



HAL
open science

L'influence des cultivars sur les propriétés fonctionnelles de la caroube Libanaise

Amira Haddarah

► **To cite this version:**

Amira Haddarah. L'influence des cultivars sur les propriétés fonctionnelles de la caroube Libanaise. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT: 2013LORR0280. tel-01750625

HAL Id: tel-01750625

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750625v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Université Libanaise
Ecole Doctorale
Sciences et Technologie



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**Doctorat Université de Lorraine Et Université Libanaise
THESE EN COTUTELLE**

Pour obtenir le grade de Docteur délivré par
L'Université Libanaise (Ecole Doctorale des Sciences et Technologie)
Et l'Université de Lorraine (France)

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Présentée et soutenue publiquement par

HADDARAH Amira

Le 12 Décembre 2013

**L'influence des cultivars sur les propriétés fonctionnelles de la caroube
Libanaise**

Directeurs de thèse

Mohamed GHOUL

Tayssir HAMIEH

Membre du Jury

Pierre-Yves Pontalier : Maître de Conférences HDR, INRA/INP-ENSIACET, Toulouse, France, rapporteurs

Imad Toufaily : Professeur de l'Université américaine de Beyrouth (AUB), rapporteurs

Mohamed Ghoul: Professeur à l'Université de Lorraine, France, Directeur

Tayssir Hamieh: Professeur à l'Université Libanaise, Beyrouth, Liban, Directeur

Invités (co-encadrants) :

Ali Ismail : Maître de Conférences à l'Université Libanaise, Beyrouth

Ali Bassal : Maître de Conférences à l'Université Libanaise, Beyrouth

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse en cotutelle ont été menés essentiellement au laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules de L'Université de Lorraine à Nancy-France et les deux laboratoires MCEMA et la plateforme de l'école doctorale des sciences et de technologie de l'Université Libanaise au Liban.

Cette thèse n'aurait pas pu être réalisée sans le concours de nombreuses personnes et des différentes collaborations effectuées notamment entre l'association AZM et l'université libanaise, l'École Doctorale des Sciences et Technologie de l'Université Libanaise et l'École Doctorale RP2E de l'Université de Lorraine.

Un très grand merci à l'association AZM au nom de son président Monsieur Abdel Illah MIKATI pour la bourse de recherche doctorale qui m'a été accordée. Un grand merci à Monsieur Mohamad KHALIL pour son aide lors du dépôt du dossier de candidature, et à la doyenne de l'école doctorale à Mme Zeinab SAAD .

Je tiens à remercier avec grand plaisir tous les membres de jury, Messieurs les rapporteurs Pr. Pierre-Yves Pontalier et Pr. Imad Toufaily, messieurs les invités (Co-directeur de thèse) M. Ali Bassal, M. Ali Ismail et mes directeurs de thèses Pr. Mohamed GHOUL et Pr. Tayssir HAMIEH.

Le très grand remerciement à M. le professeur Mohamed GHOUL pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, et m'a formé et m'a permis de savoir comment gérer et maîtriser les problèmes, avec la conviction, les qualités pédagogiques et l'enthousiasme communicatif dont il sait faire preuve. C'est à la fois un privilège et une expérience exceptionnelle que d'avoir pu bénéficier de ses conseils. Merci...

A Monsieur le Professeur Tayssir HAMIEH, qui m'a fortement aidé dans des moments difficiles. Veuillez recevoir mes plus chaleureuses et amicales pensées.

J'exprime mes remerciements et ma gratitude à Madame Latifa CHEBIL, Maître de conférence à L'Université de Lorraine, de m'avoir encouragé pendant toute la durée de mon travail, ainsi qu'à la confiance qu'elle m'a attribuée tout au long de mon étude.

Je tiens à remercier également, Mme Irina IANOU Maître de conférence pour sa précieuse aide durant les statistiques, M. Georges SALLOUM durant l'échantillonnage, et à tous mes collègues : Manèle, Hind, Mona....et bon courage pour eux.

Un grand merci pour l'ensemble du personnel de l'ENSAIA particulièrement, Anne Laplace-Chassard qui m'a aidé tellement durant mon séjour en France.

Un grand remerciement pour mes parents, mes frères et sœurs et spécialement ma mère dont cette thèse doit beaucoup à son soutien et à ses encouragements.

A ma belle-sœur merci d'avoir pris soin de mes enfants durant mon absence.

Ma reconnaissance affectueuse et inconditionnelle va à mon mari et mon amour Dr Hasan SKAYNEH et à son immense générosité pour son support moral et la conviction qu'il a mise à m'assurer sans faille pendant ces années de recherche. Je le remercie de même pour la patience avec laquelle il a supporté et accompagné les moments les plus difficiles de ce travail. Merci pour tout, tu es parfait. Que notre route commune soit longue...

Enfin, à mes trois enfants Zeinab, Ali et Rim j'adresse tout mon amour de mère, et mes excuses de chercheuse passionnée pour avoir passé de nombreux moments devant mon ordinateur. Cette thèse est dédiée à vous ...

Amira HADJARA

Liste des abréviations

| | |
|--|---|
| A1: Akkari 1 | KCl: chlorure de potassium |
| A2: Akkari 2 | Kh: khachabi |
| Ah: Ahmar | MgCl ₂ : Chlorure de Magnésium |
| Bal: Baladi | M/G: Mannose to Galactose ratio |
| Bar: Barri | Mg(NO ₃) ₂ : Nitrate de Magnésium |
| CuCl ₂ : Chlorure de cuivre | me masse de échantillon |
| cLBG: crude Locust Bean Gum | ms: sample weigh |
| Da: Dalton | Mw: Molecular weight |
| D.W.: distilled water | N: Nitrogen |
| F facteur dépendant de la nature d'échantillon | Na ₂ CO ₃ : sodium carbonate |
| F: factor | NaCl: Chlorure de sodium |
| GA: Gallic acid | n: Flow behavior index |
| G': elastic modulus | p: probability |
| G'': viscous modulus | PCA: principal component analysis |
| GC: commercial gum | pLBG: purified Locust Bean Gum |
| GM: Galactomannan | SM: Sandali Makdissi |
| H ₂ SO ₄ : sulfuric acid | SG: specific gravity |
| J1: Jnoubi1 | SM: Sandali Makdissi |
| J2: Jnoubi2 | VB Volume du Blanc |
| K: Consistency index or apparent viscosity | VE Volume de dosage d'échantillon |
| KC ₂ H ₃ O ₂ : acetate de Potassium | Vs: volume sample |
| K ₂ CO ₃ : Potassium carbonate | Vb: volume blank |
| KOH: Hydroxide de potassium | η^* : complex viscosity $[\eta]$: intrinsic viscosity |
| K ₂ SO ₄ : Sulfate de Potassium | λ : wavelength |
| kDa: kilo Dalton | |

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| <i>Introduction</i> | 1 |
| <i>Chapitre 1 - Synthèse bibliographique</i> | 5 |
| 1.1 Le caroubier | 5 |
| 1.1.1 Description botanique | 5 |
| 1.1.2 Conditions de culture | 9 |
| 1.1.3 Distribution géographique..... | 9 |
| 1.1.4 Importance écologique | 11 |
| 1.1.5 Importance économique | 11 |
| farineLa Gousse de caroube | 13 |
| 1.1.6 Composition de la pulpe..... | 14 |
| 1.1.7 Graines de caroube | 19 |
| 1.2 Gomme de caroube | 21 |
| 1.2.1 Structure | 22 |
| 1.2.2 Comportement Rhéologique | 24 |
| 1.2.3 Rapport mannose/galactose..... | 25 |
| 1.2.4 Isotherme de sorption | 26 |
| 1.2.5 Application | 27 |
| 1.3 Utilisation des produits de caroube | 28 |
| 1.3.1 Alimentaire..... | 28 |
| 1.3.2 Médicale | 30 |
| 1.3.3 Cosmétique..... | 30 |
| 1.3.4 Chimique | 31 |
| 1.4 Effets indésirables des produits de caroube | 31 |
| <i>Chapitre 2 - Matériel et Méthode</i> | 33 |
| 2.1 Géolocalisation par GPS : échantillonnages | 33 |
| 2.2 Caractéristiques morphologiques | 33 |
| 2.2.1 Longueurs..... | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.2 Largeurs..... | 34 |
| 2.2.3 Epaisseurs..... | 34 |
| 2.2.4 Volumes | 34 |
| 2.2.5 Indice de taille | 34 |
| 2.2.6 La densité spécifique..... | 34 |
| 2.2.7 Analyses Statistiques..... | 34 |
| 2.3 Analyses chimiques | 35 |
| 2.3.1 Préparation de l'échantillon | 35 |
| 2.3.2 Polyphénols totaux | 35 |
| 2.3.3 Détermination des sucres totaux | 37 |
| 2.3.4 Protéines..... | 38 |
| 2.3.5 Fibres..... | 39 |
| 2.3.6 Cendres..... | 39 |
| 2.3.7 Humidité..... | 39 |
| 2.4 Extraction des gommages de caroube..... | 40 |
| 2.4.1 Préparation de la gomme non purifiée | 40 |
| 2.4.2 Purification..... | 41 |
| 2.5 Analyses rhéologique | 43 |
| 2.5.1 Préparation des solutions..... | 44 |
| 2.5.2 Paramètres rhéologiques de viscosité..... | 44 |
| 2.5.3 Oscillation | 45 |
| 2.6 Caractérisation Structurale | 45 |
| 2.6.1 Préparation des échantillons..... | 45 |
| 2.6.2 Détermination de la masse macromoléculaire | 46 |
| 2.7 Taille et potentiel Zeta..... | 46 |
| 2.8 Détermination du rapport mannose/galactose..... | 47 |
| 2.8.1 Protocole expérimental..... | 47 |
| 2.8.2 Hydrolyse | 47 |
| 2.8.3 Analyse par HPLC | 48 |
| 2.9 Détermination de l'isotherme de sorption..... | 48 |
| 2.9.1 Protocole..... | 48 |
| 2.9.2 Préparation des solutions salines..... | 49 |
| 2.9.3 Préparation des échantillons..... | 49 |

