCl (330 g/L, Merck). 250 µL de linalol ont été ajoutés comme étalon d'extraction. L'extraction a été réalisée avec 25 mL de dichlorométhane pendant 30 minutes à partir de l'ébullition de chaque solution. En fin d'extraction, l'extrait organique de dichlorométhane a été déshydraté avec du sulfate de sodium anhydre (Sigma, CAS 7757-82-6) et filtré sur laine de verre (sigma 20383, Supelco Glass Wool, Phosphoric Acid Treated). 500 µL d'octanoate d'éthyle ont été ajoutés comme étalon de chromatographie. Le volume de l'extrait a été ajusté à 25 mL. Pour chaque matrice, l'extraction a été réalisée trois fois à partir de deux fabrications différentes.

Les extraits organiques ont été analysés par GCMS. Les rendements d'extraction ont été corrigés selon l'étalon d'extraction. La quantification de chaque composé d'arôme a été calculée selon l'étalon de chromatographie. Pour cela, pour chaque composé d'arôme, une courbe de calibration en six points a été réalisée et est présentée en figure 54 pour le carvacrol et 55 pour l'hexanoate d'éthyle.

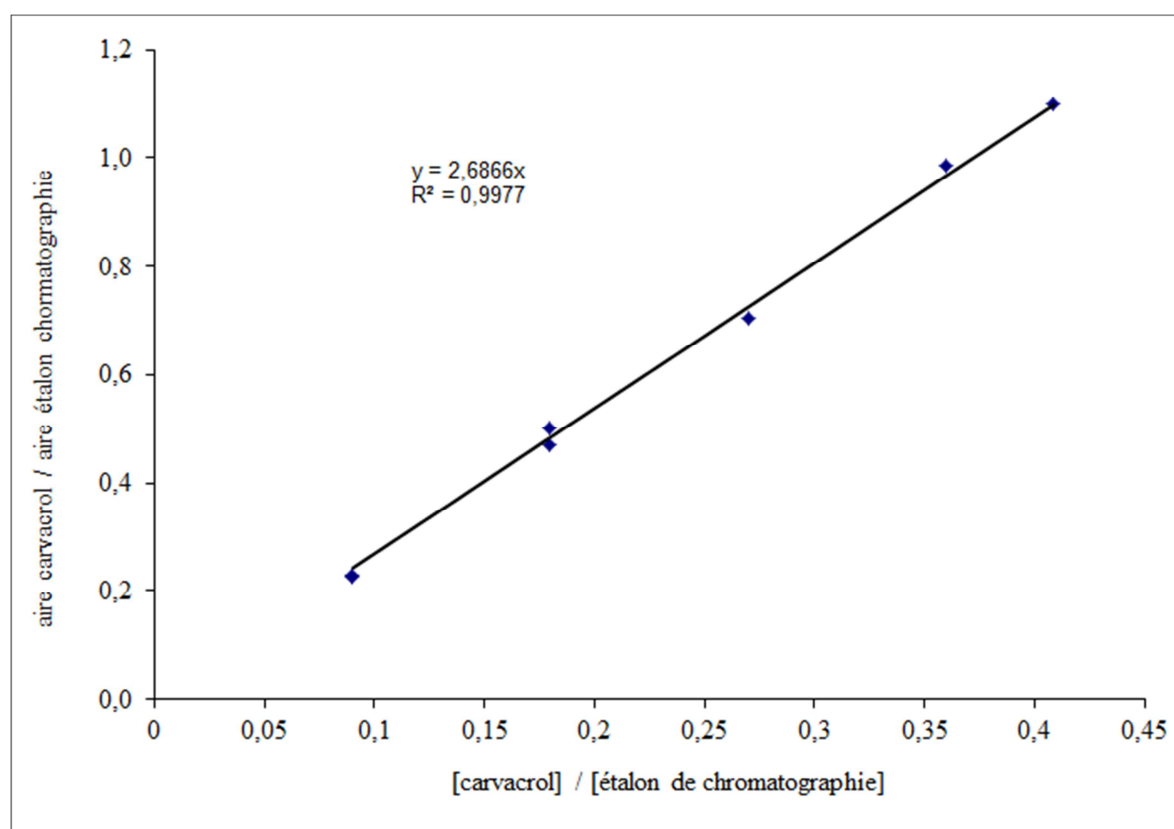


Figure 54 : Droite d'étalonnage utilisée pour la quantification du carvacrol suite aux extractions – distillations simultanées (Likens - Nickerson).

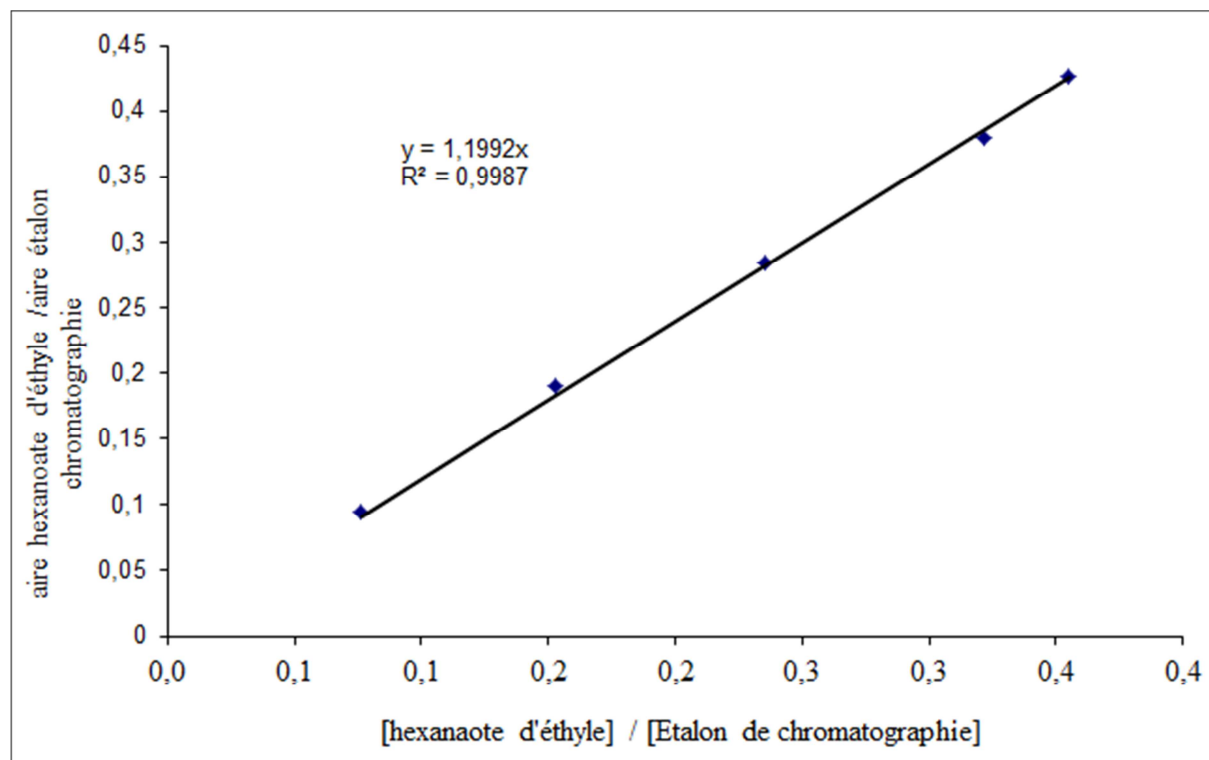


Figure 55 : Droite d'étalonnage utilisée pour la quantification de l'hexanoate d'éthyle suite aux extractions – distillations simultanées (Likens - Nickerson).

Les extraits aqueux obtenus ont été utilisés pour déterminer la quantité de propylène glycol présent dans la matrice et dans la phase continue des matrices. Deux méthodes ont été employées : l'extraction liquide - liquide (chapitre 3.1.2) et la méthode des ajouts dosés couplé à la SPME (chapitre 3.2.3).

3.1.4.3 Protocole d'extraction du carvacrol présent dans la phase continue des matrices

Le solvant utilisé est du dichlorométhane (Sigma, pureté 99,8 %, CAS 75-09-2). Une solution de linalol (Fluka, CAS 78-70-6, pureté 99 %) préparée à 4 g/L dans de l'éthanol absolu a été utilisée comme étalon d'extraction. Une solution d'octanoate d'éthyle (Aldrich, CAS 106-32-1, pureté 98 %) préparée à 2 g/L dans du dichlorométhane a été utilisée comme étalon de chromatographie.

Pour déterminer la quantité de carvacrol présent dans la phase continue des matrices, une étape de séparation de phase (phase continue / phase dispersée) a été réalisée. Trois grammes de chaque matrice ont été dilués dans 17g d'eau MilliQ[®] pour obtenir une concentration d'amidon de 0,9 % (m/m). Le but de cette dilution était d'obtenir une concentration en polysaccharide permettant l'optimisation de la sédimentation de la phase dispersée. Après agitation manuelle et homogénéisation au vortex, les échantillons dilués ont été centrifugés à 4 997 g pendant 15 minutes à 25°C. Puis le surnageant a été prélevée délicatement.

20 mL de surnageant ont été dispersées dans 100 mL d'eau MilliQ[®] saturé en NaCl (330 g/L, Merck). 250 µL de linalol ont été ajoutés comme étalon d'extraction. L'extraction a été réalisée avec 25 mL de dichlorométhane pendant 30 minutes à partir de l'ébullition de chaque solution. En fin d'extraction, l'extrait organique de dichlorométhane a été déshydraté avec du sulfate de sodium anhydre (Sigma, CAS 7757-82-6) et filtré sur laine de verre (Sigma 20383, Supelco Glass Wool, Phosphoric Acid Treated). 500 µL d'octanoate d'éthyle ont été ajoutés comme étalon de chromatographie. Le volume de l'extrait était ajusté à 25 mL. Pour chaque échantillon, l'extraction a été réalisée trois fois à partir de deux fabrications différentes.

Les extraits organiques ont été analysés par GCMS. Les rendements d'extraction ont été corrigés selon l'étalon d'extraction. La quantification du carvacrol a été calculée selon l'étalon de chromatographie (figure 54).

3.1.4.4 Conditions chromatographiques

Un µL de chaque extrait a été analysé à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse 5973 (Hewlett-Packard, USA) équipé d'un injecteur split / splitless (240°C) en mode split (ratio de 5), d'une colonne capillaire DB-WAX (30 m x 0,32 mm de diamètre interne, 0,5 µm d'épaisseur de film, J&W Scientific) et couplé à un détecteur spectromètre de masse HP 5973 (impact électronique à 70 eV, température de la source d'ionisation chimique à 230°C et température de la ligne de transfert à 240°C). Le gaz vecteur utilisé était l'hélium à un débit de 1,5 mL/min (44 cm/sec).

La température du four était programmée de 55°C à 120°C à 5°C/min puis de 120°C à 240°C à 20°C/min et isotherme à 240°C pendant 10 minutes. La méthode SIM (Selected Ion Monitoring, enregistrement d'ion spécifique) a été utilisée comme méthode de détection en raison de sa haute sensibilité. Les rapports de masse/charge (m/z) retenus correspondant aux ions moléculaires protonés (ion quantification / ion confirmation) étaient : m/z 93/121 (linalol), m/z 88/127 (octanoate d'éthyle), m/z 135/150 (carvacrol), m/z 88/99 (hexanoate d'éthyle).

3.2 Quantification des composés d'arôme

La quantification des composés d'arôme a été réalisée par un étalonnage interne. Une autre méthode a été utilisée pour quantifier les composés d'arôme. Il s'agit de la méthode des ajouts dosés.

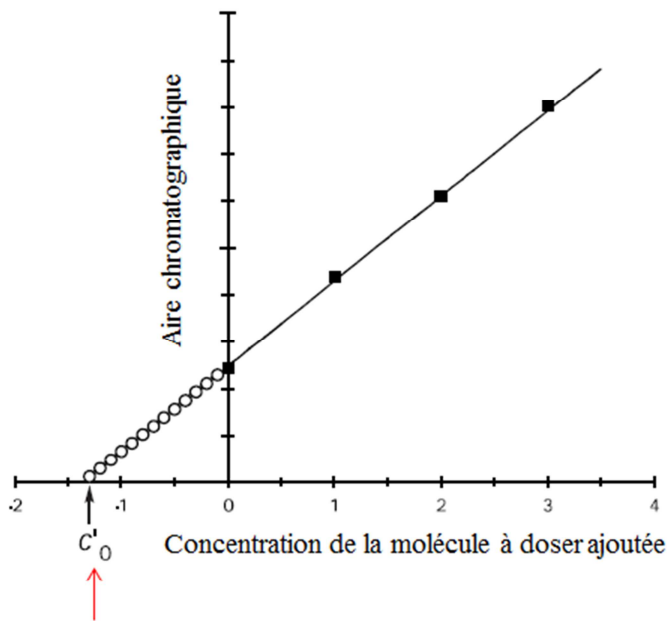
La méthode des ajouts dosés a été utilisée :

- Pour déterminer la quantité totale d'acétate d'éthyle présent dans les matrices
- Pour déterminer la quantité de propylène glycol présent dans la phase continue des matrices

Quel que soit l'objectif, la méthode des ajouts dosés a été couplée avec l'analyse de l'espace de tête par SPME.

3.2.1 Principe de la méthode des ajouts dosés

L'extrait organique ou aqueux contenant la molécule à doser est fractionné en volumes équivalents dans différents flacons. Des quantités connues et croissantes de composé pur à quantifier sont ajoutées dans chaque flacon. La concentration totale de la molécule à doser est égale à la somme de la concentration inconnue de l'extrait et de la concentration connue de l'ajout. La concentration totale varie donc linéairement. Chaque solution est analysée, dans notre cas par chromatographie en phase gazeuse couplé au spectromètre de masse (GCMS). La représentation graphique de l'aire chromatographique (A) en fonction de la quantité ajoutée de molécule pure à doser (C) est tracée (figure 56).



Concentration de notre solution initiale inconnue

Figure 56 : Représentation graphique de la méthode des ajouts dosés. Les carrés sont les points expérimentaux. Les points extrapolés à partir de la régression linéaire sont représentés par des cercles vides (Bruce and Gill, 1999).

Une simple régression linéaire est appliquée et l'équation 16 est obtenue.

$$A = aC + b \quad \text{Équation 16}$$

Avec a la pente de la droite de régression et b l'ordonnée à l'origine de la droite de régression.

Selon la figure 55, si A devient nul, alors C devient nulle également. L'équation 16 devient :

$$C = -\frac{b}{a} \quad \text{Équation 17}$$

Or, C correspond à la différence entre la concentration finale et la concentration initiale en molécule à doser. Donc si A devient nulle, la concentration finale est nulle et par conséquent C correspond à la quantité inconnue de molécules à doser. La concentration de la molécule à doser est donc très facilement calculée à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine de la

droite de régression de la représentation graphique de l'aire chromatographique en fonction de la concentration en molécules ajoutées (équation 17).

3.2.2 Détermination de la quantité totale d'acétate d'éthyle présent dans les matrices

En raison de sa volatilité élevée, l'extraction et la quantification de l'acétate d'éthyle n'ont pas pu être réalisées via l'extraction - distillation simultanée (Likens – Nickerson) précédemment décrites (chapitre 3.1.4).

Les matrices aromatisées avec l'acétate d'éthyle ont été fabriquées via le RVA selon le protocole décrit précédemment (chapitre 1.2). Pour appliquer la méthode des ajouts dosés, le volume de la solution mère d'acétate d'éthyle préparée dans le propylène glycol, injecté dans la préparation, était de 100 μ L (condition initiale), 200 μ L ou 300 μ L. Trois répétitions par niveau de concentration et par matrice ont été réalisées.

En fin de fabrication, quatre grammes d'échantillons ont été transférés dans des vials de 22 mL (Supelco, USA) et immédiatement scellés via un septum en silicone. L'équilibre thermodynamique était atteint en moins d'une heure. Pour des raisons de praticité, le temps d'équilibre appliqué était de 16°C à 40°C.

Après cette période d'équilibre, l'acétate d'éthyle était extrait de l'espace de tête via une fibre SPME (75 μ m Carboxen / PDMS, ref. 57318, Supelco) pendant 15 minutes à 60 °C. Les fibres ont ensuite été insérées dans l'injecteur du GCMS et désorbées pendant 15 minutes.

Les fibres SPME ont été analysées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse 5973 (Hewlett – Packard, USA) équipé d'un injecteur split / splitless (240°C) en mode split (ratio de 5), d'une colonne capillaire DB-WAX (30 m x 0,32 mm de diamètre interne, 0,5 μ m d'épaisseur de film, J&W Scientific) et couplé à un détecteur spectromètre de masse HP 5973 (impact électronique à 70 eV, température de la source d'ionisation chimique à 230°C et température de la ligne de transfert à 240°C). Le gaz vecteur utilisé était l'hélium à un débit de 1,5 mL/min (44 cm/sec).

La température du four était programmée de 45°C à 120°C à 5°C/min puis de 120°C à 240°C à 15°C/min. La quantification a été réalisée en mode « total ion » (de 29 à 500 unités de masse atomique).

3.2.3 Détermination de la quantité de propylène glycol présent dans la phase continue des matrices et détermination de la quantité de propylène glycol présent dans la matrice

Ce dosage a été réalisé à partir des résidus aqueux de l'extraction - distillation simultanée (Likens – Nickerson) obtenus (chapitre 3.1.4). Chaque résidu aqueux a été divisé en trois, soit environ 40 g par résidu. 0,015g de propylène glycol pur a été ajouté à l'un des aliquotes, 0,025g à l'autre aliquote. Puis, après agitation magnétique de chaque aliquote, quatre

grammes d'échantillon ont été transférés dans des vials de 22 mL (Supelco, USA) et immédiatement scellés via un septum en silicone. Le temps d'équilibre était de 16°C à 60°C.

Après cette période d'équilibre, le propylène glycol était extrait de l'espace de tête via une fibre SPME (75 µm Carboxen / PDMS, ref. 57318, Supelco) pendant 15 minutes à 60 °C. La haute teneur en NaCl (330 g/L) des résidus aqueux de l'extraction - distillation simultanée (Likens – Nickerson) a favorisé l'extraction. Les fibres ont ensuite été insérées dans l'injecteur du GCMS et désorbées pendant 15 minutes.

Ces dosages ont été réalisés une fois à partir de résidus aqueux de l'extraction - distillation simultanée (Likens – Nickerson) de matrices (chapitre 3.1.4.2) et deux fois à partir de résidus aqueux de l'extraction - distillation simultanée (Likens – Nickerson) de surnageants issus de la séparation de phase (chapitre 3.1.4.3). Les R^2 obtenus pour chaque régression linéaire (équation 16) étaient supérieurs à 0,97.

Les fibres SPME ont été analysées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse 5973 (Hewlett – Packard, USA) équipé d'un injecteur split / splitless (240°C) en mode split (ratio de 5), d'une colonne capillaire DB-WAX (30 m x 0,32 mm de diamètre interne, 0,5 µm d'épaisseur de film, J&W Scientific) et couplé à un détecteur spectromètre de masse HP 5973 (impact électronique à 70 eV, température de la source d'ionisation chimique à 230°C et température de la ligne de transfert à 240°C). Le gaz vecteur utilisé était de l'hélium à un débit de 1,5 mL/min (44 cm/sec).

La température du four était programmée de 45°C à 120°C à 5°C/min puis de 120°C à 240°C à 15°C/min. La quantification a été réalisée en mode « total ion » (de 29 à 500 unités de masse atomique).

3.3 Détermination des coefficients de partage gaz / matrice

Les coefficients de partage gaz / matrice (K) de chaque composé d'arôme ont été déterminés par la méthode PRV (Phase Ratio Volume).

3.3.1 Principe

La méthode PRV, décrite par Ettre, Welter et al. (1993), est basée sur la l'influence du volume de l'échantillon sur la concentration dans l'espace de tête, en d'autres mots sur la relation entre le coefficient de partage K et le rapport (β) du volume de la phase gazeuse / volume de la phase liquide.

Le coefficient de partage K est défini par l'équation 18.

$$K = \frac{C_G^*}{C_L^*} \quad \text{Équation 18}$$

Avec C_G^* la concentration à l'équilibre du composé volatil dans la phase gazeuse et C_L^* la concentration à l'équilibre du composé volatil dans la phase liquide.

C_G^* et C_L^* peuvent être exprimées selon les équations 19 et 20.

$$C_G^* = \frac{m_G^*}{V_G} \quad \text{Équation 19}$$

$$C_L^* = \frac{m_L^*}{V_L} \quad \text{Équation 20}$$

Avec

m_G^* la masse à l'équilibre du composé volatil dans la phase vapeur,

m_L^* la masse à l'équilibre du composé volatil dans la phase liquide,

V_G le volume de la phase gazeuse,

V_L le volume de la phase liquide.

β relie le volume de la phase gazeuse et le volume de la phase liquide selon l'équation 21.

$$\beta = \frac{V_G}{V_L} \quad \text{Équation 21}$$

En combinant les équations 17, 18, 19 et 20, K s'exprime selon l'équation 22.

$$K = \frac{m_G^*}{m_L^*} \cdot \frac{1}{\beta} \quad \text{Équation 22}$$

Or, la masse initiale du composé volatil dans le liquide m_i s'exprime selon l'équation 23.

$$m_i = m_G^* + m_L^* \quad \text{Équation 23}$$

En raisonnant en concentration ($C = m/V$), combinée avec l'équation 23, l'équation 22 peut s'exprimer de la façon suivante (équation 24) :

$$C_i = C_G^* \cdot \beta + C_L^* \quad \text{Équation 24}$$

En exprimant, C_L^* selon l'équation 17, nous obtenons l'équation 25.

$$C_i = C_G^* \cdot \left(\frac{1}{K} + \beta \right) \text{ soit } C_G^* = \frac{C_i}{\frac{1}{K} + \beta} \quad \text{Équation 25}$$

En prenant la réciproque de l'équation 25, nous obtenons une équation du type $y = ax + b$ (équation 26).

$$\frac{1}{C_G^*} = \frac{1}{C_i} \cdot \beta + \frac{1}{K \cdot C_i} \quad \text{Équation 26}$$

L'aire du pic chromatographique (A) est proportionnelle à la concentration du composé dans l'espace de tête (équation 27).

$$A = f \cdot (C_G^*) \quad \text{Équation 27}$$

Avec f le facteur de réponse spécifique à chaque composé volatil.

L'équation 26 devient alors :

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{f \cdot C_i} \cdot \beta + \frac{1}{K \cdot f \cdot C_i}$$

ou plus simplement $\frac{1}{A} = a \cdot \beta + b$ Équation 28

avec : $a = \frac{1}{f \cdot C_i}$ et $b = \frac{1}{K \cdot f \cdot C_i}$

K peut être exprimé à partir de a et de b (équation 29) :

$$K = a/b \quad \text{Équation 29}$$

Différents volumes de matrice sont introduits dans les flacons permettant ainsi d'obtenir différentes valeurs de β . La composition de l'espace de tête est analysée par chromatographie en phase gazeuse. La représentation graphique $\frac{1}{A}$ en fonction de β permet d'obtenir les valeurs a et b et par conséquent de calculer le coefficient de partage K. Un exemple est donné en figure 57. La méthode n'est plus valide lorsque la linéarité n'est pas observée.

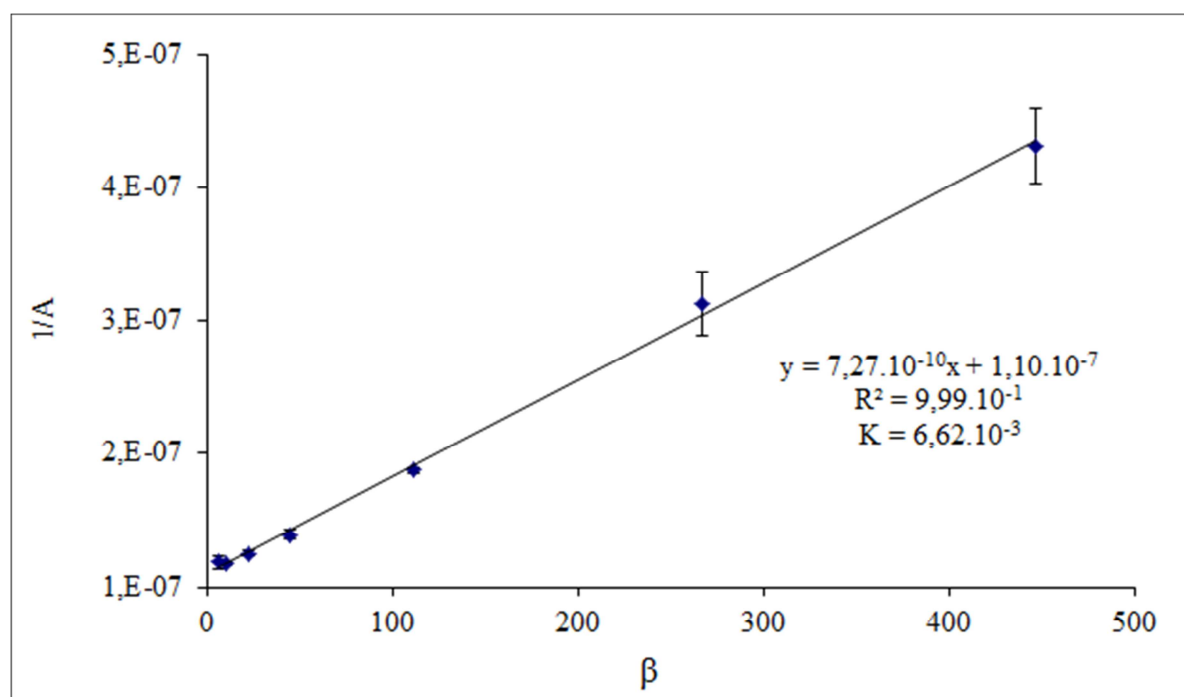


Figure 57: Illustration de la détermination graphique du coefficient de partage gaz/matrice (K) à l'équilibre thermodynamique de l'acétate d'éthyle dans la matrice amidon de pomme de terre selon la méthode PRV.

3.3.1.1 Protocole

Immédiatement en fin de fabrication, des quantités croissantes de chaque matrice ont été réparties dans des vials de 22 mL (Supelco, USA) et immédiatement scellés via un septum en silicone. Les quantités de matrices variaient selon le composé d'arôme :

- De 50 mg à 3000 mg pour les matrices contenant de l'acétate d'éthyle

- De 50 mg à 1000 mg pour les matrices contenant de l'éthyle hexanoate
- De 50 mg à 1500 mg pour les matrices contenant du carvacrol

Ces quantités ont été déterminées lors d'études préliminaires afin de respecter la linéarité présentée en figure 57.

Les échantillons ont été maintenus à 25°C dans l'incubateur du passeur automatique Combipal (CTC Analytics, Suisse). L'équilibre thermodynamique était atteint au bout de quatre heures. Par praticité, les mesures ont été faites à 24 heures. Cinq répétitions par masse et par matrice ont été réalisées. Chaque flacon n'a été utilisé qu'une seule fois.

Dans une première étape, les coefficients de partage gaz/eau (K_{eau}) ont été déterminés. Ensuite, les coefficients de partage ont été mesurés pour les différentes matrices (K_{matrice}). Pour chaque matrice, le pourcentage de rétention du composé d'arôme a été calculé selon l'équation 30.

$$\% \text{ de rétention} = \left(\frac{K_{\text{eau}} - K_{\text{matrice}}}{K_{\text{matrice}}} \right) * 100 \quad \text{Équation 30}$$

3.3.1.2 Conditions chromatographiques

Le passeur automatique Combipal (CTC Analytics, Suisse) a été utilisé pour cette analyse chromatographique. Un cm³ de chaque espace de tête a été automatiquement prélevé via une seringue à gaz de un mL préalablement chauffé à 40°C. L'échantillon gazeux a été injecté à une vitesse de 200 µL/s dans un chromatographe en phase gazeuse Trace (Thermo Electron Corporation, USA) équipé d'un injecteur splitless à 240°C, d'un détecteur d'ionisation de flamme à 250°C, d'une colonne DB-WAX (30 m x 0,32 mm de diamètre interne, épaisseur de film de 0,50 µm; J and W Scientific). Le gaz vecteur était de l'hélium avec une vélocité de 45 cm/s.

La température du four variait selon les composés d'arôme :

- Acétate d'éthyle : 50°C pendant 3 minutes, 50°C à 100°C à 10°C/min puis de 100°C à 180°C à 20°C/min.
- Hexanoate d'éthyle : 150°C à 215°C à 5°C/min
- Carvacrol : 60°C à 120°C à 5°C/min.

4 Analyses statistiques

Des analyses en composantes principales et des analyses de variance sur les données obtenues ont été effectuées avec le logiciel Statistica[®] V8 (Statsoft, France). La significativité a été établie pour des valeurs de $p < 0,05$. Des tests de Fisher ont été appliqués pour déterminer les différences significatives entre les valeurs.

Le logiciel SI/CCUB Matlab[®] a été utilisé pour la modélisation mathématique des images obtenues via la MEB.

5 Synthèse des méthodes utilisées

Le lien entre les principales méthodes utilisées et les différents chapitres de la partie « Résultats et discussion » est présenté dans le tableau 13.

Tableau 13 : Lien entre les différents protocoles et les différents chapitres de la partie résultats et discussion.

| Techniques mises en œuvre | N° du chapitre de la partie résultats et discussion correspondant |
|-----------------------------|---|
| Test de pénétrométrie | Chapitre 1.1.2 |
| Viscoélasticimétrie | Chapitre 1.1.1 |
| MEB | Chapitre 4 publication III |
| DRX | Chapitre 2 publication I et publication II |
| DSC | Chapitre 2 publication II |
| Extraction Likens Nickerson | Chapitre 2 publication II |
| SPME | Chapitre 2 publication II et chapitre 3 publication III |
| Méthode des ajouts dosés | Chapitre 2 publication II |
| PRV | Chapitre 2 publication I |

Le schéma (figure 58) récapitule toutes les méthodes mises en œuvre présentées dans ce chapitre selon les concentrations en composés d'arôme des matrices et l'état des matrices (vieilles ou avec séparation de phase).

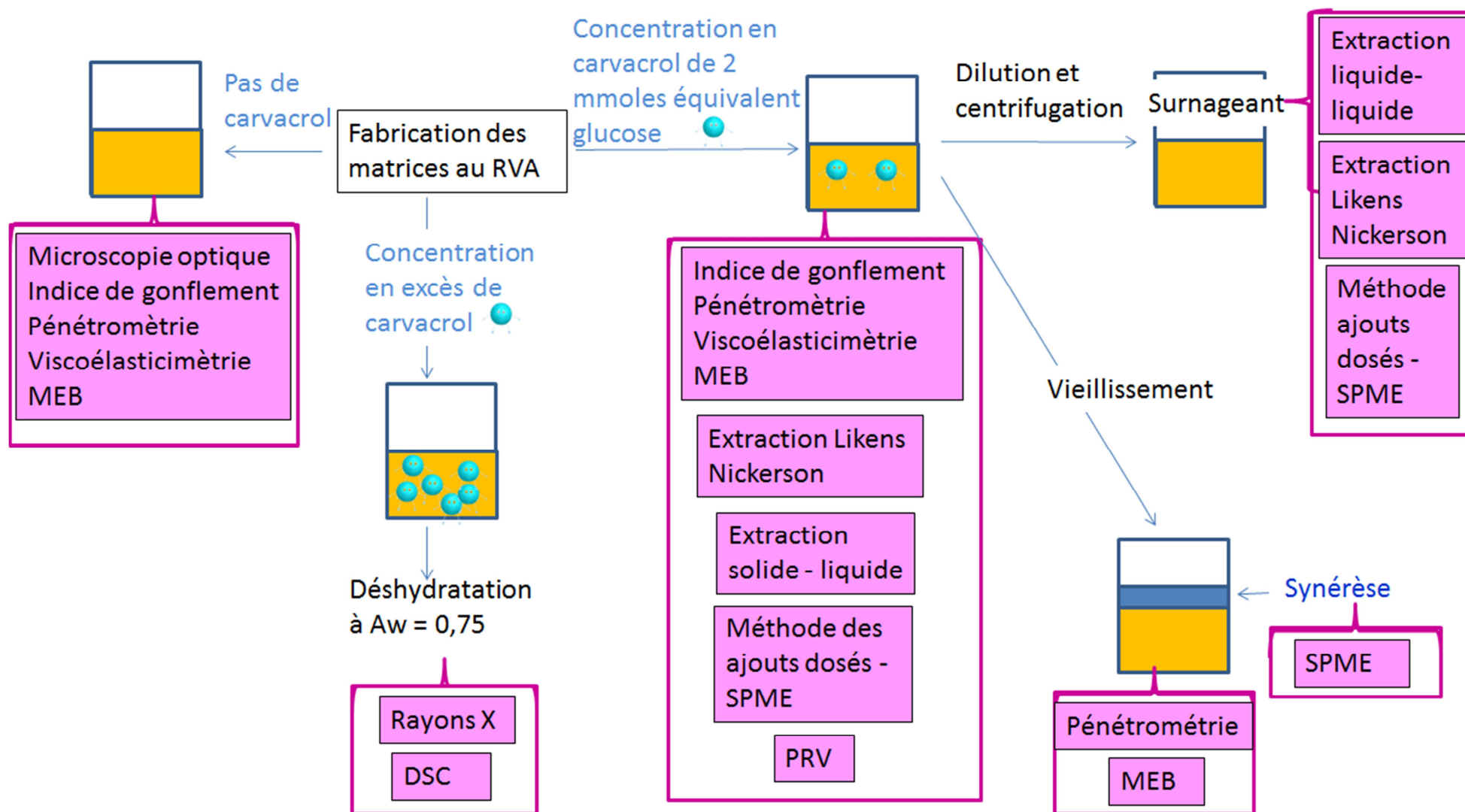


Figure 58 : Récapitulatif de toutes les méthodes mises en œuvre

RESULTATS ET DISCUSSION

1 Caractérisation de la matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac

L'objectif de cette étape était de caractériser la matrice mixte « amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac » (SK). Nous avons montré dans l'état de l'art que la communauté scientifique semble d'accord pour affirmer que le glucomannane de konjac modifie la gélatinisation et la rétrogradation de l'amidon et donc les propriétés physiques des dispersions d'amidon. En effet, la présence de glucomannane de konjac diminue le gonflement des grains d'amidon ayant comme conséquence une libération moindre de l'amylose. La viscosité de la phase continue est plus importante en raison de la présence du glucomannane de konjac. Les interactions glucomannane de konjac - eau sont importantes perturbant la réorganisation moléculaire de l'amylose lors de la rétrogradation. Il convient donc de vérifier ces conclusions dans notre système d'étude en répondant aux questions suivantes : Est-ce que l'ajout de 0,2 % de glucomannane de konjac modifie la gélatinisation et la rétrogradation d'une suspension d'amidon de pomme de terre à 5 % ? Quel est l'impact du glucomannane de konjac sur les propriétés physiques des dispersions d'amidon de pomme de terre ?

Cette caractérisation de la matrice SK a été effectuée :

- à différents moments d'observation : pendant le traitement thermomécanique (process), immédiatement en fin de process, et 24 heures après le process.
- à différents niveaux d'observation : aux niveaux macroscopique et microscopique. À chaque niveau d'observation, différentes techniques d'analyse ont été employées (figure 59).

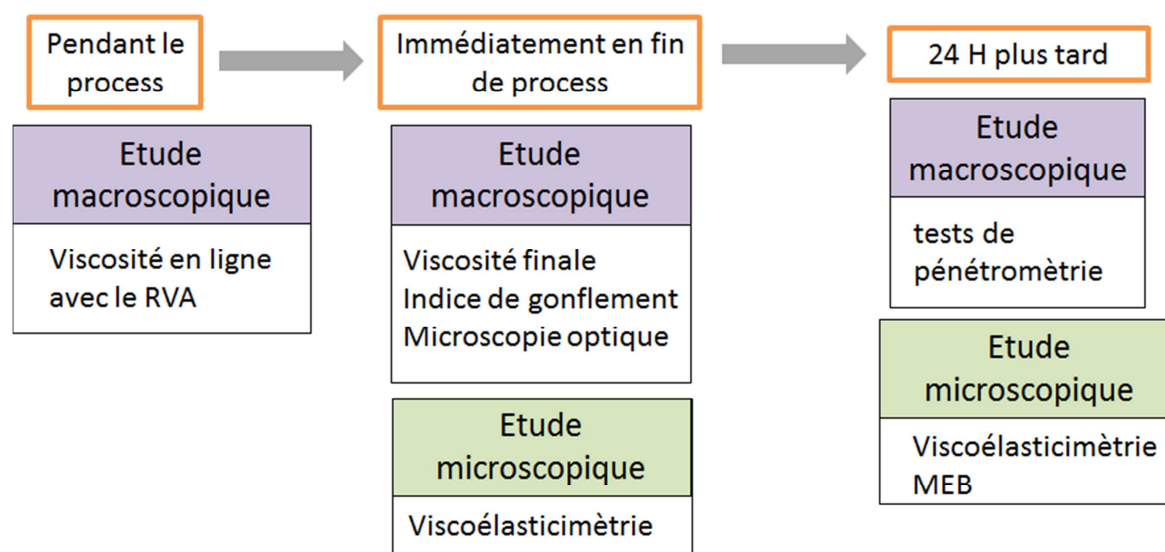


Figure 59 : Récapitulatif de différentes analyses réalisées à différents moments d'observations et à différents niveaux d'observation pour caractériser la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac.

La combinaison de ces différents moments et niveaux d'observation a permis une caractérisation complète du système d'étude.

1.1 Résultats

1.1.1 Caractérisation des matrices pendant le process et immédiatement en fin de process

Voici un exemple de profils de viscosité apparente obtenus avec le RVA[®] pour la matrice amidon de pomme de terre (PS) et la matrice « amidon – glucomannane de konjac » (SK) (figure 60).

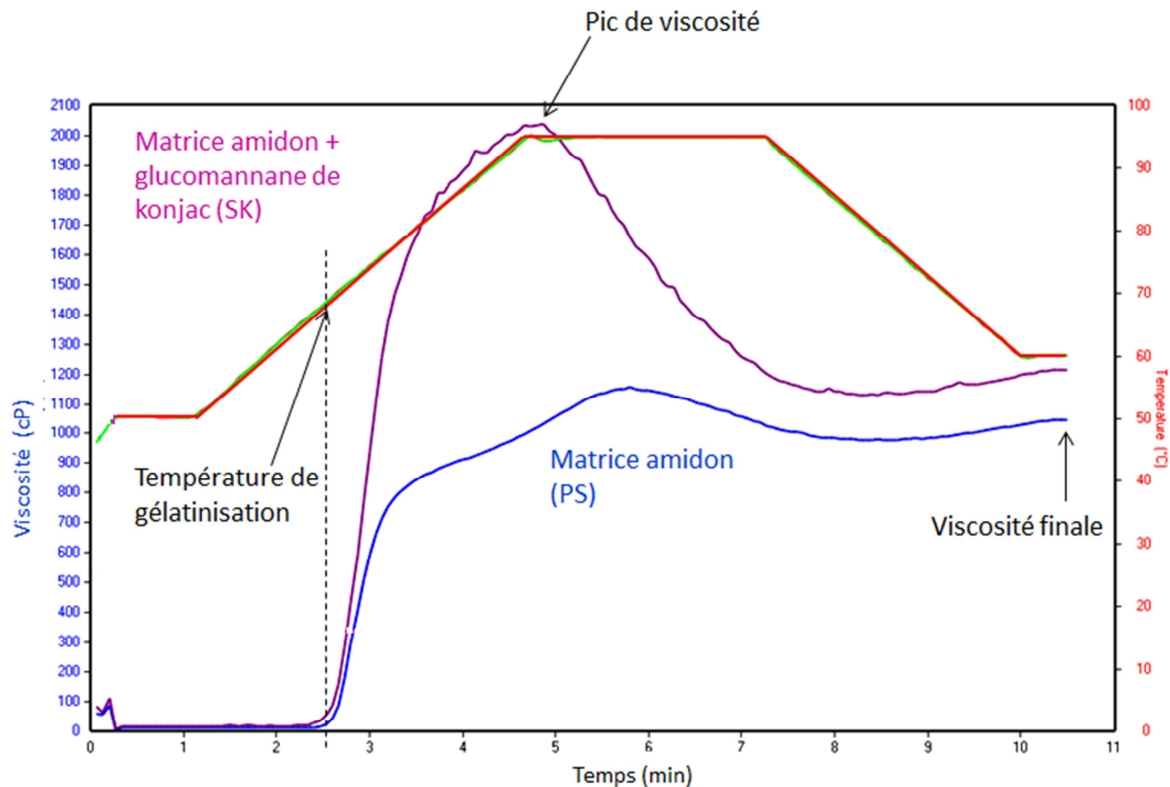


Figure 60 : Profils de viscosité apparente obtenus au RVA[®] de la matrice amidon de pomme de terre (courbe bleue) et de la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac (courbe violette). La courbe rouge indique le programme de température.

La viscosité augmentait drastiquement à partir d'une température supérieure à la température de gélatinisation. Puis la viscosité chutait à partir du moment où les grains d'amidon commençaient à se rompre, solubilisant l'amylose. Cette chute de viscosité était d'autant plus importante pour SK. Ceci est un premier indicateur révélant la différence de quantité d'amylose présente dans la phase continue. En effet, plus la quantité d'amylose solubilisée est

importante dans la phase continue, plus le réseau moléculaire entre les grains sera renforcé ou « agrégé » assurant ainsi une stabilité du système.

Trois paramètres ont été extraits de ces courbes:

- le pic de viscosité qui reflète la capacité de rétention d'eau ;
- la température de gélatinisation qui correspond à la température minimum pour gonfler le grain amidon (prise au changement de pente) ;
- la viscosité finale qui reflète l'effet épaississant des hydrocolloïdes. Ce paramètre est souvent utilisé en industrie comme étant un indicateur qualité de l'échantillon.

On n'observe aucune différence significative du paramètre température de gélatinisation entre les matrices avec et sans glucomannane de konjac (tableau 14). La présence de glucomannane de konjac ne modifiait pas la vitesse de gonflement des grains d'amidon. Par contre, le pic de viscosité et la viscosité finale étaient significativement plus élevés en présence de glucomannane de konjac. La quantité de matière étant approximativement identique entre les deux matrices, cette augmentation de viscosité peut être attribuée à l'effet épaississant du glucomannane de konjac qui est capable d'absorber jusqu'à 100 fois son poids en eau. Cette compétition pour l'eau entre le glucomannane de konjac et les grains d'amidon augmenterait la concentration du glucomannane de konjac dans la phase continue et par conséquent diminuerait le gonflement du grain d'amidon. Pour le vérifier, des observations au microscope optique et la détermination des indices de gonflement ont été réalisées.

Tableau 14 : Valeurs moyennes et écart-types des paramètres extraits des courbes de viscosités apparentes obtenues avec le RVA[®] : température de gélatinisation, pic de viscosité et viscosité finale pour la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac (SK) et la matrice amidon de pomme de terre (PS). Les moyennes avec différentes lettres sont significativement différentes selon le test de Fisher (p < 0,05).

| Matrice | Température de gélatinisation (°C) | Pic viscosité (cP) | Viscosité finale (cP) |
|---------|------------------------------------|--------------------|-----------------------|
| PS | 70,2 ± 0,5 | 1 564 ± 41 | 1 046 ± 53 |
| SK | 70,1 ± 0,6 | 2 250 ± 161 | 1 315 ± 74 |

Immédiatement en fin de process, SK a été diluée dans de l'eau après coloration au lugol et observée au microscope optique. Une phase continue colorée en bleue a été observée, caractéristique de l'amylose, et des débris ou « fantômes » de grains d'amidon en violet (figure 60). La présence de glucomannane de konjac n'empêchait pas l'amylose de se solubiliser dans la phase continue.

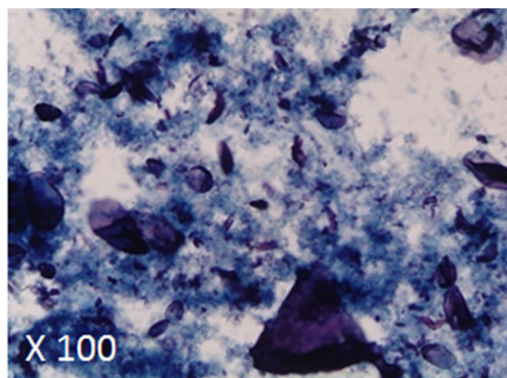


Figure 61 : Observation au microscope optique de la matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac (SK) colorée au lugol et diluée dans l'eau. L'observation a été faite immédiatement à la fin du traitement thermomécanique.

D'autres observations au microscope optique après coloration au lugol ont été effectuées mais sans dilution dans l'eau (figure 61). Différentes tailles de grains d'amidon de pomme de terre ont été observées. Ils semblaient être plus petits en présence de glucomannane de konjac (matrice SK) que dans la matrice PS.

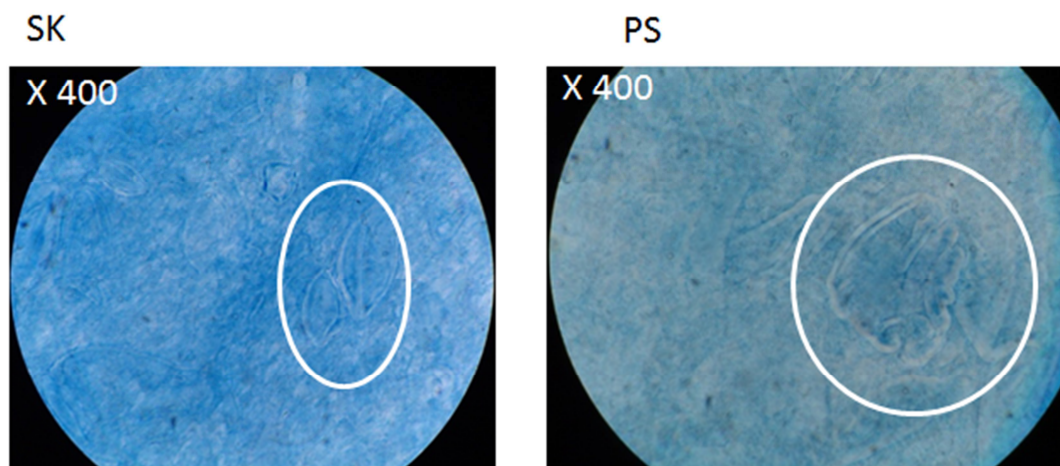


Figure 62 : Observation au microscope optique de la matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac (SK) et de la matrice amidon de pomme de terre (PS) colorée au lugol. L'observation a été faite immédiatement à la fin du traitement thermomécanique.

Pour valider ces observations microscopiques par des données chiffrées, les indices de gonflement et la fraction volumique ont été déterminés. Les résultats sont présentés dans le tableau 15. Nous avons une différence significative entre PS et SK sur les deux paramètres.

Tableau 15 : Valeurs moyennes et écart-types de l'indice de gonflement et de la fraction volumique pour la matrice amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac (SK) et la matrice amidon de pomme de terre (PS). Les moyennes avec différentes lettres sont significativement différentes selon le test de Fisher ($p < 0,05$).

| | Indice de gonflement (g/g) | Fraction volumique |
|----|----------------------------|---------------------|
| PS | 105 ± 6^a | $0,520 \pm 0,001^a$ |
| SK | 95 ± 4^b | $0,533 \pm 0,001^b$ |

L'indice de gonflement estime la quantité d'eau adsorbée par le grain d'amidon. Sa valeur était proche de 100 ce qui signifie que les grains d'amidon ont gonflé pendant le traitement thermomécanique. Néanmoins, ce gonflement était moindre en présence de glucomannane de konjac. Il est donc probable qu'il y ait eu moins d'amylose solubilisée dans la phase continue, ce qui est en accord avec la chute de viscosité importante observée après le pic de viscosité sur les profils de viscosité apparente obtenus au RVA[®].

La fraction volumique augmentait significativement en présence de glucomannane de konjac ce qui signifie que le volume de la phase continue était réduit. Par conséquent, l'amylose solubilisée était concentrée dans cette phase. Cet effet de concentration en présence de glucomannane de konjac est cohérent avec l'augmentation du pic de viscosité et de la viscosité finale apparente observée précédemment.

Selon nos résultats et dans nos conditions expérimentales, le glucomannane de konjac impacte la gélatinisation de l'amidon de pomme de terre.

1.1.2 Caractérisation des matrices immédiatement en fin de process et durant les 24 premières heures

La figure 63 présente un exemple de spectre mécanique obtenu pour PS et pour SK, c'est-à-dire l'évolution de G' et G'' en fonction de la fréquence, obtenue à 60°C (immédiatement en fin du traitement thermomécanique). Deux répétitions ont été faites par matrice. Au préalable, le domaine linéaire a été vérifié.

Les spectres de PS et SK présentaient la même allure : G' et G'' sont parallèles et G' est supérieur à G'' . C'est une allure caractéristique du comportement de transition entre une solution et un gel.

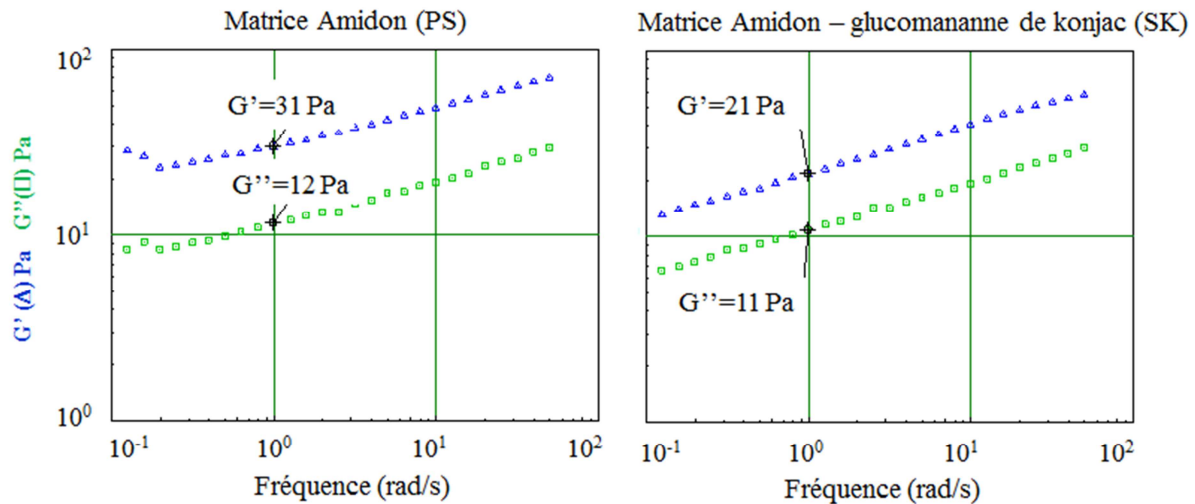


Figure 63 : Spectres mécaniques de la matrice amidon de pomme de terre (PS) et de la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac (SK) obtenus à 60°C, et à 2,5 % de déformation.

Nous avons choisi de comparer les valeurs de G' , G'' , et $\text{Tan } \delta (= G''/G')$ pour une fréquence de 1 rad/s. À 60°C, les valeurs de G' de PS étaient plus élevées que celles de SK. G'' était sensiblement identique. Cette différence se traduit par une différence de valeur de $\text{Tan } \delta$ (tableau 16). Ce paramètre reflète la mobilité des molécules et en conséquence le degré de structuration des matrices. Plus cette valeur est basse, plus le système est structuré.

Tableau 16 : Valeurs moyennes et écart-types de $\text{Tan } \delta$ pour la matrice amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac (SK) et la matrice amidon de pomme de terre (PS) obtenues à 60°C immédiatement en fin de process et à 25°C 24 heures plus tard.

| | Tan δ à 60°C, fin de process | Tan δ à 25°C, 24 heures plus tard |
|----|-------------------------------------|--|
| PS | 0,38 \pm 0,00 | 0,09 \pm 0,00 |
| SK | 0,53 \pm 0,04 | 0,24 \pm 0,01 |

À 60°C, $\text{Tan } \delta$ de PS était inférieur à celui de SK. Immédiatement en fin de process, la présence de glucomannane de konjac diminuait la structuration du système amylicé. Ce résultat conforte les résultats obtenus précédemment.

La gélification et la rétrogradation de l'amidon de pomme de terre ont été suivies pendant les 24 premières heures suivant la fin de la fabrication (figure 64). En toute logique, le module G' augmentait au cours du temps. L'évolution était plus importante pour PS que pour SK. Dans les deux systèmes, G'' évoluait peu.

