

# Chimie Biologique – 3<sup>ème</sup> Bac

## La relation extraction-structure-propriétés des polysaccharides

Cas des galactomannanes et des alginates

Sébastien Gillet, Aurore Richel.

# La relation extraction-structure-propriétés des polysaccharides

A travers 2 exemples d'hémicelluloses:

- Les galactomannanes
- Les alginates

0. Introduction

1. La détermination de la structure

2. Les propriétés

3. Cas des galactomannanes

4. Cas des alginates

# 0. Introduction

- L'extraction a déjà été vue lors des autres séances du cours. Elle ne sera rappelée que brièvement, à travers les deux exemples présentés.
- Les méthodes principales de caractérisation structurale des polysaccharides seront présentées. La théorie et les aspects pratiques de ces techniques seront abordés dans le cours de Chimie Théorique et Physique appliquée à l'analyse structurale des biomolécules.
- Seules quelques techniques de caractérisation des propriétés des polysaccharides en solutions seront présentées sommairement. La théorie relative à ces techniques sera abordée dans le cadre du cours de Science des Aliments.



# 1. La détermination de la structure

Polysaccharides are usually composed of various monosaccharides linked with different glucosidic bonds. Some polysaccharides have hyperbranched structures. Moreover, polysaccharides often have high molecular weights, and tend to form aggregates in solution that can mask the behavior of individual macromolecules. In consequence, to characterize the chemical structures and chain conformations of polysaccharides is not an easy task

# 1. La détermination de la structure

La complexité des  
oligosaccharides

De loin la famille de macromol. avec la + gde diversité

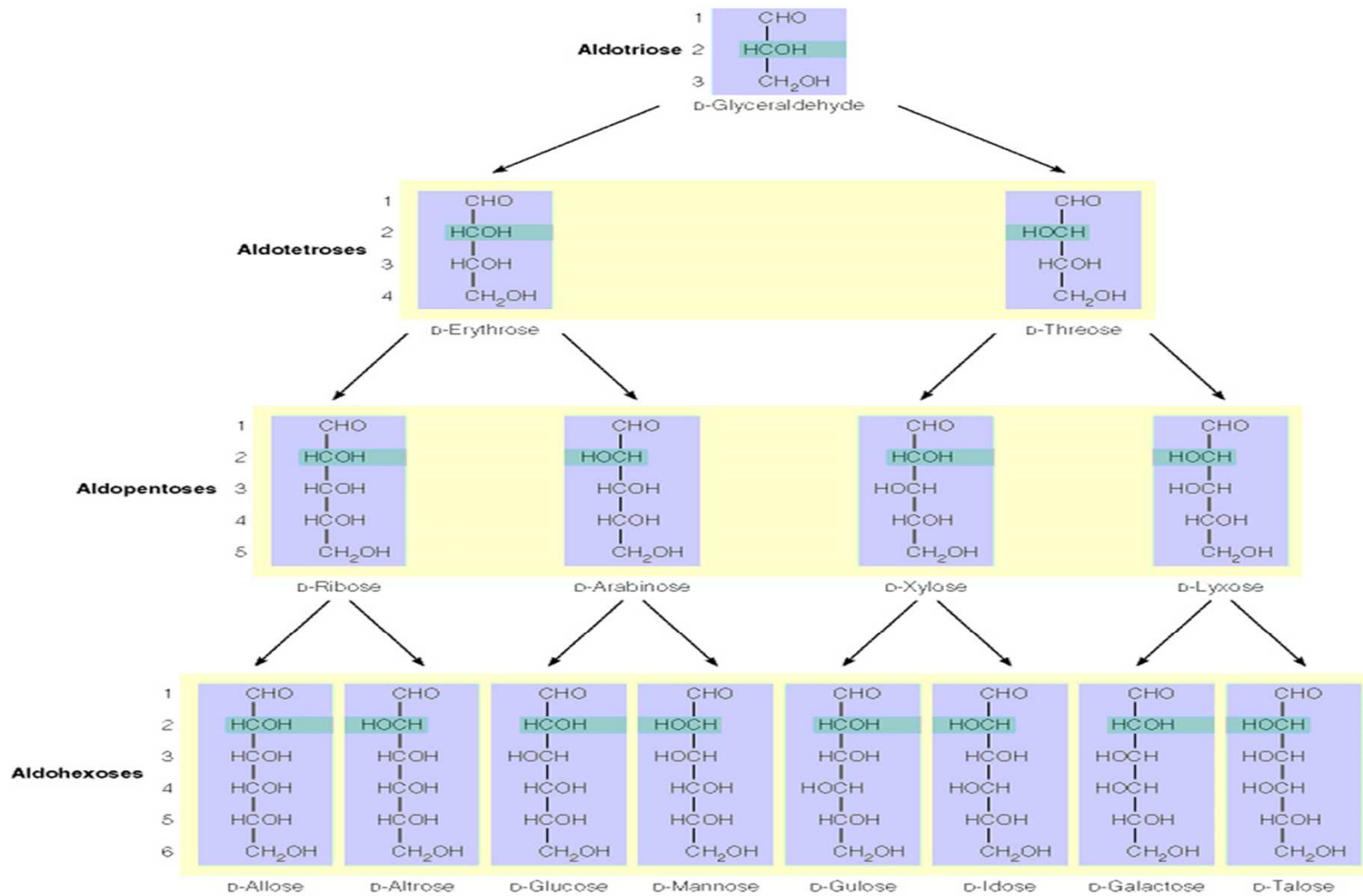
# 1. La détermination de la structure

Nb de carbone  
du résidu



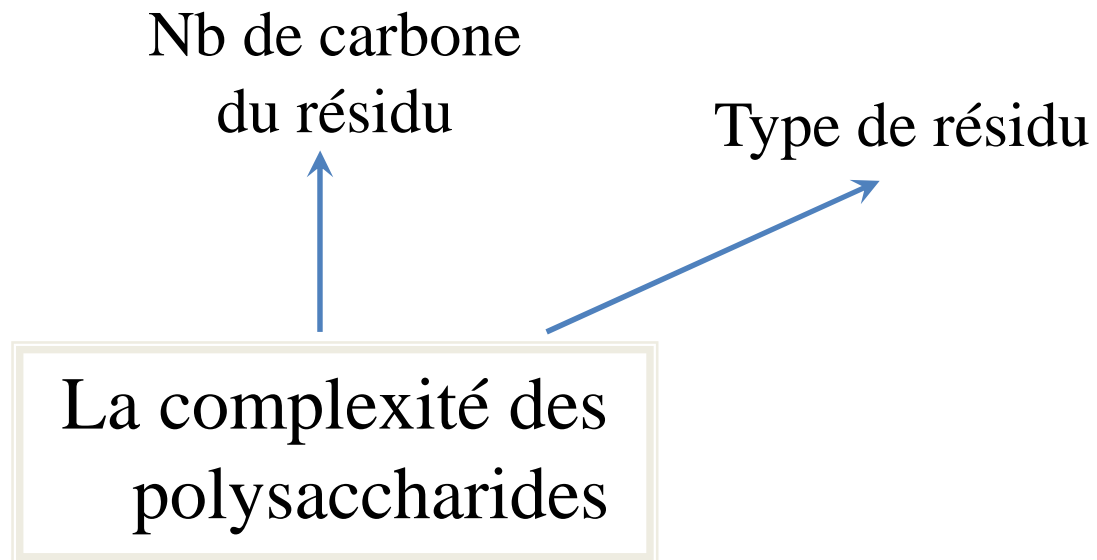
La complexité des  
polysaccharides

# 1. La détermination de la structure

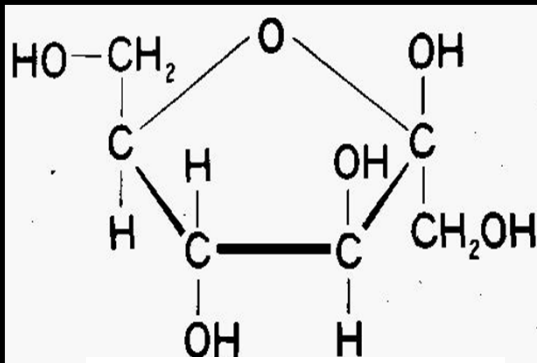


(a) D-Aldoses

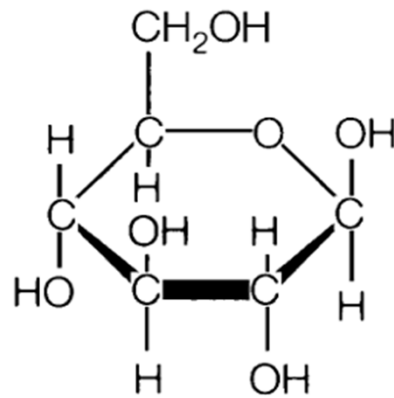
# 1. La détermination de la structure



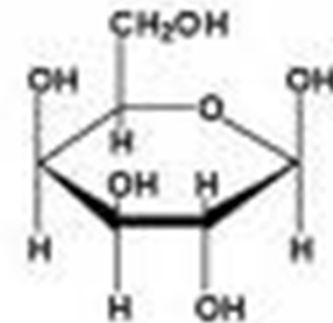
# 1. La détermination de la structure



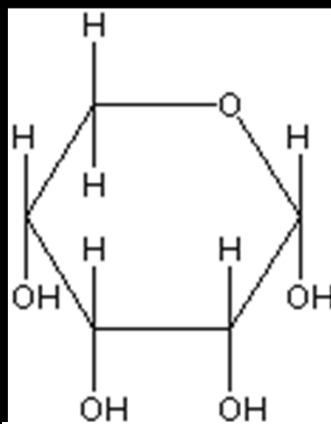
Fructose



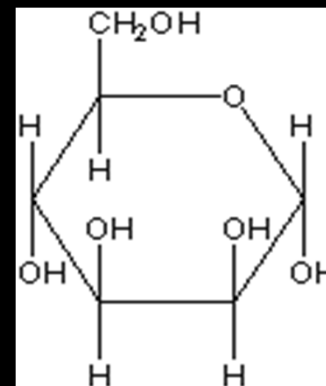
Glucose



$\beta$ -D-Galactose

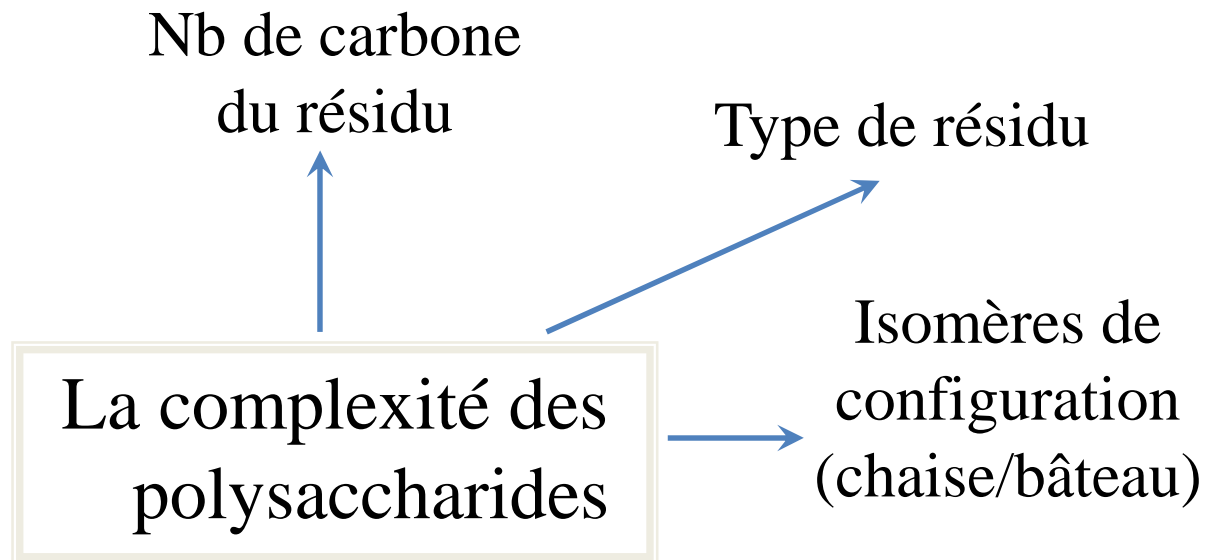


Ribose

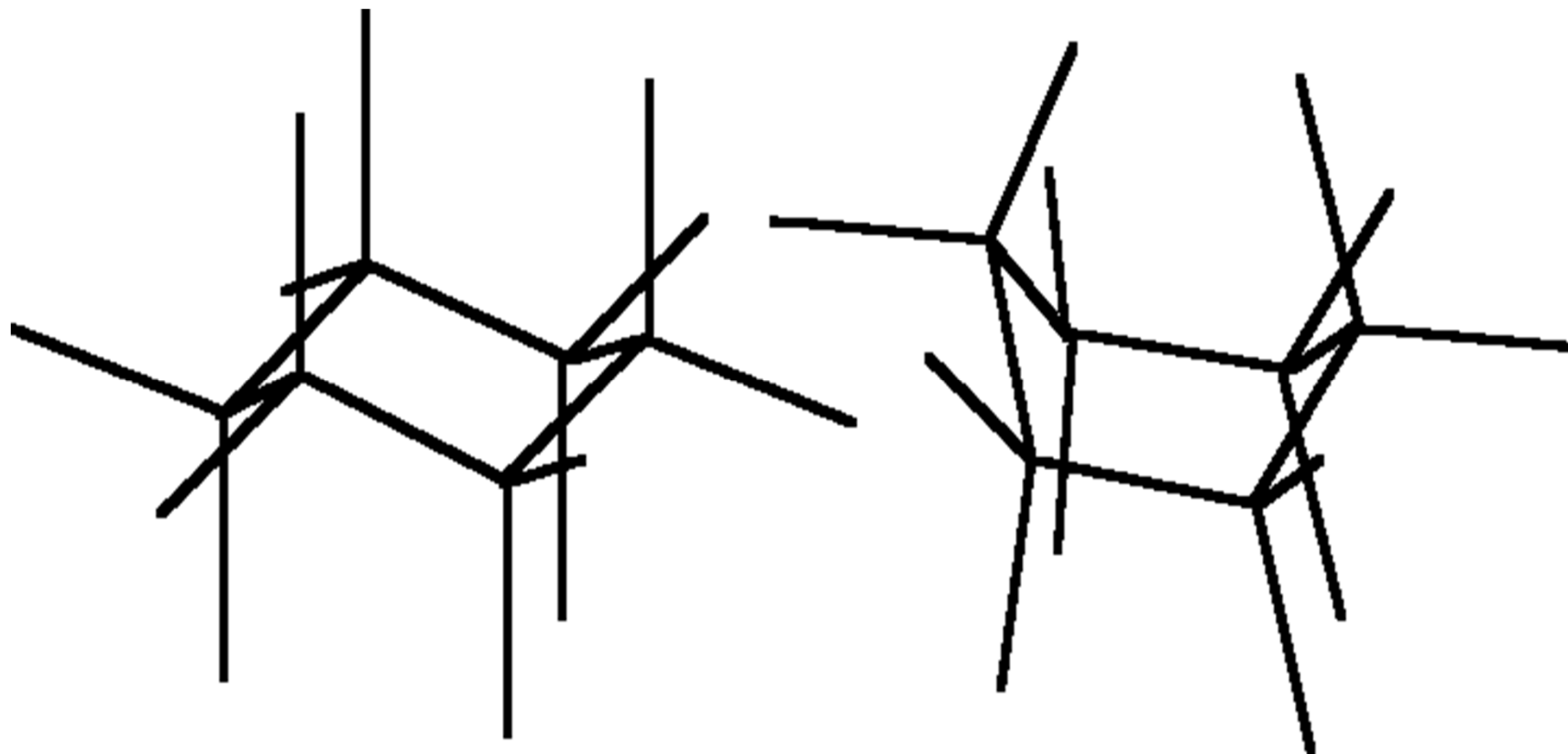


Mannose

# 1. La détermination de la structure

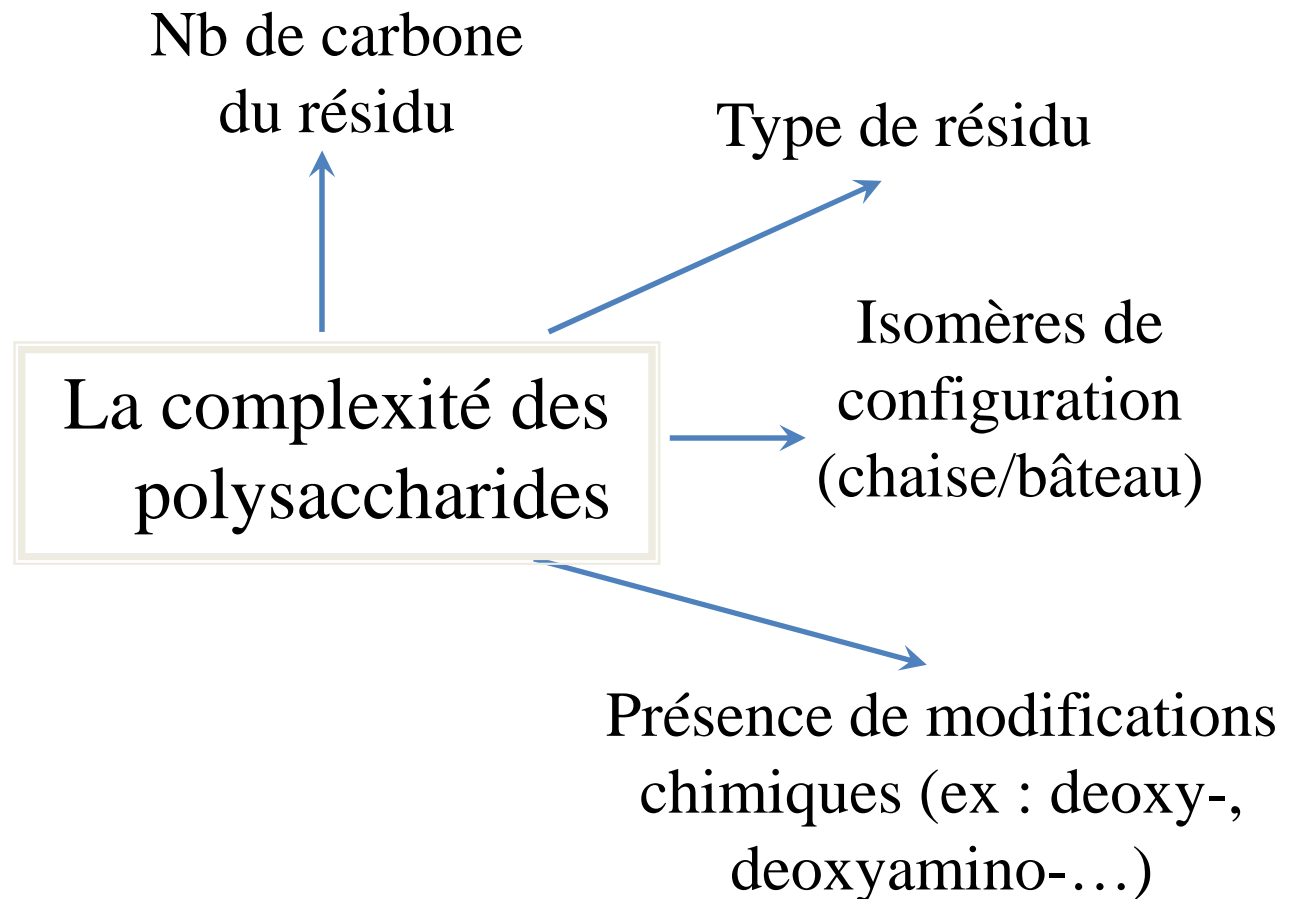


# 1. La détermination de la structure

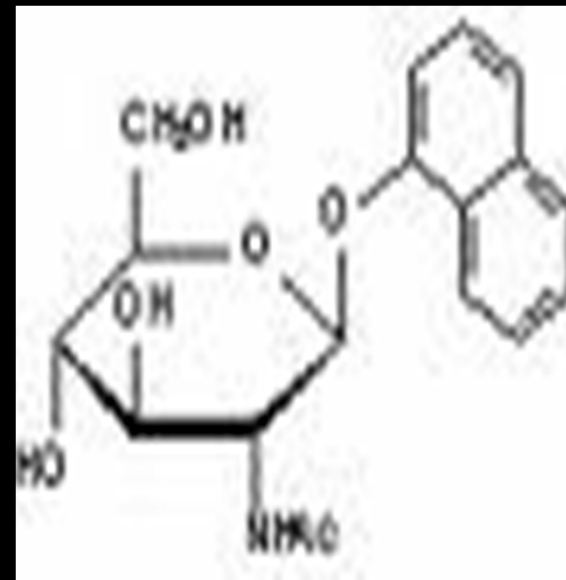
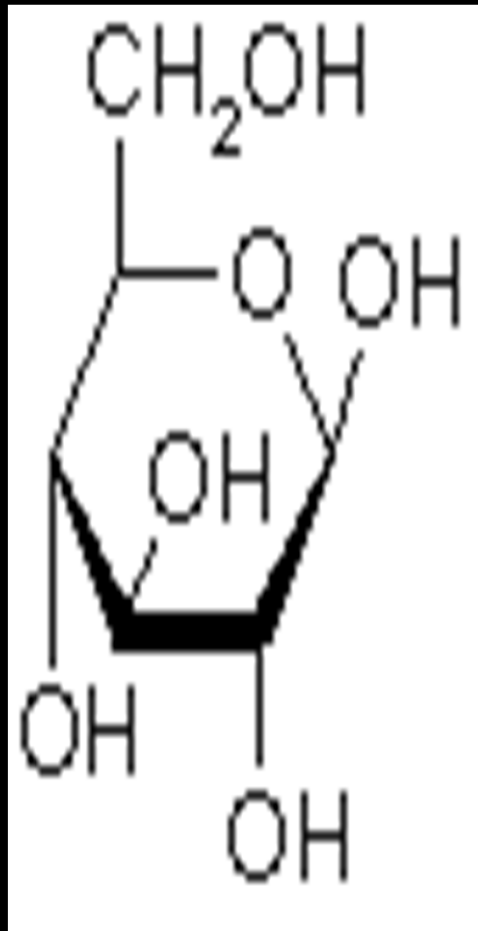