| | |
|---|------------|
| 2.9.4 Détermination de l'activité de l'eau | 50 |
| 2.9.5 Détermination de la teneur en eau | 50 |
| <i>Chapitre 3 - Caractérisation botanique et chimique de la caroube Libanaise.....</i> | <i>52</i> |
| 3.1 Introduction..... | 52 |
| 3.2 Article 1. Morphological and chemical variability of Lebanese carob varieties | 54 |
| 3.3 Contribution de l'article..... | 71 |
| <i>Chapitre 4 - Etudes des caractéristiques structurales et des propriétés rhéologiques de la gomme de caroube libanaise.....</i> | <i>73</i> |
| 4.1 Introduction : | 73 |
| 4.2 Article 2: The structural characteristics and rheological properties of Lebanese Locust Bean Gum..... | 74 |
| 4.3 Contribution de l'article..... | 86 |
| <i>Chapitre 5 - Investigation complémentaires.....</i> | <i>88</i> |
| 5.1 Projet d'article: L'influence du rapport mannose/galactose des gommes de caroube purifiées sur les propriétés rhéologiques et macromoléculaires et leur relation avec les cultivars..... | 88 |
| 5.2 Etude des isothermes de sorption..... | 99 |
| 5.2.1 Modélisations des isothermes de sorption..... | 100 |
| 5.2.2 Identification des coefficients des modèles..... | 100 |
| <i>Conclusion Générale.....</i> | <i>106</i> |
| <i>Perspectives.....</i> | <i>111</i> |
| <i>Références bibliographiques.....</i> | <i>103</i> |

Introduction

Introduction

Le caroubier est une espèce agro-sylvo-pastorale ayant d'énormes intérêts socio-économiques et écologiques (**Battle et Tous, 1997; Gharnit et al. 2001**). C'est un arbre xérophyte montrant quelques caractéristiques particulières telles la rusticité, la résistance à la sécheresse, la fertilisation du sol et la lutte contre l'érosion des sols. Par ailleurs, elle est d'une importance économique considérable, puisque ses gousses qui sont plus riches en sucre que la canne à sucre et la betterave sucrière. Elles sont utilisées en industrie alimentaire et pharmacologique (**NAS, 1979; Battle, 1997; Markis et Kefalas, 2004**). Ainsi, sa valeur commerciale a été récemment remarquée et appréciée créant ainsi un nouvel intérêt pour la plantation de caroubiers (**Sidina et al, 2009; Yousif et Alghzawi, 2000**). L'intérêt de planter les caroubiers a été augmenté dans les régions méditerranéennes en raison du développement de l'industrie alimentaire et l'augmentation de la demande pour les produits à base de caroube (**Gubbuk et al., 2010**).

Toutes les composantes de l'arbre (feuillage, fleur, fruit, bois, écorce, racine) sont utiles et ont de la valeur dans plusieurs domaines en plus de sa valeur ornementale et paysagère. Ainsi, il est considéré comme l'un des arbres fruitiers et forestiers qui représente le plus grand potentiel de valorisation.

Par ailleurs, la pulpe est très utilisée en industrie agroalimentaire et pharmacologique, notamment en alimentation diététique comme antidiarrhéique. Sa richesse en composés phénoliques sont à l'origine de ses remarquables propriétés antioxydante (**Hariri et al., 2009**). Elle est très riche en sucres (40-60%) en particulier, saccharose (27-40%), fructose (3-8%) et glucose (3-5%) mais pauvre en lipides (0,4-0,6%) ou protéines (2-6%) (**Leroy, 1929 ; Avallone et al., 1997**). Elle présente également une teneur très élevée en fibres (27-50%) et une quantité non négligeable de tanins (**Saura-Calixto, 1988**). La pulpe est souvent grillée et

broyée pour obtenir une poudre de couleur marron à arôme de chocolat qui est utilisée comme substituant de cacao. La pulpe de caroube, après broyage, peut être utilisée aussi dans l'extraction de jus sucrés, la préparation d'alcools, la production de farine de chocolat et dans l'alimentation animale. En général, la caroube est principalement exploitée pour la production de la gomme de caroube E 410 provenant de l'endosperme des graines de caroubier et utilisée dans la formulation des aliments (alimentation, confiserie,..) la cosmétique et l'industrie pharmaceutique comme agent épaississant, gonflant, liant et stabilisant dans les préparations des émulsions (**Calixto et Canellas, 1982 ; Sandolo et al., 2007**).

Au Liban, les caroubiers sont abondants et répartis le long des basses collines côtières. La plantation de cet arbre était longtemps négligée, malgré le grand intérêt écologique-économique de cette espèce végétale au pays. Les caroubiers ont été principalement utilisés pour la préparation de Dibs, une mélasse locale consommée par la population libanaise, tandis que les graines sont souvent jetées sans aucune valorisation. Récemment, l'intérêt écologique et socio-économique a permis d'encourager la culture du caroubier au Liban. Mais cette culture est confrontée à l'absence d'orientation et d'informations sur l'importance de la sélection des espèces les plus productifs, sur la variation de la composition chimique de différentes variétés libanaise (gousses et graines) en fonction de leur localisation géographique. Ce manque d'information entraîne de mauvais choix et de sélection des variétés à cultiver dans les nouveaux vergers de caroubiers. En effet, jusqu'à maintenant les critères de choix se basent uniquement sur des aspects morphologiques et physiologiques pour discriminer les différents types de caroubier libanais et pour choisir et gérer les différents cultivars à planter.

Peu d'études sont disponibles sur les caractérisations morphologiques et chimiques de la gousse et aucune information, à notre connaissance, n'est disponible sur les propriétés fonctionnelles et structurales de la gomme de caroube Libanaise.

Dans le cadre d'une démarche visant à développer une stratégie rationnelle d'amélioration et de gestion cette ressource renouvelable, cette thèse a été consacrée à la caractérisation et à l'évaluation de la valeur nutritive et fonctionnelle des gousses de caroube, originaires de plusieurs régions Libanaise. Ainsi, les principaux objectifs du présent travail sont:

1. Etude et caractérisation des critères morphologiques et de la composition chimique de différents cultivars cultivés et sauvages des caroubes Libanaises. Le but étant d'établir une corrélation entre les paramètres morphologiques, chimiques et les facteurs géographiques afin de sélectionner les variétés les plus performants utiles dans les programmes d'hybridation.
2. L'étude des propriétés physico-chimiques et rhéologiques des gommés issues des graines de caroube de différentes variétés. Les résultats obtenus aideront à développer des niches spécifiques à hautes valeurs ajoutées pour ces gommés. Cette étude a été complétée par des investigations structurales et des conditions de stockage (isothermes de sorption).

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

1.1 Le caroubier

Le caroubier (*Ceratonia siliqua L.*) appartient à la famille des légumineuses (Fabacées) de l'ordre des Rosales, de la sous-famille des césalpiniacées (**Figure1**). C'est un arbre de croissance lente, d'une longévité importante dépassant souvent les 200 ans (**Battle & Tous, 1997; Yousif et Alghzawi, 2000; Rejeb et al., 1991**). Il est largement cultivé dans les régions méditerranéennes à des fins ornementales et industrielles et nécessite peu d'entretien (**El Hajaji, 2010**).



Figure 1. L'arbre de caroubier

1.1.1 Description botanique

Le caroubier possède une cime très étalée et un tronc dont la base peut atteindre 2 à 3 mètres de circonférence et pouvant atteindre une hauteur de 15 m (**Rejeb et al., 1991**), avec un feuillage persistant, dense et brillant. Il a une écorce lisse et grise lorsque la plante est jeune, brune et rugueuse à l'âge adulte. Son bois de couleur rougeâtre est très dur (**Ait Chitt et al., 2007**).

1.1.1.1 Inflorescence

La plupart des caroubiers sont dioïques, parfois hermaphrodite et rarement monoïque (Linskens and Scholten, 1980; Battle et Tous, 1988). Ainsi, Les fleurs mâles (Figure 2.a), femelles (Figure 2.b) et hermaphrodites poussent sur des pieds différents. Les pieds mâle sont stériles et improductifs (Rejeb, 1995). D'après Tucker (1992a), les fleurs sont initialement bi-sexes et au cours de leur développement, l'une des fonctions sexuelle mâle ou femelle est supprimée. Par ailleurs, Les fleurs du caroubier poussent en automne et la floraison apparaît en hiver sur le vieux bois et porte les jeunes fruits (Figure 2.c), et à la fin de l'été que les gousses en maturité seront récoltées, en générale en Septembre (Haselberg, 1986; Tucker, 1992; battle & Tous, 1997). Les inflorescences portent 20 à 50 petites fleurs unisexuées qui se disposent sur les branches et le tronc en courtes grappes latérales (Figure2.a). Les fleurs sont inhabituelles sans pétales et le taux d'avortement des fleurs atteint 83 % chez les types productifs (Battle et Tous, 1997).