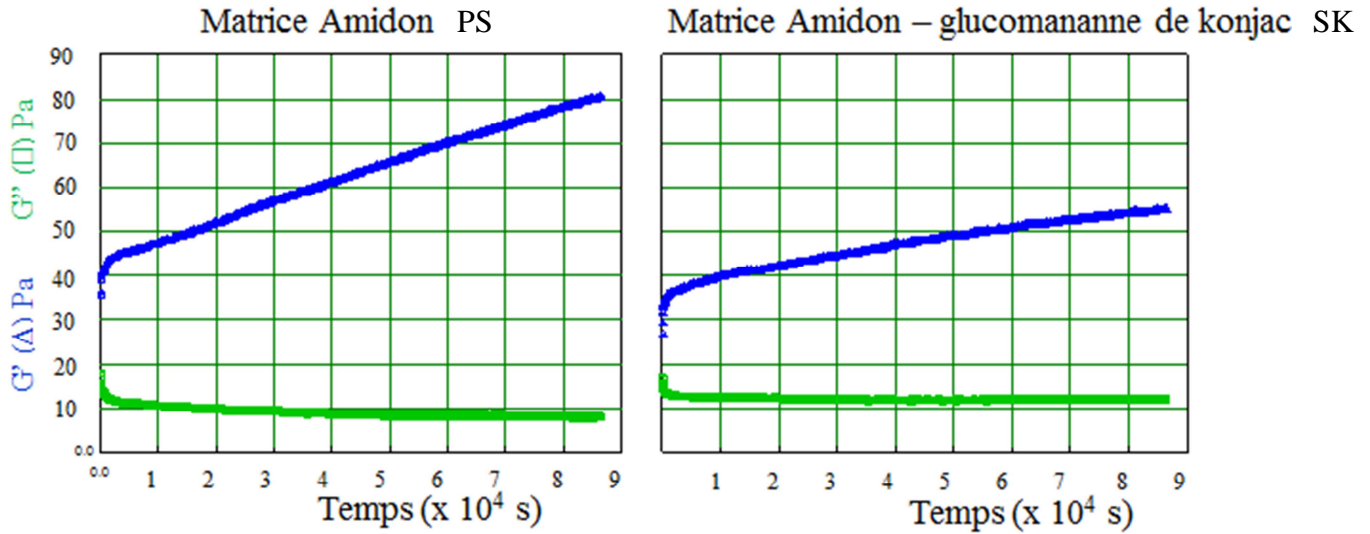


Figure 64 : Suivi de gélification de la matrice amidon de pomme de terre (PS) et de la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac (SK) pendant 24 heures à 2,5 % de déformation et à 1 rad/s.

Les spectres mécaniques de PS et SK obtenus à 25°C et 24 heures après la fabrication sont présentés en figure 65.

PS présentait un comportement de solide avec G' nettement supérieur à G'' et G' stable aux basses fréquences. Néanmoins, à des fréquences supérieures à 2 rad/s, G' variait légèrement en fonction de la fréquence et G'' augmentait de façon plus importante. Nous sommes en présence d'un gel faible.

SK présentait aussi un comportement d'un gel avec G' supérieur à G'' . Cependant, contrairement à PS, G' évoluait dans les basses fréquences. Nous sommes en présence d'un système intermédiaire entre un gel faible et une solution.

Durant les 24 premières heures de la rétrogradation de l'amidon, les valeurs de G' relevées à 1 rad/s ont logiquement augmenté. À nouveau, nous observons des valeurs plus élevées de G' pour PS que pour SK. Ceci est conforme avec la littérature : l'ajout de glucomannane de konjac diminue le module G' (Yoshimura, Takaya et al., 1998b). La valeur de $\tan \delta$ de SK était toujours plus importante que celle de PS (tableau 16) traduisant la faible structuration de la matrice SK par rapport à PS. L'ajout de 0,2 % de glucomannane de konjac a ralenti la rétrogradation de l'amidon de pomme de terre.

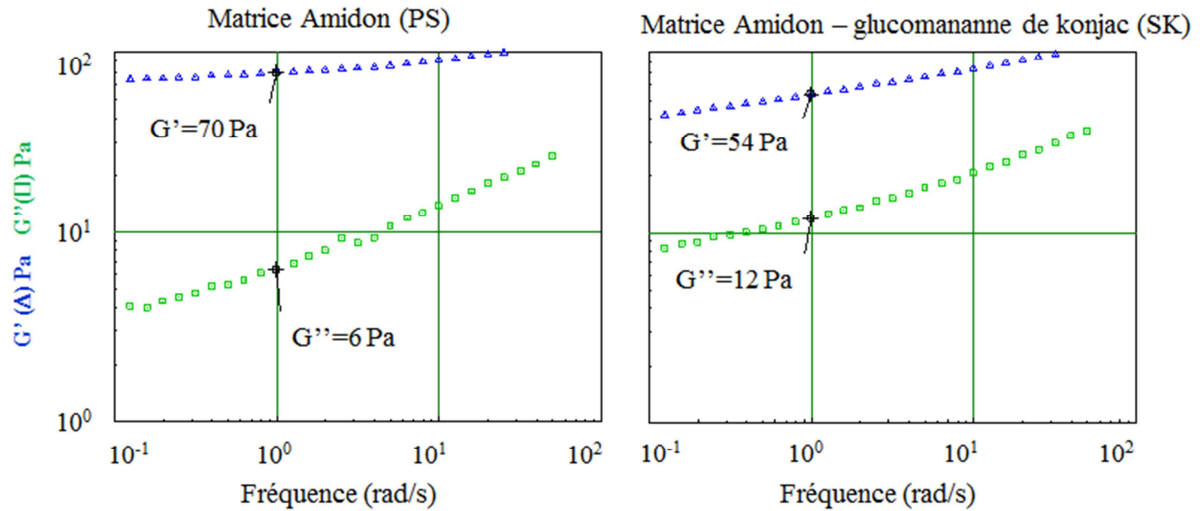


Figure 65 : Spectres mécaniques de la matrice amidon de pomme de terre (PS) et de la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac (SK) obtenus 24 heures après le traitement thermomécanique, à 25°C et à 2,5 % de déformation.

Les propriétés mécaniques de PS et SK ont également été évaluées en large déformation par des tests de pénétrométrie, 24 heures après la fabrication. Aucune variation significative de la valeur F_{max} n'a été observée entre PS et SK (figure 66).

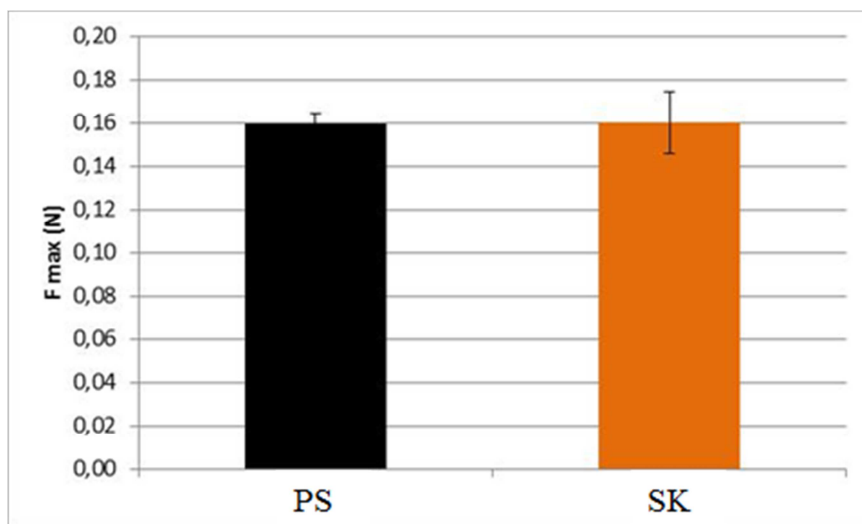


Figure 66 : Valeurs moyennes et écart-types de F_{max} (N) pour la matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac (SK) et la matrice amidon de pomme de terre (PS), obtenues à 25°C, 24H après la fin de la fabrication.

Nos résultats sont en accord avec la littérature. Huang, Kennedy et al. (2007) ont montré que l'ajout de 0,1 %, 0,2 %, 0,3 % ou 0,4 % (m/m) de glucomannane de konjac à des gels d'amidon de riz à 5 % (m/m) (32 % amylose) n'augmentait pas le module F_{max} .

Charoenrein, Tatirat et al., (2010) ont également montré les mêmes résultats sur des gels d'amidon de riz à 8 % (m / m) en ajout de 0,3 % ou 0,5 % (m / m) de glucomannane de konjac. Ceci confirme bien qu'à faible concentration de glucomannane de konjac et en absence d'agent alcalin, le glucomannane de konjac est incapable de former un gel.

Pour conclure sur la caractérisation des matrices 24 heures après la fin du traitement thermomécanique, des observations microscopiques en MEB ont été réalisées. Globalement, il était difficile à l'œil nu de voir des différences entre les clichés microscopiques de SK (figure 68) et PS (figure 67). Tous les deux présentaient une surface homogène avec des cavités (trous sur les observations) de différentes tailles. Ces cavités observées sur les clichés correspondent aux poches d'eaux présentes dans la matrice avant les étapes de déshydratation et dessiccation.

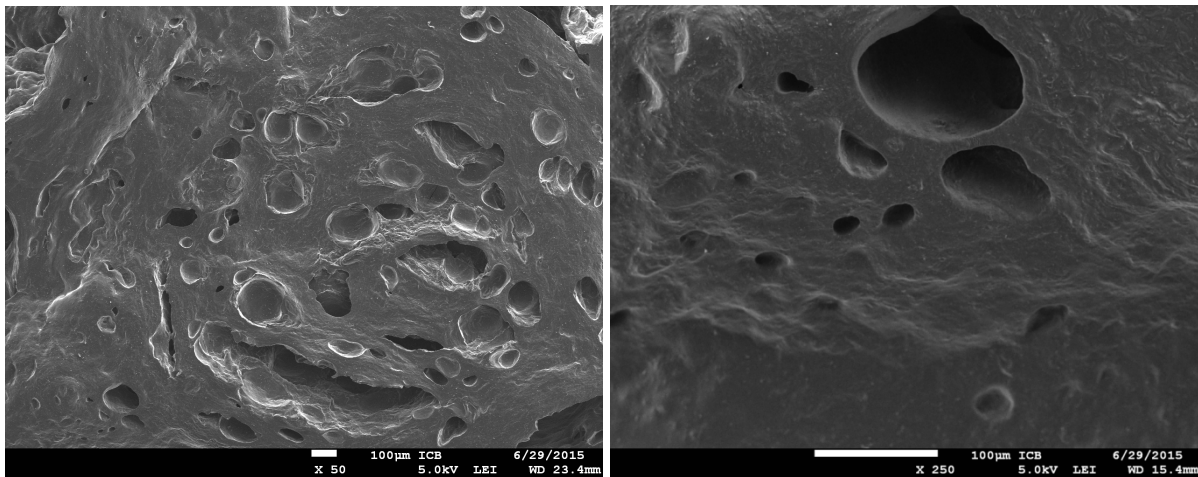


Figure 67 : Observations au MEB de la matrice amidon de pomme de terre (PS), 24 heures après le traitement thermomécanique au grossissement X50 (à gauche) et X250 (à droite). La barre d'échelle représente 100 µm.

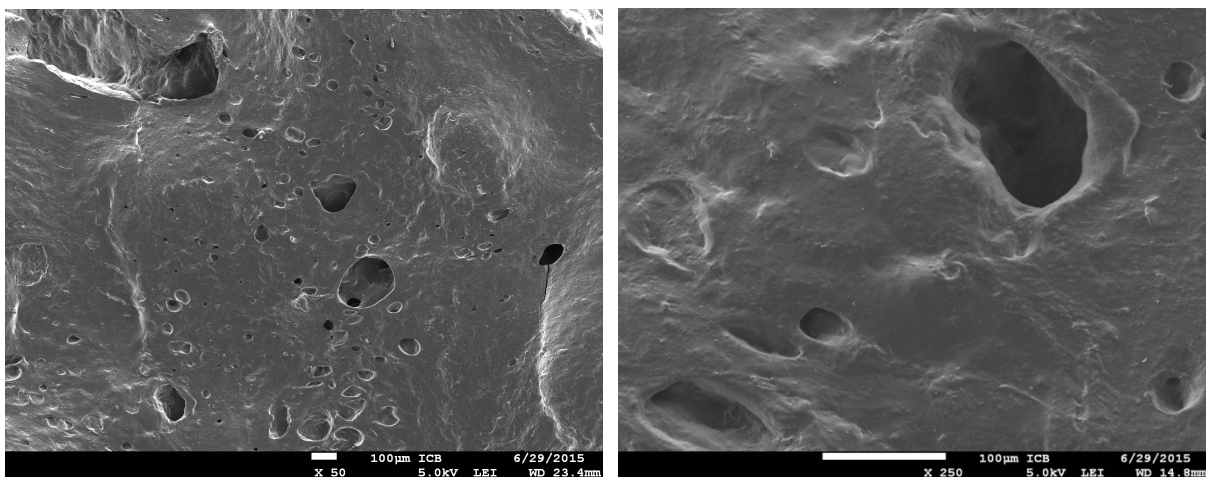


Figure 68 : Observations au MEB de la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac (SK), 24 heures après le traitement thermomécanique au grossissement X50 (à gauche) et X250 (à droite). La barre d'échelle représente 100 µm.

La modélisation de ces clichés via la transformée de Fourier Généralisé a permis d'obtenir les descripteurs de l'état de surface de PS et SK présentés en figure 69. L'interprétation de ce graphique est basée sur la position des points et de la distance entre eux. Les points étant localisés dans un même cluster ont un état de surface (« texture ») similaire.

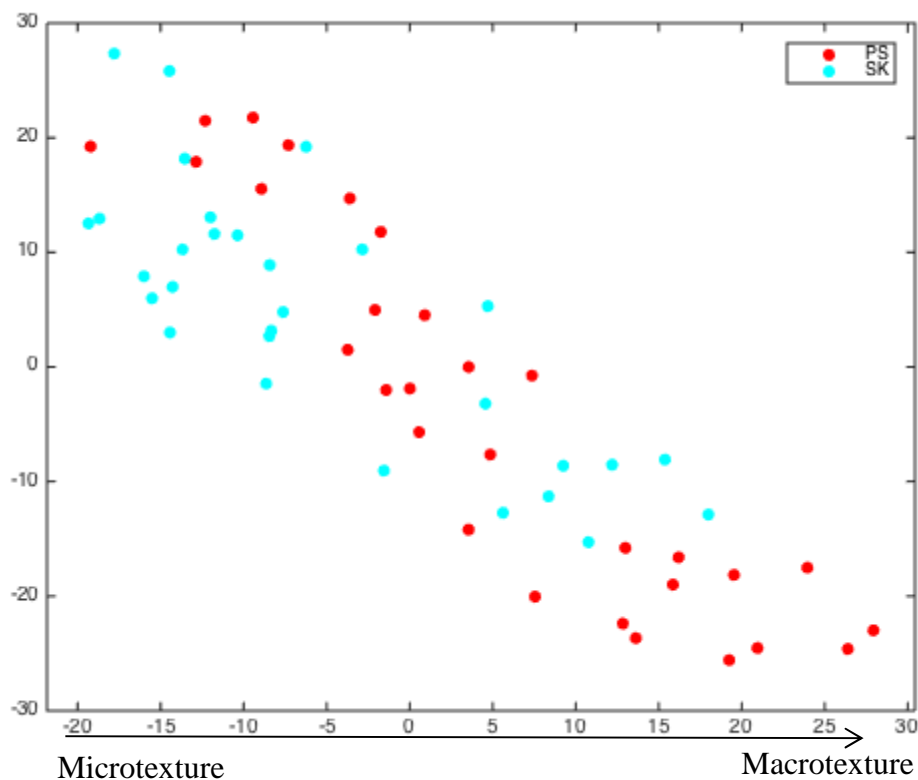


Figure 69 : Projection 2D des descripteurs de l'état de surface de la matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac (SK, point bleu) et la matrice amidon de pomme de terre (PS, point rouge) obtenues par la transformée de Fourier Généralisé associée à la réduction des données.

Aucune différence entre les descripteurs de l'état de surface de PS et SK n'a été observée. La dispersion des points de chaque matrice est très hétérogène. L'état de surface correspondant à la microtexture correspond aux zones lisses observées sur les clichés en figures 67 et 68. L'état de surface correspondant à la macrotecture est dû aux cavités observées (figures 67 et 68).

1.2 Conclusion

Parmi toutes les méthodes employées pour caractériser la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac, seuls les tests de pénétrométrie et la microscopie électronique à balayage n'ont pas permis de distinguer PS de SK. La figure 70 récapitule l'évolution des paramètres discriminants cités précédemment selon l'ajout de 0,2 % (m/m) de glucomannane de konjac à une suspension d'amidon de pomme de terre à 5 % (m/m).

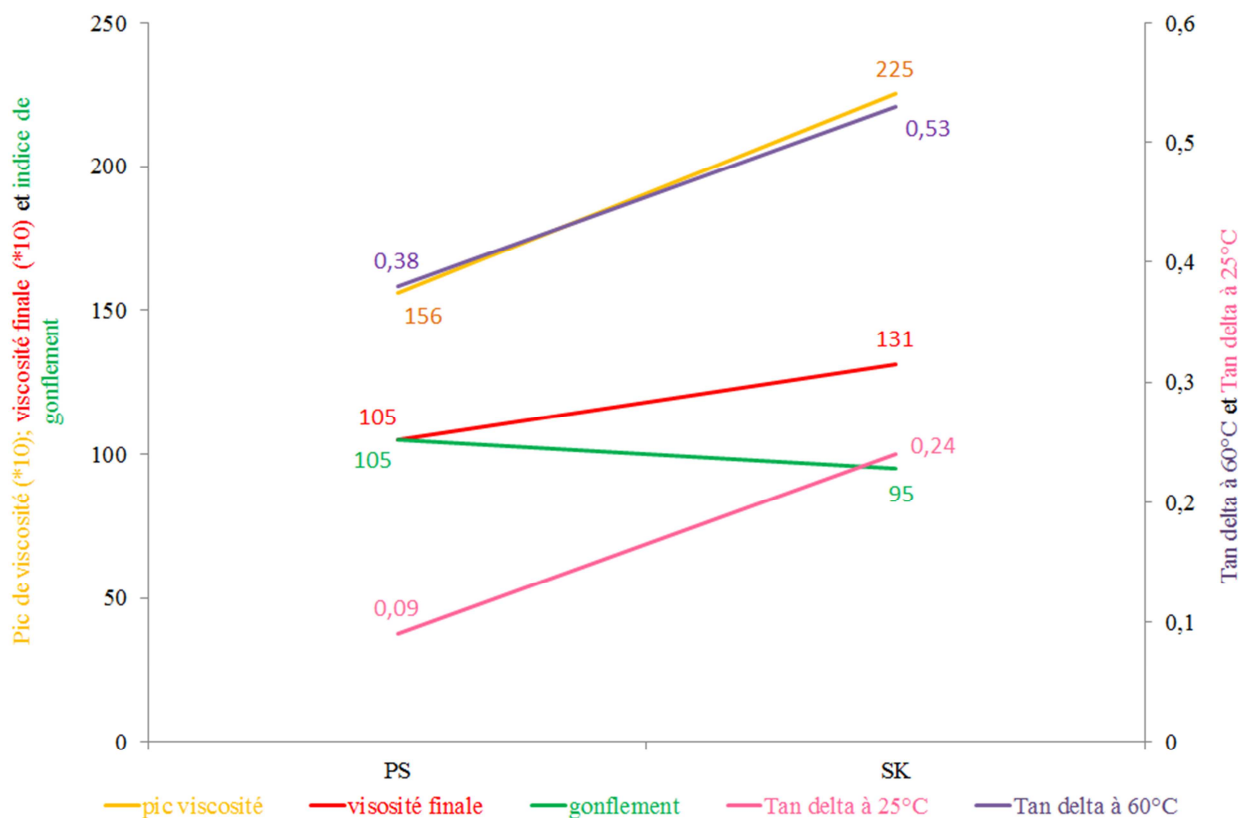


Figure 70 : Évolution des paramètres viscosité finale et pic de viscosité obtenus au RVA®, indice de gonflement (sur l'axe Y de gauche) et Tan delta à 60°C et à 25°C (sur l'axe Y de droite) selon l'ajout de 0,2 % (m/m) de glucomannane de konjac à une suspension d'amidon de pomme de terre à 5 % (m/m).

Nous avons démontré que l'ajout de 0,2 % de glucomannane de konjac à une matrice d'amidon de pomme de terre à 5 % ne formait pas un gel. L'ajout de glucomannane de konjac augmentait de façon significative la viscosité de la suspension d'amidon de pomme de terre.

Le glucomannane de konjac n'empêchait pas la gélatinisation de l'amidon de pomme de terre mais la ralentissait. En effet, sa présence dans la phase continue diminuait le gonflement des grains d'amidon de pomme de terre limitant la solubilisation de l'amylose. De plus, le volume de la phase continue était diminué entraînant un effet de concentration de l'amylose. Cette organisation engendrait un système peu structuré (tan delta élevé) et peu résistant au cisaillement (chute importante de la viscosité observée au RVA après le pic de viscosité).

Ces résultats complètent et confortent les résultats obtenus par les collègues de l'INRA de Nantes travaillant sur le même projet avec les mêmes lots d'amidon de pomme de terre et de glucomannane de konjac. Ils ont étudié l'influence de l'ajout de différents teneurs de glucomannane de konjac (quantité variant de 0,2 % à 1 % (m/m)) sur la gélatinisation et la rétrogradation de gel d'amidon de pomme de terre à teneur variable (de 5 % à 10 % (m/m)) par DSC et diffraction des rayons X (Schwartz, Le Bail et al., 2014).

Un focus a été effectué uniquement sur les matrices communes aux deux études.

Pour l'analyse en diffraction des rayons X, le protocole thermomécanique appliqué pour la préparation des échantillons a été effectué avec le RVA[®]. Les différences par rapport à celui appliqué dans notre étude sont présentées dans le tableau 17.

Tableau 17 : Différences dans le protocole thermomécanique de préparation des matrices entre l'équipe de Nantes et l'équipe de Dijon.

| | Protocole RVA à Dijon | Protocole RVA à Nantes |
|---|--------------------------|---------------------------|
| Rampe de chauffage et de refroidissement (°C / min) | 12 | 10 |
| Température maximale (°C) | 95 | 90 |
| Durée de l'isotherme pendant la température maximale (minutes) | 3,5 | 15 |
| Température finale (°C) | 60 | 20 |

Pour l'analyse en DSC, le traitement thermomécanique appliqué était différent. 100 mg d'amidon de pomme de terre natif et 500 µL d'une suspension de glucomannane de konjac à 0,2 % (m/m), préalablement homogénéisée à 20°C pendant 30 minutes, ont été déposés dans une capsule en inox. Le programme de température appliqué était de 25°C à 120°C à 1°C/min.

L'effet du glucomannane de konjac sur la gélatinisation de l'amidon de pomme de terre a été étudié par DSC. Les résultats sont présentés en tableau 18. Aucune différence n'a été observée sur les valeurs de température initiale (T_0), de température du pic (T_p) ni sur l'enthalpie de gélatinisation (ΔH). Cela montre que la gélatinisation de l'amidon de pomme de terre se produit en présence de glucomannane de konjac. Par contre, la température finale (T_c) a été augmentée en présence de glucomannane de konjac. Cette augmentation traduit le ralentissement de la gélatinisation de l'amidon de pomme de terre en présence de glucomannane de konjac.

Tableau 18 : Valeurs moyennes et écart-types de la température de gélatinisation et d'enthalpies de la matrice amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac (SK) et la matrice amidon de pomme de terre (PS) obtenues par DSC. T_0 correspond à la température initiale. T_p correspond à la température du pic. T_c correspond à la température finale.

| | T_0 (°C) | T_p (°C) | T_c (°C) | ΔH (J/g d'amidon sec) |
|----|------------|------------|------------|-------------------------------|
| PS | 60,2 ± 0,3 | 65,2 ± 0,2 | 70,5 ± 0,3 | 15,8 ± 0,4 |
| SK | 60,0 ± 0,2 | 65,3 ± 0,2 | 71,2 ± 0,2 | 15,8 ± 0,2 |

Les spectres de diffraction aux rayons X de PS et SK étaient du type B, mettant en évidence la rétrogradation de l'amidon de pomme de terre en présence de glucomannane de konjac. Les molécules d'amylose et d'amylopectines s'organisaient en doubles hélices.

Enfin, la quantité d'eau congelable a été déterminée par micro - DSC. La quantité d'eau congelable de PS était de 100 % (ratio eau libre (kg) / eau totale (kg) = 0,9998 ± 0,0001), celle de SK de 97 % (ratio eau libre (kg) / eau totale (kg) = 0,9714 ± 0,0003) c'est-à-dire que par rapport à PS, SK avait 3 % d'eau non-congelable. Cette diminution de la quantité d'eau

congelable en présence de glucomannane de konjac expliquerait l'impact de cet hydrocolloïde sur la gélatinisation et la rétrogradation de l'amidon de pomme de terre. En effet, la phase visqueuse entourant les grains d'amidon gonflés serait du glucomannane de konjac interagissant avec l'amylose solubilisée aboutissant à la formation d'une structure spongieuse. Cette structure pourrait être la raison de l'augmentation de la quantité d'eau non-congelable et retarderait l'agrégation des molécules d'amylopectine, ce qui est en accord avec l'effet du glucomannane de konjac sur la gélatinisation et la rétrogradation de l'amidon de pomme de terre observé lors de leur étude et de nos résultats.

La gélatinisation et la rétrogradation d'une dispersion d'amidon de pomme de terre (5 % (m / m)) ont été possibles en présence de glucomannane de konjac. Cependant, une très faible quantité de glucomannane de konjac (0,2 % (m / m)) a suffi pour perturber la gélatinisation et la rétrogradation de l'amidon de pomme de terre.

2 Encapsulation moléculaire de composés volatils par une matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac

Dans ce chapitre, l'objectif est de valider ou non l'hypothèse N°1 : «l'encapsulation moléculaire de composés d'arôme par l'amylose d'amidon de pomme de terre en présence de glucomannane de konjac est possible». L'étude menée a permis de décliner cette question en plusieurs hypothèses / questions secondaires qui sont détaillées ci-après.

2.1 Interactions composés volatils - polysides

Les travaux antérieurs ont montré que l'amidon a la propriété de former des complexes amylose - ligand réversibles avec certains ligands. Ces complexes sont formés, selon les ligands pendant, à la fin de la gélatinisation de l'amidon ou lors du refroidissement et ce, à partir de concentrations faibles en ligand. Les conditions opératoires influent sur l'établissement de complexes amylose - ligand et sur le type de polymorphisme obtenu.

Le glucomannane de konjac semble avoir également un potentiel intéressant d'encapsulation. Seuls les travaux de Schwartz (2014) relatent l'influence de la présence de glucomannane de konjac sur l'encapsulation moléculaire de composés volatils par de l'amidon de pomme de terre. Notre étude va permettre d'étoffer les connaissances sur ce sujet.

Au travers de notre démonstration, nous allons essayer de répondre aux questions suivantes :

- Est-ce que la présence de glucomannane de konjac impacte sur l'encapsulation moléculaire d'amylose d'amidon de pomme de terre - composés volatils ?
- Est-ce que cette encapsulation moléculaire est efficace ?
- Est-ce que le glucomannane de konjac crée des interactions avec les composés volatils ?

Pour valider l'hypothèse N°1 et répondre à ces questions, la démarche expérimentale mise en œuvre est présentée en figure 71.

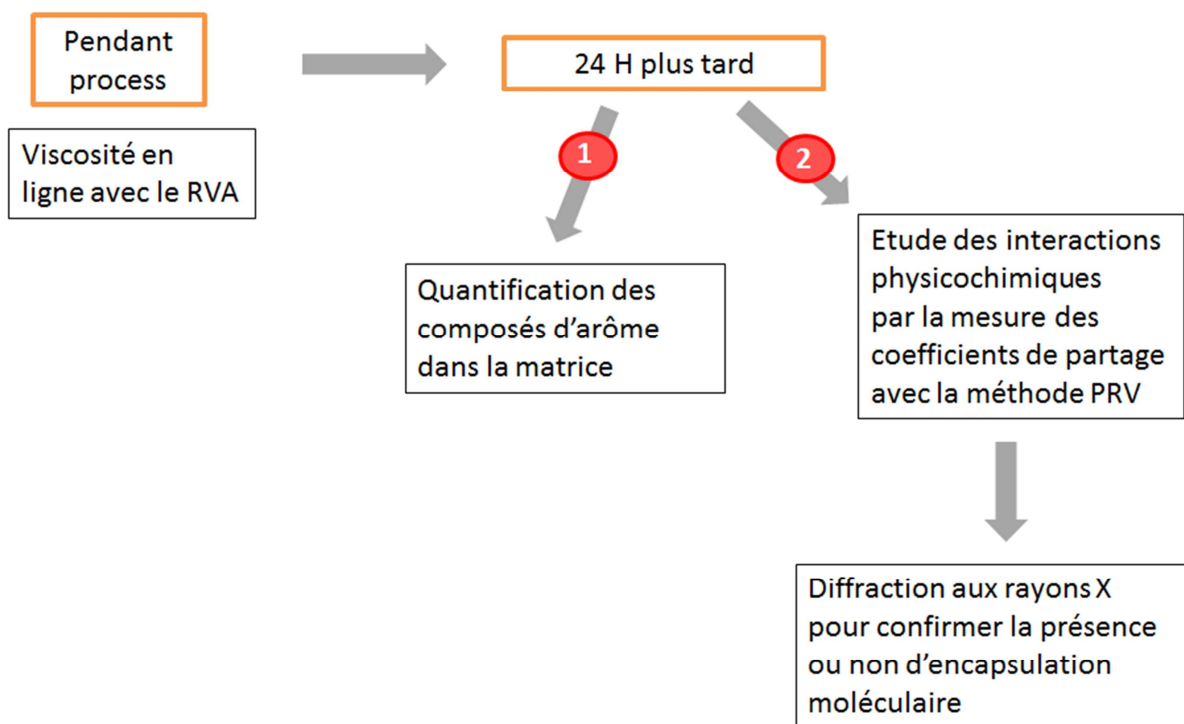


Figure 71 : Récapitulatif de la démarche expérimentale mise en œuvre pour valider ou non l'hypothèse N°1 : « l'encapsulation moléculaire de composés d'arôme dans une matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac est possible ».

Dans un premier temps, l'impact de l'ajout des composés d'arôme sur la gélatinisation de l'amidon de pomme de terre a été étudié.

Puis, 24 heures après la fin du traitement thermomécanique, les pertes de composés d'arôme lors du process ont été dosées. Pendant le stockage de 24 heures, les matrices ont été conservées à température ambiante. Enfin, la présence ou non d'interactions entre les composés d'arôme et les polysaccharides a été mise en évidence par la méthode PRV et confortée par des études en diffractions aux rayons X.

Les différentes méthodes mises en œuvre dans cette démarche expérimentale sont présentées en figure 72.

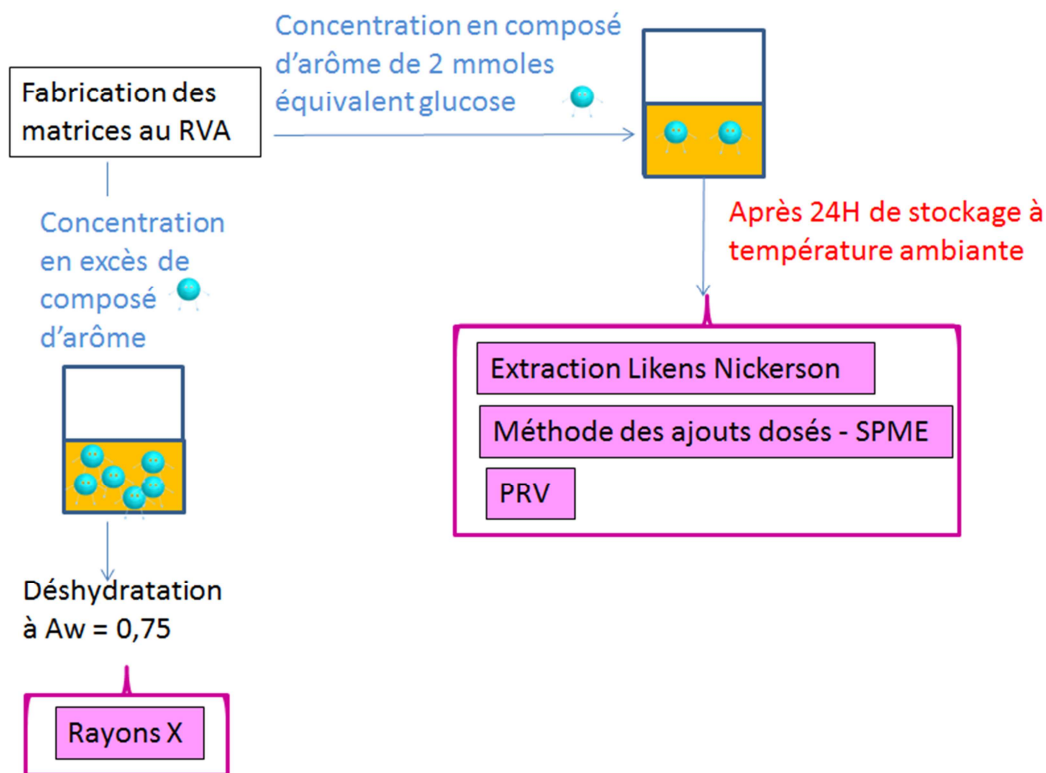


Figure 72 : Méthodes mises en œuvre dans la démarche expérimentale mise en œuvre pour valider ou non l'hypothèse N°1 : « l'encapsulation moléculaire de composés d'arôme dans une matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac est possible ».

2.1.1 Impact des composés d'arôme sur la gélatinisation de l'amidon de pomme de terre

Pendant le process, l'impact de l'ajout des trois composés d'arôme - hexanoate d'éthyle, acétate d'éthyle et carvacrol - lors de la gélatinisation de l'amidon de pomme de terre avec le RVA[®] a été étudié. L'ajout des composés d'arôme, quel que soit le moment d'ajout et quelle que soit la nature du composé d'arôme n'avait aucun impact sur la gélatinisation de l'amidon de pomme de terre ni sur la viscosité des suspensions obtenues. Les résultats sont présentés dans la publication I.

2.1.2 Quantification des composés d'arôme dans la matrice

Les échantillons ont été stockés 24 heures à température ambiante. Puis, la quantité de composés d'arôme restant dans la matrice a été déterminée. La quantification du carvacrol et de l'hexanoate d'éthyle a été réalisée suite à une extraction - distillation simultanée (Likens - Nickerson) (tableau 19).

Pour le carvacrol, approximativement 100 % du carvacrol a été retrouvé. Il n'y avait pas de différence significative entre les matrices ($p = 0.066$ avec $\alpha = 0,05$). Pour ce composé peu volatil, cela signifie que l'on a peu ou pas de pertes lors de la fabrication et que la méthode

d'extraction permet de doser le carvacrol dans sa globalité, c'est à dire le carvacrol complexé avec l'amylose et le carvacrol potentiellement non complexé.

Tableau 19 : Quantités moyennes de carvacrol, d'hexanoate d'éthyle et d'acétate d'éthyle et écart-types respectifs exprimés selon le pourcentage de la quantité initiale de composés d'arôme (m/m) dosés dans les matrices amidon de pomme de terre (PS-ELA, PS-LLA) et les matrices amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac (SK-ELA, SK-LLA). ELA signifie que le composé d'arôme a été ajouté en début de process. LLA signifie que le composé d'arôme a été ajouté en fin de process. Les moyennes avec différentes lettres sont significativement différentes selon le test de Fisher ($p < 0,05$).

| | PS-ELA | PS-LLA | SK-ELA | SK-LLA |
|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Carvacrol | 100 ± 12 | 86 ± 4 | 95 ± 5 | 104 ± 8 |
| Hexanoate d'éthyle | 30 ± 3 ^c | 22 ± 2 ^a | 24 ± 1 ^a | 17 ± 3 ^b |
| Acétate d'éthyle | 93 ± 7 ^a | 89 ± 8 ^a | 98 ± 1 ^a | 62 ± 1 ^b |

Pour l'hexanoate d'éthyle, 17 à 30 % du composé introduit dans le système ont été retrouvés. Nous venons de montrer que cette méthode d'extraction est efficace. Par conséquent, ces faibles quantités indiquent qu'il y a eu, lors de la préparation, des pertes liées à la plus grande volatilité du composé et au manque d'étanchéité du godet échantillon du RVA®.

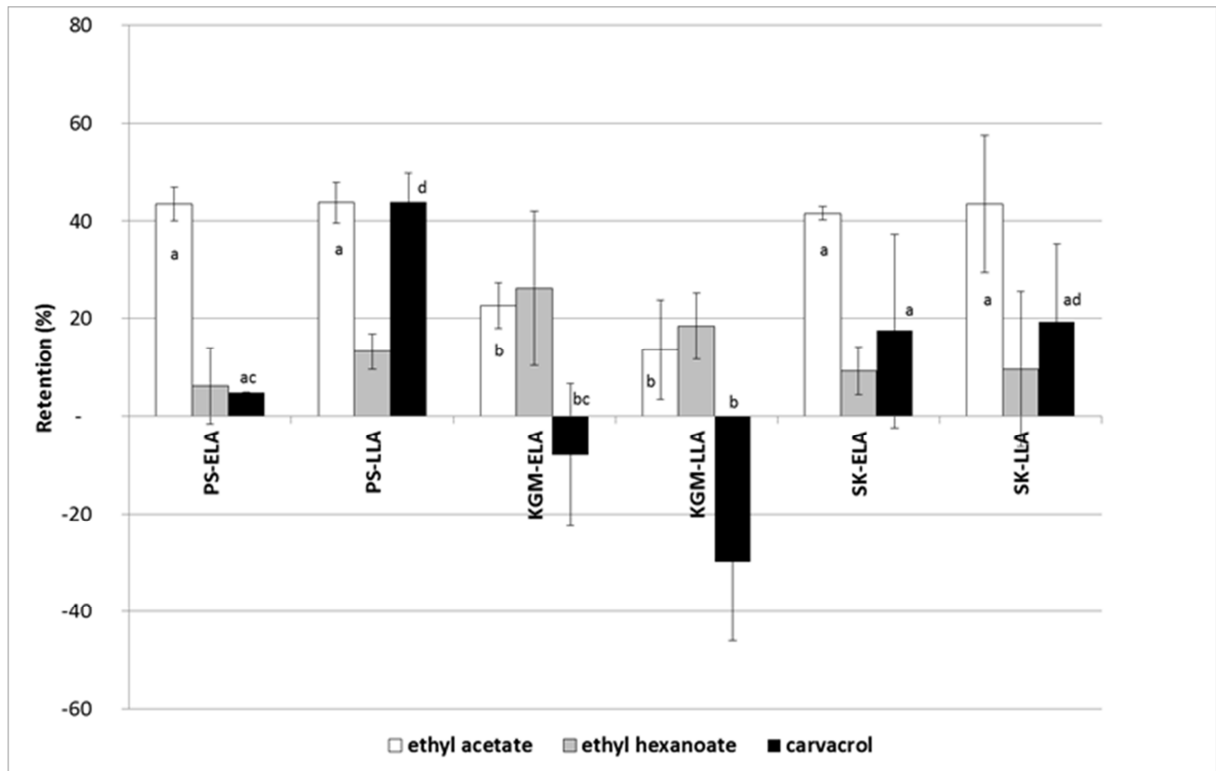
L'acétate d'éthyle, du fait de sa très grande volatilité, a nécessité l'usage d'une autre méthode d'extraction : la méthode SPME couplée avec la méthode des ajouts dosés. Excepté pour SK-LLA, les matrices contenaient 89 à 98 % de l'acétate d'éthyle. Ces pourcentages proches de 100 nous montrent que la méthode d'extraction est efficace.

Pour les deux esters, l'acétate d'éthyle et l'hexanoate d'éthyle, SK-LLA est la matrice qui en contenait le moins. Nous constatons également que lorsque ces deux esters étaient ajoutés en fin de process, leur perte était plus importante. Ceci pourrait s'expliquer par la forte volatilité de ces deux composés d'arôme, nettement plus volatils que le carvacrol.

2.1.3 Etude de la présence ou non d'interactions entre les composés d'arôme et les polysaccharides

La présence ou non d'encapsulation moléculaire entre les divers polysides et les composés d'arôme a été mise en évidence par la détermination des coefficients de partage $K_{\text{air/matrice}}$ via la méthode PRV. L'équilibre thermodynamique était atteint en quatre heures à température ambiante. Par praticité, les mesures ont été faites après 24 heures de stockage à température ambiante. Les résultats sont présentés dans la publication I.

Résumé graphique de la publication I



Effect of konjac glucomannan addition on aroma release in gels containing potato starch

Céline Lafarge^a, Nathalie Cayot^{a1}, Chantal Hory^b, Liseth Goncalves^a, Claire Chassefont^a, Patricia Le Bail^c,

^a *Unité Procédés Alimentaires et Microbiologiques, UMR A 02.102, AgroSup Dijon / Université de Bourgogne, 1 esplanade Erasme, F-21000 Dijon, France*

^b *Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR 6265 CNRS, UMR 1324 INRA, Université de Bourgogne, AgroSup Dijon, 17 rue Sully F-21000 Dijon.*

^c *Unité de Physicochimie des Macromolécules, Institut National de la Recherche Agronomique, BP 71627, 44316 Nantes, Cedex 03, France.*

Abstract

The present study aimed to measure the retention of aroma compounds (ethyl acetate, ethyl hexanoate and carvacrol) in dispersions based on konjac glucomannan and/or potato starch, and to highlight the influence of konjac glucomannan on the mechanisms involved in aroma retention. Publications on the effect of konjac glucomannan on aroma release are scarce. Konjac glucomannan is a polysaccharide used as a food additive for its viscous and emulsifying properties. Retention of aroma compounds in dispersions was calculated from partition coefficients which were measured using the phase ratio variation method. This method, consisting of analyses of the headspace at equilibrium, enables the determination of the partition coefficient of volatile compounds in a gas/liquid system without external or internal calibration. The three aroma compounds chosen for this study behave differently towards amylose. Prior to the release study, the complexing behavior of carvacrol with starch, hitherto unknown, was investigated by X-ray diffraction: V_{6III} amylose complexes were formed with carvacrol. Our results showed no specific interaction between ethyl hexanoate and potato starch or konjac glucomannan. Ethyl acetate retention seemed to be due to trapping in the complex network of polysaccharides and to the density of this network. Retention of carvacrol was influenced by the nature of polysaccharides present in the dispersion, and was mainly governed by specific interaction with starch. Additionally, the addition of konjac glucomannan to potato starch dispersions decreased retention of volatile compounds complexing starch, but had little effect on retention of the other aroma compounds.

¹Corresponding author. Tel.: +33 3 80 77 40 32
E-mail address: nathalie.cayot@agrosupdijon.fr (N.Cayot).

Highlights

- V_{6III} amylose complexes were formed with carvacrol.
- Aroma compounds can be trapped in Konjac dispersion.
- Addition of konjac decreased retention governed by interaction with amylose.

Keywords: Gas / dispersion partition coefficient, Phase Ratio Variation method (PRV), X-ray analysis, Konjac glucomannan, Potato starch, Aroma compound .

1.INTRODUCTION

Polysaccharides, when used as thickening and stabilizing agents in food formulation, are commonly known to reduce flavor release due to an increase in viscosity and/or molecular interaction with flavor compounds (Arvisenet, Le Bail et al., 2002).

Among polysaccharides used in the food industry, starch is one of the most important food hydrocolloids. It is used not only as a main ingredient of staple foods but also as a thickener, gelling agent, stabilizer and fat replacer in processed food products. Starch may interact with small molecules such as aroma compounds or lipids. Additionally, to avoid negative effects such as syneresis which may occur during storage, other hydrocolloids are often added to starch to maintain overall product quality throughout the shelf-life. Synergistic interaction between starch and the added hydrocolloid may modify the texture, improve moisture retention and control water mobility (Takahiro, Yohei et al., 2005; Alam, Siddiqui et al., 2009).

Konjac glucomannan (KGM) is one of these polysaccharides. KGM is an essentially linear polysaccharide composed of blocks of β -1,4-linked mannose and glucosyl residues with approximately 5-10 % acetylation (Yoshimura, Takaya et al., 1998b; Khanna and Tester, 2006). KGM was reported by diverse authors to interact synergistically with carrageenan, xanthan, gellan gum, and with starches of various botanic origins: maize (Yoshimura, Takaya et al., 1998a; Yoshimura, Takaya et al., 1998b; Khanna and Tester, 2006), wheat (Takahiro, Yohei et al., 2005; Zhou, Wang et al., 2008), potato (Khanna and Tester, 2006), tapioca (Muadklay and Charoenrein, 2008), and rice (Huang, Kennedy et al., 2007; Charoenrein, Tatirat et al., 2010). All these authors found that the high water holding capacity of KGM prevented syneresis occurring in starch gels and slowed down the retrogradation rate of starch during storage. Due to its technological properties when combined with other ingredients, KGM can also be used as a 'fat analogue' in the formulation of reduced/low-fat food products (Delgado-Pando, Cofrades et al., 2011; Jimenez-Colmenero, Cofrades et al., 2013).

To our knowledge, publications on the effect of konjac glucomannan on aroma release are scarce. Though the addition of a small amount of KGM to starch matrices might be useful to control the texture and extend the shelf life of food products, it might also affect the interactions between aroma compounds and starch, and, as a consequence, affect flavor retention and release.

In this context, the present study aimed to measure the retention of aroma compounds in dispersions based on konjac glucomannan (KGM), potato starch (PS) and a dispersion of konjac glucomannan and potato starch (SK) and highlighted the influence of the konjac glucomannan on the mechanisms involved in aroma retention.

Three aroma compounds with different physicochemical properties, functional groups and behavior towards starch were chosen: ethyl hexanoate, ethyl acetate and carvacrol. Ethyl hexanoate and ethyl acetate are two aroma compounds frequently used in food research. Ethyl hexanoate can induce V6II amylose but ethyl acetate is non-complexing with amylose (Biais, Le Bail et al., 2006). Carvacrol is a phenolic compound and a natural antioxidant of great interest for the food industry because of its inhibitory effect on the growth of various microorganisms and its capacity to protect organisms and cells from damage induced by oxidative stress (Burt, 2004; Ben Arfa, Combes et al., 2006). The complexing properties of carvacrol with amylose are unknown. X-ray analysis was used in the present study to verify its complexing behavior: V6III amylose complexes were formed with carvacrol.

The retention (or release) of the three aroma compounds in complex matrices can be measured using the gas/dispersion partition coefficient K ($= C_g/C_m$) at equilibrium under infinite dilution conditions. No specific interaction was found between ethyl hexanoate and the different polysaccharides. Ethyl acetate retention seemed to be due to trapping in the complex network of polysaccharides and to the density of this network. Retention of carvacrol was influenced by the nature of polysaccharides present in the dispersion, and was mainly governed by specific interactions with starch. Additionally, the addition of konjac glucomannan to potato starch dispersions decreased retention of volatile compounds complexing starch, but had little effect on retention of the other aroma compounds.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Potato starch (PS) (Sigma Aldrich) and purified konjac glucomannan (KGM) (kindly given by Georges Srzednick (UNSW, Sidney)) were used. Aqueous dispersions of potato starch (PS), of konjac glucomannan (KGM), and of the starch – konjac glucomannan dispersion (SK) were made using deionized MilliQ water.

Ethyl acetate (CAS number: 141-78-6, $\text{Log } P_{\text{oct-w}} = 0.73$, molecular weight = $0.088 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, boiling point = 77°C , vapor pressure at $25^\circ\text{C} = 13105 \text{ Pa}$, water solubility at $25^\circ\text{C} = 0.082 \text{ kg}\cdot\text{L}^{-1}$, non complexing with amylose (Biais, Le Bail et al., 2006)) and ethyl hexanoate (CAS number: 123-66-0, $\text{Log } P_{\text{oct-w}} = 2.83$, molecular weight = $0.144 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, boiling point =

170 °C, vapor pressure at 25 °C = 240 Pa, water solubility at 25°C = 0.00048 kg.L⁻¹, V6II-type complexes with amylose (Biais, Le Bail et al., 2006)) were supplied by Aldrich (Saint-Louis, USA).

Carvacrol (CAS number: 499-75-2, LogP_{oct-w} = 3.49, molecular weight = 0.150 kg.mol⁻¹, boiling point = 237 °C, vapor pressure at 25 °C = 3 Pa, water solubility at 25°C = 0.00125 kg.L⁻¹, V6III-type complexes with amylose (Biais, Le Bail et al., 2006)) was supplied by SAFC (Saint-Louis, USA). The purity of the three aroma compounds was greater than 98 %.

Propylene glycol (Aldrich, purity 99.5 %, food grade, CAS number: 57-55-6, Log P_{oct-w} = -0.92, molecular weight = 0.076 kg.mol⁻¹, boiling point = 155 °C, vapor pressure at 25 °C = 39 Pa, water solubility at 25 °C = 0.811 kg.L⁻¹, V6I-type complexes with amylose (Biais, Le Bail et al., 2006)) was used as a dispersion solvent to prepare a stock solution of aroma compound.

2.2. Preparation of carvacrol – amylose complexes

The preparation procedure was designed to favor the formation of complexes. Twenty eight grams of distilled water was stirred for 10 min with a bubbling of nitrogen to prevent further oxidation, and was put in an aluminum flask. Potato starch was gently added and the resulting PS dispersion (5 % w/w) was stirred to avoid sedimentation. In the case of the SK dispersion, KGM was added to the PS dispersion, very slowly but with strong stirring. Then the dispersion was put in the RVA apparatus (Newport Scientific, Jessup, USA) at 50 °C for 1 min and carvacrol (1 cm³) was added. The dispersions were heated to 90 °C at a constant rate of 10 °C.min⁻¹, kept at this temperature for 15 min and finally cooled to 20 °C at the same rate. At the beginning of the pasting profile, the dispersion was stirred at 960 rpm for the first 10 s to ensure the uniformity of the dispersion. Afterwards, a constant stirring of 160 rpm was applied.

After cooling, water content of samples was adjusted at Aw = 0.75 by desorption over saturated NaCl solution.

2.3. X-ray diffraction analysis

Fifty milligrams of sample equilibrated at Aw=0.75 was sealed in a copper ring between two adhesive tape sheets to prevent any change in water content. The sample was examined by Wide Angle X-ray Scattering. Measurements were performed using a D8 Discover spectrometer with GADDS detector and cross-coupled mirrors from Bruker-AXS (Madison, USA), working at 40 KV and 40 mA, with a copper monochromator ($\lambda=1.54059 \cdot 10^{-10}$ m) and sample alignment by microscopic video and laser. Data were monitored by a 120° curve detector for 10 min and normalized between 3 and 30° (2 θ).

2.4. Preparation of konjac-glucomannan and potato starch dispersions

Aqueous dispersions of potato starch (PS, 5% w/w), of konjac glucomannan (KGM, 0.2 % w/w), and of the starch – konjac glucomannan dispersion (SK, 0.2 % w/w of konjac glucomannan and 5 % w/w of potato starch) were prepared using a Rapid ViscoAnalyser (RVA) Super 4 apparatus (Newport Scientific, Jessup, USA) with the “STD1” thermal program. The dispersions were kept at 50 °C for 1 min, heated from 50 °C to 95 °C at a constant rate of 12 °C·min⁻¹, kept at 95 °C for 3.5 min, cooled to 60 °C at the same scanning rate and then kept at 60 °C for 3 min. The agitation speed was fixed at 960 rpm for the first 10 s at 50 °C then for 10 s at 60 °C (during cooling) to ensure the uniformity of the dispersion, and finally at 160 rpm until the end of the process. A stock solution of aroma compound was prepared by dissolving a given amount of aroma compound in propylene glycol at 25 °C while stirring in order to obtain a final concentration of 2 mmoles of volatile compound per glucose equivalent in the polysaccharide gel. The stock solutions were stored at 4°C. One hundred µL of stock solution was added either before heating (early ligand addition: ELA), or after cooling (30 sec after the start of the plateau at 60 °C, late ligand addition: LLA). Resulting concentrations of aroma compounds in polysaccharide gel are as follows: carvacrol 77.1 mg·L⁻¹; hexanoate 65.4 mg·L⁻¹ and 41.3 mg·L⁻¹ ethyl acetate. Distilled de-ionized water (STD) was used as the control and underwent the same preparation procedure. Finally, for each aroma compound, height samples in triplicate were made: STD-ELA, STD-LLA, PS-ELA, PS-LLA, KGM-ELA, KGM-LLA, SK-ELA, SK-LLA.

