

Cristallisation de courtes chaînes d'amylose en solution diluée

Nicole Montesanti^{a*}, Jean-Luc Putaux^a, Gabrielle Potocki-Véronèse^b,
Alain Buléon^c, Danièle Dupeyre^a, Frédéric Dubreuil^a

^a Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, ICMG-CNRS, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9

^b Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, UMR5504 INRA-CNRS, UMR792 INSA-INRA,
135 avenue de Rangueil, 31400 Toulouse Cedex 4

^c INRA, Rue de la Géraudière, BP 71627, 44316 Nantes Cedex 3

Résumé – Ce travail porte sur les mécanismes de cristallisation au sein du grain d'amidon pendant sa biosynthèse via l'étude de systèmes modèles. L'approche inclut la cristallisation de chaînes courtes d'amylose en phase homogène ainsi que son induction au contact de surfaces cristallines. Les cristaux ont été préparés à partir de chaînes d'amylose de DP 7-40 obtenues par biosynthèse *in vitro* ou dégradation acide d'amidon natif. Nous avons étudié l'influence de l'origine des chaînes, de leur longueur et des conditions de cristallisation.

1. Introduction

L'amidon natif est un mélange de deux homopolymères de glucose, l'un linéaire (l'amylose) et l'autre branché (l'amylopectine). Les grains d'amidon sont constitués d'anneaux de croissance alternés amorphes / semi-cristallins. Leur cristallinité partielle est associée à l'organisation en grappe des courtes branches linéaires de l'amylopectine qui s'organisent en doubles hélices parallèles et forment des lamelles. Le degré de polymérisation (DP) de ces branches courtes varie typiquement de 12 à 18 [1]. Deux principaux allomorphes sont connus : le type A (maille monoclinique) et le type B (maille hexagonale) [1]. Afin de comprendre les modes de cristallisation *in vivo* de ces branches, nous avons étudié la cristallisation *in vitro* de courtes chaînes d'amylose d'un DP similaire, ainsi que l'influence de paramètres tels que l'origine de l'amylose, la longueur des chaînes, leur polydispersité ainsi que la température de cristallisation.

2. Préparation des cristaux

Les courtes chaînes d'amylose ont été préparées par hydrolyse acide d'amidon natif de pomme de terre, de maltodextrines commerciales fractionnées [7], ou par biosynthèse *in vitro* en utilisant une enzyme, l'amylosaccharase [4], qui synthétise de l'amylose à partir de saccharose [5]. Des fractions de faible polydispersité, dans une gamme totale de DP de 7 à 31, ont été obtenues en séparant les chaînes synthétisées par chromatographie sur gel perméable (GPC). Chaque fraction a tout d'abord été solubilisée dans l'eau (0,05% p/v) par chauffage à 150°C. La solution a ensuite été filtrée sur 0.2 μ m à 80°C puis maintenue à une température entre 55 et 60°C durant 4 h en présence de vapeurs d'acétone et sous légère agitation.

3. Cristallisation homogène

Les images de microscopie électronique à balayage (MEB) montrent généralement des cristaux lamellaires oblongs, individuels ou agrégés (Figure 1), dont les caractéristiques géométriques dépendent des conditions de cristallisation et de la fraction d'amylose choisie. Les cristaux sont polydisperses et très agrégés lorsqu'ils sont préparés à partir de dextrans de pomme de terre (Figure 1a). Ceux préparés à partir d'amylose synthétique de DP 14-24 forment des cristaux de morphologie plus régulière, avec un extrémité plate et l'autre pointue (Figure 1b), tandis que des chaînes plus longues (DP 23-29) forment des agrégats de cristaux avec des extrémités plus arrondies (Figure 1c). Les clichés de diffraction électronique de monocristaux hydratés-congelés enregistrés à basse température permettent d'identifier sans ambiguïté l'allomorphe A (Figures 2a,b), les doubles hélices étant orientées parallèlement au grand axe du cristal (Figures 2a,c) [3]. La section transverse des cristaux est un parallélogramme dont les caractéristiques sont bien corrélées avec celles du plan de base de la maille monoclinique de l'allomorphe A (Figure 2d).

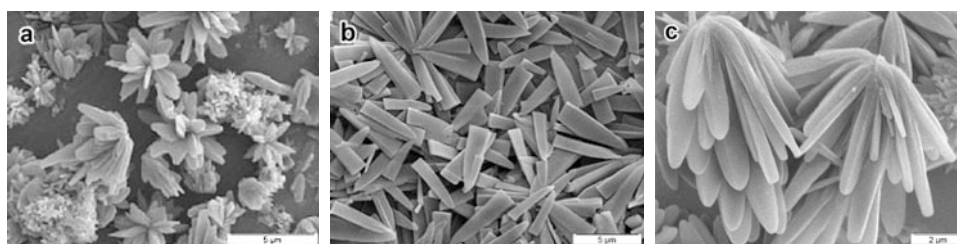


Figure 1 – Images MEB de cristaux d'amylose A préparés à partir de chaînes courtes d'origine et de DP différents : pomme de terre, DP 9-26 ; b) amylose synthétique, DP 14-24 ; c) amylose synthétique, DP 23-29.

* Auteur à contacter : montesanti@cermav.cnrs.fr – Tél. : 04 76 03 76 11

Des travaux précédents ont montré par microscopie électronique en transmission (MET) que des petits cristaux de type A étaient constitués de lamelles de 5-7 nm d'épaisseur [6]. Le mécanisme de croissance de nos cristaux oblongs semble aussi reposer sur le développement d'un empilement lamellaire de doubles hélices. Les images de la surface de cristaux préparés à partir d'amylose synthétique, enregistrées par MEB avec un canon à effet de champ et par microscopie à force atomique (AFM), révèlent cette organisation lamellaire (Figure 2d) [7].