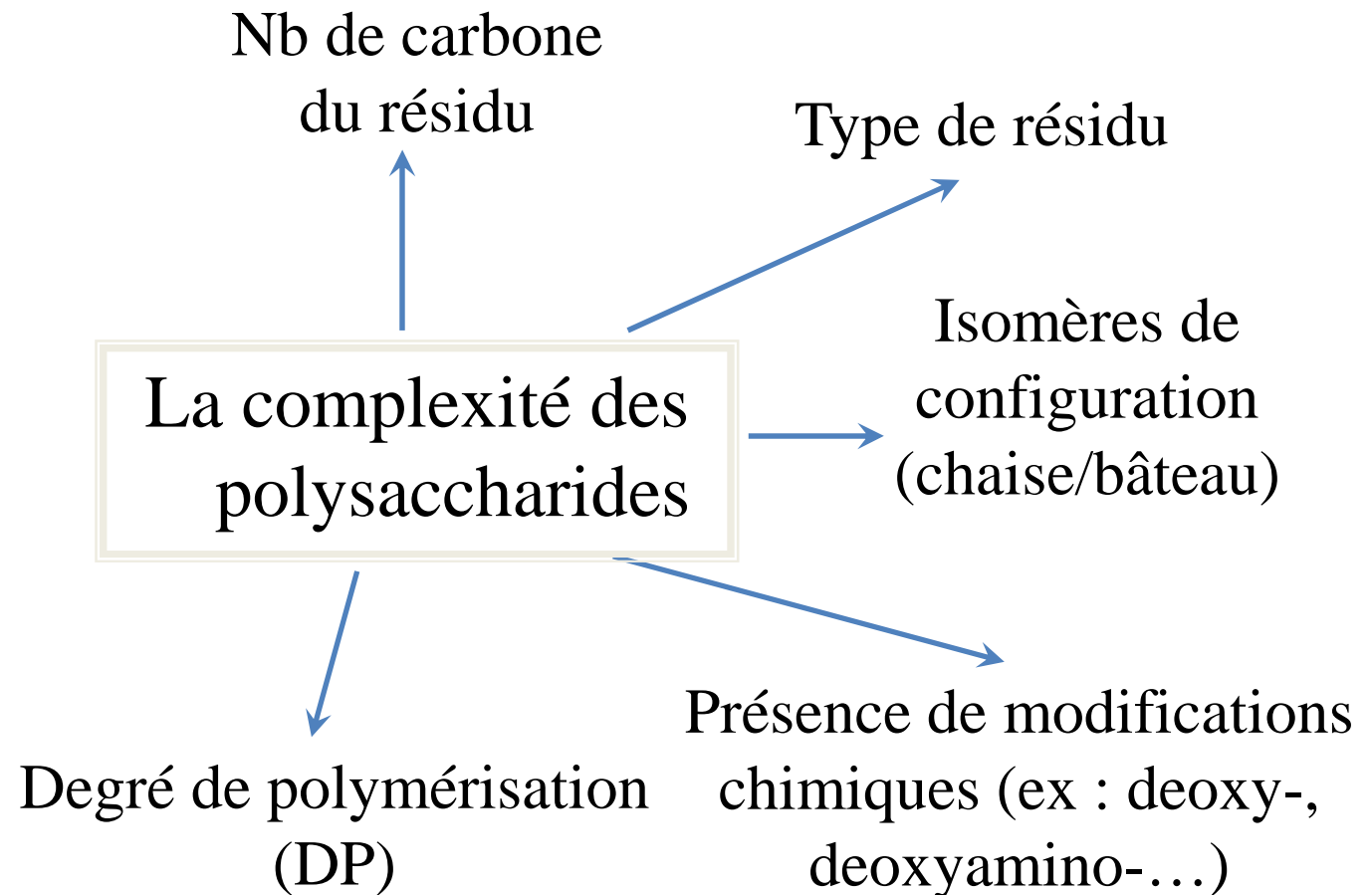
# 1. La détermination de la structure



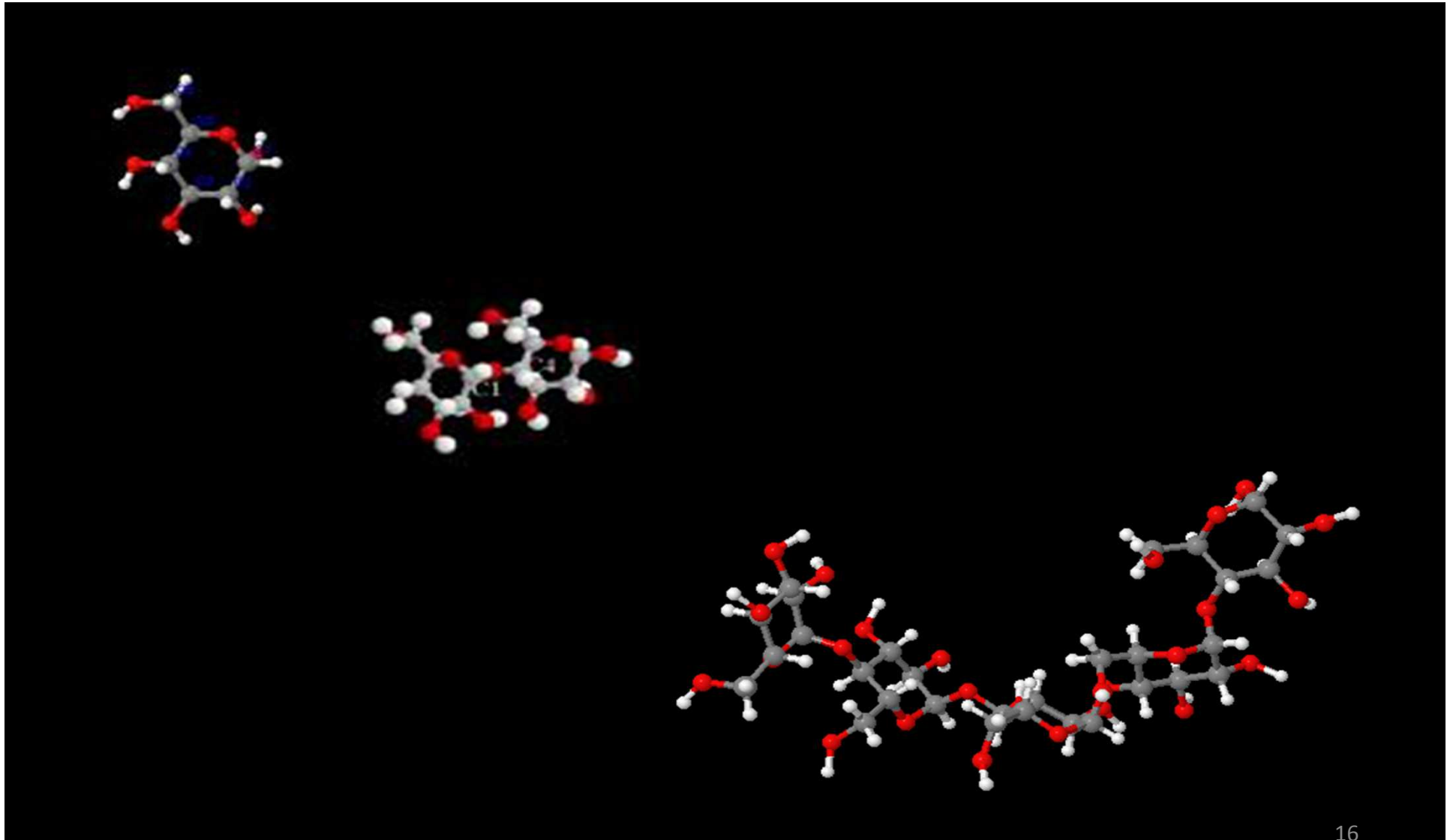
# 1. La détermination de la structure



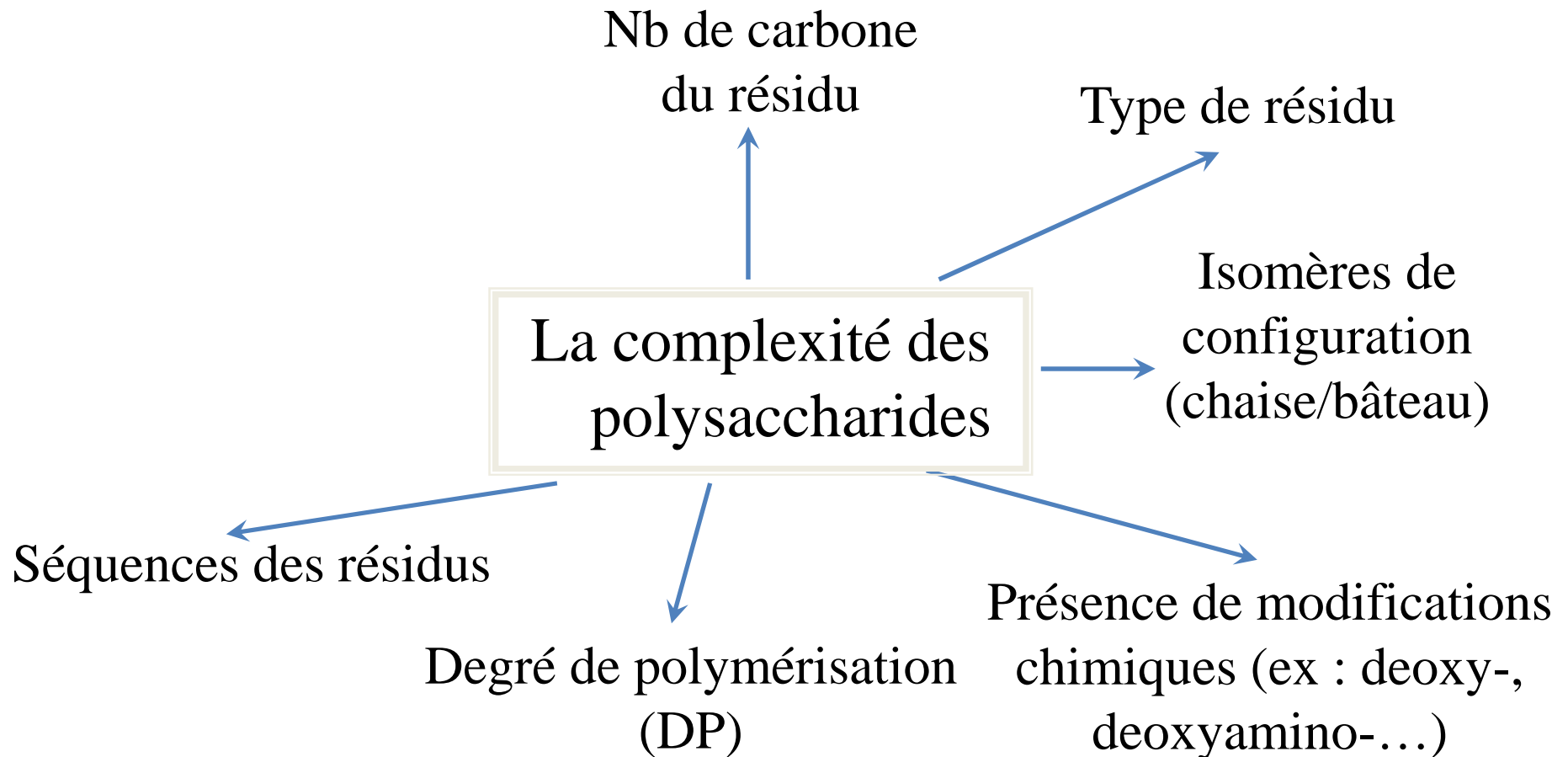
# 1. La détermination de la structure



# 1. La détermination de la structure

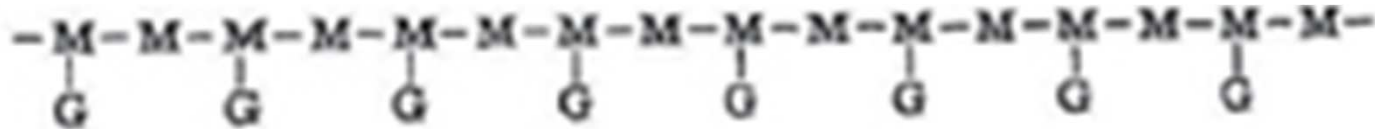


# 1. La détermination de la structure

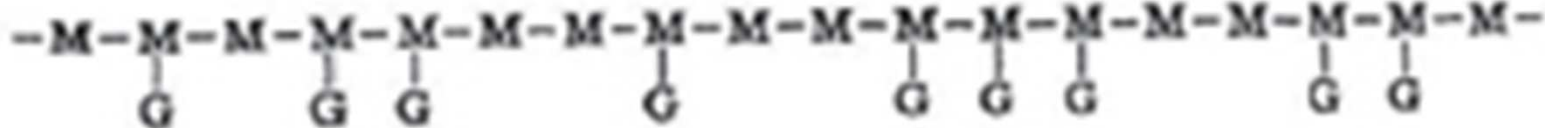


# 1. La détermination de la structure

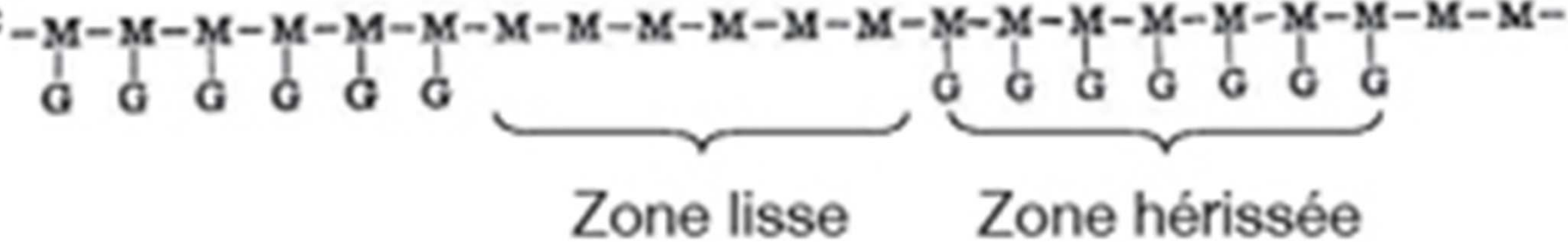
a



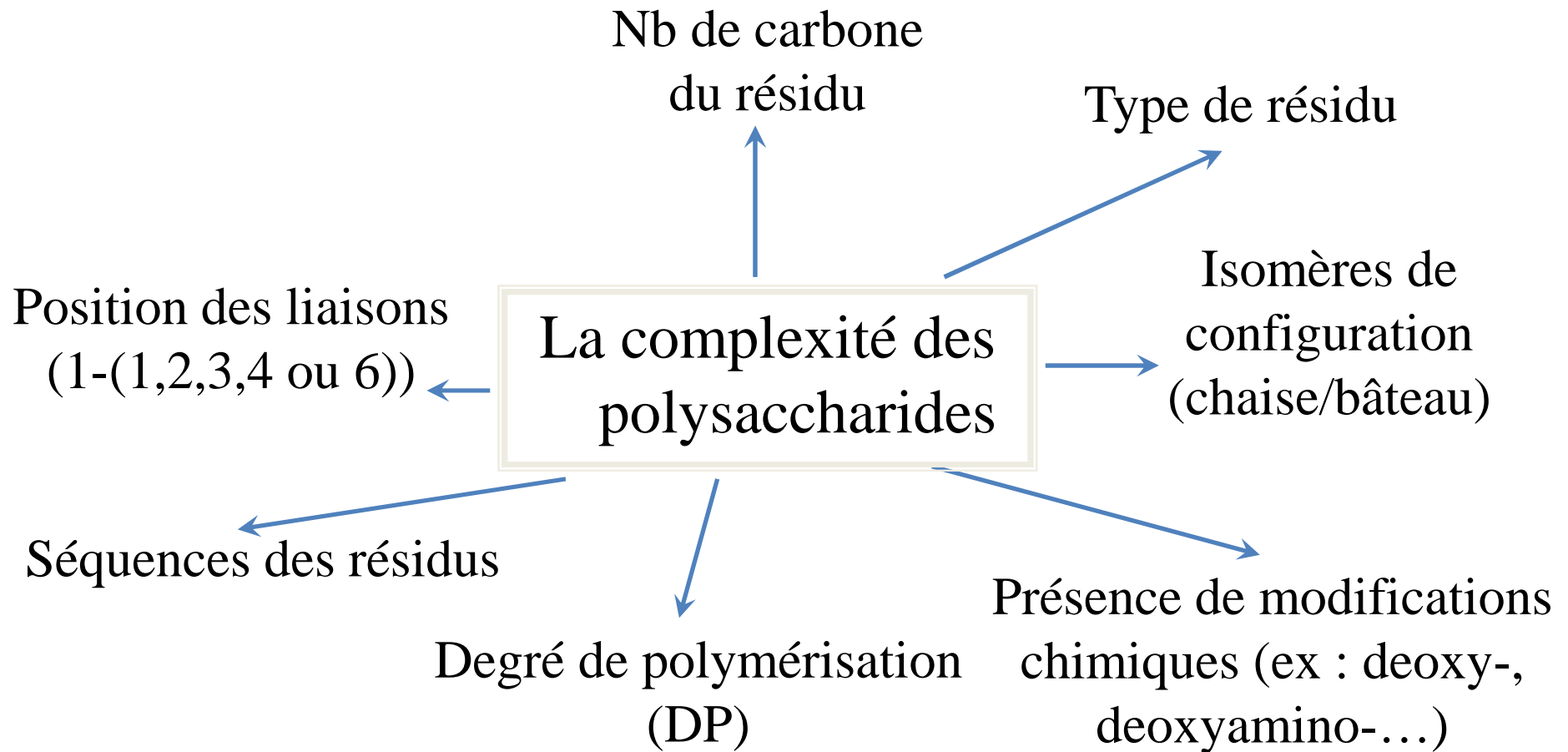
b



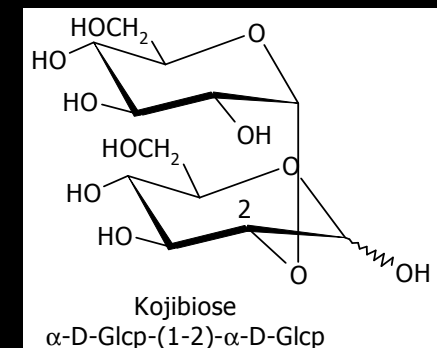
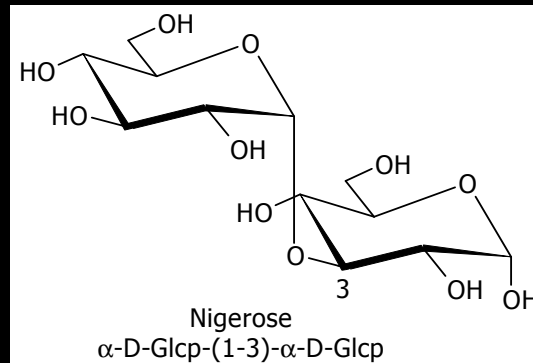
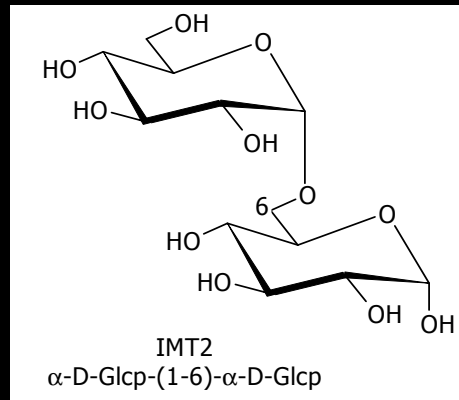
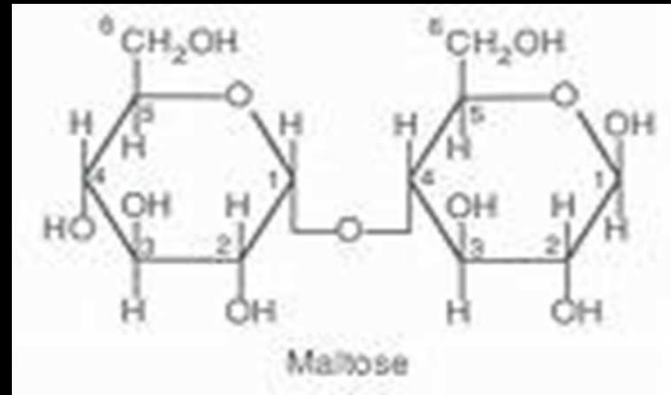
c



# 1. La détermination de la structure

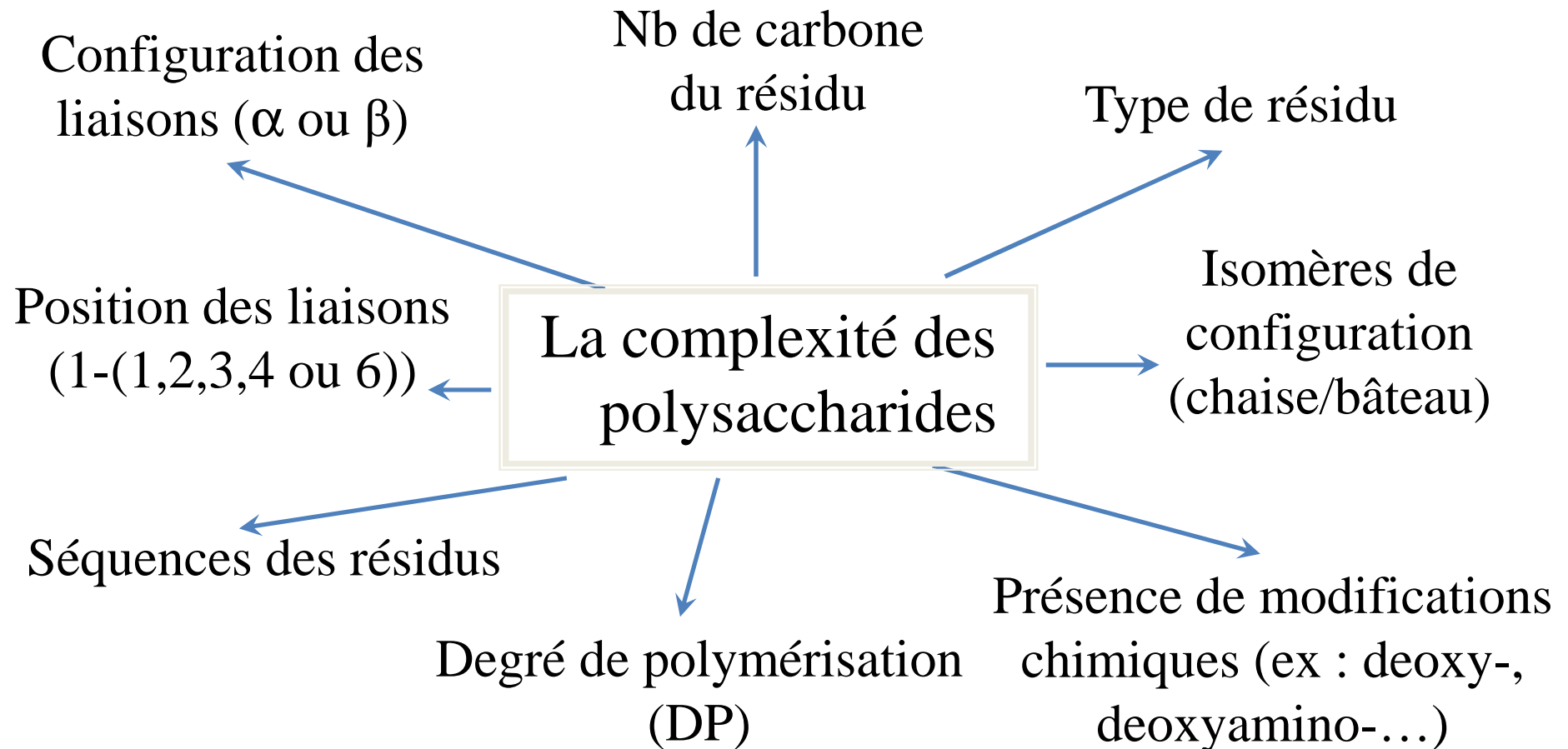


# 1. La détermination de la structure

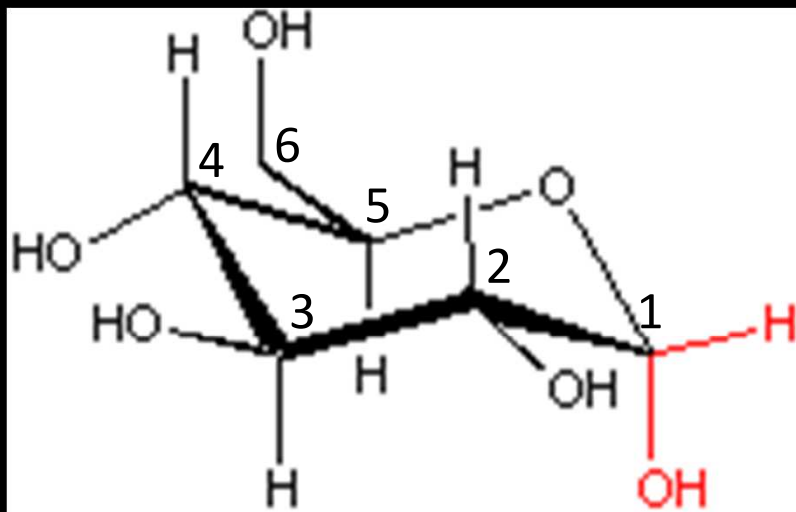




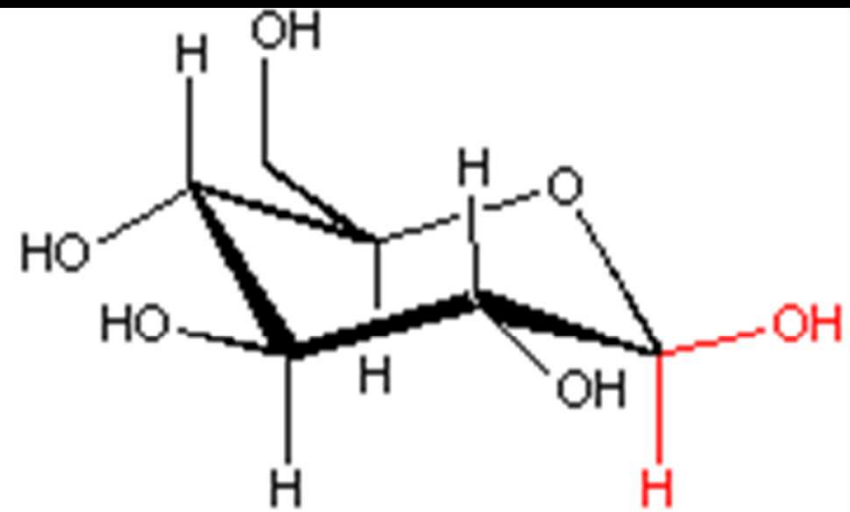
# 1. La détermination de la structure



# 1. La détermination de la structure



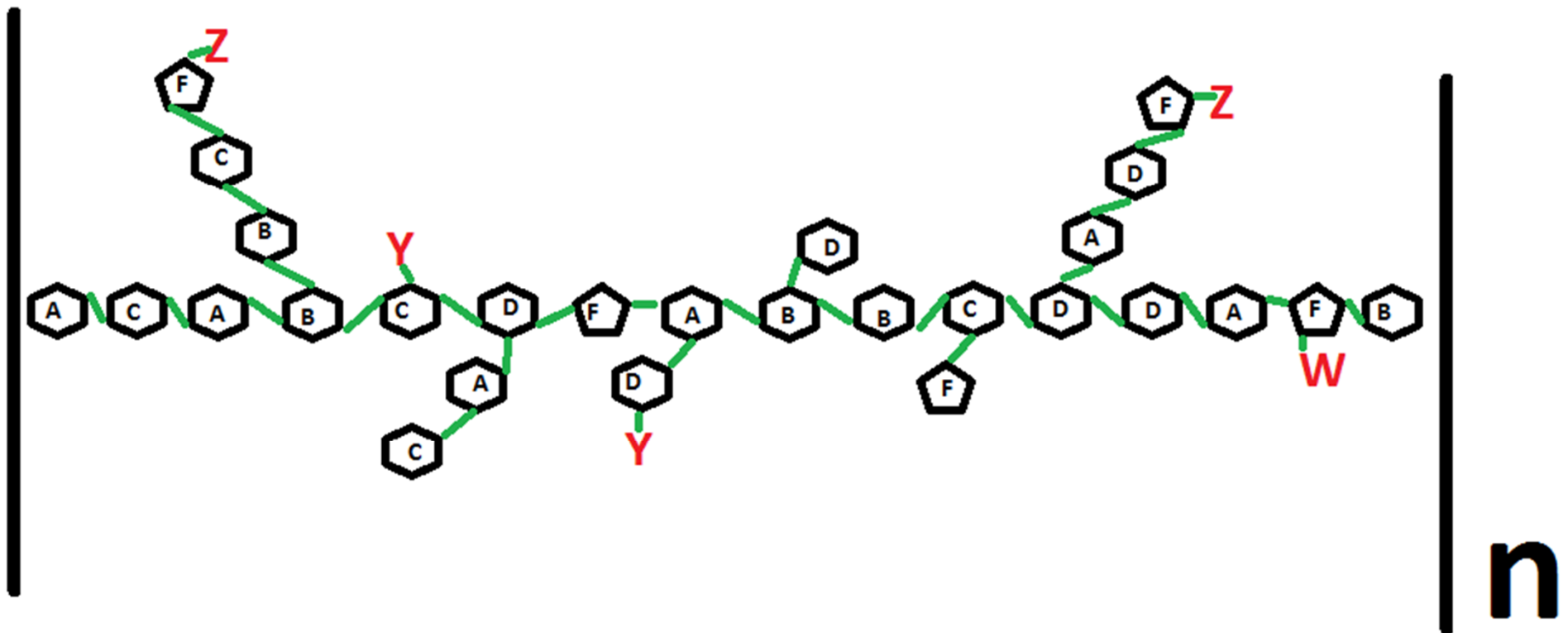
$\alpha$ -D-Glucopyranose



$\beta$ -D-Glucopyranose

# 1. La détermination de la structure

Soit un polysaccharide inconnu



Comment déterminer sa structure ?

# 1. La détermination de la structure

## Trois éléments de caractérisation

- 1. La composition
- 2. La taille
- 3. L'arrangement – structure fine
- (4. La conformation)

# 1. La détermination de la structure

Trois éléments de caractérisation

- 1. La composition (combien de A, B, C, ... W, Y, Z? Comment les résidus sont-ils liés? )
- 2. La taille (combien de fois  $n$ ? Quelle masse?)
- 3. L'arrangement (Comment les substituants sont-ils répartis)
- (4. La conformation) (comment la molécule est-elle positionnée en 3D? Quel volume occupe-t-elle en solution aqueuse?)

# 1. La détermination de la structure

## Trois éléments de caractérisation

- 1. La composition
- 2. La taille
- 3. L'arrangement – structure fine
- (4. La conformation)

Un polysaccharide est composé le plus souvent d'une distribution de chaînes de longueurs, de compositions et de structures fines différentes. On ne peut donc pas parler de structures absolues mais bien de « structures moléculaires moyennes ».

# 1. La détermination de la structure

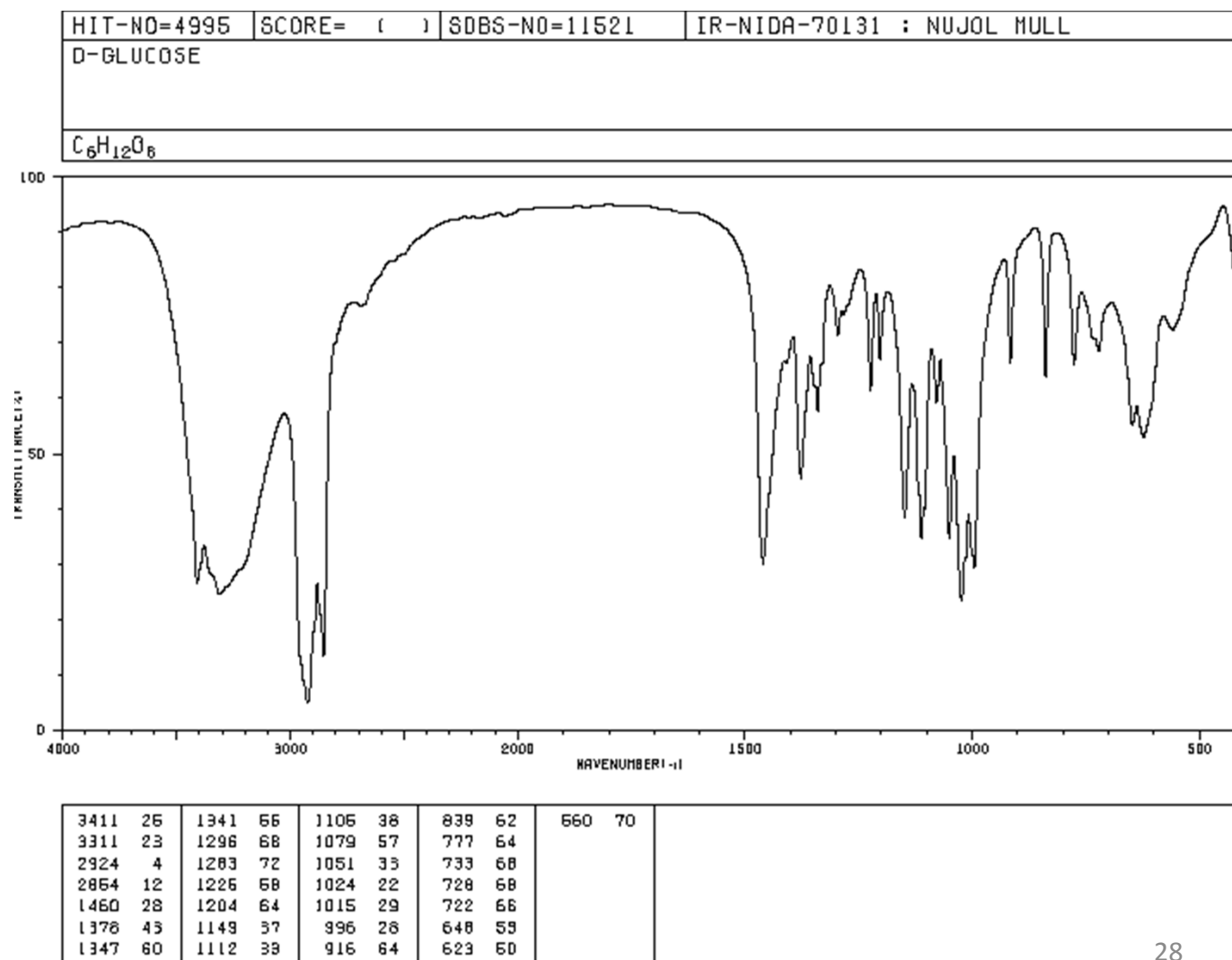
## Recours à différentes techniques

The chemical structures were analyzed by FTIR, liquid-state NMR (one and two dimensions), solid-state NMR, Raman spectroscopy, gas chromatography (GC), GC–Mass (GC–MS), and high-performance liquid chromatography (HPLC) – RI/MALLS/Viscometry.

(The chain conformations of polysaccharides in solutions were investigated using static and dynamic light scattering, viscosity analysis based on the theory of dilute polymer solutions, circular dichroism analysis, and atomic force microscopy (AFM) including single molecular AFM and AFM-based single-molecule force spectroscopy fluorescence correlation spectroscopy and NMR spectroscopy.)

# 1.1. La composition

## FTIR Spectroscopy





# 1.1. La composition

## FTIR Spectroscopy

FTIR spectroscopy is used to investigate the vibrations of molecules and polar bonds between the different atoms. Structures of polysaccharides, such as monosaccharide types, glucosidic bonds and functional groups, can be analyzed using FTIR spectroscopy. In the range of 1100-1010  $\text{cm}^{-1}$ , three strong absorption peaks appear for pyranoside, and two peaks for furanoside.

The stretching vibration ( $\nu$ ) of some pyranoses (Zhang, 1994).

Type	Stretching vibration ( $\text{cm}^{-1}$ )
$\alpha$ -D-Glucose	855–833
$\beta$ -D-Glucose	905–876
$\alpha$ -D-Galactose	839–810
$\beta$ -D-Galactose	914–866
$\alpha$ -D- or $\alpha$ -D-Mannose	843–818
$\beta$ -D-Mannose	898–888
$\alpha$ -D-Xylose	760–740
$\beta$ -D- or $\beta$ -L-Arabinose	855–830

# 1.1. La composition

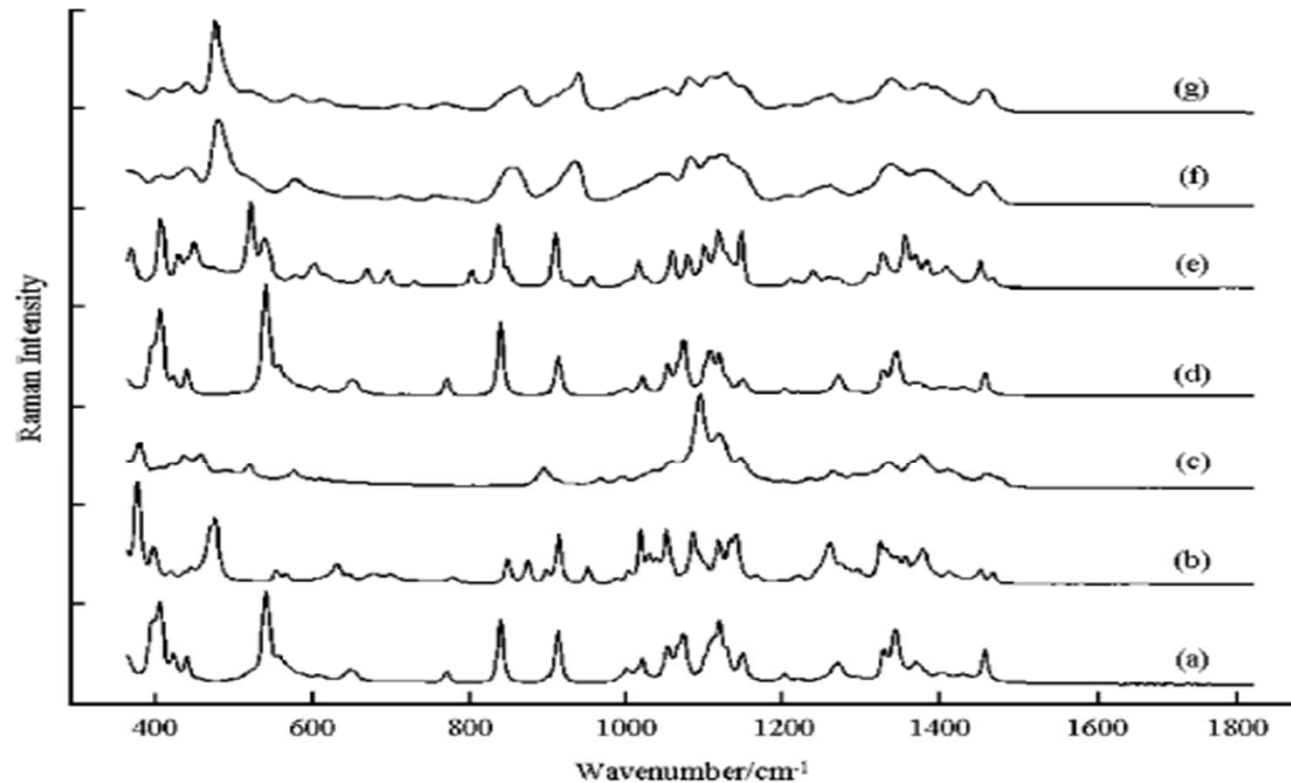
## Raman Spectroscopy

Compared with FTIR spectroscopy, Raman spectroscopy is sensitive to detect the vibrations of molecules and nonpolar bonds of the same atom. It is suitable to characterize the helical conformation and the plane fold of biomacromolecules.

The Raman spectra of saccharides can be divided into four regions: the bands in the range of 350–600  $\text{cm}^{-1}$  are assigned to skeletal modes of pyranose rings; the anomeric region is from 600 to 950  $\text{cm}^{-1}$ ; the glycosidic stretching modes appear in the region 950–1200  $\text{cm}^{-1}$ ; and the  $\text{CH}_2$  and C–OH deformations region is from 1200 to 1500  $\text{cm}^{-1}$ .

# 1.1. La composition

## Raman Spectroscopy



**Figure 7.** Raman spectra of saccharides: (a)  $\beta$ -D-glucose, (b) lactose, (c) cellulose, (d) D-(+)-dextrose, (e) D-(+)-trehalose, (f) amylose, (g) amylopectin.

# 1.1. La composition

## Raman Spectroscopy

Some authors reported that the FT-Raman spectra of carrageenan, alginic acid and agar exhibited a higher resolution than FTIR spectra in the region of 500–1500  $\text{cm}^{-1}$ , which were sensitive to the type of polysaccharide and to the type of glycosidic linkage.