Viscosity profiles were recorded for all of the systems. Three parameters were taken from the RVA curves: pasting temperature (°C) (corresponding to the beginning of the increase in viscosity), peak viscosity (Pa·s) and final viscosity at 60 °C (Pa·s). Corresponding values (mean ± standard deviation of triplicate) are reported in Table 1.

2.5. Head Space Gas Chromatography analysis (HS-GC)

2.5.1. Sampling

Immediately after preparation, different amounts ranging from 50 mg to 3000 mg of each preparation were poured into headspace vials (22 mL, Supelco, Bellefonte, USA): 50 mg to 3000 mg for preparations with ethyl acetate, 50 mg to 1000 mg for preparations with ethyl hexanoate, and 50 mg to 1500 mg for preparations with carvacrol. The vials were sealed using silicone septa in metallic caps (VWR International, Radnor, USA). The samples were maintained at 25 °C using the incubator of an automatic headspace sampler CombiPal (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) until the HS-GC analysis. Five repetitions were done per volume.

2.5.2. Gas Chromatography (GC) analysis

GC analysis was carried out according to (Savary, Guichard et al., 2006). One cm³ of headspace was automatically withdrawn from the vials using a 1 cm³ gastight syringe (Gerstel, Mülheim, Germany) preheated to 40 °C. The gaseous sample was injected and analyzed in a Trace gas chromatograph (Thermo Electron corporation, Marietta, USA) using a flame ionization detector (FID).

Each vial was used only once. The injector temperature was set at 240 °C with an injection rate of 200 μL·s⁻¹. A 0.32 mm x 30 m capillary DB-Wax column (film = 0.5 μm, Chromoptic, Courtaboeuf, France) was used with a carrier gas (helium) at a velocity of 45 cm·s⁻¹.

The setting for the oven temperature program depended on the aroma compound: for ethyl acetate, 50 °C for 3 min, then up to 100 °C at 10 °C·min⁻¹, and up to 180 °C at 20 °C·min⁻¹; for ethyl hexanoate, from 150 °C to 215 °C at 5 °C·min⁻¹; for carvacrol, from 60 °C to 120 °C at 5 °C·min⁻¹. The temperature of the detector was set at 250 °C.

2.6. Phase Ratio Volume method (PRV)

At equilibrium, a one-ml sample of headspace was withdrawn from each tube and analyzed by gas chromatography as described previously. The concentration of the volatile compound in the headspace is proportional to the sample volume in the vial. Ettre, Welter et al., (1993) described the following linear relationship:

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{f_i C_m} K + \frac{\beta}{f_i C_m} \quad (1)$$

where A is the chromatographic peak area at equilibrium, f_i is the proportional factor, C_m is the initial sample concentration in the sample and β is the ratio between the volume of headspace V_g and the volume of the dispersion V_m (β = V_g/V_m).

The quantities of samples (50, 100, 200, 500, 1000, 2000 and 3000 mg) poured into glass vials represented different phase ratios β (respectively, 479; 239; 119; 47; 23; 11; 5).

To transform mass into volume, the density of each sample was measured using a picnometer.

The equation (1) can be plotted as 1/A against β, where a and b are respectively the slope and the intercept. From the linear equation obtained (Eq. 2), the partition coefficient K (=a/b) is calculated.

$$\frac{1}{A} = a\beta + b \quad (2)$$

where $a = K/f_i^i$ Cm and $b = 1/f_i^i$ Cm.

K was measured in five intervals for each compound.

2.7. Data analysis

The reported values were obtained by averaging the results of three series of determination and their corresponding standard deviations.

For each volatile compound, analysis of variance (ANOVA) was used to determine significant differences among gas/dispersion partition coefficients. Significance was established at $p < 0.05$. Fisher's t-tests were used to determine significant differences between k values and % retention values in the different matrices (Statistica 8 for Windows software).

Principal Component Analysis (PCA) was also performed to study the relationships between aroma retention and dispersions (Statistica8 for Windows software).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Interaction behavior of carvacrol towards amylose

The X-ray diagram obtained without carvacrol (spectrum not shown) exhibited reflections characteristic of B-type structure. This result indicates that the recrystallization of amylose and amylopectin chains occurred in double helices.

X-ray diffraction patterns of PS and SK samples in the presence of carvacrol are shown in Figure 1. The PS sample spectrum (Figure 1, curve 1) yielded two allomorphic structures: a V6III type structure, determined by (Buléon, Delage et al., 1990) with reflections at $2\theta = 6.9^\circ$, 8.8° , 9.6° , 11.1° , 12.5° , 13° , 15.2° , 17° , 19.2° , and 20° , and a B-type structure ($2\theta = 5.6^\circ$, 10.1° , 11.3° , 14.9° , 17° , 19.5° , 22° , 23.9°). As the crystalline packing (III) is present, it is possible to conclude that amylose forms complexes with carvacrol, and that the carvacrol molecules were between the helices or inside and outside the helices. The B type structure observed reflected the amylopectin retrogradation. No peak characteristic of recrystallized free ligand is observed. Free ligand could be present in the liquid state.

The diffraction diagram of the complexes formed in the presence of KGM (Figure 1, curve 2) showed the same reflections as the PS sample spectrum and the intensity of the peaks were very similar. Therefore, these results highlight the amylose complexation with carvacrol in spite of the presence of konjac glucomannan.

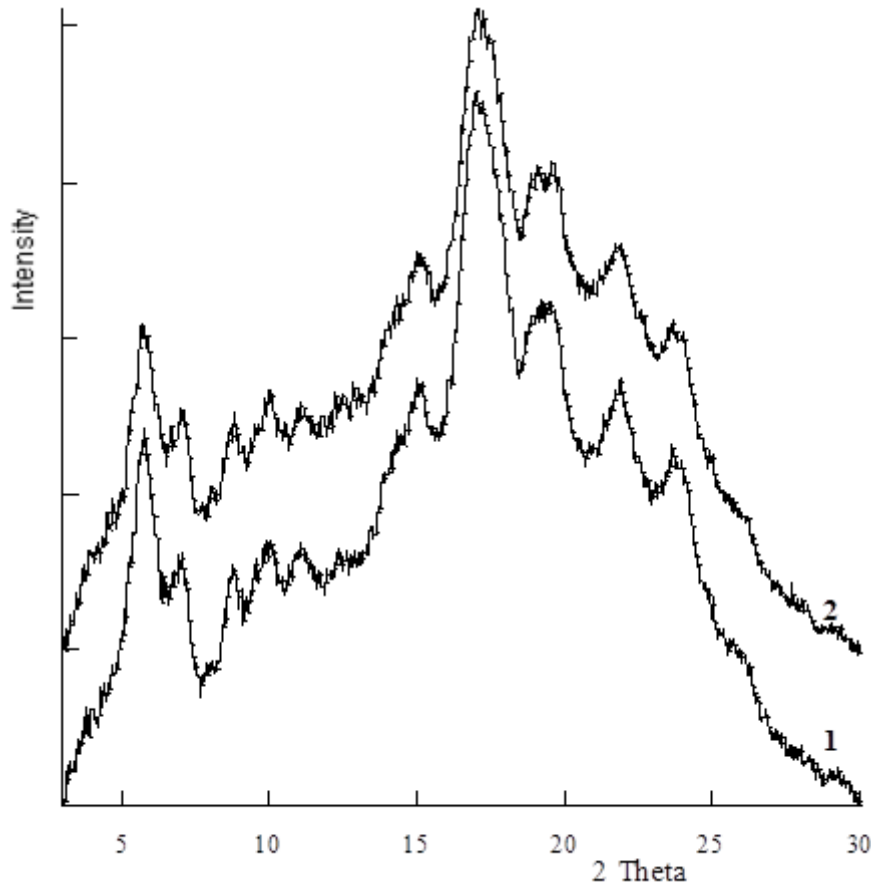


Figure 1: X-ray diffraction spectra obtained for potato starch dispersion and potato starch / konjac glucomannan dispersion in presence of carvacrol. Curve 1: PS dispersion, curve 2: SK dispersion

3.2. Pasting and viscosity characteristics of potato starch and konjac - glucomannan dispersions

Pasting viscosity curves had the same shape for both dispersions (data not shown): viscosity increased as temperature increased above the pasting temperature, and viscosity decreased as the starch granules began to leach their components.

Pasting temperatures were similar whatever the nature of sample (Table 1). In contrast, peak viscosities and final viscosities were significantly higher for SK dispersions than for PS dispersions. As the dry matter content is approximately equal for all dispersions, the increase in viscosity can be attributed to the thickening effect of KGM. In fact, KGM can absorb about ten times its weight of water. These results are in accordance with other results reported in the literature (Charoenrein, Tatirat et al., 2010). Funami, Kataoka et al., (2005) explained this increase by the thickening effect due to KGM but also by interactions between KGM and swollen starch particles or with the leached amylopectin. These authors suggest that, upon heating, glucomannan interacts with the long exterior chains of amylopectin, leading to an increase in paste viscosity of the starch – glucomannan dispersion.

Such interactions between polysaccharides should contribute to a decrease in the amount of amylose leached during heating, thus reducing the increase of the viscosity of the continuous phase. Additionally, Bahnassey and Breene (1994) suggested that competition for water during starch swelling in the presence of KGM – more precisely, the diffusion of water from the continuous phase containing KGM into the starch granules - increased the concentration of KGM surrounding the starch granules.

The addition of volatile compounds had no impact on the overall shape of the paste curve, whatever the nature of the volatile compound and the moment it was added to the dispersion (data not shown). Pasting temperatures and final viscosities were not modified by the presence of volatile compounds (Table 1). In accordance with other studies (Cayot, Lafarge et al., 2000; Lafarge, Bard et al., 2008), the addition of aroma compounds did not modify peak viscosity for PS.

Table 1: Pasting and viscosity characteristics of dispersions.
Volatile compounds were added either before heating (ELA) or during the plateau at 60°C (LLA).
Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ using Fisher's t-test.

| | Pasting temperature (°C) | | | | Peak viscosity (Pa·s) | | | | Final viscosity (Pa·s) | | | |
|-------------------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Experimental values (means ± s.d.) | | | | Experimental values (means ± s.d.) | | | | Experimental values (means ± s.d.) | | | |
| | PS-ELA | PS-LLA | SK-ELA | SK-LLA | PS-ELA | PS-LLA | SK-ELA | SK-LLA | PS-ELA | PS-LLA | SK-ELA | SK-LLA |
| no aroma compound | 70.25 ^{bc} ± 0.45 | | 70.14 ^{abc} ± 0.62 | | 1.564 ^a ± 0.041 | | 2.250 ^d ± 0.161 | | 1.046 ^a ± 0.053 | | 1.315 ^b ± 0.074 | |
| Ethyl acetate | 70.25 ^{bc} ± 0.06 | 70.30 ^{bc} ± 0.00 | 69.83 ^{abc} ± 0.49 | 69.98 ^{abc} ± 0.46 | 1.457 ^a ± 0.025 | 1.471 ^a ± 0.015 | 1.866 ^b ± 0.109 | 2.051 ^{bcd} ± 0.056 | 1.073 ^a ± 0.020 | 1.104 ^a ± 0.014 | 1.304 ^b ± 0.042 | 1.326 ^b ± 0.016 |
| Ethyl hexanoate | 70.22 ^{bc} ± 0.04 | 70.23 ^c ± 0.06 | 70.18 ^{abc} ± 0.05 | 69.88 ^{abc} ± 0.46 | 1.491 ^a ± 0.012 | 1.449 ^a ± 0.023 | 1.900 ^b ± 0.095 | 2.076 ^c ± 0.044 | 1.086 ^a ± 0.012 | 1.065 ^a ± 0.043 | 1.327 ^b ± 0.059 | 1.332 ^b ± 0.037 |
| Carvacrol | 70.20 ^{abc} ± 0.09 | 70.20 ^{bc} ± 0.09 | 69.63 ^a ± 0.49 | 69.75 ^{bc} ± 0.73 | 1.501 ^a ± 0.025 | 1.474 ^a ± 0.020 | 1.995 ^{bc} ± 0.076 | 2.038 ^{bc} ± 0.108 | 1.093 ^a ± 0.037 | 1.058 ^a ± 0.035 | 1.331 ^b ± 0.078 | 1.344 ^b ± 0.020 |

3.3. Partition coefficients of volatile compounds in pure water

Partition coefficients of volatile compounds (K) must be measured when the system is at thermodynamic equilibrium and under conditions of infinite dilution for the volatile compounds. Preliminary experiments were done to verify these conditions, and showed that equilibrium was reached after four hours. For practical reasons, samples were analyzed after 24h of storage. The air/water partition coefficients of aroma compounds were representative of the volatility of these molecules in water.

Partition coefficients of the three volatile compounds were determined in water at 25°C, and the K values obtained were 0.0125 for ethyl acetate, 0.0399 for ethyl hexanoate, and 0.0010 for carvacrol (Table 2). The least volatile compound (i.e. lowest K value) is therefore carvacrol, and the most volatile compound is ethyl hexanoate.

Table 2: Gas/water partition coefficients K of volatile compounds (PRV method, 25 °C, 24 h). Volatile compounds were added either before heating (ELA) or during the plateau at 60 °C (LLA). For each aroma compound means were calculated using five repetitions per volume \pm s.d.. Means with different letters are significantly different.

| Volatile compound | K | K | |
|-------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| | literature data at 30°C | Experimental values at 25°C | |
| | water | STD-ELA | STD-LLA |
| Ethyl acetate | 0.0162* | 0.0125 ^b | 0.0125 ^b |
| | 0.0199** | \pm 0.0024 | \pm 0.0024 |
| Ethyl hexanoate | 0.0302* | 0.0399 ^a | 0.0399 ^a |
| | 0.0340*** | \pm 0.0052 | \pm 0.0052 |
| Carvacrol | 0.0002**** | 0.0011 ^{ab} | 0.0010 ^{abc} |
| | | \pm 0.0001 | \pm 0.0001 |

* (Savary, Guichard et al., 2006) ** (Kopjar, Andriot et al., 2010) *** (Landy, Courthaudon et al., 1996) **** (Van Roon, Parsons et al., 2005)

For the two esters, the measured values are in accordance with published data (Landy, Courthaudon et al., 1996; Savary, Guichard et al., 2006; Kopjar, Andriot et al., 2010). The slight differences can be attributed mainly to differences in the experimental conditions such as the temperature of analysis. As expected, for these two esters, volatility increased with the number of carbon atoms in the molecule. In fact, for a homologous series of esters, there is a linear relationship between K and the number of carbon atoms (or hydrophobicity log P) i.e. Log P increases as K increases. Thus, the polar character of the compounds (log P) is reduced as the carbon chain length increases (Jouquand, Ducruet et al., 2004; Savary, Guichard et al., 2006).

Carvacrol was found to have a low partition coefficient in water, i.e. to be less volatile than the esters. Indeed, for partially soluble compounds (solubility lower than 10 g·L⁻¹),

Amoore and Buttery (1978) established a relationship giving partition coefficients in water as a function of saturated vapor pressure, solubility in water and molecular weight. So, despite its high log P value, the very low vapor pressure of carvacrol could explain this result.

The volatility of volatile compounds in water was taken as the reference for the polysaccharide dispersions studied hereafter. Retention was calculated as the ratio of the difference between K obtained for water and K obtained for a given dispersion to K obtained for water (x 100 to obtain a percentage) and the results were reported in Figure 2.

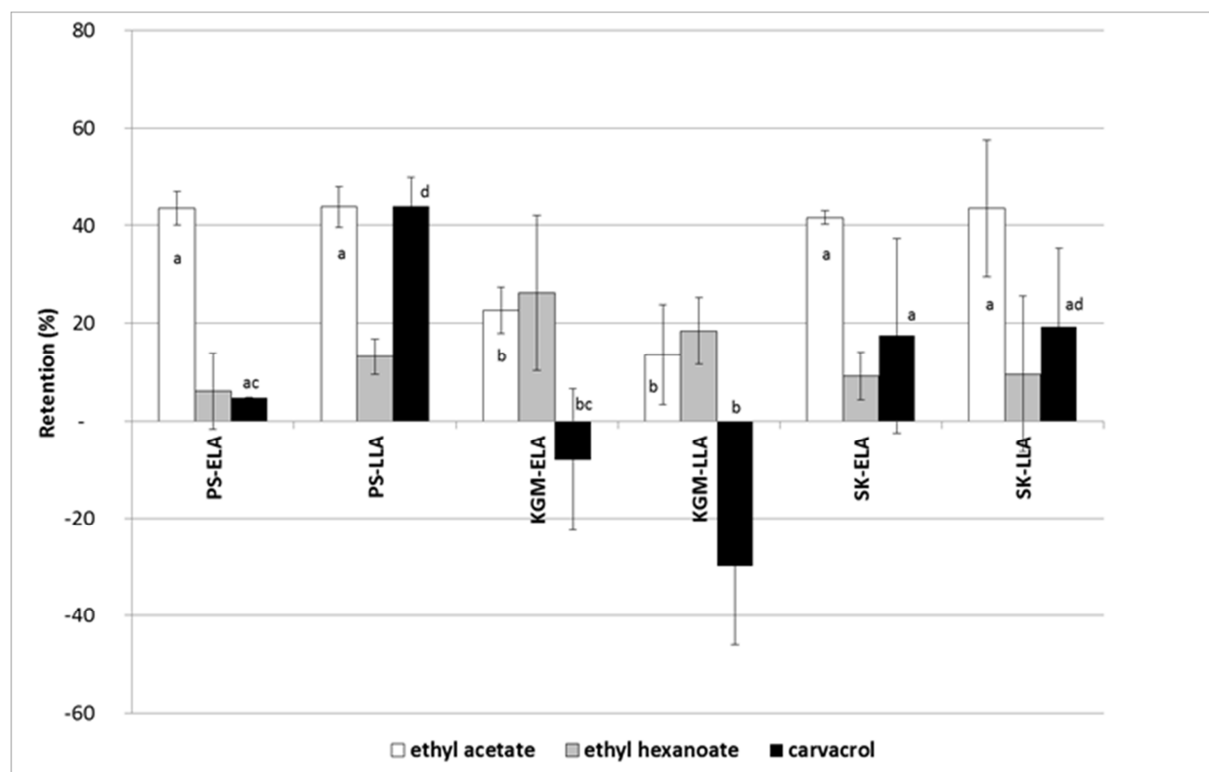


Figure 2: Retention of volatile compounds (ethyl acetate = white bars, ethyl hexanoate = grey bars, carvacrol = black bars) by potato starch (PS), konjac glucomannan (KGM) and potato starch-konjac glucomannan dispersions (SK). The volatile compounds were added either before heating (ELA) or during the plateau at 60 °C (LLA). For each aroma compound, different letters on bars indicate significant differences among suspensions (p<0.05).

3.4. Effect of polysaccharide dispersions on the retention of volatile compounds

As retention experiments were measured at equilibrium, the viscosity effect affecting diffusion was limited, and the reported results only stand for physicochemical interaction between aroma compounds and polysaccharides.

Analysis of variance of the retention percentages measured for each aroma compound in the different dispersions showed

- no significant differences for ethyl hexanoate,

- significant differences for ethyl acetate between dispersions with starch and without starch,
- significant differences for carvacrol.

A PCA analysis was done in order to determine which factors govern interaction, and mainly for interaction with carvacrol.

As shown in Figure 3, the first two principal components accounted for 82 % of the total variance (51.85 % and 30.24 %, respectively). The plot of variables (Figure 3a) showed the vectors of variables are well represented being close to the correlation circle. On the first axis (Fact.1), the retention percentage of ethyl acetate is positively correlated to dispersions containing PS. The retention percentage of ethyl hexanoate is negatively correlated to these two variables. On the second axis (Fact.2), the retention percentage of carvacrol is positively correlated to the late ligand addition. The score plot of the different dispersions is in Figure 3b and shows two groups of data: on the left side of axis 1, dispersions containing starch; on the right side of axis 1, dispersions containing only KGM. This representation of the correlations will help the following discussion on data.

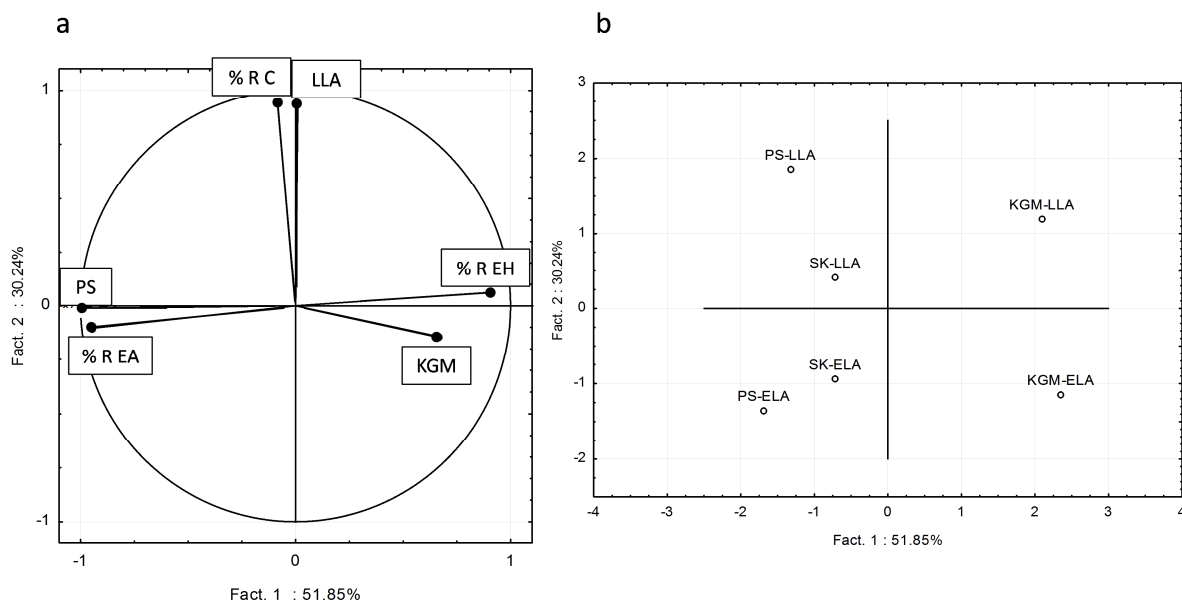


Figure 3: Results of PCA loading (a) and score (b) plots of the different dispersions. %R EA= % retention of ethyl acetate; %R EH= % retention of ethyl hexanoate; %R C= % retention of carvacrol; PS= dispersion containing potato starch; KGM= dispersion containing konjac glucomannan; LA= ligand addition at the end of heating. PS-ELA: potato starch, early ligand addition; PS-LLA: potato starch, late ligand addition. KGM-ELA: konjac glucomannan, early ligand addition; KGM-LLA: konjac glucomannan, late ligand addition. SK-ELA: starch-konjac glucomannan, early ligand addition; SK-LL: starch-konjac glucomannan, late ligand addition

3.4.1. Aroma behavior in KGM dispersions

Whatever the aroma compound, the time when the aroma compounds were added in KGM dispersions during the pasting procedure (modalities “LLA” and “ELA”) had no statistically significant effect on retention.

For both esters, a retention ranging between 14 and 26 % was measured in presence of KGM. The literature attributes this effect to the existence of hydrophobic interactions between non-polar esters and polymer chains. In fact, KGM molecules in water can regroup themselves to create a local hydrophobic medium and then organize the water molecules between them. Thus hydrophobic molecules such as ethyl acetate and ethyl hexanoate introduced in such a solution can interact with KGM because of the lack of strong favorable interaction with water molecules.

A negative retention ranging between -8 and -30 % was measured for carvacrol, but these results were obtained with huge standard deviations. In any case (considering negative retention or no retention), these results were surprising because carvacrol was a more hydrophobic compound than the esters. This effect could be assimilated to a salting-out phenomenon revealing competition between carvacrol and the macromolecules of KGM to bind water molecules. In spite of its relatively high hydrophobicity (Log P=2.83), carvacrol has a hydroxyl group which may interact with water molecules through H-bonds. So, there could be a competition between carvacrol and KGM to bind water molecules which could explain its negative retention. The same behavior was reported for ethyl hexanoate in soft drink model systems containing sugars (Hansson A., Andersson J. et al., 2001), for 2-butanone and 1-hexanol in maltodextrin solutions (Jouquand, Ducruet et al., 2004), and for ethyl acetate and ethyl isobutanoate in stirred yoghurt models (Nongonierma, Springett et al., 2006). In all these food systems, the macromolecules solubilization necessitates water and so less free water is available to interact with volatile compounds (Jouquand, Aguni et al., 2008).

3.4.2. Aroma behavior in starch dispersions

In dispersions containing starch, all the aroma compounds were retained at different levels: the measured values ranged from 5 to 44 %.

For both esters, the moment when they were added during the pasting procedure had no significant effect. The retention of ethyl acetate was above 40 % and between 6-13 % for ethyl hexanoate. These results indicate that esters interacted with starch. The effects of starch on aroma retention can be explained by two mechanisms: physical entrapment of aroma molecules within the hydrocolloidal dispersion and interaction between the aroma compounds and the gel components. More precisely, amylose, a starch polymer with an helical structure, is able to form semi-crystalline complexes known under the generic name of V amylose, which is known for its high aroma retention property (Jouquand, Ducruet et al., 2006). Depending on the ligand, the structure of V amylose can be classified into two families: V6 and V8 where 6 and 8 represent the number of D-glucosyl units per turn. In V6 amylose, three

types of crystalline packing (V6I, V6II and V6III) may be obtained depending on the nature of the complexing molecule which can be trapped either in the single helix of amylose (V6I) or both within and between amylose helices (V6II and V6III) (Helbert and Chanzy, 1994) and, thus have an influence on aroma retention.

Ethyl acetate is not known to interact specifically with starch, but this retention effect has already been observed in previous studies (Lafarge, Bard et al., 2008). This retention can be due to trapping in the complex network of starch. Ethyl hexanoate showed less retention. Nevertheless, previous studies (Biais, Le Bail et al., 2006) have shown that ethyl hexanoate was able to complex amylose in the V6II type. Several hypotheses may explain our results: the stirring speed during the preparation of suspension which can be a critical factor in the formation of amylose-ethyl hexanoate complex. Biais, Le Bail et al. (2006) reported that, due to its high molecular weight and low solubility in water, very strong stirring during the making of dispersions (equivalent to the one used in emulsifying processes) is necessary to form amylose-complexes. Furthermore, we can attribute the small retention of ethyl hexanoate to the fact that this compound is less soluble in water and more hydrophobic than ethyl acetate.

With carvacrol, the results varied considerably depending on the moment the volatile compound was added. Consequently, chemical parameters were probably responsible for these retention phenomena. A retention effect was observed for PS dispersions, and the retention was greatly increased (up to 50 %) when carvacrol was added during the plateau at 60 °C (LLA) (Figure 2). This value reflects the presence of strong interaction between starch and carvacrol. This observation can be explained by the fact that, at the moment of the pasting procedure, amylose was partly leached out of the starch granules and could more easily interact with carvacrol. Indeed, carvacrol is known to form complex with amylose (Biais, Le Bail et al., 2006). On the other hand, no retention was observed with PS when carvacrol was added before heating (ELA). Our first hypothesis to explain this difference in retention of carvacrol according to the modalities “LLA” and “ELA” was based on the lack of airtightness of RVA apparatus. To allow us to validate this hypothesis, we measured the losses of carvacrol during pasting procedure using Likens-Nickerson extraction method. We obtained the same amount of carvacrol (around 90 % of the initial amount) in PS-ELA or PS-LLA (data not shown). This difference in retention of carvacrol between PS-ELA or PS-LLA needs to be elucidated. The role of propylene glycol used to dilute aroma compound should be studied. Indeed, propylene glycol is able to complex amylose in the V6I type (Biais, Le Bail et al., 2006). We can therefore assume a competition between the propylene glycol and carvacrol for amylose. More investigations in DSC and/or X-ray studies are needed to understand the respective roles of propylene glycol and carvacrol with starch, and more particularly with amylose.

3.4.3. Aroma behavior in potato starch – konjac glucomannan dispersion

In SK dispersions, all the aroma compounds were retained with different levels: the measured values ranged from 9 to 43 %. For all aroma compounds, the moment when they

were added during the pasting procedure had no significant effect. The retention of ethyl acetate was above 40 % that of ethyl hexanoate was 9 %, and 18 % for carvacrol.

We observed that the retention of ethyl hexanoate was the same in the PS dispersion, in the KGM dispersions and in the SK dispersions. It can be concluded that there was no specific interaction between ethyl hexanoate and the different polysaccharides.

In SK dispersions, the retention of ethyl acetate is the same as the one obtained in starch dispersions but twice as high as that obtained in KGM dispersions. These results can be explained by the difference of polysaccharide amount in the dispersions. Aroma retention increased with an increased polysaccharide concentration. In fact, the polysaccharide concentration for SK and PS dispersions were 25 times higher than in KGM dispersions. In this case, the retention does not seem to depend on the presence of one or the other polysaccharide, but rather on a trapping in the complex network of polysaccharides and to the density of this network. The concentration of polysaccharides in the dispersion is of great importance as it affects the mechanical properties of the dispersions. The increased viscosity of dispersions usually results in a decreased aroma release and consequently in an increased retention.

In SK dispersions, retention of carvacrol is influenced by the nature of the polysaccharides present in the dispersion. In fact, addition of KGM to PS dispersions (SK) reduced the retention of carvacrol for “LLA modality” and increased the retention of carvacrol for “ELA”. For “ELA modality”, the huge standard deviation does not allow us to draw conclusions. For “LLA modality”, as previously explained, the swelling of starch granules and the solubilization of amylose could have been limited by competition for water due to the presence of KGM and, as a consequence, the availability of carvacrol for amylose could have been diminished.

4. CONCLUSIONS

Starch is known to develop interaction with some ligands and this was confirmed in the present study. In starchy dispersions, the intensity of retention can be explained:

- by the ability of each volatile compound to form specific interactions with starch, and thus depend on the availability of amylose,
- by trapping in the complex network.

In our study, the retention of carvacrol was governed mainly by the interactions with starch (V6III complexes) confirmed by X-ray analysis. The retention of carvacrol was more important when amylose was available i.e. during the plateau at 60°C (when amylose was leached out of the starch granules). By contrast, retention of ethyl acetate was due to trapping in the complex network of starch.

KGM was able to develop interactions with some ligands depending on the chemical properties of the volatile compound and competition for water. Our results showed hydrophobic interactions between non-polar esters and polymer chains.

The addition of KGM to PS dispersions is known to limit the swelling of starch granules, thus decreasing the solubility of amylose. As a consequence, the retention governed by interaction of amylose-aroma compounds was decreased as shown in the present study for carvacrol.

REFERENCES

- Alam, F., Siddiqui, A., Lutfi, Z., & Hasnain, A. (2009). Effect of different hydrocolloids on gelatinization behaviour of hard wheat flour. *Trakia Journal of Sciences*, 7 (1), 1-6.
- Amoore, J. E., & Buttery, R. G. (1978). Partition coefficients and comparative olfactometry. *Chemical Senses Flavour*, 3, 57-71.
- Arvisenet, G., Le Bail, P., Voilley, A., & Cayot, N. (2002). Influence of physicochemical interactions between amylose and aroma compounds on the retention of aroma in food-like matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (24), 7088-7093.
- Bahnassey, Y. A., & Breene, W. M. (1994). Rapid Visco-analyser (RVA) pasting profiles of wheat, corn, waxy xorn, tapioca and amaranth starches (*A. hypochondriacus* and *A. cruentus*) in the persence of konjac flour, gellan, guar, xanthan and locust bean gums. *starch*, 4, 134-141.
- Ben Arfa, A., Combes, S., Prezosi-Belloy, L., Gontard, N., & Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 149-154.
- Benjamin, O., Leus, M., & Everett, D. W. (2011). Static headspace analysis of volatile compounds released from B-lactoglobulin-stabilized emulsions determined by the phase ratio variation method. *Food Research International*, 44, 417-424.
- Biais, B., Le Bail, P., Robert, P., Pontoire, B., & Buléon, A. (2006). Structural and stoichiometric studies of complexes between aroma compounds and amylose. Polymorphics transitions and quantification in amorphous and crystalline areas. *Carbohydrate Polymers*, 66, 306-315.
- Buléon, A., Delage, M. M., Brisson, J., & Chanzy, H. (1990). Single crystals of V amylose complexed with isopropanol and acetone. *International Journal of Biological Macromolecules*, 12 (1), 25-33.
- Burt, S. (2004). Essentials oils: Their antibacterial properties and potential applications in food - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3), 223-253.
- Cayot, N., Lafarge, C., Arvisenet, G., & Taisant, C. (2000). Influence of aroma compounds on the mechanical properties of starch-based food systems. *Journal of Texture Studies*, 31, 297-313.
- Charoenrein, S., Tatirat, O., Rengsutti, K., & Thongngam, M. (2010). Effect of konjac glucomannan on syneresis, textural properties and the microstructure of frozen rice starch gel. *Carbohydrate Polymers*, 83, 291-296.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Rodríguez-Salas, L., & Jiménez-Colmenero, F. (2011). A healthier oil combination and konjac gel as functional ingredients in low-fat pork liver pâté. *Meat Science*, 88 (2), 241-248.
- Ettre, L. S., Welter, C., & Kolb, B. (1993). Determination of gas-liquid partition coefficients by automatic equilibrium head-space gas-chromatography utilizing the ratio phase variation method. *Chromatographia*, 35, 73-84.
- Funami, T., Kataoka, Y., Omoto, T., Goto, Y., Asai, I., & Nishinari, K. (2005). Effects of non-ionic polysaccharides on the gelatinization and retrogradation behavior of wheat starch. *Food Hydrocolloids*, 19, 1-3.
- González Canga, A., Fernández Martínez, N., Sahagún, A. M., García Vieitez, J. J., Díez Liébana, M. J., Calle Pardo, Á. P., Castro Robles, L. J., & Sierra Vega, M. (2004). Glucomannan: Properties and therapeutic applications *Nutricion Hospitalaria*, 19 (1), 45-50.
- Hansson A., Andersson J., Leufvén A., & Pehrson K. (2001). Effect of changes in pH on the release of flavour compounds from a soft drink-related model system. *Food Chemistry*, 4, 429-435.
- Helbert, W., & Chanzy, H. (1994). Single crystals of V amylose complexed with n-butanol or n-pentanol: structural features and properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16, 207-213.
- Huang, M., Kennedy, J. F., Li, B., Xu Xiao, & Xie B.J. (2007). Characters of rice starch gel modified by gellan, carrageenan, and glucomannan: A texture profile analysis study. *Carbohydrate Polymers*, 69, 411-418.

- Jimenez-Colmenero, F., Cofrades, S., Herrero, A.-M., Solasb, M.-T., & Ruiz-Capillas, C. (2013). Konjac gel for use as potential fat analogue for healthier meat product development: Effect of chilled and frozen storage. *Food Hydrocolloids*, 30 (1), 351-357.
- Jouquand, C., Ducruet, V., & Giampaoli, P. (2004). Partition coefficients of aroma compounds in polysaccharide solutions by the phase ratio variation method. *Food Chemistry*, 85, 467-474.
- Jouquand, C., Ducruet, V., & Le Bail, P. (2006). Formation of amylose complexes with C6-aroma compounds in starch dispersions and its impact on retention. *Food Chemistry*, 96, 461-470.
- Jouquand, Aguni, Malhiac and Grisel (2008). "Influence of chemical composition of polysaccharides on aroma retention." *Food Hydrocolloids* 22(6): 1097-1104.
- Khanna, S., & Tester, R. F. (2006). Influence of purified konjac glucomannan on the gelatinisation and retrogradation properties of maize and potato starches. *Food Hydrocolloids*, 20, 567-576.
- Kopjar, M., Andriot, I., Saint-Eve, A., Souchon, I., & Guichard, E. (2010). Retention of aroma compounds: an interlaboratory study on the effect of the composition of food matrices on thermodynamic parameters in comparison with water (Research article). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90 (8), 1285-1292.
- Lafarge, C., Bard, M.-H., Breuvert, A., Doublier, J.-L., & Cayot, N. (2008). Influence of the structure of cornstarch dispersions on kinetics of aroma release. *Journal of Food Science*, 73 (2), S104-S109.
- Landy, P., Courthaudon, J.-L., Dubois, C., & Voilley, A. (1996). Effect of Interface in Model Food Emulsions on the Volatility of Aroma Compounds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 44, 526-530.
- Martuscelli, M., Savary, G., Pittia, P., & Cayot, N. (2008). Vapour partition of aroma compounds in strawberry flavoured custard cream and effect of fat content. *Food Chemistry*, 108 (4), 1200-1207.
- Muadklay, J., & Charoenrein, S. (2008). Effects of hydrocolloids and freezing rates on freeze-thaw stability of tapioca starch gels. *Food Hydrocolloids*, 22, 1268-1272.
- Nongonierma, A., Springett, M., Le Quere, J.-L., Cayot, P., & Voilley, A. (2006). Flavour release at gas/dispersion interfaces of stirred yoghurt models. *International Dairy Journal*, 16 (2), 102-110.
- Savary, G., Guichard, E., Doublier, J.-L., & Cayot, N. (2006). Dispersion of aroma compounds: determination of partition coefficients in complex semi-solid matrices. *Food Research International*, 39 (3), 372-379.
- Takahiro, F., Yohei, K., Toshio, O., Yasunori, G., Iwao, A., & Katsuyoshi, N. (2005). Effect of non-ionic polysaccharides on the gelatinization and retrogradation behavior of wheat starch. *Food Hydrocolloids*, 19, 1-13.
- Van Roon, A., Parsons, J. R., te Kloeze, A.-M., & Govers, H. A. J. (2005). Fat and transport of monoterpenes through soils : prediction of temperature dependent soil fate model input-parameters. *Chemosphere*, 61, 599-609.
- Yoshimura, M., Takaya, T., & Nishinari, K. (1998). Rheological studies on dispersions of corn starch and konjac-glucomannan. *Carbohydrate Polymers*, 35, 71-79.
- Zhou, Y., Wang, D., Zhang, L., Du, X., & Zhou, X. (2008). Effect of polysaccharides on gelatinization and retrogradation of wheat starch. *Food Hydrocolloids*, 22, 505-512.

Commentaires synthétiques de la publication I et expérimentations complémentaires :

Dans une première étape, les coefficients de partage des composés dans l'eau $K_{\text{air/eau}}$ ont été déterminés. Les valeurs étaient conformes avec les données de la littérature. Notre méthode PRV était donc validée. Le carvacrol était le composé le moins volatil, l'hexanoate d'éthyle le plus volatil. Dans la série des esters, le coefficient de partage augmentait avec le nombre de carbone, c'est-à-dire avec le log de P.

Ensuite, les coefficients de partage $K_{\text{air/matrice}}$ ont été mesurés pour les différentes matrices : PS-ELA, PS-LLA, KGM-ELA, KGM-LLA, SK-ELA et SK-LLA. À partir de ces coefficients de partage $K_{\text{air/matrice}}$, le pourcentage de rétention de chaque composé d'arôme a été calculé en prenant comme référence les coefficients de partage obtenus avec l'eau. Lorsqu'une rétention est observée, cela signifie qu'il y a des interactions entre le composé volatil et le polysaccharide.

2.1.3.1 Interaction acétate d'éthyle et polysaccharides

La rétention de l'acétate d'éthyle n'a pas été influencée par le moment d'ajout. Par contre, la rétention était deux fois plus importante dans les matrices contenant de l'amidon de pomme de terre (PS-ELA, PS-LLA, SK-ELA, SK-LLA) que dans les matrices contenant uniquement du glucomannane de konjac (KGM-ELA et KGM-LLA). L'acétate d'éthyle est connu pour ne pas former de complexe avec l'amidon. En augmentant la quantité de polysaccharide, c'est-à-dire en passant d'une dispersion de 0,5 % (m/m) de polyoside à 5,5 % (m/m), la rétention de l'acétate d'éthyle a été augmentée sous l'effet de la quantité de polysaccharide présent. L'acétate d'éthyle était donc piégé dans le réseau désorganisé de la matrice.

2.1.3.2 Interaction hexanoate d'éthyle et polysaccharides

Aucune variation de rétention de l'hexanoate d'éthyle n'a été mise en évidence quelle que soit la composition de la matrice et quel que soit le moment d'ajout du composé d'arôme. Or, d'après la littérature, sous certaines conditions, l'hexanoate d'éthyle forme des complexes de signature V6II avec l'amylose. Pour vérifier la présence ou non de complexes avec l'amylose selon nos conditions opératoires, une étude en DRX a été menée. Pour cette étude, la matrice PS-ELA a été choisie. 10 % (m/m d'amidon sec) d'hexanoate d'éthyle pur ou un mélange de 5 % d'hexanoate d'éthyle (m / m d'amidon sec) et 5 % de propylène glycol (m/m d'amidon sec) ont été ajoutés en début de traitement thermomécanique (figure 73).

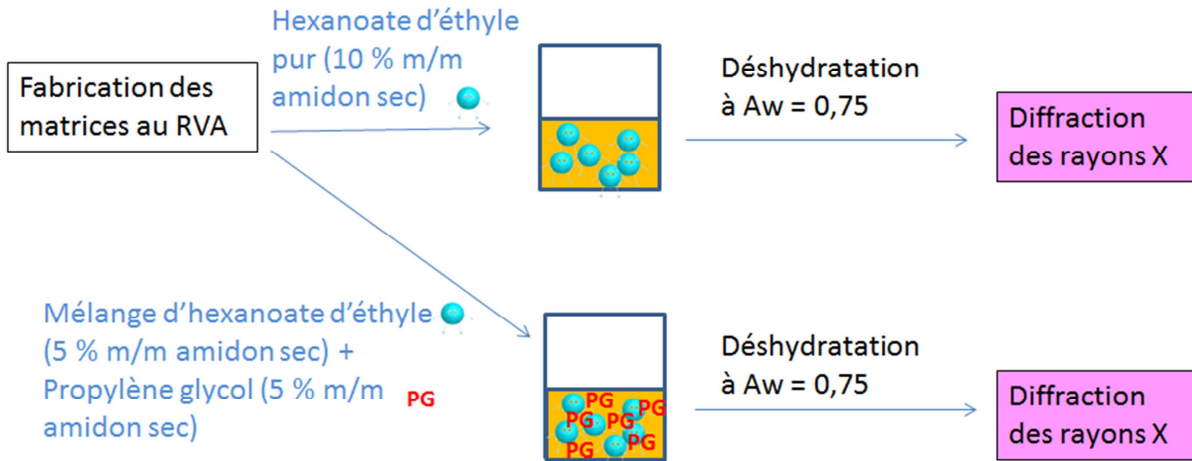


Figure 73 : Etude en diffraction des rayons X pour mettre en évidence la formation ou non de complexes hexanoate d'éthyle – amylose d'amidon de pomme de terre.

Les spectres de diffraction aux rayons X obtenus sont présentés en figure 74.

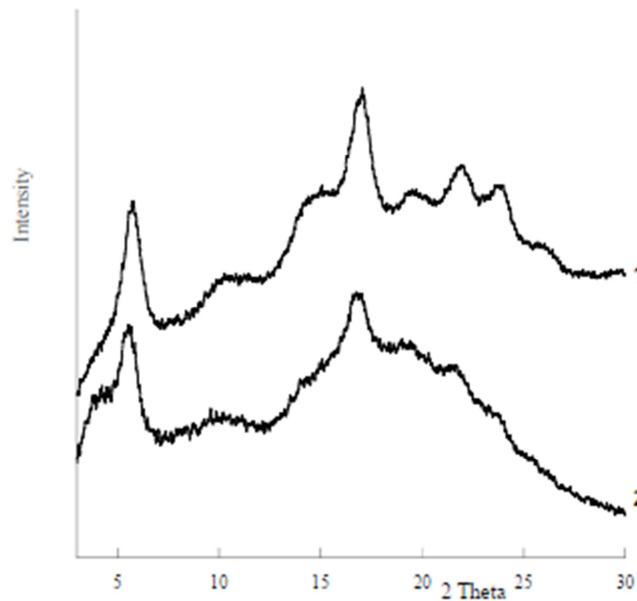


Figure 74 : Spectres de diffraction aux rayons X de la matrice amidon de pomme de terre en présence d'hexanoate d'éthyle pur ajouté en début de process (1) et de la matrice amidon de pomme de terre en présence d'un mélange hexanoate d'éthyle et propylène glycol ajouté en début de process (2).

Les deux spectres étaient caractéristiques de la structure du type B avec des pics de diffraction pour les angles $2\theta = 5,6^\circ ; 10,1^\circ ; 11,3^\circ ; 14,9^\circ ; 17^\circ ; 19,5^\circ ; 22^\circ ; 23,9^\circ$. Donc, dans nos conditions expérimentales, l'hexanoate d'éthyle ne formait pas de complexes avec l'amidon de pomme de terre.

2.1.3.3 Interaction carvacrol et polysaccharides

La rétention du carvacrol variait selon le moment d'ajout du carvacrol et selon la formulation de la matrice. La rétention du carvacrol de PS-LLA était environ 40 fois plus importante que celle PS-ELA. Nous avons vu précédemment qu'il n'y avait pas de perte lors du traitement thermomécanique. Le moment d'ajout a donc un impact sur la complexation amidon - composés d'arôme. Pour expliquer cette différence de rétention entre PS-LLA et PS-ELA, notre hypothèse est la suivante : il y aurait compétition entre le carvacrol et propylène glycol pour former des complexes avec l'amylose d'amidon de pomme de terre. En effet, le carvacrol et le propylène glycol sont deux ligands connus pour complexer l'amylose. Lorsque plusieurs ligands sont présents, des phénomènes compétitifs ou synergiques peuvent se produire lors de la complexation avec l'amylose.

Dans les matrices, SK-LLA et SK-ELA, la rétention était similaire. Par contre la rétention du carvacrol dans SK-LLA et SK-ELA était inférieure d'environ 20 % à celle de PS-LLA. La rétention du carvacrol était diminuée par l'ajout de glucomannane de konjac dans la matrice amyliée. Le carvacrol ne formait aucune interaction physicochimique avec le glucomannane de konjac. Un effet salting-out était même observé dans les matrices KGM-ELA et KGM-LLA. Les diagrammes de diffraction aux rayons X des matrices PS-ELA et SK-ELA aromatisées avec 3,5 % de carvacrol pur présentaient des spectres caractéristiques de la structure de type polymorphique V6III avec des pics de diffraction aux angles $2\theta = 6,9^\circ$; $8,8^\circ$; $9,6^\circ$; $11,1^\circ$; $12,5^\circ$; 13° ; $15,2^\circ$; 17° ; $19,2^\circ$; 20° et d'une structure de type polymorphique B avec des pics de diffraction aux angles $2\theta = 5,6^\circ$; $10,1^\circ$; $11,3^\circ$; $14,9^\circ$; 17° ; $19,5^\circ$; 22° ; $23,9^\circ$. La complexation carvacrol – amylose avait donc lieu même en présence de glucomannane de konjac. La présence de la structure de type B observée reflète la rétrogradation de l'amylopectine. Pour expliquer la différence de rétention entre PS-LLA et SK-LLA, notre hypothèse est basée sur l'impact du glucomannane de konjac lors de la gélatinisation de l'amidon de pomme de terre. En effet, la diminution de la quantité d'amylose solubilisée pourrait être à l'origine de cette diminution de rétention du carvacrol dans les matrices SK.

2.2 Impact du glucomannane de konjac et compétition entre le carvacrol et le propylène glycol pour la formation de complexes carvacrol - amylose d'amidon de pomme de terre

Pour valider ou non les nouvelles hypothèses émises, la démarche expérimentale mise en œuvre est présentée en figure 75.

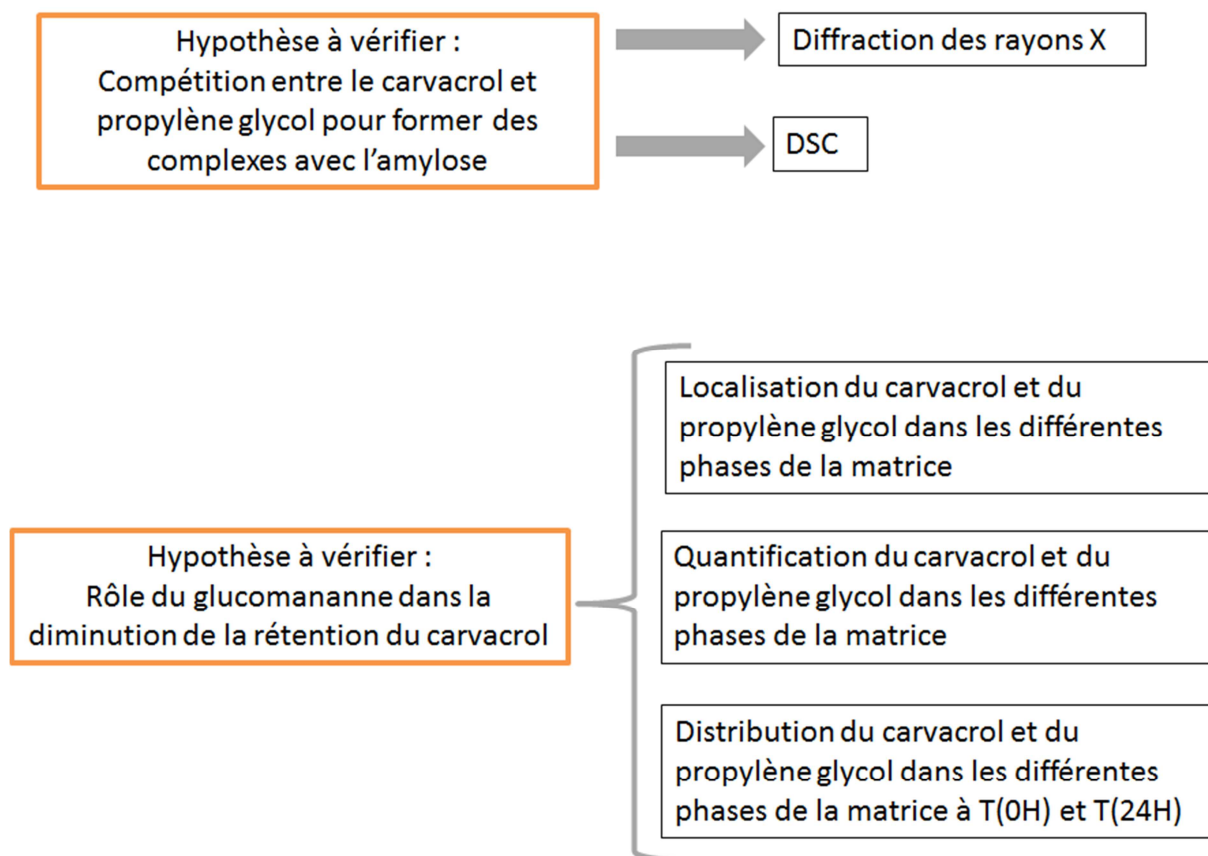


Figure 75 : Récapitulatif de la démarche expérimentale mise en œuvre pour étudier (i) la compétition éventuelle entre le propylène glycol et le carvacrol pour former des complexes avec l'amylose, (ii) le rôle du glucomannane de konjac sur la diminution de la rétention du carvacrol.

Pour l'hypothèse « compétition entre le carvacrol et le propylène glycol pour former des complexes avec l'amylose d'amidon de pomme de terre », des études en diffraction des rayons X et en DSC ont été conduites.

Concernant l'hypothèse « impact du glucomannane de konjac », la localisation et la quantification du carvacrol et propylène glycol dans les différentes phases de la matrice, phase continue et phase dispersée, ont été déterminées afin de comprendre l'impact du glucomannane de konjac et du moment d'ajout du carvacrol sur la rétention du carvacrol. Pour affiner la compréhension des mécanismes, la distribution du carvacrol et du propylène glycol dans les différentes phases de la matrice à T(OH) (= fin du traitement thermomécanique) et à T(24H) (= 24 heures après la fin du traitement thermomécanique) a également été suivie.

Les différentes méthodes mises en œuvre dans cette démarche expérimentale sont présentées en figure 76.