Figure 2. Type d'inflorescence du caroubier
a: fleurs mâles, b: fleurs femelles, c: gousses

1.1.1.2 Feuilles

Le caroubier est un arbre sclérophylle à feuilles persistantes, résistant à la sécheresse, mais peu tolérant au froid (Biner et al, 2007). Les feuilles sont ovales, d'un vert sombre et luisant sur le dessus et tirant sur le rougeâtre en dessous et elles ont un pétiole de 10 à 20 cm de longueur. Elles sont alternées pennées et ayant 2 à 5 paires de folioles coriaces (Figure 3), ovales et entières, légèrement échancrées au sommet et paripennées (Diamantoglou et Mitrakos, 1981; Rejeb, 1995). En outre, le caroubier ne perd pas ces feuilles en automne mais il les renouvelle partiellement au printemps tous les deux ans. Les vieilles feuilles mesurant 12 à 30 cm tombent en juillet (Diamantogulou et Mitrakos, 1981). Par ailleurs, le feuillage apporte une ombre appréciée dans les pays chauds et forment un rideau très efficace contre le bruit.

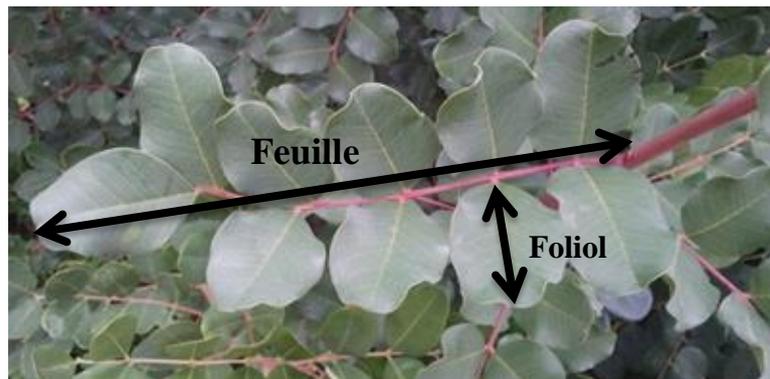


Figure 3. Feuille et foliole du caroubier

1.1.1.3 Types de Caroubiers

On rencontre deux types de caroubier, l'un sauvage ayant un rendement intéressant en graines et l'autre cultivé. L'abondance des graines dans les gousses d'une production de caroubier, est un caractère distinctif entre les types sauvages et cultivés. En effet, les types sauvages sont connus pour leur grande production de graines et leur faible teneur en pulpe et non charnues (Marakis et al., 1988; Ouchkif, 1988; Di Lorenzo, 1991). Plusieurs auteurs estiment que les gousses de caroube du type sauvage produisent généralement des proportions relativement plus importantes en graines que ceux des types cultivés et la qualité dépend du rendement en

graines : 15% selon **Ouchkif (1988b)** et 12 à 25% selon **Gharnit et al., (2001)**. De plus, ces graines (types sauvages) sont caractérisées par des péricarpes non charnues (**Marakis et al., 1988; Di Lorenzo, 1991; Tous et al., 1995; Battle & Tous, 1997; Gharnit et al., 2001**). Les gousses de types cultivés sont plus charnues et plus riches en sucre et sont largement utilisées comme matière première pour la production de sirops (**Roseiro, Girio, et Collaco, 1991**). Par conséquent, les entreprises qui produisent le sirop de caroube ou de la poudre de caroube préfèrent les types cultivés. La domestication de certains arbres sauvages non cultivées a été pratiquée dans le but d'augmenter le rendement des graines et de la qualité de gomme pour l'exploitation industrielle (**Batista et al., 1996; Makris and Kefalas, 2004**).

1.1.1.3 Culture historique

Le nom scientifique du caroubier, *Ceratonia siliqua* dérive du grec "Keras" (= corne) et du latin *siliqua*, désignant une siliqua ou gousse et faisant allusion à la dureté et à la forme du fruit (**Battle et Tous, 1997**). De même, Les Arabes se référent à la caroube comme "Kharroub", les italiens "Carrubo", les français "Carroubier", les allemands "Karubenbaum", les grecs "Charaoupi", le turc "charnup" et les espagnols "Garrofero" ou "Algarrobo" (**Battle et Tous, 1997; Zografakis & Dasenakis, 2002**).

Au Liban et selon les régions, la caroube est appelé « kharroub » ou « kharnub ». Par ailleurs de son utilisation historique comme un aliment de base dans l'alimentation des animaux domestiques (**Abi Azar R., 2007**), ce fruit a été également utilisé par les gens en temps de famine. La caroube est consommée dans les régions défavorisées et est connue sous le nom de « pains de St-Jean ». De même, les animaux pourraient également paître sur les feuilles, et le bois adapté comme combustible. Les caroubiers ont été traditionnellement intercalés avec des olives, des raisins, des amandes et de l'orge dans les systèmes à faible intensité agricoles dans la plupart des pays producteurs de caroube (**Battle & Tous, 1997**). Cet arbre a été introduite par les arabes dans la région méditerranéenne, y inclut l'Espagne (**Petit & Pinilla, 1995**).

1.1.2 Conditions de culture

Le caroubier est décrit comme une plante à grande adaptabilité au région du bassin méditerranéen (**Battle &Tous, 1997; Zengin et al., 2008**), caractérisé par des conditions climatiques semi-aride méditerranéennes. Les caroubiers ont un système profondément enraciné permettant une adaptation aux différents types de sols et conditions de salinité (**Obeidat et al, 2011**). Pour cela, ils poussent mieux dans les sols calcaires et de préférence les zones côtières proches de la mer. Cependant, le caroubier peut être endommagé par des températures basses inférieures ou égales à -4°C et ne peut survivre à des températures -7°C . Par contre, il peut subir des températures estivales de 40°C accompagnées de vents secs et chauds sans être visiblement affecté. Par ailleurs, pour une maturation complète, les caroubes ont besoin d'une exposition total de 5000 à 6000 heures à des températures supérieures à 9°C , (**Battle &Tous, 1997**).

1.1.3 Distribution géographique

Le caroubier est distribué dans toute la région du bassin méditerranéen. On le rencontre actuellement dansn une zone allant de l'Espagne et du Portugal jusqu'en Turquie, en Syrie, en passant par le Maroc, l'Algérie, la Tunisie, la Lybie, l'Egypte, le Liban, la Grèce, l'Italie et la France. Plus récemment, le caroubier a été introduit dans de nombreux autres pays à climats chauds et semi-arides, principalement aux Etats-Unis (Floride et Californie), l'Australie et l'Argentine, l'Arizona, le Chili, le Mexique et l'Afrique du Sud (**Battle et Tous, 1997**). Au Liban, la majeure partie de la population de *Ceratonia siliqua* se trouve dans la partie ouest du pays, dans les zones côtières et sur les pentes inférieures des montagnes côtières (20-800 m) (**FAO, 2001**). Une étude effectuée par **Eid (2001)** montre que les arbres présents à des altitudes plus élevées présentent souvent un aspect rabougri et chétif, sauf s'ils sont protégés par les parois d'une vallée, d'un rocher, ou par d'autres espèces végétales (**Abi Azar, 2007**).

1.1.3.1 Production mondiale

Le caroubier présente une irrégularité de production très marquée dont on attribue généralement la cause à une mauvaise pollinisation, à des déficiences en soins culturaux et aux conditions climatiques (FAO, 2003).

La production mondiale annuelle de caroube essentiellement méditerranéenne, est estimée à 310 000 tonnes dont les principaux producteurs sont l'Espagne (42%), l'Italie (16%), le Portugal (10%), le Maroc (8%), la Grèce (6,5%), la Chypre (5,5%) et la Turquie (4,8%) (FAOSTAT, 2010). Ainsi, L'Espagne étant le plus grand pays producteur et exportateur des gousses de caroube avec une production d'environ 150.000 t/an, couvre 57,5% de la superficie cultivée, et 47,6% de la production mondiale (Petit & Pinilla, 1995 ; Matthausa & Ozcan, 2011). La différence en rendement dépend de la récolte, de la région et des pratiques de culture (Makris et Kefalas, 2004). Ainsi, La grande variabilité phénotypique au sein et entre les cultivars a d'importantes implications pour la sélection, la création de nouvelles plantations et l'optimisation de la productivité de cette culture (Battle et Tous, 1997).

Dans de nombreux pays arabes, le fruit est utilisé pour préparer des boissons populaires et des confiseries. Dans les pays occidentaux, la poudre de caroube est produite par égrenage des gousses et la caroube concassés ainsi obtenu est enfin grillée et broyée (Yousif & Alghzawi, 2000).