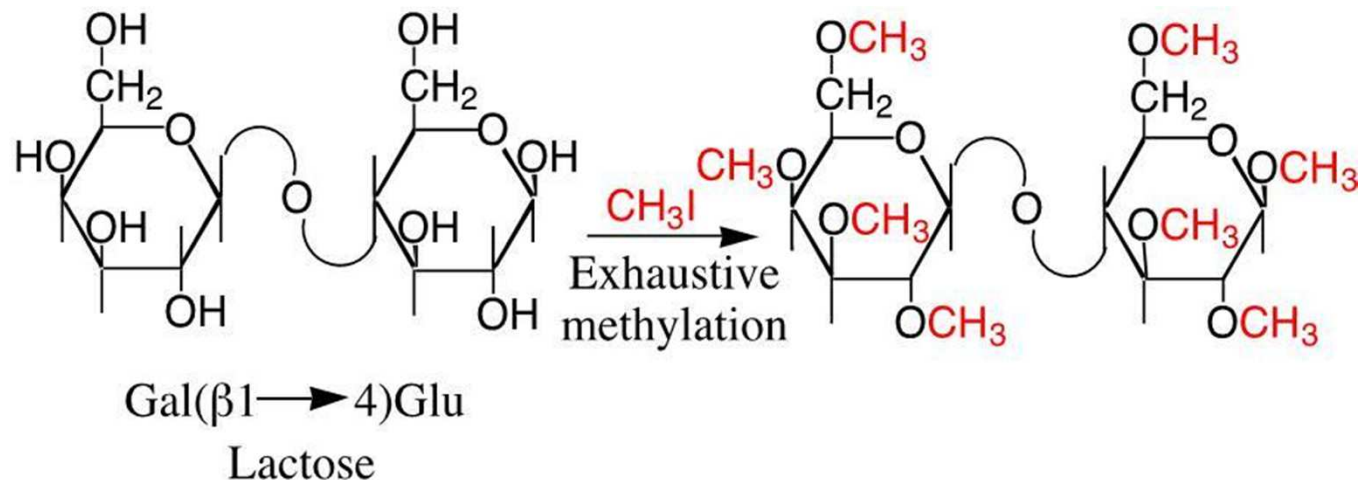
The Raman bands of some saccharides.

Type	Band ( $\text{cm}^{-1}$ )	
	Skeletal modes of pyranose rings	Modes of anomeric carbons
$\alpha$ -D-Glucose	440	842
$\beta$ -D-Glucose	440	900
Trehalose	449	839
$\alpha$ -D-Maltose		848
$\beta$ -D-Isomaltose		905
Amylose	481	865
Amylopectin	477	850
Dextran	543	844

# 1.1. La composition

## Chemical analysis and chromatography

The monosaccharide compositions, types of glycosidic linkages and branching of polysaccharides may be also analyzed by chemical analysis and chromatography. GC, GC–MS and HPLC methods are employed after polysaccharides are hydrolyzed by trifluoroacetic acid (TFA), or are derived by the methylation, periodic acid oxidation and Smith degradation.



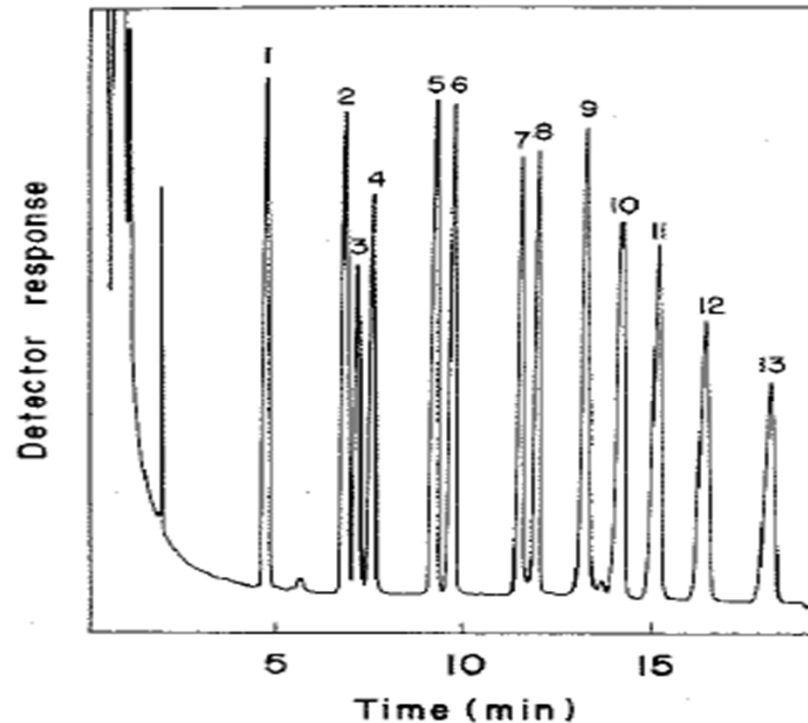
# 1.1. La composition

## Chemical analysis and chromatography

Obtention des ratios en différents monosaccharides

294

A. B. BLAKENEY, P. J. HARRIS, R. J. HENRY, B. A. STONE



GC-FID

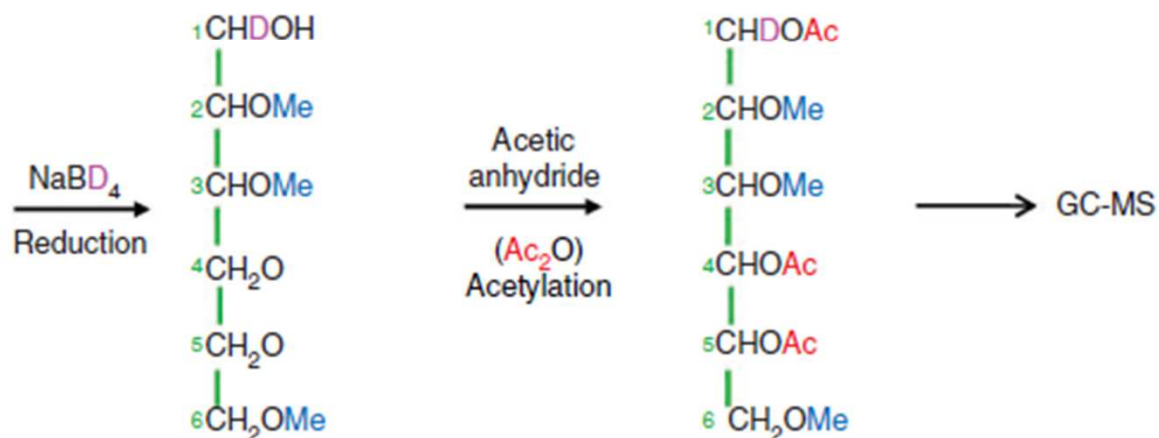
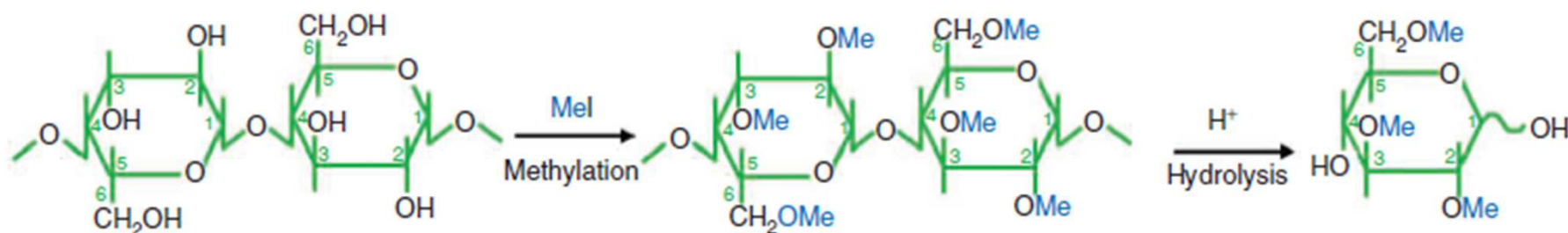
Rien sur le type  
de liaisons

Fig. 1. Separation of alditol acetates by gas-liquid chromatography on a Silar 10C glass-capillary column. The temperature was kept at 190° for 4 min and then increased to 230° at 4°/min. 1, erythritol; 2, 2-deoxy-erythro-pentitol; 3, rhamnitol; 4, fucitol; 5, ribitol; 6, arabinitol; 7, xylitol; 8, 2-deoxy-arabino-hexitol; 9, allitol; 10, mannitol; 11, galactitol; 12, glucitol; and 13, myo-inositol.

# 1.1. La composition

## Chemical analysis and chromatography

Obtention du type de liaison par méthylation –  
acétylation successives / analyse GC-MS



# 1.1. La composition

## NMR spectroscopy

Développée au point 1.3



# 1.2. La taille

## Quelques caractéristiques des polymères

### Degré de polymérisation

Le degré de polymérisation moyen ( $\overline{DP}$ ) est égal au nombre moyen de monomères dans un polymère.

$$\overline{DP} = \frac{\overline{M}}{M_0}$$

Avec:

$\overline{M}$ , masse molaire moyenne

$M_0$ , masse molaire d'un résidu monomérique

Pour  $1 < DP < \sim 10$ , on parle d'oligomères.

# 1.2. La taille

## Quelques caractéristiques des polymères

### **Masse moléculaire moyenne en nombre**

La masse moléculaire moyenne en nombre ( $\overline{M}_n$ ) est la moyenne des masses molaires pondérée par le nombre de chaînes de chaque longueur. Cette grandeur ne dépend que du nombre de molécules de polymère, indépendamment de leur forme et leur masse.

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_i N_i \cdot M_i}{\sum_i N_i}$$

Avec:

$N_i$ , nombre de polymères de masse moléculaire  $M_i$

# 1.2. La taille

## Quelques caractéristiques des polymères

### **Masse moléculaire moyenne en masse**

La masse moléculaire moyenne en masse ( $\overline{M}_w$ ) est la moyenne des masses molaires pondérée par la masse de chaînes de chaque longueur. Cette grandeur ne dépend pas que du nombre de molécules, mais de la masse des molécules de polymère.

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_i N_i \cdot M_i^2}{\sum_i N_i \cdot M_i} = \frac{\sum_i w_i \cdot M_i}{\sum_i w_i}$$

Avec:

$w_i$ , masse totale de toutes les molécules de masse moléculaire  $M_i$

# 1.2. La taille

## Quelques caractéristiques des polymères

### **Polydispersité**

L'indice de polydispersité ( $I$ ) donne une première idée de la distribution des masses molaires des différentes molécules au sein du polymère.

$$I = M_w / M_n$$

Pour un polymère parfait, où toutes les molécules auraient la même longueur (et donc même masse molaire),  $I$  serait égal à 1.

# 1.2. La taille

## Mesures de la masse moléculaire des polymères

### **Spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse (SM) peut être utilisée pour étudier les macromolécules, seule ou couplée avec un système de chromatographie (GC, HPLC, SFC). En plus de données structurales, la SM permet d'obtenir les valeurs de MM des différentes longueurs de chaînes constituant un polymère. La méthode est destructive car au cours de l'analyse les substances sont ionisées puis fragmentées. L'analyse des fragments informe sur la structure des molécules. Chacun des ions formés est caractérisé par son rapport masse/charge ( $m/z$ ) ; l'appareil est capable de séparer ces ions (par un champ magnétique) et de les détecter/caractériser.

# 1.2. La taille

## Mesures de la masse moléculaire des polymères

### **Spectrométrie de masse**

Par SM de type MALDI-TOF (couple une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol), les composés sont analysés de manière directe: ils sont volatilisés et ionisés par bombardements sous vide ; le faisceau d'ions ainsi formé est soumis à un champ électrique et à un champ magnétique et le temps de vol est déterminé via un détecteur ionique. Cette technique SM est la plus utilisée pour l'analyse de polymères ; les valeurs  $m/z$  des ions moléculaires ou des fragments renseignent sur la taille des différentes longueurs de chaîne. Toutefois si un mélange contient des proportions importantes d'oligomères, leurs ions moléculaires risquent d'occulter les fragments beaucoup moins nombreux issus des polymères plus gros.

# 1.2. La taille

Mesures de la masse moléculaire des polymères

## **Séparation de polymères par chromatographie d'exclusion stérique**

Il existe plusieurs dénominations: chromatographie de perméation sur gel, filtration sur gel, chromatographie d'exclusion de taille ou d'exclusion stérique (HPSEC en anglais).

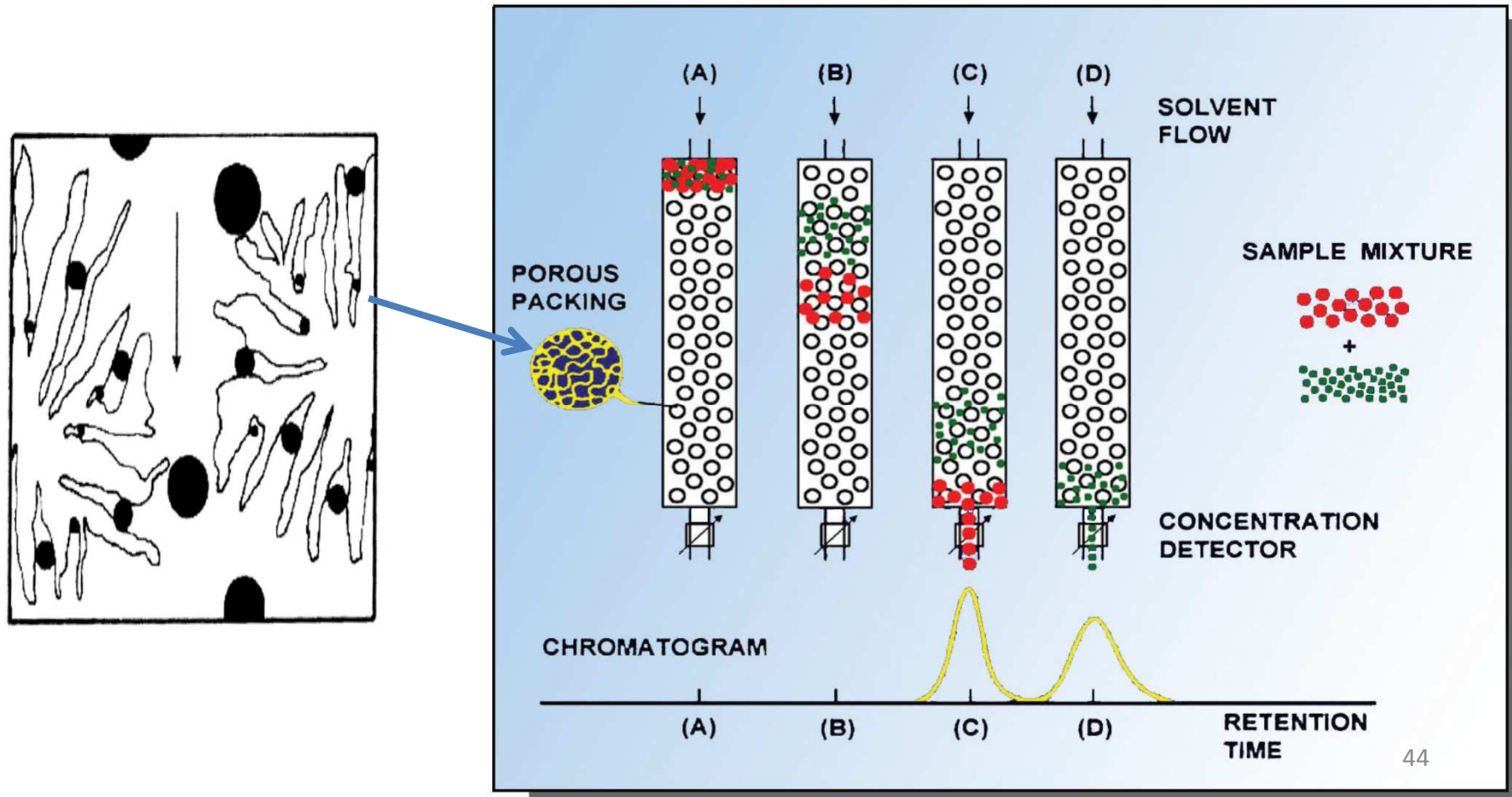
L'HPSEC permet de séparer sur colonne des composés suivant leur volume hydrodynamique. Les composés de taille plus importante sont élués en premier, ceux de taille plus réduite sont davantage retenus car ils forment de nombreuses interactions avec la matrice poreuse.

Une technique de détection associée à l'HPSEC permet ensuite de détecter les composés séparés et de les caractériser. Il existe différentes détections possibles.

# 1.2. La taille

## Mesures de la masse moléculaire des polymères

### Séparation de polymères par chromatographie d'exclusion stérique



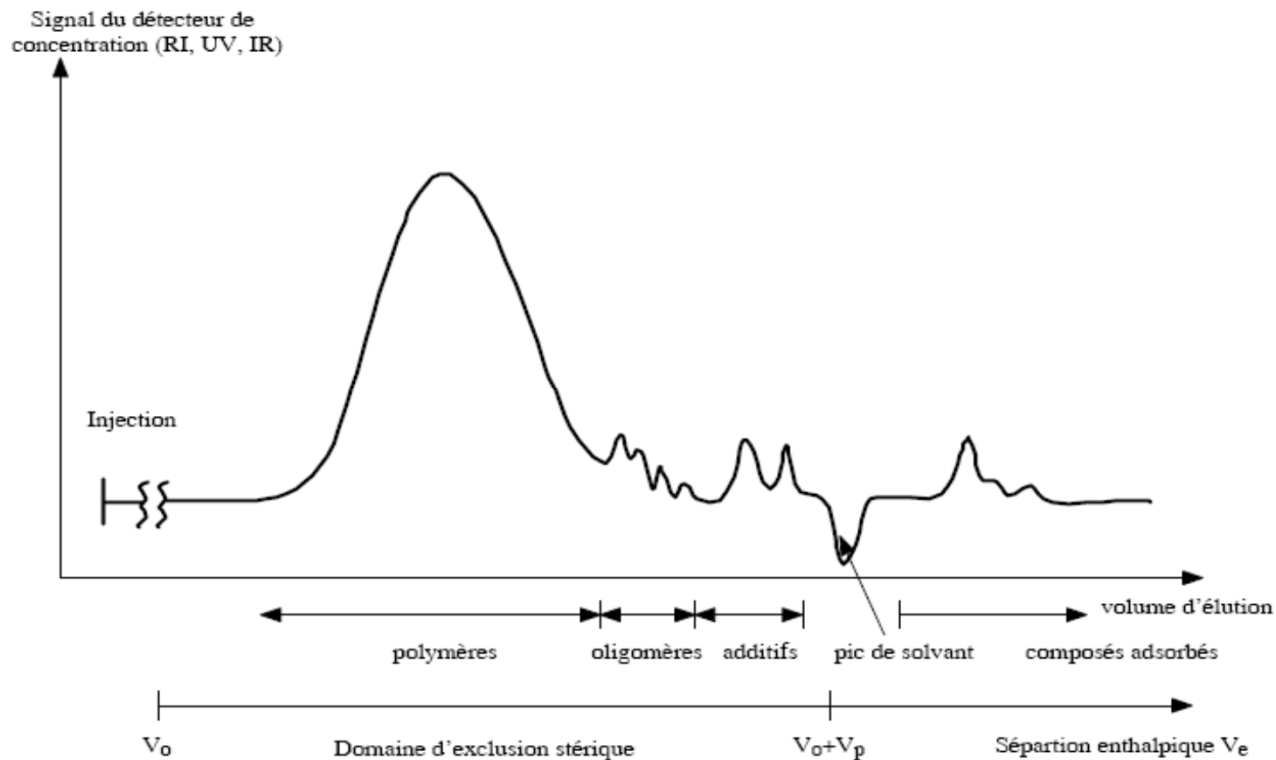


# 1.2. La taille

## Mesures de la masse moléculaire des polymères

### Détecteurs de concentration

Il s'agit des techniques de réfractométrie (RI) et de spectroscopie UV ou infrarouge.



# 1.2. La taille

Mesures de la masse moléculaire des polymères

## Détecteurs de concentration

La détection UV présente un intérêt si les polymères absorbent dans l'UV (protéines, lignines,...).

De manière générale et en particulier pour les polysaccharides, le détecteur RI (ou réfractomètre différentiel) est le plus utilisé. Il mesure une différence d'indice de réfraction entre une cellule étalon qui contient de l'éluant pur et une cellule de détection où s'écoule l'échantillon élué.

# 1.2. La taille

## Mesures de la masse moléculaire des polymères

### Détecteurs de concentration

Le signal  $RI$  suit la relation:

$$RI = K \cdot dn/dc \cdot C$$

Avec:

$K$ , constante ;  $C$ , la concentration ;  $dn/dc$ , la variation de l'indice de réfraction  $n$  avec la concentration

$$dn/dc = (n - n_0)/C$$

Avec:

$n_0$ , la valeur  $n$  de la référence.

La grandeur  $dn/dc$  est caractéristique d'un composé. Le signal obtenu est proportionnel à la concentration.

La détection  $RI$  peut également être utilisée pour déterminer la MM des composés. Pour cela un étalonnage externe est nécessaire.

# 1.2. La taille

## Mesures de la masse moléculaire des polymères

### Détecteurs de viscosimétrie

La viscosimétrie permet la détermination de la viscosité intrinsèque ( $IV$ ) d'un polymère.  $IV$  est la viscosité spécifique normalisée en concentration d'un polymère en solution à dilution infinie.  $IV$  équivaut au volume par unité de masse qu'un polymère occupe dans une solution.

$$IV = [\eta] = \left. \frac{\eta_{sp}}{c} \right|_{c \rightarrow 0} \quad \eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$$

Avec:

$[h]$ , viscosité intrinsèque (en mL/g) ;  $h_{sp}$ , viscosité spécifique de la solution à concentration  $C$  (sans dimension) ;  $h_o$ , viscosité du solvant (sans dimension) ;  $h$ , viscosité de la solution.

# 1.2. La taille

Mesures de la masse moléculaire des polymères

## Détecteurs de viscosimétrie

Pour un polymère,  $\eta$  dépend de:

- la conformation (bâtonnet > pelote > sphère)
- la longueur de chaîne
- la ramification ( $\eta$  pour linéaire >  $\eta$  pour ramifiée)
- l'agrégation (diminution de  $\eta$ )

# 1.2. La taille

## Mesures de la masse moléculaire des polymères

### Détecteurs de viscosimétrie

La loi de Mark-Houwink-Sakurada relie la viscosité intrinsèque  $[\eta]$  à la MM viscosimétrique :  $[\eta] = K \cdot M^a$

Avec:

- K, constante de Mark-Houwink
- a, coefficient de Mark-Houwink relatif à la structure du polymère.

Les coefficients K et  $\alpha$  varient avec le couple solvant/polymère et la température.

En traçant le graphe de Mark-Houwink  $\text{Log}[\eta]$  en fonction de  $\text{Log}M$ , on a une relation linéaire qui donne  $\text{Log}K$ , la valeur à l'intersection et a la pente de la droite.

# 1.2. La taille

Mesures de la masse moléculaire des polymères

## Détecteurs de viscosimétrie

Le coefficient  $a$  varie de 0 à 2 suivant la structure de la molécule. Ainsi pour une structure sphérique  $a$  varie de 0 à 0,1, de 0,35 à 0,80 pour une structure aléatoire en pelote et de 1,5 à 2 pour une structure en bâtonnet rigide.

**Lien vers la conformation (point 1.4.)**

# 1.2. La taille

## Mesures de la masse moléculaire des polymères

### Détecteurs a diffusion de lumière

La lumière traversant une solution de polymères interagit avec les atomes des molécules qui vont provoquer une irradiation dans toutes les directions.

L'intensité de la lumière diffusée varie avec l'angle sous lequel elle est mesurée.

Il existe différents types de détecteurs de lumière diffusée, mesurant:

- la diffusion (laser) à angle faible (LA(L)LS): l'intensité de la lumière diffusée est mesurée au niveau de l'angle le plus faible possible (généralement  $7^\circ$ ).
- la diffusion (laser) à angle droit (RA(L)S): l'intensité de la lumière diffusée est mesurée à  $90^\circ$

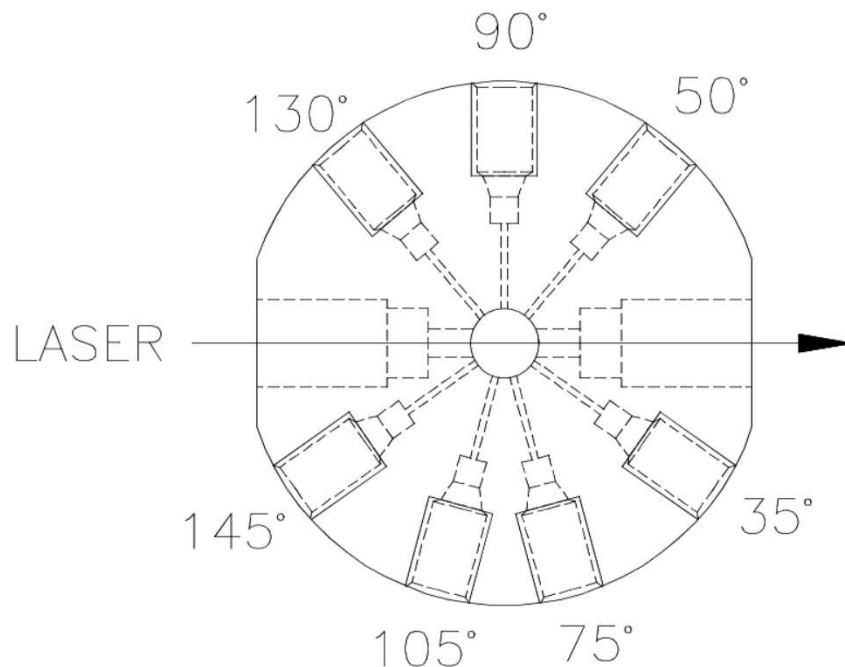


# 1.2. La taille

## Mesures de la masse moléculaire des polymères

### Détecteurs a diffusion de lumière

- la diffusion (laser) multi-angle (MA(L)LS): l'intensité de la lumière diffusée est mesurée sous différents angles (les appareils du marché possèdent 3, 7 ou 18 angles).



# 1.2. La taille

## Mesures de la masse moléculaire des polymères

### Détecteurs a diffusion de lumière

La diffusion de lumière dans une solution composée de polymères dans un solvant, est gouvernée par l'équation de Rayleigh:

$$\frac{KC}{\Delta R(\theta, C)} = \frac{1}{M_w} \left( 1 + \frac{R_g^2 q^2}{3} \right) + 2A_2 \cdot C$$

Avec:

$R(\theta, C)$ , rapport de Rayleigh, pour un angle de diffusion  $\theta$  et une concentration  $C$  ;  $M_w$ , masse moléculaire moyenne ;  $C$ , concentration de la solution ;  $K$ , constante optique ;  $R_g$ , rayon de giration ;  $q$ , vecteur de diffusion de la lumière polarisée verticalement ;  $A_2$ , deuxième coefficient de viriel

# 1.2. La taille

Mesures de la masse moléculaire des polymères

## Détecteurs a diffusion de lumière

La mesure de la lumière diffusée, associée à d'autres détecteurs permet de déterminer sans calibration la MM d'un polymère.

A angle de diffusion nul, la relation devient:

$$\theta \rightarrow 0^\circ \quad \frac{KC}{R_0(C)} = \frac{1}{M_w} + 2A_2 * C$$

# 1.2. La taille

## Mesures de la masse moléculaire des polymères

### La triple détection

En associant une séparation par HPSEC avec les trois détections RI, viscosimétrie et diffusion de lumière, on parle de triple détection.

Une telle association présente l'avantage de donner sans calibration des informations directes sur les polymères. Ces informations sont:

- la distribution
- les valeurs de  $M_n$ ,  $M_w$  et de polydispersité  $I$
- la taille des macromolécules avec  $R_g$  et  $R_h$
- la viscosité intrinsèque  $IV$  et ainsi des éléments sur la conformation des polymères
- le degré de ramification des polymères  $g$  (et la fréquence de ramification  $l$ )
- les constantes de Mark-Houwink  $a$  et  $K$  et ainsi des éléments sur la structure des polymères
- la valeur  $dn/dc$  si la concentration exacte de la solution analysée est connue ou l'inverse.

# 1.3. La structure fine

## Répartition des substituants

### Cas des galactomannanes - **Enzymes**

L'intérêt commercial porté aux galactomannanes a débouché sur l'étude de la distribution des résidus D-galactopyranoses sur la chaîne principale de résidus D-mannopyranoses. Malgré l'utilisation relativement ancienne de ces gommes, l'élucidation de la structure fine des galactomannanes n'a débuté que bien plus tard (années 1960-1970), avec l'apparition et la généralisation de certaines techniques de mesure.

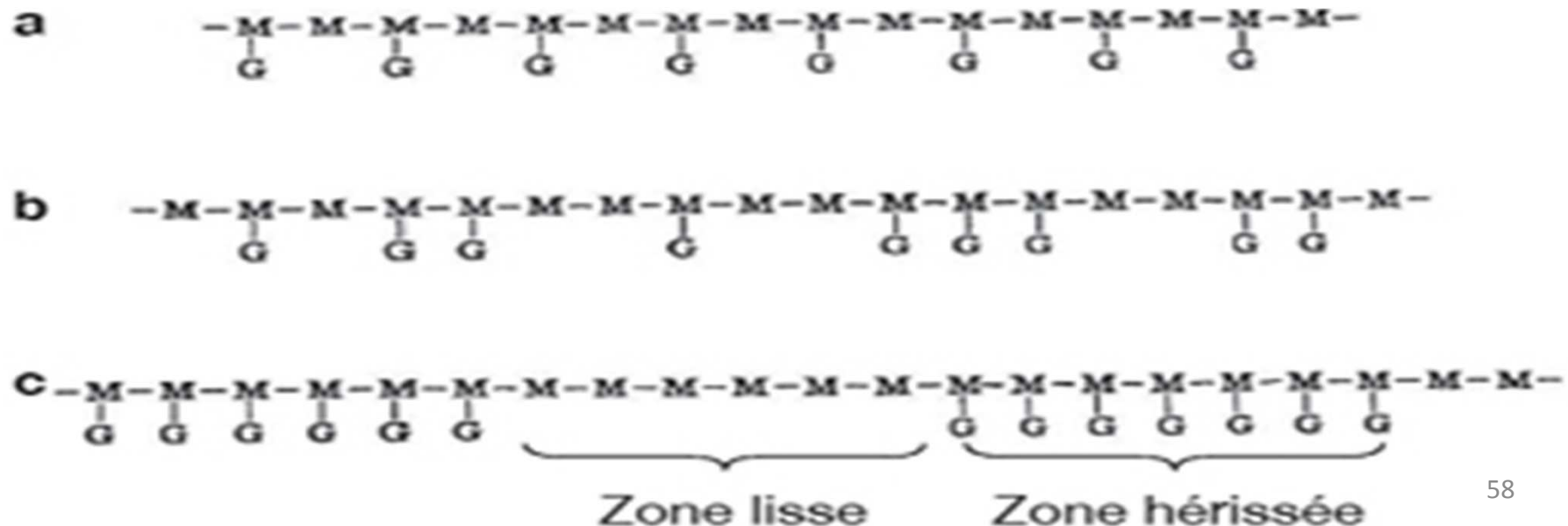
Les premières études réalisées ont mis en œuvre des  $\alpha$ -D-galactosidases et des  $\beta$ -D-mannanases. Ces enzymes testées sur des galactomannanes, de même rapport M/G mais d'origines botaniques différentes, ont généré des cinétiques d'hydrolyse et des produits de dégradation forts différents. Il apparaît ainsi que l'arrangement des substituants galactosyl sur la chaîne de mannose est très différent d'un galactomannane à l'autre et est vraisemblablement lié à l'espèce végétale d'origine.

# 1.3. La structure fine

## Répartition des substituants

### Cas des galactomannanes

Sur base de ces observations, différents types de répartition ont été proposés : la disposition régulière, la disposition aléatoire et la disposition en blocs uniformes. Des intermédiaires entre ces trois structures « types » peuvent également exister dans la nature.