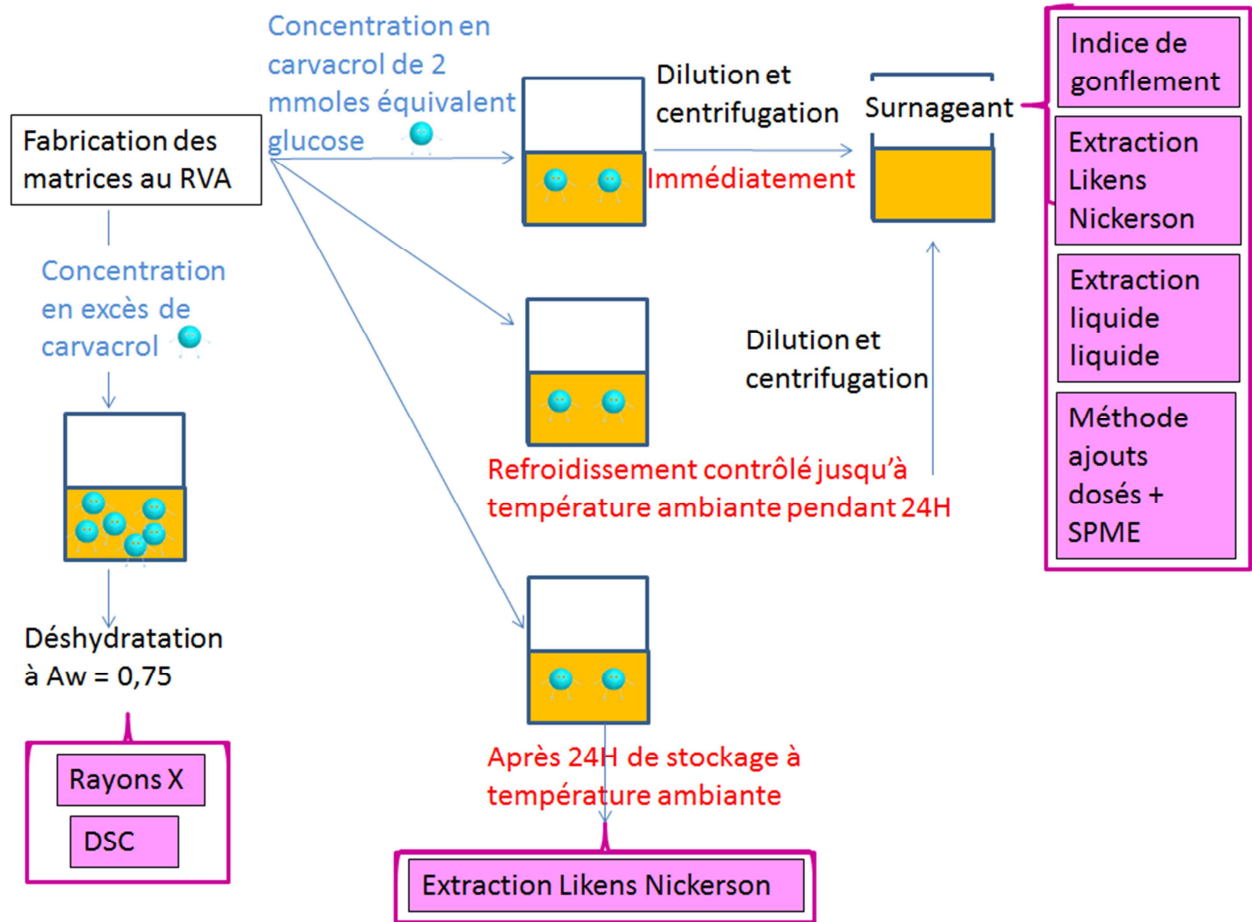
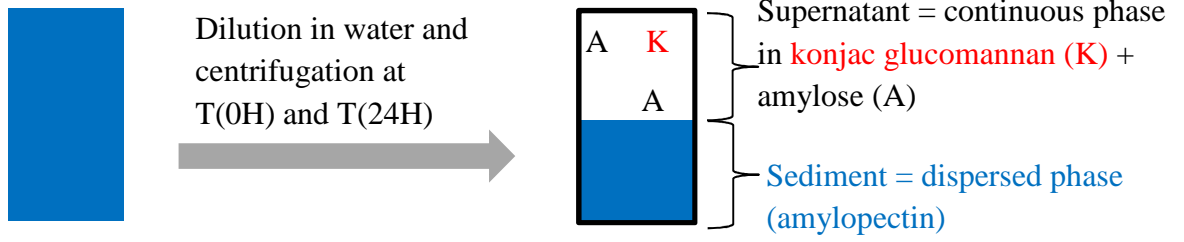




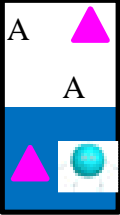
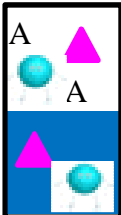
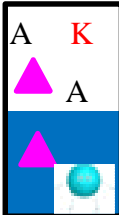
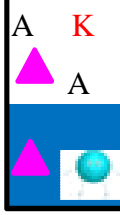
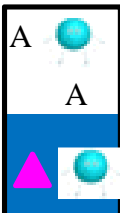
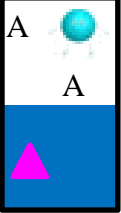


Figure 76 : Méthodes utilisées dans la démarche expérimentale mise en œuvre pour étudier (i) la compétition éventuelle entre le propylène glycol et le carvacrol pour former des complexes avec l'amylose, (ii) le rôle du glucomannane de konjac sur la diminution de la rétention du carvacrol.

Les résultats sont présentés dans la publication II.

Résumé graphique de la publication II



Sample with potato starch (PS)
 ± konjac glucomannan (K)
 + carvacrol 
 + propylen glycol 

| Distribution of propylen glycol and carvacrol | PS-ELA | PS-LLA | SK-ELA | SK-LLA |
|---|---|---|---|---|
| At T(0H) |  |  |  |  |
| At T(24H) |  |  |  |  |

Distribution and competition between carvacrol and propylene glycol for inclusion complexes in aqueous suspensions based on potato starch and konjac glucomannan

Céline Lafarge^a, Elias Bou-Maroun^a, Bruno Pontoire^b, Nathalie Cayot^{a2}, Patricia Le Bail^b

^a *Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France*

^b *UR1268, Biopolymères, Interactions, Assemblages, INRA, F-44300 Nantes, France.*

Abstract

The quantification and the distribution of carvacrol and propylene glycol between the continuous phase and the dispersed phase of aqueous suspensions based on potato starch and konjac glucomannan were investigated.

For this purpose, a series of potato starch suspensions with or without konjac glucomannan were prepared by hydrothermal treatment. Two different modes of adding ligands were used: either added before the heating of the suspensions or after the heating of the suspensions.

X-ray diffraction and differential scanning calorimetry studies confirmed the presence of carvacrol complexes in V_{6III} type. Propylene glycol did not create complex with amylose but promoted the formation of amylose-carvacrol complexes in the presence or not of konjac glucomannan. Differential scanning calorimetry study showed that low concentrations of konjac glucomannan (0.2 %) seemed to disturb the establishment of amylose-carvacrol complexes. Results showed that the time of adding carvacrol to starch dispersions, i.e. prior or after the heating of suspensions, and the presence of konjac glucomannan influenced the location of carvacrol in the different phases. These results allow understanding how the location and the amounts of ligands in the biphasic suspension influence the retention of carvacrol.

By comparing the distribution of carvacrol on a period of 24H, the complexation was shown amplified with time. This demonstrated that the implementation of amylose - carvacrol complexes was highly dependent on the experimental conditions and on time.

²Corresponding author. ph. +33 3 80 77 40 85;

E-mail address: nathalie.cayot@agrosupdijon.fr (N.Cayot).

Highlights

- Propylene glycol promoted the amylose carvacrol complexes.
- No amylose carvacrol propylene glycol complexes highlighted
- The time of ligand addition changed its distribution.
- With late ligand addition, konjac glucomannan modified its partition.
- Konjac glucomannan disturbed the establishment of carvacrol-amylose complexes.

Keywords: starch, carvacrol, propylene glycol, konjac glucomannan, inclusion complex, partition.

Chemical compound studied in this article: Carvacrol (PubChem CID: 10364); Propylene glycol (PubChem CID: 1030); Amylose (PubChem CID: 53477771); Amylopectin (PubChem CID: 439207); Water (PubChem CID: 962)..

1. INTRODUCTION

Starch is used not only as main ingredient of many staple foods but also as a thickener, gelling agent, stabilizer, and fat replacer in many processed food products. It is also used in the composition of delivery systems, for food flavour for example. To avoid negative effects such as syneresis which may occur during storage of aqueous starch suspensions, other hydrocolloids are often added to maintain overall product quality throughout the shelf-life. Synergistic interaction between starch and the added hydrocolloid may modify the texture, improve moisture retention and control water mobility (Takahiro, Yohei et al., 2005; Alam, Siddiqui et al., 2009). The products obtained in this case are described as biphasic systems formed by a continuous phase containing the water soluble macromolecules and a dispersed phase composed of swollen starch granules. Konjac glucomannan (KGM) is one of these hydrocolloids. KGM is an essentially linear polysaccharide composed of β -1,4-linked D-glucosyl and D-mannosyl residues (in a molar ratio of 1.5:1) as main chain with branching β -1,4-glucosyl units. Degree of branching is about 8 %. KGM contains acetyl group in the main chain, approximately 5-10 % (Katsuraya, Okuyama et al., 2003b; Khanna and Tester, 2006).

It was reported to interact with starches of various botanic origins: maize (Yoshimura, Takaya et al., 1998b), wheat (Takahiro, Yohei et al., 2005; Zhou, Wang et al., 2008), potato (Khanna and Tester, 2006), tapioca (Muadklay and Charoenrein, 2008), and rice (Huang, Kennedy et al., 2007; Charoenrein, Tatirat et al., 2010). All these authors found the high water holding capacity of KGM prevented syneresis occurring in starch gels and slowed down the retrogradation rate of starch during storage. Recently, Schwartz et al. (2014) demonstrated that the presence of KGM in potato starch suspension can affect the gelatinization and the retrogradation of potato starch. This phenomenon seems to appear at low concentrations of KGM. Several investigations concerning the use of KGM had shown its great potential as encapsulant of aroma compound (Yang, Xiao et al., 2009) and KGM gel would be a promising choice to develop delivery systems and controlled release of molecules of interest (Nakano, Takikawa et al., 1979; Alvarez-Manceñido, Landin et al., 2008; Wen, Wang et al., 2008; Zhang, Chen et al., 2014).

It is well known that the amylose molecule of starch can form interactions (especially helical inclusion complexes) with a variety of small molecules such as aroma compounds (Conde-Petit, Escher et al., 2006; Jouquand, Ducruet et al., 2006). Two families of structures have been identified for these ligand - amylose complexes: V_6 and V_8 where 6 and 8 represent the number of D-glucosyl units per turn (Helbert and Chanzy, 1994). In the V_6 family, three types of crystalline packing V_{6I} , V_{6II} and V_{6III} (where I, II and III define unit cells of different size) may be obtained depending on the nature of the complexing molecule. The complexing molecule can be trapped either in the single helix only (V_{6I}) or both within and between amylose helices (V_{6II} and V_{6III}).

Carvacrol and propylene glycol were chosen in the present study as they were known ligands for starch. Carvacrol was chosen as volatile odorant compound. It is a phenolic compound and a natural antioxidant of great interest for the food industry because of its inhibitory effect on the growth of various microorganisms and its capacity to protect organisms and cells from damage induced by oxidative stress (Burt, 2004; Ben Arfa, Combes et al., 2006). The complexing properties of carvacrol with amylose are V_{6III} type (Le Bail, Chauvet et al., 2013). Propylene glycol was chosen as carrier solvent of carvacrol. In fact, propylene glycol (1,2-propanediol, PG) is one of the most widely used solvent for flavor carriage because it has a broad range of applications and is relatively inexpensive. PG is also known to be a complexing ligand of amylose in V_{6I} type (Pozo-Bayon, Biais et al., 2008).

In a previous study, Lafarge et al. (2014) reported that the retention of carvacrol solubilized in PG by potato starch suspensions was governed mainly by the inclusion complexes with starch. This retention was more important when mixture carvacrol-PG was added at the end of heating, i.e. when amylose was leached out of the starch granules and available to interact. They also reported that the addition of KGM to the potato starch suspensions decreased the retention of carvacrol.

The inclusion of aroma compounds is similar to the one of fatty acids (Le Bail, Houinsou-Houssou et al., 2015). The mode of addition of fatty acid (i.e. prior to heating or after heating)

would also influence the structural properties of starch fatty acid system. X-ray diffraction studies revealed that the degree of crystallinity exhibited by the starch samples was dependent on mode of fatty acid addition (Exarhopoulos and Raphaelides, 2012; Chang, He et al., 2013; Vasiliadou, Raphaelides et al., 2015). It is conceivable that crystalline and less crystalline complexes differ in the retention of the volatile compound.

The objectives of the present study were to determine (i) the competitive effect between carvacrol and PG, the effect of KGM (ii) and the effect of the moment of addition of ligands (iii) on the formation of carvacrol amylose complexes in the suspensions.

For that purpose, the distribution of carvacrol and PG in the different phases of polysaccharide suspensions was studied.

Due to huge differences of concentration of carvacrol and PG in the different phases, some of the methods were adapted to each case.

The different analyses done on samples are schematically represented in Figure 1.

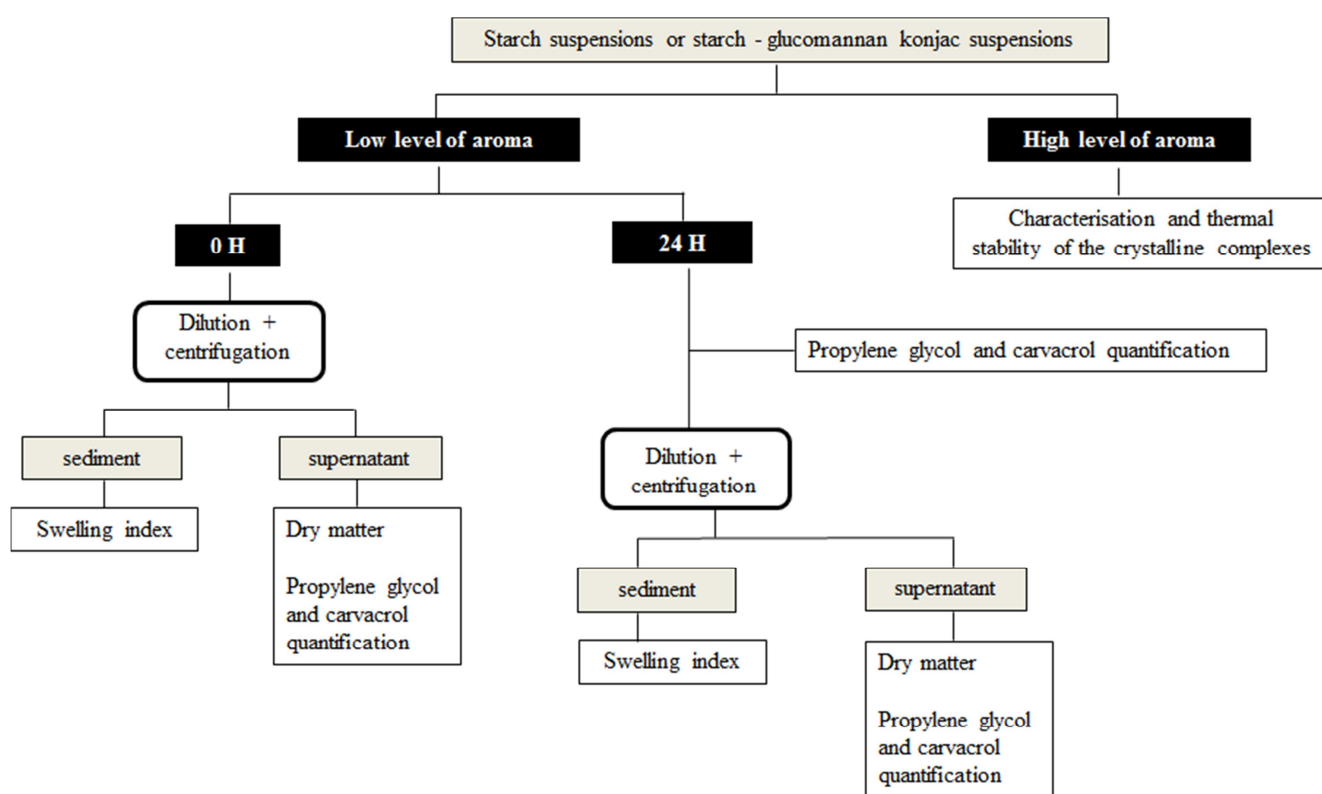


Figure 1: Experimental design

2.MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Potato starch does not contain any internal lipid interfering with the formation of the inclusion

complex to be studied. It was obtained from Sigma Aldrich. Purified KGM was kindly given by Georges Szrednick (University of New South Wales of Sydney, Australia). All suspensions were made using deionized MilliQ water.

Carvacrol (SAFC, CAS n 499-75-2, and purity 98 %) and propylene glycol (PG, Aldrich, CAS n 57-55-6, purity 99.5 %, and food grade) have the following physicochemical characteristics at 25°C (estimation program EPI suiteTM):

- Carvacrol (C₁₀H₁₄O), Log P_{octanol-water} = 3.49, vapour pressure = 3.09 Pa, solubility in water = 1.25 g/L.
- PG (C₃H₈O₂), Log P_{octanol-water} = -0.92, vapour pressure = 38.80 Pa, solubility in water = 811 g/L.

Dichloromethane (Carlo Erba, CAS 75-09-2, purity 99.8 %, stabilized with amylene), sodium chloride (VWR, CAS 7647-14-5), and anhydrous sodium sulfate (VWR, CAS 7757-82-6) were used for Liken-Nickerson extraction. A mixture of ethyl acetate (Sigma, CAS 141-78-6, purity 99 %,) and absolute ethanol (Sigma, CAS 064-17-5) (3:1, v/v) were used for liquid-liquid extraction.

Linalool (Fluka, CAS 78-70-6, purity 99 %, prepared at 4 g/L in absolute ethanol) was used as extraction standard for quantification of carvacrol and PG. Ethyl octanoate (Aldrich, CAS 106-32-1, purity 98 %) was used as chromatographic standard for quantification of carvacrol (prepared at 2 g/L in dichloromethane) and of PG (prepared at 4 g/L in the mixture ethyl acetate/ethanol (3:1, v/v)).

2.2. Preparation of samples

2.2.1. Preparation of starch and konjac-glucomannan aqueous suspensions

Aqueous suspensions containing potato starch (PS samples: 25 g of water plus 1.25 g of potato starch per batch), or both starch and KGM (SK samples: 25 g of water plus 1.25 g of starch and 0.05 g of KGM per batch) were prepared using a Rapid Visco AnalyzerTM (model RVA super 4, Newport Scientific, Australia) equipped with the ThermoclineTM software. The mixture was put in the aluminium flask and manually stirred to avoid sedimentation. Then, the mixture was held at 50°C for 1 minute, heated to 95°C at a constant rate of 12°C/min, held at 95°C for 3.5 minutes and finally cooled to 60°C at the same rate and held at this temperature for 3 minutes. A constant stirring of 160 rpm was applied, except at the beginning of the pasting profile when the mixture was stirred at 960 rpm for the first 10 s at 50°C and during cooling step for 10 s at 60°C to ensure a good homogeneity. Viscosity profiles were recorded to check reproducibility of the preparation. Three parameters were taken from the RVA curves: pasting temperature (°C) (corresponding to the beginning of the increase in viscosity), peak viscosity (Pa•s) and final viscosity at 60°C (Pa•s).

A stock solution of ligands was prepared by dissolving 1.807 g of carvacrol in 100 mL of PG at 25°C under stirring. The concentration of ligand was chosen in order to obtain a final concentration of 2 mmol of carvacrol per glucose equivalent of starch considered as sufficient to induce complex formation (Arvisenet, Le Bail et al., 2002). The stock solution was stored at 4°C before use. One hundred μ L of stock solution was added to the suspensions, either before heating (early ligand addition: ELA), or after cooling (30 sec after the start of the plateau at 60 °C, late ligand addition: LLA). In the polysaccharide suspensions, resulting concentrations are 0.07 g/L for carvacrol and 4.14 g/L for PG. Four samples were made in triplicate: PS-ELA, PS-LLA, SK-ELA, SK-LLA.

2.2.2. Preparation of crystalline complexes

Preliminary experiments were done for the preparation of samples in order to favour the formation ligands amylose complexes. The preparation procedure, described in section 2.2.1., was adapted as followed. Distilled water was stirred for 10 minutes with a bubbling of nitrogen to prevent oxidation. In case of SK suspensions, KGM was added to PS suspension, very slowly but under strong stirring. Then the mixture was put in the RVA apparatus at 50°C for 1 minute. Suspensions were heated to 90°C at a constant rate of 10°C/min, kept at this temperature for 15 minutes and finally cooled to 60°C at the same rate. Ligands were added in excess either before the heating (samples ELA) or after cooling (30 sec after the end of the plateau at 60°C, samples LLA). Samples labelled Ca contained 3 % (starch, w/w) of carvacrol and no PG. Samples labelled Ca-PG contained 1.5 % carvacrol and 1.5 % PG. Samples labelled PG contained 3 % PG and no carvacrol. After cooling, water content of samples was adjusted at $A_w = 0.75$ by desorption over saturated NaCl solution.

2.3. Analysis of amylose crystalline complexes

2.3.1. X-ray diffraction analysis

Thirty milligrams of sample equilibrated at $A_w = 0.75$ were sealed in a copper ring between two adhesive tape sheets to prevent any change in water content. The sample was examined by Wide Angle X-ray Scattering (WAXS) at room temperature. Measurements were done using a D8 Discover spectrometer from Bruker-AXS (Karlsruhe, Germany) with GADDS 2D detector and cross-coupled mirrors, working at 40 kV and 40 mA, with a copper anode ($\lambda=1.54059 \cdot 10^{-10}$ m) and sample alignment by microscopic video and laser. DRX data were monitored for 10 minutes and normalized between 3 and 30° (2θ).

2.3.2. Thermal analysis

DSC thermograms were recorded by a micro-differential scanning calorimeter SETARAM™ MicroDSC7 (SETARAM 161 instrumentation, Caluire, France). Stainless steel

pans were used and a pan containing 500 μL deionized water was taken as the reference. Thirty milligrams of sample were weighted into DSC pan and 500 μL of deionized water were added. The pans were then sealed and placed in a thermally isolated detector. The sample and the reference were subjected to heating and cooling controlled by the computer. The chosen kinetics of the reaction were $1^\circ\text{C}/\text{min}$ from 10°C to 120°C followed by a cooling of $1^\circ\text{C}/\text{min}$ to 10°C . A second rise in temperature was performed at $1^\circ\text{C}/\text{min}$ to 120°C in order to determine whether the observed thermal transitions were reversible.

2.4. Analysis of starch and konjac-glucomannan aqueous suspensions

2.4.1. Separation of the continuous and the dispersed phase

To determine the distribution of carvacrol and PG in the different phases of the polysaccharide system, suspensions were submitted to phase separation. For that purpose, 3 g of each suspension was diluted in 17 g of deionized water to obtain 0.9 % (w/w) suspension (starch basis). The aim of the dilution step was to have a final concentration which allows optimizing the sedimentation of the granular phase. After manual stirring, the diluted sample was centrifuged at 4997 g for 15 min at 25°C .

In order to study the establishment of inclusion complexes formation, phase separation was done either immediately after the preparation of the suspensions described in section 2.2.1 (samples labelled T(OH)) or 24 hours later (samples labelled T(24H)). In this case, the samples were cooled in a water bath in order to control the cooling kinetics and favour the formation of inclusion complexes. After centrifugation, the supernatant was carefully separated from the residue.

2.4.2. Swelling index and dry matter

All the residues from samples T(OH) were weighted (W_{re}) and dried in an oven at 105°C for 24 hours (D_{re}). The swelling index of the starch granules as defined as Mestres, Nago, Akissoe & Matencio (1997) was calculated: Swelling index (g/g) = $(W_{re} - D_{re}) / D_{re}$. Measurements for each sample were done five times.

Dry matter was determined in all the supernatants from samples T(OH) and T(24H) using drying at 105°C for 24 hours. Measurements were done in triplicate. The nature of the starchy matter (amylose / amylopectin) in the supernatants was determined according to the iodine binding method of Jarvis & Walker (1993).

2.4.3. Extraction and quantification of ligands

Likens-Nickerson extraction method was performed on whole suspensions as well on the supernatants obtained as described above. For the extraction in whole suspensions, about 8 g of sample were dispersed in 100 ml of milliQ water. For the extraction in supernatants, 20 mL of sample were added to 80 mL of milliQ water. The diluted samples were saturated with NaCl (330 g/L). Linalool (250 µL) was added as the extraction standard. The dichloromethane extract was used for the quantification of carvacrol by GCMS. The aqueous extraction residue was used to quantify PG.

2.4.3.1 Carvacrol quantification

The diluted samples were extracted by 25 mL of dichloromethane for 30 minutes after the solution started to boil. Extractions were done in triplicate on two different batches. Dichloromethane extracts were dehydrated using sodium sulfate and 500 µL of ethyl octanoate were added to the extracts as the chromatography standard. These extracts were used to quantify carvacrol by GCMS. The extraction yields obtained by GCMS were corrected with the proportion of recovered extraction standard.

2.4.3.2 Propylene glycol quantification

Due to differences in concentrations, the quantification of PG was done by two different methods. For T(OH) samples, standard addition method coupled with headspace solid phase extraction (HS-SPME) was used. For samples T(24H), the amount of PG was below the limit of detection of the method previously described. The determination of PG, in this case, was done using liquid-liquid extraction.

- Standard addition method coupled with *HS-SPME*

Known amounts (0.015 and 0.025 g) of PG were added to 40 g of the aqueous Likens-Nickerson extraction residues. Then, 4 g of sample were transferred into a 22 mL vial which was immediately sealed with a silicone septum and screw cap. The equilibration time was 16 hours at 60°C. After equilibration, the volatile compounds were extracted from the headspace using an SPME fiber (75µm Carboxen / PDMS, ref. 57318, Supelco) for 15 minutes at 60 °C. Finally, the fibers were inserted into the GCMS injection port and desorbed for 15 minutes. For each PG added amount, two different extracts from two different batches were obtained. Analyses were done once on extracts from aqueous Likens-Nickerson extraction residues of the suspensions and were duplicated on counterpart obtained from supernatants.

Simple linear regressions were calculated for the different samples from the following equation: $y = a_i x + b_i$

Where x is the amount of added PG, y is the peak area of PG and i is an index for the type of sample. Using the regression models, the concentration of PG in the samples (x -intercept) was calculated. Two regression models were obtained for each sample. Reported data were obtained with R^2 above 0.97 for the linear relationship.

- Liquid-liquid extraction

The solvent used for the extraction was chosen from the study of Cayot, Lafarge, Bou-Maroun & Cayot (2016). 140 g of the aqueous Likens-Nickerson extraction residues of supernatant T(24H), 140 g of the extraction solvent (ethyl acetate/ethanol (3:1, v/v)) and 250 μ L of linalool (as extraction standard) were stirred strongly during five minutes. Immediately after, the organic phase was removed and dehydrated using sodium sulfate. Preliminary experiments showed that one washing led to optimal extraction of PG. The extract was then filtered using glass wool and concentrated using rotavapor[®] (Buchi) apparatus (40°C, 120 mbar) up to 10 mL of extract. 500 μ L of ethyl octanoate was added as chromatography standard. These concentrated extracts were used to quantify PG by GCMS. The extraction yields obtained by GCMS were corrected with the proportion of recovered extraction standard. Extractions were done in triplicate. Each replication corresponded to a different batch prepared using RVA.

2.4.4. Gas chromatography – Mass spectrometry analysis

One μ L of dichloromethane or ethyl acetate/ethanol extracts or SPME fibers were analysed with a 5973 gas chromatograph (Hewlett–Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with a fused-silica capillary column (30 m \times 0.32 mm ID, 0.5 μ m film thickness) coated with a DB-Wax stationary phase (J and W Scientific, USA, 125-7033) and coupled to a HP 5973 mass spectrometer detector. The instrument was equipped with a split/splitless injection port operating at 240°C in the split mode with a split ratio of 5. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.5 mL/min (44 cm/sec). Mass spectrometry was taken in the electron ionization mode at 70 eV. The ion source was set at 230°C and the transfer line at 240°C.

Spectrometry Selected Ion Monitoring method (SIM method) was used. Data were collected for m/z values corresponding to the protonated molecular ion (ions for quantification / ions for identification) as followed: m/z 135/150 (carvacrol), m/z 93/121 (linalool), m/z 88/127 (ethyl octanoate), m/z 45/61 (PG). For the carvacrol quantification, the oven temperature was increased from 40°C to 120°C at 5°C/min, then from 120°C to 240°C at 20°C/min, and finally held at 240°C for 10 min. For the quantification of PG following liquid-liquid extraction, the temperature of the oven was increased from 55°C to 120°C at 5°C/min, then from 120°C to 240°C at 20°C/min and finally held at 240°C for 10 min.

For the quantification of PG by HS-SPME, the temperature of the oven was increased from 45°C to 120°C at 5°C/min, then from 120°C to 240°C at 15°C/min.

2.5. Statistical analysis

The Statistica V8 software was used for ANOVA. Significance was established at $p < 0.05$. Fisher t-test was used to determine significant differences between values.

3. RESULTS AND DISCUSSION

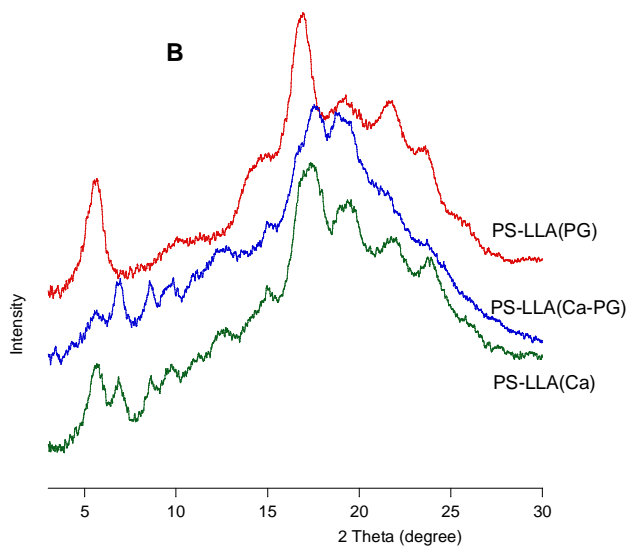
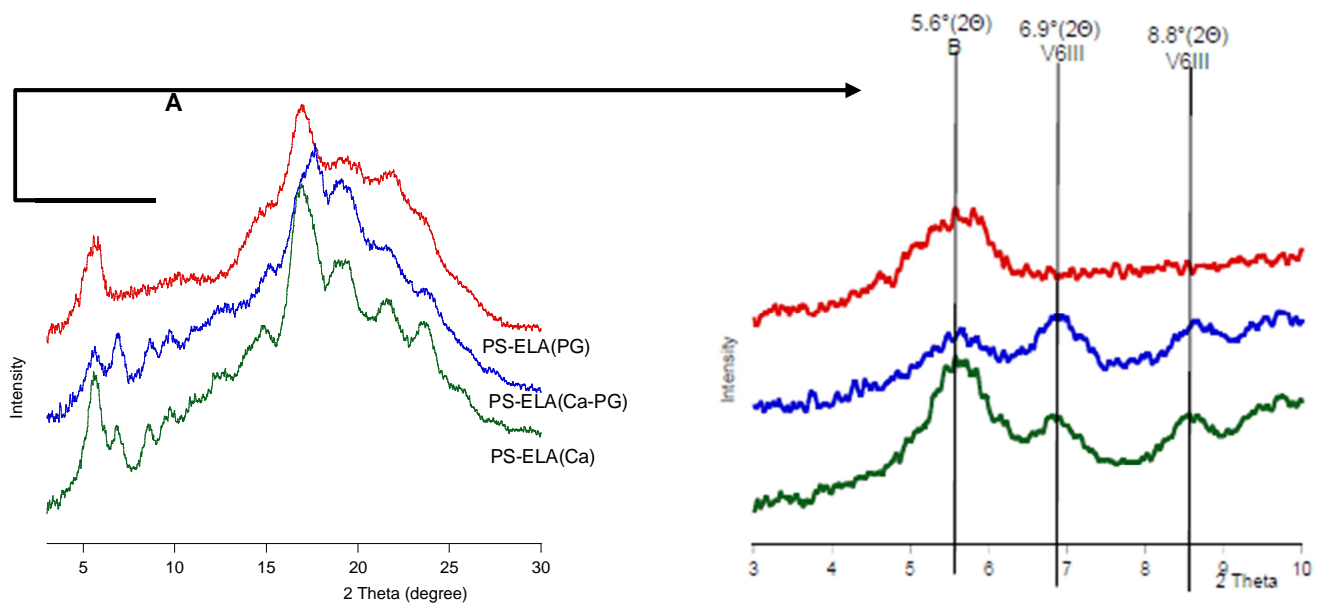
PS and SK suspensions were characterized during preparation. Pasting viscosity curves had the same shape (data not shown): viscosity increased as temperature increased above the pasting temperature, and viscosity decreased as the starch granules began to leach their components. Pasting temperatures were similar whatever the nature of the sample. As foreseen (Lafarge, Cayot et al., 2014), due to the high water holding capacity of KGM, peak viscosities and final viscosities were significantly higher for SK suspensions than for PS suspensions. From the data obtained for the different batches, preparation of suspensions was considered repeatable.

3.1 Characterization and thermal stability of the crystalline complexes

The starch - ligand complexes were prepared as described in Section 2.2.2., and were studied using two techniques: X-ray diffraction and differential scanning calorimetry. These techniques show an excellent complementarity in the determination of important structural features such as crystalline type, helical conformation and stability of the amylose ligand complexes formed.

Figure 2 displays the X-ray diffraction spectra of PS and SK suspensions with different concentrations of carvacrol and PG, added at different times. The obtained spectra have the same general shape, whatever the polysaccharide composition (with or without KGM) and whatever the time of ligand addition.

For samples PS-(PG) and SK-(PG) containing only PG, X-ray spectra displayed the typical B-type crystallinity pattern ($2\theta = 5.6^\circ, 10.1^\circ, 11.3^\circ, 14^\circ, 14.9^\circ, 17^\circ, 19.5^\circ, 22^\circ, 23.9^\circ,$ and 26°) corresponding to retrograded starch. No peak characteristic of the V6I-type structure was observed despite the fact that PG was reported to form such complexes. Nevertheless, Biais, Le Bail, Robert, Pontoire & Buleon (2006) indicated, that due to the hydrophilic characteristics of PG (low log P and high solubility in water), complexes with PG could be observed only at huge concentrations. So it seems that the concentration used in the preparation of samples (3 %) was not sufficient. The high proportion of complexing molecules necessary in the case of hydrophilic molecules can be explained by the fact that these molecules interact more favourably with water (solvent) rather than with amylose. A higher concentration increases the amylose ligand interactions at the expense of ligand water interactions and lead to the formation of complexes.



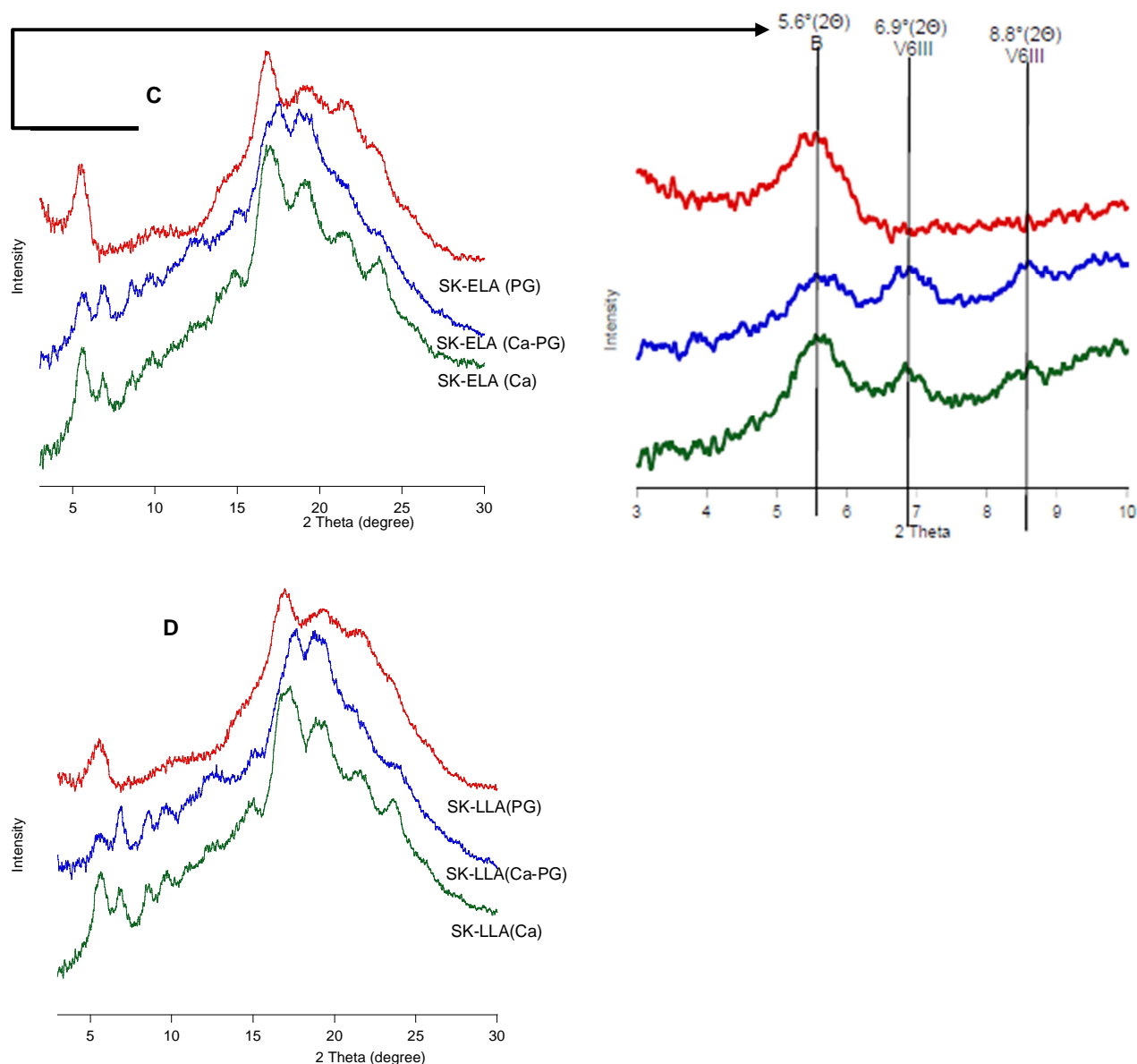


Figure 2: X-ray diffractograms of starch suspensions (PS) and starch konjac glucomannan suspensions (SK) with different amounts of ligands. A) and C) Ligands added before the heating (ELA); B) and D) Ligands added at the end of heating (LLA).

Conversely, hydrophobic molecules prefer interactions with amylose rather than with water even at low concentrations. This is the case of carvacrol. Indeed the samples containing carvacrol (PS-(Ca-PG), PS-(Ca), SK-(Ca-PG), and SK-(Ca)) showed X-ray scattering spectra exhibiting typical peaks of the V6III packing ($2\theta = 6.9^\circ, 8.8^\circ, 9.6^\circ, 10^\circ, 11.1^\circ, 12.5^\circ, 13^\circ, 15.2^\circ, 17^\circ, 17.7^\circ, 18.1^\circ, 19.2^\circ, 19.3^\circ, 24.5^\circ, \text{ and } 25.2^\circ$) (Buléon, Delage et al., 1990) highlighting the amylose carvacrol complexes and characteristic peaks of the B structure linked only to the retrogradation of amylopectin.

However, it is interesting to notice the difference between the spectra of samples containing the mixture PG-carvacrol and those containing only carvacrol. Indeed, the intensity of the peak at 6.9 in 2θ (specific of V6III packing) is more intense than the peak at 5.6 in 2θ (specific of B structure) on all spectra of the samples containing PG. In contrast with this

result and for samples containing only carvacrol, the peaks characteristics of the B type structure are much better defined. The presence of PG seems to promote the amylose carvacrol complexes. Carvacrol is hydrophobic and less soluble in water so it is easily solubilized in PG. This improves the dispersion of carvacrol in the aqueous phase and thereby increases the contact surface with amylose, and promotes an increase in the quantity of amylose complexed by the carvacrol.

Thermograms obtained have the same general shape (Figure 3), whatever the time of ligand addition (LLA Figure 3 or ELA data not shown) but depend of the polysaccharide composition (with or without KGM) and the nature of the ligand. A second scan was used to prove reorganization during the cooling carried out between the two heating scans and, especially, the well-known melting/recrystallization reversibility of amylose ligand complexes (Biliaderis and Galloway, 1989).

All the thermograms obtained from PS or SK suspensions exhibited a large endotherm around $58 \pm 2^\circ\text{C}$, which corresponded to the melting of amylopectin retrograded during storage (Kugimiya, Donovan et al., 1980). During cooling, the kinetic was too fast to allow reorganization of amylopectin. Amylose melting is known to occur at about 140°C and cannot be observed in the present experiments. These results are in agreement with the B structure observed on the X-ray diffraction spectra.

Unlike the PS-(PG) and SK-(PG) samples which presented no other endotherm, the thermograms obtained in presence of carvacrol (PS-(Ca-PG), PS-(Ca), SK-(Ca-PG) and SK-(Ca)) exhibited a second melting endotherm at $97 \pm 1^\circ\text{C}$ for the PS-LLA suspensions and at $99 \pm 2^\circ\text{C}$ for the SK-LLA suspensions (Figures 3A-3B). Moreover, only for SK-LLA suspensions, the melting temperature recorded after cooling and reheating (second scan) is slightly lower than that observed during the first scan: $96 \pm 1^\circ\text{C}$. These results confirm the presence of the amylose carvacrol complexes in these samples. During the first scan (first heating), the endotherms corresponding to the complex fusion are much broader for suspensions containing KGM ($T_0 = 91 \pm 1^\circ\text{C}$; $T_p = 99 \pm 2^\circ\text{C}$; $T_c = 110 \pm 2^\circ\text{C}$) than for suspensions without one ($T_0 = 91 \pm 1^\circ\text{C}$; $T_p = 97 \pm 1^\circ\text{C}$; $T_c = 101 \pm 1^\circ\text{C}$). The T_0 (onset temperature) has almost the same value, T_p (peak value) and T_c (conclusion temperature) shifted to higher temperatures. X ray diffraction results of Schwartz et al. (2014) highlighted the amylose complexation with carvacrol in spite of the presence of KGM, even if it seemed to interfere with the complexation at “high” concentrations. Present X-ray diffraction results are in agreement with this conclusion, but results of DSC show that even at low concentrations, KGM seems to disturb the complexation of amylose with carvacrol.

Publication II

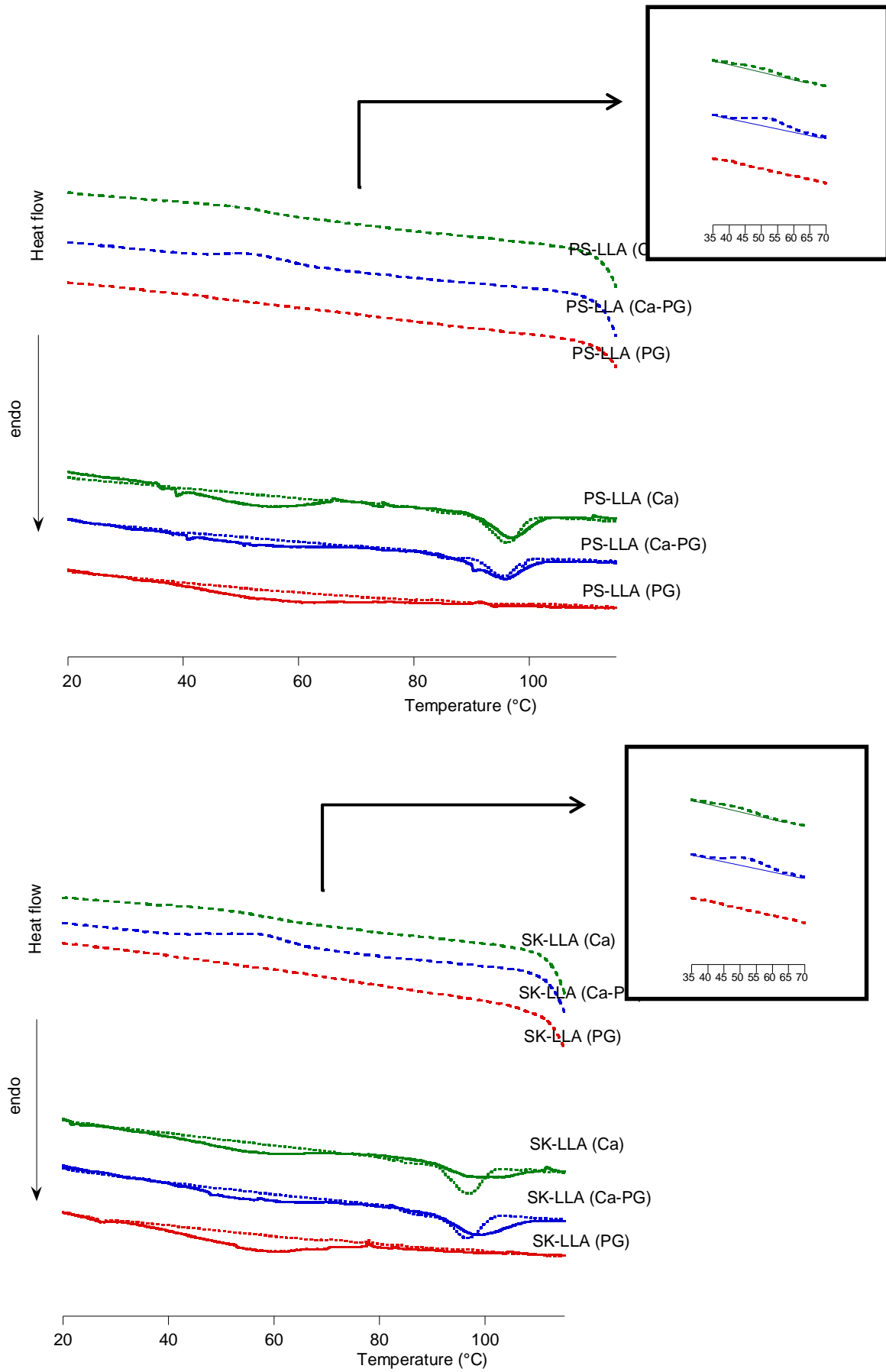


Figure 3: Thermograms of starch suspensions (PS) and starch konjac glucomannan suspensions (SK) with different amounts of ligands. A) PS samples, B) SK samples. The dotted line corresponds to the thermogram recorded during the second heating scan after cooling at 1°C/min.

It is also interesting to note that during cooling, in presence of carvacrol, thermograms yield a similar broad exotherm with a crystallization temperature dependent of the presence or not of the PG but with no influence of the presence of KGM. This observation suggests that the presence of PG in the system promotes the dispersion of carvacrol whatever the amount of KGM, which is consistent with the X-ray diffraction results.

Both methods made possible to evidence the interactions between the chosen ligands and amylose in a qualitative manner. To improve the understanding of amylose carvacrol complexation, the location, the quantification and the distribution of carvacrol and PG in the biphasic polysaccharide suspensions have been studied.

3.2. Distribution of carvacrol and propylene glycol in the biphasic polysaccharide suspensions

Prior to phase separation, the amount of carvacrol and PG for the different polysaccharide suspensions were determined and reported in table 1.

Table 1: Starch swelling index, dry matter and amount of carvacrol and propylene glycol within potato starch suspensions (PS) and potato starch – konjac glucomannan suspensions (SK). Ligands were added either before the heating (ELA) or after the heating (LLA).

| Experimental values (means \pm s.d.) | PS-ELA | SK-ELA | PS-LLA | SK-LLA |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Starch swelling index (g/g) | 100 \pm 9 | 96 \pm 7 | 101 \pm 8 | 103 \pm 8 |
| Dry matter in the supernatant at T(OH) (% w/w) | 0.53 \pm 0.06 | 0.52 \pm 0.04 | 0.53 \pm 0.04 | 0.56 \pm 0.01 |
| Dry matter in the supernatant at T(24H) (% w/w) | 0.50 \pm 0.06 | 0.48 \pm 0.08 | 0.50 \pm 0.02 | 0.51 \pm 0.06 |
| Carvacrol (% initial quantity) | 100 \pm 12 | 95 \pm 5 | 86 \pm 4 | 104 \pm 8 |
| Propylene glycol (% initial quantity) | 81 \pm 6 | 88 \pm 6 | 77 \pm 6 | 90 \pm 6 |

Recovered quantities of carvacrol ranked from 86 to more than 104 % of the quantity initially added in the suspensions and there were no significant differences among samples ($p = 0.066$). In spite of the lack of air tightness of RVA apparatus, the loss of volatile compound during heating was low. The quantities recovered for PG were very similar among the different suspensions and were around 84 % \pm 6 % of the quantity initially added in the suspensions.

Starch swelling indexes were not significantly different ($\alpha = 5\%$, p (effect presence of KGM): 0.701, p (effect time of added ligand): 0.217) for the different suspensions and were about 100 (table 1). It means that starch granules were totally swelled during preparation, with amylose leached out of starch granules. Part of the amylopectin can also be dispersed in the continuous phase (Doublier, Llamas et al., 1987).

After phase separation (T0H and T24H), dry matter of supernatants was determined. No significant differences were observed among the different suspensions ($\alpha = 5\%$, p (nature suspensions and time of analysis interaction: 0.942)). The addition of carvacrol, the time of addition of carvacrol, the time of phase separation and the presence of KGM did not influence starch swelling in a significant manner.

Amylose is known to react with iodine to form blue coloured inclusion complexes. The addition of iodine stained blue all the supernatants obtained in this study showing the presence of amylose. From the absorbance spectra (data not shown), the maximum optical density (OD) was obtained at a wavelength of 624 nm, which is characteristic of amylose (Jarvis and Walker, 1993). The supernatant was thus mainly composed of amylose. The intensity of blue colour was the same for all the samples containing carvacrol and PG ($OD = 0.45 \pm 0.04$) and was significantly lower than the control samples containing neither PG nor carvacrol ($OD = 0.67 \pm 0.06$). It means that there is less free amylose to form complex with iodine and thus highlights the presence of complex with carvacrol whatever the experimental condition in this study. These qualitative results obtained with low aroma concentrations confirm the DRX and DSC results obtained with high aroma concentrations. It can be concluded that the dry matter of the supernatant is mainly amylose.

KGM was not specifically quantified in the different phases of polysaccharide suspensions due to the small amount of KGM added (0.2 % w/w). Due to its high affinity for water and its large hydrodynamic volume, KGM cannot probably penetrate into the starch granules and may be located mainly in the continuous phase (Alloncle, Lefebvre et al., 1989).

So, all the supernatants obtained were similar. They were composed of KGM and amylose. The amylose amount was equal in all the supernatants.

The amounts of carvacrol and PG were determined in the supernatant (rich in amylose and KGM) and the residue (rich in amylopectin) immediately after the end of heating (T(0H) and 24 hours later (T(24H))).

For carvacrol (Figure 4), we observed significant differences among the samples ($p = 0.048$). At T(0H), the amount of carvacrol in the supernatant for PS-ELA, SK-ELA and SK-LLA were not significantly different with a mean value of 15 % of the initial quantity. It means that 85 % of the carvacrol is in the residue. The supernatant PS-ELA contained a far higher amount of carvacrol (more than 40 %). At T(24H), there were again significant differences among the samples ($p=0.000$). The supernatant PS-LLA contained more carvacrol

than the counterparts (about 70 %). The other samples were not significantly different with a mean value of about 50 %. These results showed that the time of adding carvacrol to starch dispersions, i.e. prior or after the heating of suspensions, and the presence of KGM influenced the distribution of carvacrol. In the suspensions without KGM, the late addition of carvacrol led to higher amount of this ligand in the supernatant, i.e. in the continuous phase. As all the supernatants had the same composition (mainly amylose), this difference might be due to greater complexation in this case where carvacrol was added after the heating and where there was no KGM to hinder the mobility of the molecules. By comparing results for T(0H) and for T(24H), the amount of carvacrol in the supernatants increased for all the samples: a ratio of 1.7 for PS-ELA to 3.5 for all the others. This difference could be explained by the fact that after 24 hours, complexes had more time to settle, resulting in more carvacrol present in the supernatant where the amylose was. For PS-LLA, all the conditions were met to allow complexation, so a higher amount of carvacrol was already complexed at T(0H), but continued at T(24H). When all the conditions were not met to allow complexation (carvacrol added before the complete swelling of amylose and/or molecular mobility reduced by KGM), it takes longer to settle.