1.1.3.2 Production au Liban

La production de caroube au Liban diminue d'une année à l'autre et cela est la conséquence d'un mauvais entretien des arbres cultivés. Estephan, 2002 a mentionné que la production de caroube au Liban est estimée à 7400 tonnes par an à partir de 700 ha. Alors que selon le recensement du Ministère d'agriculture 2010, la répartition du caroubier sur le territoire libanais fut estimée à 2200 tonnes (Tableau1).

Tableau 1. Les superficies occupées par le caroubier au Liban (Ministère d'Agriculture, 2010)

| Caroube | Liban | Mont Liban | Akkar | Nord Liban | Baalbeck (Hermel) | Bekaa | Sud Liban | Nabatieh |
|-----------------------------|-------|------------|-------|------------|-------------------|-------|-----------|----------|
| Superficie plantées (Dunum) | 2409 | 151 | 186 | 292 | 9 | 4 | 1320 | 447 |
| Superficie plantées (ha) | 240.9 | 15.1 | 18.6 | 29.2 | 0.9 | 0.4 | 132 | 44.7 |

Tableau 2. La production de caroube pour les années 2008 et 2009 (Ministère d'Agriculture, 2010)

| Année | 2008 | 2009 |
|--------------------------|------|------|
| Superficie (Ha) | 243 | 243 |
| Production (1000 tonnes) | 1.9 | 2.2 |

1.1.4 Importance écologique

Le caroubier (*Ceratonia siliqua*) est une espèce agro-sylvo-pastorale ayant d'énormes intérêts socio-économiques et écologiques, grâce à son aptitude à développer différentes stratégies d'adaptation aux contraintes hydriques (Saidi et al 2007 ;). Ainsi, Il peut être utilisé dans le reboisement des zones arides et dégradées, comme étant une ressource précieuse de reforestation pour gérer l'érosion sur les terres marginales non adaptés à d'autres espèces agricoles (sols pauvres et salins et résistant à la sécheresse), pour limiter contre la propagation des incendies (Barracosa et al., 2007), comme plante ornementale en bordure des routes et dans les jardins (Batlle et Tous, 1997) et comme brise-vent compte tenu de sa couronne sphérique, et de son feuillage (Winer, 1980 ; Sidina et al., 2009; Yousif & Alghzawi, 2000)

1.1.5 Importance économique

Le caroubier est considéré comme l'un des arbres fruitiers et forestiers les plus performants puisque toutes ses parties (feuilles, fleurs, fruits, bois, écorces et racines) sont utiles et ont des valeurs dans plusieurs domaines (Aafi, 1996). Ainsi, il pourrait constituer des plantations de

choix dans les programmes réguliers de reboisement pour assurer un développement durable des zones rurales et à l'économie de montagne (**Rejeb, 1995; Batlle et Tous, 1997**). En fait, la culture du Caroubier et l'industrialisation de ses produits ont connu un développement remarquable en raison des multiples utilisations de ses graines en industrie agro-alimentaire (amélioration de la texture des aliments), diététiques, pharmaceutique, cosmétique et en d'autres applications (**Correia & Martins-Loucao, 1995, 2005**). La gomme de caroube obtenue à partir des graines de gousses est d'une grande importance dans l'industrie alimentaire (**Gonçalves et al, 2005**). Selon des études récentes, la caroube est une source de bon marché d'hydrates de carbone actuellement explorées comme matériaux pour la production de bioéthanol, avec plusieurs avantages par rapport à d'autres cultures agricoles riches en sucre (**Vourdoubas et al., 2002 ; Sanchez et al., 2010 ; Turhan et al., 2010**). Par ailleurs, ses gousses utilisées en industrie alimentaire et pharmacologique sont plus riches en sucre que la canne à sucre et la betterave sucrière (**NAS, 1979; Batlle, 1997; Markis et Kefalas, 2004**). Le bois du caroube est très apprécié en ébénisterie et pour la fabrication du charbon. L'écorce et les racines sont employées dans le tannage.

farineLa Gousse de caroube

La gousse de caroube est principalement composée de deux éléments: la pulpe et les graines qui représentent respectivement, 90% et 10% du poids de la gousse. L'arbre de caroubier commence à produire des gousses à partir de l'âge de 6 ans. Le fruit se développe très lentement nécessitant 9 à 10 mois pour atteindre la maturité (**Battle et Tous, 1997**).



Figure 4. Gousse de caroube en moi de Décembre

La couleur de la gousse de caroube est verte avant d'atteindre la maturité (**Figure 4**). A maturité, elle devient brune foncée à noire et parfumées (**Figure 5**). Les gousses sont comestibles et deviennent indéhiscentes après maturité. Elle est sinueuse sur les bords, aplatie, droite ou arquée et présente une surface ridée (péricarpe), luisante, comprimée, recourbée ou non suivant les espèces, épaissie aux sutures, de longueur allant de 10 à 30 cm, une largeur variant entre 1,5 et 3,5cm et une épaisseur moyenne de 1 cm (**Figure 5A**).

Certains auteurs ont rapporté que la gousse du caroubier peut renfermer entre 12 à 16 graines (**Tutin et al., 1993; Gharnit, 1997**). Ces graines se trouvent à l'intérieur de la gousse dans des petits compartiments du mésocarpe (tissu pulpeux sucré) et qui sont séparés par des cloisons pulpeuses.

Les graines se caractérisent par une texture très dure, comprimées, ayant la forme ovale oblongue, une couleur brunâtre et brillante, dont la longueur et la largeur varie de 8 à 10 mm

et de 7 à 8 mm et de 3 à 5 mm d'épaisseur (**Figure5B**) (**Martindale, 1989; Batlle et Tous, 1997**).

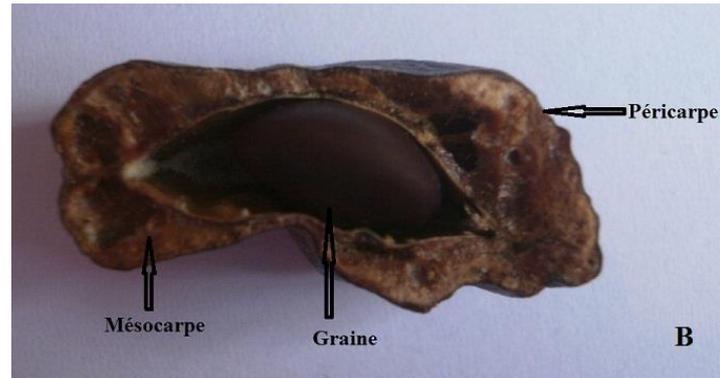
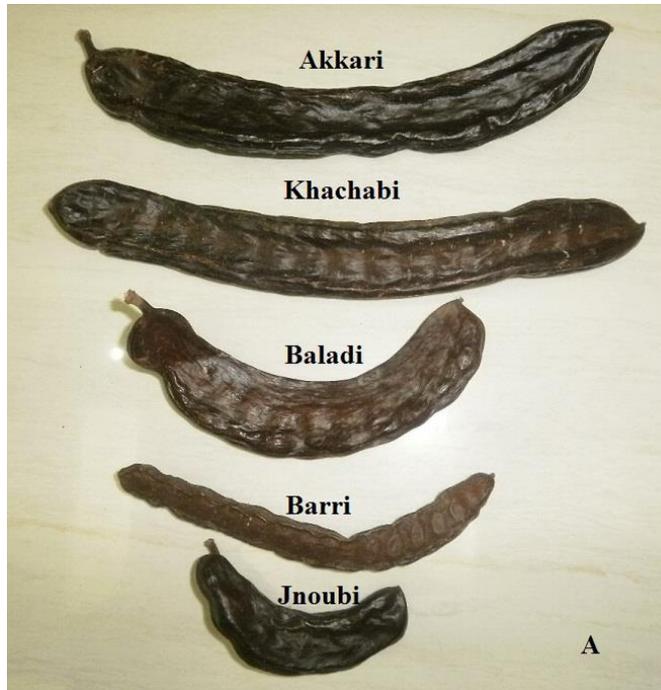


Figure.5 A: Gousse de caroube; B: Coupe transversal de la gousse

1.1.6 Composition de la pulpe

La pulpe sucrée de la caroube est employée depuis longtemps comme nourriture pour les bétails (**Ait Chitt et al., 2007; Manso et al., 2010**). La pulpe du fruit de caroube contient des glucides sucrés, ainsi que des fibres alimentaires, des tanins et des polyphénols (**Papagiannopoulos et al., 2004 , Makris & Kefalas, 2004**).

La caroube broyée est traitée industriellement et vendus dans les grands magasins et les marchés locaux comme un substitut du cacao (**Yousif, 2000; Kumazawa et al, 2002; Ayaz, 2007; Bengoechea et al., 2008**). La pulpe des gousses de caroube contient des teneurs élevées en sucre (saccharose, fructose et glucose) et peut être utilisé comme matière première pour la production des sirops (**Petit et Pinilla, 1995**) et du saccharose cristallisé (**Lafuente, 1961**) pour l'industrie alimentaire. La composition chimique de la pulpe varie en fonction des cultivars, de l'origine géographique, du temps de la récolte et des facteurs environnementaux

(**Battle et Tous, 1997; Biner et al, 2007; Owen et al, 2003 ; Davis et al.1971; Orphanos et Papaconstantinou, 1969**). Ainsi, **Thomson (1971)** a trouvé dans 40 cultivars un taux de sucres de 37 à 62%, des protéines brutes de 2,2 à 6,6%, des fibres brutes de 4,2 à 9,6% et une teneur en cendre de 1.5 à 2.4%. Alors que d'autres auteurs ont rapporté un contenu riche en polyphénols (16-20% essentiellement des tanins) et en fibres alimentaires (jusqu'à 39,8%) (**Avalone, 1997 ; Wursh et al., 1984 ; Battle et Tous, 1997; Biner et al, 2007; Owen et al, 2003; Youssef et al, 2009, Marakis, 1996; Santos et al, 2005; Yousif et Alghzawi, 2000**). **Avallone et al., (1997)**, et **Bengoechea et al., (2008)** ont rapporté des taux élevés en glucides (>50%) avec une faible quantité de protéines (1-2 %) et des teneurs négligeables en matières grasses (0,5-0,7), et environ 18% de cellulose et de l'hémicellulose, et une teneur appréciable en minéraux.