# 1.3. La structure fine

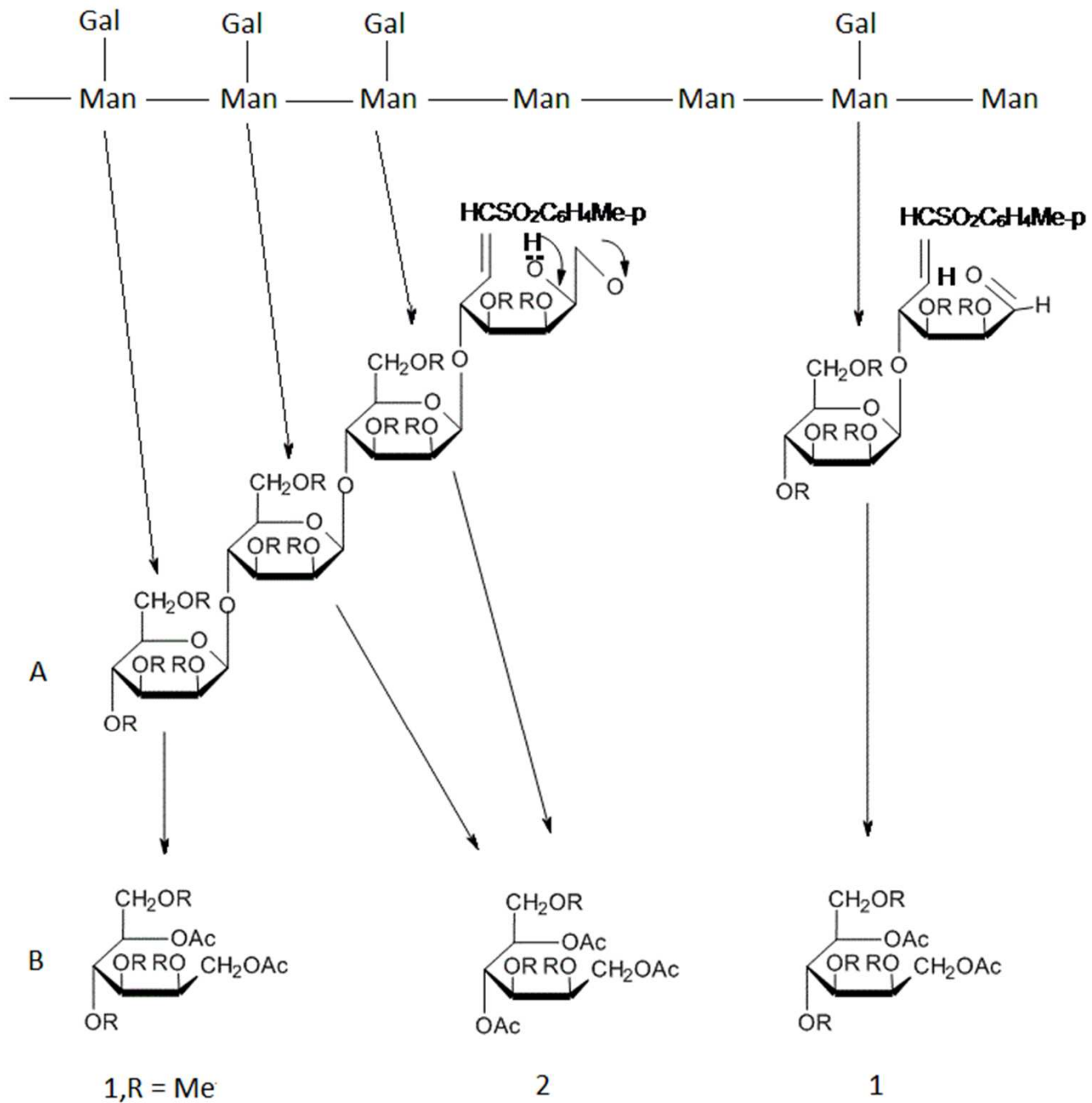
## Répartition des substituants

### Cas des galactomannanes – **Dégradation alcaline**

L'élucidation spécifique de la structure de la gomme de caroube a été proposée pour la première fois en 1975 en utilisant une technique de dégradation alcaline.

Cette étude a pu démontrer que la gomme de caroube ne contient pas de chaînes latérales disposées de manière régulière. Ses résidus latéraux sont situés sur des blocs de résidus mannose, chaque bloc substitué étant composé de 25 résidus mannose.

Détermination du « degree of blockiness »





# 1.3. La structure fine

## Répartition des substituants

### Cas des galactomannanes – **Modélisation informatique**

D'autres études réalisées mettent en œuvre une hydrolyse enzymatique suivie d'une simulation par ordinateur. Cette approche implique la caractérisation et la quantification des oligosaccharides produits par hydrolyse de galactomannanes par des  $\beta$ -mannanases hautement purifiées ainsi que la connaissance complète de la cinétique d'action de celles-ci.

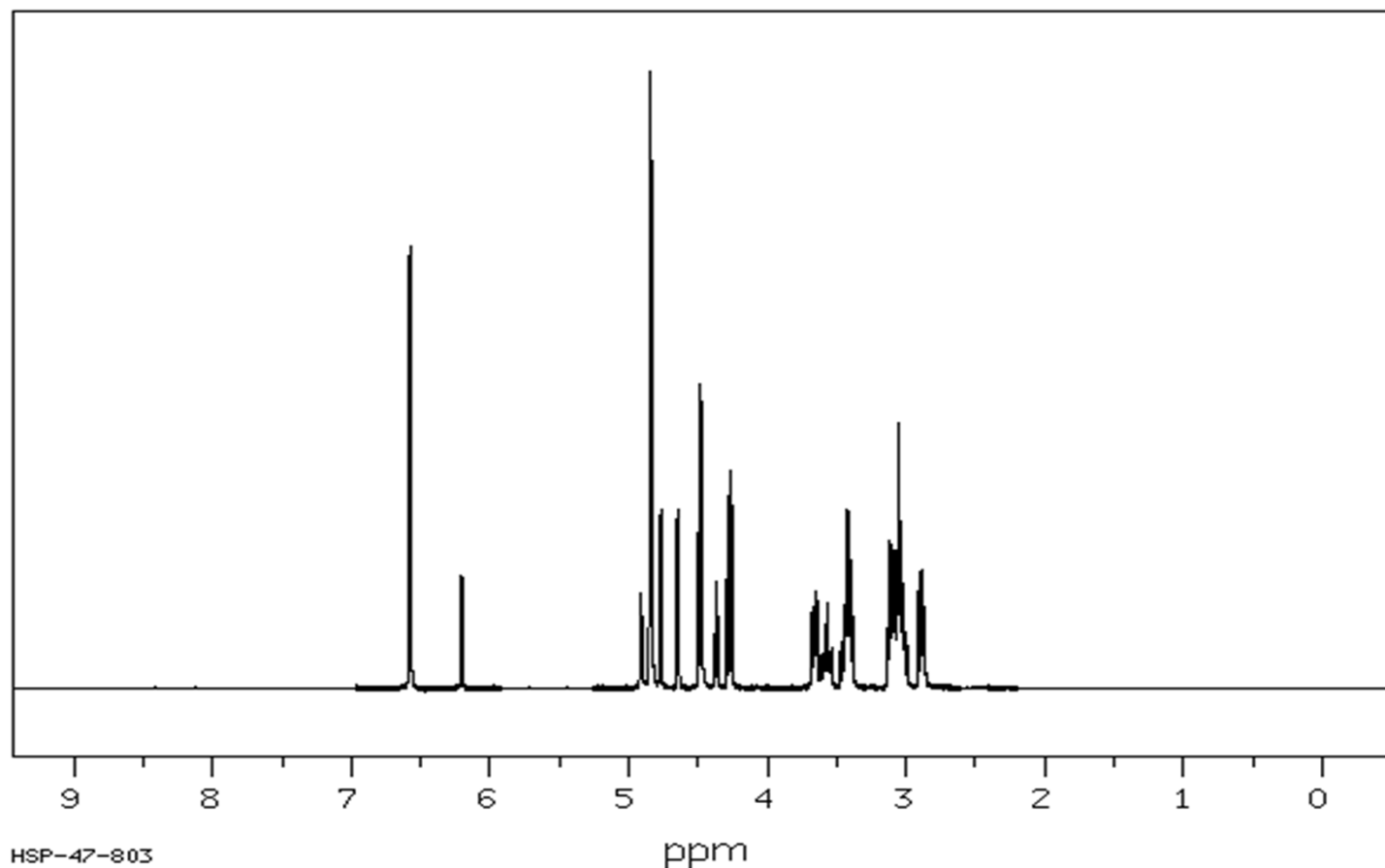
A partir de là, un modèle décrivant les besoins en sites de liaison des enzymes étudiées a été établi. En confrontant ce modèle aux oligosaccharides obtenus lors de l'hydrolyse, il est possible de déduire la structure originelle du polysaccharide étudié.

# 1.3. La structure fine

Répartition des substituants

## Cas des galactomannanes – RMN Spectrometry

La spectrométrie RMN peut fournir de nombreuses informations sur la composition mais également sur la structure fine des



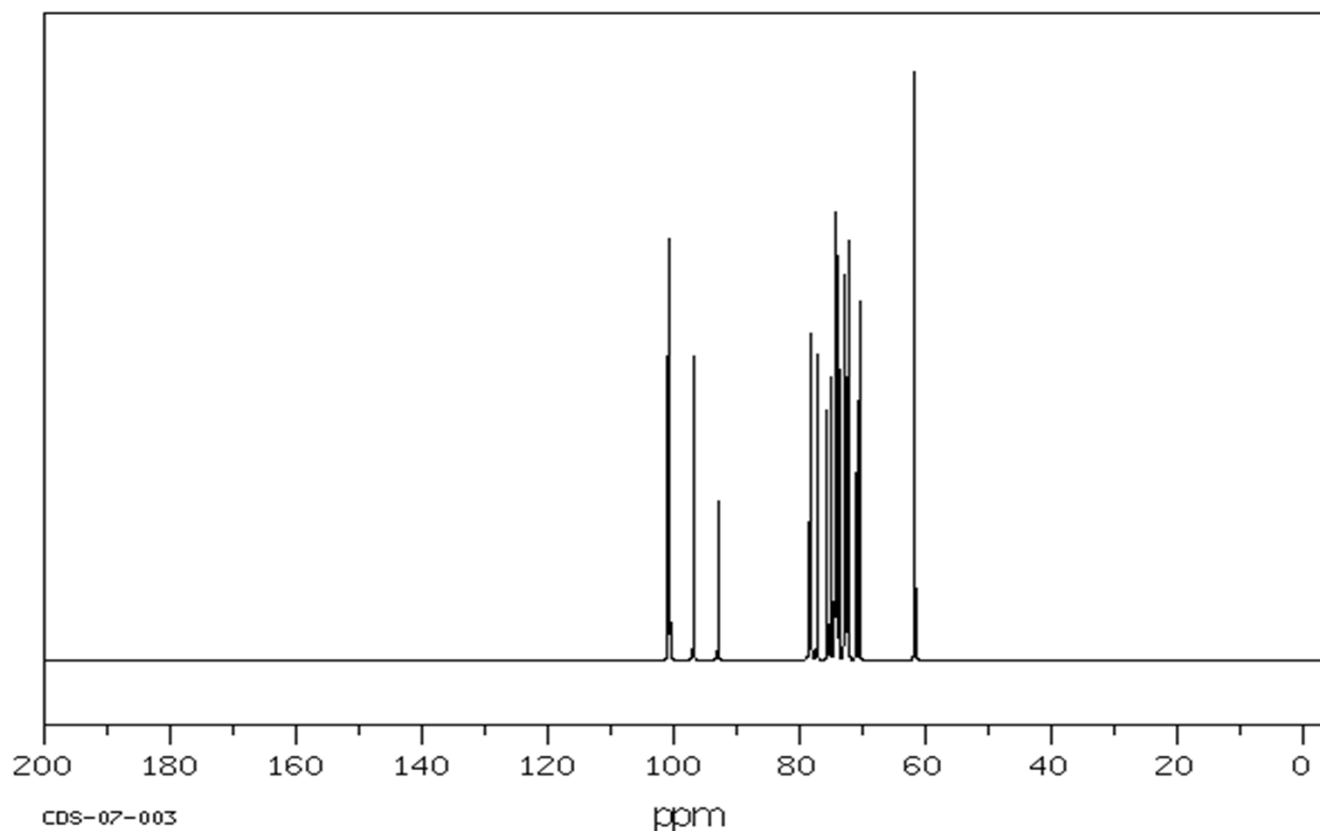
**<sup>1</sup>H NMR du D-glucopyranose**

# 1.3. La structure fine

Répartition des substituants

**Cas des galactomannanes – RMN Spectrometry**

La spectrométrie RMN peut fournir de nombreuses informations sur la composition mais également sur la structure fine des



**<sup>13</sup>C NMR du D-maltotriose**

# 1.3. La structure fine

## Répartition des substituants

### Cas des galactomannanes – **RMN Spectrometry**

La spectrométrie RMN peut fournir de nombreuses informations sur la composition mais également sur la structure fine des polysaccharides.

1. Saccharide residues: The anomeric carbon resonances of polysaccharides may be distinguished in the chemical shift ranges of 90–110 ppm, thus the saccharide residues is firstly determined in their  $^{13}\text{C}$  NMR spectra. In consequence, the anomeric proton resonances in the chemical shift ranges of 4.4–5.5 ppm will be confirmed through the relations of protons and carbons from H, C-COSY, HMQC and HSQC.

# 1.3. La structure fine

## Répartition des substituants

### Cas des galactomannanes – **RMN Spectrometry**

2. Constituent monosaccharides: The cross peaks of H2, H3, H4, H5 and H6 of polysaccharides can be recognized step by step based on the cross peak of the anomeric proton in homonuclear DQF-COSY, TOCSY and COSY-45 spectra. In addition, the  $^{13}\text{C}$  chemical shifts of C2, C3, C4, C5 and C6 can be found in heteronuclear H, C-COSY, HMQC and HSQC spectra based on the chemical shifts of such protons. Consequently, the assignments of individual residues of polysaccharides can be made according to the chemical shifts of most monosaccharides reported in the literature.

# 1.3. La structure fine

## Répartition des substituants

### **Cas des galactomannanes – RMN Spectrometry**

3. Glycosidic linkage and sequence: The correlation between the anomeric protons on one monosaccharide and the carbons on another monosaccharide can be found in the HMBC spectrum. Then the glycosidic linkage and sequence of polysaccharides will be obtained. Such chemical structures can be confirmed through NOESY spectroscopy.

# 1.3. La structure fine

## Répartition des substituants

### Cas des galactomannanes – **RMN Spectrometry**

4. Anomeric configuration: The  $\beta$ -anomeric  $^{13}\text{C}$  resonances locate in the downfield compared to those of  $\alpha$ -anomer types for most saccharides. The chemical shifts of  $\beta$ -anomeric  $^{13}\text{C}$  locate in the range of 103–105 ppm, while the chemical shifts of  $\alpha$ -anomeric  $^{13}\text{C}$  are from 97 to 101 ppm.

The coupling constant ( $J$ ), like the vicinal coupling constant ( $^3J$ ), and the  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  coupling constants ( $^1J_{\text{CH}}$  and  $^4J_{\text{CH}}$ ) may help to recognize the anomeric conformations of saccharides. For example, the  $^1J_{\text{C}_1\text{-H}_1}$  values about 170 and 160 Hz indicate an  $\alpha$ -anomeric and a  $\beta$ -anomeric configuration for 1-4-D polysaccharide, respectively.

# 1.3. La structure fine

## Répartition des substituants

### Cas des galactomannanes – RMN Spectrometry

5. Position of substituted groups: The chemical shifts normally downfield shift about 0.2–0.5 ppm for protons and 6–7 ppm for  $^{13}\text{C}$  after the hydroxyl groups of polysaccharides are substituted by methyl, acetyl, sulfate and phosphate groups.

Chemical shifts of substituted groups of polysaccharides.

Substituted groups	Chemical shift		
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^{31}\text{P}$
Methyl	1.28	17.8	–
Acetyl	2.02	24.8	–
Carboxyl	–	176.7, 177.3	–
Phosphate	–	–	–0.78, –1.67

Il est également possible de mesurer colorimétriquement le degré de substitution de ces différents groupements



# 1.3. La structure fine

## Répartition des substituants

### Cas des galactomannanes – **RMN Spectrometry**

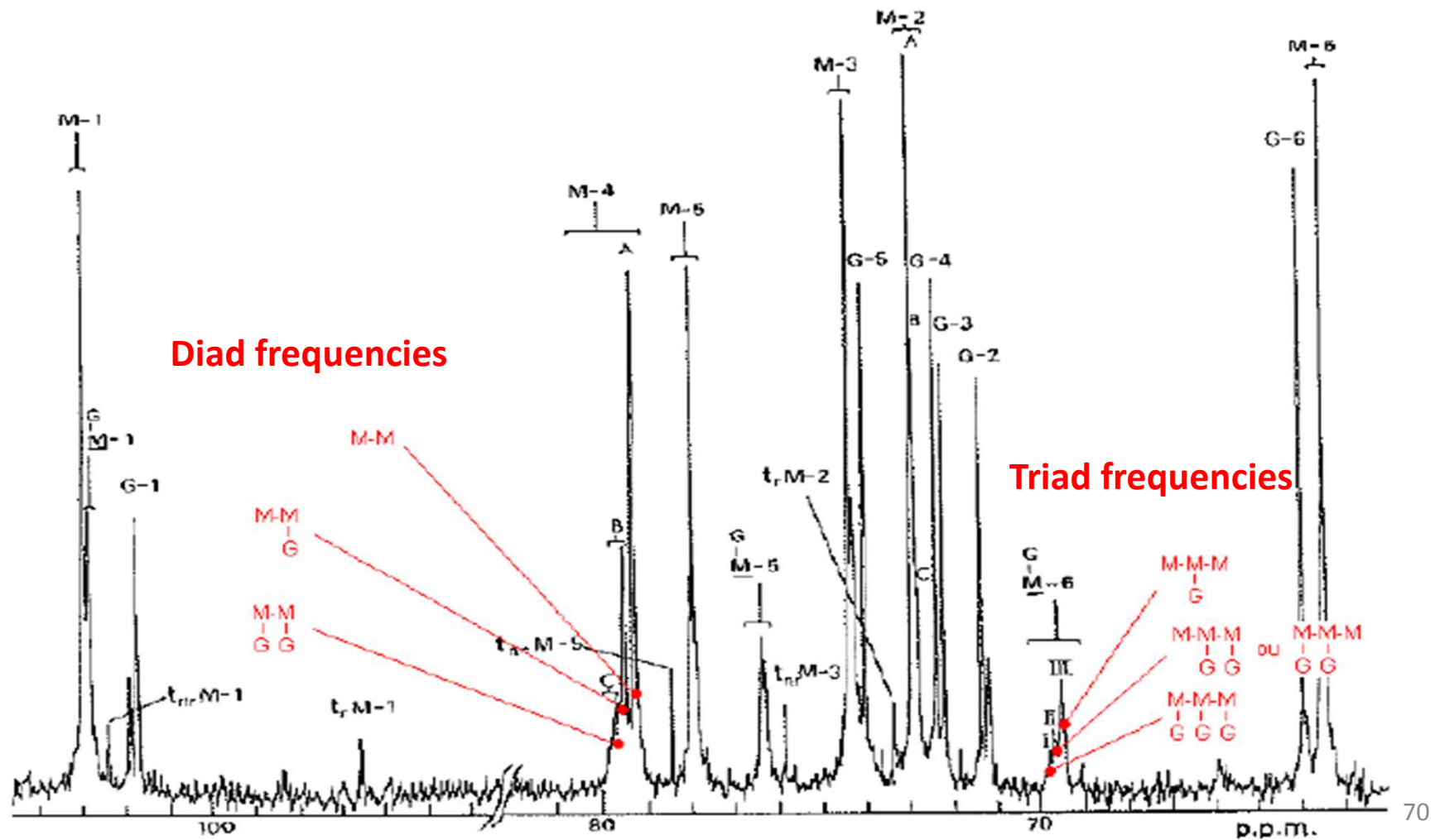
5. La présence de substituants saccharidiques influence également le déplacement chimique en  $^{13}\text{C}$  RMN :

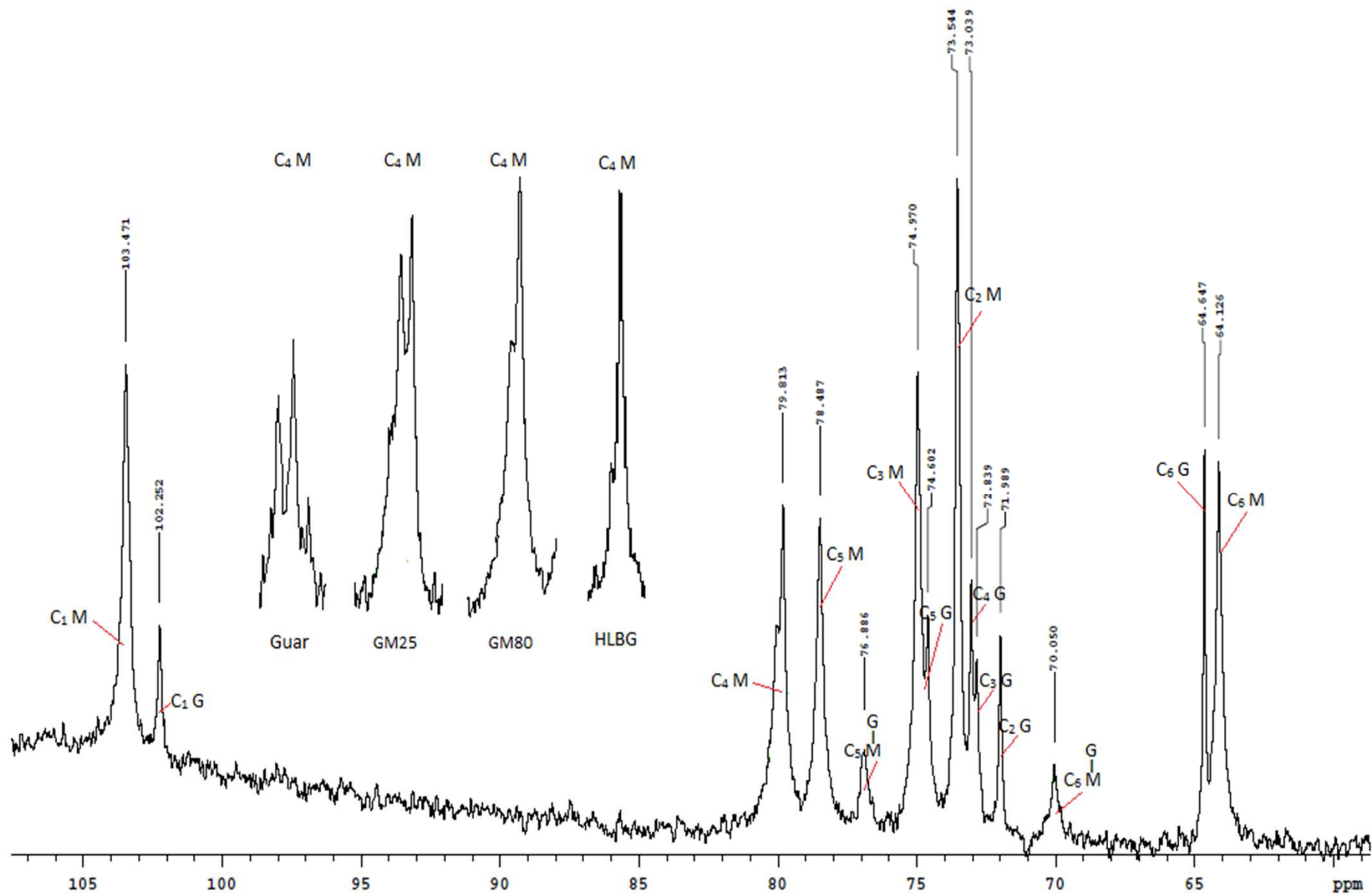
- Substituant sur un résidu adjacent : déplacement du  $\text{C}_4$  Man non-substitué
- Substituant(s) situé(s) de part et d'autre d'un résidu (ou d'un seul côté): déplacement du  $\text{C}_6$  Man substitué

# 1.3. La structure fine

## Répartition des substituants

### Cas des galactomannanes – RMN Spectrometry





# 1.4. La conformation

## 2. Les propriétés

Les polysaccharides peuvent conférer de nombreuses propriétés aux solutions dans lesquelles ils sont solubilisés/dispersés. Ils agissent ainsi notamment sur :

- Viscosité
- Viscoélasticité
- Formation de gel
- Emulsification
- Stabilisation colloïdale
- Texture
- Etc.

La viscosité, la viscoélasticité et la formation de gel seront uniquement abordées sommairement, ici.

## 2. Les propriétés

### Propriétés gélifiantes et épaississantes

- La gélification est un phénomène par lequel les molécules s'agrègent pour former un réseau ordonné (liaisons intermoléculaires plus ou moins fortes)
- La structure gélifiée implique la formation d'un réseau tridimensionnel présentant un comportement (semi-)solide
- Le solvant (eau) est emprisonné dans ce réseau et ne peut se déplacer librement

**Gélifier = figer le milieu**

## 2. Les propriétés

### Propriétés gélifiantes et épaississantes

- Si aucune liaison intermoléculaire n'est possible, on aura un épaississement pur. Le colloïde ne pourra donner que des solutions visqueuses
- L'épaississement entraîne une modification de l'aspect (notion de viscosité) et de texture

**Epaissir = changer la mobilité du milieu**

## 2. Les propriétés

### Propriétés gélifiantes et épaississantes

- La caractérisation des propriétés gélifiantes et épaississantes se fait à plusieurs niveaux :
  - Méthodes viscosimétriques (propriétés d'écoulement et propriétés viscoélastiques)
  - Analyse de texture (force de gel)
  - Influence de la concentration (détermination de la concentration minimale de gélification)
  - Comportement thermique (gélification à chaud/à froid, thermoréversibilité)



## 2.1. La viscosité

### Approche intuitive

- Passer son doigt dans de l'eau ou dans du miel
- La « résistance » de la solution est différente
- Passer son doigt avec la même « force » dans du miel et dans de l'eau, il avancera plus vite dans l'eau
- Passer son doigt à la même « vitesse » dans du miel et dans de l'eau, l'effort demandé sera plus important dans le cas du miel

## 2.1. La viscosité

### Approche intuitive

- Notion de viscosité
- La grande majorité des liquides ont un comportement intermédiaire entre les liquides et les solides, étant souvent à la fois **élastiques** et **visqueux**
- La résistance d'un fluide à toute modification irréversible des éléments de son volume s'appelle la viscosité

## 2.1. La viscosité

### Loi fondamentale

Isaac Newton fut le premier à établir la loi fondamentale de la viscosité décrivant le comportement de l'écoulement d'un liquide idéal

:  $\tau = \eta \times D$ , avec

$\eta$ , la viscosité (Pa x s)

$D$ , le gradient de vitesse ( $dv/dy = s^{-1}$ )

$\tau$ , la contrainte tangentielle (force/surface = Pa)

## 2.1. La viscosité

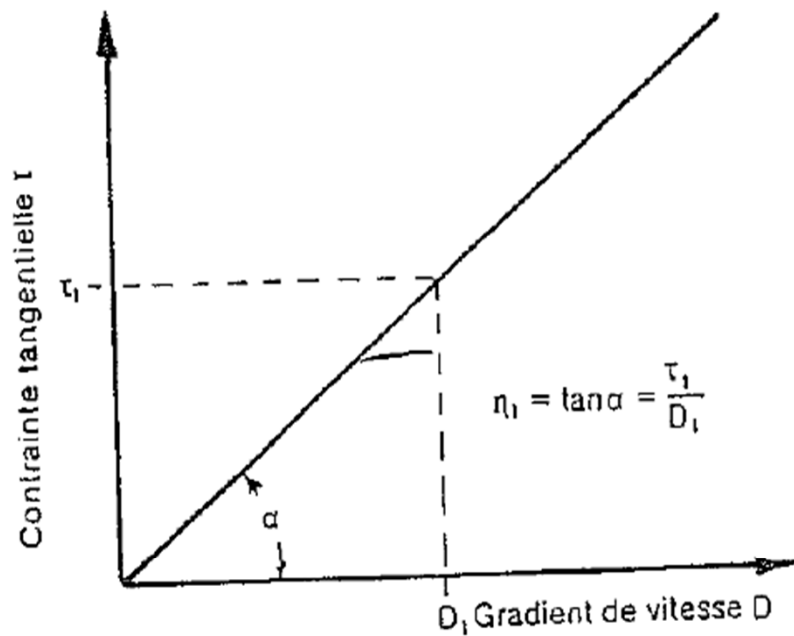
### Courbe d'écoulement

La corrélation entre le gradient de vitesse et la contrainte tangentielle définissant la capacité d'écoulement d'un fluide est exprimée dans un diagramme où  $\tau$  est porté en ordonnée et  $D$  en abscisse. Ce diagramme s'appelle « courbe d'écoulement ».

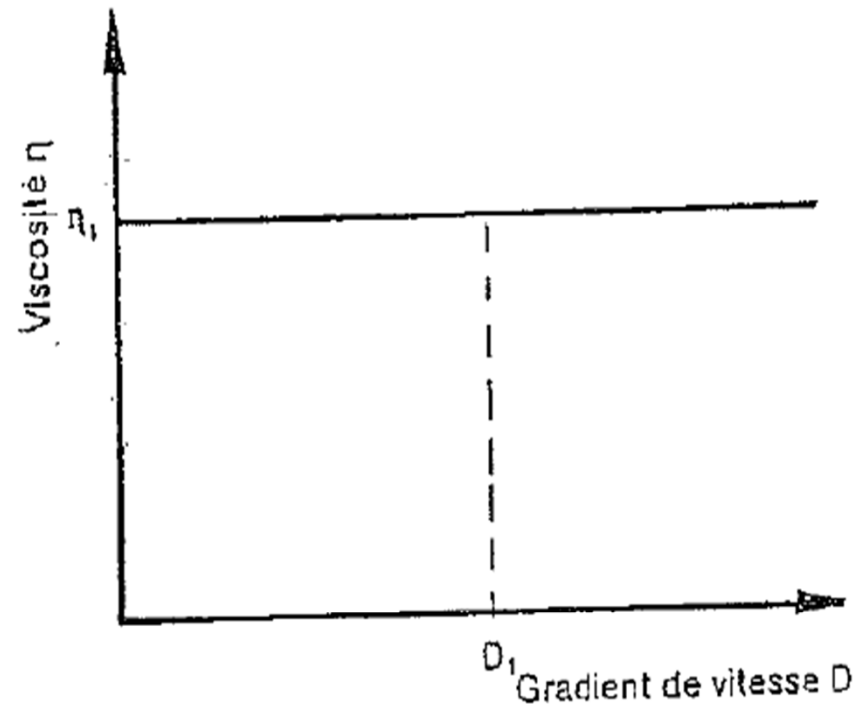
Un autre diagramme est très courant :  $\eta$  est porté en fonction de  $D$ . Ce diagramme est appelé « courbe de viscosité ».