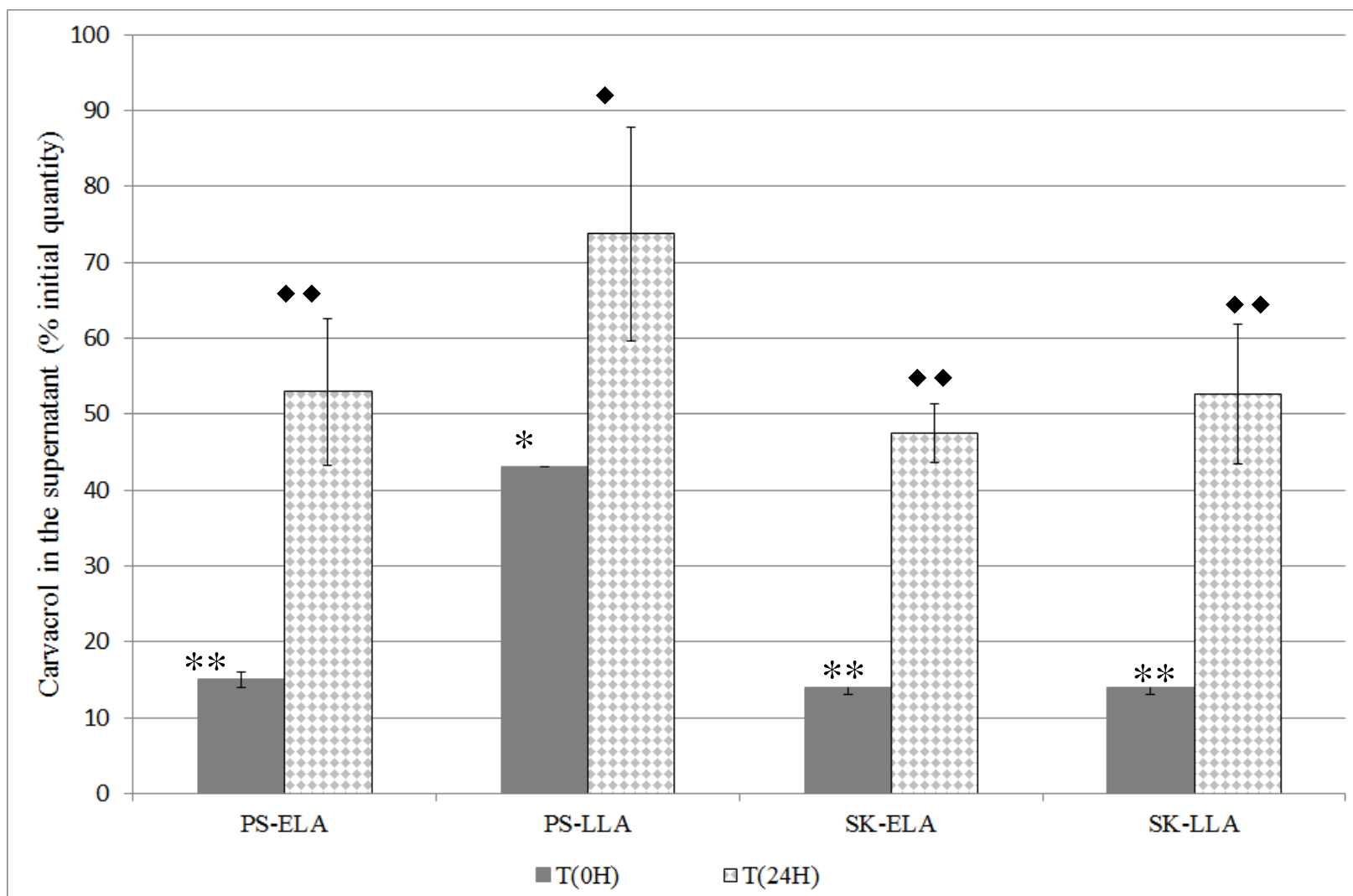


Figure 4: Amount of carvacrol of supernatants for the different systems as a function of time of separation of the continuous and the dispersed phase. T(0H) is the phase separation performed immediately at the end of the process. T(24H) is the phase separation performed 24 hours at the end of the process. The standard deviations are represented on the bars. Significant differences are indicated by different symbols ($p < 0.05$ using Fisher t-test).

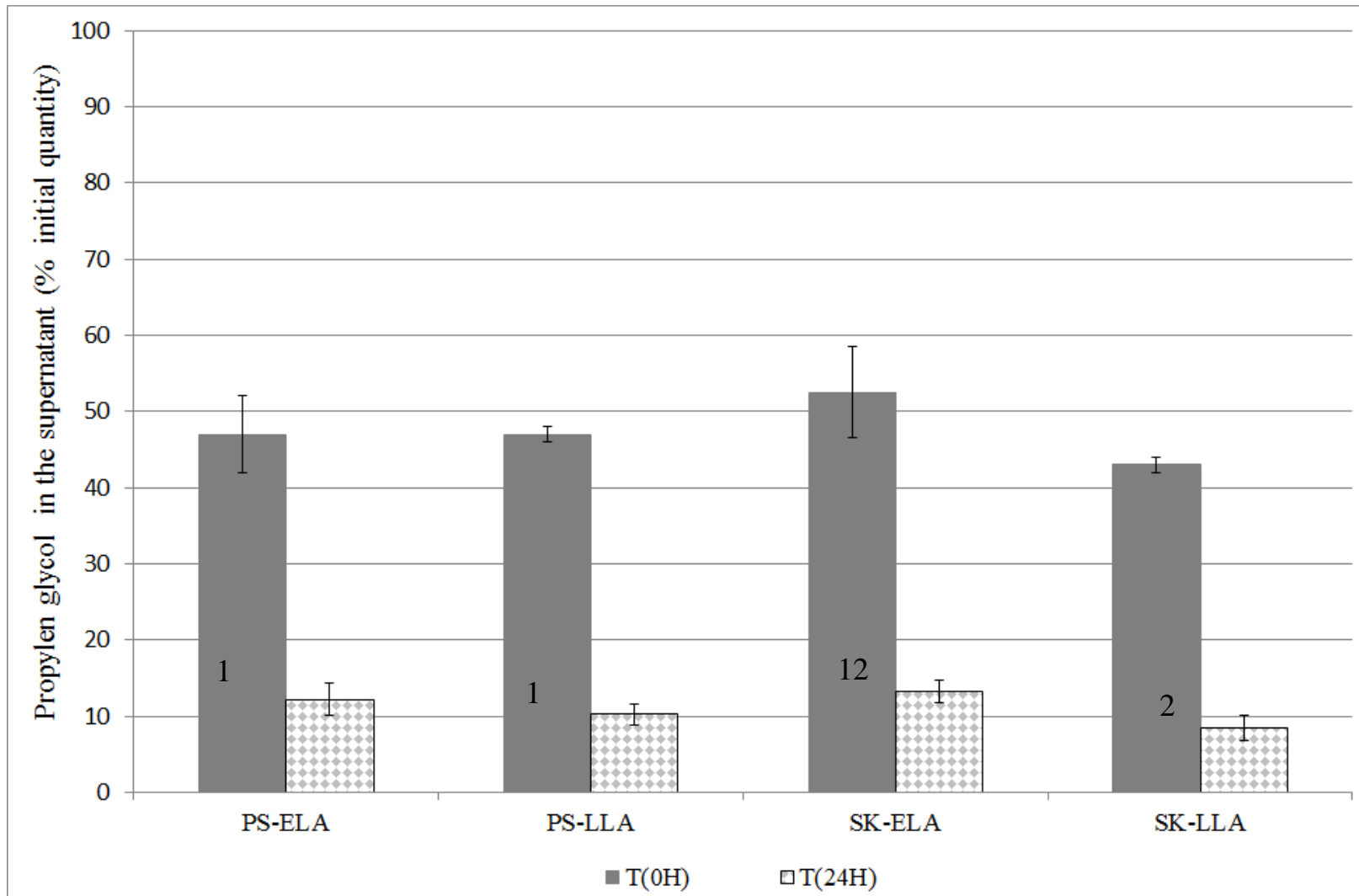


Figure 5: Amount of propylene glycol of supernatants for the different systems as a function of time of separation of the continuous and the dispersed phase. T(0H) is the phase separation performed immediately at the end of the process. T(24H) is the phase separation performed 24 hours at the end of the process. The standard deviations are represented on the bars. Significant differences are indicated by different letters ($p < 0.05$ using Fisher t-test).

In parallel, the amount of the PG in the supernatants was determined (figure 5). At T(0H), PG was distributed uniformly between the two phases (about 50 % in each phase) of the system, whatever the system ($p = 0.289$). This result showed no specific affinity of PG for one or the other phase. At T(24H), the amount of PG in the supernatants decreased heavily, especially and significantly for SK-LLA. At the end of heating, there was less water available and it could be assumed that this result was due to a competitive effect between propylene glycol and konjac glucomannan towards water.

Overall, the distributions of PG and of carvacrol in the continuous and dispersed phases between T(0H) and T(24H) were the opposite. To sum up the distribution of carvacrol and PG in different phases of system, a schematic representation is presented in figure 6. Only, the molecules predominantly presents in each phase were represented.

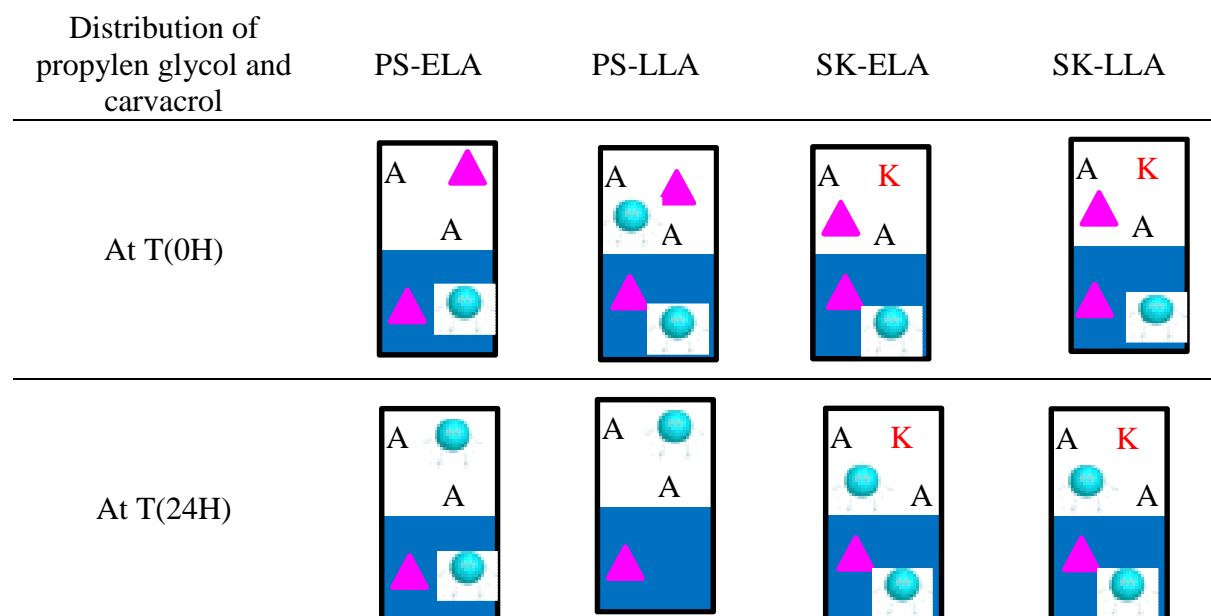


Figure 6: Schematic representation of the distribution of propylene glycol and carvacrol in different phases of the potato starch suspensions (PS) and potato starch – konjac glucomannan suspensions (SK). Ligands were added either before the heating (ELA) or after the heating (LLA). T(0H) is the phase separation performed immediately at the end of the process. T(24H) is the phase separation performed 24 hours at the end of the process. The letters A and K symbolize respectively Amylose and Konjac glucomannan. The pink triangle represents propylene glycol and the blue circle represents carvacrol. Only, the molecules predominantly presents in each phase were represented.

At T(0H), the applied heat treatment followed by the phase separation allowed to solubilize any amylose in the continuous phase. PG, in excess, had no particular affinity for any phase and therefore distributed equally between the two phases. PG was the carrier solvent of carvacrol and promoted the complexation of carvacrol by amylose. Carvacrol was also present in two phases almost evenly in the case of PS-LLA. When carvacrol was added at the end of heating, the amylose molecules, free to move in the continuous phase, were available to rapidly form inclusion complex with carvacrol. This may explain the high

proportion of carvacrol in the supernatant of PS-LLA (43 % w/w) compared to PS-ELA (15 % w/w). This phenomenon was not observed in presence of KGM. In SK-ELA and SK-LLA, only 14 % (w/w) of carvacrol was in the continuous phase. In our experimental conditions, the addition of KGM did not change the material balance of suspensions. Due to physicochemical properties of KGM, the viscosity of the continuous phase is accentuated by the presence of KGM, thus limiting the mobility of carvacrol.

At T(24H), carvacrol was present evenly in the two phases for all matrices except for PS-LLA. For PS-LLA, carvacrol was predominantly present in the continuous phase (74 % w/w). By comparing the distribution of carvacrol between T(0H) and T(24H), the quantity of carvacrol in the continuous phase was 3.5 times higher for PS-ELA, SK-ELA, SK-LLA and 1.7 times higher for PS-ELA. This demonstrated that the implementation of amylose - carvacrol complexes was highly dependent on the experimental conditions and on time.

At T(24H), PG was found mainly in the dispersed phase whatever the composition of the matrix. The presence or not of KGM was thus not related to this phenomenon. In contrast, this location of PG could be explained by the amount of carvacrol complexed with amylose. In fact, the amylose helix is characterized by a single helix with a hydrophobic cavity and hydrophilic areas outside of the chain due to the presence of hydrophilic groups. At T(0H), for all matrixes, between 14 % (w/w) and 43 % (w/w) of carvacrol is located in the continuous phase and complexed with amylose. Hydrogen bonds can also be drawn between PG and the hydrophilic areas of the amylose helix as 50 % of PG were located in this phase. At T(24H), for all matrixes, between 48 % (w/w) and 74 % (w/w) of carvacrol were located in the continuous phase with amylose. At the opposite, 90 % (w/w) of PG were located in dispersed phase. Therefore, it seemed that above a threshold amount of amylose – carvacrol complexes, PG could not find any affinity with amylose helix located in the continuous phase. It was then attracted by the hydrophilic zone of the dispersed phase rich in amylopectin (residue) which began to retrograde in double helices. In our experimental conditions, this threshold was at 48 % (m/m) of carvacrol located in the continuous phase with amylose.

4. CONCLUSIONS

PS and SK suspensions were prepared by hydrothermal treatment and flavoured with carvacrol solubilized in PG. X-ray diffraction and DSC results demonstrated that PG alone did not interact with amylose but helped the formation of amylose-carvacrol complexes when the mixture carvacrol-PG was used. The presence of KGM was shown of little negative effect on the formation of amylose-carvacrol complexes. Nevertheless, the study showed that the moment of addition of the ligands was of great importance concerning the distribution and the amount of the ligands within the biphasic suspension. The moment of addition of the ligand when starch was swollen and when amylose was in the continuous phase led to a presence of carvacrol mainly in the continuous phase. This effect was dramatically decreased in presence of KGM.

It is worth comparing the distribution of carvacrol and PG at T(24H) in the different suspensions with the retention of carvacrol obtained in a previous study (Lafarge, Cayot et al., 2014). The retention of carvacrol was more pronounced for PS-LLA than PS-ELA. The addition of KGM to PS suspensions decreased the retention of carvacrol. The location and the quantification of carvacrol allow explaining the retention results and understanding how the distribution of carvacrol influenced the retention. Both a high viscosity of continuous phase in presence of KGM and the time of added ligand impacted the interactions with amylose.

Acknowledgements: The authors would like to thank Chantal Hory, Lucie Ribourg and Bérénice Houinsou Houssou for their important contribution to these experiments. Preparation of starch and konjac - glucomannan aqueous suspensions was done with equipments from the technical platform RMB (“Rhéologie et structure des Matériaux Biologiques”) of University of Bourgogne- Franche-Comté.

REFERENCES

- Alam, Siddiqui, Lutfi and Hasnain (2009). "Effect of different hydrocolloids on gelatinization behaviour of hard wheat flour." *Trakia Journal of Sciences* 7(1): 1-6.
- Alloncle, Lefebvre, Llamas and Doublier (1989). "A rheological characterization of cereal starch-galactomannan mixtures." *Cereal chemistry* 66: 90-93.
- Alvarez-Manceñido, Landin, Lacik and Martínez-Pacheco (2008). "Konjac glucomannan and konjac glucomannan/xanthan gum mixtures as excipients for controlled drug delivery systems. Diffusion of small drugs." *International Journal of Pharmaceutics* 349(1–2): 11-18.
- Arvisenet, Le Bail, Voilley and Cayot (2002). "Influence of physicochemical interactions between amylose and aroma compounds on the retention of aroma in food-like matrices." *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50(24): 7088-7093.
- Ben Arfa, Combes, Prezosi-Belloy, Gontard and Chalier (2006). "Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure." *Letters in Applied Microbiology* 43: 149-154.
- Biais, Le Bail, Robert, Pontoire and Buleon (2006). "Structural and stoichiometric studies of complexes between aroma compounds and amylose. Polymorphic transitions and quantification in amorphous and crystalline areas." *Carbohydrate Polymers* 66: 306-315.
- Biliaderis and Galloway (1989). "Crystallization behavior of amylose-V complexes: Structure-property relationships." *Carbohydrate Research* 189: 31-48.
- Buléon, Delage, Brisson and Chanzy (1990). "Single crystals of V amylose complexed with isopropanol and acetone." *International Journal of Biological Macromolecules* 12(2): 25-33.
- Burt (2004). "Essential oils : Their antibacterial properties and potential applications in food - A review." *International Journal of Food Microbiology* 94(3): 223-253.
- Cayot, Lafarge, Bou-Maroun and Cayot (2016). "Substitution of carcinogenic solvent dichloromethane for the extraction of volatile compounds in a fat-free model food system." *Journal of Chromatography A* 1456: 77-88.
- Chang, He and Huang (2013). "Effect of lauric acid on the V-amylose complex distribution and properties of swelled normal cornstarch granules." *Journal of Cereal Science* 58(1): 89-95.
- Charoenrein, Tatirat, Rengsutti and Thongngam (2010). "Effect of konjac glucomannan on syneresis, textural properties and the microstructure of frozen rice starch gel." *Carbohydrate Polymers* 83: 291-296.
- Conde-Petit, Escher and Nuessli (2006). "Structural features of starchflavor complexation in food model systems." *Trends in Food Science and Technology* 17: 227-235.
- Doublier, Llamas and Le Meur (1987). "A rheological investigation of cereal starch pastes and gels. Effect of pasting procedures." *Carbohydrate Polymers* 7(4): 251-275.
- Exarhopoulos and Raphaelides (2012). "Morphological and structural studies of thermally treated starch-fatty acid systems." *Journal of Cereal Science* 55(2): 139-152.

Publication II

- Helbert and Chanzy (1994). "Single crystals of V amylose complexed with n-butanol or n-pentanol: structural features and properties." *International Journal of Biological Macromolecules* 16: 207-213.
- Huang, Kennedy, Li, Xu Xiao and Xie B.J. (2007). "Characters of rice starch gel modified by gellan, carrageenan, and glucomannan: A texture profile analysis study." *Carbohydrate Polymers* 69: 411-418.
- Jarvis and Walker (1993). "Simultaneous, Rapid, Spectrophotometric determination of Total Starch, Amylose and Amylopectin." *Journal Science of Food Agricultural* 63: 53-51.
- Jouquand, Ducruet and Le Bail (2006). "Formation of amylose complexes with C6-aroma compounds in starch dispersions and its impact on retention." *Food Chemistry* 96: 461-470.
- Katuraya, Okuyama, Hatanaka, Oshima, Sato and Matsuzaki (2003). "Constitution of konjac glucomannan: chemical analysis and ¹³C NMR spectroscopy." *Carbohydrate Polymers* 53(2): 183-189.
- Khanna and Tester (2006). "Influence of purified konjac glucomannan on the gelatinisation and retrogradation properties of maize and potato starches." *Food Hydrocolloids* 20: 567-576.
- Kugimiya, Donovan and Wong (1980). "Phase Transitions of Amylose-Lipid Complexes in Starches: A Calorimetric Study." *Starch* 32(8): 265-270.
- Lafarge, Cayot, Hory, Goncalves, Chassefont and Le Bail (2014). "Effect of konjac glucomannan addition on aroma release in gels containing potato starch." *Food Research International* 64: 412 - 419.
- Le Bail, Chauvet, Simonin, Rondeau-Mouro, Pontoire, de Carvalho and Le-Bail (2013). "Formation and stability of amylose ligand complexes formed by high pressure treatment." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 18: 1-6.
- Le Bail, Houinsou-Houssou, Kosta, Pontoire, Gore and Le Bail (2015). "Molecular encapsulation of linoleic and linolenic acids by amylose using hydrothermal and high-pressure treatments." *Food research international* 67: 223-229.
- Mestres, Nago, Akissoe and Matencio (1997). "End use quality of some African Corn Kernels. 2 Cooking behavior of whole dry-milled maize flours; incidence of storage." *Journal of Agricultural Food Chemistry* 45: 565-571.
- Muadklay and Charoenrein (2008). "Effects of hydrocolloids and freezing rates on freeze-thaw stability of tapioca starch gels." *Food Hydrocolloids* 22: 1268-1272.
- Nakano, Takikawa and Arita (1979). "Release characteristics of dibucaine dispersed in konjac gels." *Journal of Biomedical Materials Research* 13: 811-819.
- Pozo-Bayon, Biais, Rampon, Cayot and Le Bail (2008). "Influence of complexation between amylose and a flavored model sponge cake on the degree of aroma compound release." *Journal of Agricultural Food Chemistry* 56(15): 6640-6647.
- Schwartz, Le Bail, Garnier, Llamas, Queveau, Pointoire, szrednicki and Le Bail (2014). "Available water in konjac glucomannan-starch mixtures. Influence on the gelatinization, retrogradation and complexation properties of two starches." *Food Hydrocolloids* 41: 71-78.
- Takahiro, Yohei, Toshio, Yasunori, Iwao and Katsuyoshi (2005). "Effect of non-ionic polysaccharides on the gelatinization and retrogradation behavior of wheat starch. ." *Food Hydrocolloids* 19: 1-13.
- Vasiliadou, Raphaelides and Papastergiadis (2015). "Effect of heating time and temperature on partially gelatinized starch-fatty acid interactions." *LWT - Food Science and Technology* 60(2, Part 1): 698-707.
- Wen, Wang, Wang, Li and Zhao (2008). "Preparation of konjac glucomannan hydrogels as DNA-controlled release matrix." *International Journal of Biological Macromolecules* 42(3): 256-263.
- Yang, Xiao and Ding (2009). "An investigation into the application of konjac glucomannan as a flavor encapsulant." *European Food Research and Technology* 229(3): 467-474.
- Yoshimura, Takaya and Nishinari (1998). "Rheological studies on mixtures of corn starch and konjac-glucomannan." *Carbohydrate Polymers* 35: 71-79.
- Zhang, Chen and Yang (2014). "Konjac glucomannan, a promising polysaccharide for OCDDS." *Carbohydrate Polymers* 104: 175-181.
- Zhou, Wang, Zhang, Du and Zhou (2008). "Effect of polysaccharides on gelatinization and retrogradation of wheat starch." *Food Hydrocolloids* 22: 505-512.

Commentaires synthétiques de la publication II :

2.2.1 Compétition entre le carvacrol et le propylène glycol pour former des complexes avec l'amylose d'amidon de pomme de terre.

Les études en diffraction des rayons X et en DSC ont été réalisées avec un ajout en excès de propylène glycol pur (3 % (m / m d'amidon sec)) ou en excès de carvacrol pur (3 % (m / m d'amidon sec)) ou en mélange « propylène glycol – carvacrol » (1,5 %-1,5 % (m / m d'amidon sec)). Les résultats ont confirmé la présence de complexes amylose - carvacrol de type V6III. Par contre, dans nos conditions expérimentales, le propylène glycol ne formait pas de complexe avec l'amylose. Il n'y avait donc pas de compétition entre le carvacrol et le propylène glycol pour former des complexes avec l'amylose. Bien au contraire, les deux techniques montrent que le propylène glycol favorisait la formation des complexes amylose - carvacrol en type V6III.

Selon les résultats de DSC, l'ajout de glucomannane de konjac semblait perturber l'établissement des complexes amylose - carvacrol.

Notre hypothèse « compétition entre le carvacrol et le propylène glycol pour former des complexes avec l'amidon de pomme de terre » est donc rejetée.

2.2.2 Impact du glucomannane de konjac et du moment d'ajout du carvacrol sur la rétention du carvacrol.

En DSC et DRX, aucune différence structurale n'a été observée selon le moment d'ajout du carvacrol, cela étant peut-être dû à la présence en excès de carvacrol que requièrent ces analyses. Cependant, dans des matrices à plus faible concentration en carvacrol (2 mmol de carvacrol/équivalent glucose), la localisation et la quantité de carvacrol et de propylène glycol différaient selon le moment d'ajout des ligands et la présence de glucomannane de konjac.

Dans nos conditions expérimentales, toutes les matrices présentaient le même indice de gonflement et la même quantité d'amylose solubilisée. Après séparation de phase, la phase continue était principalement constituée d'amylose et de glucomannane de konjac. L'amylopectine était localisée dans la phase dispersée.

À T(OH) (= fin du traitement thermomécanique), le traitement thermique appliqué suivi de la séparation de phase a permis de solubiliser toute l'amylose dans la phase continue. Le propylène glycol, solvant support du carvacrol et présent en excès dans les matrices, n'avait pas d'affinité particulièrement entre les phases et était distribué équitablement entre la phase continue et la phase dispersée.

Le carvacrol était majoritairement présent dans la phase dispersée excepté pour PS-LLA où le carvacrol était presque équitablement distribué entre la phase continue et la phase dispersée. En fin de traitement thermique à 60°C, les molécules d'amylose étaient solubilisées dans la phase continue, et, disponibles de suite pour former des complexes avec le carvacrol. De plus, le carvacrol étant solubilisé dans le propylène glycol, « facilitateur de la complexation carvacrol – amylose » selon les résultats en DRX, l'interaction était favorisée. Ceci

expliquerait la haute proportion de carvacrol dans la phase continue de PS-LLA (43 % m/m) comparée à celle de PS-ELA (15 % m/m).

En présence de glucomannane de konjac, le moment d'ajout du carvacrol n'avait pas d'impact sur sa distribution et seulement 14 % (m/m) de carvacrol était présent dans la phase continue. Dans nos conditions expérimentales, la quantité d'amylose solubilisée était la même indépendamment de la présence ou non de glucomannane de konjac. La différence de répartition du carvacrol entre PS-LLA et SK-LLA pourrait alors être liée aux propriétés physicochimiques du glucomannane de konjac. En effet, la présence du glucomannane de konjac dans la phase continue accroît sa viscosité limitant ainsi la mobilité du carvacrol et des molécules d'amylose.

À T(24H) (= 24 heures après la fin du traitement thermomécanique), le carvacrol était distribué équitablement entre la phase continue et la phase dispersée pour toutes les matrices, excepté pour PS-LLA où il était majoritairement présent dans la phase continue (74 % m/m). En comparant la distribution du carvacrol à T(0H) et à T(24H), la quantité de carvacrol présent dans la phase continue était 3,5 fois plus importante pour PS-ELA, SK-ELA, SK-LLA et 1,7 fois plus importante pour PS-ELA. Ceci démontre que l'établissement des complexes amylose – carvacrol est dépendant des conditions expérimentales et du temps.

Le propylène glycol, contrairement à T(0H), était principalement localisé dans la phase dispersée (90 % m/m), quelque soit la composition de la matrice. La présence ou non de glucomannane de konjac n'était donc pas liée à ce phénomène. Par contre, cette localisation du propylène glycol pourrait être expliquée par la quantité de carvacrol complexé avec l'amylose. L'hélice d'amylose complexée est une simple hélice présentant une cavité hydrophobe et des zones hydrophiles à l'extérieur de l'hélice en raison des groupements hydrophiles de la chaîne. À T(0H), toutes matrices confondues, entre 14 % (m/m) et 43 % (m/m) de carvacrol était complexé avec l'amylose. Des interactions hydrogènes pouvaient également s'établir entre le propylène glycol et les zones hydrophiles de l'hélice d'amylose puisque le propylène glycol était présent à 50 % (m/m) dans la phase continue à T(0H). À T(24H), toutes matrices confondues, entre 48 % (m/m) et 74 % (m/m) de carvacrol était retrouvé dans la phase continue et était complexé avec l'amylose. Par contre, la quantité de propylène glycol présent dans la phase continue a été divisée par 5 par rapport à sa quantité à T(0H). 90% (m/m) du propylène glycol étaient retrouvée dans la phase dispersée. Il semblerait donc qu'au-delà d'une quantité seuil de complexes amylose – carvacrol formés, le propylène glycol ne trouverait plus d'affinité avec l'hélice d'amylose et serait alors attiré par les zones hydrophiles des doubles hélices de l'amylopectine (en amorce de rétrogradation à 24 heures) localisées dans la phase dispersée. Dans nos conditions expérimentales, ce seuil serait situé à 48 % (m/m) de carvacrol interagissant avec l'amylose d'amidon de pomme de terre.

Il est intéressant de comparer cette distribution du carvacrol et du propylène glycol obtenue à T(24H) avec les résultats de rétention obtenus par la méthode PRV présentée précédemment (publication I), obtenu également à 24 heures.

La rétention du carvacrol par PS-LLA était la plus prononcée reflétant ainsi la présence de fortes interactions entre l'amidon de pomme de terre et le carvacrol lors d'un ajout en fin de process. L'étude de la distribution du carvacrol entre les différentes phases de la matrice PS a mise en évidence l'impact du moment d'ajout du carvacrol sur sa distribution et par conséquent son impact sur les complexes amylose – carvacrol.

Par contre, l'impact du moment d'ajout était inexistant en présence de glucomannane de konjac. La présence ou non du glucomannane de konjac n'a pas impacté sur la quantité d'amylose solubilisée. La diminution des interactions entre l'amylose et le carvacrol observé par la méthode PRV serait liée aux propriétés physicochimiques du glucomannane de konjac : augmentation de la viscosité de la phase continue limitant ainsi la mobilité du carvacrol et des molécules d'amylose.

Notre hypothèse « impact du glucomannane de konjac sur l'encapsulation moléculaire du carvacrol » est donc validée.

L'hypothèse N°1 est vérifiée : l'encapsulation moléculaire de composés volatils est possible dans une matrice d'amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac. Dans notre étude, sur les trois composés volatils étudiés, seuls des complexes carvacrol – amylose ont été observés. Ce complexe amylose - carvacrol existe en présence ou non du glucomannane de konjac et présente aux rayons X une signature de type V6III.

Le glucomannane de konjac ne forme pas d'interactions spécifiques avec les composés volatils. Leur rétention est due à la forte viscosité de la phase continue provoquée par la présence du glucomannane de konjac, limitant la mobilité et la volatilité des composés. Un effet « salting-out » du carvacrol est observé dans une suspension de glucomannane de konjac.

Le propylène glycol, solvant support des composés d'arôme et présent en excès dans nos matrices, ne forme pas de complexes avec l'amidon. Au contraire, sa présence favorise la complexation du carvacrol avec l'amidon.

L'établissement des complexes amylose - carvacrol est dépendant des conditions expérimentales et du temps. Dans les matrices contenant uniquement de l'amidon de pomme de terre, le moment d'ajout du carvacrol est un facteur déterminant. Un ajout en fin de process semble le plus favorable.

Les analyses DSC montrent que l'ajout de glucomannane de konjac perturbe modérément l'établissement des complexes amylose - carvacrol. Sa présence dans la phase continue des matrices augmente sa viscosité, limitant la mobilité du carvacrol et de l'amylose et ainsi leurs potentialités de rencontre.

2.3 Efficacité du piégeage du carvacrol par la matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac

Pour la suite de l'étude, nous conserverons donc uniquement le carvacrol comme molécule d'intérêt.

Le pourcentage de rétention du carvacrol présenté dans la publication I a été déterminé à partir des coefficients de partage $K_{\text{air/matrice}}$, reflétant les interactions entre les composés d'arôme et les polysaccharides. Mais, il ne tient pas compte du piégeage du carvacrol dans le réseau désorganisé de la matrice. Notre objectif était donc de déterminer l'efficacité du piégeage du carvacrol par la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac en tenant de ces deux phénomènes concomitants.

La méthode retenue pour cette détermination était une extraction solide - liquide, avec ultra - sons et centrifugation. Contrairement à la technique d'extraction – distillation simultanée (Likens – Nickerson) utilisée précédemment, aucun chauffage n'est appliqué pour cette extraction solide - liquide. Par conséquent, on peut supposer que le carvacrol complexé par l'amylose ne sera pas accessible. Cependant, Biais (2006) a montré que les complexes de type V6III pouvaient évoluer vers des signatures de type V6I lors d'extractions solide - liquide. Cela signifie que les molécules situées entre les hélices sont mobiles sous l'effet du lavage par un solvant.

De plus, pour cette extraction solide – liquide, aucune matrice n'a été déstructurée préalablement afin de préserver la structure des matrices. Par conséquent, la quantité de carvacrol estimée par ce dosage est appelée « quantité de carvacrol mobile ». Elle correspond à la quantité de carvacrol non piégé par les complexes avec l'amylose, c'est-à-dire le carvacrol piégé dans le réseau désorganisé de la matrice et éventuellement le carvacrol localisé entre les hélices d'amylose. Sur cette base, le pourcentage de piégeage global du carvacrol a été calculé selon l'équation 31.

$$\left(\frac{\text{Quantité initiale théorique de carvacrol} - \text{Quantité de carvacrol mobile}}{\text{Quantité initiale théorique de carvacrol}} \right) * 100 \quad \text{Équation 31}$$

Nos résultats précédents ont montré que la quantité de carvacrol dans les matrices, quels que soit la composition de la matrice et le moment d'ajout, était proche de 100 et qu'il n'y avait pas de différence significative entre les matrices. Par simplification, le pourcentage de piégeage global du carvacrol est calculé à partir de la quantité initiale théorique de carvacrol.

Le pourcentage de piégeage global du carvacrol par les matrices PS-ELA, PS-LLA, SK-ELA et SK-LLA a été déterminée à deux moments : T0 (immédiatement en fin de traitement thermomécanique) et à T24 (24 heures après la fin du traitement thermomécanique). La démarche expérimentale mise en œuvre est présentée en figure 77.

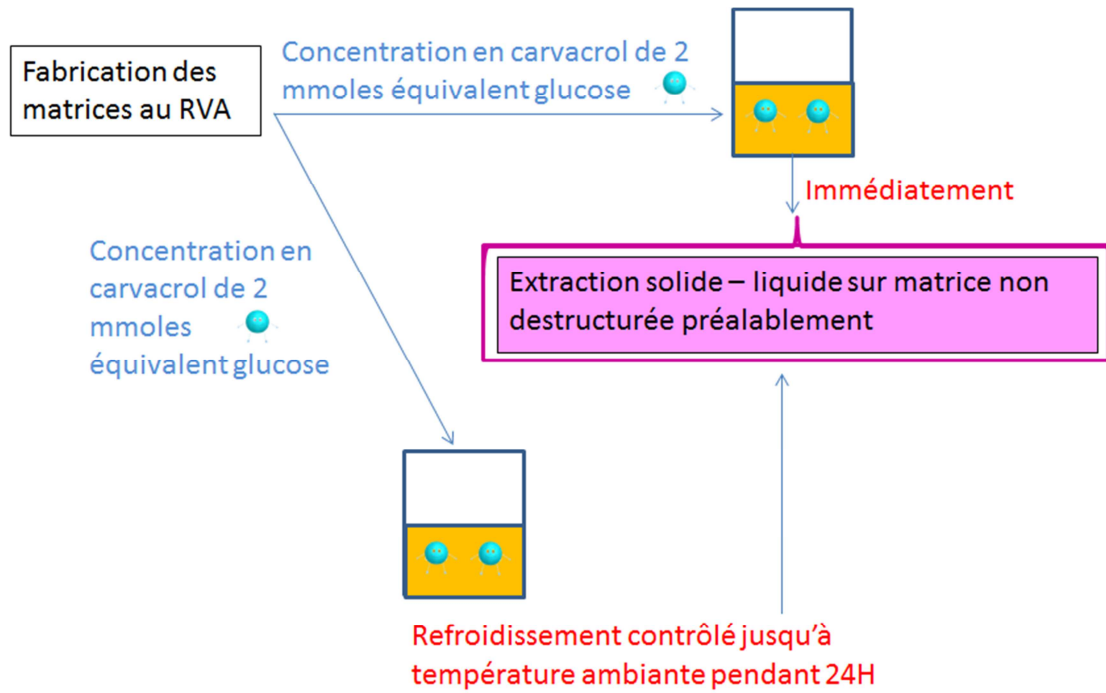


Figure 77 : Méthode expérimentale mise en œuvre pour déterminer l'efficacité du piégeage du carvacrol par la matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac à deux moments : immédiatement en fin de traitement thermomécanique et 24 heures après la fin du traitement thermomécanique.

Le pourcentage de piégeage global du carvacrol par PS-ELA, SK-ELA, PS-LLA et SK-LLA était compris entre 50 et 70 % (figure 78).

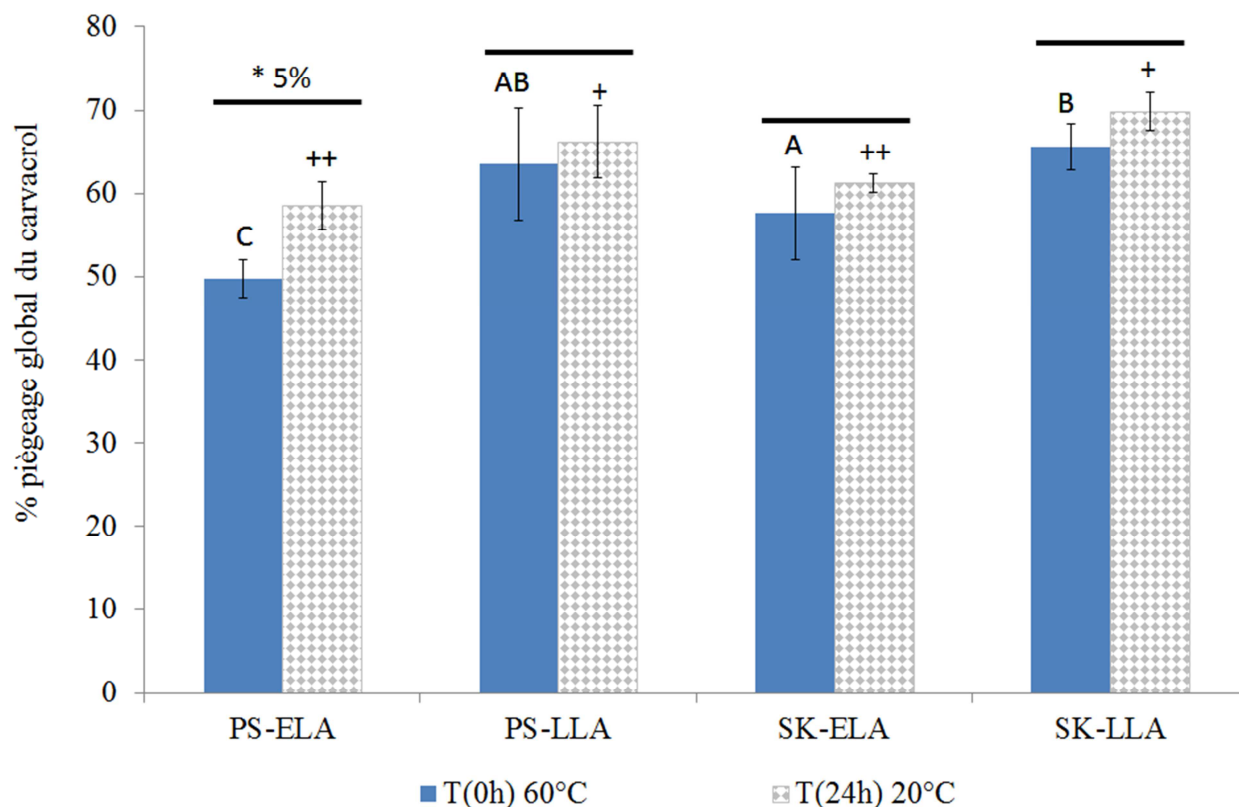


Figure 78 : Pourcentage de carvacrol piégé dans la matrice amidon de pomme de terre (PS) et la matrice amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac (SK). Le carvacrol a été ajouté en début de process (ELA) ou en fin de process (LLA). Les moyennes avec différentes lettres ou symboles sont significativement différentes selon le test de Fisher ($p < 0,05$). La barre noire avec une étoile au-dessus du couple T(0h)/T(24h) pour chaque système montre la significativité selon le test de Fisher ($p < 0,05$).

À T(0h), une différence significative entre les échantillons était observée. L'ajout du carvacrol en fin de process favorisait une augmentation significative du piégeage du carvacrol : le piégeage du carvacrol par PS-ELA était plus faible que celui de PS-LLA. Le piégeage du carvacrol par SK-ELA était plus faible que celui de SK-LLA.

L'ajout de glucomannane de konjac à PS-ELA améliorait significativement le piégeage global du carvacrol. Le pourcentage de piégeage global du carvacrol était identique entre les matrices PS-LLA, SK-ELA et SK-LLA.

Les dosages ont été appliqués sur des matrices âgées de 24 heures. À T(24h), les échantillons étaient significativement différents. Comme à T(0h), à T(24h), le piégeage du carvacrol par PS-ELA était inférieur à celui de PS-LLA et le piégeage du carvacrol par SK-ELA était plus faible que celui de SK-LLA.

Le piégeage du carvacrol par les matrices PS-LLA et SK-LLA étaient identiques et étaient significativement plus élevées que celui de PS-ELA et SK-ELA. L'ajout du carvacrol en fin de traitement thermomécanique favorisait le piégeage du carvacrol en présence ou non de glucomannane de konjac.

Les barres noires au-dessus des couples (T(0)/T(24)) pour chaque système figurent la significativité des différences entre T(0) et T(24). Seule la matrice PS-ELA montrait une différence significative. Cette observation peut être liée avec celle faite dans la publication II : la formation des complexes amylose - carvacrol, selon les conditions de préparations des matrices, peut prendre du temps. Ce phénomène n'était pas visible pour les autres matrices contrairement aux résultats précédents de la publication II. L'absence de dilution de la matrice dans de l'eau, la nature du solvant utilisé pour le dosage et la présence de glucomannane de konjac peuvent expliquer cette différence de résultats.

Les matrices présentant le meilleur piégeage du carvacrol immédiatement après le traitement thermomécanique et 24 heures plus tard sont : PS-LLA et SK-LLA.

Afin de comprendre quel phénomène (complexes carvacrol – amylose ou piégeage du carvacrol dans le réseau désorganisé de la matrice) est impliquée, la combinaison (i) des résultats de pourcentage de piégeage global du carvacrol et (ii) des résultats de pourcentages de rétention du carvacrol calculés à partir des coefficients de partage obtenus par la méthode PRV (publication I), est présentée en figure 79, selon la composition des matrices.

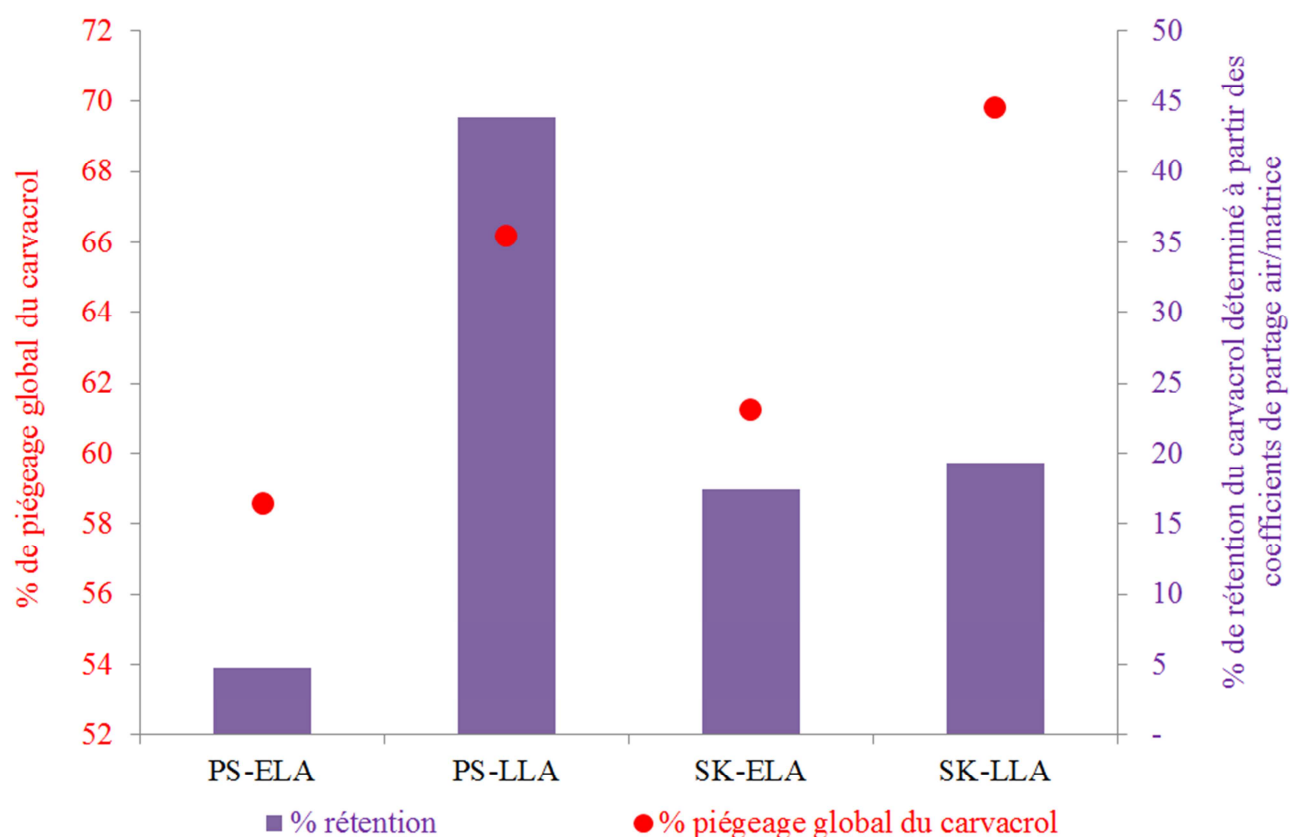


Figure 79 : Combinaison des résultats de pourcentage de piégeage global du carvacrol avec les résultats de pourcentages de rétention du carvacrol calculés à partir des coefficients de partage obtenus par la méthode PRV (publication I) selon la composition des matrices : amidon de pomme de terre (PS), amidon de pomme de terre et glucomannane de konjac (SK). Le carvacrol a été ajouté en début de process (ELA) ou en fin de process (LLA).

La méthode PRV met en évidence les interactions physicochimiques entre les polysaccharides et les composés d'arôme. Comme la mesure se déroule à l'équilibre thermodynamique, l'effet de la structure ou de la viscosité n'intervient pas.

De fortes interactions physicochimiques existaient entre le carvacrol et l'amidon dans la matrice PS-LLA, se traduisant par une forte rétention du carvacrol (44 %). Par contre, les interactions physicochimiques étaient deux fois plus faibles dans la matrice SK-LLA. Or, le pourcentage de piégeage global du carvacrol n'était pas significativement différent entre PS-LLA (66 %) et SK-LLA (70 %). Ceci s'expliquerait par :

- L'établissement de fortes interactions physicochimiques entre l'amidon et le carvacrol pour PS-LLA aboutissant à la formation de complexes carvacrol - carvacrol. Ceci explique le haut pourcentage de rétention du carvacrol obtenu à partir des coefficients de partage. De plus, la matrice n'a pas été déstructurée préalablement à l'extraction solide – liquide. Le réseau d'amylose et d'amylopectine peut également limiter la mobilité du carvacrol. Le haut pourcentage de carvacrol piégé par PS-LLA s'expliquerait principalement par la présence de complexes amylose – carvacrol.
- La baisse du pourcentage de rétention du carvacrol par SK-LLA par comparaison avec PS-LLA s'explique par la présence du glucomannane de konjac. L'augmentation de la viscosité de la phase continue en raison de la présence du glucomannane de konjac limite la mobilité du carvacrol et de l'amylose, et par conséquent l'établissement de complexes carvacrol – amylose pour SK-LLA. Cette augmentation de viscosité de la phase continue pourrait également limiter la mobilité du carvacrol et la diffusion du solvant lors du dosage de la quantité de carvacrol piégé par la matrice. Le haut pourcentage de carvacrol piégé par SK-LLA serait dû en majeure partie au réseau de la matrice polysaccharidique et à la viscosité importante de la phase continue et dans une moindre mesure à la présence de complexes amylose – carvacrol.

PS-ELA est la matrice présentant la plus faible rétention du carvacrol (5 %). Très peu d'interactions physicochimiques s'établissaient entre le carvacrol et l'amidon de pomme de terre lors d'un ajout du carvacrol en début de process. 59 % du carvacrol étaient néanmoins piégés par cette matrice. Cette rétention était donc uniquement due au réseau désorganisé de la matrice, cette dernière n'ayant pas été déstructurée avant l'extraction.

En raison de l'important écart-type du pourcentage de rétention de SK-ELA (publication I), aucune hypothèse n'est formulée.

Les matrices présentant un meilleur piégeage du carvacrol immédiatement après le traitement thermomécanique et 24 heures plus tard sont :

- PS-LLA (65 % \pm 2 % à 24 heures) en raison des fortes interactions physicochimiques entre le carvacrol et l'amylose (complexes carvacrol - amylose)

- SK-LLA (68 % \pm 3 % à 24 heures), en raison de l'augmentation de la viscosité de la phase continue (effet structure du réseau de polysaccharide) et, dans une moindre mesure, en raison de la présence d'interactions physicochimiques entre le carvacrol et l'amylose (complexes carvacrol - amylose).

3 Stabilité du piégeage du carvacrol et stabilité physique de la matrice amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac.

L'objectif de cette partie est de valider ou non l'hypothèse N°2 : « l'ajout de glucomannane de konjac améliore la stabilité physique des matrices à base d'amidon de terre et la stabilité du piégeage des composés d'arôme ».

La stabilité du piégeage du carvacrol dans le temps a été légèrement abordée lors de l'étude de la détermination du pourcentage de piégeage global du carvacrol à T(0h) et à T(24h) (chapitre 3 « Efficacité du piégeage du carvacrol par la matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac). En effet, cette étude a été réalisée sur des matrices non déstructurées au préalable. Une diminution du piégeage du carvacrol entre T(0h) et à T(24h) aurait traduit une faible stabilité de piégeage du carvacrol et/ou une faible stabilité physique par les différentes matrices. En effet, la stabilité des interactions physicochimiques « amidon – composé d'arôme » est indissociable de la stabilité physique de la matrice. Nous pouvons donc affirmer que le piégeage du carvacrol est stable sur 24 heures. Pour poursuivre l'étude de la stabilité du piégeage du carvacrol par une matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac dans le temps, deux voies étaient possibles : procéder à un vieillissement naturel sur plusieurs semaines voire plusieurs mois ou procéder à un vieillissement accéléré en procédant à des cycles répétés de congélation / décongélation. Les avantages et inconvénients des deux options sont présentés dans le tableau 20. Pour notre étude, le vieillissement accéléré a été retenu.

Tableau 20 : Avantages et inconvénients de l'étude de la stabilité du piégeage du carvacrol par la matrice amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac par vieillissement naturel ou accéléré.

| | Avantages | Inconvénients |
|--------------------------------|--|--|
| Vieillissement naturel | Proches du vieillissement naturel des aliments | Difficile à gérer au niveau expérimental (problème calendaire, microbiologique) |
| Vieillissement accéléré | Applications produits alimentaires surgelés Facilité dans la gestion des expérimentations | Modifications supplémentaires obtenues par rapport à un vieillissement naturel (cristaux de glace) |

La stabilité du piégeage de composé d'intérêt est indissociable de la stabilité physique de la matrice. L'ajout d'hydrocolloïde à une suspension d'amidon constitue une façon d'améliorer les performances et/ou les qualités des gels d'amidon comme par exemple ralentir l'apparition de synérèse. En effet, une conséquence négative de la rétrogradation de l'amidon natif est l'apparition de synérèse, paramètre critique de la stabilité physique du gel d'amidon.