1.1.6.1 Sucres

Les gousses de caroube sont caractérisées par une teneur élevée en sucres (environ 500 g/kg) plus élevée que celle présente dans la betterave ou dans la canne (environ 200g/kg) (**Petit & Pinilla, 1995**). Il est bien connu que le saccharose est le sucre le plus abondant dans la gousse de caroube (**Calixto et al, 1982; Gubbuk et al, 2010**), suivi par le glucose et le fructose. et les teneurs des autres sucres (xylose, maltose) sont plus faibles et la cellulose et l'hémicellulose représente de l'ordre de 18% (**Tableau 3**). Cependant, ces proportions varient selon les auteurs (**Karkacier & Artik, 1995; Kumazawa et al, 2002 ; Biner, 2007**). Ces différences au sein de la littérature sont attribuées à de nombreux facteurs tels l'origine géographique, les conditions climatiques, la diversité entre les variétés, la récolte et le stockage, et les facteurs technologiques tels que l'extraction et les méthodes d'analyse (**Owen et al, 2003; Papagiannopoulos et al., 2004**).

Tableau 3. Composition chimique de la pulpe en M.S de la pulpe

| Constituants | Poudre de caroube | Références |
|----------------------------|-------------------|--|
| Hydrates de carbone | 77,3-82,4 | Shawakfeh et Ereifej, 2005 |
| Saccharose (%) | 65-75 | Petit et Pinnila,1995; Albanell et al., 1991; Avallone et al.,1997; Batlle&Tous, 1997; Biner et al., 2007; FAO, 1991; Gubbuk et al., 2010; Iipumbu et al., 2008; Yousif & Alghzawi et al., 2000. |
| Glucose (%) | 1,5-17,4 | Avallone et al., 1997; Batlle & Tous, 1997; Biner et al., 2007; FAO, 1991; Gubbuk et al., 2010; Iipumbu et al., 2008 |
| Fructose (%) | 1,8 - 17,9 | Avallone et al., 1997; Batlle & Tous, 1997; Biner et al., 2007; FAO, 1991; Gubbuk et al., 2010; Iipumbu et al., 2008 |
| Polyphénols totaux | 16-20% | wursh et al,1984; Avallone et al., 1997; Ayaz et al., 2007; Iipumbu et al., 2008; Sahin et al., 2009; Youssef et al., 2009 ; Batlle & Tous, 1997; Gubbuk et al., 2010 |
| Fibre (%) | 7,6- 10,8 | Shawakfeh et Ereifej, 2005 |
| Humidité (%) | 6 – 16,7 | Avallone et al., 1997; Calixto et al, 1982; FAO, 1991; Iipumbu et al., 2008; Yousif & Alghazwi, 2000; Youssef et al., 2009 |
| Cendre (%) | 2,7- 6 | Albanell et al., 1991; petit et pinilla,1995; Avallone et al., 1997; Batlle & Tous, 1997; Bravo et al., 1994; Calixto et al., 1982; Iipumbu et al., 2008; Shawakfeh et Ereifej, 2005;Yousif & Alghzawi et al., 2000; Yousef et al., 2009 |
| Proteine (%) | 3- 7,6 | Albanell et al., 1991; Avallone et al., 1997; Ayaz et al., 2007; Bravo et al., 1994; Calixto et al., 1982; FAO, 1991; Iipumbu et al., 2008; Shawakfeh et Ereifej,2005;Yousif & Alghzawi, 2000; Youssef et al., 2009 |

1.1.6.2 Polyphénols

Les polyphénols naturels regroupent l'ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants. Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques comme l'acide gallique, à des composés hautement polymérisés, de plus de 30000 Dalton, comme les tanins (acide tannique) (Dewick, 1995).

Les polyphénols sont présents dans toutes les plantes mais leur nature et teneur varient largement d'une espèce à l'autre, et donc d'un aliment à l'autre (Grolier et al., 2001). La caroube est une bonne source de polyphénols (16-20%) (Bamforth, 1999; Dewick, 1995). Cependant, les résultats sont très différents au sein de la littérature, non seulement en fonction des facteurs technologiques tels que les méthodes d'extraction et d'analyse, mais aussi de l'origine géographique, des conditions climatiques, de la récolte et du stockage (Papagiannopoulos et al. (2004); Markis & Kefalas (2004).

Les composés phénoliques que contiennent les caroubes sont à l'origine de leur propriété antioxydante (**Hariri et al., 2009**). **Kumazawa et al. (2002)** ont montré que cette activité antioxydante du polyphénol brut de la gousse de caroube est plus élevée par rapport aux composés polyphénoliques authentiques. Dans ce cadre, **Kumazawa et al. (2002)** montrent que les polyphénols bruts de la gousse ont un effet fort contre la décoloration de β -carotène. En outre, **El Hajaji, (2010)** a signalé que les feuilles de caroubier contiennent des quantités élevées en composés polyphénoliques.

1.1.6.3 Fibres

Les fibres sont des substances résiduelles, constituées des polysaccharides non amidonnés et se trouvant dans la paroi (cellulose, hémicellulose, pectine, lignine) et dans le cytoplasme des cellules (gomme, par exemple gomme arabique, gomme de guar et gomme de caroube, agar-agar, alginate et carraghénanes ...). Les fibres de caroube contiennent une quantité remarquable de tanins condensés et d'autres polyphénols (**Owen et al., 2003**). La fibre de caroube est une des fibres alimentaires ayant la plus forte teneur en polyphénols (**Papagiannopoulos, 2004**). Certains chercheurs ont rapporté la quantité de fibres comme étant les fibres alimentaires totales (**Bravo et al, 1994; Iipumbu et al, 2008**) tandis que d'autres l'ont qualifiée des hémicelluloses, des cellulose ou simplement des fibres brutes (**FAO, 1991**). En outre, d'autres auteurs ont divisé la teneur en fibres de poudre de caroube en fibres solubles et en fibres insolubles (**Bravo et al., 1994**) ou en fibres détergentes (**Albanell et al., 1991**). La quantité de fibres au détergent acide en poudre de caroube se situe entre 24,13% et 49,47%, mais elle est significativement affectée par la variété de caroube (**Albanell et al, 1991; Iipumbu et al, 2008**). Par conséquent, la différence dans la quantité de fibres rapportés dans la poudre de caroube est très probablement dû aux différentes méthodes appliquées pour calculer les différentes fractions de fibres (**Iipumbu et al., 2008**).

Chez l'homme, la consommation de fibres de caroube a démontré un pouvoir antioxydant élevé (**Kumazawa et al., 2002**) et un abaissement du taux de cholestérol et des triglycérides sérique (**Zunft, 2003**).

1.1.6.4 Protéines et lipides

La farine de gousse de caroube broyée contient à peu près 4,45% de protéines: aspartique (acide aspartique + asparagine), alanine, acide glutamique (acide glutamique + glutamine), leucine et valine; ensemble, elles représentent 57% de la teneur en acides aminés total des gousses (**Ayaz, 2009**). L'embryon ou la farine de germe est riche en protéine (52% avec une teneur élevée en lysine et arginine) et en carbohydrates (27 %).

La teneur en protéines de la farine de germe de caroube obtenue à partir des graines est plus élevée que celle observée pour les autres haricots comme la féverole (*Vicia faba L.*), pois (*Pisum stivum L.*) et le soja (*Glycine max. Merrill.*). **Maza et al. (1989)** ont trouvé des valeurs de 48,4% pour la teneur en protéines du germe de caroube (lipides éliminés), tandis que **Marcone, Kakuda, et Yada (1998)** ont déterminé une teneur en protéines de 18,83% et 34,35% pour les graines de pois et de soja, respectivement. La caroubine, la protéine insoluble dans l'eau isolée à partir d'embryons de caroube, est un mélange composé d'un grand nombre de protéines polymérisées de taille différente (**Wang et al., 2001, Bengoechea et al., 2008**).

Certains auteurs (Wang, 2001 ; Smith, 2010) indiquent que ce système de protéine possède les mêmes propriétés rhéologiques que le gluten, mais la caroubine a une structure plus ordonnée, avec des changements mineurs dans la structure secondaire lorsqu'elle est hydratée. Il est bien connu que les protéines de germe de caroube ont une composition bien équilibrée en acides aminés (Bengoechea et al., 2008). Ces protéines pourraient être utilisées comme ingrédients sains dans les aliments nutraceutiques et peut constituer une nouvelle source de nourriture pour les différents secteurs de population.