# 2.1. La viscosité

## Courbe d'écoulement



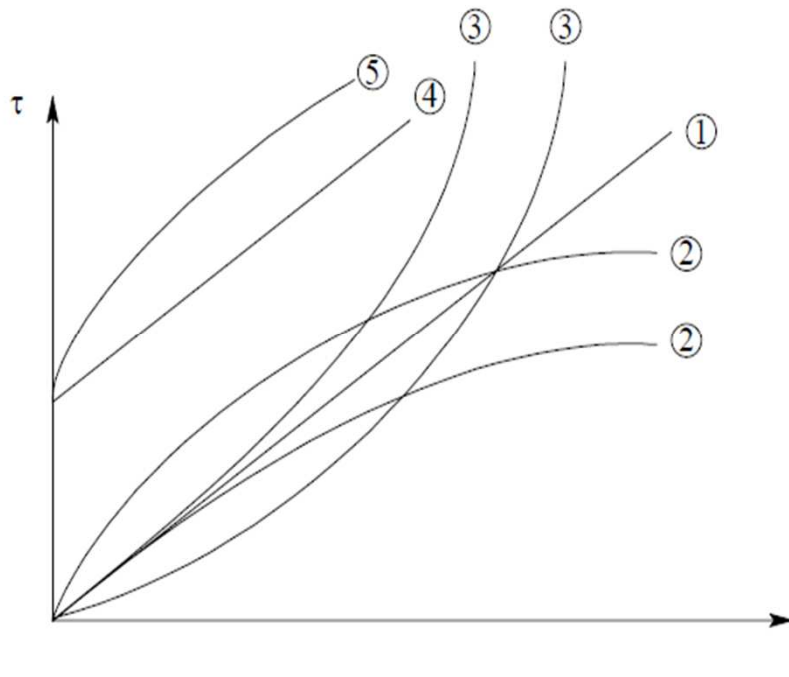
Courbe d'écoulement d'un "liquide newtonien"



Courbe de viscosité d'un "liquide newtonien"

# 2.1. La viscosité

## Courbe d'écoulement



① fluide newtonien  $\eta_a$  est constante

②  $\eta_a$  diminue quand  $\gamma$  augmente: fluide rhéofluidifiant ou pseudoplastique

③  $\eta_a$  augmente quand  $\gamma$  augmente: fluide rhéoépaississant ou dilatant

Les fluides ayant un comportement plastique ont un rhéogramme qui ne passe pas par l'origine, c'est-à-dire qu'il existe un seuil de plasticité  $\tau_0$ .

④ Plastique idéal (plastique de Bingham)

⑤ Plastique non idéal

On doit dépasser  $\tau_0$  pour que l'écoulement ait lieu (par exemple dentifrice).

## 2.1. La viscosité

### Courbe d'écoulement

**fluide rhéofluidifiant:** les molécules, sous l'effet de la vitesse de cisaillement ont tendance à s'aligner progressivement le long des couches ce qui favorise leur glissement relatif. Une seconde interprétation consiste à envisager une modification de la structure du matériau sous l'effet du gradient de vitesse (déstructuration par rupture de liaison de type Van der Waals, défloculation des particules...)

Cas du Ketchup

## 2.1. La viscosité

### Courbe d'écoulement

**fluide rhéoépaississant:** les causes d'origine moléculaire sont diverses et pas toujours élucidées. On peut invoquer l'augmentation du volume libre entre les particules. Au repos, il serait minimal, sous un gradient de vitesse en augmentation, il y a gonflement du liquide (les particules sont moins imbriquées). La phase continue n'est plus capable de combler les vides interparticulaires ni d'assurer une bonne lubrification.

Cas des amidons hydratés



## 2.1. La viscosité

### Courbe d'écoulement

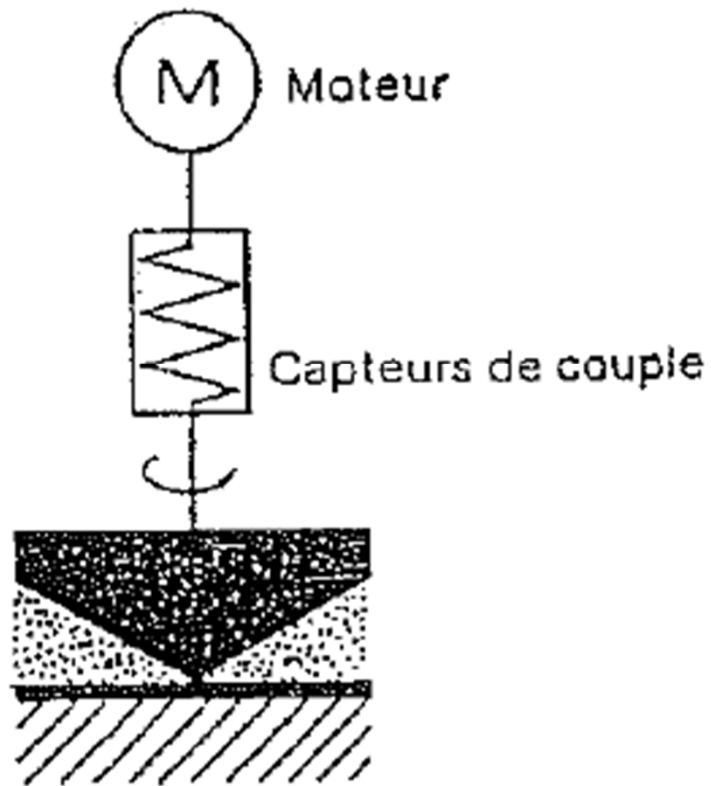
**fluide plastique:** au repos le liquide possède une structure tridimensionnelle rigide (particules emboîtées) ou floculées. Le seuil d'écoulement correspond à l'énergie nécessaire pour les séparer. Au-delà, l'écoulement s'effectue sous l'effet de la contrainte effective ( $\tau - \tau_c$ ).

Cas de la mayonnaise

# 2.1. La viscosité

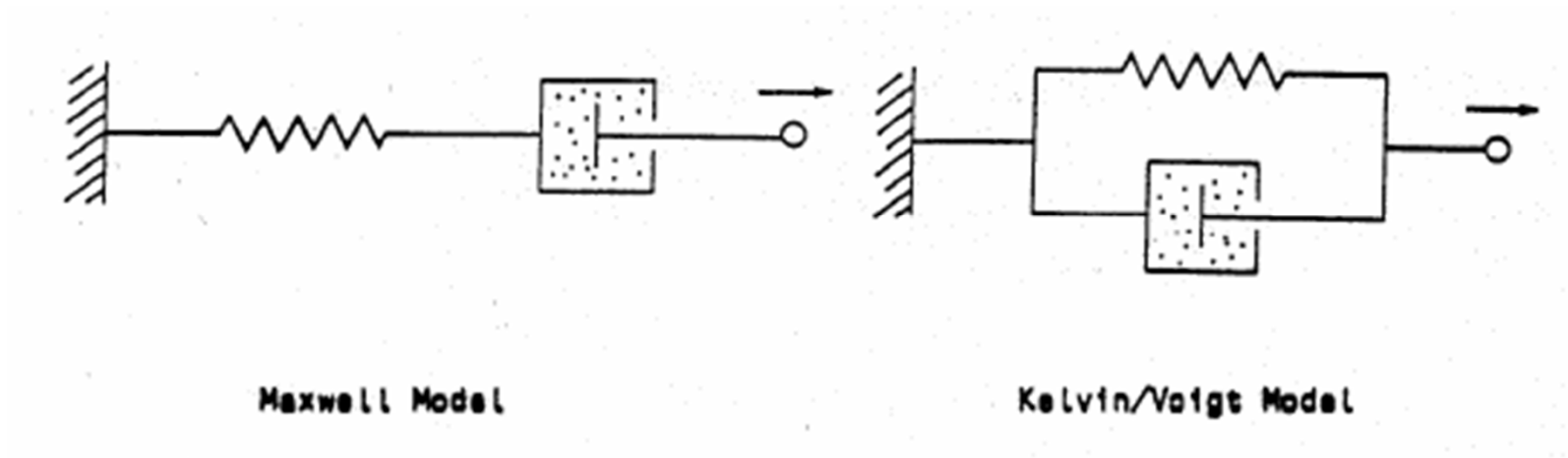
## Dispositif de mesure – système Searle

Dispositifs de mesure plan-cône



## 2.2. La viscoélasticité

Les fluides sont visqueux et élastiques



Modèles pour une substance viscoélastique  
(Maxwell et Kelvin/Voigt)

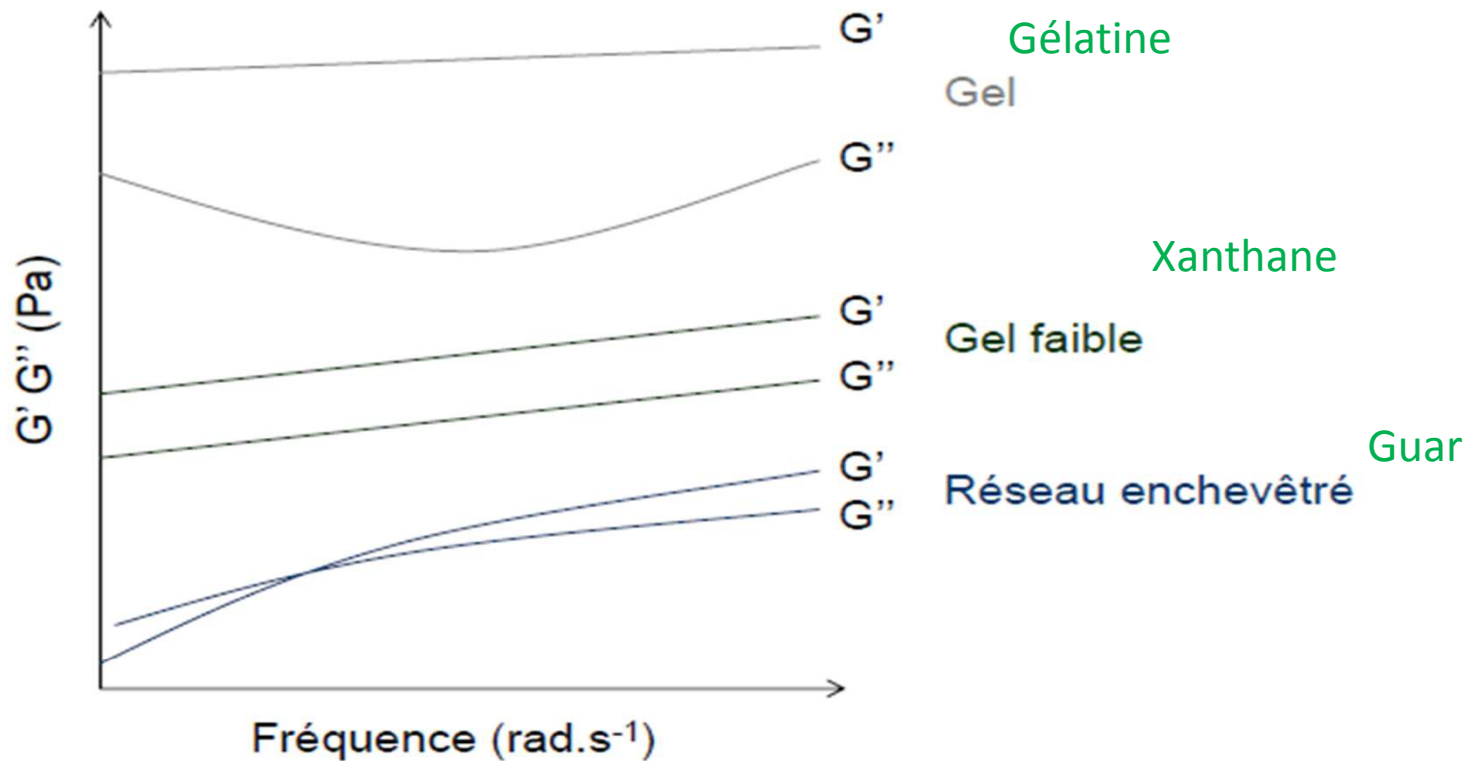
## 2.2. La viscoélasticité

### Le spectre mécanique

- Plus un gradient de vitesse, mais une fréquence d'oscillations
- $G'$  **module de conservation** (storage modulus), caractéristique le comportement **élastique**
- $G''$  **module de perte** (loss modulus) caractéristique du comportement **visqueux**
- Génèrent le spectre mécanique

# 2.2. La viscoélasticité

## Le spectre mécanique



Allure des spectres  $G'$   $G''$  pour un gel, un gel faible et un réseau enchevêtré

## 2.3. La formation de gel

### Le texturomètre

Lorsqu'une solution de polysaccharides forme un gel (concentration, température, synergie, etc.), il est possible de caractériser ce gel au texturomètre.

Par 2 fois, cet appareil va pénétrer sur une profondeur donnée, à l'aide d'une sonde, dans la surface d'un gel. L'appareil mesure en parallèle la résistance du gel à la pénétration.

Plusieurs informations peuvent être tirées de cette mesure.



# Tests empiriques de texture (IX)

## Analyse de Profil de Texture (TPA)

Propriété texturale

Mesures issues de la courbe force-déformation

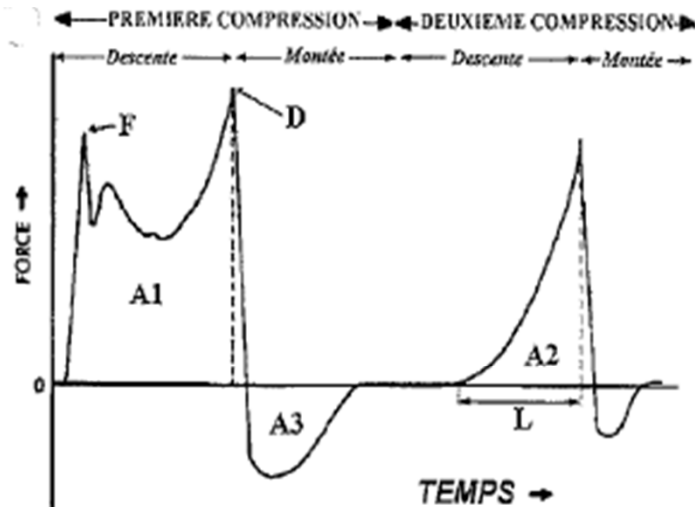
Bourne, 1968

Friedman *et al.*, 1963

Dimension

Dureté <i>Hardness</i>	Force nécessaire pour atteindre la première morsure (déformation fixée) = hauteur du premier pic	Pic maximal durant la première compression : D	Force
Cohésion <i>Cohesiveness</i>	Travail nécessaire pour casser les liens internes du produit = surface sous le deuxième pic divisée par surface sous le premier pic	Rapport des surfaces sous les courbes correspondantes au travail appliqué sur le produit : $A_2/A_1$	Sans dimension
Élasticité <i>Springiness</i>	Rapidité de récupération de la forme initiale = Différence entre la durée B (entre les deux compressions) de l'échantillon et la durée C trouvée sur un matériau totalement inélastique (argile)	Distance récupérée entre la première et la seconde descente : L	Longueur
Adhérence <i>Adhesiveness</i>	Travail nécessaire pour tirer le piston de l'échantillon = surface sous le pic négatif	Surface des forces négatives de la première compression : $A_3$	Travail
Fragilité <i>Fracturability</i>	Hauteur de la première cassure significative lors de la première compression	Force avant la première chute brusque (cassure majeure des tissus) : F	Force
Mâchement <i>Chewiness</i>	Dureté x cohésion x élasticité	Dureté x cohésion x élasticité	Travail
Collant <i>Sticky</i>	Dureté x cohésion	Dureté x cohésion	Force

- Aujourd'hui l'élasticité correspond souvent à une valeur sans dimension. La mesure résulte de la durée de la deuxième compression rapportée à celle de la première compression (à taux de déformation identique et vitesse constante), ce qui correspond à la proportion de longueur récupérée entre les deux descentes (Truong *et al.*, 1998 ; Meullenet *et al.*, 1998). Cette propriété est usuellement exprimée en pourcentage, 100% signifiant que l'échantillon retourne à sa taille initiale entre les deux sollicitations



Plusieurs remarques sont nécessaires pour compléter ce tableau :

- Seules les caractéristiques mécaniques sont étudiées
- Selon le produit analysé, la fragilité et l'adhérence ne sont pas toujours présentes
- La limite de surface pour calculer le travail effectué est discutée : Friedman *et al.* considéraient toute la surface entre le moment où le plongeur quitte sa position initiale et celui où il revient à cette position. La vitesse de déplacement n'étant pas régulière, le calcul de la distance, donc du travail sont approximatifs. Bourne ne considère que les forces de descente du piston et non celles de remontée qui ne correspondent plus à la force exercée sur le produit mais par le produit, d'où la limite verticale à droite pour le calcul de l'aire sous la courbe. Peleg (1976) précise que la mesure du travail est à déterminer sur la courbe force = f(distance), qui permet de visualiser le trajet du piston et évite toute ambiguïté

Technologie & Qualité des Produits Alimentaires

# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

## Introduction

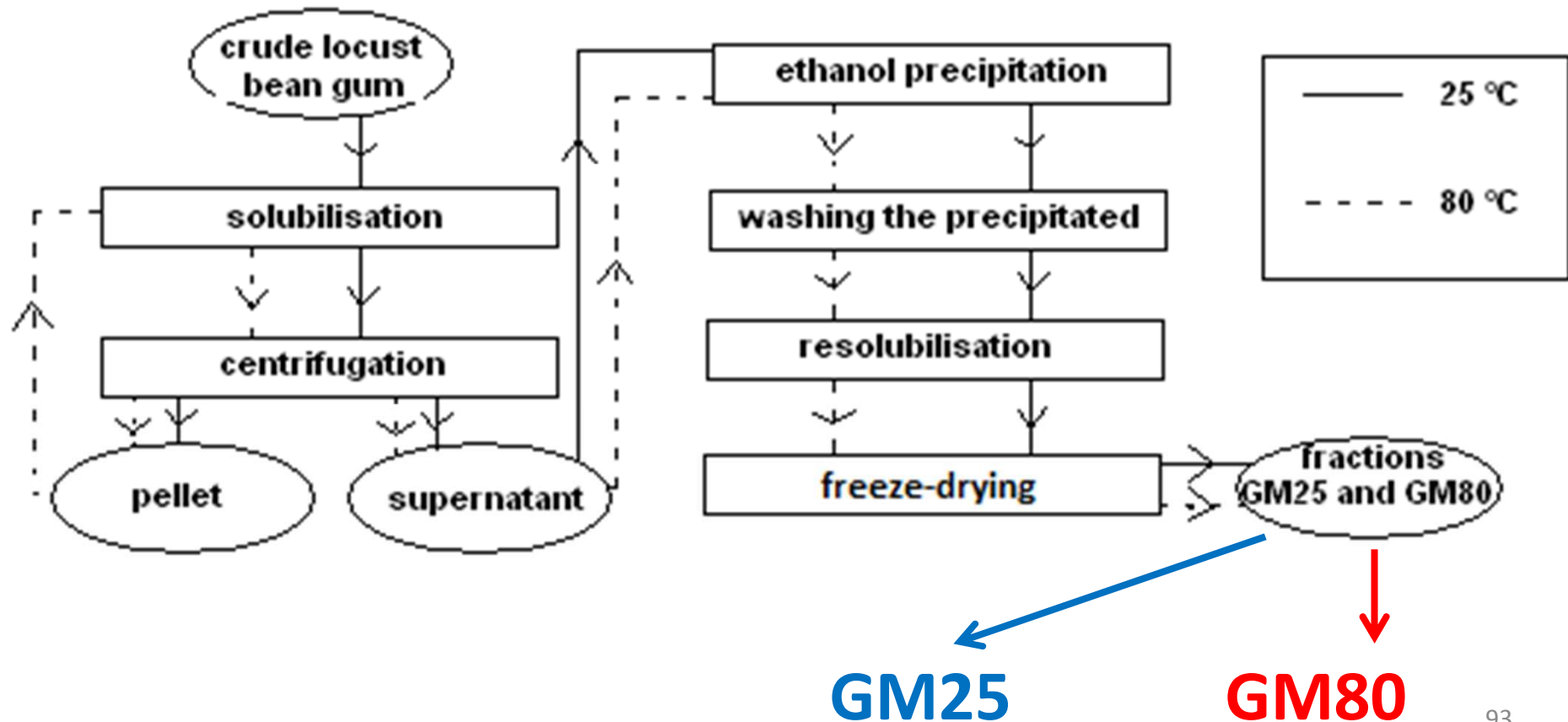
Le caroubier est une essence cultivée, dans le bassin méditerranéen, pour ses graines. Ces graines contiennent un endosperme riche en galactomannanes très prisé, notamment par l'industrie agro-alimentaire, pour ses propriétés texturantes. Après récolte, les graines subissent une décortication et une dégermination. Les endospermes ainsi nettoyés sont ensuite broyés pour donner **la gomme de caroube brute**





# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

## Extraction des galactomannanes



# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

## Composition générale

**Table 1 : Production yields of GM25 and GM80 fractions  
(as % of of initial dry matter) and their chemical characterization.**

<sup>1</sup> Obtained by difference.

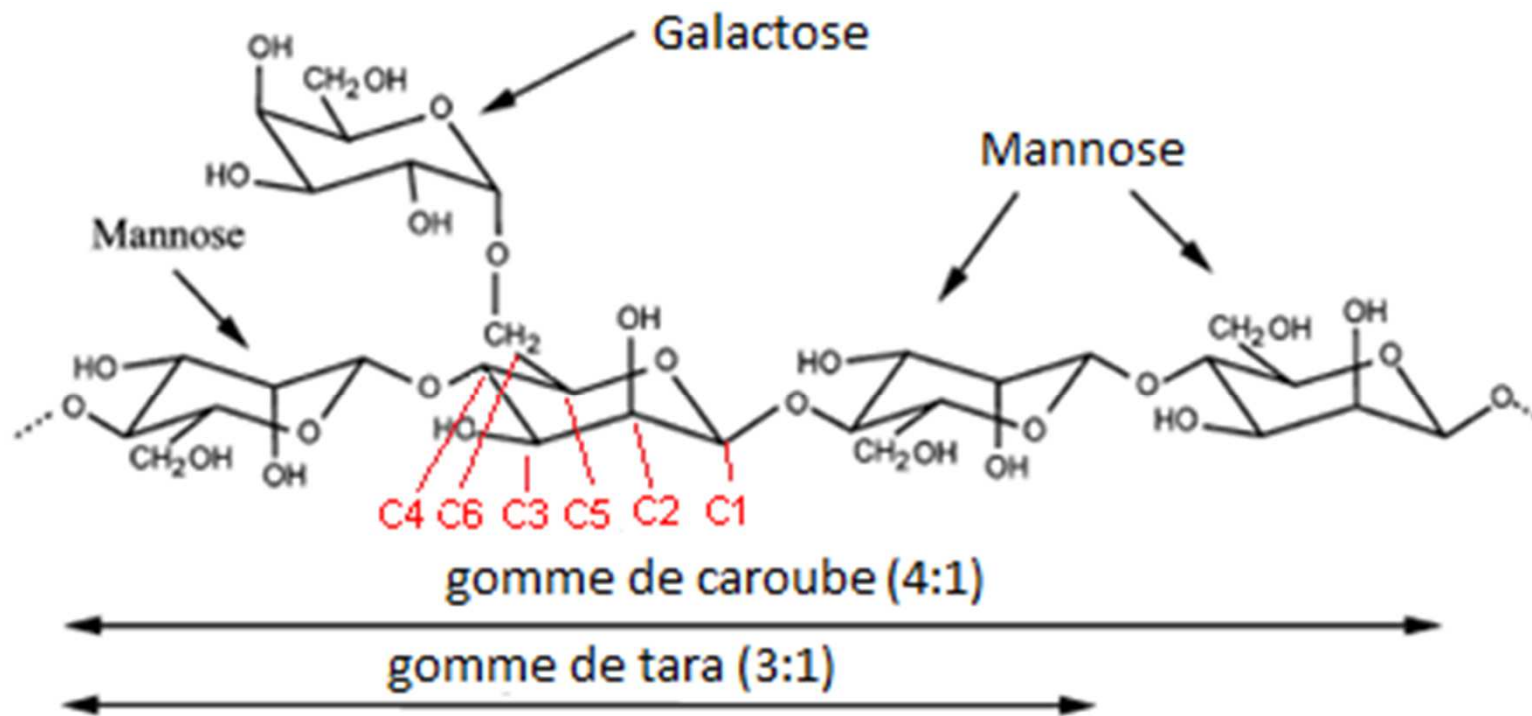
		CLBG	GM25	GM80
<b>Yields</b>		100	32.57	33.25
<b>Chemical composition</b>				
	Protein	6.00 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01
	Fat	2.10 ± 0.11	0	0
	Ash	0.31 ± 0.05	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
	Fiber	2.20 ± 0.20	0	0
	Galactomannans <sup>1</sup>	89.39 ± 0.24	99.94 ± 0.02	99.94 ± 0.01

# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

Composition chimique

Méthylation GC-FID

Méthylation, Acétylation GC-MS



# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

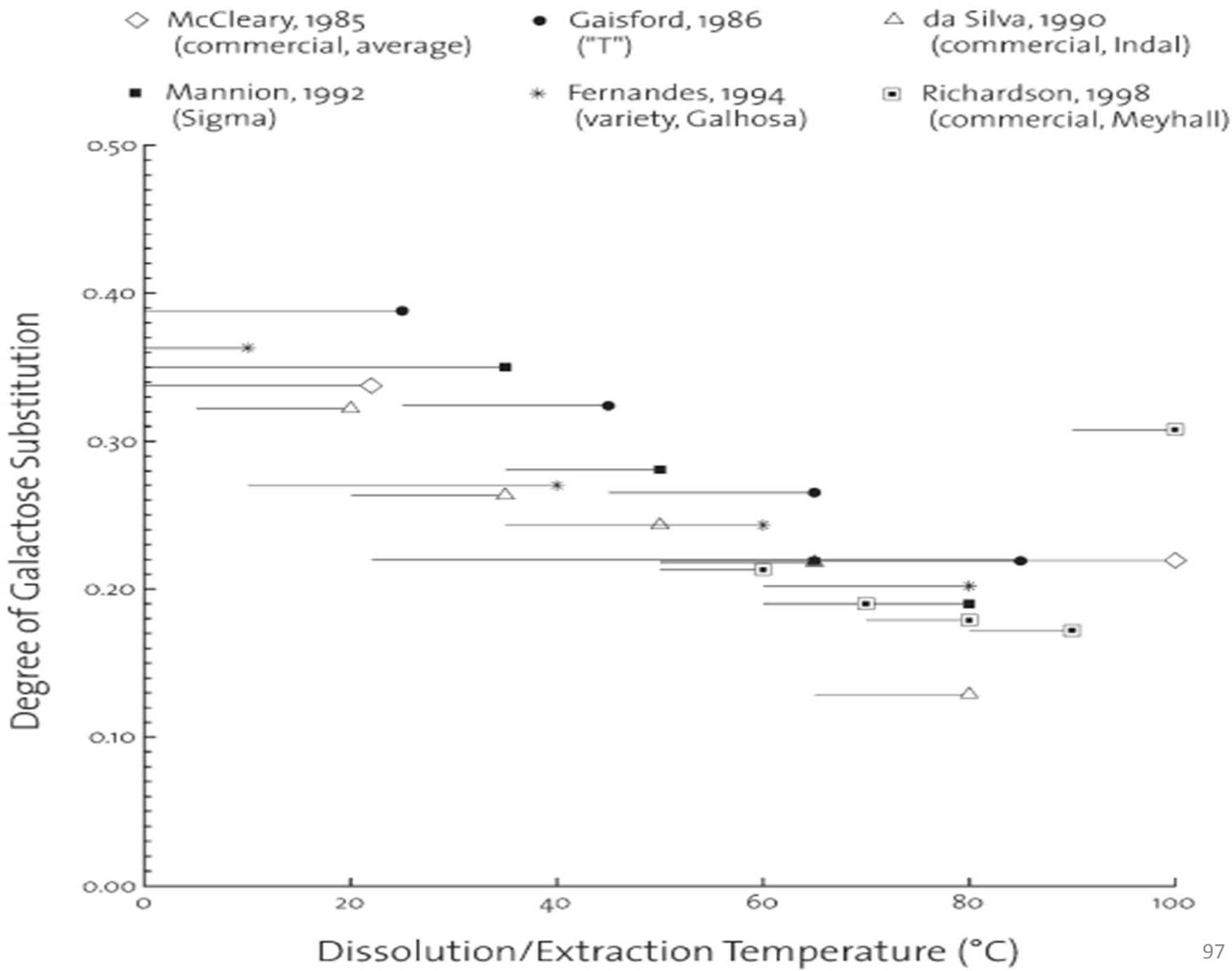
## Composition chimique

### Méthylation GC-FID

### Méthylation, Acétylation GC-MS

Ratios Mannose/ Galactose des principales légumineuses utilisées industriellement (BRESOLIN *et al.*, 1997 ; GARTI *et al.*, 1997 ; Parvathy *et al.*, 2005 ).