Au cours de cette étude, nous allons essayer de répondre également aux questions suivantes : Est-ce que l'association amidon de pomme de terre et glucomannane de konjac améliore la stabilité physique des matrices en fonction du temps ? Est-ce que l'association

amidon de pomme de terre et glucomannane de konjac améliore la stabilité du piégeage du carvacrol en fonction du temps ?

Pour ces études, la démarche mise en œuvre est présentée en figure 80.

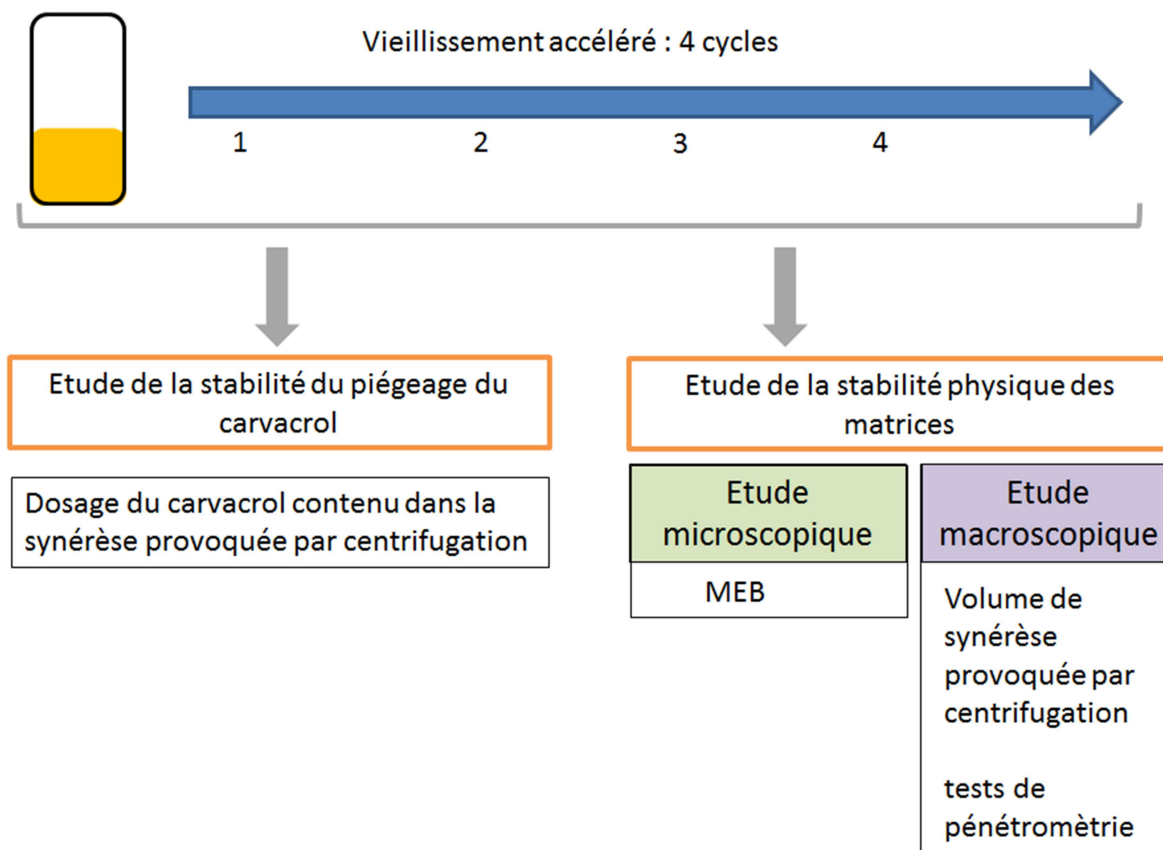


Figure 80 : Schéma de la démarche expérimentale mise en œuvre pour l'étude de la stabilité du piégeage du carvacrol par la matrice amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac et de la stabilité physique de ces gels.

Un cycle de vieillissement accéléré correspond à : 24 heures à -18°C puis 2 heures à 30°C . Pour cette étude, quatre cycles ont été effectués sur les matrices : PS-ELA, PS-LLA, SK-ELA, SK-LLA, PS (matrice amidon de pomme de terre sans carvacrol) et SK (matrice amidon de pomme de terre et glucomannane de konjac sans carvacrol).

L'étude de la stabilité du piégeage du carvacrol consistait à doser le carvacrol présent dans la synérèse. La synérèse obtenue est une synérèse provoquée par centrifugation des matrices ayant subi x cycles de congélation/décongélation et non une synérèse obtenue « naturellement ». Dans ce chapitre, le liquide exsudé des matrices suite à la centrifugation sera appelé synérèse. Le carvacrol a été dosé par l'analyse de l'espace de tête par SPME-GCMS. L'avantage de l'utilisation de la chromatographie gazeuse couplée au spectromètre de masse était de suivre l'éventuelle décomposition du carvacrol lors de l'étude de vieillissement accéléré (figure 81).

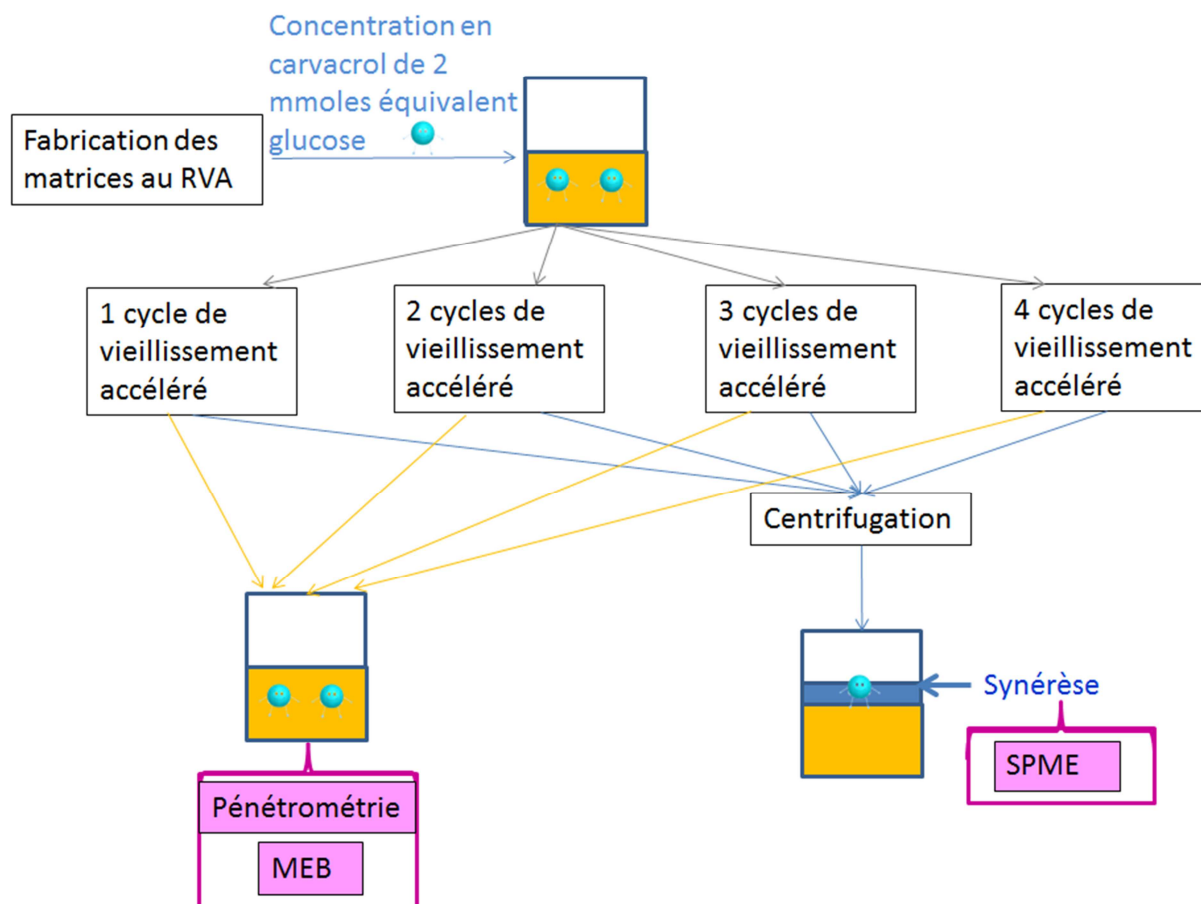


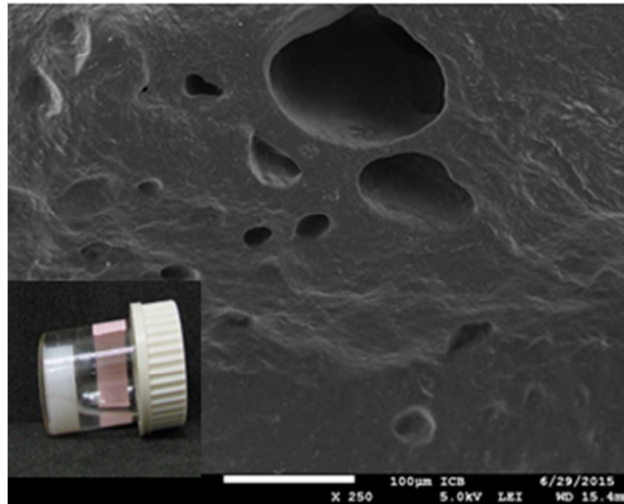
Figure 81 : Méthodes mises en œuvre lors de la démarche expérimentale pour l'étude de la stabilité du piégeage du carvacrol par la matrice amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac et de la stabilité physique de ces gels.

La stabilité physique des matrices a été étudiée à un niveau d'observation microscopique avec le microscope électronique à balayage (MEB) et à un niveau macroscopique avec le volume de synérèse provoquée collecté et des tests de pénétrométrie (figure 81).

Les résultats sont présentés dans la publication III.

Résumé graphique de la publication III

Trapping of carvacrol in potato starch gel



0.2% of konjac glucomannan improved the stability of carvacrol trapping, improved the physical stability of the gel

Trapping of carvacrol by konjac glucomannan-potato starch gels: stability from macroscopic to microscopic scale, using image processing.

Céline Lafarge^a, Ludovic Journaux^b, Aline Bonnotte^c, Jeannine Lherminier^c, John Aldo Lee^d, Patricia Le Bail^e, Nathalie Cayot^{a*3}

^a *Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France*

^b *LE2I UMR6306, CNRS, Arts et Métiers, Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, F-21000 Dijon, France*

^c *Plateforme DImaCell, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France*

^d *Univ. Catholique de Louvain, Molecular Imaging, Radiotherapy, and Oncology-IREC Avenue Hippocrate 55, B-1200 Bruxelles, Belgium*

^e *UR1268, Biopolymères, Interactions, Assemblages, INRA, F-44300 Nantes, France.*

Abstract:

The aim of the study was to show that the presence of a small quantity of konjac glucomannan (KGM) in potato starch suspension increased the stability of carvacrol trapping.

For that purpose, several freeze-thaw cycles were used to accelerate the ageing of the product and consequently drastically destabilize the gels, and induce syneresis. The stability of carvacrol trapping was evaluated by the quantification of carvacrol in the syneresis liquid. The stability of the starch gel structure was studied at microscopic and macroscopic scale.

The moment of the addition of carvacrol and the presence of KGM both had an effect on the stability of carvacrol trapping and of the structure of the gel.

KGM promoted amylose retrogradation but slowed down amylopectin retrogradation. The stability of potato starch gels can be improved by the addition of a small quantity of KGM which showed a 'cryoprotectant' behaviour.

New method to characterize the micro and macrostructure from SEM images processing has also been proposed. The processing of microscopy images was done using Generalized Fourier Descriptors and allowed the characterization of each sample. The carvacrol addition lowered the physical stability of the gel with larger pores and increased syneresis. On the

*3Corresponding author. ph. +33 3 80 77 40 85;
E-mail address: nathalie.cayot@agrosupdijon.fr

contrary, the KGM addition increased the size of the pores but prevented the formation of very large pores and reduced syneresis. The most stable system was obtained by the addition of carvacrol at the end of heating, in a konjac glucomannan–potato starch gel.

Highlights

- Stability of carvacrol trapping was affected by addition time of carvacrol to the suspensions.
- Addition of KGM in starch gel improved the stability of carvacrol trapping.
- Physical stability of starch gels was more disturbed by carvacrol than by KGM.
- Addition of KGM in starch gel ensured a good stability of starch gels towards freeze-thaw cycles.
- New method based on SEM images processing has been proposed.

Keywords: starch, carvacrol, konjac glucomannan, freeze-thaw stability, image processing, trapping.

Chemical compound studied in this article

Carvacrol (PubChem CID: 10364); Amylose (PubChem CID: 53477771); Amylopectin (PubChem CID: 439207); Water (PubChem CID: 962).

1. Introduction

Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) is a phenolic monoterpene constituent of essential oils produced by aromatic plants as oregano and thyme. Carvacrol exhibits many effects of great interest for the food industry: antioxidant, antibacterial, antifungal (Burt, 2004; Ben Arfa, Combes et al., 2006). However, the addition of carvacrol in food products presents some difficulties: (i) it has an extremely low flavour threshold and can drastically change the sensory properties of the food, (ii) it is highly insoluble in water and (iii) it could be oxidized or evaporated when exposed to air, light, or heat.

Trapping of carvacrol in a starch gel could be a good way to overcome these problems. In fact, it is well known that starch may interact with small ligands such as aroma compounds or lipids to form molecular inclusion complexes (Conde-Petit, Escher et al., 2006; Jouquand, Ducruet et al., 2006). In fact, in presence of complexing molecules, amylose organizes in single helix, offering a large hydrophobic central cavity which can receive ligands. Another form of ligand trapping in starch matrix exists. It is based on a non-specific physical entrapment by the network gel established through the rearrangement of starch molecules.

Starch is an important ingredient for the food industry because of its wide availability, low cost and functional properties: thickener, gelling agent, stabilizer, and fat of substitution. However, many food applications of native starches are limited due to their tendency to retrograde during cooling and storage. This is usually associated with syneresis and changes in texture, decreasing the overall consumer acceptability of the product. A way to improve or maintain desirable textural properties and stability of most starchy products is the incorporation of hydrocolloids. Konjac glucomannan (KGM) may be used for this purpose. KGM is an essentially linear polysaccharide composed of β -1.4-linked d-glucosyl and d-mannosyl residues (in a molar ratio of 1.5:1) as main chain with branching β -1.4-glucosyl units. Degree of branching is about 8 %. KGM contains acetyl group in the main chain, approximately 5-10 % acetylation (Yoshimura, Takaya et al., 1998b; Katsuraya, Okuyama et al., 2003b; Khanna and Tester, 2006). It was reported to interact with starches of various botanic origins: maize (Yoshimura, Takaya, & Nishirani, 1997), wheat (Funami, Kataoka et al., 2005; Zhou, Wang et al., 2008), potato (Khanna and Tester, 2006), tapioca (Muadklay and Charoenrein, 2008), and rice (Huang, Kennedy et al., 2007; Charoenrein, Tatirat et al., 2010). All these authors reported the high water holding capacity of KGM that prevented syneresis liquid occurring in starch gels and slowed down the retrogradation rate of starch during storage. Recently, Schwartz et al., (2014) demonstrated that the presence of KGM in a potato starch-water system could affect the gelatinization, the retrogradation and the complexation phenomena of potato starch. This phenomenon seemed to appear at low concentrations of KGM.

In this context, the objective was to study the stability of carvacrol trapping in a mixed gel of KGM and potato starch. Several freeze-thaw cycles (FT cycles) were used to accelerate the ageing of the product and consequently drastically destabilize the gels. In fact, the succession of FT cycles induced an increase of molecular associations between starch chains. More particularly, the retrogradation of amylose resulted in the expulsion of water from the gel structure. This phenomenon is named syneresis (Morris, 1990). The stability of carvacrol trapping was evaluated by the quantification of carvacrol in the syneresis using Head Space-Solid Phase Micro Extraction-Gas Chromatography Mass Spectrometry (HS-SPME-GCMS). The gel set-up and / or the physical stability of the starch gel were studied: (i) at microscopic scale using Scanning Electron Microscopy (SEM) followed with image processing analysis and (ii) at macroscopic scale with pasting behaviour of samples and determination of syneresis.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Potato starch was obtained from Sigma Aldrich and purified konjac glucomannan was kindly provided by Georges Srzednick (University of New South Wales of Sydney, Australia). All suspensions were made using deionized MilliQ water.

Carvacrol (SAFC, Saint-Louis, United States of America, purity 98 %) and propylene glycol (Aldrich, Saint-Louis, United States of America, purity 99.5 %, food grade) have the following physicochemical characteristics at 25°C (estimation program EPI suiteTM):

- Carvacrol (C₁₀H₁₄O, CAS n°499-75-2), Log Poct-w = 3.49, vapour pressure = 3.09 Pa, solubility in water = 1.25 g•L⁻¹.
- Propylene glycol (C₃H₈O₂, CAS n°57-55-6, Log Poct-w = - 0.92, vapour pressure = 38.80 Pa, solubility in water = 811 g•L⁻¹.

The extraction standard for quantification of carvacrol was 4-sec-butylphenol (Aldrich, Saint-Louis, United States of America, CAS n°99-71-8, purity 97 % prepared at 50 mg•L⁻¹ in dimethyl sulfoxide (DMSO, Aldrich, Saint-Louis, United States of America, CAS n°67-68-5).

Glutaraldehyde (Aldrich, Saint-Louis, United States of America, CAS n°111-30-8, grade 1 prepared at 2.5% in buffer 7) and absolute ethanol (Aldrich, Saint-Louis, United States of America, CAS n°64-17-5) were used to prepare the samples for scanning electron microscopy.

2.2 Samples preparation and pasting profile

Aqueous suspensions containing potato starch (PS samples, 25 g of water plus 1.25 g of potato starch by batch), or both starch and konjac glucomannan (SK samples, 25 g of water plus 1.25 g of starch and 0.05 g of konjac glucomannan per batch) were prepared using a Rapid Visco AnalyzerTM (model RVA-super 4, Newport Scientific, Australia) equipped with the ThermoclineTM software. The mixture was put in the aluminium flask and manually stirred to avoid sedimentation. Then, the mixture was held at 50°C for 1 min, heated to 95°C at a constant rate of 12°C•min⁻¹, held at 95°C for 3.5 min and finally cooled to 60°C at the same rate and held at this temperature for 3 min. A constant stirring of 160 rpm was applied, except at the beginning of the pasting profile when the mixture was stirred at 960 rpm for the first 10 s at 50°C and during cooling step for 10 s at 60°C. Viscosity profiles were recorded to check reproducibility of the preparation. Four parameters were taken from the RVA curves: pasting temperature (°C) (corresponding to the beginning of the increase in viscosity), peak viscosity (mPa.s), setback (final viscosity minus trough viscosity, mPa.s) and final viscosity at 60 °C (mPa.s).

A stock solution of carvacrol was prepared by dissolving 1.807 g of carvacrol in 100 mL of propylene glycol at 25°C under stirring. The concentration of carvacrol was chosen in order to obtain a final concentration of 2 mmol of carvacrol per glucose equivalent of starch considered as sufficient to induce complex formation (Arvisenet, Le Bail et al., 2002). The stock solutions were stored at 4°C before use. One hundred µL of stock solution was added to the suspensions, either before heating (Early Ligand Addition: ELA), or after heating (30 sec after the start of the plateau at 60 °C, Late Ligand Addition: LLA). Six samples were made in triplicate: PS, SK, PS-ELA, PS-LLA, SK-ELA, SK-LLA.

2.3 Freeze-thaw cycles

Immediately after preparation, suspensions were sampled as such into centrifuge tubes or jars for further analyses. Then, they were frozen 30 min after the end of pasting profile at -18°C for 24 hours then thawed at 30°C in water bath for two hours. This FT cycle was repeated up to four times.

2.4 Syneresis measurement

The samples were centrifuged at 8000 g at 25°C for 15 min. The liquid exuded from the suspension was cautiously collected and weighed. The percentage of syneresis was calculated as the ratio of the weight of liquid exuded from the suspension to the total weight of the suspension before centrifugation. The result was multiplied by 100. The data were reported as the average of three measurements.

2.5 Quantification of carvacrol in syneresis

Carvacrol was quantified in syneresis by Head Space-Solid Phase Micro Extraction-Gas Chromatography Mass Spectrometry HS-SPME-GCMS, using a calibration curve (linear regression of six points).

The exuded liquid (obtained as explained in paragraph 2.4.) was firstly filtered on glass wool and then on a 45 µm nylon filter. Afterwards, one mL of the filtered sample was transferred into a 22 mL vial, immediately sealed with a silicone septum and screw cap, and agitated during one minute. After 5 minutes of equilibration time at 40°C, the volatiles were extracted from the headspace using a SPME fibre (75µm DVB / Carboxen / PDMS, ref. 57329, Supelco, USA) for 5 min at 40°C. Finally, the fibre was inserted into the GCMS injection port and desorbed for 15 min.

SPME fibres were analysed with a Shimadzu 2010 gas chromatograph (Kyoto, Japan) fitted with a split / splitless injector (240°C, 0.115 bar) on split mode (ratio: 20 / 1) and with a Shimadzu QP2010+ detector (electronic impact at 70 eV, temperature source at 200°C). The chromatograph was equipped with a capillary column FFAP (J&W Scientific) of 30 m ×

0.32 mm. Film thickness was 0.25 μm . Helium was used as vector gas at a velocity of 53 cm / sec). Spectrometry selected ion monitoring method (SCAN mode) was used. m/z 91 fragment resulting from carvacrol was chosen for the quantification.

2.6 Determination of the structure of starch gel after several freeze-thaw cycles with Scanning Electron Microscopy (SEM)

All the unfrozen gels and the gels submitted at several freeze-thaw cycles were fixed in 0.1M phosphate buffer (pH 7.2) containing 2.5 % (v/v) glutaraldehyde for two hours at room temperature. After dehydration in an ethanol series, samples were dehydrated using a critical point dryer. A piece of dehydrated sample was mounted on aluminium stub and coated with a fine layer of carbon and was observed using a JEOL JSM 7600F FEG-SEM. More than 9 views were recorded by sample. Representative images were presented with the accelerating voltage and the magnification used.

2.7 Images processing

2.7.1 Texture feature analysis

The SEM images obtained for these experiments (figure 1) showed differences in structure of the freeze-thawed gels corresponding to the different experimental conditions.

In order to quantify these observations, the biological texture of samples was characterized by texture feature analysis of SEM images. A successful texture characterization requires an efficient feature extraction methodology but the major difficulty is that images are most of the time not uniform, due to changes in orientation, scale, illumination conditions, or other visual appearance (as the obtained SEM images). To overcome these problems, numerous approaches are proposed in the literature. We can distinguish five families of methods to extract textural features (Tuceryan, Jain et al., 1993): structural, statistical, spatio-frequency approaches, and methods based on forms recognition and fractals.

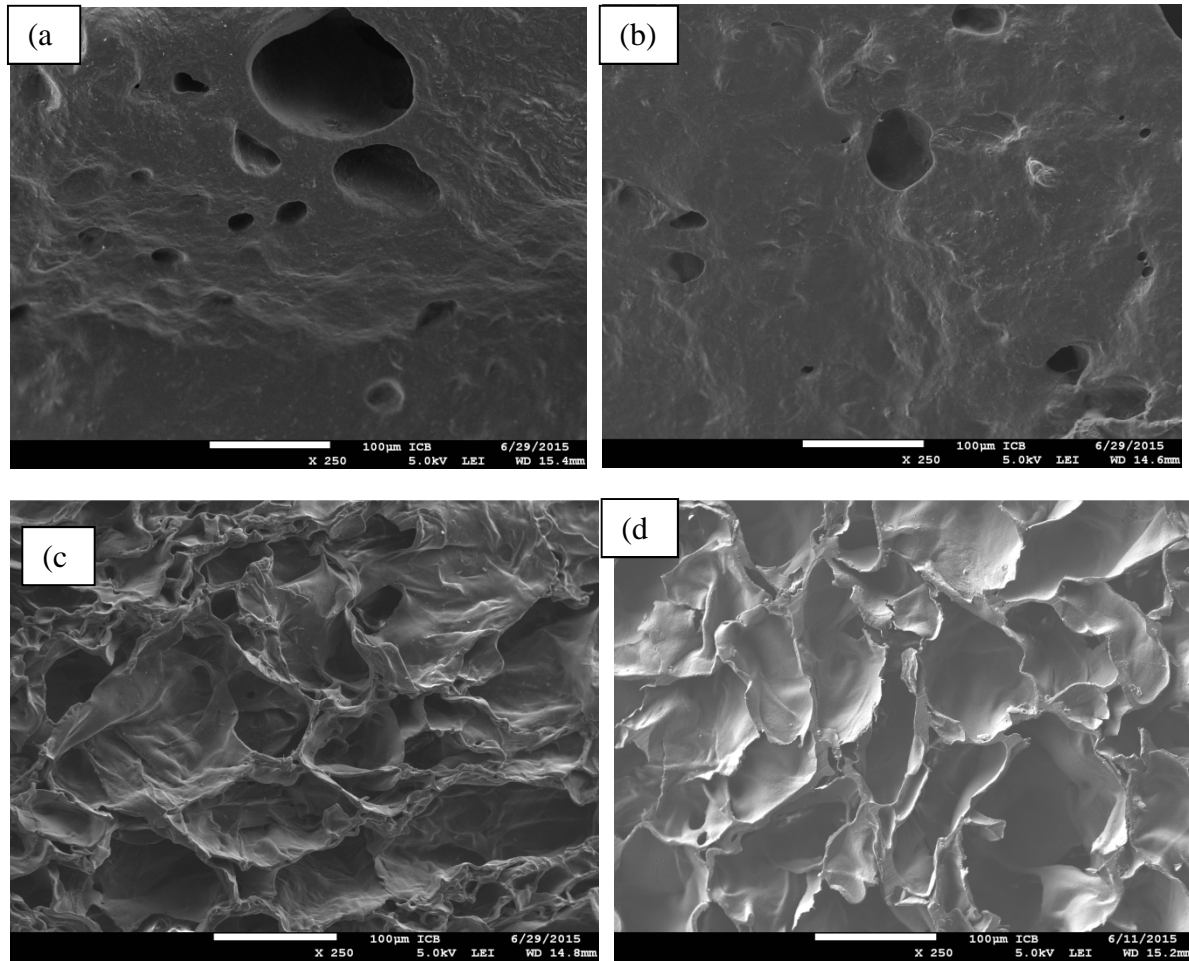


Figure 1: Typical SEM images of potato starch gels (5% (w/w)) with or without konjac glucomannan (0.2% (w/w)) and with or without carvacrol (x 250, bar = 100µm). (a) Unfrozen potato starch gel, (b) Unfrozen potato starch-konjac glucomannan gel, (c) Potato starch gel with carvacrol added at the end of heating, after four freeze-thaw cycles, (d) Potato starch - konjac glucomannan gel with carvacrol added at the end of heating, after four freeze-thaw cycles.

In this context, due to the important variability in orientation and illumination conditions for the different textures, the protocol was based on the computation of robust invariants (Arivazhagan, Ganesan et al., 2006). One family of invariants called Motion descriptors (MD) also known as Generalized Fourier Descriptors (GFD) (Gauthier, Bornard et al., 1991) was considered, which provided well-proven robust features in complex areas of pattern recognition (faces, objects, forms) (Smach, Lemaître et al., 2008; Journaux, Simon et al., 2011).

Images database

The SEM images were grey level images. Each image consisted of a 100 µm scale with a resolution of 256 x 256 pixels resolution which suited well to the scale of our biological observation and time processing. The dataset was composed of 12 classes representing the 12 different kinds of experimental conditions. Finally, the dataset contained almost 1152 images, 96 samples per experimental conditions.

Texture characterisation using Generalized Fourier Descriptors (GFDs)

The main goal of texture analysis of images is to characterize texture with parameters called features. Let f be a square summable function on the plane, and \hat{f} its Fourier transform.

Then, the GFDs of the chosen method are defined as:

$$\hat{f}(x) = \int_{\mathbb{R}^2} f(x) e^{(-j^x x)} dx \quad . \quad (\text{Eq.1})$$

If (λ, θ) are the polar coordinates of point x , then $\hat{f}(\lambda, \theta)$ denotes the Fourier transform of f at (λ, θ) . Gauthier et al., (1991) defined the mapping of D_f from \mathbb{R}_+ into \mathbb{R}_+ as:

$$D_f(\lambda) = \int_0^{2\pi} |\hat{f}(\lambda, \theta)|^2 d\theta \quad , \quad (\text{Eq.2})$$

where D_f is the GFD vector that describes each texture image (see supplementary data).

GFDs, calculated according to equation 2, have several properties that are useful for object recognition: invariance to translation, rotation, and reflection. The GFD vector will be used as input to the nonlinear high-dimensional data visualization method.

High-dimensional data visualization

In order to observe and estimate the differences among samples, GFDs were extracted from SEM images. In the context of texture discrimination, GFDs provided robust but very high-dimensional features (128 dimensions) (Journaux, Simon et al., 2011). Unfortunately, these high-dimensional (HD) datasets were difficult to analyse, information being often redundant, with strong inter-feature correlation. Moreover, this HD dataset could suffer from the curse of dimensionality (Hughes, 1968), in the form of norm concentration (François & Verleysen IEEE 2007) and hubness (Venna, Peltonen et al., 2010). Thus, to improve characterization performance and HD data visualization, dimensionality reduction (DR) techniques were used to transform HD data into a meaningful low-dimensional (LD) representation with the goal of preserving the data structure. Among the numerous methods proposed in the literature (Lee and Verleysen, 2007), a recent nonlinear DR (NLDR) approach called Multi-Scale Jensen-Shannon embedding (Ms.JSE) (Lee, Peluffo-Ordóñez et al., 2015) was chosen. Ms.JSE is an extension of JSE based on neighbourhood preservation between the HD and LD space, for several sizes of neighbourhoods. In this approach, LD coordinates for the data points are chosen so that soft Gaussian neighbourhoods match soft Gaussian neighbourhoods in the HD feature space. The probability of the j th point to be a neighbour of the i th point at scale h in the HD feature space is computed as:

$$\sigma_{hij} = \frac{e^{-\frac{\delta_{ij}^2}{2\lambda_{hi}(P_h)^2}}}{\sum_{k,k \neq i} e^{-\frac{\delta_{ik}^2}{2\lambda_{hi}(P_h)^2}}} \quad , \quad (\text{Eq.3})$$

where:

δ_{ij} is the distance between the i th and j th points in the HD feature space.

$\lambda_{hi}(Ph)$ the bandwidth specific to the i th point at scale h , which corresponds to the radius around the i th sample needed to encompass about Ph soft neighbours.

P_h is the perplexity, a parameter that is related to entropy of σ_{hij} and indicates the number of soft neighbours to consider. At scale h , P is equal to $2h$ and $\lambda_{hi}(P)$ is determined by solving $P_h = e^{(-\sum_j \sigma_{hij} \log(\sigma_{hij}))}$

The probability of the j th point to be a neighbour of the i th point at scale h in the LD space is computed similarly as

$$s_{hij} = \frac{e^{\left(-\frac{d_{ij}^2}{2(l_h)^2}\right)}}{\sum_{k,k \neq i} e^{\left(-\frac{d_{ik}^2}{2(l_h)^2}\right)}}, \quad (\text{Eq. 4})$$

where d_{ij} is the distance between i th and j th point in the LD representation. Bandwidth l_h at scale h is common for all points and pre-set to $2(1/D)$, where D is the target dimension ($D = 2$ is most cases).

Global similarities over all scales are computed as $\sigma_{ij} = \frac{1}{H} \sum_{h=1}^H h \sigma_{hij}$ and $s_{ij} = \frac{1}{H} \sum_{h=1}^H h s_{hij}$.

Since similarities are normalized like a probability distribution, Ms.JSE uses a divergence, namely, the Jensen-Shannon divergence to measure the discrepancy between HD and LD similarities based on Kullback-Leibler divergence D_{KL} (Lee, Renard et al., 2013):

$$D_{JS}^{\mathcal{K}}(\sigma||s) = \mathcal{K}D_{KL}(\sigma||z) + (1 - \mathcal{K})D_{KL}(s||z) \quad , \quad (\text{Eq. 5})$$

where $z = \mathcal{K}\sigma + (1 - \mathcal{K})s$ and \mathcal{K} is the mixing parameter.

2.7.2 Detection and quantification of the surface distribution of pores inside images

In order to estimate the 2D surface corresponding to 3D pores in the SEM images, we extracted the pores by a technique based on Fourier filtering and two dimensional discrete fast Fourier transform (FFT) (Cooley and Tukey, 1965). This approach included three important steps: a high-pass filtering, a thresholding step and finally a cleaning step of the image based on mathematical morphology operations (Serra, 1982).

For the high pass Fourier filtering, a two dimensional FFT was performed on the target image by the equation 7:

$$F(k_x, k_y) = \frac{1}{\sqrt{N_x N_y}} \sum_{n_x=0}^{N_x-1} \sum_{n_y=0}^{N_y-1} f(n_x, n_y) e^{i \omega \frac{k_x n_x}{N_x}} e^{i \omega \frac{k_y n_y}{N_y}}, \quad (\text{Eq. 7})$$

Based on the centred Fourier image, a high pass filter was applied in order to eliminate low frequencies in the FFT image (figure 2b). The cut off frequency was empirically sized by a 10 pixels width disk mask.

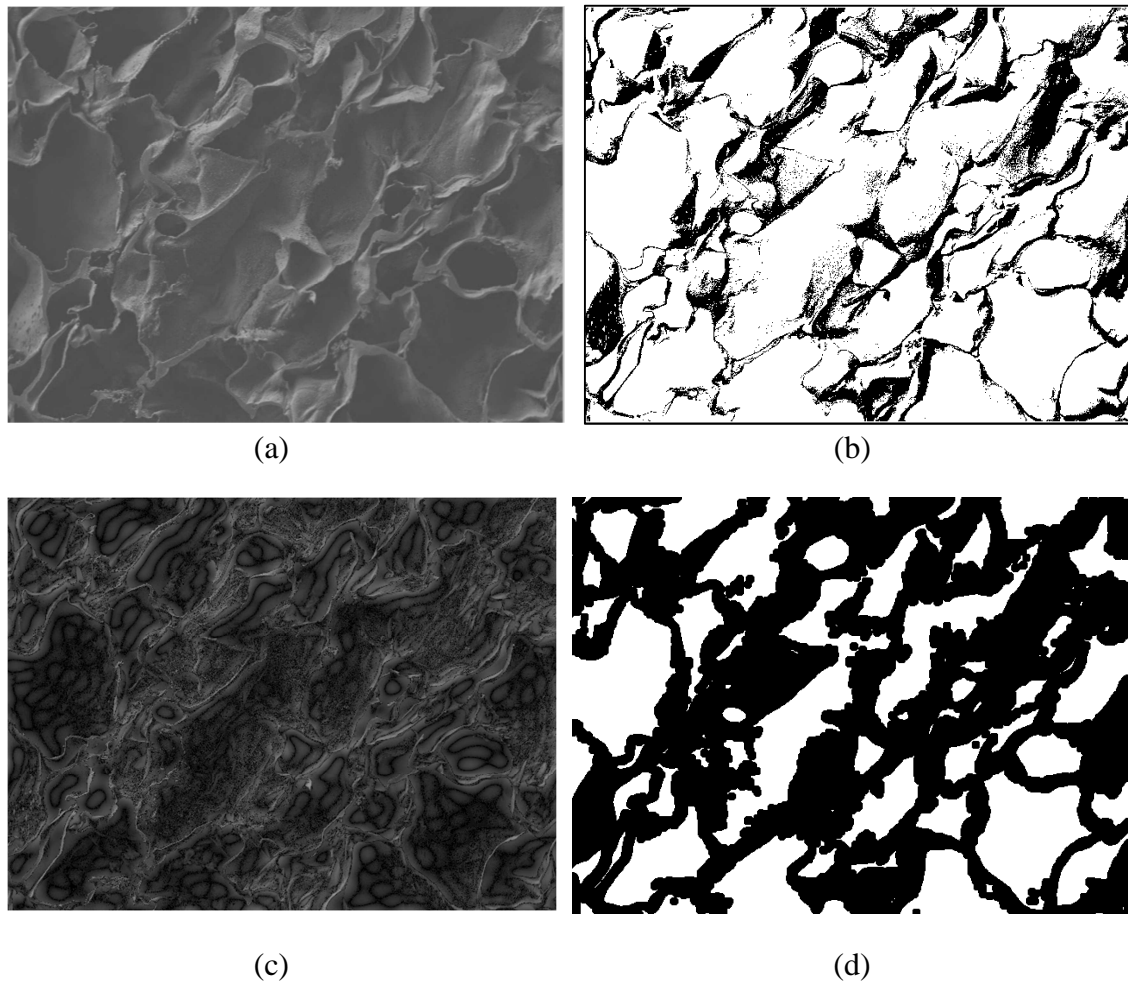


Figure 2: Example of initial SEM image (a), its associated image after inverse FFT (b), thresholded image (c), cleaned image of holes detection (d).

The thresholding of the resulting image was based on an Inverse FFT and a predetermined threshold was applied in order to eliminate low pixel values which do not correspond to the sample (figure 2c). The cleaning step aimed to eliminate remaining “no holes” pixel groups, which were small and scattered. It laid on mathematical morphology operation and was performed with three sub steps:

- First, a dilatation, which aimed at making bigger and closer pixel groups in the image.
- Then a blurring convolution with a Gaussian smoothing operator, followed by a thresholding, which eliminated too small groups of pixels. These small groups were considered as miss. This step made smaller the pixel groups that corresponded to holes and then justified a third step.
- Another dilatation was performed which aimed at regenerate size of pixel groups corresponding to holes (figure 2d).

Finally, the number and the surface of pores was estimated in each SEM image and reported a normalized histogram of surface pores distribution. Each histogram was normalized due to the difference of samples images for each experiment.

2.8 Statistical analysis

The Statistica V8 software was used for Anova. Significance was established at $p < 0.05$. Fisher t-test was used to determine significant differences between values. All image processing was performed on the SI / CCUB Matlab[®] software of the Burgundy University.

3. Results and discussion

3.1 Stability of trapping

Preliminary studies showed that:

- No degradation of carvacrol was observed by GCMS after FT cycles (data no shown).
- The amount of carvacrol measured in the whole suspensions using Likens-Nickerson extraction method was similar whatever the suspension considered and was about $96 \% \pm 8 \%$ of the initial quantity added into the suspensions (w/w). Thus, the loss of carvacrol during pasting procedure is considered as low.

The amount of carvacrol in the syneresis liquid of PS suspensions and SK suspensions for each FT cycle was reported in table 1.

Table 1: Amount of carvacrol in the syneresis liquid (% w/w) of potato starch suspensions (PS) and potato starch-konjac glucomannan suspensions (SK) for each freeze-thaw cycle (FT). Ligands were added either before heating (ELA) or during the plateau at 60°C (LLA). Mean values in each column with different superscripts (a-c) are significantly different at $p < 0.05$ using Fisher t-test. Means values in each row with different superscripts (1-4) are significantly different at $p < 0.05$ using Fisher t-test.

| Sample | % Carvacrol in the syneresis (w) / initial content (w) | | | | Stability of trapping after 4 th FT cycles |
|--|--|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---|
| | Cycle 1 | Cycle 2 | Cycle 3 | Cycle 4 | |
| PS-ELA | 60.8 ^d ₂ ± 2.9 | 56.5 ^a ₂ ± 8.2 | 38.6 ^b ₁ ± 4.1 | 39.7 ^b ₁ ± 0.6 | Variable |
| PS-LLA | 53.4 ^c ± 4.3 | 51.2 ^a ± 4.5 | 46.6 ^c ± 3.8 | 52.1 ^c ± 3.8 | Steady |
| SK-ELA | 43.9 ^b ₃ ± 3.3 | 28.4 ^b ₁ ± 3.4 | 32.4 ^a ₁₂ ± 2.1 | 33.6 ^a ₂ ± 1.1 | Variable |
| SK-LLA | 24.8 ^a ± 4.1 | 29.1 ^b ± 5.0 | 31.2 ^a ± 1.9 | 33.0 ^a ± 1.7 | Steady |
| best samples for trapping at each FT cycle | SK-LLA | SK-LLA SK-ELA | SK-LLA SK-ELA | SK-LLA SK-ELA | |

Generally speaking, after the FT cycles, the amount of carvacrol in the syneresis liquid from PS gels was significantly higher than the one of SK gels. Higher values of carvacrol in the syneresis liquid indicate a lower stability of trapping. Thus, the addition of a small quantity of KGM (0.2% w/w) improved the stability of the starch gel submitted to FT cycles.

The addition time of carvacrol had also an effect on the stability of the trapping. In fact, for PS-LLA and SK-LLA, trapping of carvacrol remained fairly stable regardless of the number of FT cycles. On the contrary, for PS-ELA and SK-ELA, trapping of carvacrol varied with the number of FT cycles. It can be concluded that the addition of carvacrol at the end of heating in a potato starch gel seems to favour the stability of carvacrol trapping.

However, after four FT cycles, the highest quantity of carvacrol in the syneresis liquid was obtained from PS-LLA (1.5 times higher than the one from SK-LLA). The suspensions with the lowest amount of carvacrol in the syneresis liquid were the suspensions containing KGM. It can be concluded that both the addition of a small quantity of KGM (0.2% w/w) and the addition of carvacrol at the end of heating in a potato starch gel seem to favour the stability of carvacrol trapping.

In order to understand the relationships between the stability of trapping, the presence of KGM, and the addition of carvacrol at the end of the process, it was necessary to study the physical stability of the gels. For that purpose, we used several techniques at different levels of observation: the macroscopic level was studied through the pasting properties of suspensions and the percentage of syneresis liquid; the microscopic level was studied through

the microstructure of samples using SEM. Texture features analysis was done on SEM data in order to quantify the microstructure of the samples.

3.2 Physical stability of the gels : macroscopic scale

3.2.1 Pasting properties

The effect of KGM and of carvacrol on the pasting properties was presented in table 2.

As no significant differences in the pasting temperature were found, it can be concluded that adding a small quantity of KGM and / or carvacrol to a potato starch suspension did not disrupt the speed of the potato starch swelling.

Table 2: Pasting values of potato starch suspensions (PS) and potato starch-konjac glucomannan suspensions (SK) for each freeze-thaw cycle. Ligands were added either before heating (ELA) or during the plateau at 60°C (LLA). Mean values in each column with different superscripts (a-c) are significantly different at $p < 0.05$ using Fisher t-test.

| Sample | Pasting temperature (°C) | Peak (mPa.s) | Setback (mPa.s) | Final viscosity (mPa.s) |
|--------|--------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| PS | 71.1 ± 0.3 | 1106 ^a ± 15 | 143 ^{bc} ± 19 | 948 ^a ± 10 |
| SK | 70.8 ± 0.4 | 1789 ^b ± 33 | 124 ^a ± 5 | 1183 ^b ± 6 |
| PS-ELA | 71.2 ± 0.5 | 1086 ^a ± 4 | 158 ^d ± 10 | 962 ^a ± 9 |
| PS-LLA | 71.2 ± 0.3 | 1095 ^a ± 18 | 145 ^{cd} ± 15 | 937 ^a ± 13 |
| SK-ELA | 71.2 ± 0.4 | 1760 ^b ± 21 | 129 ^{ab} ± 7 | 1213 ^b ± 8 |
| SK-LLA | 71.0 ± 0.5 | 1778 ^b ± 16 | 128 ^a ± 9 | 1180 ^b ± 13 |

Higher values for peak viscosity and for final viscosity were obtained in all samples containing KGM. In a previous study, Lafarge et al., (2014) have shown that, due to the high water holding capacity of KGM, peak viscosities and final viscosities were significantly higher for SK suspensions than for PS suspensions. This result might be due either to a thickening effect from KGM or to the interactions between KGM and swollen particles during the re-association of starch molecules (Rojas, Rosell et al., 1999). Additionally, the addition of aroma compounds did not modify viscosity profiles for PS and SK.

The association between starch molecules during cooling is commonly referred to as the setback. It involves retrogradation (early-stage retrogradation), or re-ordering, of the starch

molecules inducing network formation (entanglements and/or junction zone formation) (Cozzolino, 2016). Setback is used as an indicator of potential starch retrogradation. Typically, starch presenting higher setback values could have a greater tendency for retrogradation and consequently syneresis (Pongsawatmanit and Srijunthongsiri, 2008). The addition of KGM resulted in a significant decrease in the setback value. This decrease should imply a reduction in retrogradation (decreasing of syneresis) and an improvement in FT stability.

However, according to Chantaro and al. (Chantaro, Pongsawatmanit et al., 2013), as setback parameter is obtained from the difference between the final viscosity and the minimum viscosity after pic viscosity, the decreasing of setback with the addition of hydrocolloid did not necessarily indicate a reduced retrogradation, but may also be caused by a higher viscosity of the system.

3.2.2 *Syneresis*

Syneresis of potato starch gels, with and without KGM, with and without carvacrol was measured after the four FT cycles. Data were reported in table 3. Syneresis occurred in all the studied samples.

After the first FT cycle, PS showed a syneresis of 26.8 %. The syneresis increased dramatically and significantly during the third FT cycle (52.2 %). After that, the value remained steady. SK behaved differently. Syneresis was not varying significantly according to the FT cycles. These results are in accordance with the ones of Charoenrein & Preechathamwong (2012). These authors have shown that adding 0.3 % KGM reduced syneresis of freeze-thawed rice starch gels. It has been hypothesized that the effects of hydrocolloids in the reduction of syneresis are due to the retardation of the amylose retrogradation and to an increase in the viscosity of the gels.

However, after the first and second FT cycles, the presence of KGM (0.2 % w/w) increased significantly the percentage of syneresis liquid. From the third cycle, the syneresis obtained for SK was significantly lower than the one for PS.

During the retrogradation step, the molecule chains of amylose get organized in double helices and form a crystalline network around the amylopectin molecules, which get organized in turn. Because amylose chains are linear, recrystallization is a fast process, lasting no more than few hours. The rapid crystallization of amylose molecules is followed by a slow crystallization of amylopectin molecules which requires several weeks (Miles, Morris et al., 1985). As multiple FT cycles are known to drastically accelerate retrogradation, four FT cycles could mimic long term storage (related with long term retrogradation of amylopectin) and one FT cycle could mimic short term storage (related with short term retrogradation of amylose). These results may indicate that KGM promotes amylose retrogradation but decreased amylopectine retrogradation. The stability during a long storage of PS gels can be

improved by the addition of a small quantity of KGM (0.2% w/w), resulting in decreasing retrogradation. This result is in accordance with the literature (Funami, Kataoka et al., 2005; Xu, Zhong et al., 2012). These authors concluded that thermodynamic incompatibility between corn starch and KGM led to a mutual exclusion. Due to the phase separation, the local concentration of amylose became relatively higher, resulting in more short-term retrogradation. This effect was probably due to the high viscosity of KGM too. KGM inhibited the association between starch granules, thus delaying the starch gel retrogradation induced by freeze-thaw treatment (Charoenrein, Tatirat et al., 2010). These results may suggest that KGM has a ‘cryoprotectant’ behaviour and could be effective in preserving quality in freeze–thaw starch gels.

Table 3: Amount of syneresis liquid of potato starch suspensions (PS) and potato starch-konjac glucomannan suspensions (SK) for each freeze-thaw cycle. Ligands were added either before heating (ELA) or during the plateau at 60°C (LLA). Mean values in each column with different superscripts (a-c) are significantly different at $p < 0.05$ using Fisher t-test. Means values in each row with different superscripts (1-4) are significantly different at $p < 0.05$ using Fisher t-test.

| Sample | Syneresis liquid (%) | | | | Stability samples after 4 th FT cycles |
|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--|---------------------------------------|---|
| | Cycle 1 | Cycle 2 | Cycle 3 | Cycle 4 | |
| PS | 26.8 ^c ₁ ± 5.3 | 33.2 ^c ₁ ± 1.9 | 52.2 ^a ₂ ± 3.9 | 54.8 ^{ab} ₂ ± 1.2 | ↘↘↘ |
| SK | 49.3 ^{ab} ± 8.3 | 43.3 ^a ± 6.6 | 40.0 ^d ± 4.1 | 41.7 ^c ± 6.9 | → |
| PS-ELA | 49.0 ^{ab} ₁ ± 3.3 | 56.5 ^b ₂ ± 2.0 | 62.2 ^c ₃ ± 2.6 | 61.0 ^a ₂₃ ± 1.9 | ↘↘ |
| PS-LLA | 44.7 ^a ₁ ± 6.5 | 55.8 ^b ₂ ± 1.0 | 58.6 ^{bc} ₂ ± 0.1 | 56.5 ^a ₂ ± 1.6 | ↘↘ |
| SK-ELA | 48.8 ^a ₂ ± 3.5 | 57.2 ^b ₁ ± 2.9 | 54.5 ^{ab} ₁₂ ± 2.7 | 56.0 ^a ₁ ± 3.3 | ↘ |
| SK-LLA | 42.6 ^a ₁ ± 2.7 | 43.8 ^a ₁ ± 2.6 | 51.3 ^a ₂ ± 3.1 | 49.1 ^b ₂ ± 2.8 | ↘ |
| The most stable unflavoured samples | PS | PS | SK | SK | |
| At each FT cycle | | | | | |
| The most stable flavoured samples | PS-LLA | SK-ELA | SK-LLA | SK-LLA | |
| At each FT cycle | SK-LLA | SK-LLA | | | |

PS-ELA and PS-LLA behaved the same way as PS. After the first cycle, the percentage of syneresis range between 44.7 % and 49 %. Then syneresis increased significantly from the

third FT cycle (62.2 %) for PS-ELA and from the second FT cycle (58.6 %) for PS-LLA. After that, the value remained steady. The syneresis values of PS-ELA and PS-LLA were significantly higher than that of PS until the third cycle. At the fourth FT cycle, the syneresis values obtained for PS, PS-LLA and PS-ELA were not significantly different. These results indicate that the stability of PS gels is decreased by the addition of carvacrol. The effects of aroma compound on the retrogradation of starch have been widely studied with high concentration of aroma compound. At food concentration (2 mmol/mol glucose, equivalent concentration used in this present study), Arvisenet & Cayot (2001) and Lafarge, Bard, Breuvert, Doublier & Cayot (2008) demonstrated respectively by texture measurements and by dynamic viscoelastic measurements that aroma compound delayed the retrogradation of corn starch dispersions. These results are consistent with the findings of Tietz (1997). This author studied the influence of tapioca starch-aroma interactions at low menthone concentration at several observation scales: molecular, microstructure and macrostructure. A low aroma compound concentration, typical for food products, can trigger structural rearrangements occurring during starch retrogradation and then modify syneresis of starch gels.

In contrast, SK-LLA and SK-ELA had a different behaviour of SK. The results displaying the values of syneresis liquid percent varied depending on the FT cycles. The syneresis liquid values of SK-ELA and SK-LLA were significantly higher than those of SK from the third cycle. Focusing on all flavoured samples, after four FT cycles, the syneresis liquid for SK-LLA represents 49.1 %, while for the other samples containing carvacrol, values were included between 56 % and 61 %. Consequently, SK-LLA is the suspension showing the most physical stability.

These results are in accordance with pasting properties reported above. In our experimental conditions, the setback value was a good indicator for predicting starch retrogradation after four FT cycles.