Par ailleurs, la farine de germe est utilisée dans l'alimentation diététique humaine (**Dakia et al., 2007**) ou comme ingrédient potentiel dans les aliments dérivés des céréales pour les personnes cœliaques (**Feillet et Roulland, 1998**).

1.1.6.5 Cendres

Selon plusieurs auteurs (**Albanell et al., 1991; Avallone et al., 1997; Batlle & Tous, 1997; Bravo et al., 1994; Calixto et al., 1982; Iipumbu et al., 2008; Yousif & Alghzawi et al., 2000; Yousef et al., 2009**), la teneur en cendres présentes dans la poudre de caroube variait entre 2% et 6% selon le type de caroube (**Avallone et al., 1997; Albanell et al., 1991; Iipumbu et al., 2008**).

1.1.6.6 Minéraux

D'après **Ozcan et al. (2007)** et **Petit et pinilla (1995)** la gousse est une bonne source de potassium (802 mg/100g), de calcium (440.05 mg/100g), de sodium (10.1 mg/100g). De même, les oligo-éléments sont présents à des quantités importantes : fer (2.34 mg/100g), magnésium (66.9 mg/100g), de manganèse (0.56 mg/100g), de zinc (0.70 mg/100g), du cuivre (0,62 mg/100g), et du phosphore P (31,58 mg/100g).

1.1.6.7 Humidité

La poudre de caroube contient une humidité qui varie selon les auteurs de 6% à 15,6% (**Avallone et al., 1997; Calixto et al, 1982; FAO, 1991; Iipumbu et al., 2008; Yousif & Alghazwi, 2000; Youssef et al., 2009**). **Batlle et Tous (1997)** et **Iipumbu et al. (2008)** ont expliqué que cette variabilité est due aux conditions environnementales (pluie et humidité), aux cultivars de caroubier, à la durée de maturation, au moment de la récolte et à la durée de stockage. (**Albanell et al, 1991;Avallone et al, 1997; Iipumbu et al, 2008**).

1.1.7 Graines de caroube

La graine est composée essentiellement d'antioxydants et de polysaccharides. Elle est utilisée depuis l'antiquité comme mesure des pierres précieuses et semble également, avoir été utilisée

par les pharmaciens pour peser leurs ingrédients (le carat) (Battle, 1997). Les graines de caroube sont constituées de trois différentes parties mais fortement liées. Il s'agit, de l'extérieur vers l'intérieur, une enveloppe (cuticule marronne, 30-33%), un endosperme (blanc et translucide, 42-46%) un embryon ou un germe (23-25%) (**Andrade et al., 1999; Neukom, 1988; Garnit, 2006**).

1.1.7.1 Cuticule

La cuticule ou l'enveloppe contient des antioxydants (**Batista et al, 1996**). Ces antioxydants naturels n'est autre que les polyphénols naturellement présentes dans l'enveloppe de la graine, qui sont valorisables dans l'industrie alimentaire (Makris et Kefalas, 2004).

1.1.7.2 Endosperme

La partie la plus intéressante de la graine de caroube est l'endosperme qui est constitué de 2 téguments enrobant un germe (**Figure 6**). Sa composition chimique est pauvre en minéraux en fibres et en protéines. Par contre elle contient une quantité appréciable de lipides (Bouzouita et al., 2007).



Figure 6. Graines de caroube décortiquées et séparées

Cette partie de la graine est obtenue par décorticage afin de séparer les enveloppes et le germe des graines. Une fois broyés, les téguments donnent la gomme de caroube non purifiée (**Martindale, 1989**).

1.1.7.3 Germes

La farine de germes est très riche en protéines (50%), en glucides (27%). Elle est principalement utilisée dans les aliments pour les enfants (**Lizardo et al., 2002**). Elle est également utilisée dans l'alimentation diététique humaine (**Dakia et al., 2007**) ou comme ingrédient potentiel dans les aliments dérivés des céréales pour les personnes cœliaques (**Feillet et Roulland, 1998**).

1.2 Gomme de caroube

La gomme de caroube est un galactomannane, qui n'est autre que le polysaccharide obtenu à partir de l'endosperme de la graine après élimination de la cuticule et du germe (**Kök et al., 1998**). La composition typique d'un LBG de haute pureté est de 10 à 13% d'humidité, 5% de protéine, 1% de cendres, 1% des fibres de et le reste est de 80 à 85% de galactomannane (**Maier et 1993**). Ce polysaccharide est utilisé dans l'industrie alimentaire (additif naturel E 410 dans les crèmes glacées, mayonnaises, sauces, produits de boulangerie, etc.), ou non-alimentaires (industries pharmaceutiques, cosmétique, photographie, béton, explosifs, peinture, encre, cirage, textiles textile et du papier, produits antidiarrhéiques, etc.). Cette large utilisation est due à ses propriétés épaississantes, émulsifiantes et stabilisantes (**Multon, 1984; Goycoola et al., 1995; Batlle et al., 1997; Garti et al., 1997; Patmore et al., 2003**). En plus, son prix est faible par rapport aux autres polysaccharides utilisés dans l'industrie alimentaire (**Kök et al., 1998**). Également, il est exploité pour sa propriété synergiste avec le carraghénane, l'agar et la gomme de xanthane, même à des faibles concentrations. Le galactomannane conduit à une augmentation de la rigidité finale du gel ou favorise la gélification pour former des gels plus forts et plus élastiques (**Hoichman et al., 2007, Lopes da Silva et al, 1996; Dea & Morrison, 1975; Dea, 1972**).

Récemment, quelques d'études ont également évoqué ce sous-produit de l'industrie comme une bonne source de polyphénols (**Bernardo-Gil, 2011**).

1.2.1 Structure

Les galactomannanes ont une structure générale semblable, constituée d'une chaîne de monomères dont chacune possède une chaîne principale de mannane sur laquelle il existe des ramifications d'une unité galactose (**Figure 7**) (**McCleary et al., 1988 ; Richardson et al., 1998**). Ils se distinguent par leur teneur en unité galactose exprimée par le rapport mannose sur galactose (M/G), par la répartition des unités galactose le long de la chaîne de mannane et aussi par leur masse molaire (**Fox, 1992 ; Azero et al., 2002**). Cette différence dans la « microstructure » influencent fortement les interactions moléculaires (**da Silva et al., 1990 ; Mao et al., 2006**) et les propriétés rhéologiques des solutions de galactomannanes. En outre, les galactomannanes sont des polysaccharides hydrosolubles et neutres (**Dea et al., 1975**).

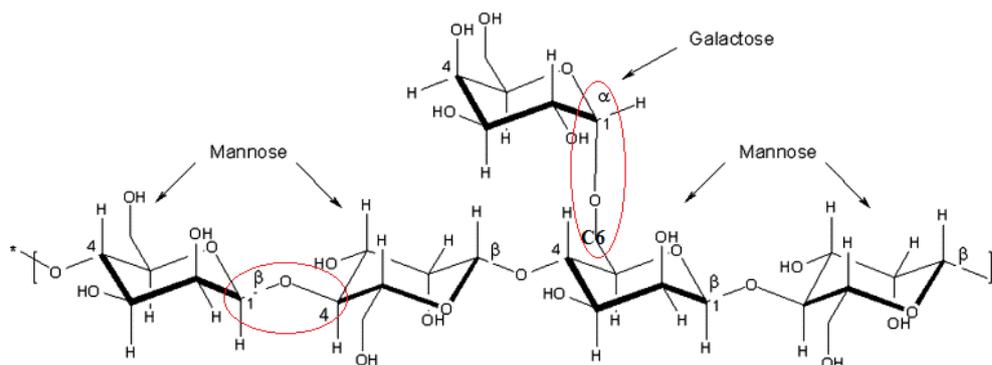


Figure 7. Structure de la gomme de caroube; rapport mannose (α 1,4) galactose (β 1,6).

Généralement, les galactomannanes sont des polysaccharides non-gélifiants constitués d'une chaîne linéaire de 1,4- β - D-mannose sur laquelle un seul D-galactosyle est attachée sur le carbone C6 du D-mannosyl (**Pollard, 2007; Lopes da Silva et al, 1996**). La répartition des résidus de galactose a été avérée irrégulière, (**McCleary 1986**), laissant des régions de mannose non substitué. On pense que ces régions permet des interactions avec d'autres polysaccharides, telles que l'interaction synergique avec x-carraghénane (**Sand, 1982**) et peut également assurer une protection contre la dégradation thermique par auto-association, par opposition à la gomme de guar, qui n'a pas des régions de mannose non substituées (**McCleary, Clark et al. 1985; Kok 1999**). La teneur en gomme de caroube diffère

considérablement entre les cultivars même dans les mêmes conditions environnementales (Tous et al., 1996).

1.2.1.1 Taille et Potentiel Zeta

Les particules en suspension ou en émulsion colloïdale portent généralement une charge électrique. La quantité de charge sur la surface des particules peut être une importante caractéristique des particules, car elle détermine de nombreuses propriétés de la suspension ou émulsion (<http://www.colloidal-dynamics.com>) Ainsi, Cette propriété des particules à former une solution colloïdale est liée à leur potentiel Zeta. Le potentiel Zeta mesure l'importance de la répulsion ou de l'attraction entre des particules en suspension et donne une description de la dispersion électrostatique. Le Nano-Zétasizer ZS, mesure la mobilité électrophorétique exprimée par le potentiel Zeta. A présent, il n'existe aucune information sur le potentiel Zeta de la gomme de caroube. Mais en générale, les solutions de galactomannane présentent des valeurs comprises entre 13,7 et -2,1 mV, ce qui confirme leur comportement relativement neutre (Carneiro-da-Cunha et al., 2011) et (Belgacem et Gandini, 2008).