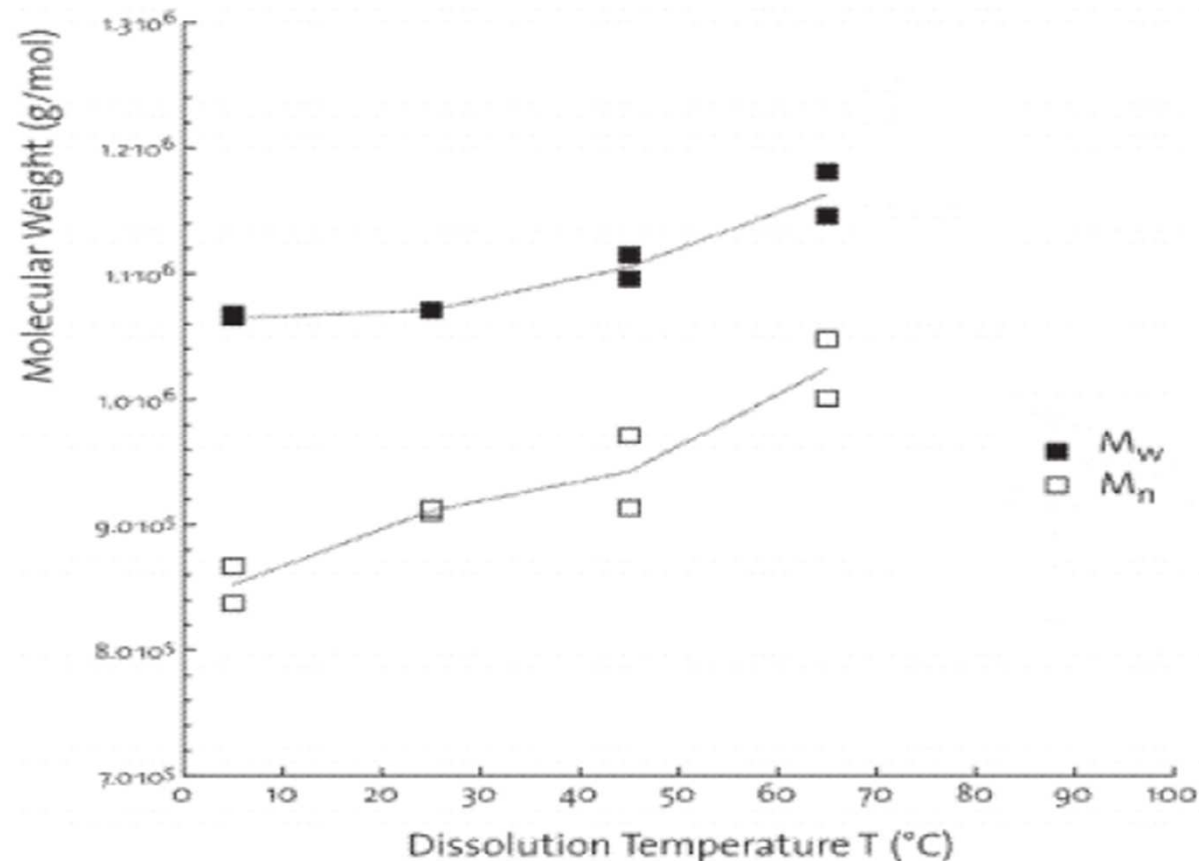
Source	Ratio Man/Gal	Référence
<i>Schizolobium parahybum</i>	3 : 1	BRESOLIN <i>et al.</i> (1997)
<i>Mimosa scrabella</i>	1,1 : 1	BRESOLIN <i>et al.</i> (1997)
<i>Cyamopsis tetragonoloba</i> (gomme de guar)	2 : 1	PARVATHY <i>et al.</i> (2005)
<i>Caesalpinia spinosa</i> (gomme tara)	3 : 1	PARVATHY <i>et al.</i> (2005)
<i>Ceratonia siliqua</i> (gomme de caroube)	4 : 1	PARVATHY <i>et al.</i> (2005)
<i>Trigonella foenum-graecum</i> (gomme de fenugrec)	1 : 1	GARTI <i>et al.</i> (1997)



# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

## Taille des polymères

Le procédé de purification a une influence considérable sur la taille moyenne du produit obtenu



# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

## Taille des polymères

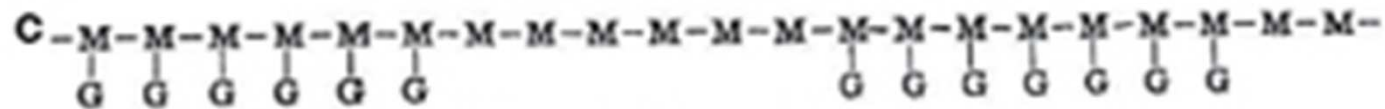
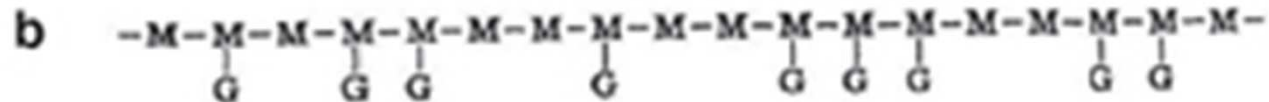
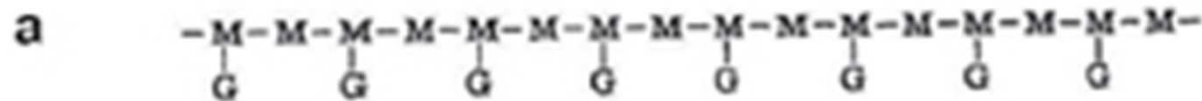
**Table 3 : Structural data of GM25 and GM80 solutions (0.5 mg/mL) determined at 40 °C by SEC-MALLS : weight average molecular weight ( $M_w$ ), number average molecular weight ( $M_n$ ), polydispersity index (PI), radius of gyration ( $R_g$ ).**

\*equivalent hexose units

	Water			Phosphate buffer		
	GM25	GM80	CLBG	GM25	GM80	CLBG
$M_w$ (kDa)	736.7 ± 15.1	699.6 ± 49.5	1017.9 ± 162.8	761.1 ± 9.3	911.3 ± 54.2	772.2 ± 9.8
$M_n$ (kDa)	590.3 ± 15.1	636.5 ± 52.6	696.7 ± 86.2	655.9 ± 13.9	897.7 ± 67.2	631.7 ± 12.9
$DP_w^*$	4548 ± 93	4319 ± 306	6283 ± 1005	4698 ± 57	5625 ± 335	4767 ± 60
$DP_n^*$	3644 ± 155	3929 ± 325	4307 ± 532	4049 ± 86	5541 ± 415	3899 ± 80
PI	1.25 ± 0.03	1.10 ± 0.04	1.46 ± 0.07	1.16 ± 0.03	1.02 ± 0.02	1.23 ± 0.04
$\langle R_g \rangle_w$	91.8 ± 1.5	94.2 ± 3.4	99.2 ± 2.5	91.7 ± 1.7	106.9 ± 4.2	89.3 ± 2.8
$\langle R_g \rangle_n$	100.1 ± 1.5	100.6 ± 1.5	107.6 ± 2.3	98.2 ± 2.2	109.5 ± 3.5	96.4 ± 4.0

# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

Structure fine

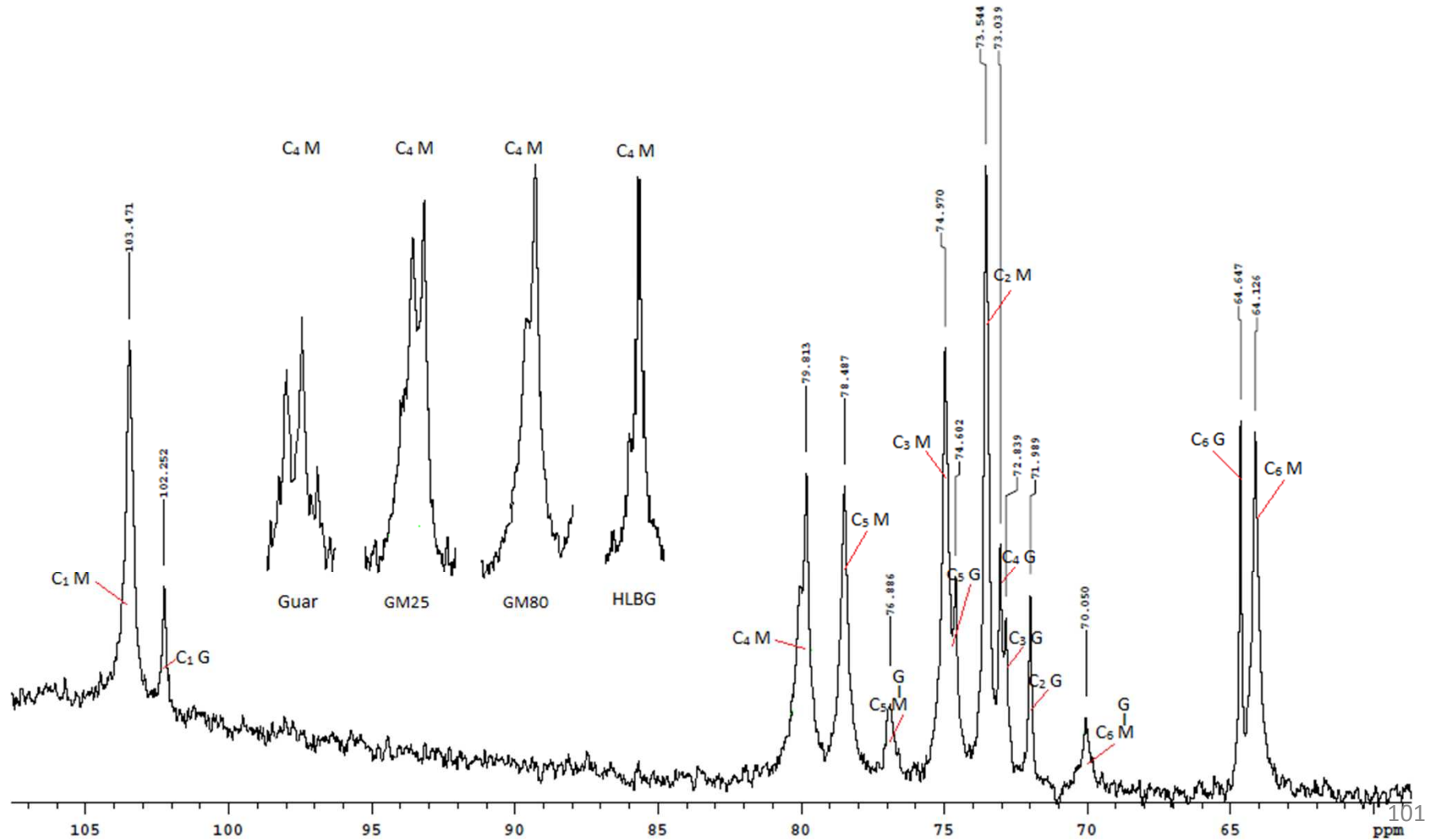




# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

Structure fine

Analyse RMN



# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

## Structure fine

## Dégradation alcaline/GC-MS

**Table 2 : Fine structural characterization of different galactomannans: GM25, GM80, HCLBG and guar gum (Guar).**

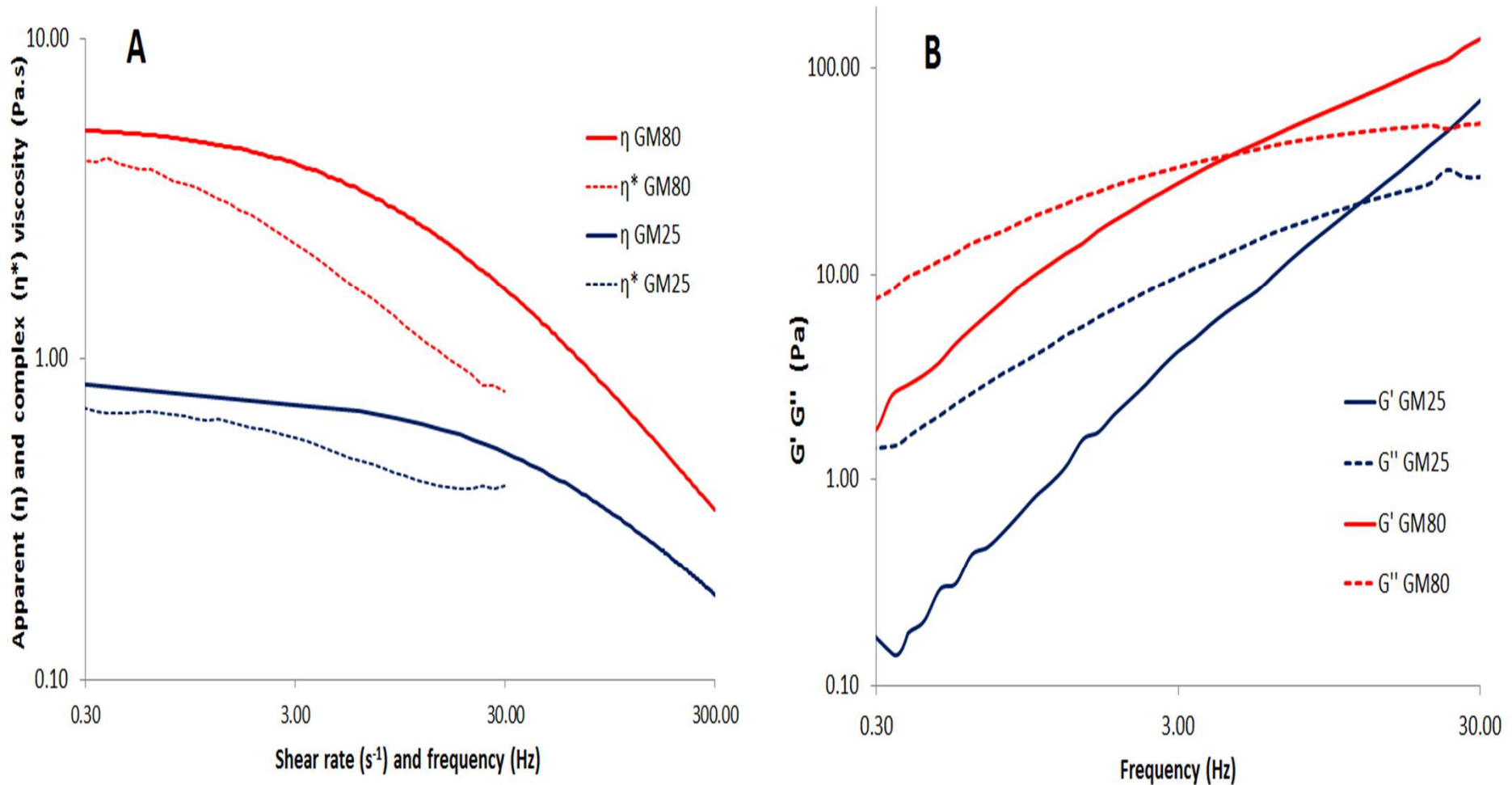
<sup>1</sup> Blakeney *et al.*, 1983 ; <sup>2</sup> Manzi *et al.*, 1986 ; <sup>3</sup> Baker & Whistler 1975.

Structural characterization	Guar	GM25	GM80	HCLBG	CLBG	RP
M/G ratio (GC-FID) <sup>1</sup>	1.51 ± 0.01	2.85 ± 0.01	3.84 ± 0.01	5.98 ± 0.01	4.07 ± 0.03	4.50 ± 0.03
M/G ratio ([ <sup>13</sup> C]-NMR) <sup>2</sup>	1.70 ± 0.02	2.98 ± 0.04	3.50 ± 0.01	6.55 ± 0.04	/	/
Degree of blockiness (%) <sup>3</sup>	40.00 ± 1.23	70.00 ± 2.04	83.00 ± 2.47	96.00 ± 3.15	/	/
F11 Diad Frequencies (%) <sup>2</sup>	41.28 ±1.25	12.35 ± 1.17	15.65 ± 0.28	6.13 ± 0.18	/	/
F12 or F21 Diad Frequencies (%) <sup>2</sup>	46.53 ± 0.54	35.52 ± 0.95	30.35 ± 0.59	21.01 ± 1.49	/	/
F22 Diad Frequencies (%) <sup>2</sup>	12.19 ±	52.10 ±	54.00 ±	72.85 ±	/	<sup>102</sup> /



# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

## Viscosité et viscoélasticité



# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

## Viscosité et viscoélasticité

- The viscosity generated by galactomannans dispersions is due to two distinct factors: i) interpenetration of the macromolecular chains leading to the creation of "physical" non specific recovery ; ii) the presence of more specific interactions between macromolecules resulting from intermolecular aggregation phenomena: the hyperentanglements.
- Apparent viscosity of a dispersions in semi-dilute conditions is therefore related to the molecular structure that influences possibilities of interactions

# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

## Viscosité et viscoélasticité

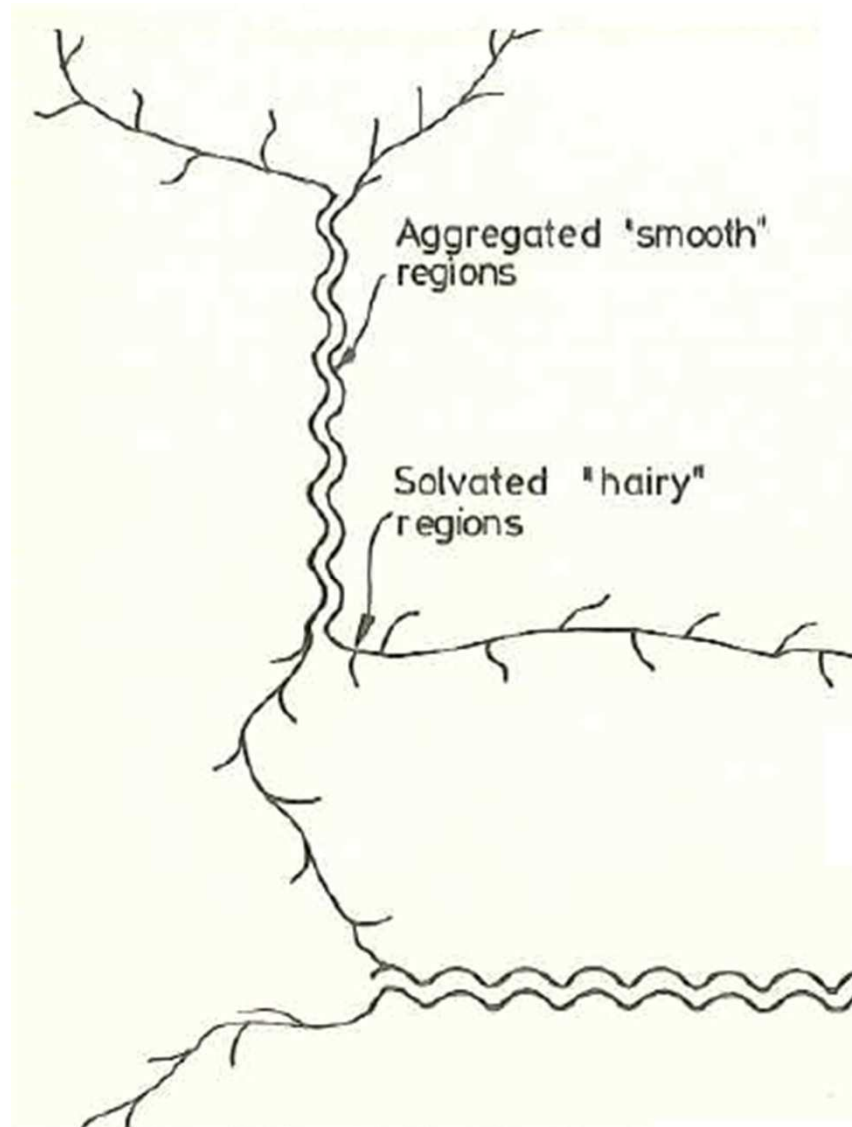
- Both fractions studied showed a shear thinning behavior (or pseudoplastic). This means that the apparent viscosity decreased as the shear rate increased.
- Under imposed shear stress, macromolecules are disentangled more or less quickly – depending on entanglements density and of interactions strength – to end up oriented in the direction of the flow. This macromolecules reorganization results in a decrease of viscosity.
- Although the shear thinning effect is much stronger for the GM80 fraction ( $n_{GM80} = 0.333$  and  $n_{GM25} = 0.389$ ), it possesses a greater apparent viscosity  $\eta$  on the range of shear rates tested ( $K_{GM80} = 17.838$  and  $K_{GM25} = 7.227$ ).
- It is therefore possible to conclude that the molecular structure of the GM80 fraction promotes such intermolecular (aggregation) interactions and therefore hyper-entanglements.

# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

## Viscosité et viscoélasticité

- The study of viscoelastic properties is one of the main techniques to highlight entanglements. The viscoelastic behavior of a solution/dispersion is also influenced by the structure of polymers.
- The graph is typical of galactomannans in semi-dilute conditions that are viscoelastic fluids generating an entangled network. The loss modulus  $G''$  (Pa) is greater than the storage modulus  $G'$  (Pa) at low oscillation frequencies, whereas the reverse is observed at higher frequencies.
- Beyond the shift point, the oscillation frequency becomes too high and galactomannans chains can not be dissociated. The GM80 fraction had a much stronger viscoelastic behavior and greater dynamic (complex) viscosity  $\eta^*$  than GM25 fraction whose  $G'$  and  $G''$  are lower. The intersection between  $G'$  and  $G''$  curves was shifted at lower frequencies for GM80 fraction. This means that it quickly had an elastic dominance behavior generated by entanglements and hyper-entanglements which dissociate less easily.

### 3. Cas des galactomannanes - Caroube





# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

## Viscosité et viscoélasticité

- D'autres facteurs influencent le comportement

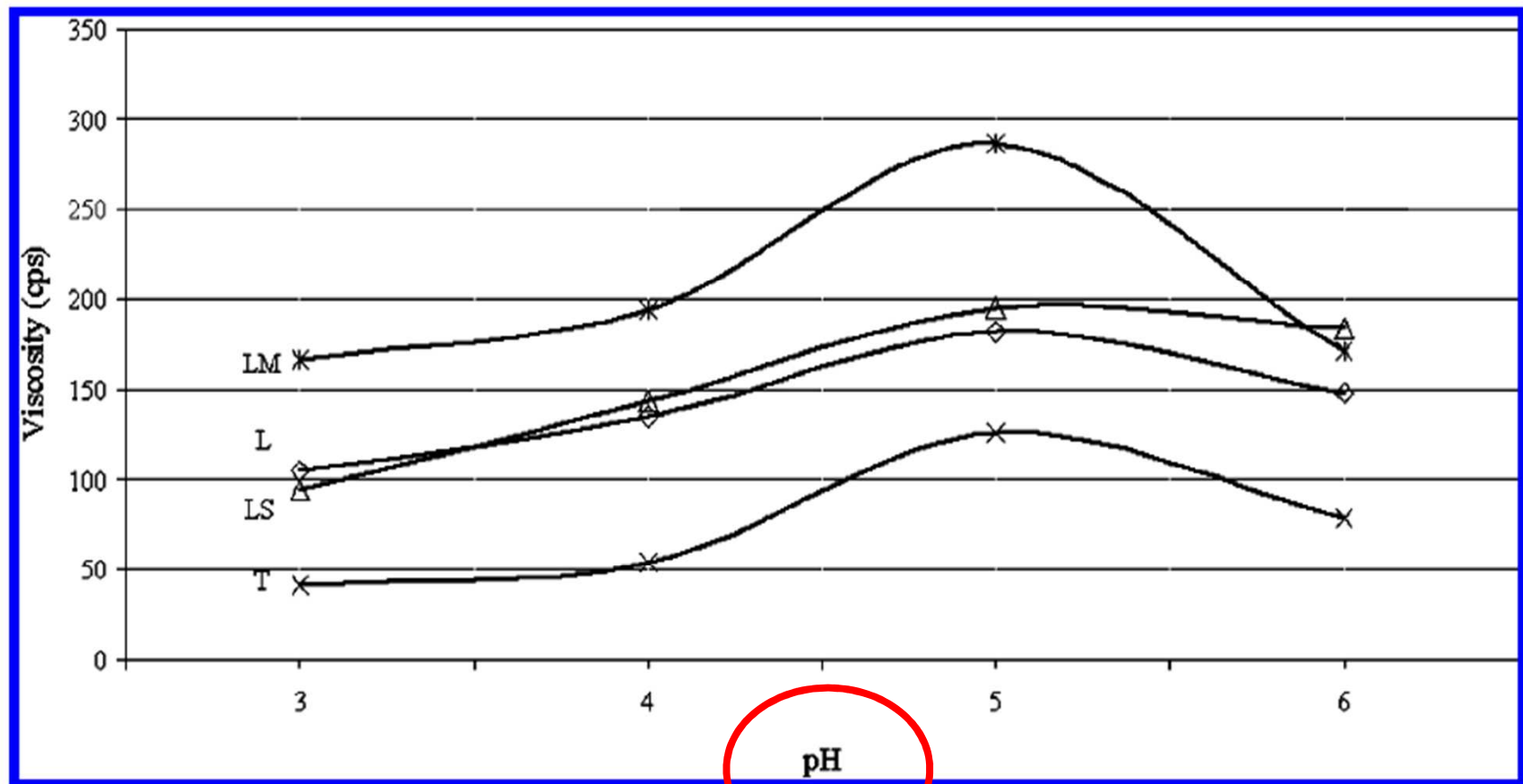
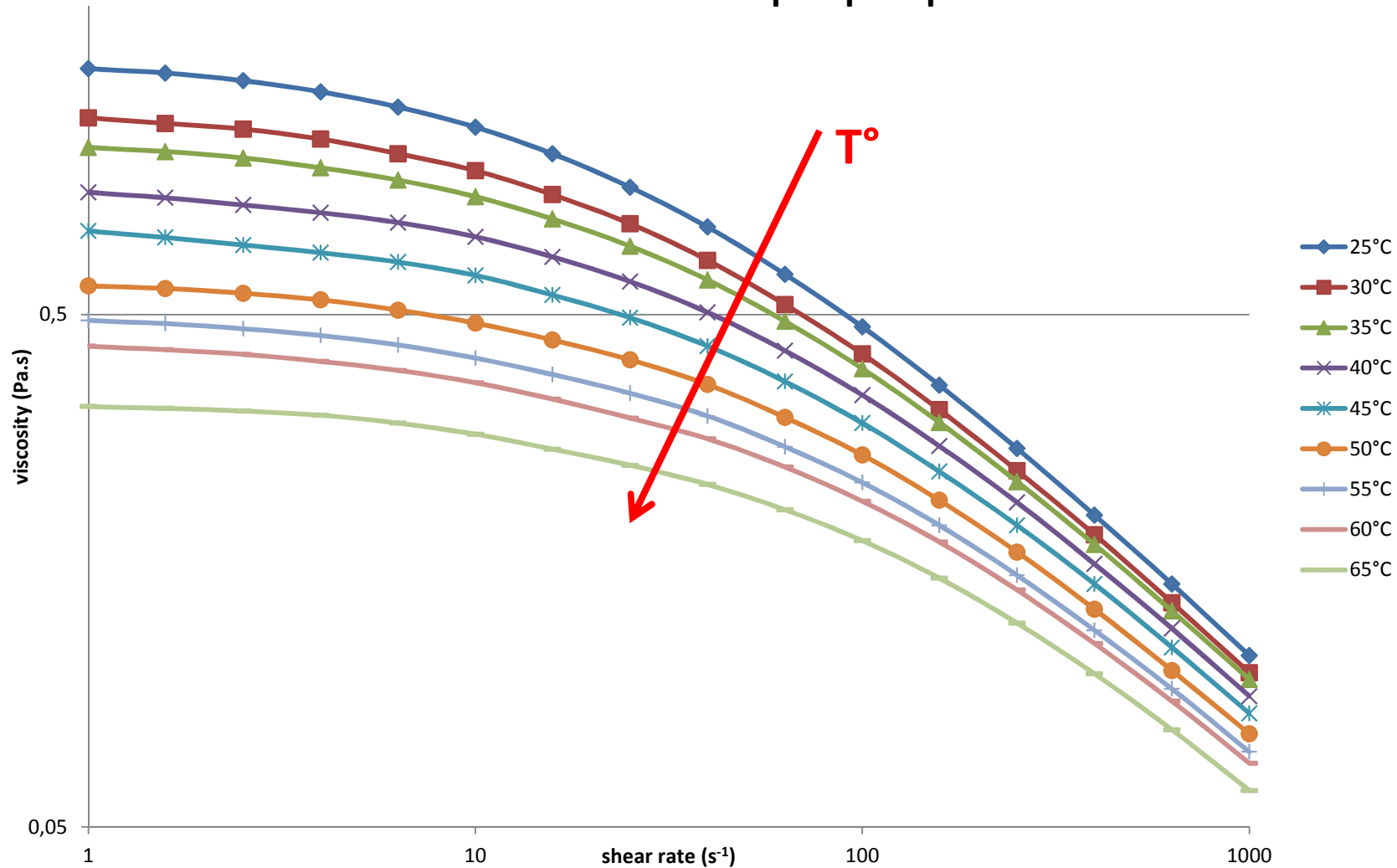


Figure 3. Viscosity values (cps) of 1% LBG aqueous solutions at 20 °C versus pH value (spindle R2 at 20 rpm).

# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

## Viscosité et viscoélasticité

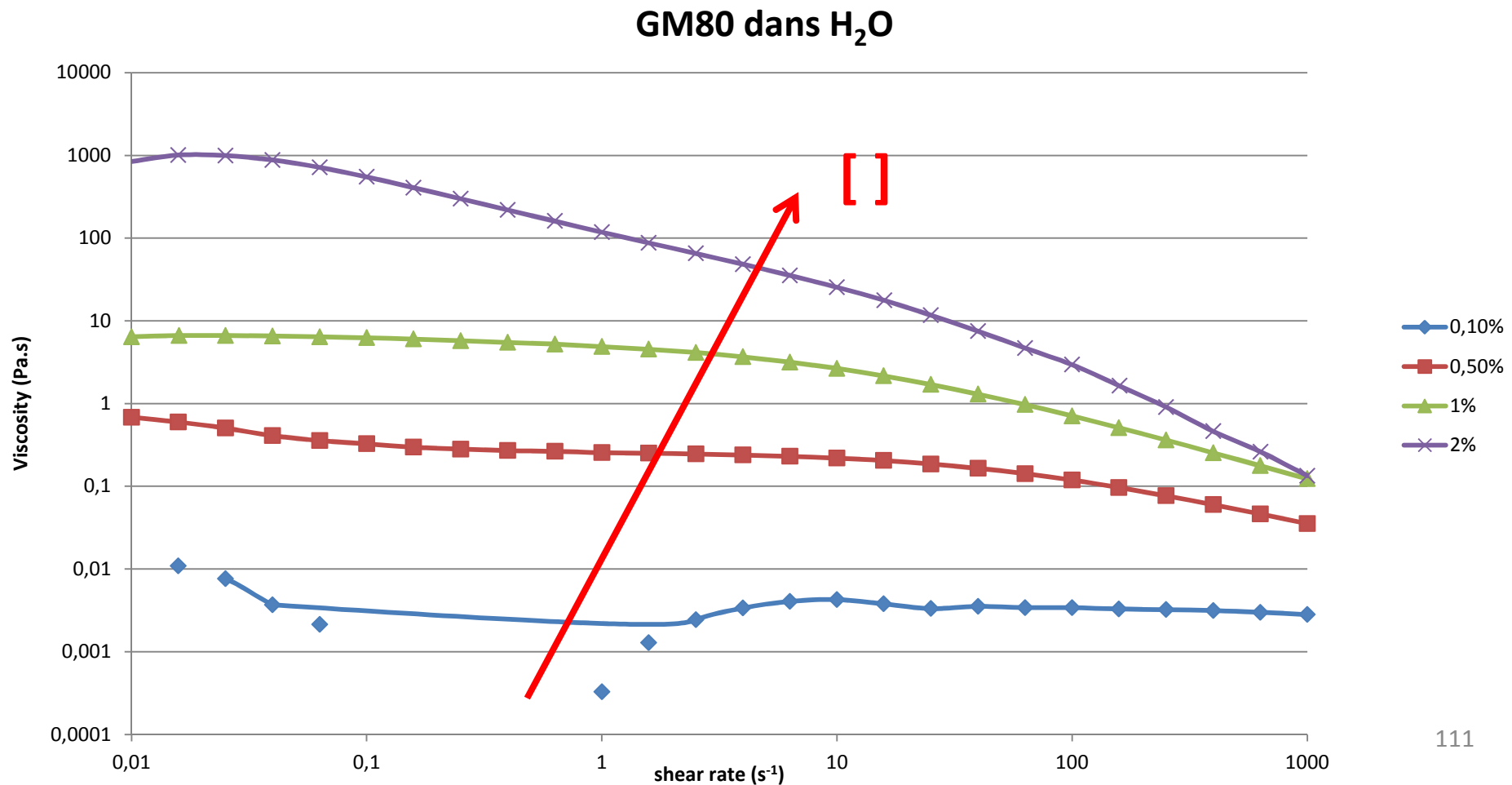
1% GM25 dans du tampon phosphate



# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

## Viscosité et viscoélasticité

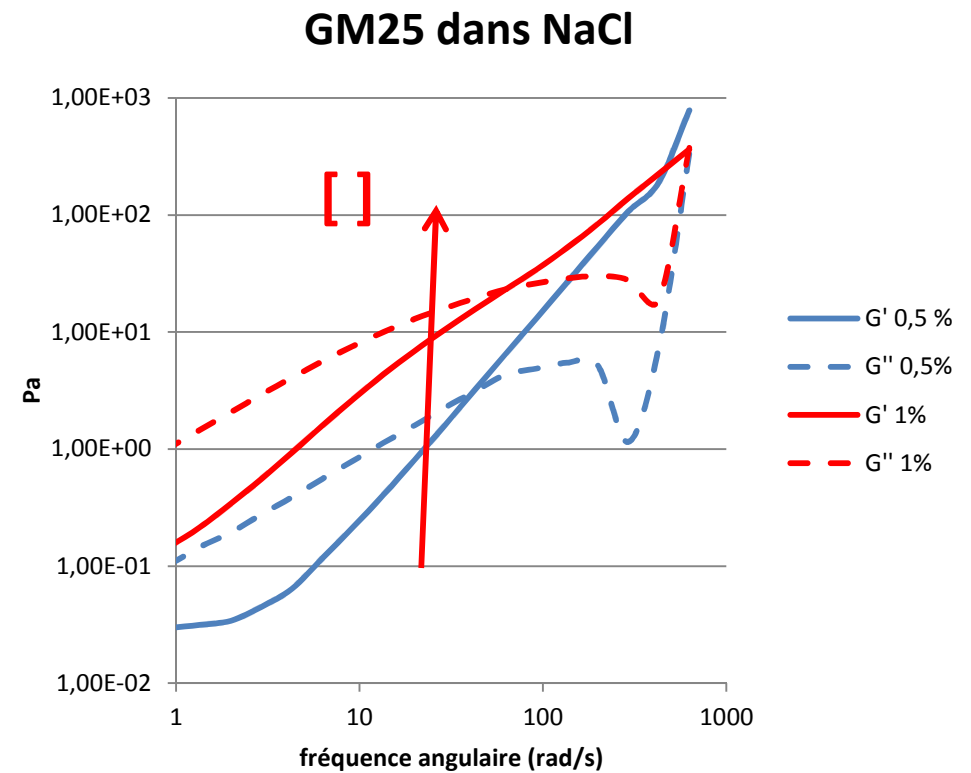
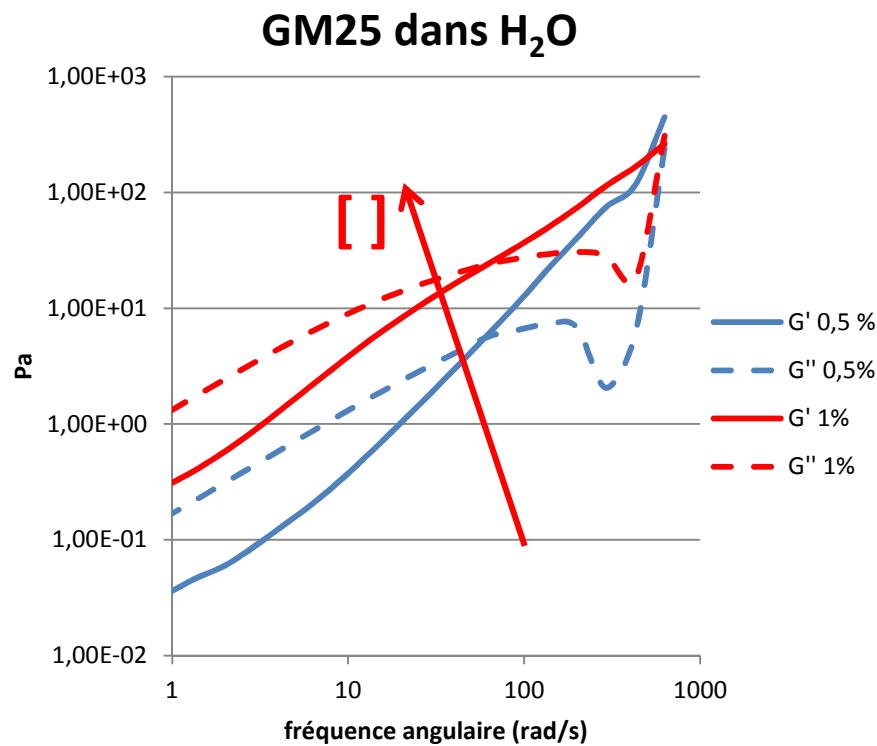
- D'autres facteurs influencent le comportement



# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

## Viscosité et viscoélasticité

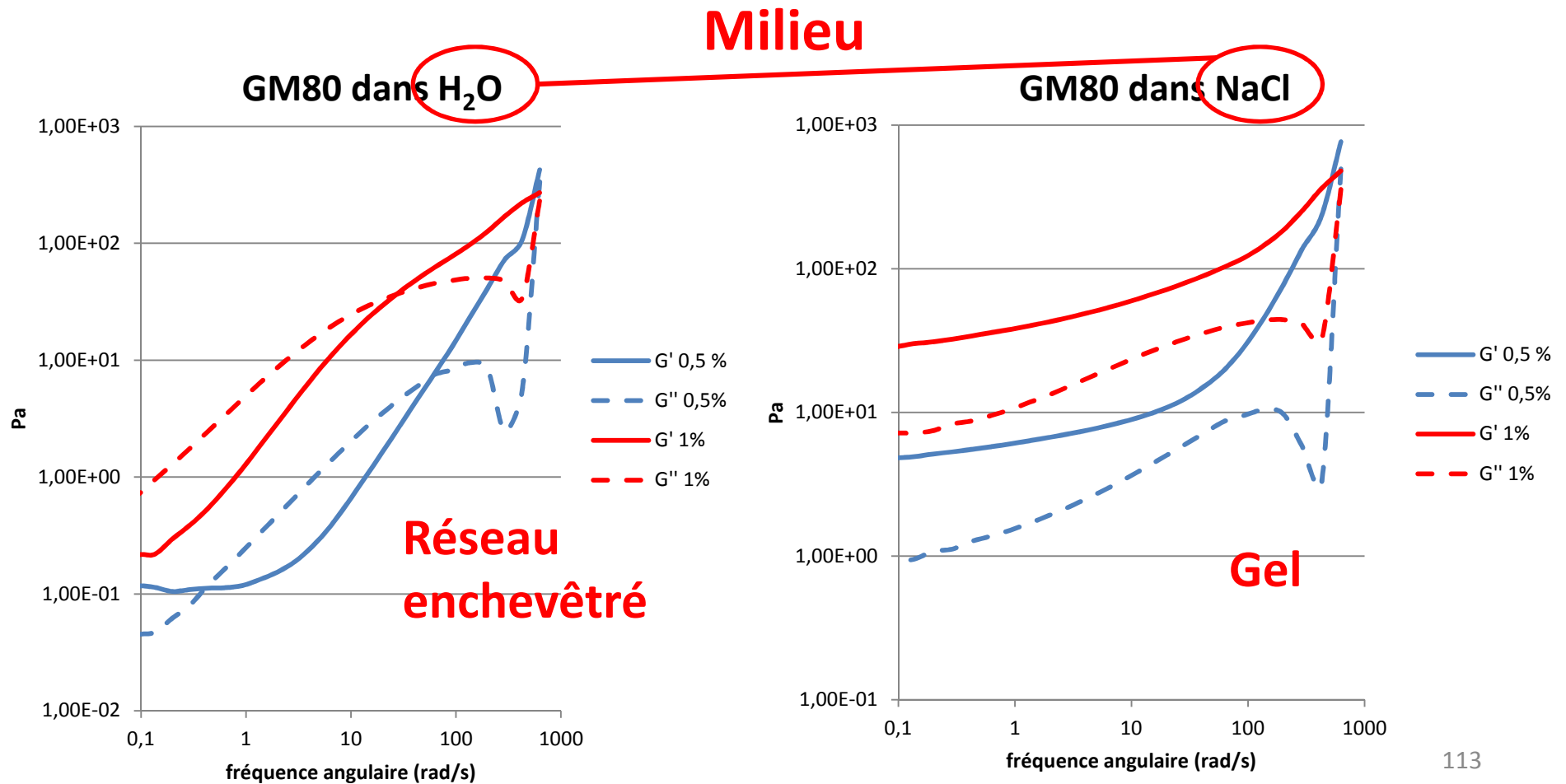
- D'autres facteurs influencent le comportement



# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

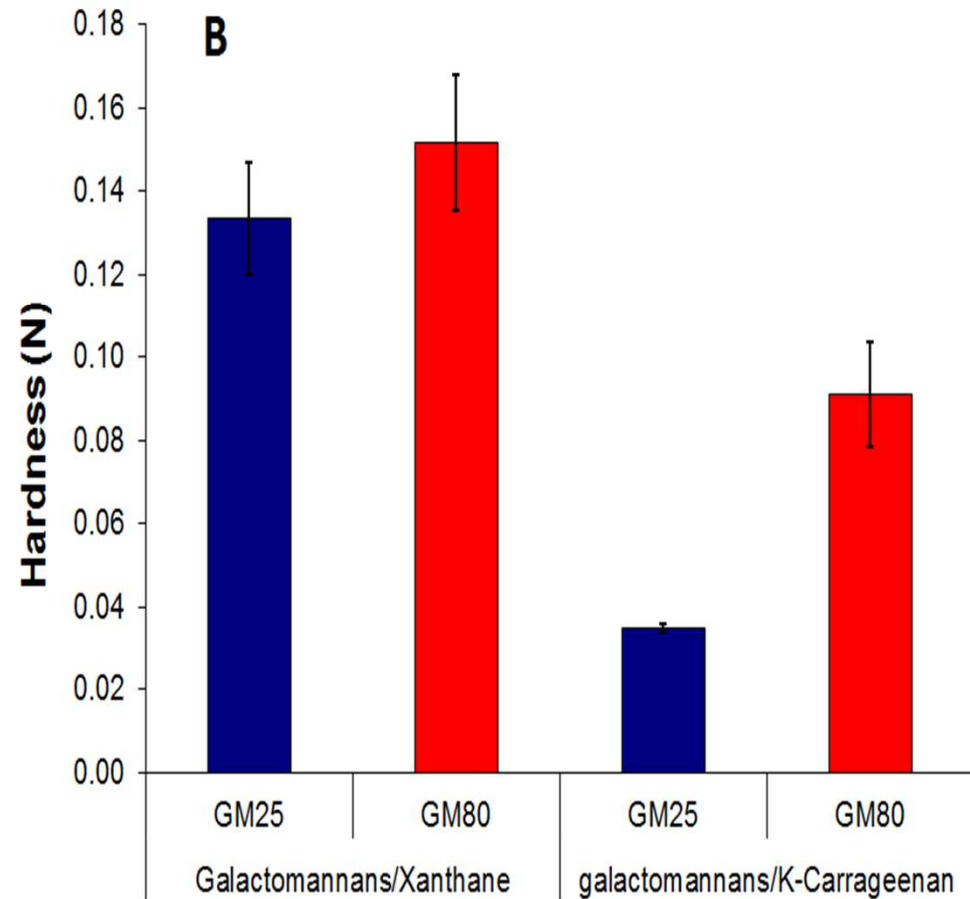
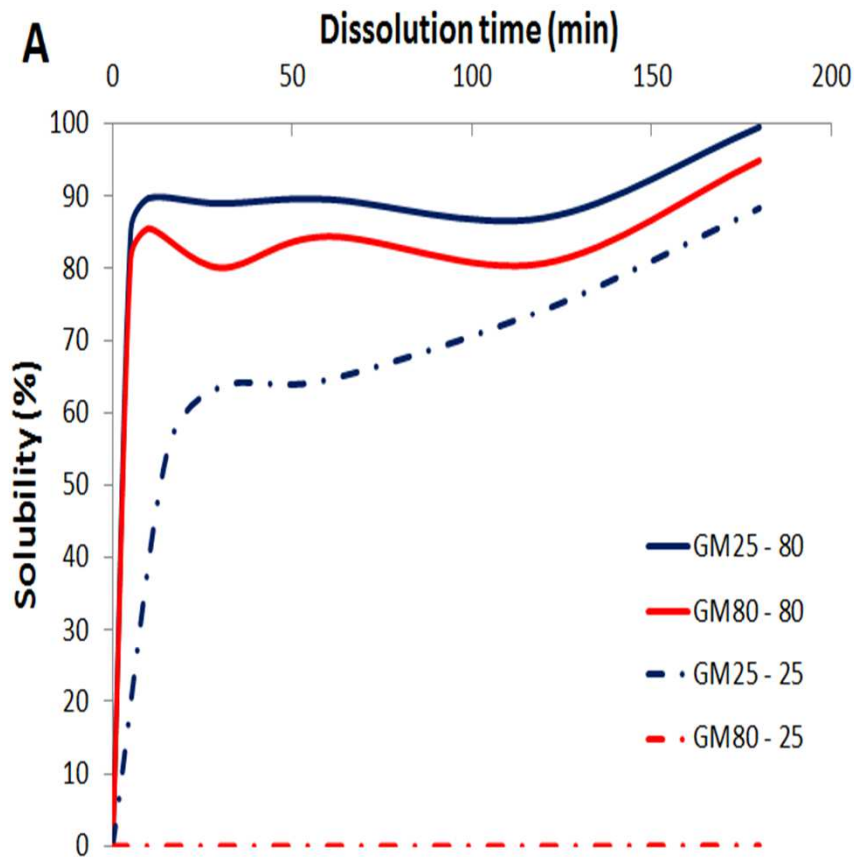
## Viscosité et viscoélasticité

- D'autres facteurs influencent le comportement



# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

## Solubilisation et formation de gels par synergie



# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

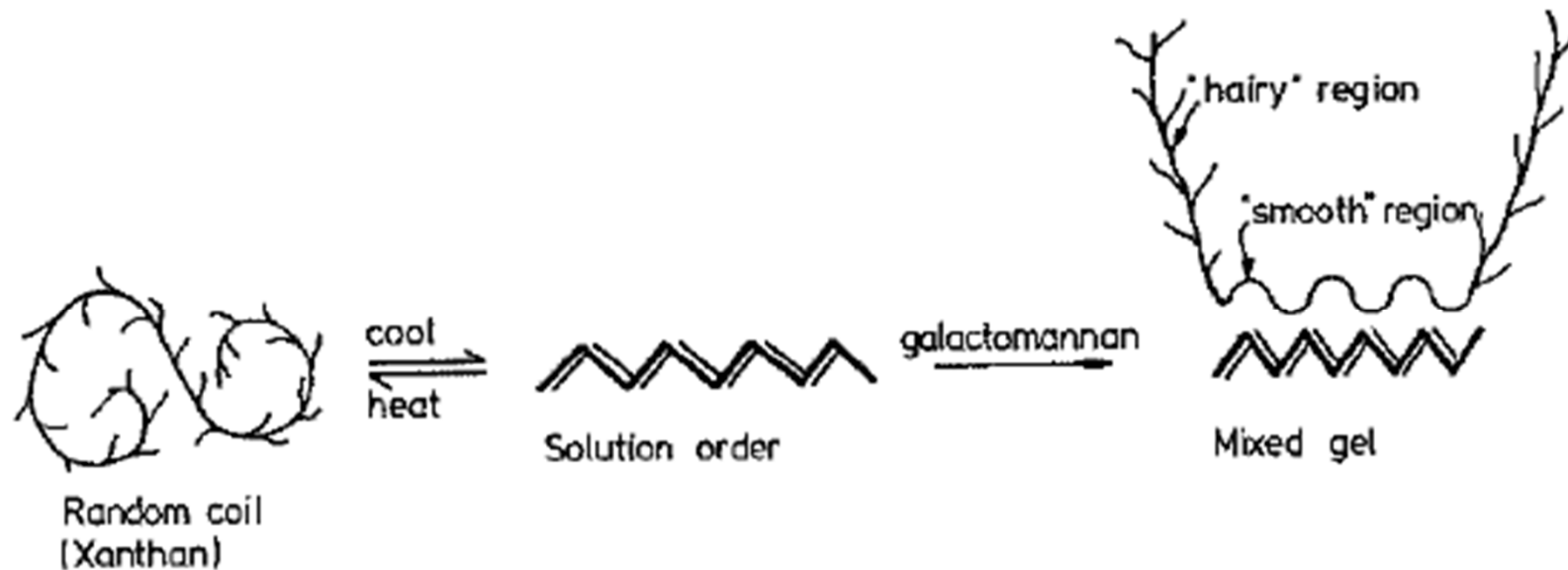
## Solubilisation et formation de gels par synergie

- When xanthan, galactomannans or carrageenan alone are dissolved at the same **concentration** as in the mixed gels or at the total concentration of the gels, they do not generate gels. Each fraction alone – regardless of the solubilization temperature – exhibits strength gels near 0.02 N. Only mixed gels are able to generate positive synergies.
- Stronger gels were obtained by combining galactomannans in xanthan. The GM80 fraction generated stronger gels (0.152 N) when associated with xanthane at 80 °C. The concentration of solutions, dispersions or gels was invariable. Thus, only the structural characteristics can explain the differences observed in gel formation behavior.

# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

## Solubilisation et formation de gels par synergie

- Some authors demonstrated a positive correlation between the storage modulus  $G'$  of a mixed galactomannan/xanthan gel and the amount of "smooth regions" established in the galactomannan.





# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

## En conclusion

- Un procédé de purification/d'extraction différent va générer des polysaccharides de structure moyennes différentes.
- Des structures différentes (même légèrement) vont conférer à une solution/dispersion des propriétés assez différentes.
- Comment aller plus loin?
  - Étudier le phénomène sur un plus grand nombre de fraction
  - S'intéresser aux zones de jonction
- La structure n'est pas le seul facteur influant sur le comportement

# 3. Cas des galactomannanes - Caroube

## Applications

- Additif alimentaire (E410) utilisé industriellement pour ses propriétés texturantes (épaississantes et viscosifiantes) et stabilisantes. Elle entre notamment dans la composition des crèmes glacées, des soupes, des friandises, des aliments pour bébés, des produits laitiers, des boissons alcoolisées et non-alcoolisées, des aliments pour bétail, etc.
- Il est, également, économiquement intéressant d'y avoir recours comme agent co-gélifiant pour des applications telles que les crèmes lactières, les crèmes fouettées, les crèmes glacées sans lait, le surimi, les boulettes de viande allégées, les analogues de mozzarella, etc.
- Dans les produits de boulangerie, l'adjonction de gomme de caroube prévient ou retarde la rétrogradation des amidons et des amidons modifiés et influe sur la viscosité de ces derniers.
- La gomme de caroube est également utilisée en tant qu'additif pour des applications non-alimentaires dans l'industrie papetière, cosmétique, textile et pharmaceutique, où ses propriétés d'agent de libération contrôlée de médicament sont prisées ainsi que sa capacité de co-gélification, utilisée en encapsulation de principes actifs.

# 4. Cas des Alginates

## Introduction

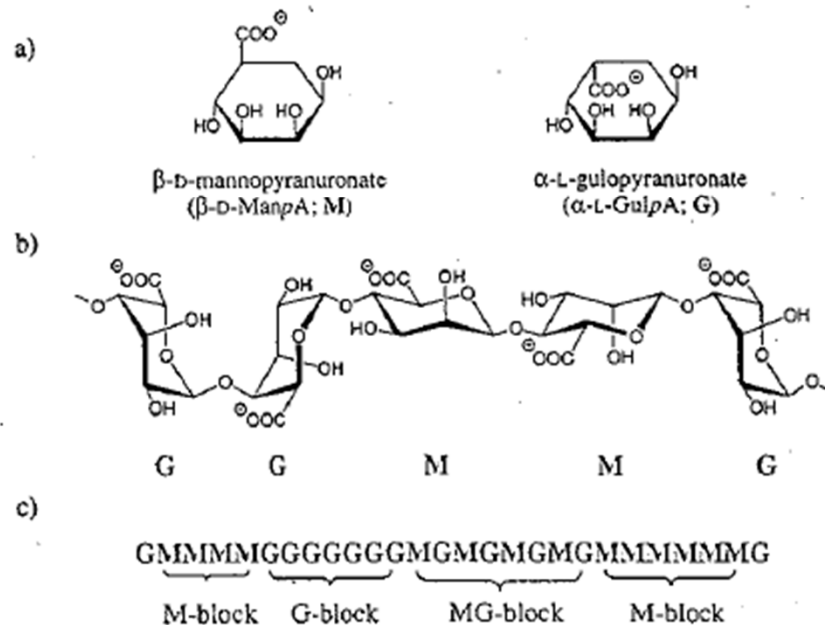
- Composés structuraux des algues brunes et de certaines bactéries du sol
- Résistance mécanique et flexibilité aux organismes qui en sont pourvus
- 15 000 T/an d'alginates produites à partir de 400 000 T d'algues fraîches [1981]. (> 30 000 T actuellement)
- Les alginates sont solubilisés à partir de leur matrice puis précipités à l'éthanol
- La dépolymérisation des alginates donne l'acide alginique

# 4. Cas des Alginates

## Structure

### a) Composition chimique

Copolymère linéaire d'acide B-D-mannuronique et d'acide  $\alpha$ -L-guluronique liés en 1-4



Les 2 oses sont isomères, même épimères

Les alginates bactériens ( $\neq$  algues) sont O-acétylés principalement sur le résidu mannuronate (mono- ou di-acétylé)

Structural data of alginates: (a) the monomers in alginate; (b) the alginate chain; and (c) alginate chain sequence.

# 4. Cas des Alginates

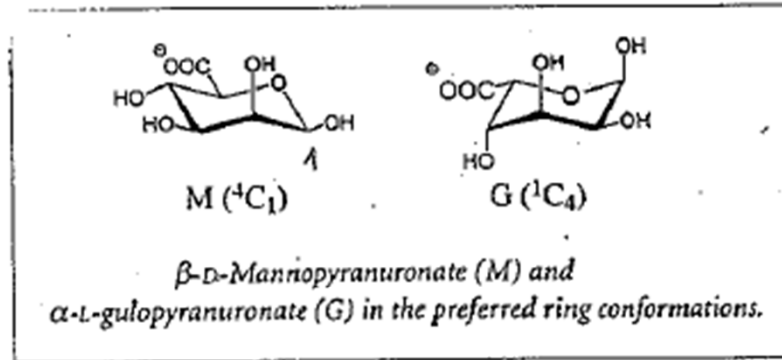
## Structure

### Conformation

acide  $\beta$ -D mannuronique  
acide  $\alpha$ -L guluronique

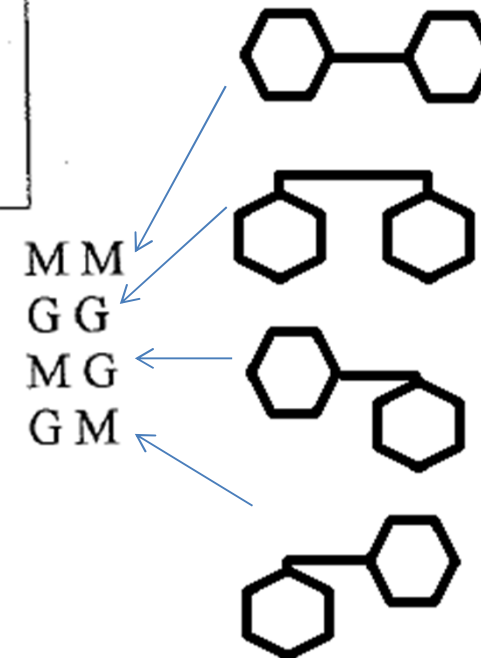
${}^4C_1$   
 ${}^1C_4$

Conformations « chaise » différentes pour que le groupement carbonyle volumineux soit en position équatoriale (favorisé > énergie). Conséquences sur la liaison glycosidique.



liaison

- di équatoriales
- di axiales
- équatoriales-axiales
- axiales-équatoriales



liaison di axiale G  $\rightarrow$  peu de mobilité  $\rightarrow$  rigide

# 4. Cas des Alginates

## Structure

- Ratio M:G par GC-FID / FTIR
- MM fort variable : 50 – 100 000 kDa (dp 260-520 000). Influence des procédés de préparation
- Polydispersité de 1,4 à 6 (fct préparation et nombre purifications)
- Liaisons par GC-MS
- DS en groupements acétyls par colorimétrie / FTIR
- Position des O-acétyls par  $^1\text{H}$  NMR (O-2 ou O-3)
- Structure fine (blocs) par hydrolyse acide partielle et précipitation acide des fractions (dosage colorimétrique)
  - 3 fraction (M, presque exclusivement ; G, presque exclusivement ; MG à parts égales)
  - Blocs M, G et M.G

# 4. Cas des Alginates

## Structure

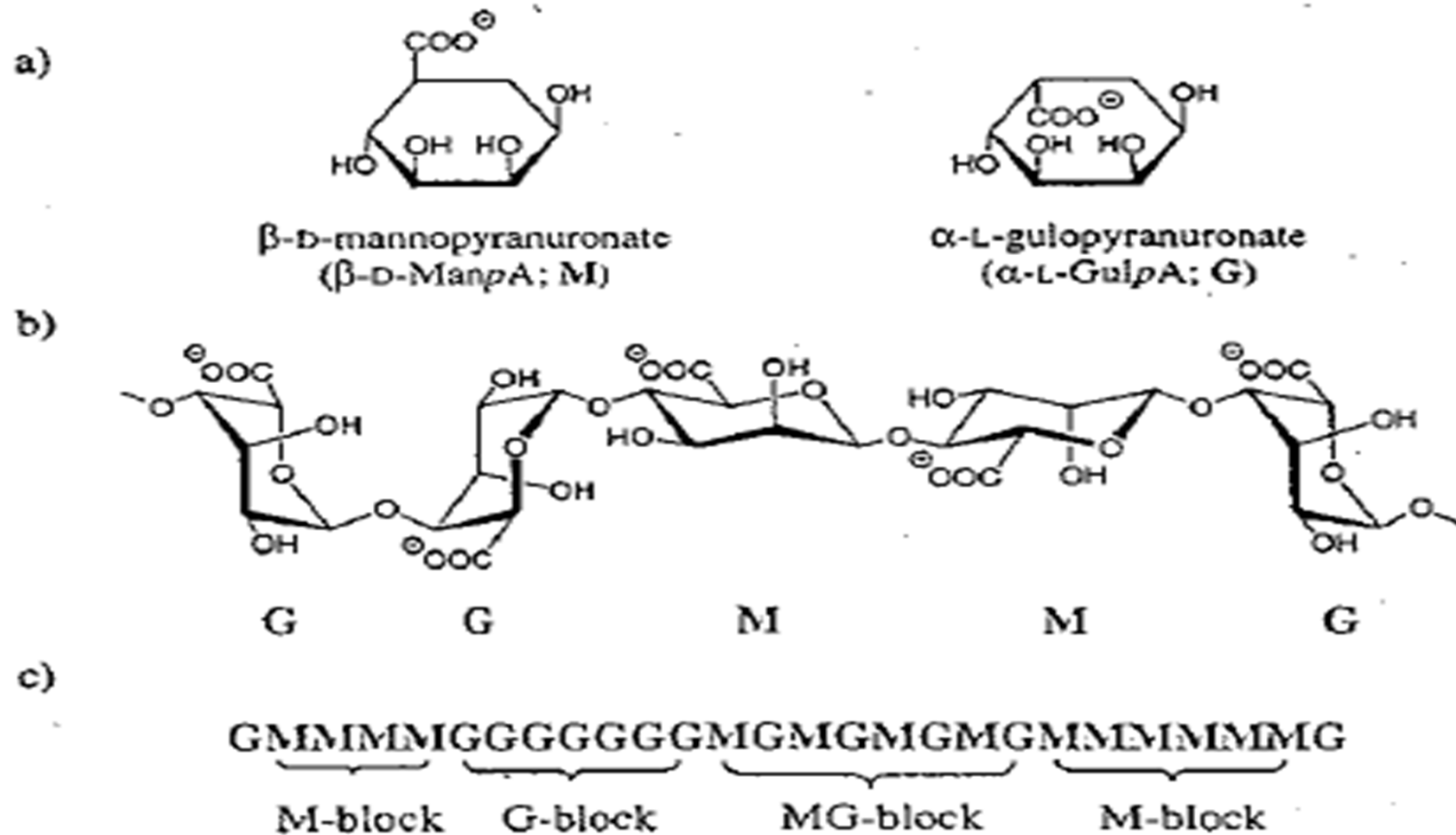
- Structure fine (blocs) par  $^1\text{H}$  NMR et  $^{13}\text{C}$  NMR à 90 °C (diad and triad frequencies). Féquences G, M, GG, MM, MG...

TABLE I  
Fractional Composition of Alginates as Determined by  $^1\text{H}$ -NMR

Organism	Fractional composition								Reference
	$F_G$	$F_M$	$F_{GG}$	$F_{MM}$	$F_{MG}$	$F_{GM}$	$F_{GGG}$	$F_{MMM}$	
Seaweeds:									
<i>Laminaria digitata</i>	0.42	0.68	0.27	0.43	0.15	0.15	0.22	0.10	Grasdalen (1983)
<i>Laminaria hyperborea</i> (stipe)	0.70	0.30	0.60	0.20	0.10	0.10	0.56	0.06	
<i>Macrocystis pyrifera</i>	0.39	0.61	0.21	0.43	0.18	0.18	0.20	0.20	
<i>Ascophyllum nodosum</i>	0.43	0.57	0.18	0.32	0.25	0.25	0.13	0.17	
Bacteria:									
<i>Azotobacter vinelandii</i> TL	0.45	0.55	0.43	0.52	0.02	0.02	0.41	0.02	Skjak-Braek <i>et al.</i> (1986a)
<i>Azotobacter vinelandii</i> IV	0.94	0.06	0.93	0.04	0.01	0.01	—	—	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (10255)	0.40	0.60	0	0.20	0.40	0.40	—	0.40	
<i>Pseudomonas mendocina</i> (10541)	0.26	0.74	0	0.48	0.26	0.26	—	0.26	
<i>Pseudomonas putida</i> (1007)	0.37	0.63	0	0.26	0.37	0.37	—	0.40	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CF492a	0.26	0.74	0	0.48	0.26	0.26	—	—	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (3763)	0.44	0.56	0	0.12	0.44	0.44	—	—	Sherbrock-Cox <i>et al.</i> (1984)

# 4. Cas des Alginates

## Structure



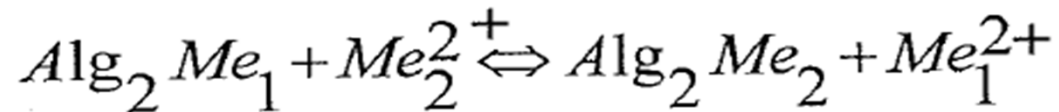
*Structural data of alginates: (a) the monomers in alginate;  
(b) the alginate chain; and (c) alginate chain sequence.*



# 4. Cas des Alginates

## Propriétés - Gélification

- Alginates tels quels = épaississants. Mais, possibilité de gélifier!
- La gélification se produit à l'aide d'ions métalliques divalents
- La fixation de l'ion au polymère se produit par échange d'ion



Coefficient de sélectivité

$$K_{\text{Me}_2^{2+} / \text{Me}_1^{2+}} = \frac{X_{\text{Me}_2^{2+}} C_{\text{Me}_1^{2+}}}{X_{\text{Me}_1^{2+}} C_{\text{Me}_2^{2+}}}$$

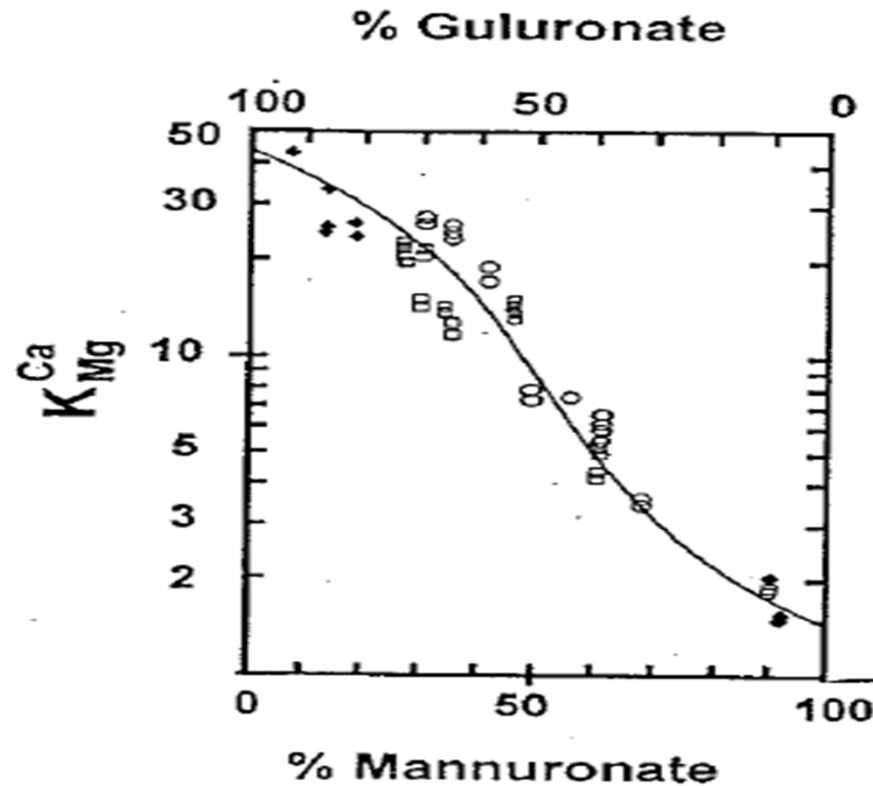
$X_{\text{Me}^{2+}}$  = fraction molaire d'ions métalliques liés à l'alginate

$$= X_{\text{Me}_1^{2+}} + X_{\text{Me}_2^{2+}} = 1$$

$C_{\text{Me}_1^{2+}}$  et  $C_{\text{Me}_2^{2+}}$  : concentration molaire des ions dans la solution à l'équilibre

# 4. Cas des Alginates

## Propriétés - Gélification



- Plus %G est grand, plus K est important
- Quand %G  $\searrow$  et %M  $\nearrow$ , K  $\searrow$
- Pas de sélectivité du mannuronate pour  $Ca^{2+}$ , mais bien sélectivité du guluronate

Selectivity coefficients,  $K_{Mg}^{Ca}$ , for alginates and alginate fragments as a function of monomer composition. The experimental points are obtained at  $X_{Ca}=X_{Mg}=0.5$ . The curve is calculated using  $(K_{Mg}^{Ca})_{guluronate} = 40$  and  $(K_{Mg}^{Ca})_{mannuronate} = 1.8$  (from [37])

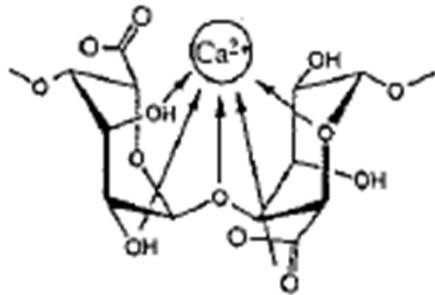
# 4. Cas des Alginates

## Propriétés - Gélification

- Les liaisons G-G forment des “U” qui peuvent capter les différents ions  $\text{Ca}^{2+}$  (par les groupement OH des guluronates)
- Le capté dans un bloc G-G est capable d’attirer un autre bloc G-G d’une autre chaîne – structure “egg box”.