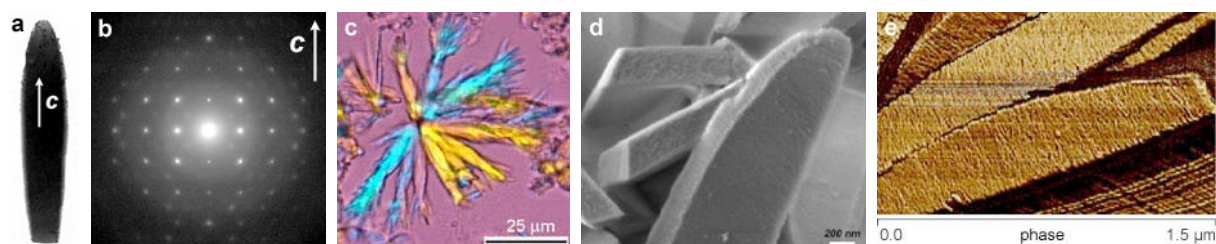


Figure 2 – a) monocristal d'amylose préparé en présence d'acétone (MET) ; b) cliché de diffraction électronique (allomorphe A). La flèche indique la direction des doubles hélices dans le cristal ; c) micrographie optique en lumière polarisée. Les couleurs uniformes indiquent que les doubles hélices sont parallèles ; d,e) structure lamellaire des cristaux suggérée par les images enregistrées par MEB-FEG (d) et AFM (e) en mode contact intermittent (image de phase) [7].

4. Cristallisation hétérogène

Des microfibrilles de cellulose ajoutées à une solution d'amylose constituent des sites de nucléation privilégiés pour le polymère. La cristallisation se développe alors à partir (Figure 3a) ou autour (Figure 3b) des microfibrilles. En particulier, cette technique s'est révélée indispensable pour déclencher la cristallisation de chaînes de faible DP (typiquement 7-12). Les cristaux obtenus à partir d'amylose synthétique restent oblongs mais sont moins longs (Figure 3a). Ceux formés à partir des chaînes issues du fractionnement de maltodextrines (donc légèrement branchées) présentent une organisation lamellaire irrégulière évoquant celle de l'amidon natif (Figure 3b). La cristallisation d'amylose synthétique induite par des surfaces de verre ou de mica conduit à la formation de "tapis" très denses de cristaux oblongs à section parallélogramme (Figures 3c,d).

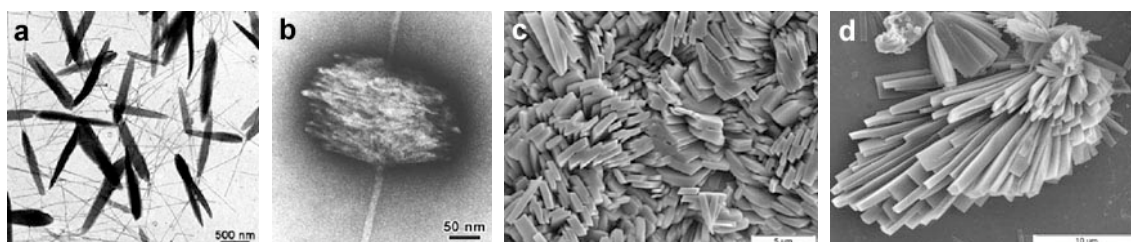


Figure 3 –a,b) Images MET de cristaux de type A formés en présence de microfibrilles de cellulose, à partir d'amylose synthétique de DP 12-27 (a) et de dextrines commerciales (b, coloration négative) ; c,d) images MEB d'agrégats de cristaux d'amylose synthétique formés sur une lame de verre (DP 17-22).

5. Références

- [1] A. Buléon, P. Colonna, V. Planchot, S. Ball, *Starch granules: structure and biosynthesis*. Int. J. Biol. Macromol. **23** (1998) 85-112
- [2] J.L. Putaux, S. Molina-Boisseau, T. Momaour, A. Dufresne, *Platelet nanocrystals resulting from the disruption of waxy maize starch granules by acid hydrolysis*. Biomacromolecules **4** (2003) 1198-1202
- [3] A. Imberty, H. Chanzy, S. Perez, A. Buléon, V. Tran, *The double-helical nature of the crystalline part of A-starch*. J. Mol. Biol. **201** (1998) 365-378
- [4] G. Potocki de Montalk, P. Sarçabal, M. Remaud-Siméon, R.M. Willemot, V. Planchot, P. Monsan, *Amylosucrase from Neisseria polysaccharea: novel catalytic properties*. FEBS Lett. **471** (2000) 219-223
- [5] G. Potocki-Véronèse, J.L. Putaux, D. Dupeyre, C. Albenne, M. Remaud-Siméon, P. Monsan, A. Buléon, *Amylose synthesized in vitro by amylosucrase: morphology, structure and properties*. Biomacromolecules **6** (2005) 1000-1011.
- [6] A. Pohu, J.L. Putaux, V. Planchot, P. Colonna, A. Buléon, *Origin of the limited α -amylolysis of debranched maltodextrins crystallized in the A form: a TEM study on model substrates*. Biomacromolecules **5** (2004) 119-125.
- [7] Les auteurs remercient A. Heyraud (CERMAV) pour ses échantillons de maltodextrines fractionnées ainsi que les sociétés JEOL et VEECO pour les tests réalisés sur leurs appareils et durant lesquels certaines des images de MEB et d'AFM présentées dans ce travail ont été réalisées.