La taille des particules peut avoir un impact significatif sur la performance et le processus de manipulation de beaucoup de solides particulaires. La distribution de la taille des particules dans une poudre de gomme peut avoir un effet sur ses propriétés fonctionnelles (taux d'hydratation, dissolution, etc) (Mathur, 2011).

1.2.1.2 Poids moléculaire

Les valeurs de masse molaire des galactomannanes (de la LBG en particulier) sont en général artificiellement élevées en raison des associations intermoléculaires qui persistent souvent, même à de faibles concentrations ($C = 0,1 \%$) (Richardson et al., 1998). La masse molaire moyenne (M_w) de la gomme de caroube native (gomme brute) évaluée par chromatographie d'exclusion fut estimée à $0,812 \times 10^6$ Da (Richardson et al., 1998). D'autres auteurs ont trouvé des poids moléculaires de $0,319 \times 10^6$ à $1,380 \times 10^6$ Da (Gaisford et al. 1986, Doublier

and Launay, 1981).). la viscosité intrinsèque dépend de la longueur de la chaîne de mannose et non pas de la concentration en chaînes latérales de galactose (**Doublier & Launay, 1981; McCleary et al., 1981**).

1.2.2 Comportement Rhéologique

La gomme pure peut être plus sensible à la dégradation, sous l'influence de la température, que la gomme non pure car cette dernière contient des matières qui protègent le galactomannane de la dégradation. Les constituants protéiques semblent jouer ce rôle car les acides aminés sont connus pour leur forte interaction avec les petites chaînes libres qui sont impliquées dans la dégradation de la molécule sous les hautes températures (**Kök et al., 1998**). Par ailleurs, La gomme de caroube seule ne forme jamais un gel mais elle peut former des solutions stables très visqueuses à des concentrations très faibles (<1%) grâce à ses fortes capacités de rétention d'eau (gonfler avec l'eau) non assimilable par l'organisme (**Battle et Tous, 1997, Pollard, 2006**) LBG est largement utilisé comme additif dans les industries alimentaires et non alimentaires, en raison de sa capacité à fournir une haute viscosité même à des faibles concentrations (<1%) et de fonctionner en tant que liant de l'eau.. D'autre part, **Rizzo et al. (2004)** ont montré qu'un rapport mannose sur galactose élevé (équivalant à une faible teneur en résidus galactose dans la chaîne de galactomannane) entraînait une viscosité élevée. L'augmentation de la concentration des molécules de galactomannanes en solution favorise l'interpénétration des chaînes macromoléculaires conduisant à la création d'enchevêtrements plus ou moins denses, mais favorisent aussi l'établissement d'interactions interchaînes (**Dakia, 2010**). Ces phénomènes contribuent fortement au développement de la viscosité et expliquent la plus forte dépendance de la viscosité avec la concentration que pour d'autres polymères (**Dakia, 2010**).

1.2.3 Rapport mannose/galactose

LBG est polydispersé étant donné qu'il est plus difficile à se disperser que d'autres galactomannanes en raison de son rapport Mannose/Galactose (M/G) élevé. Ce rapport détermine le comportement du LBG en solution ainsi que son interaction avec d'autres biopolymères. Chacune des monomères chez la gomme de caroube possède un rapport mannose galactose d'environ 4, tandis que celui de la gomme de tara (TG) est d'environ 3:1, celui de la gomme guar (GG) est d'environ 2:1 et celui de la gomme de fenugrec (FG) d'environ 1:1 (Dakia, 2010). La teneur en galactose moyenne se situe généralement entre 20 et 23% de poids, et les chaînes de LBG peuvent contenir des niveaux supérieurs et inférieurs de galactose. Généralement, un rapport plus ou moins élevée en mannose-galactose (faible degré de substitution), comme c'est le cas de LBG, le galactomannane n'est que partiellement soluble dans l'eau, tandis qu'à des niveaux très élevés de substitution, les polymères sont entièrement soluble (Pollard & Fischer, 2006). En outre, la chaîne principale du mannane qui est moins substitué par des unités de galactose est celle qui interagit et forme facilement des complexes avec d'autres biopolymères conduisant à la formation d'un réseau en solution. Ainsi, un rapport M/G élevé conduit à une augmentation de la capacité d'épaississement (Richardson, 1998; Kök et al, 1999), ce qui influence fortement les interactions moléculaires et les propriétés rhéologiques des solutions de galactomannane (Da Silva et Gonçalves, 1990; Mao et Chen, 2006). Certains auteurs ont montré que les caractéristiques moléculaires des GM du même type de plante, telles que le rapport M/G et la masse molaire (M_w), peuvent varier en fonction de la variété et des conditions de culture (climat, sol) (Bargallo et al., 1997 ; Lazaridou et al., 2000 ; Rizzo et al., 2004), ainsi que de la préparation du polymère et de la méthode d'extraction (da Silva et al., 1990 ; Sittikijyothin et al., 2005 ; Dakia et al., 2008). Rizzo et al. (2004) ont mis en évidence une différence dans le M/G des gommages de caroube issues de différentes variétés de caroubiers d'Italie. De

même, **Lazaridou et al. (2000)** ont montré, que les propriétés moléculaires des GM peuvent changer au sein d'une même variété en fonction de la région de culture ou des conditions climatiques et du sol ($M/G = 3,14- 3.82$).

1.2.4 Isotherme de sorption

L'activité de l'eau (a_w) qui est l'état de l'eau dans les aliments, est un concept couramment utilisé en corrélation avec la sécurité alimentaire et la qualité. Il est important de connaître la relation entre la teneur en humidité et a_w d'un aliment. Cette relation est appelée l'isotherme de sorption d'humidité (**Labuza et Altunakar, 1970 , Scott,1957**). Elle permet de déterminer la teneur en eau minimale que l'on peut atteindre en fin de séchage et de préciser les conditions de stockage afin de contrôler la qualité du produit final (**thèse Chemkhi, 2008**). Par ailleurs, l' a_w est pratiquement identique à l'humidité d'équilibre d'un matériau hygroscopique. L'humidité d'équilibre est l'humidité relative qui doit régner dans une atmosphère ambiante pour empêcher tout échange d'eau entre les matériaux et l'air. Il est donc clair que pour assurer une bonne conservation et du stockage de produits, le climat ambiant ne doit pas dépasser les valeurs limites établies par la mesure de l'activité de l'eau. La capacité de conservation des aliments, la stabilité des couleurs, du goût, la teneur en vitamines, l'arôme et les conditions favorables à la formation de moisissures et à la croissance des microbes sont directement influencés par la valeur a_w . Pour la modélisation des isothermes de sorption, et pour la prédiction du comportement hygroscopique lors du stockage ou du séchage, des modèles mathématiques sont utilisés pour optimiser le lissage des points expérimentaux dans un domaine des activités de l'eau assez important. Par conséquent, La détermination des isothermes de sorption sont des outils essentiels dans les processus de déshydratation pour la sélection des conditions correctes de séchage, et les exigences de conditionnement et de stockage pour un produit. Ces isothermes permettent de déterminer la teneur en eau finale à atteindre pour optimiser les conditions de stockage et de séchage de ces produits et donner des

informations précieuses sur l'équilibre hygroscopique du produit à sécher et à conserver (Timoumi, 2005).

1.2.5 Application

La graine pour sa part est destinée à la transformation en gomme alimentaire (sauces, fromages, nappages, glaces...), en gomme technique (aliments pour chiens et chats), en produits pharmaceutiques (principalement contre les diarrhées), et à l'industrie du papier et de textile (Tous et al., 1996) (Tableau 4). La gomme de caroube est le hydrocolloïde préféré pour les desserts glacés, le fromage fondu et les produits laitiers fermentés. Il existe aussi des cultivars dont la différence est liée à la qualité de la gomme, en particulier concernant la viscosité, la résistance au gel et au contenu des galactomannanes. Cette gomme est employée dans une large gamme de produits de l'industrie alimentaire, dont les plus importantes sont la crème glacée, les aliments pour bébés et les aliments pour animaux de compagnie (Correia & Martins-Loucao, 1995, 2005).