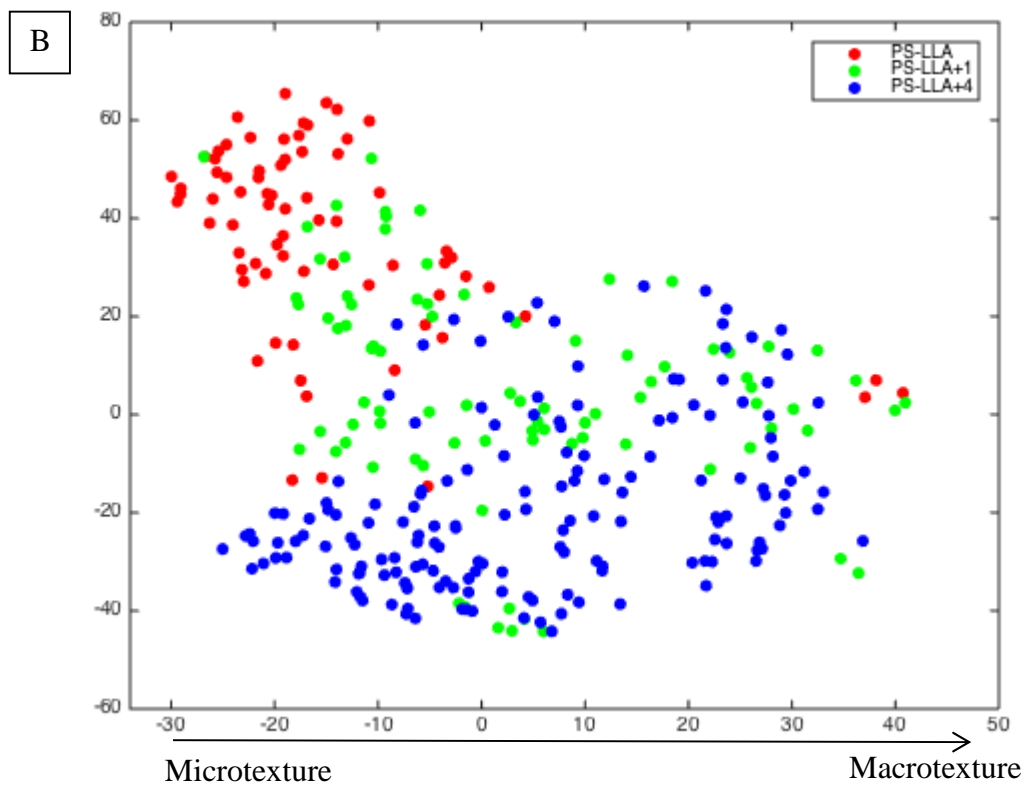
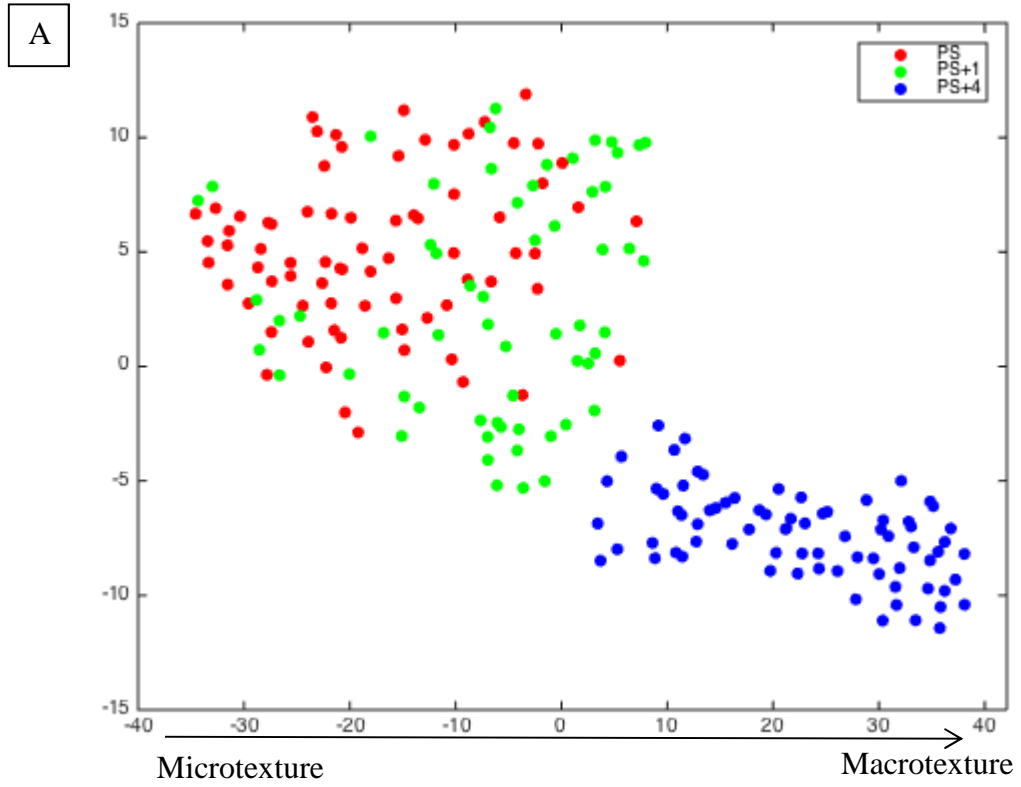
To understand why SK-LLA was the suspension with the best physical stability and the best trapping stability, the microstructure of studied suspensions was examined.

3.3 Physical stability of the gels: microscopic scale

Freschi et al. (Freschi, Doran et al., 2014) reported a comparative study on the morphology of wheat and potato starch gels by SEM or by ESEM (Environmental Scanning Electron Microscopy). Their results confirmed that conventional sample preparation for SEM analysis did not alter the structure of the gels and allowed a higher detailed view of the sample, in comparison with ESEM.

In the present study, clear differences of microstructure were observed between unfrozen gels and frozen gels (figure 1). All freeze-thawed starch gels developed a spongy structure which can be attributed to ice crystal formation (observed as cavities in micrographs) and starch retrogradation that was accelerated by FT-cycles. These results were consistent with those reported by several authors (Ferrero, Martino et al., 1994; Charoenrein, Tatirat et al., 2010; Charoenrein and Preechathamwong, 2012).

Data processing was done on images of unfrozen gels and gels submitted at several FT cycles, as described in the material and methods part, and the texture features obtained were presented in figure 3. The interpretation of these graphs is based on the position of points and the distance between the points. The points which are located in a same cluster have a similar texture. Clear differences were observed in the texture features of PS, SK, PS-LLA, SK-LLA gels (unfrozen, after one FT cycle, and after four FT cycles).



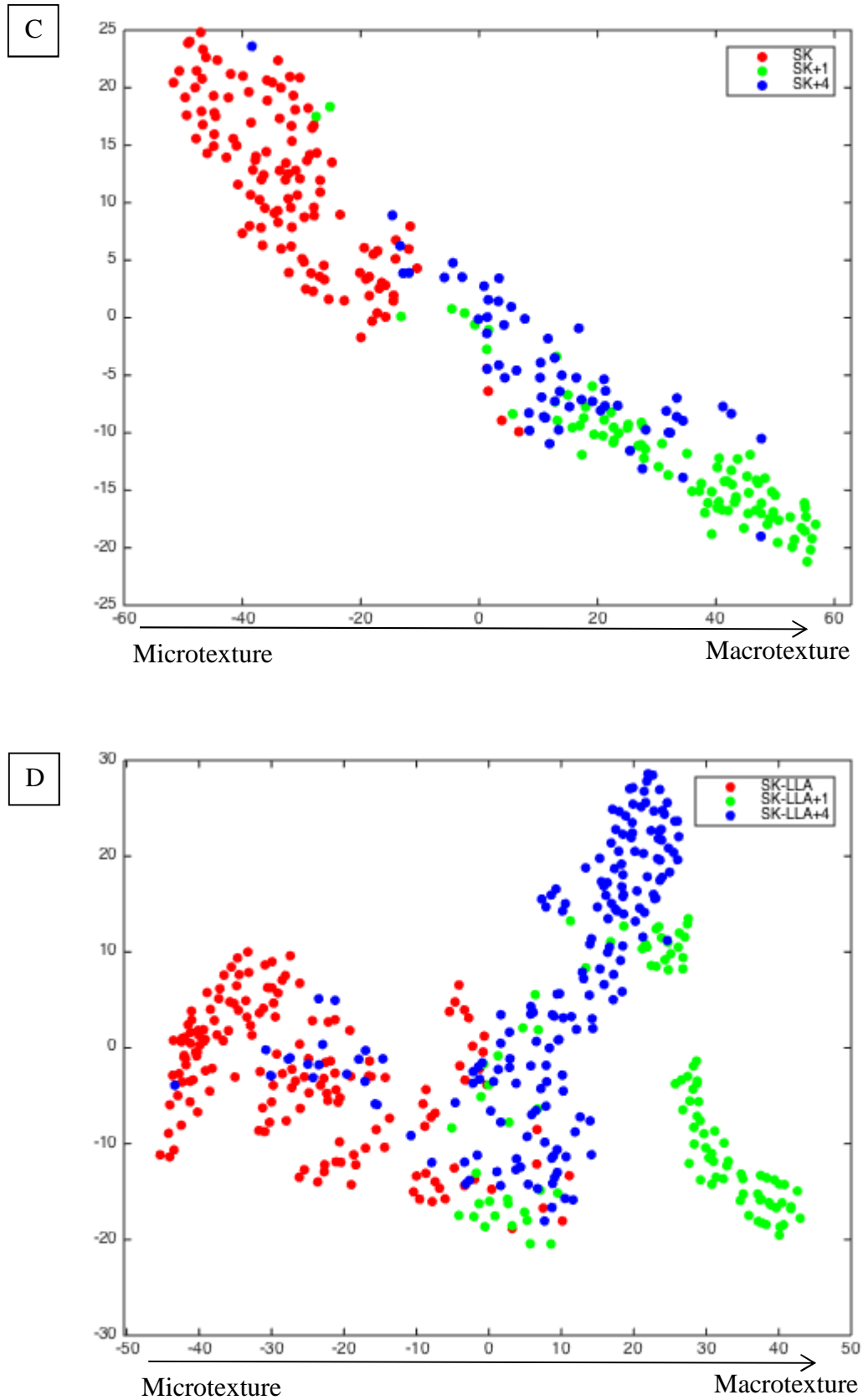


Figure 3: Projection 2D of components of Multi-Scale Jensen-Shannon embedding analysis. Effect of freeze-thaw cycles on texture features of PS (A), PS-LLA (B), SK (C) and SK-LLA (D). Red colour: unfrozen gel, Green colour: gel after one freeze-thaw cycle, Blue colour: gel after four freeze-thaw cycles.

For PS suspensions (figure 3A), three distinct classes were obtained. The 3D projection confirmed these three distinct clusters (data not shown). The texture features evolved logically according to the FT cycles. The texture features of unfrozen gel (PS) described a microtexture, namely a smooth and uniform texture. After four FT cycles, the texture features of frozen gel (PS+4) described a macrotexture, namely a granular and heterogeneous texture. The texture of gels obtained after one FT cycle (PS+1) had intermediate texture features between these two counterparts. This evolution of the texture feature correlated closely with the obtained increase in syneresis. It is clear that each FT cycle impacted on the gel structure, this is connected to ice crystallization. Indeed, the repeating of FT cycle reinforced the phase separation and ice growth, which created cavities in the gel network during freezing and these holes were also re-enlarged during thawing. As the ice crystals become larger, the syneresis liquid increased.

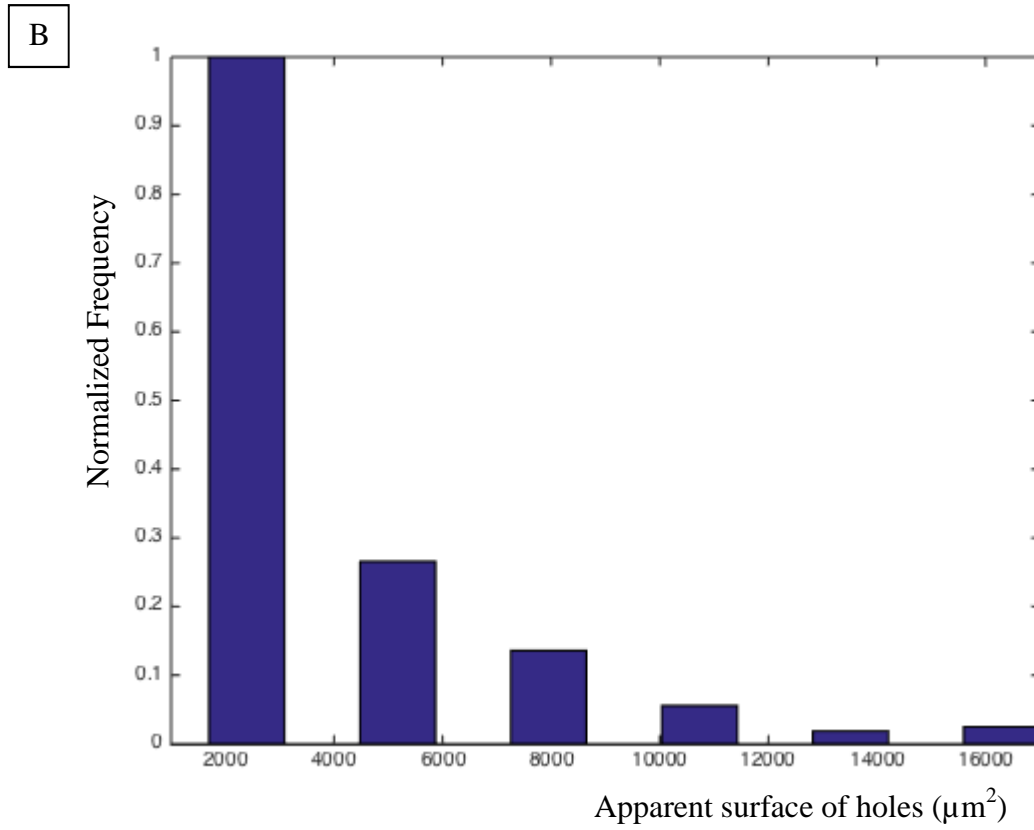
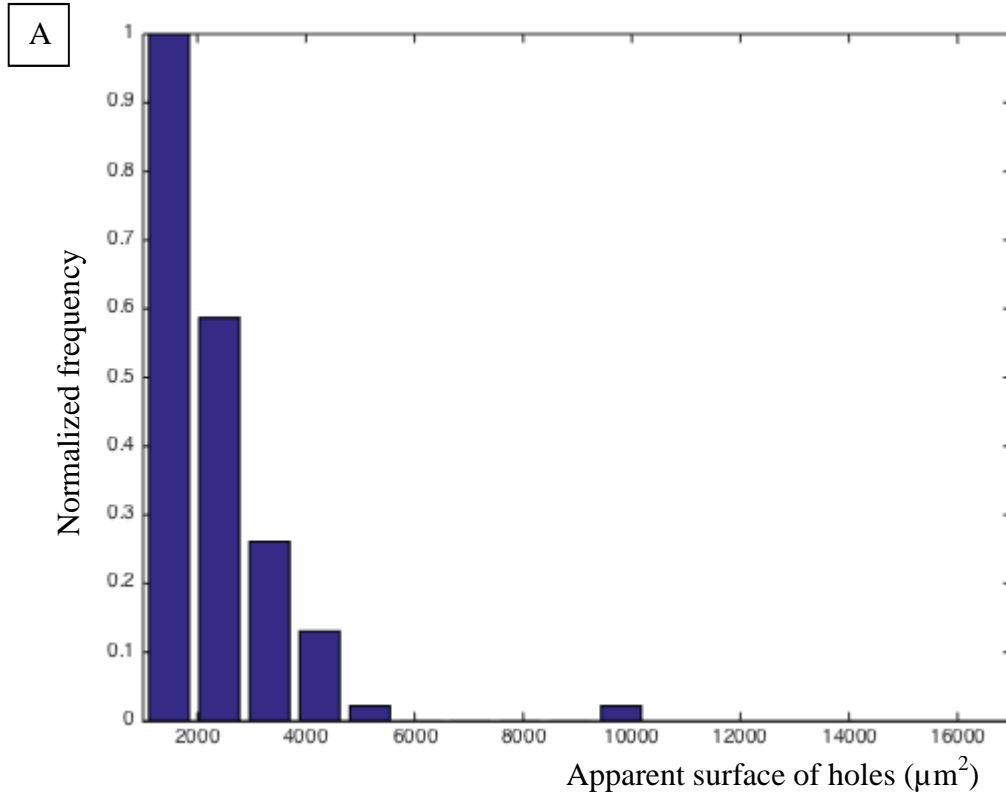
The addition of carvacrol to a PS gel had impacted negatively the texture features of frozen gels (figure 3B). In fact, the distribution of points corresponding to one FT cycle (PS-LLA+1) and to four FT cycles (PS-LLA+4) were more scattered than PS+1 and PS+4. This dispersion described a heterogeneous texture. The addition of carvacrol modified the texture features of the starch gel and decreased his physical stability. These findings confirmed the results of syneresis.

At the opposite, the addition of KGM to a PS gel did not modify the texture features of unfrozen and frozen gel of PS (Figure 3C). Three clusters were observed. The distribution of points of SK, SK+1, SK+4 seemed closer than PS, PS+1, PS+4 (figure 3A) meaning that in each cluster with KGM, the texture was more homogeneous. These structural findings were correlated well with the insignificant changes in syneresis found after 1 to 4 FT cycles for SK and confirmed the cryoprotectant behaviour of KGM.

The texture features of unfrozen SK-LLA and frozen SK-LLA noted SK-LLA+1 and SK-LLA+4 on figure 3D sum up the dual effect of carvacrol and of KGM. The distribution of points of each cluster is more dispersed for SK (figure 3C) but less pronounced for PS-LLA (figure 3D). The texture features of SK-LLA+4 were intermediate between those of SK+4 characterized by a microtexture (namely homogeneous) and those of PS-LLA reflecting a macrotexture (namely heterogeneous).

A comparison of the texture features of all unfrozen gels used in this study has been performed and no difference could be highlighted (data not shown).

The standardized distributions of the surface of the holes within frozen gel obtained after 4 FT cycles have been performed. The holes (observed like cavities in micrographs) are the reflection of the shape and size of embedded ice crystals formed during freezing and thawing. This distribution of holes can be used as an indicator of the homogeneity of starch gels (figure 4).



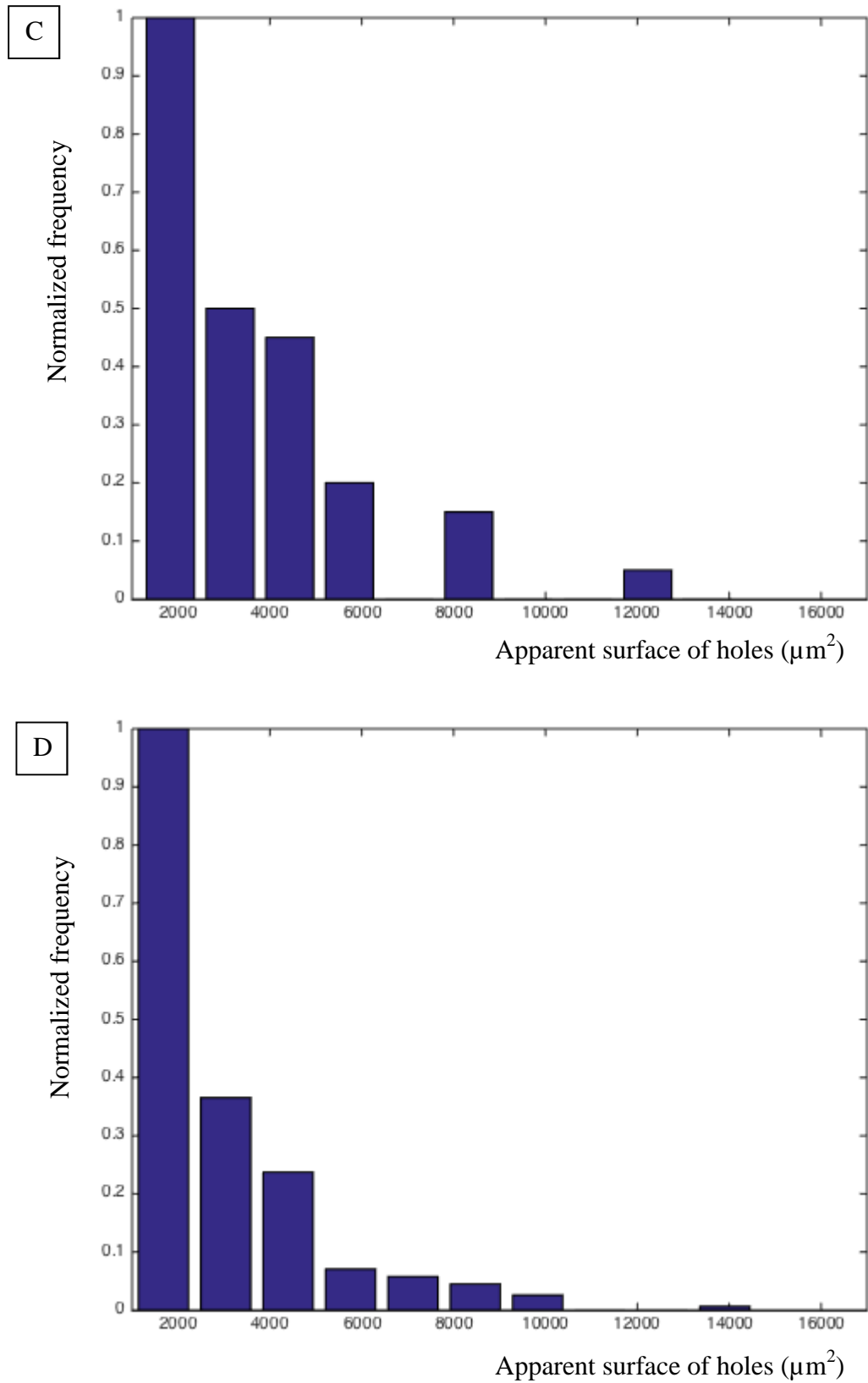


Figure 4: Normalized histogram of the surface of the holes distribution within the gel after four freeze-thaw cycles. (A) PS, (B) PS-LLA, (C) SK, (D) SK-LLA.

In PS gel after 4 FT cycles (PS+4), the surface distribution of the holes was quite homogeneous (figure 4A). Indeed, the microtexture of PS was characterised by a population of holes ranging from 1000 to 2000 μm^2 , and less than 30% of the holes with higher projected surface. The PS gels had a smooth and uniform microstructure. The FT cycles triggered the rearrangement of amylose and amylopectin chains, reinforced the separation phase and ice growth and that homogeneously.

PS-LLA +4 presented a surface distribution of the holes (figure 4B) characterised by larger holes: mainly holes of 2000 μm^2 and less than 30% of holes with higher projected surfaces. These results revealed that ice formation was more marked by the presence of carvacrol which indicated the destabilizing effect with carvacrol as discussed previously. The formation of big ice crystals promoted the separation phase and the concentration of starch-rich regions. It could be assumed that carvacrol promoted starch retrogradation as evidenced by the high syneresis and the large ice crystals formed.

The surface distribution of the holes of SK+4 was more heterogeneous than the one of PS, with 50% holes of 2000 μm^2 and 50% of holes of higher dimensions (figure 4C). This distribution showed that KGM has perturbed the arrangement of amylose and amylopectin chains during retrogradation. Logically, larger holes should accelerate the syneresis. Nevertheless, these larger holes were not correlated with increase in syneresis. In fact, as pointed out earlier, when KGM was added in PS gel, the syneresis liquid of starch gel decreased. This decrease may be attributed to an increase of the intracellular and intermolecular hydrogen bindings, to a phase separation or to an interaction between KGM and amylose molecules (BeMiller, 2011; Chen, Fu et al., 2015). It may also be related to the high water holding capacity of KGM. Higher values for peak viscosity and final viscosity in RVA measurement were observed. So the water-holding capacity of KGM allowed retaining water during FT cycles. KGM hindered the harmful effect from FT cycles on PS by reducing syneresis and thus improve the freeze-thaw stability of starches. However, the ice crystal formation was not prevented.

The surface distribution of the holes of SK-LLA+4 (figure 4D) was less heterogeneous than the one of SK+4 (figure 4C), with about 60% holes of 2000 μm^2 and less than 40% of holes of higher dimensions (figure 4D). The addition of the ligand, which induced the complexation led the amylose and amylopectin chains to adopt a given structure, limiting the KGM action in its disruptive role in the arrangement of amylose and amylopectin chains during retrogradation. The comparison between the surface distribution of PS-LLA + 4 (figure 4B) and SK-LLA+4 (figure 4D) show that the addition of KGM in the system induced the formation of bigger holes (less than 30% of holes bigger than 2000 μm^2 for PS-LLA, to be compared with less than 40% of holes bigger than 2000 μm^2 for SK-LLA), but in the same time, very large holes (above 1200 μm^2) were presents in PS-LLA and not in SK-LLA. Then,

it can be concluded that the presence of KGM prevents the formation of the biggest ice crystals within the matrices containing carvacrol.

4. Conclusions

The KGM, added in a very low quantity (0.2 %) into a PS gel, has shown its efficiency as an agent to ensure the physical stability of the gel subjected to repeated FT cycles. This phenomenon could be explained by the result of the KGM water-holding capacity and by the competition for water between KGM and starch. This minor addition of KGM (0.2 %) was also effective to ensure the stability of carvacrol trapping.

The Image processing by Generalized Fourier Descriptors was used to provide an accurate means of obtaining texture features on starchy gels and a better understanding of their microstructure. The addition of carvacrol reduced the physical stability of the gel with larger pores and increased syneresis. Furthermore, the addition of KGM increased the pore size but prevented the formation of very large pores and therefore reduced the syneresis.

This study showed that addition of KGM into PS gels and the addition of carvacrol at the end of heating of the suspensions were the best conditions to ensure the physical stability of the gels and the stability of carvacrol trapping. The practical utility of this study can be found in the formulation of frozen food products, especially when modified starches cannot be used.

References

- Arivazhagan, S., Ganesan, L., & Priyal, S. P. (2006). Texture classification using Gabor wavelets based rotation invariant features. *Pattern Recognition Letters*, 27, 1976-1982.
- Arvisenet, G., & Cayot, N. (2001). Influence of aroma compounds on large deformation properties of starch-based systems during agging. *Journal of Texture Studies*, 32, 185-203.
- Arvisenet, G., Le Bail, P., Voilley, A., & Cayot, N. (2002). Influence of physicochemical interactions between amylose and aroma compounds on the retention of aroma in food-like matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 7088-7093.
- BeMiller, J. N. (2011). Pasting, paste, and gel properties of starch-hydrocolloid combinations. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 386-423.
- Ben Arfa, A., Combes, S., Prezosi-Belloy, L., Gontard, N., & Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 149-154.
- Burt, S. (2004). Essential oils : Their antibacterial properties and potential applications in food - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- Chantaro, P., Pongsawatmanit, R., & Nishinari, K. (2013). Effect of heating-cooling on rheological properties of tapioca starch paste with and without xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 183-194.
- Charoenrein, S., & Preechathamwong, N. (2012). Effect of waxy rice flour and cassava starch on freeze-thaw stability of rice starch gels. *Carbohydrate Polymers*, 90, 1032-1037.
- Charoenrein, S., Tatirat, O., Rengsutti, K., & Thongngam, M. (2010). Effect of konjac glucomannan on syneresis, textural properties and the microstructure of frozen rice starch gel. *Carbohydrate Polymers*, 83, 291-296.
- Chen, H.-m., Fu, X., & Luo, Z.-g. (2015). Effect of gum arabic on freeze-thaw stability, pasting and rheological properties of tapioca starch and its derivatives. *Food Hydrocolloids*, 51, 355-360.

- Conde-Petit, B., Escher, F., & Nuessli, J. (2006). Structural features of starchflavor complexation in food model systems. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 227-235.
- Cooley, J. W., & Tukey, J. W. (1965). An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series. *Mathematics of computation*, 19, 297-301.
- Cozzolino, D. (2016). The use of the rapid visco analyser (RVA) in breeding and selection of cereals. *Journal of Cereal Science*, 70, 282-290.
- Ferrero, C., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (1994). Corn starch-xanthan gum interaction and its effect on the stability during storage of frozen gelatinized suspensions. *starch*, 46, 300-308.
- Freschi, J., Doran, L., Malumba, P., & Blecker, C. (2014). Impact of freezing and thawing processes on wheat and potato starch gel syneresis. *starch*, 66, 208-215.
- Funami, T., Kataoka, Y., Omoto, T., Goto, Y., Asai, I., & Nishinari, K. (2005). Effects of non-ionic polysaccharides on the gelatinization and retrogradation behavior of wheat starch. *Food Hydrocolloids*, 19(1), 1-13.
- Gauthier, J.-P., Bornard, G., & Silberman, M. (1991). Motions and pattern analysis: harmonic analysis on motion groups and their homogeneous spaces. *Systems, Man and Cybernetics, IEEE Transactions on*, 21, 159–172.
- Huang, M., Kennedy, J. F., Li, B., Xu Xiao, & Xie B.J. (2007). Characters of rice starch gel modified by gellan, carrageenan, and glucomannan: A texture profile analysis study. *Carbohydrate Polymers*, 69, 411-418.
- Hughes, G. P. (1968). On the mean accuracy of statistical pattern recognizers. *Information Theory, IEEE Transactions on*, 14, 55-63.
- Jouquand, C., Ducruet, V., & Le Bail, P. (2006). Formation of amylose complexes with C6-aroma compounds in starch dispersions and its impact on retention. *Food Chemistry*, 96, 461-470.
- Journaux, L., Simon, J.-C., Destain, M. F., Cointault, F., Miteran, J., & Piron, A. (2011). Plant leaf roughness analysis by texture classification with generalized Fourier descriptors in a dimensionality reduction context. *Precision Agriculture*, 12, 345-360.
- Katsuraya, K., Okuyama, K., Hatanaka, K., Oshima, R., Sato, T., & Matsuzaki, K. (2003). Constitution of konjac glucomannan: chemical analysis and ¹³C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 53(2), 183-189.
- Khanna, S., & Tester, R. F. (2006). Influence of purified konjac glucomannan on the gelatinisation and retrogradation properties of maize and potato starches. *Food Hydrocolloids*, 20, 567-576.
- Lafarge, C., Bard, M. H., Breuvert, A., Doublier, J. L., & Cayot, N. (2008). Influence of the Structure of Cornstarch Dispersions on Kinetics of Aroma Release. *Journal of Food Science*, 73(2), S104-S109.
- Lafarge, C., Cayot, N., Hory, C., Goncalves, L., Chassefont, C., & Le Bail, P. (2014). Effect of konjac glucomannan addition on aroma release in gels containing potato starch. *Food Research International*, 64, 412 - 419.
- Lee, J. A., Peluffo-Ordóñez, D. H., & Verleysen, M. (2015). Multi-scale similarities in stochastic neighbour embedding: Reducing dimensionality while preserving both local and global structure. *Neurocomputing*, 169, 246–261.
- Lee, J. A., Renard, E., Bernard, G., Dupont, P., & Verleysen, M. (2013). Type 1 and 2 mixtures of Kullback–Leibler divergences as cost functions in dimensionality reduction based on similarity preservation. *Neurocomputing*, 112, 92-108.
- Lee, J. A., & Verleysen, M. (2007). *Nonlinear dimensionality reduction*: Springer Science & Business Media.
- Miles, M. J., Morris, V. J., Orford, P. D., & Ring, S. G. (1985). The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydrate Research*, 135(2), 271-281.
- Morris, V. J. (1990). Starch gelation and retrogradation. *Trends in Food Science & Technology*, 1, 2-6.
- Muadklay, J., & Charoenrein, S. (2008). Effects of hydrocolloids and freezing rates on freeze–thaw stability of tapioca starch gels. *Food Hydrocolloids*, 22, 1268–1272.
- Pongsawatmanit, R., & Srijunthongsiri, S. (2008). Influence of xanthan gum on rheological properties and freeze–thaw stability of tapioca starch. *Journal of Food Engineering*, 88(1), 137–143.
- Rojas, J. A., Rosell, C. M., & Benedito de Barber, C. (1999). Pasting properties of different wheat flour-hydrocolloid systems. *Food Hydrocolloids*, 13(1), 27-33.
- Schwartz, J. M., Le Bail, K., Garnier, C., Llamas, G., Queveau, D., Pointoire, B., szrednicki, G., & Le Bail, P. (2014). Available water in konjac glucomannan-starch mixtures. Influence on the gelatinization, retrogradation and complexation properties of two starches *Food Hydrocolloids*, 41, 71-78.
- Serra, J. (1982). *Image analysis and mathematical morphology*, v. 1: Academic press.
- Smach, F., Lemaître, C., Gauthier, J.-P., Miteran, J., & Atri, M. (2008). Generalized Fourier descriptors with applications to objects recognition in SVM context. *Journal of Mathematical Imaging and Vision*, 30, 43-71.
- Tietz, M. (1997). *Starch-flavour interactions : impact on flavour retention and release in model food systems*. PhD, ETH, Zurich.

- Tuceryan, M., Jain, A. K., & others. (1993). Texture analysis. *Handbook of pattern recognition and computer vision*, 2, 207–248.
- Venna, J., Peltonen, J., Nybo, K., Aidos, H., & Kaski, S. (2010). Information retrieval perspective to nonlinear dimensionality reduction for data visualization. *Journal of Machine Learning Research*, 11, 451-490.
- Xu, Z., Zhong, F., Li, Y., Shoemaker, C. F., Yokoyama, W. H., & Xia, W. (2012). Effect of polysaccharides on the gelatinization properties of cornstarch dispersions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 658–664.
- Yoshimura, M., Takaya, T., & Nishirani, K. (1997). Rheological studies on mixtures of corn starch and konjac glucomannan. *Carbohydrate Polymers*, 35, 71-79.
- Zhou, Y., Wang, D., Zhang, L., Du, X., & Zhou, X. (2008). Effect of polysaccharides on gelatinization and retrogradation of wheat starch. *Food Hydrocolloids*, 22, 505-512.

Supplementary data

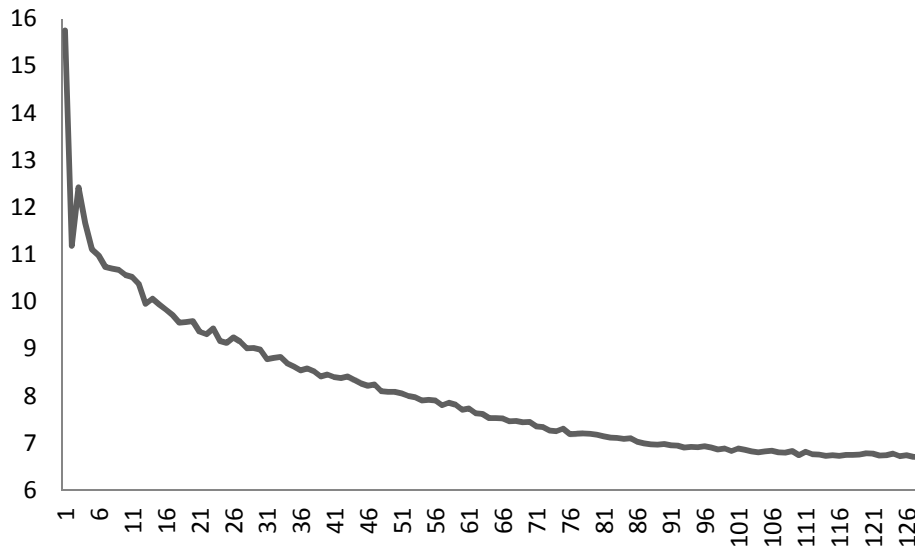


Figure 1: Example of a Generalized Fourier Descriptor feature

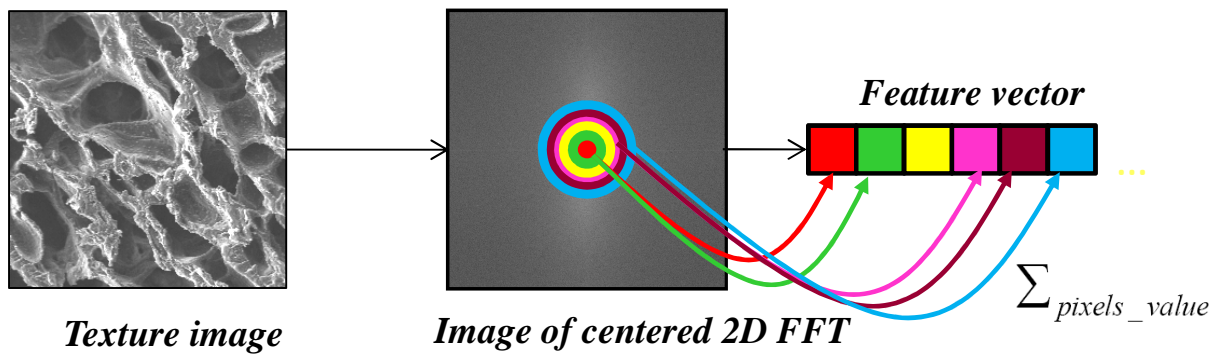


Figure 2: Procedure to find GFD texture feature

Commentaires synthétiques de la publication III :

3.1 Étude de la stabilité du piégeage du carvacrol par la matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac

La stabilité du piégeage du carvacrol a été évaluée par son dosage dans le liquide de synérèse. Aucune décomposition du carvacrol n'a été observée sur les chromatogrammes obtenus par GCMS.

De hautes valeurs de carvacrol dosé dans le surnageant traduisaient une faible stabilité du piégeage du carvacrol. Deux paramètres influent sur la stabilité du piégeage du carvacrol : la présence de glucomannane de konjac et le moment d'ajout du carvacrol.

La quantité de carvacrol dosée dans les surnageants de PS-ELA et PS-LLA était plus élevée que celle dosée dans SK-ELA et SK-LLA. L'ajout d'une petite quantité de glucomannane de konjac (0,2 % (m/m)) améliorait la stabilité du piégeage du carvacrol.

Le moment d'ajout du carvacrol n'était pas neutre. La quantité de carvacrol piégé restait stable pour PS-LLA et SK-LLA quel que soit le nombre de cycles de congélation / décongélation contrairement à celle de PS-ELA et SK-ELA qui était faible et variait avec le cycle de congélation / décongélation. Cependant, après quatre cycles de congélation / décongélation, SK-ELA présentait une meilleure stabilité que PS-ELA.

Il en ressort de cette étude que SK-LLA présentait la meilleure stabilité de piégeage du carvacrol.

3.2 Étude de la stabilité physique de la matrice mixte amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac

À l'échelle macroscopique, la stabilité physique des gels a été étudiée par les mesures de volume de synérèse recueillis et les propriétés mécaniques des matrices par des tests de pénétrométrie. Ces derniers ne s'étaient pas montrés concluants. La succession des cycles de congélation / décongélation a formé une surface non plane des échantillons. De plus, la présence des poches d'eau dans les échantillons a rendu les tests de pénétrométrie non répétables et non exploitables. Pour contourner ce problème, deux solutions auraient pu être envisagées :

- Réaliser une précompression des échantillons avant les tests de pénétrométrie
- Démouler les échantillons et réaliser des tests d'analyse du profil de texture (TPA, Texture Profile Analysis).

Tous les échantillons, indépendamment du nombre de cycles de congélation / décongélation, ont présenté de la synérèse. De hautes valeurs de synérèse traduisaient un gel peu stable dans le temps. En effet, la succession de cycles congélation / décongélation accélèrerait la rétrogradation de l'amidon. Les associations entre les chaînes des molécules d'amidon augmentaient, expulsant l'eau, la synérèse, en dehors de la structure. Deux paramètres

influençaient la stabilité des matrices : la présence de glucomannane de konjac et la présence du carvacrol.

L'ajout de glucomannane de konjac a réduit la synérèse de PS soumis à un vieillissement accéléré. Cependant, cet effet n'était visible qu'à partir du troisième cycle de congélation / décongélation. Pour les deux premiers cycles, un effet « accélérateur de synérèse » était observé. Nos résultats ont ainsi montré que 0,2 % (m/m) de glucomannane de konjac accélèrait la rétrogradation de l'amylose, qui a lieu dans les premières heures de la rétrogradation de l'amidon et ralentissait la rétrogradation de l'amylopectine, qui se déroule sur plusieurs jours voire plusieurs semaines. Cet effet serait dû aux modifications physicochimiques de la phase continue (viscosité, fraction volumique) en présence de glucomannane de konjac. En effet, selon nos résultats précédents, en présence de glucomannane de konjac, l'amylose est concentrée dans la phase continue, favorisant les interactions amylose-amylose et donc la rétrogradation de l'amylose. Par contre la présence du glucomannane de konjac dans la phase continue inhibe l'association des fantômes des grains d'amidon et ralentit donc la rétrogradation de l'amylopectine. Ces résultats semblent prometteurs en vue d'application du glucomannane de konjac pour préserver au long terme la qualité des aliments surgelés à base d'amidon.

PS-ELA et PS-LLA présentaient des volumes de synérèse nettement plus importants que ceux de PS. Le carvacrol a donc diminué la stabilité physique des gels d'amidon et accentué la rétrogradation de l'amidon. Nos résultats sont en accord avec la littérature. Néanmoins, l'effet des composés d'arôme sur la rétrogradation de l'amidon varie. En effet, Cayot, Lafarge et al (2000) ont montré lors d'un vieillissement accéléré (24 heures à -26°C, puis 24 heures à température ambiante) par des tests de pénétration que la rétrogradation de l'amidon de maïs standard était ralentie en présence d'acétate d'isoamyle (composé d'arôme non complexant). Suite à un vieillissement naturel pendant 28 jours à 6°C, l'étude des mêmes matrices d'amidon de maïs standard aromatisées avec de l'acétate d'isoamyle, de l'octanol (complexe avec l'amylose de type V6II) ou du linalol (complexe avec l'amylose de type V6III), par analyse rhéologique en mode dynamique, a également montré que la présence de l'acétate d'isoamyle ou de l'octanol ralentissait la rétrogradation de l'amidon de maïs standard (Reparet, Moine et al., 2006). Par contre, aucun impact du linalol sur la rétrogradation du gel d'amidon de maïs standard n'a été mis en évidence.

Les volumes de synérèse recueillis pour SK-ELA et SK-LLA variaient selon les cycles de congélation / décongélation et étaient supérieurs à SK à partir du troisième cycle de congélation / décongélation.

En conclusion de l'étude de la stabilité physique des matrices, sur les quatre matrices testées, SK-LLA est la matrice présentant la meilleure stabilité physique après quatre cycles de congélation / décongélation.

Pour comprendre pourquoi SK-LLA était la matrice présentant la meilleure stabilité physique et la meilleure stabilité de piégeage du carvacrol, une analyse microscopique (MEB) a été

réalisée. L'analyse des images MEB par la transformée de Fourier a clairement mis en évidence l'effet des cycles de congélation / décongélation, du carvacrol et du glucomannane de konjac sur les caractéristiques texturales de surface des échantillons.

Après 4 cycles de congélation / décongélation, PS présentait des propriétés texturales de surface hétérogène mais avec des surfaces de pores homogènes et petites. La surface des pores reflète la taille et la forme des cristaux de glace formés lors des cycles de congélation / décongélation. L'hétérogénéité de la surface des échantillons reflète l'effet des congélations successives, ce qui est en accord avec l'augmentation du volume de synérèse observé. Par contre, SK présentait une texture plus homogène que PS ce qui est en accord avec les résultats de la différence de stabilité physique entre PS et SK. La distribution de la surface des pores était plus hétérogène pour SK. Cette distribution reflète l'effet néfaste du glucomannane de konjac sur l'organisation des chaînes d'amylose et d'amylopectine lors de la rétrogradation. Or, la présence de grande surface de pore n'est pas corrélée avec une augmentation de synérèse. La forte capacité de rétention d'eau du glucomannane de konjac a permis d'assurer la stabilité physique des gels lors du vieillissement accéléré en limitant l'apparition de synérèse sans empêcher la formation de gros cristaux de glace. Ce résultat est en accord avec l'étude de Ni, Ke et al, (2016). Les auteurs ont montré que, dans une matrice constituée d'un mélange d'amidon de pomme de terre (5 % m/v), d'hydroxypropylméthylcellulose (1,4 % m/v), de carraghénane (0,3 % m/v), de pectine (0,4 % m/v), d'agar (0,5 % m/v), la présence de 0,3 % (m/v) ou 0,5 % (m/v) de glucomannane de konjac limitait la formation de gros cristaux de glace. Par contre, cet effet n'était pas visible avec un ajout de 0,1 % de (m/v) de glucomannane de konjac.

PS-LLA présentait une surface nettement plus hétérogène que PS, avec de larges surfaces de pores. Ces résultats révèlent que la formation de glace était plus marquée en présence de carvacrol. Ceci conforte nos observations précédentes de l'effet néfaste du carvacrol sur la stabilité physique de PS-ELA et PS-LLA. Dans nos conditions expérimentales, le carvacrol avait un effet déstabilisant se traduisant par des volumes de synérèse importants.

La comparaison des caractéristiques texturales de surface de PS-LLA avec celle de SK-LLA a montré que ces deux matrices avaient des surfaces de pores importantes mais que la présence du glucomannane de konjac limitait la taille de ces pores. Ceci explique pourquoi la matrice SK-LLA présente une stabilité physique et une stabilité de piégeage du carvacrol supérieures par rapport aux trois autres matrices de l'étude (PS-ELA, PS-LLA, SK-ELA).

Cette étude de la stabilité du piégeage du carvacrol dans le temps a été réalisée en choisissant des conditions drastiques : les cycles de congélation/décongélation. Ces derniers ont accéléré la rétrogradation de l'amidon qui a été d'autant plus amplifiée que la vitesse de congélation appliquée était faible. Les résultats obtenus déterminent les limites de stabilité des échantillons. Afin de valider si les tests de vieillissement accélérés peuvent être des tests fiables prédictifs de la stabilité des échantillons, une étude de la stabilité des échantillons en vieillissement « normal » serait intéressante à réaliser.

L'hypothèse N°2 est vérifiée : l'ajout de glucomannane de konjac améliore la stabilité physique des matrices à base d'amidon de terre et la stabilité du piégeage des composés d'arôme.

L'ajout de 0,2 % (m/m) de glucomannane de konjac à une suspension d'amidon de pomme de terre (5 %) a permis d'assurer une stabilité du piégeage du carvacrol par l'amidon de pomme de terre. Cette stabilité du piégeage du carvacrol est liée à la stabilité physique des matrices amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac. En effet, la présence du glucomannane de konjac :

- accélère la rétrogradation de l'amylose mais ralentit celle de l'amylopectine lors d'un vieillissement accéléré par des cycles de congélation / décongélation. Ce phénomène est lié aux modifications physicochimiques (viscosité, fraction volumique) de la phase continue en présence de glucomannane de konjac.
- limite le volume de synérèse. Le glucomannane de konjac n'empêche pas la formation de cristaux de glace, par contre il limite leur grossissement. Cette piste serait intéressante à approfondir.

La matrice SK-LLA présente une stabilité physique et une stabilité de piégeage du carvacrol supérieures par rapport aux trois autres matrices de l'étude (PS-ELA, PS-LLA, SK-ELA).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était de démontrer que la présence de glucomannane de konjac dans une matrice d'amidon de pomme de terre permet d'accroître sa stabilité physique sans inhiber l'encapsulation moléculaire de composés d'arôme par l'amylose.

La première phase du travail a consisté à caractériser la matrice amidon - glucomannane de konjac avant l'ajout de composés d'arôme. Dans la matrice « amidon de pomme de terre - glucomannane de konjac » étudiée, la gélatinisation et la rétrogradation de l'amidon de pomme de terre ont eu lieu. Cependant, une très faible quantité de glucomannane de konjac (0,2 % (m/m)) a suffi pour perturber la gélatinisation et la rétrogradation de l'amidon de pomme de terre. La présence de glucomannane de konjac a engendré une matrice moins bien structurée où les grains d'amidon de pomme de terre sont moins gonflés avec pour conséquence une diminution de la solubilisation de l'amylose. Le glucomannane de konjac est présent dans la phase continue de la matrice. En raison de sa présence et de son fort pouvoir de rétention d'eau, un effet de concentration de l'amylose solubilisée dans la phase continue a été observé. Cette matrice mixte amidon - glucomannane de konjac peut être définie comme un gel faible.

Dans un deuxième temps, des composés d'arôme ont été ajoutés à la matrice afin de comprendre l'influence des paramètres : présence de glucomannane de konjac, moment d'ajout des composés d'intérêts, sur la formation des complexes amylose – ligand. Les résultats de notre étude permettent d'affirmer que l'encapsulation moléculaire de composés d'arôme par l'amylose d'amidon de pomme de terre en présence d'une faible quantité de glucomannane de konjac (0,2 % (m/m)) a été possible. La formation de complexes a été mise en évidence avec le carvacrol. Cependant l'ajout de glucomannane de konjac a perturbé modérément l'établissement de l'encapsulation moléculaire du carvacrol. La signature de ces complexes carvacrol - amylose est de type V6III, c'est-à-dire que le carvacrol se situerait en inter et intra - hélice de l'amylose.

L'établissement des complexes amylose - carvacrol est dépendante des conditions expérimentales et du temps. La formation de complexes avec l'hexanoate d'éthyle n'a pas été mise en évidence. Ce résultat est contraire à la littérature, néanmoins les conditions expérimentales comme la vitesse d'agitation utilisée, étaient différentes. Ainsi, dans notre étude, la vitesse d'agitation appliquée semble ne pas être suffisante pour ce composé volatil 2,6 fois moins soluble dans l'eau que le carvacrol. Dans les matrices contenant uniquement de l'amidon de pomme de terre, le moment d'ajout de la molécule d'intérêt est un facteur déterminant. Un ajout du carvacrol en fin de process paraît grandement faciliter l'encapsulation moléculaire par l'amylose. L'utilisation du propylène glycol comme solvant support du carvacrol a favorisé également la formation de complexes carvacrol - amylose. Dans nos conditions expérimentales, le propylène glycol ne forme pas de complexes avec l'amylose.

Les matrices présentant le meilleur piégeage du carvacrol immédiatement après le traitement thermomécanique et 24 heures plus tard sont :

- PS-LLA (matrice amidon de pomme de terre, ajout du carvacrol en fin de process, 65 % \pm 2 %) en raison des fortes interactions physicochimiques entre le carvacrol et l'amylose
- SK-LLA (matrice amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac, ajout du carvacrol en fin de process, 68 % \pm 3 %) en raison de l'augmentation de la viscosité de la phase continue limitant la mobilité du carvacrol et en raison, dans une moindre mesure, de la présence d'interactions physicochimiques entre le carvacrol et l'amylose.

Puis dans un troisième temps, la stabilité du piégeage du carvacrol a été étudiée. Pour cette étude, le choix a été fait de conserver les matrices à l'état de gels ou de solutions épaisses. L'étude la stabilité du piégeage du carvacrol par une matrice amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac a montré que cette stabilité était liée à la stabilité physique des matrices amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac. L'ajout de 0,2 % (m/m) de glucomannane de konjac a permis d'assurer :

- la stabilité physique dans le temps de la suspension d'amidon de pomme de terre à 5 % (m/m) soumise à un vieillissement accéléré par des cycles répétés de congélation / décongélation. Il a été observé, lors d'un vieillissement accéléré par des cycles de congélation / décongélation, que la rétrogradation de l'amylose a été accélérée mais que celle de l'amylopectine a été ralentie. Ce phénomène est lié aux modifications physicochimiques (viscosité, fraction volumique) de la phase continue en présence de glucomannane de konjac. De plus, en raison de sa forte capacité de rétention d'eau, le volume de synérèse est limité.
- la stabilité du piégeage du carvacrol en raison de la stabilité physique des matrices.

Parmi toutes les matrices de l'étude, la matrice présentant la meilleure stabilité physique et la meilleure stabilité du piégeage du carvacrol est la matrice SK-LLA (matrice amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac, ajout du carvacrol en fin de process).

En conclusion, parmi toutes les matrices de cette étude, SK-LLA (matrice mixte amidon de pomme de terre – glucomannane de konjac, ajout du carvacrol en fin de process) présente tous les critères positifs et prometteurs pour assurer une bonne protection du carvacrol, efficace et stable dans le temps.

L'état de l'art sur le glucomannane de konjac a mis en évidence son potentiel en tant que matériau d'encapsulation de composés aromatisants. Cette étude nous a permis d'étoffer les connaissances sur les interactions entre le glucomannane de konjac et les composés volatils. Selon nos conditions expérimentales, le glucomannane de konjac ne forme pas d'interactions

spécifiques avec les composés d'arôme. Par contre, la rétention des composés volatils au sein d'une matrice de glucomannane de konjac dépend de leurs propriétés physicochimiques. En effet, les esters testés sont retenus en raison de la forte viscosité de la solution de glucomannane de konjac, limitant la mobilité et la volatilité des composés d'arôme. Par contre, pour le carvacrol présentant un log P plus élevé que les esters de l'étude, un effet « salting-out » a été observé dans la suspension de glucomannane de konjac. Ces différents comportements demandent à être approfondis et l'on peut se demander si ces résultats sont dus à un effet compétitif avec l'eau ou à une conformation particulière du glucomannane de konjac. Nous sommes en droit de nous demander si la chaîne linéaire du glucomannane de konjac est capable également de prendre une forme hélicoïdale pouvant interagir avec les molécules volatiles.