Effet chélatant, mécanisme principal de gélification des alginates

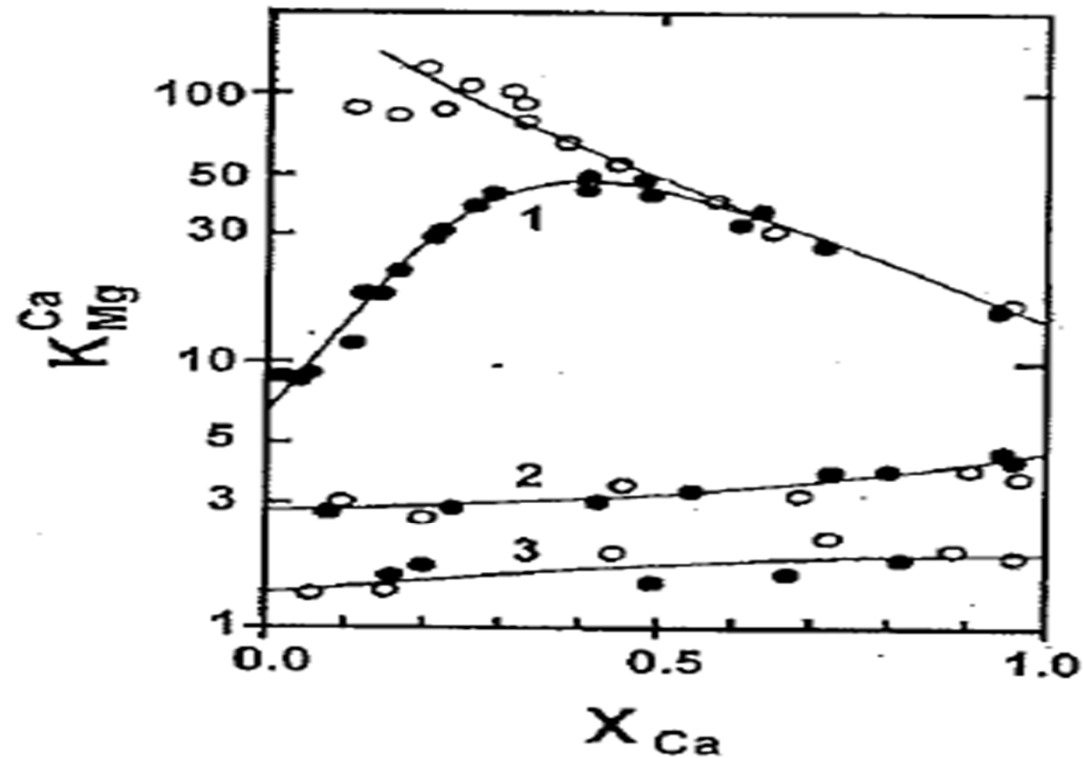


**Le nombre de blocs G-G successifs conditionne le nombre de sites de fixation de 2 chaînes**

*The egg-box model for binding of divalent cations to homopolymeric blocks of  $\alpha$ -L-guluronate residues [41], and a probably binding site in a GG-sequence.*

# 4. Cas des Alginates

## Propriétés - Gélification



Selectivity coefficients,  $K_{Mg}^{Ca}$ , as a function of ionic composition ( $X_{Ca}$ ) for different alginate fragments. Curve 1: Fragments with 90% guluronate residues. Curve 2: Alternating fragment with 38% guluronate residues. Curve 3: Fragment with 90% mannuronate residues. ●: Dialysis of the fragments in their  $Na^+$  form. ○: Dialysis first against 0.2 M  $CaCl_2$ , then against mixtures of  $CaCl_2$  and  $MgCl_2$  (from {40}).

# 4. Cas des Alginates

## Propriétés - Gélification

Selectivity coefficients<sup>12</sup> for equilibria between sodium ions, divalent metal ions and alginate

ORIGIN OF ALGINATE		<i>L. digitata</i>	<i>L. hyperborea</i> (stipes)
<u>Mannuronic</u>	ratio	1.6	0.45
Guluronic			
Divalent Metal	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Cu}^{2+} \\ \text{Ba}^{2+} \\ \text{Ca}^{2+} \\ \text{Co}^{2+} \end{array} \right.$	$\frac{K}{230}$	$\frac{K}{340}$
		21	52
		7.5	20
		3.5	4

Other experiments<sup>13</sup> have indicated that the selectivity coefficients for two types of alginate are in the order.

<i>L. digitata</i>	Pb-Cu	Cd	Ba	Sr	Ca	Co	Ni	Zn	Mn	Mg	
<i>L. hyperborea</i> (stipes)	Pb	Cu	Ba	Sr	Cd	Ca	Co	Ni	Zn	Mn	Mg

# 4. Cas des Alginates

## Propriétés - Gélification

BASES MOLECULAIRES A LA GELIFICATION

Gélification ou précipitation très rapide avec  $\text{Ca}^{2+}$

→ défaut aspect (« yeux »)

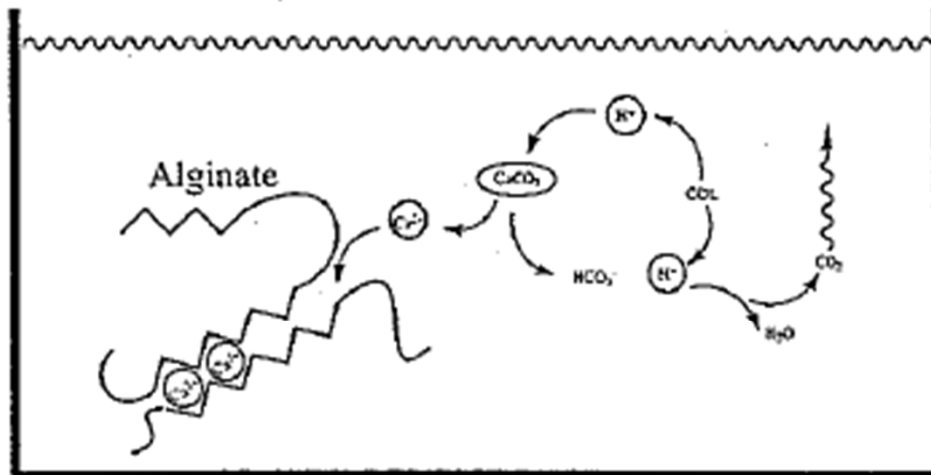
→ techniques de préparation

- méthode par dialyse : diffusion  $\text{Ca}^{2+}$  à travers membrane
- extrusion → bain (ou goutte à goutte)
- gélification interne : blocage du  $\text{Ca}^{2+}$  et relargage

agent séquestrant : phosphate, citrate, EDTA,  
sels insolubles  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{CaCO}_3$ .

# 4. Cas des Alginates

## Propriétés - Gélification



*Principal reactions during the formation of an alginate gel using D-glucono- $\delta$ -lactone (GDL) and  $\text{CaCO}_3$ .*

D glucono  $\delta$  lactone (GDL)  
inactive progressivement  
l'agent séquestrant ( $\text{Ca CO}_3$ )

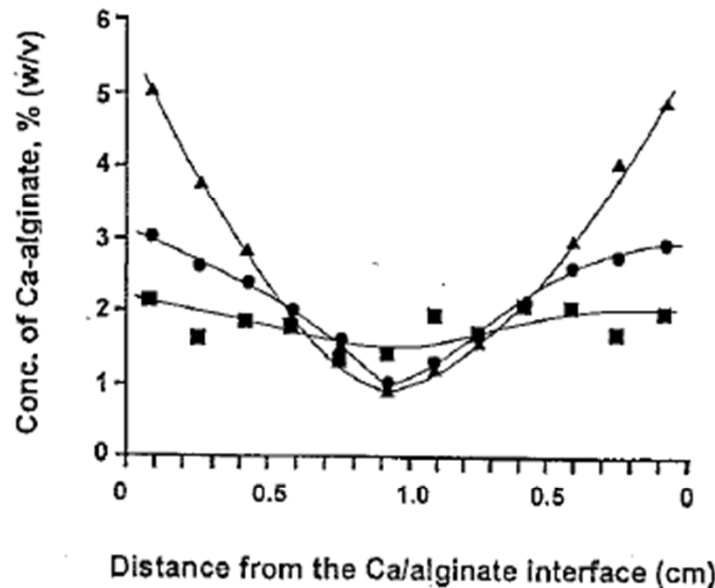
- Acidification lentement le milieu (libération  $\text{H}^+$ )
- $\text{H}^+ + \text{CaCO}_3 \rightarrow \text{Ca}^{2+} + \text{HCO}_3^-$
- $\text{Ca}^{2+}$  induit la gélification

# 4. Cas des Alginates

## Propriétés - Gélification

- La gélification se produit à l'aide d'ions métalliques divalents
- La fixation de l'ion au polymère se produit par échange d'ion

### HOMOGENEITE DU GEL



Concentration en polymère plus basse au centre  
gélification rapide en surface et diffusion de l'alginate  
du centre vers la périphérie  
- parfois recherché : propriété barrière  
- plus homogène avec gélification « interne »

*Polymer concentration profiles of alginate gel cylinders formed by dialyzing a 2% (w/v) solution of Na-alginate from Laminaria hyperborea against 0.05 M CaCl<sub>2</sub> in the presence of NaCl. ■: 0.2 M; ●: 0.05 M; ▲: no NaCl.*



# 4. Cas des Alginates

## Propriétés – Génétique et Biosynthèse

Algues + bactéries : Azotobacter vinelandii

Composition and sequence data of alginates isolated from natural sources.  $F_G$  and  $F_{GG}$  give the molar fraction of guluronic acid and the frequencies of diad guluronic acid, respectively. d.a.: degree of acetylation.

Source	Composition $F_G$	Sequence $F_{GG}$	OAc d.a.
Seaweeds	0.20 - 0.85	0.07 - 0.70	0
<i>A. vinelandii</i>	0.10 - 0.95	0.02 - 0.85	0.02 - 0.6
<i>P. aeruginosa</i>	>0.5 - 1.0	0	0.2 - >1
<i>S. syringae</i>	>0.5 - 1.0	0	0.2 - >1
<i>P. mendocina</i>	>0.5	0	0.2 - >1
<i>P. putida</i>	>0.5	0	0.2 - >1
<i>P. fluorescence</i>	>0.5	0	0.2 - >0.5

Pseudomonas



composition très variable de pur M à 80% G, homogène (*A. vinelandii*) à polyalterné (*Pseudomonas*)

+

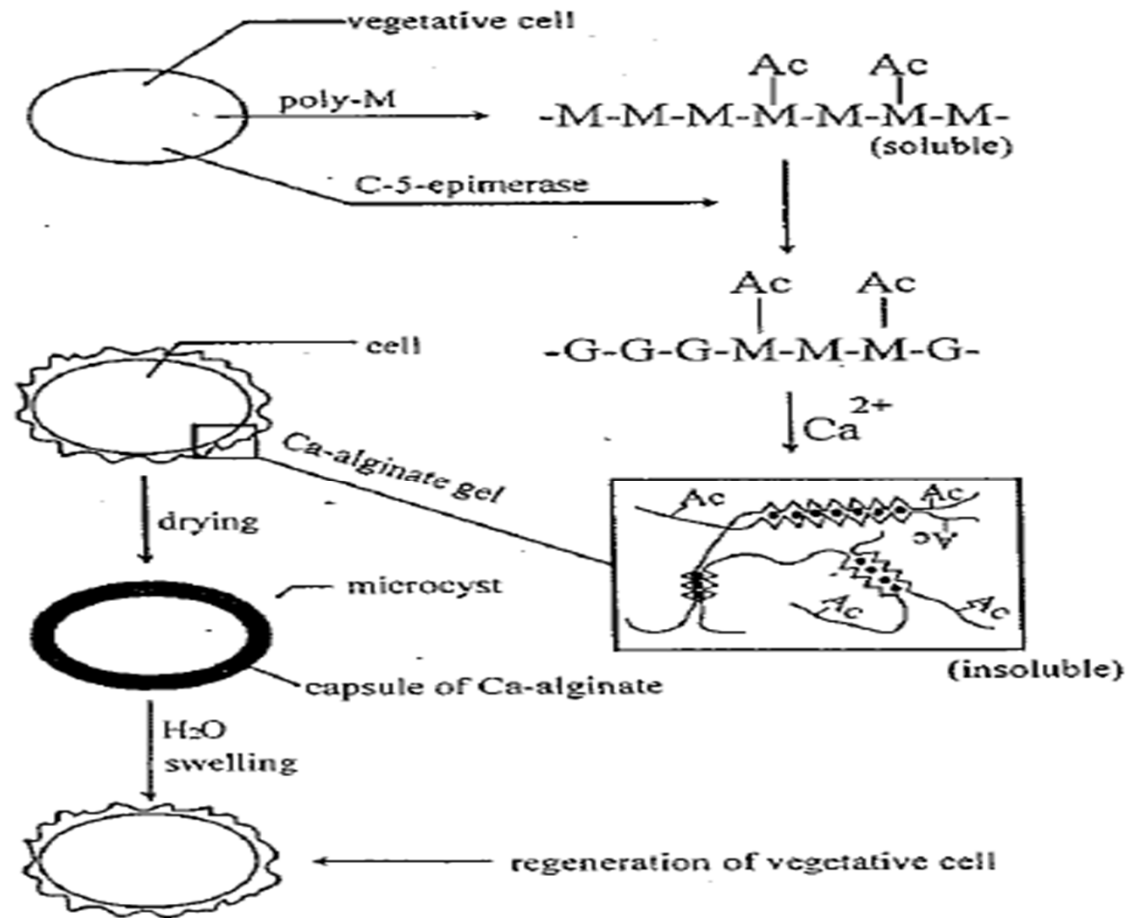
présence de groupements acétylés

Azotobacter + proche des algues

Absence de G adjacent →  $G < 50\%$

# 4. Cas des Alginates

## Propriétés – Génétique et Biosynthèse

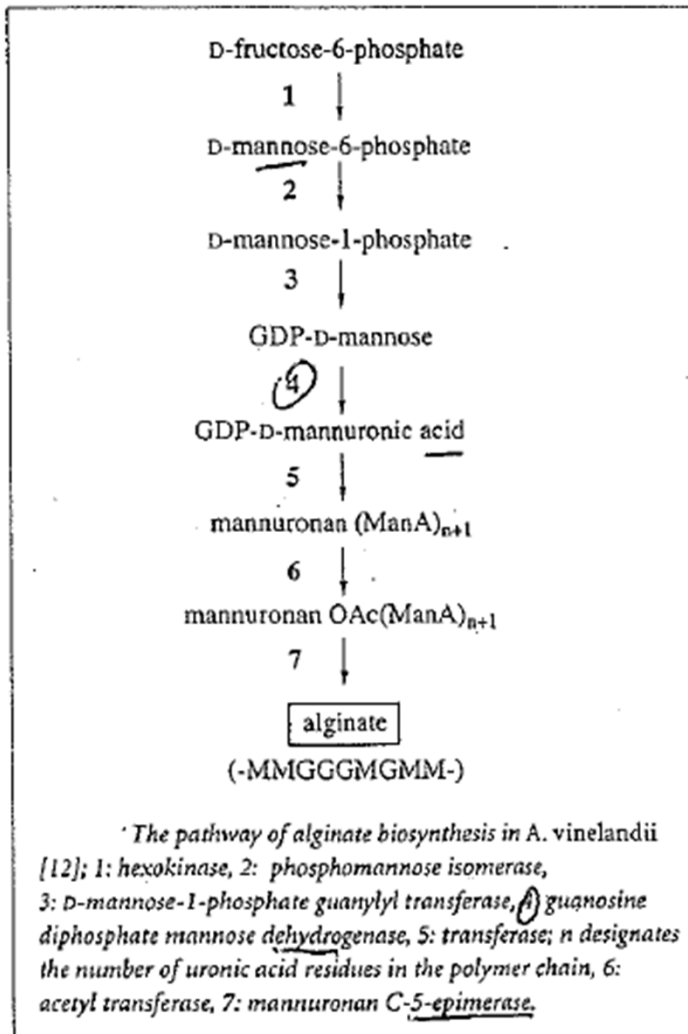


*The role of alginate synthesis in the formation of cysts by Azotobacter vinelandii.*

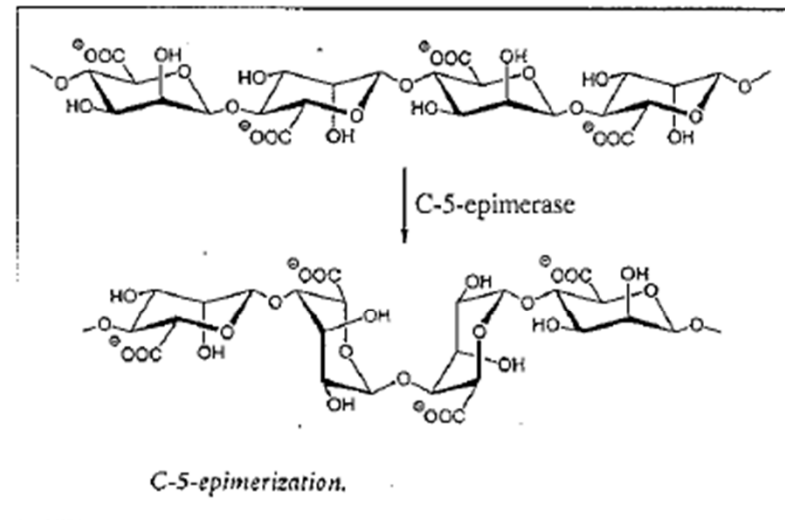
# 4. Cas des Alginates

## Propriétés – Génétique et Biosynthèse

7 étapes



Etape 7 C5 épimérisation  
 $\beta$  -D mannuronate  $\rightarrow$   $\alpha$  -L guluronate



# 4. Cas des Alginates

## Propriétés – Applications

MAIN PROPERTY USED	USE	SPECIAL REASON FOR USE
Thickening power.	Controlling the viscosity of food products, e.g. sauces and syrups.	Alginates are edible. <i>comestible</i>
	Thickening cosmetic creams and lotions.	Harmless on skin.
	Thickening liquid detergents and shampoos.	
	Thickening textile printing pastes.	Easily washed out; special advantages with certain dyes.
	Thickening rubber and synthetic latices and some adhesives.	Penetration into fabrics and paper is controlled.
	Thickening water for fire fighting.	Non corrosive.
General colloidal properties.	Stabilising ice cream.	Checks phase separation.
	Stabilising foam on beer.	
	Stabilising water ices.	Checks dripping. <i>Egouttage</i>
	Suspending solids in fruit drinks.	
	Stabilising edible emulsions, e.g. salad dressings.	
	Stabilising imitation cream.	Gives quick whipping.
	Preventing liquid separation in toothpaste.	
	Improving flow properties of welding electrode fluxes.	Improves drying behaviour.
<i>son usage</i>	Flocculating solids in water treatment and sugar processing.	
	Creaming rubber latex.	Creamed latex is stabilised.
	Formation of films and fibres.	
Formation of films and fibres.	Sausage casings.	Edible and hygienic.
	Calcium alginate yarn (temporary threads).	Easily dissolved.
	Calcium-sodium fibres.	Haemostatic and absorbable.

Gel formation.	Milk desserts	
	Table jellies Confectionery jellies Animal foods.	Jellies can be made in the cold and are heat stable.
	Reformed fruits and other food products.	
	Jellies with thermally delayed setting.	Setting temperature can be controlled.
	Dental impression materials.	Can be used in the cold.
	Semi solid pharmaceutical and cosmetic preparations.	
Formation of films on surfaces (including bindings).	Binding pharmaceutical tablets.	Distintegration on wetting.
	Oil impermeable barrier creams for protecting the skin.	
	Textile warp sizing. <i>chaîne</i> <i>imfois</i>	Easily washed out.
	Surface sizes and coating additive for paper.	Controls penetration for oily substances.
	Priming coat for porous surfaces.	Controls penetration.
	Anti-stick and mould release.	<i>à former collant et dés-charge</i>
	Temporary binders for sintered products.	Easily destroyed on firing.
Base exchange and chemical reactions.	Analytical separations.	
	Purification of bases.	
	Salts of physiologically active bases. Medical uses.	
	Combination with strontium to prevent absorption into tissues.	Does not remove calcium.
	Hardening gelatine.	Has suitable properties for photography.

# 4. Cas des Alginates

## Propriétés – Applications

**TABLE 3**  
Some Major Applications of Alginates

<i>Area of application</i>	<i>Function</i>	<i>Specific examples</i>
Food and drinks industry	Stabilizer	Foam stabilizer (beer). Phase-separation retardant (ice cream).
	Viscosifier	Suspension of fruit pulp. Thickener for sauces, milk shakes etc.
	Gelling agent	Reconstitution of foods (stoneless fruit, onion rings).
	Film	Coating of fish.
Pharmaceutical industry	Stabilizer	Emulsions in cosmetic preparations. Binder for tablets and lozenges.
	Gelling agent Film/fibres	Moulds for dental impressions. Gastroenteric coatings for tablets. Haemostatic bandages.
	Therapeutic agents	Anti-acid and anti-ulcer compound.
Other uses	Viscosifier	Printing inks.
	Gelling agent	Enzyme/cell immobilization.

# 4. Cas des Alginates

## Propriétés – Applications

### Traitement du reflux œsophagien

- protection de la muqueuse
- formation gel acide dans l'estomac, obstacle au reflux
- synergie avec produits anti-acides

### Dermatologie, agent cicatrisant

- formation gel en surface

### Re largage

- tablettes contenant alginates et médicament
- +H<sub>2</sub>O → gonflement (pénétration eau) et diffusion médicament
- rôle porosité, composition...

# 4. Cas des Alginates

## Propriétés – Applications

### Matériel pour impression dentaire

Alginate + ...

- Sels solubles Ca
- Charge : ex terre à diatomée
- Retardateur : pyrophosphate tetra sodique

### Impressions textiles

- Epaissement des systèmes aqueux utilisés + rhéologie
- Pas de réaction avec encres et fibres textiles
- Pas de groupement hydroxyle primaire + répulsion de l'anion (encre) par  $\text{Coo}^-$  (condition alcaline)

→ bonne fixation, couleur lumineuse, lavable

### Papeterie

Renforcer effet amidon (10% par rapport amidon)

### Traitement des eaux

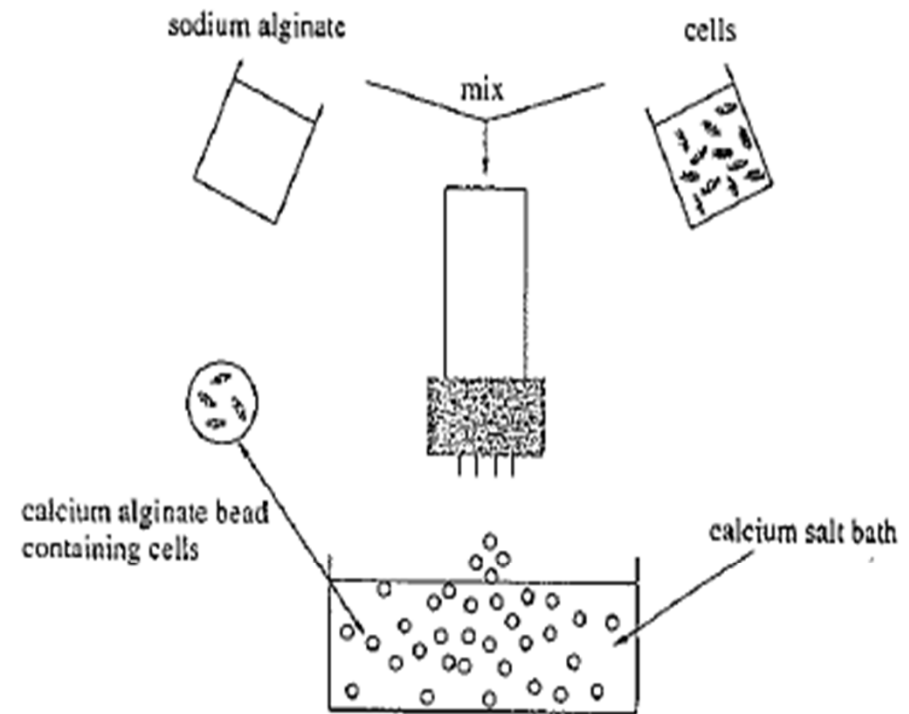
Co-floculants : fixation d'agrégats

# 4. Cas des Alginates

## Propriétés – Applications

### Matrice d'immobilisation

Alginate 1-4%  
Solution de cations : 20-100 mM  
qq  $\mu$  à plusieurs mm



*Entrapment of cells in calcium alginate*



# 4. Cas des Alginates

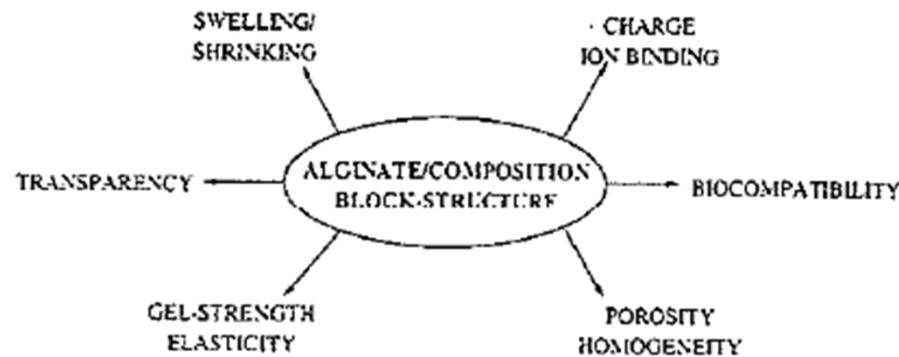
## Propriétés – Applications

*Examples of alginate immobilized cells.*

Cells	Product	References
<b>Bacteria</b>		
<i>Erwina rhapontici</i>	Isomaltulose	[7]
<i>Leuconostoc oenos</i>	Wine	[8]
<i>Pseudomonas denitricans</i>	Drinking water	[9]
<b>Blue green algae</b>		
<i>Anabena species</i>	Ammonia	[10]
<b>Fungi</b>		
<i>Claviceps purpurea</i>	Alkaloids and ergotoxins	[11]
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicillin	[12]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ethanol	[13]
<b>Brown algae</b>		
<i>Botryococcus braunii</i>	Hydrocarbons	[14]
<b>Plant cells</b>		
<i>Chatharanthus roseus</i>	Alkaloids	[15]
<b>Mammalian cells</b>		
Hybridoma	Monoclonal antibodies	[16]
Islets of Langerhans	Insulin	[17]
Fibroblasts	Interferon $\beta$	[18]
Hepatocytes	Detoxification of blood	[19]
Neural cells	Neurotransmitters and trophic factors	[20]

# 4. Cas des Alginates

## Propriétés – Applications



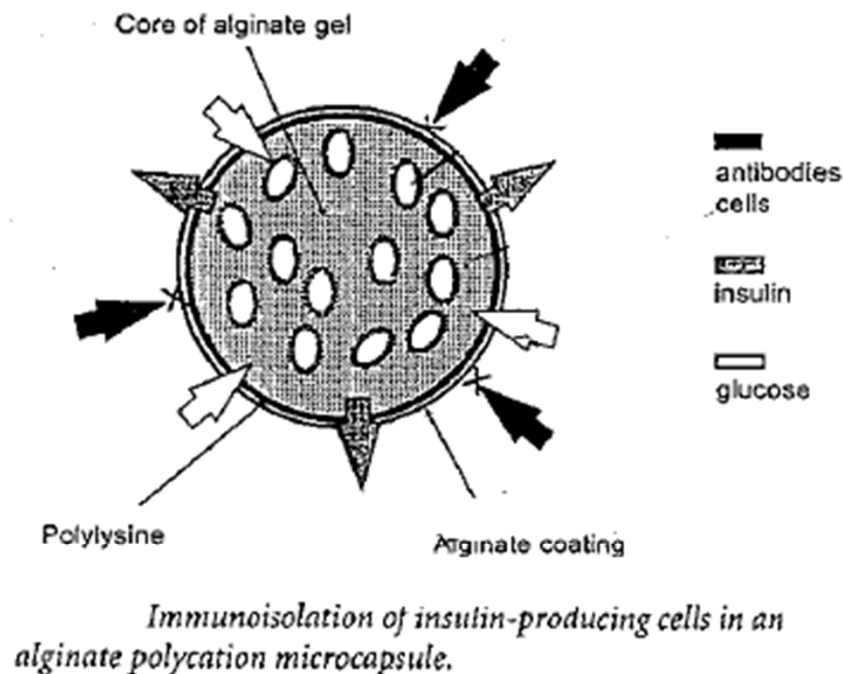
*Some structure-function correlations in alginate gels relevant to their use as immobilization material.*

- Haute teneur en acide guluronique →
- gel fort stable malgré ions « antigel » :  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  séquestrant Ca.
  - poreux, peu de rétrécissement lors de la formation gel.
  - faible gonflement après séchage

## Microcapsules comme barrière immunologique en prospection

→ transplantation → barrière entre transplant et système  
immunitaire

ex : cellules productrices d'insuline → diabète



Difficultés : biocompatibilité + altération microscopique



intérêt de renforcer la périphérie → voir  
précédemment

# 4. Cas des Alginates

## Propriétés – Applications

### Compatibilities of Alginates in Solution

#### A. COMPATIBLE

*Some common substances, high proportions of which can be included in aqueous alginate solutions without causing precipitation.*

Polyhydric alcohols	Ethylene glycol, glycerol, sorbitol, mannitol.
Carbohydrates	Simple sugars, starch, soluble cellulose derivatives.
Gums	Acacia, tragacanth, locust bean, guar, karaya, carrageenan, pectin.
Salts	Most salts of the alkalis, ammonium and magnesium, e.g. sodium sulphate, sodium carbonate, borax, magnesium sulphate.
Dyestuffs	Reactives, directs, vats, solubilised vats, Rapidogens, many acid dyes, pigment dyestuffs and binders.
Proteins	Gelatine, egg albumen, casein, vegetable proteins (calcium assumed absent or sequestered).
Miscellaneous	Urea, phenol, emulsified oils and resins, boric acid.

#### B. INCOMPATIBLE

*Some substances which even in low concentration precipitate alginates from solution.*

Salts	Soluble ionised salts of alkaline earths and heavy metals.
Acids	Strong acids (sufficient to bring the pH to below 3.5 in alginate salt solutions, 2.5 in propylene glycol alginate solutions).
Organic substances	Cationic detergents, positively charged colloids.