Le glucomannane de konjac a eu la faculté de limiter la synérèse. Lors de cycles répétés de congélation / décongélation, le glucomannane de konjac n'empêche pas la formation de cristaux de glace, par contre il limite leur grossissement. Ce comportement mimant celui des cryoprotecteurs conventionnels semble intéressant à approfondir.

Enfin, il serait intéressant de déterminer la température basse limite à laquelle l'ajout de ligand en fin de traitement thermique peut être réalisé. En effet, plus cette température est basse, plus cela est favorable à l'encapsulation de molécules d'intérêt thermosensibles. Deux axes peuvent être envisagés : l'utilisation d'amidon pré-gélatinisé et/ou la modification des paramètres du traitement thermomécanique.

Une autre perspective à ce travail serait d'étudier la libération des molécules d'intérêt. Deux modes de libération peuvent être envisagés :

- la libération par diffusion passive, qui présente l'inconvénient de ne pas permettre de contrôler le taux de libération de molécules d'intérêt
- la libération par dégradation suite à une hydrolyse enzymatique ou acide.

Suite à la libération, il serait intéressant de vérifier si le carvacrol, qui, en plus de ses propriétés aromatisantes, a des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, a conservé ces fonctionnalités.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ades, Kesselman, Ungar and Shimoni (2012). "Complexation with starch for encapsulation and controlled release of menthone and menthol." *LWT - Food Science and Technology* 45(2): 277–288.
2. Adrian, Potus and Frangne (1995). *La science alimentaire de A à Z*. Paris, Tec. et Doc.
3. Agoub, Smith, Giannouli, Richardson and Morris (2007). "'Melt-in-the-mouth" gels from mixtures of xanthan and konjac glucomannan under acidic conditions: A rheological and calorimetric study of the mechanism of synergistic gelation." *Carbohydrate Polymers* 69(4): 713–724.
4. Ahmadi-Abhari (2013). The role of amylose-LPC inclusion complexation on the functional properties and digestibility of wheat starch. Thèse de doctorat spécialisé chimie des polymères. Groningen, University of Groningen.
5. Alam, Siddiqui, Lutfi and Hasnain (2009). "Effect of different hydrocolloids on gelatinization behaviour of hard wheat flour." *Trakia Journal of Sciences* 7(1): 1-6.
6. Albrecht, Van Muiswinkel, Xu, Schols, Voragen and Gruppen (2011). "Enzymatic production and characterization of konjac glucomannan oligosaccharides." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 12658–12666.
7. Alloncle, Lefebvre, Llamas and Doublier (1989). "A rheological characterization of cereal starch-galactomannan mixtures." *Cereal chemistry* 66: 90-93.
8. Alonso-Sande, Teijeiro-Osorio, Remuñán-López and Alonso (2009). "Glucomannan, a promising polysaccharide for biopharmaceutical purposes." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72(2): 453–462.
9. Alpendurada (2000). "Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis." *Journal of Chromatography A* 889(1-2): 3–14.
10. Alvarez-Mancenido, Braeckmans, De Smedt, Demeester, Landin and Martinez-Pacheco (2006). "Characterization of diffusion of macromolecules in konjac glucomannan solutions and gels by fluorescence recovery after photobleaching technique." *International Journal of Pharmaceutics* 316: 37–46.
11. Alvarez-Manceñido, Landin, Lacik and Martínez-Pacheco (2008). "Konjac glucomannan and konjac glucomannan/xanthan gum mixtures as excipients for controlled drug delivery systems. Diffusion of small drugs." *International Journal of Pharmaceutics* 349(1–2): 11-18.
12. Amoore and Buttery (1978). "Partition coefficients and comparative olfactometry." *Chemical Senses Flavour* 3: 57-71.
13. André Rémi de la société Setaram Instruments France. (2016). from <http://www.setaram.com/setaram-products/calorimetry/microcalorimetry/microsc/0/> consulté le 06/07/2016.
14. Arivazhagan, Ganesan and Priyal (2006). "Texture classification using Gabor wavelets based rotation invariant features." *Pattern Recognition Letters* 27: 1976-1982.
15. Aronica (2010). "La diffraction des rayons X. Principes et applications d'une méthode de caractérisation des arrangements atomiques dans les solides cristallisés." *l'Actualité Chimique* 346: 24-28.
16. Arvisenet (2001). Influence des interactions physico-chimiques entre amidons et composés d'arôme sur la libération des arômes et les propriétés rhéologiques dans des matrices aqueuses complexes. Thèse de doctorat spécialisé sciences de l'alimentation. Dijon, Université de Bourgogne.
17. Arvisenet and Cayot (2001). "Influence of aroma compounds on large deformation properties of starch-based systems during agging." *Journal of Texture Studies* 32: 185-203.
18. Arvisenet, Le Bail, Voilley and Cayot (2002). "Influence of physicochemical interactions between amylose and aroma compounds on the retention of aroma in food-like matrices." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7088-7093.
19. Athès, Peña y Lillo, Bernard, Pérez-Correa and Souchon (2004). "Comparison of Experimental Methods for Measuring Infinite Dilution Volatilities of Aroma Compounds in Water/Ethanol Mixtures." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(7): 2021–2027.
20. Atkin, Cheng, Abeysekera and Robards (1999). "Localisation of amylose and amylopectin in starch granules using enzyme-gold labelling." *Starch* 51: 163-172.
21. Aznar, Tsachaki, Linforth, Ferreira and Taylor (2004). "Headspace analysis of volatile organic compounds from ethanolic systems by direct APCI-MS." *International Journal of Mass Spectrometry* 239 (1): 17–25.
22. Bagley and Christianson (1982). "Swelling capacity of starch and its relationship to suspension viscosity-effect of cooking time, temperature and concentration." *Journal of Texture Studies* 13(1): 115-126.

23. Bahnassey and Breene (1994). "Rapid Visco-analyser (RVA) pasting profiles of wheat, corn, waxy xorn, tapioca and amaranth starches (*A. hypochondriacus* and *A. cruentus*) in the persence of konjac flour, gellan, guar, xanthan and locust bean gums." *Starch* 4: 134-141.
24. Bahrani (2012). Modication des propriétés physicochimiques de l'amidon par procédés hydrothermiques : Contribution à l'étude des transferts couplés chaleur-masse. Thèse de doctorat spécialisé génie des procédés. La rochelle, Université de La Rochelle.
25. Baker, Miles and Helbert (2001). "Internal structure of the starch granule revealed by AFM." *Carbohydrate Research* 330(2): 249-256.
26. Baranowska, Sikora, Krystyan and Tomasik (2011). "Analysis of the formation of starch - hydrocolloid binary gels and their structure based on the relaxation times of the water molecules." *Polimery* 6: 478-483.
27. Bauer, Badoud, Löliger and Etournand (2010). *Science et technologie des aliments*. Lausanne, Presses polytechniques et universitaires romandes.
28. Belingheri, Curti, Ferrillo and Vittadini (2012). "Evaluation of porous starch as a flavour carrier." *Food & Function* 3(3): 255-261.
29. Belingheri, Ferrillo and Vittadini (2015). "Porous starch for flavor delivery in a tomato-based food application." *LWT - Food Science and Technology* 60(1): 593-597.
30. Belitz and Grosch (1987). *Food Chemistry*. Berlin, Springer-Verlag.
31. BeMiller (2011). "Pasting, paste, and gel properties of starch-hydrocolloid combinations." *Carbohydrate Polymers* 86(2): 386-423.
32. Ben Arfa, Combes, Prezosi-Belloy, Gontard and Chalier (2006). "Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure." *Letters in Applied Microbiology* 43: 149-154.
33. Bertoft, Annor, Shen, Rumpagaporn, Seetharaman and Hamaker (2016). "Small differences in amylopectin fine structure may explain large functional differences of starch." *Carbohydrate Polymers* 140: 113-121.
34. Bhosale and Ziegler (2010). "Preparation of spherulites from amylose-palmitic acid complexes." *Carbohydrate Polymers* 80(1): 53-64.
35. Biaï (2006). Etude structurale et mécanismes de formation de complexes amylose-ligand. Influence sur la rétention de composés d'arôme dans une matrice amylacée. Thèse de doctorat spécialisé sciences des aliments. Nantes, Université de Nantes.
36. Biaï, Le Bail, Robert, Pontoire and Buléon (2006). "Structural and stoichiometric studies of complexes between aroma compounds and amylose. Polymorphics transitions and quantification in amorphous and crystalline areas." *Carbohydrate Polymers* 66: 306-315.
37. Bien manger. (2016). from <http://www.shirataki-konjac.com/guide-du-konjac/les-differentes-formes-de-konjac/> (consulté le 25/05/2016).
38. Biliaderis, Arvanitoyannis, Izdorczyk and Prokopowich (1997). "Effect of hydrocolloids on gelatinization and structure formation in concentrated waxy maize and wheat starch gels." *Starch* 49(7-8): 278-283.
39. Biliaderis and Galloway (1989). "Crystallization behavior of amylose-V complexes: structure-property relationships " *Carbohydrate Research* 189: 31-48
40. Biliaderis, Page, Slade and Sirett (1985). "Thermal behavior of amylose-lipid complexes " *Carbohydrate Polymers* 5: 367-389.
41. Bluhm and Zugenmaier (1981). "Detailed structure of the Vh amylose-iodine complex a linear polyiodine chain." *Carbohydrate Research* 89: 1-10.
42. Bogracheva, Morris, Ring and Hedley (1998). "The granular structure of C-type pea starch and its role in gelatinization." *Biopolymers* 45(4): 323-332.
43. Boland, Buhr, Giannouli and van Ruth (2004). "Influence of gelatin, starch, pectin and artificial saliva on the release of 11 flavour compounds from model gel systems." *Food chemistry* 86(3): 401-411.
44. Boursier (2005). "Amidons natifs et amidons modifiés alimentaires." *Techniques de l'ingénieur* F4690.
45. Boutboul, Giampaoli, Feigenbaum and Duvruet (2002). "Influence of the nature and treatment of starch on aroma retention." *Carbohydrate Polymers* 47 73-82.
46. Brisson, Chanzy and Winter (1991). "The crystal and molecular structure of VH amylose by electron diffraction analysis." *International Journal of Biological Macromolecules* 13(1): 31-39.
47. Bruce and Gill (1999). "Estimates of Precision in a Standard Additions Analysis." *Journal of Chemical Education* 76(6): 805-807.
48. Buléon, Colonna and Leloup (1990). "Les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales." *Industries Alimentaires et Agricoles Juin*: 515-531.
49. Buléon, Colonna, Planchot and Ball (1998). "Starch granules : structure and biosynthesis." *International Journal of Biological Macromolecules* 23: 85-112.

50. Buléon, Delage, Brisson and Chanzy (1990). "Single crystals of V amylose complexed with isopropanol and acetone." *International Journal of Biological Macromolecules* 12(1): 25-33.
51. Buleon, Duprat, Booy and Chanzy (1984). "Single crystals of amylose with a low degree of polymerization." *Carbohydrate Polymers* 4(3): 161-173.
52. Buléon, Pontoire, Riekkel, Chanzy, Helbert and Vuong (1997). "Crystalline Ultrastructure of Starch Granules Revealed by Synchrotron Radiation Microdiffraction Mapping." *Macromolecules* 30(13): 3952-3954.
53. Burgot and Pellerin (2003). "Microextraction en phase solide (SPME)." *Techniques de l'ingénieur* P1430.
54. Burt (2004). "Essentials oils : Their antibacterial properties and potential applications in food - A review." *International Journal of Food Microbiology* 94(3): 223-253.
55. Cardoso, Putaux, Nishiyama, Helbert, Hýtch, Silveira and Chanzy (2007). "Single Crystals of V-Amylose Complexed with α -Naphthol." *Biomacromolecules* 8(4): 1319-1326.
56. Cayot, Lafarge, Arvisenet and Taisant (2000). "Influence of aroma compounds on the mechanical properties of starch-based food systems." *Journal of Texture Studies* 31: 297-313.
57. Cayot, Lafarge, Bou-Maroun and Cayot (2016). "Substitution of carcinogenic solvent dichloromethane for the extraction of volatile compounds in a fat-free model food system." *Journal of Chromatography A* 1456: 77-88.
58. Cayot, Pretot, Doublier, Meunier and Guichard (2004). "Release of isoamyl acetate from starch pastes of various structures: thermodynamic and kinetic parameters." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5436-5442.
59. Cayot, Taisant and Voilley (1998). "Release and perception of isoamyl acetate from a starch-based food matrix." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(8): 3201-3206.
60. Chang, He and Huang (2013). "Effect of lauric acid on the V-amylose complex distribution and properties of swelled normal cornstarch granules." *Journal of Cereal Science* 58(1): 89-95.
61. Chantaro, Pongsawatmanit and Nishinari (2013). "Effect of heating-cooling on rheological properties of tapioca starch paste with and without xanthan gum." *Food Hydrocolloids* 31(2): 183-194.
62. Charoenrein and Preechathamwong (2012). "Effect of waxy rice flour and cassava starch on freeze-thaw stability of rice starch gels." *Carbohydrate Polymers* 90: 1032-1037.
63. Charoenrein, Tatirat and Muadklay (2008). "Use of centrifugation-filtration for determination of syneresis in freeze-thaw starch gels." *Carbohydrate Polymers* 73(1): 143-147.
64. Charoenrein, Tatirat, Rengsutti and Thongngam (2010). "Effect of konjac glucomannan on syneresis, textural properties and the microstructure of frozen rice starch gel." *Carbohydrate Polymers* 83: 291-296.
65. Chen, Fu and Luo (2015). "Effect of gum arabic on freeze-thaw stability, pasting and rheological properties of tapioca starch and its derivatives." *Food Hydrocolloids* 51: 355-360.
66. Chen, Schols and Voragen (2003). "Physicochemical Properties of Starches Obtained from Three Varieties of Chinese Sweet Potatoes." *Journal of Food Science* 68(2): 431-437.
67. Chin, Keeton, Longnecker and Lamkey (1998). "Low-fat Bologna In A Model System With Varying Types And Levels Of Konjac Blends." *Journal of Food Science* 63(5): 808-813.
68. Christianson, Hodge, Osborne and Detroy (1981). "Gelatinization of wheat starch as modified by xanthan gum, guar gum, and cellulose gum." *Cereal chemistry* 58(6): 513 - 517.
69. Chromoptic. (2016). from <http://www.chromoptic.com/fr/boutique/microextraction-phase-solide> (consulté le 05/07/2016).
70. Chua, Baldwin, Hocking and Chan (2010). "Traditional uses and potential health benefits of Amorphophallus konjac K. Koch ex N.E.Br." *Journal of Ethnopharmacology* 28(2): 268-278.
71. Cohen, Orlova, Kovalev, Ungar and Shimoni (2008). "Structural and functional properties of amylose complexes with genistein." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 4212-4218.
72. Conde-Petit, Escher and Nuessli (2006). "Structural features of starch-flavor complexation in food model systems." *Trends in Food Science & Technology* 17 (5): 227-235.
73. Cooley and Tukey (1965). "An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series." *Mathematics of computation* 19: 297-301.
74. Cozzolino (2016). "The use of the rapid visco analyser (RVA) in breeding and selection of cereals." *Journal of Cereal Science* 70: 282-290.
75. Crosbie, Ross and (2007). *The RVA handbook*. St. Paul, U.S., AACC International.
76. Crouzet (1998). "Arômes alimentaires." *Techniques de l'ingénieur* F4100.
77. Da Silva, De Souza Ferreira, Bruschi, Britten and Toshimi Matumoto-Pintro (2016). "Effect of commercial konjac glucomannan and konjac flours on textural, rheological and microstructural properties of low fat processed cheese." *Food Hydrocolloids* 60: 308-316.

78. De Roos (1994). Physicochemical models of flavour release from foods. Flavour release. ACS symposium series 763. D. D. Roberts and A. J. Taylor. Washington, American Chemical society: 126-141.
79. Delgado-Pando, Cofrades, Rodríguez-Salas and Jiménez-Colmenero (2011). "A healthier oil combination and konjac gel as functional ingredients in low-fat pork liver pâté." *Meat Science* 88(2): 241-248.
80. DGCCRF (2006). Arômes alimentaires. Ministère de l'économie des finances et de l'industrie. Conférence, Marseille.
81. Dorthe (2005). Caractérisation de farines et de glucomannanes de konjac selon l'origine botanique et le procédé de fabrication-purification : composition des farines, structure moléculaire fine des glucomannanes et propriétés rhéologiques. Thèse de doctorat spécialisé chimie moléculaire structurale. Grenoble, Université Joseph Fourier-Grenoble 1.
82. Doublier (1981). "Rheological Studies on Starch-Flow Behaviour of Wheat Starch Pastes." *Starch* 33(12): 415-420.
83. Doublier (1987). "A rheological comparison of wheat, maize, faba bean and smooth pea starches." *Journal of Cereal Science* 5: 247-262.
84. Doublier, Llamas and Le Meur (1987). "A rheological investigation of cereal starch pastes and gels. Effect of pasting procedures." *Carbohydrate Polymers* 7(4): 251-275.
85. Dries, Gomand, Delcour and Goderis (2016). "V-type crystal formation in starch by aqueous ethanol treatment: The effect of amylose degree of polymerization." *Food Hydrocolloids* 61: 649-661.
86. Dubal (2016). Native starches-dextrines for food application. Société Roquette. Formation ingénieur AgroSup Dijon, 3^{ième} année.
87. Eliasson (1985). "Starch Gelatinization in the Presence of Emulsifiers. A Morphological Study of Wheat Starch." *Starch* 37(12): 411-415.
88. Eliasson and Krog (1985). "Physical properties of amylose-monoglyceride complexes." *Journal of Cereal Science* 3(3): 239-248.
89. Eliasson and Ljunger (1988). "Interactions between amylopectin and lipid additives during retrogradation in a model system." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 44: 353-361.
90. Escher, Nuessli and Conde-Petit (2000). Interactions of flavour compounds with starch in food processing. Flavor release. American Chemical Society. New Orleans. 763: 230-245.
91. Ettre, Welter and Kolb (1993). "Determination of gas-liquid partition coefficients by automatic equilibrium headspace-gas chromatography utilizing the phase ratio variation method." *Chromatographia* 35(1): 73-84.
92. Evans (1986). "An investigation of starch-surfactant interactions using viscosimetry and differential scanning calorimetry." *Starch* 38(7): 227-235.
93. Exarhopoulos and Raphaelides (2012). "Morphological and structural studies of thermally treated starch-fatty acid systems." *Journal of Cereal Science* 55(2): 139-152.
94. Fang and Wu (2004). "Variations of Konjac glucomannan from *Amorphophallus konjac* and its refined powder in China." *Food Hydrocolloids* 18: 167-170.
95. Fernandez and Cabrol-Bass (2007). "Analyse des arômes." *Techniques de l'ingénieur* p3233.
96. Ferrero, Martino and Zaritzky (1994). "Corn starch-xanthan gum interaction and its effect on the stability during storage of frozen gelatinized suspensions." *Starch* 46: 300-308.
97. Freschi, Doran, Malumba and Blecker (2014). "Impact of freezing and thawing processes on wheat and potato starch gel syneresis." *Starch* 66: 208-215.
98. Funami, Kataoka, Omoto, Goto, Asai and Nishinari (2005). "Effects of non-ionic polysaccharides on the gelatinization and retrogradation behavior of wheat starch." *Food Hydrocolloids* 19: 1-3.
99. Gallant, Bouchet and Baldwin (1997). "Microscopy of starch: Evidence of a new level of granule organization." *Carbohydrate Polymers* 32: 177-191.
100. Gauthier, Bornard and Silberman (1991). "Motions and pattern analysis: harmonic analysis on motion groups and their homogeneous spaces." *Systems, Man and Cybernetics, IEEE Transactions on* 21: 159-172.
101. Godet, Tran, Delage and Buléon (1993). "Molecular modelling of the specific interactions involved in the amylose complexation by fatty acids." *International Journal of Biological Macromolecules* 15(1): 11-16.
102. Goesaert, Brijs, Veraverbeke, Courtin, Gebruers and Delcour (2005). "Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality." *Trends in Food Science & Technology* 16(1-3): 12-30.
103. Golovnya, Yuryev, Kalistratova, Wasserman, Terenina, Krikunova and Misharina (2001). "Thermodynamic characteristics of supramolecular complexes of aroma compounds with ordered

- structures of polysaccharides of corn starch and its cryotextures." *Russian Chemical Bulletin* 50(2): 300-303.
104. Gouin (2004). "Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends." *Trends in Food Science & Technology* 15(7–8): 330-347.
105. Grenet and Legendre (2010). "Analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC)." *Techniques de l'ingénieur* P1205.
106. Gudmundsson and Eliasson (1990). "Retrogradation of amylopectin and the effects of amylose and added surfactants/emulsifiers." *Carbohydrate Polymers* 13: 295–315.
107. Gwenola and Fernand (2003). "Microextraction en phase solide (SPME)." *Techniques de l'ingénieur* P1430.
108. Hansson A., Andersson J., Leufvén A and Pehrson K. (2001). "Effect of changes in pH on the release of flavour compounds from a soft drink-related model system." *Food Chemistry* 4: 429-435.
109. Harrisson and Hills (1997). "Mathematical model of flavour release from liquids containing aroma binding macromolecules." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 1883-1890.
110. Haziza and Deleporte (2014). *Introduction à la Diffraction par Rayon X*. ENS Cachan, document pédagogique.
111. Heinemann, Escher and Conde-Petit (2003). "Structural features of starch–lactone inclusion complexes in aqueous potato starch dispersions: the role of amylose and amylopectin." *Carbohydrate Polymers* 51 (2): 159–168.
112. Heinemann, Zinsli, Renggli, Escher and Conde-Petit (2005). "Influence of amylose–flavor complexation on build-up and breakdown of starch structures in aqueous food model systems." *LWT - Food Science and Technology* 38: 885–894.
113. Helbert (1994). *Données sur la structure du grain d'amidon et des produits de recristallisation de l'amylose*. Thèse de doctorat spécialisé sciences biologiques et fondamentales appliquées. Genoble I, University Joseph Fourier.
114. Helbert and Chanzy (1994). "Single crystals of V amylose complexed with n-butanol or n-pentanol: structural features and properties." *International Journal of Biological Macromolecules* 16: 207-213.
115. Hoa, Micheau, Gahide, Le Bars and Taourel (2007). *L'IRM Pas Pas* (Edition Noir & Blanc). Montpellier, Campus medica.
116. Hoover and Hadziyev (1981). "Characterization of potato starch and its monoglyceride complexes." *Starch* 33(9): 290-300.
117. Hsein-Chih and Sarko (1978). "The double-helical molecular structure of crystalline b-amylose." *Carbohydrate Research* 61(1): 7-25.
118. Hsien-Chih and Sarko (1978). "The double-helical molecular structure of crystalline a-amylose." *Carbohydrate Research* 61(1): 27-40.
119. Huang, Kennedy, Li, Xu Xiao and Xie B.J. (2007). "Characters of rice starch gel modified by gellan, carrageenan, and glucomannan: A texture profile analysis study." *Carbohydrate Polymers* 69: 411-418.
120. Hughes (1968). "On the mean accuracy of statistical pattern recognizers." *Information Theory, IEEE Transactions on* 14: 55-63.
121. Imberty, Buléon, Tran and Pérez (1991). "Recent Advances in Knowledge of Starch Structure." *Starch* 43(10): 375-384.
122. Imberty, Chanzy, Pérez, Buléon and Tran (1988). "The double-helical nature of the crystalline part of A-starch." *Journal of Molecular Biology* 201(2): 365-378.
123. Imberty and Perez (1988). "A revisit to the three-dimensional structure of B-type starch." *Biopolymers* 27(8): 1205-1221.
124. Imberty and Pérez (1989). "Conformational analysis and molecular modelling of the branching point of amylopectin." *International Journal of Biological Macromolecules* 11(3): 177-185.
125. Immel and Lichtenthaler (2000). "The hydrophobic topographies of amylose and its blue iodine complex." *Starch* 52(1): 1-8.
126. Itthisoponkul, Mitchell, Taylor and Farhat (2007). "Inclusion complexes of tapioca starch with flavour compounds." *Carbohydrate Polymers* 69: 106–115.
127. Jacky (2013). "Microscopie électronique à balayage : principe et équipement." *Techniques de l'ingénieur* P865.
128. Jarvis and Walker (1993). "Simultaneous, Rapid, Spectrophotometric determination of Total Starch, Amylose and Amylopectin." *Journal Science of Food Agricultural* 63: 53-51.
129. Jenkins and Donald (1995). "The influence of amylose on starch granule structure." *International Journal of Biological Macromolecules* 17(6): 315-321.
130. Jianrong, Donghua, Szrednicki, Kanlayanarat and Borompichaichartkul (2009). *A simplified method of purifying konjac glucomannan*, International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium.

131. Jiménez-Colmenero, Cofrades, Herrero, Fernández-Martín, Rodríguez-Salas and Ruiz-Capillas (2012). "Konjac gel fat analogue for use in meat products: Comparison with pork fats." *Food Hydrocolloids* 26(1): 63–72.
132. Jimenez-Colmenero, Cofrades, Herrero, Solasb and Ruiz-Capillas (2013). "Konjac gel for use as potential fat analogue for healthier meat product development: Effect of chilled and frozen storage." *Food Hydrocolloids* 30(1): 351-357.
133. Joël (2006). "Rhéologie, texture et texturation des produits alimentaires." *Techniques de l'ingénieur* F3300.
134. Jouquand, Aguni, Malhiac and Grisel (2008). "Influence of chemical composition of polysaccharides on aroma retention." *Food Hydrocolloids* 22(6): 1097-1104.
135. Jouquand, Ducruet and Giampaoli (2004). "Partition coefficients of aroma compounds in polysaccharide solutions by the phase ratio variation method." *Food Chemistry* 85: 467-474.
136. Jouquand, Ducruet and Le Bail (2006). "Formation of amylose complexes with C6-aroma compounds in starch dispersions and its impact on retention." *Food chemistry* 96(461-471).
137. Journal officiel de l'Union européenne (2008a). Règlement (UE) N°1333/2008 sur les additifs alimentaires.
138. Journal officiel de l'Union européenne (2008b). Règlement (UE) N°1334/2008 du parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008 relatif aux arômes et à certains ingrédients alimentaires possédant des propriétés aromatisantes qui sont destinés à être utilisés dans et sur les denrées alimentaires et modifiant le règlement (CEE) no 1601/91 du Conseil, les règlements (CE) no 2232/96 et (CE) no 110/2008 et la directive 2000/13/CE.
139. Journal officiel de l'Union européenne (2011a). Règlement (UE) N°1129/2011 de la commission du 11 novembre 2011 modifiant l'annexe II du règlement (CE) N°1333/2008 du Parlement européen et du Conseil en vue d'y inclure une liste de l'Union des additifs alimentaires.
140. Journal officiel de l'Union européenne (2011b). Règlement (UE) N°1169/2011 du parlement européen et du conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires, modifiant les règlements (CE) N°1924/2006 et (CE) N°1925/2006 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant la directive 87/250/CEE de la Commission, la directive 90/496/CEE du Conseil, la directive 1999/10/CE de la Commission, la directive 2000/13/CE du Parlement européen et du Conseil, les directives 2002/67/CE et 2008/5/CE de la Commission et le règlement (CE) N° 608/2004 de la Commission.
141. Journal officiel de l'Union européenne (2012a). Règlement (UE) N°231/2012 de la commission du 9 mars 2012 établissant les spécifications des additifs alimentaires énumérés aux annexes II et III du règlement (CE) no 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil.
142. Journal officiel de l'Union européenne (2012b). Règlement (UE) N°432/2012 de la commission du 16 mai 2012 établissant une liste des allégations de santé autorisées portant sur les denrées alimentaires, autres que celles faisant référence à la réduction du risque de maladie ainsi qu'au développement et à la santé infantiles.
143. Journal officiel de l'Union européenne (2015). Règlement (UE) 2015/647 de la commission du 24 avril 2015 modifiant et rectifiant les annexes II et III du règlement (CE) N°1333/2008 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne l'utilisation de certains additifs alimentaires.
144. Journaux, Simon, Destain, Cointault, Miteran and Piron (2011). "Plant leaf roughness analysis by texture classification with generalized Fourier descriptors in a dimensionality reduction context." *Precision Agriculture* 12(3): 345-360.
145. Kalichevsky and Ring (1987). "Incompatibility of amylose and amylopectin in aqueous solution." *Carbohydrate Research* 162(2): 323-328.
146. Katsuraya, Okuyama, Hatanaka, Oshima, Sato and Matsuzaki (2003a). "Constitution of konjac glucomannan: chemical analysis and ¹³C NMR spectroscopy." *Carbohydrate Polymers* 53(2): 183-189.
147. Katsuraya, Okuyama, Hatanaka, Oshima, Sato and Matsuzakic (2003b). "Constitution of konjac glucomannan: chemical analysis and ¹³C NMR spectroscopy." *Carbohydrate Polymers* 53: 183–189.
148. Keetels, van Vliet and Walstra (1996). "Gelation and retrogradation of concentrated starch systems : 1. Gelation." *Food Hydrocolloids* 10(3): 343-358.
149. Khanna and Tester (2006). "Influence of purified konjac glucomannan on the gelatinisation and retrogradation properties of maize and potato starches." *Food Hydrocolloids* 20: 567-576.
150. Kong and Ziegler (2014). "Molecular encapsulation of ascorbyl palmitate in preformed V-type starch and amylose." *Carbohydrate Polymers* 111: 256-263.
151. Kopjar, Andriot, Saint-Eve, Souchon and Guichard (2010). "Retention of aroma compounds: an interlaboratory study on the effect of the composition of food matrices on thermodynamic parameters in comparison with water (Research article)." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(8): 1285-1292.

152. Kuge and Takeo (1968). "Complexes of Starchy Materials with Organic Compounds Part II. Complex Formation in Aqueous Solution and Fractionation of Starch by l-Menthone." *Agricultural and Biological Chemistry* 32(10): 1232-1238.
153. Kugimiya and Donovan (1981). "Calorimetric study of the amylose content of starches based on formation and melting of the amylose-lysolecithin complex." *Journal of Food Science* 46: 765-777.
154. Kugimiya, Donovan and Wong (1980). "Phase Transitions of Amylose-Lipid Complexes in Starches: A Calorimetric Study." *Starch* 32(8): 265-270.
155. Lafarge, Bard, Breuvart, Doublier and Cayot (2008). "Influence of the structure of cornstarch dispersions on kinetics of aroma release." *Journal of Food Science* 73(2): 104-109.
156. Lafarge, Cayot, Hory, Goncalves, Chassefont and Le Bail (2014). "Effect of konjac glucomannan addition on aroma release in gels containing potato starch." *Food research international* 64: 412 - 419.
157. Landy, Courthaudon, Dubois and Voilley (1996). "Effect of Interface in Model Food Emulsions on the Volatility of Aroma Compounds." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 526-530.
158. Langourieux and Couzet (1994). "Study of aroma compounds-polysaccharides interactions by dynamic exponential dilution." *LWT - Food Science and Technology* 27(6): 544-549.
159. Le Bail, Chauvet, Simonin, Rondeau-Mouro, Pontoire, de Carvalho and Le-Bail (2013). "Formation and stability of amylose ligand complexes formed by high pressure treatment." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 18: 1-6.
160. Le Bail, Houinsou-Houssou, Kosta, Pontoire, Gore and Le Bail (2015). "Molecular encapsulation of linoleic and linolenic acids by amylose using hydrothermal and high-pressure treatments." *Food Research International* 67: 223-229.
161. Le Bail, Rondeau and Buléon (2005). "Structural investigation of amylose complexes with small ligands: Helical conformation, crystalline structure and thermostability." *International Journal of Biological Macromolecules* 35: 1-7.
162. Le Thanh, Thibeau, Thibaut and Voilley (1992). "Interactions between volatile and non-volatile compounds in the presence of water." *Food chemistry* 43(2): 129-135.
163. Lee, Baek, Cha, Park and Lim (2002). "Freeze-thaw stabilization of sweet potato starch gel by polysaccharide gums." *Food Hydrocolloids* 16(4): 345-352.
164. Lee, Peluffo-Ordóñez and Verleysen (2015). "Multi-scale similarities in stochastic neighbour embedding: Reducing dimensionality while preserving both local and global structure." *Neurocomputing* 169: 246-261.
165. Lee, Renard, Bernard, Dupont and Verleysen (2013). "Type 1 and 2 mixtures of Kullback-Leibler divergences as cost functions in dimensionality reduction based on similarity preservation." *Neurocomputing* 112: 92-108.
166. Lee and Verleysen (2007). *Nonlinear dimensionality reduction*, Springer Science & Business Media.
167. Lesmes, Barcheath and Shimoni (2008). "Continuous dual feed homogenization for the production of starch inclusion complexes for controlled release of nutrients." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9(4): 507-515.
168. Li, Guiltinan and Thompson (2006). "The Use of Laser Differential Interference Contrast Microscopy for the Characterization of Starch Granule Ring Structure." *Starch* 58(1): 1-5.
169. Li, Jiang, Ni, Yan, Fanga, Corkea and Xiao (2015). "Preparation and characterization of konjac glucomannan and ethyl cellulose blend films." *Food Hydrocolloids* 44: 229-236.
170. Li, Wang, Jin, Zhou and Li (2014). "Application of micronized konjac gel for fat analogue in mayonnaise." *Food Hydrocolloids* 35: 375-382.
171. Lorenzo, Munekata, Pateiro, Campagnol and Domínguez (2016). "Healthy Spanish salchichón enriched with encapsulated n-3 long chain fatty acids in konjac glucomannan matrix." *Food Research International*: In press, doi:10.1016/j.foodres.2016.1008.1012.
172. Madene (2006). *Etude des transferts d'arômes encapsulés dans une matrice alimentaire type génoise. Thèse de doctorat spécialisé procédés biotechnologiques et alimentaires. à Vandoeuvre-les-Nancy, INPL.*
173. Mestres, Nago, Akissoe and Matencio (1997). "End use quality of some African Corn Kernels. 2 Cooking behavior of whole dry-milled maize flours; incidence of storage." *Journal of Agricultural Food Chemistry* 45: 565-571.
174. Miles, Morris, Orford and Ring (1985). "The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch." *Carbohydrate Research* 135: 271-281.
175. Morris (1990). "Starch gelation and retrogradation." *Trends in Food Science & Technology* 1: 2-6.
176. Morrison, Law and Snape (1993). "Evidence for Inclusion Complexes of Lipids with V-amylose in Maize, Rice and Oat Starches." *Journal of Cereal Science* 18(2): 107-109.

177. Morrison, Tester, Snape, Law and Gidley (1993). "Swelling and gelatinization of cereal starches. IV. Some effects of lipid-complexed amylose and free amylose in waxy and normal barley starches." *Cereal Chemistry* 70(4): 385-391.
178. Mourtzinou, Kalogeropoulos, Papadakis, Konstantinou and Karathanos (2008). "Encapsulation of Nutraceutical Monoterpenes in B-Cyclodextrin and Modified Starch." *Journal of Food Science* 89-94(1): 87-.
179. Muadklay and Charoenrein (2008). "Effects of hydrocolloids and freezing rates on freeze-thaw stability of tapioca starch gels." *Food Hydrocolloids* 22: 1268-1272.
180. Murat, Gourrat, Jerosch and Cayot (2012). "Analytical comparison and sensory representativity of SAFE, SPME, and Purge and Trap extracts of volatile compounds from pea flour." *Food Chemistry* 135(3): 913-920.
181. Nakano, Takikawa and Arita (1979). "Release characteristics of dibucaine dispersed in konjac gels." *Journal of Biomedical Materials Research* 13: 811-819.
182. Nayouf (2003). Etude rhéologique et structurale de la qualité texturantes du système amidon/kappa carraghénane en relation avec le traitement thermomécanique. Thèse de doctorat spécialisé thermique, énergétique, génie des procédés. Nantes, Université de Nantes.
183. Nguyen, Lafarge, Murat, Mession, Cayot and Saurel (2014). "Partition of volatile compounds in pea globulin-maltodextrin aqueous two-phase system." *Food chemistry* 164: 406-412.
184. Ni, Ke, Xiao, Wu, Kuang, Corke and Jiang (2016). "The control of ice crystal growth and effect on porous structure of konjac glucomannan-based aerogels." *International Journal of Biological Macromolecules* 92: 1130-1135.
185. Nishinari, Williams and Phillips (1992). "Review of the physico-chemical characteristics and properties of konjac mannan." *Food Hydrocolloids* 6(2): 199-222.
186. Nongonierma, Springett, Le Quere, Cayot and Voilley (2006). "Flavour release at gas/matrix interfaces of stirred yoghurt models." *International Dairy Journal* 16(2): 102-110.
187. Norbert (1996). "Caractérisation de solides cristallisés par diffraction X." *Techniques de l'ingénieur* P1080.
188. Norme internationale ISO 1666. (1996). Amidon et fécule - Détermination de l'humidité - Méthode par séchage à l'étuve.
189. Norme internationale ISO 11357-1 (2009). Plastiques - Analyse calorimétrique différentielle (DSC) - Partie 1 : Principes généraux.
190. Nuessli (1998). Complexation behavior of amylose with small ligands in aqueous starch systems. Thèse de doctorat spécialisé sciences techniques. Zurich, ETH (École polytechnique fédérale).
191. Nuessli, Conde-Petit, Trommsdorff and Escher (1995). "Influence of starch flavor interactions on rheological properties of low concentration starch systems." *Carbohydrate Polymers* 28: 167-170.
192. Nuessli, Handschin, Conde-Petit and Escher (2000). "Rheology and structure of amylopectin potato starch dispersions without and with emulsifier addition." *starch* 52(1): 22-27
193. Nuessli, Putaux, Le Bail and Buléon (2003). "Crystal structure of amylose complexes with small ligands." *International Journal of Biological Macromolecules* 33(4-5): 227-234.
194. Olkku and Rha (1978). "Gelatinisation of starch and wheat flour starch—A review." *Food chemistry* 3(4): 293-317.
195. Osman-Ismail and Solms (1973). "The formation of inclusion compounds of starches with flavor substances." *LWT - Food Science and Technology* 6(4): 147-150.
196. Pangborn and Szczesniak (1974). "Effect of hydrocolloids and viscosity on flavor and odor intensities of aromatic flavor compounds." *Journal of Texture Studies* 4(4): 467-482.
197. Paramera, Konteles and Karathanos (2011). "Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae*, beta-cyclodextrin and modified starch." *Food Chemistry* 125: 913-922.
198. Passion céréales. (2016). "Des chiffres et des céréales, l'essentiel de la filière." from http://asset.keepeek.com/permalinks/domain39/2016/05/12/1890-B20_Des_chiffres_et_des_cereales_2016_BD.pdf (consulté le 29/05/2016).
199. Penroj, Mitchell, Hill and Ganjanagunchorn (2005). "Effect of konjac glucomannan deacetylation on the properties of gels formed from mixtures of kappa carrageenan and konjac glucomannan." *Carbohydrate Polymers* 59: 367-376.
200. Perla (2006). "Microcalorimétrie à balayage DSC Application agroalimentaire." *Techniques de l'ingénieur* P1270.
201. Planétoscope. (2016). "Production mondiale de konjac." from <http://www.planetoscope.com/cereales/1788-production-mondiale-de-konjac.html> (consulté le 25/05/2016).
202. Pongsawatmanit and Srijunthongsiri (2008). "Influence of xanthan gum on rheological properties and freeze-thaw stability of tapioca starch." *Journal of Food Engineering* 88(1): 137-143.

203. Pozo-Bayon, Biais, Rampon, Cayot and Le Bail (2008). "Influence of complexation between amylose and a flavored model sponge cake on the degree of aroma compound release." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(15): 6640–6647.
204. Raphaelides, Dimitreli, Exarhopoulos, Iliia and Koutsomihali (2015). "A process designed for the continuous production of starch inclusion complexes on an industrial scale." *Food and Bioprocess Processing* 96: 245-255.
205. Rappenecker and Zugenmaier (1981). "Detailed refinement of the crystal structure of Vh-amylose." *Carbohydrate Research* 89(1): 11-19.
206. Reparet, Moine, Arvisenet, Le Bail and Cayot (2006). "Influence of flavoring on the viscoelastic properties of starch gels during gelation and long-time retrogradation." *Journal of Texture Studies* 37(5): 459-475.
207. Richard and Multon (1992). *Les arômes alimentaires*. Paris, Lavoisier.
208. Ridout, Parker, Hedley, Bogracheva and Morris (2003). "Atomic force microscopy of pea starch granules: granule architecture of wild-type parent, r and rb single mutants, and the rrb double mutant." *Carbohydrate Research* 338(20): 2135-2147.
209. Ring (1985). "Some studies on starch gelation." *Starch* 37(3): 80-83.
210. Roberts, Elmore, Langley and Bakker (1996). "Effects of sucrose, guar gum, and carboxymethylcellulose on the release of volatile flavor compounds under dynamic conditions." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1321-1326.
211. Rojas, Rosell and Benedito de Barber (1999). "Pasting properties of different wheat flour-hydrocolloid systems." *Food Hydrocolloids* 13(1): 27-33.
212. Rondeau-Mouro, Le Bail and Buleon (2004). "Structural investigation of amylose complexes with small ligands : inter- or intra-helical associations?" *Journal of Biological Macromolecules* 34: 309-315.
213. Ruiz-Capillas, Triki, Herrero, Rodriguez-Salas and Jiménez-Colmenero (2012). "Konjac gel as pork backfat replacer in dry fermented sausages: Processing and quality characteristics." *Meat Science* 92(2): 144–150.
214. Ruschmann and Solms (1990). "Formation of inclusion complexes of starch with different organic compounds. IV. Ligand binding and variability in helical conformations of V amylose complexes " *LWT - Food Science and Technology* 23: 84-87.
215. Rutschmann, Heiniger, Pliska and Solms (1989). "Formation of inclusion complexes of starch with different organic compounds. I. Method of evaluation of binding profiles with menthone as an example." *LWT - Food Science and Technology* 22: 240-244.
216. Rutschmann and Solms (1990a). "Formation of inclusion complexes of starch in ternary model systems with decanal, menthone, and 1-naphthol." *LWT - Food Science and Technology* 23(5): 457-464.
217. Rutschmann and Solms (1990b). "Formation of inclusion complexes of starch with different organic compounds. II. Study of ligand binding in binary model systems with decanal, 1-naphthol, monostearate and monopalmitate." *LWT - Food Science and Technology* 23(1): 70-79.
218. Rutschmann and Solms (1990c). "Formation of inclusion complexes of starch with different organic compounds. V. Characterization of complexes with amperometric iodine titration, as compared with direct quantitative analysis." *LWT - Food Science and Technology* 23(1): 88-93.
219. Rutschmann and Solms (1990d). "The formation of ternary inclusion complexes of starch with menthone and monostearate - a possible food model system." *LWT - Food Science and Technology* 23(5): 451-456.
220. Saravacos, Taoukis, Krokida, Karathanos, Lazarides, Stoforos, Tzia, Yanniotis, Nedovic, Kalusevic, Manojlovic, Levic and Bugarski (2011). "11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11) An overview of encapsulation technologies for food applications." *Procedia Food Science* 1: 1806-1815.
221. Sarko and Biloski (1980). "Crystal structure of the KOH-amylose complex " *Carbohydrate Research* 79: 11-21.
222. Savary (2006). *Impact de la structure de gels composites à base de polyoside sur la libération d'arôme : exemples des bases de fruits-sur-sucre*. Thèse de doctorat spécialisé science de l'alimentation. Dijon, Université de Bourgogne.
223. Savary, Guichard, Doublier and Cayot (2006). "Mixture of aroma compounds: determination of partition coefficients in complex semi-solid matrices." *Food Research International* 39(3): 372-379.
224. Schoch and Williams (1944). "Adsorption of fatty acid by the lineat component of corn starch." *Journal of the American Chemical Society* 66(7): 1232–1233.
225. Schwartz, Le Bail, Garnier, Llamas, Queveau, Pontoire, Srzednicki and Le Bail (2014). "Available water in konjac glucomannan–starch mixtures. Influence on the gelatinization, retrogradation and complexation properties of two starches." *Food Hydrocolloids* 41: 71-78.
226. Serra (1982). *Image analysis and mathematical morphology*, v. 1, Academic press.

227. Seuvre, Goubet and Voilley (2002). Rôle de l'eau dans le comportement des substances d'arôme en milieux aqueux, peu hydratés, émulsionnés et gélifiés. L'eau dans les aliments. M. Le Meste, D. Lorient and D. Simatos. Paris, Lavoisier, TEC. et DOC.: 674 p.
228. Shah, Li, Wang, Liu, Li, Wei, Weiping and Zhenshun (2015). "Health benefits of konjac glucomannan with special focus on diabetes." *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 5(2): 179-187.
229. Shen, Bertoft, Zhang and Hamaker (2013). "Iodine binding to explore the conformational state of internal chains of amylopectin." *Carbohydrate Polymers* 98: 778–783.
230. Smach, Lemaître, Gauthier, Miteran and Atri (2008). "Generalized Fourier descriptors with applications to objects recognition in SVM context." *Journal of Mathematical Imaging and Vision* 30: 43-71.
231. Šubarić, Babić, Ačkar, Piližota, Kopjar, Ljubas and Ivanovska (2011). "Effect of galactomannan hydrocolloids on gelatinization and retrogradation of tapioca and corn starch." *Croatian Journal of Food Science and Technology* 3(1).
232. Takahiro, Yohei, Toshio, Yasunori, Iwao and Katsuyoshi (2005). "Effect of non-ionic polysaccharides on the gelatinization and retrogradation behavior of wheat starch. ." *Food Hydrocolloids* 19: 1-13.
233. Takigami (2009). Konjac mannan. *Handbook of hydrocolloids*. Phillips G.O. and P.A. Williams. Cambridge, Woodhead Publishing.
234. Tang, Mitsunaga and Kawamura (2006). "Molecular arrangement in blocklets and starch granule architecture." *Carbohydrate Polymers* 63(4): 555–560.
235. Tester and Al-Ghazzewi (2013). "Mannans and health, with a special focus on glucomannans." *Food Research International* 50(1): 384–391.
236. Tester and Al-Ghazzewi (2016). "Glucomannans and nutrition." *Food Hydrocolloids*: in press <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.1005.1017>.
237. Tietz (1997). Starch-flavour interactions : impact on flavour retention and release in model food systems. Zurich, PhD, ETH. Doctor of science.
238. Tietz (2007). Starch-flavour interactions: impact on flavour retention and release in model food systems. Thèse de doctorat spécialisé sciences. Zurich, ETH (École polytechnique fédérale).
239. Tietz, Buettner and Conde-Petit (2008). "Interaction between starch and aroma compounds as measured by proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS)." *Food chemistry* 108(4): 1192–1199.
240. Tobin, Fitzsimons, Kelly and Fenelon (2011). "The effect of native and modified konjac on the physical attributes of pasteurized and UHT-treated skim milk." *International Dairy Journal* 21: 790-797.
241. Tuceryan, Jain and others (1993). "Texture analysis." *Handbook of pattern recognition and computer vision* 2: 207–248.
242. Union nationale des producteurs de pomme de terre (2012). "La filière féculé se prend en main." *Profil* 47: 11-13.
243. USIPA (Union des Syndicats des Industries des Produits Amylacés et de leurs dérivés). (2013). "Amidonnerie-Féculerie ", from <http://www.usipa.fr/produits/proteines-fibres-lipides/feculerie-pomme-de-terre> (consulté le 29/05/2016).
244. Vamadevan and Bertoft (2015). "Structure-function relationships of starch components." *Starch* 67: 55-68.
245. Van Roon, Parsons, te Kloeze and Govers (2005). "Fat and transport of monoterpenes through soils : prediction of temperature dependent soil fate model input-parameters." *Chemosphere* 61: 599-609.
246. Van Ruth and King (2003). "Effect of starch and amylopectin concentrations on volatile flavour release from aqueous model food systems." *Flavour and Fragrance Journal* 18(5): 407–416.
247. van Soest, De Wit, Tournois and Vliegenthart (1994). "Retrogradation of Potato Starch as Studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy." *Starch* 46(12): 453-457.
248. Varavinit, Shobsngob, Varayanond, Chinachoti and Naivikul (2002). "Freezing and Thawing Conditions Affect the Gel Stability of Different Varieties of Rice Flour." *Starch - Stärke* 54(1): 31-36.
249. Vasiliadou, Raphaelides and Papastergiadis (2015). " Effect of heating time and temperature on partially gelatinized starch-fatty acid interactions." *LWT - Food Science and Technology* 60 (2): 698-707.
250. Venna, Peltonen, Nybo, Aidos and Kaski (2010). "Information retrieval perspective to nonlinear dimensionality reduction for data visualization." *Journal of Machine Learning Research* 11: 451-490.
251. Wang, Liu, Li, Wang and Wang (2015). "Two natural glucomannan polymers, from Konjac and Bletilla, as bioactive materials for pharmaceutical applications." *Biotechnology Letters* 37(1): 1-8.
252. Wen, Wang, Wang, Li and Changsheng (2008). "Preparation of konjac glucomannan hydrogels as DNA-controlled release matrix." *International Journal of Biological Macromolecules* 42: 256–263.
253. Whittam, Orford, Ring, Clark, Parker, Cairns and Miles (1989). "Aqueous dissolution of crystalline and amorphous amylose-alcohol complexes." *International Journal of Biological Macromolecules* 11(6): 339-344.

254. Williams, Foster, Martin, Norton, Yoshimura and Katsuyoshi (2000). "A molecular description of the gelation mechanism of konjac mannan." *Biomacromolecules* 1: 440-450.
255. Winter and Sarko (1974). "Crystal and molecular structure of the amylose-DMSO complex." *Biopolymers* 13(7): 1461-1482.
256. Wulff, Avgeanki and Guzmán (2005). "Molecular encapsulation of flavours as helical inclusion complexes of amylose." *Journal of Cereal Science* 41: 239-249.
257. Xiao, Gao and Zhang (2000). "Blend films from konjac glucomannan and sodium alginate solutions and their preservative effect." *Journal of Applied Polymer Science* 77: 617-626.
258. Xiong, Cheng, Ye, Du, Zhou, Lin, Geng, Chen, Corke and Cai (2009). "Effects of konjac glucomannan on physicochemical properties of myofibrillar protein and surimi gels from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)." *Food chemistry* 116: 413-418.
259. Xu, Zhong, Li, Shoemaker, Yokoyama and Xia (2012). "Effect of polysaccharides on the gelatinization properties of cornstarch dispersions." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 658-664.
260. Yamashita (1965). "Single crystals of amylose V complexes." *Journal of Polymer Science Part A: General Papers* 3(9): 3251-3260.
261. Yamashita and Hirai (1966). "Single crystals of amylose V complexes. II. Crystals with 71 helical configuration." *Journal of Polymer Science Part A-2: Polymer Physics* 4(2): 161-171.
262. Yang, Xiao and Ding (2009). "An investigation into the application of konjac glucomannan as a flavor encapsulant." *European Food Research and Technology* 229: 467-474.
263. Yang, Yang, Petcavich and Mao. (2001). "Process for preserving fresh produce." from <http://www.google.com/patents/US6203833> (consulté le 26/05/2016).
264. Yeo, Thompson and Peterson (2016). "Inclusion complexation of flavour compounds by dispersed high-amylose maize starch (HAMS) in an aqueous model system." *Food chemistry* 199: 393-400.
265. Yoshimura and Nishinari (1999). "Dynamic viscoelastic study on the gelation of konjac glucomannan with different molecular weights." *Food Hydrocolloids* 13: 227-233.
266. Yoshimura, Takaya and Nishinari (1996). "Effects of Konjac-Glucomannan on the Gelatinization and Retrogradation of Corn Starch As Determined by Rheology and Differential Scanning Calorimetry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 2970-2977.
267. Yoshimura, Takaya and Nishinari (1998). "Rheological studies on mixtures of corn starch and konjac-glucomannan." *Carbohydrate Polymers* 35: 71-79.
268. Zhang, Chen and Yang (2014). "Konjac glucomannan, a promising polysaccharide for OCDDS." *Carbohydrate Polymers* 104: 175-181.
269. Zhang, Xie and Gan (2005). "Advance in the applications of konjac glucomannan and its derivatives." *Carbohydrate Polymers* 60: 27-31.
270. Zhou, Wang, Zhang, Du and Zhou (2008). "Effect of polysaccharides on gelatinization and retrogradation of wheat starch." *Food Hydrocolloids* 22: 505-512.
271. Ziegler, Nordmark and Woodling (2003). "Spherulitic crystallization of starch: influence of botanical origin and extent of thermal treatment." *Food Hydrocolloids* 17(4): 487-494.