Tableau 4. Les produits dérivés de la graine de caroube et leurs applications

| Applications | Dérivés | Produits | Références |
|--------------|---|---|---|
| Alimentaire | Endosperme | | |
| | Gomme de graines de caroube purifiée (GGC) (ou poudre d'endosperme purifié) | E410 : Additif alimentaire en industrie agro-alimentaire (agent gélifiant, Liant, agent d'adhésion..) | <i>Battle et Tous, 1997 ; Gonçalves et al, 2005</i> |
| Industrielle | GGC de moindre pureté | <ul style="list-style-type: none"> • Pharmaceutiques (pommade, anticoagulant..) • Cosmétiques (Mousses, gels...) • Textiles (Épaississant de couleurs) • Papier (produits de flottaison, épaississant) • Chimiques (couleurs, pesticides) • Des explosifs (agent absorbant de l'humidité) | <i>Calixto et Canellas, 1982 ; Sandolo et al., 2007</i> |

| Médicinale | | Germe | |
|------------|-----------------|---|----------------------------------|
| | Farine de germe | l'alimentation diététique humaine (couper la sensation de faim lors des régimes pour mincir en bonne santé) | <i>Dakia et al., 2007</i> |
| | Farine de germe | Ingrédient potentiel dans les aliments dérivés des céréales pour les personnes cœliaques | <i>Feillet et Roulland, 1998</i> |

La gomme de caroube est prescrite en cas d'insuffisance rénale chronique. Elle retiendra dans le tube digestif l'urée, la créatinine, l'acide urique, l'ammoniaque et les phosphates provoquant un abaissement important et bénéfique du taux d'urée dans le sang (**Berrougui, 2007**). Également, grâce à ses propriétés épaississantes et gonflantes, La gomme de caroube est souvent prescrite par le phytothérapeute en amont des repas, pour couper la sensation de faim lors des régimes pour mincir en bonne santé. Elle va ainsi, ralentir l'assimilation des aliments par action sur les enzymes responsables de la digestion : la trypsine, la chymotrypsine, l'amylase et la lipase (Cruz, 1955 ;Yvan Vandenplas, 1998).

1.3 Utilisation des produits de caroube

La gousse de caroube, est un fruit à usage multiple. Toutes les composantes de l'arbre (feuillage, fleur, fruit, bois, écorce, racine) sont utiles et ont de la valeur. Une gamme de produits est dérivée de la caroube à partir des graines et des gousses (**Santos, 2005**).

1.3.1 Alimentaire

La poudre de caroube tirée des gousses est un édulcorant naturel, qui a la saveur et l'apparence semblable du chocolat. C'est pourquoi il est souvent utilisé comme substitut du cacao. L'avantage d'utiliser la caroube réside dans le fait que contrairement au chocolat, il ne contient pas de stimulants puisque il est dépourvu de caféine et de théobromine.

(**Bengoechea, 2008**).

Les principaux dérivés de caroubes et leurs applications sont présentés dans le tableau 5. Par ailleurs, différents aliments humaine peuvent être dérivés de la pulpe de caroube tels que les sirops de sucre ou de mélasse, la poudre de caroube non torréfié et torréfié utilisés comme

substituts de cacao dans les pâtes, les barres de céréales, les confiseries au chocolat, les crèmes glacées et les produits légers (Marakis, 1996; Plowright, 1951; Loeb, 1989). Au Liban, les gousses de caroube sont principalement utilisées pour extraire la mélasse ou «débés», qui est obtenue par broyage, trempage dans de l'eau, et par une série de décantation qui permettent d'obtenir un jus sucré. Ce jus subit une ébullition pour obtenir ce qu'on appelle la mélasse de caroube. Le tourteau de caroube broyé ou haché est aussi utilisé comme substitut de la tourbe pour les plantes en pépinière (Rishani et Rice, 1988). Une autre utilisation des caroubes est la fabrication d'un produit laitier artisanal connu sous le nom de «mekika ». Ce produit est préparé par coagulation du lait avec l'extrait de gousses vertes de caroube. Il est spécifique de la région

Tableau 5. Les produits dérivés de la pulpe de caroube et leurs applications

| Applications | Dérivés | Actions | Références |
|--|--|--|---|
| Industrielles | La pulpe de caroube | | |
| | Poudre de caroube non torréfié et torréfié | Edulcorant naturel, substitut du cacao (libre de caféine et de théobromine) | <i>Plowright, 1951; Loeb, 1989; Marakis, 1996; Bengoechea, 2008</i> |
| | Farine de caroube (gousses broyées) | L'extraction du sucre | <i>Petit & Pinilla, 1995</i> |
| | Farine de caroube (gousses broyées) Fermentation de l'éthanol | Fabrication de l'alcool | <i>Roukas, 1993; Roukas, 1996</i> |
| | Farine de caroube | Production d'acide citrique | <i>Roukas, 1998; Roukas, 1999</i> |
| | La mélasse de caroube « Débés » (au Liban) | Obtenir un jus sucré | <i>Rishani et Rice, 1988</i> |
| | L'extrait de gousses vertes de caroube coagulation du lait avec | La fabrication d'un produit laitier artisanal (Liban) | <i>Abi Azar, 2007</i> |
| | Le tourteau de caroube (sous-produits de l'industrie du « débés ») | Substitut de la tourbe pour les plantes en pépinière | <i>Rishani et Rice, 1988</i> |
| | - | Alimentation animale (chevaux, ruminants) | <i>Battle, 1997</i> |
| Activité Médicinale et pharmacologique | les extraits de caroube résultats prometteurs | Résultats prometteurs : <ul style="list-style-type: none"> • Effets antiprolifératifs in vitro des lignes cellulaires de carcinome hépatocellulaire chez les souris • De l'adénocarcinome et les cellules d'adénome du côlon humain, dans les cellules cancérogènes cervicales (HeLa, et les cellules de neuroblastome (N1E-115) du rat • Dans le HeLa cervicales et le cancer (MCF-7) du sein humain | <i>Corsi, 2002; Klenow, 2008; Klenow, 2009; Custódio, 2011</i> |

| | | | |
|------------|---|---|--|
| | fibres et farine de caroube (riche en composés phénoliques) | <ul style="list-style-type: none"> • Activité antioxydante, traitement du syndrome métabolique, amélioration digestive. • grande activité de piégeage des radicaux DPPH. • Réduction du niveau de cholestérol total et du LDL dans le sang • Régulation des niveaux de glucose dans le sang | Owen, 2003; Gruendel et al, 2006 ; Gruendel, 2007; Ayaz, 2007 ; Zunft, 2001 ; Zunft, 200 ; Gruendel ; 2007 Papagiannopoulos et al., 2004 |
| | dérivées de caroube particulièrement riches en tanin | Produits antidiarrhéiques chez les nourrissons (bloque l'adhérence d'Escherichia coli à l'épithélium intestinal lutter contre la diarrhée (produits antidiarrhéiques) et traiter le catarrhe. | Guggenbichler, 1983 ; Loeb, 1989; Alsit, 1998) |
| diététique | La farine de germe de caroube | utilisation dans l'alimentation diététique humaine ou comme ingrédient potentiel dans les aliments dérivés des céréales pour les personnes cœliaques | Dakia et al., 2007; Feillet et Roulland, 1998 |

Eklim El Kharoub dans le Chouf (Sud de Beyrouth) ou l'on trouve en parallèle avec la culture du caroubier (Abi Azar, 2007).

1.3.2 Médicale

Actuellement, la caroube est considérée comme une plante d'investigation de nouveaux antioxydants naturels contenus dans l'enveloppe de la graine et la pulpe du fruit. Cette activité antioxydante est attribuée à la présence de composés phénoliques et fibres (**Tableau 5**) (**Custódio, 2011**).

1.3.3 Cosmétique

Dans l'une des applications industrielles, la gomme de caroube est utilisé en cosmétique (**Calixto et Canellas, 1982 ; Sandolo et al., 2007**) pour sa capacité à former une solution très visqueuse, à une faible concentration en raison de ses propriétés épaississantes, émulsifiantes et stabilisantes (**Multon, 1984 ; Goycoola et al., 1995 ; Stephen et al., 1995 ; Batlle et al., 1997**).

1.3.4 Chimique

Certains travaux ont déjà montré l'application de la farine de caroube (gousses broyées) pour l'extraction du sucre (**Petit & Pinilla, 1995**), la fermentation de l'éthanol (**Roukas, 1993; Roukas, 1996**), et la production d'acide citrique (**Roukas, 1998; Roukas, 1999**). De même, le bois du caroubier est très apprécié en ébénisterie et pour la fabrication du charbon et l'écorce et les racines sont employées dans le tannage.

1.4 Effets indésirables des produits de caroube

Les fibres de caroube (LBG) utilisées pour épaissir les préparations des nourrissons peuvent réduire la disponibilité des minéraux tels que le calcium et le fer (**Bosscher, 2001**). En ce qui concerne le germe de graine de caroube, certains chercheurs affirment que des extraits de germe de graine de caroube ont été trouvés pour diminuer l'activité trypsique (**Filioglou & Alexis, 1987**) et la digestibilité des protéines (**Filioglou & Alexis, 1989**). Toutefois, les substances antinutritives, comme les inhibiteurs de la trypsine, généralement contenue dans les graines des légumineuses (**Weder, 1986**) peuvent être désactivée par chauffage. Selon **Martinez-Herrera et al., (2006)**, un traitement à 121°C pendant 25 minutes de la farine du germe de caroube est adaptés aux denrées et aux produits alimentaires des animaux. De même l'utilisation de la caroube entière dans la consommation humaine est limitée en raison du niveau élevé de tanins provoquant son astringence limitée (**Bate-Smith, 1973; Karkacier et Artik, 1995**). Le germe de graine de caroube contient également des tanins qui pourraient créer des problèmes de palatabilité en raison de leur goût astringent, et pourrait également réduire la digestibilité des aliments. Il a été suggéré que la digestibilité des protéines est réduite par des tannins, soit par liaison directe à certaines parties de la molécule ou par l'inhibition non compétitive des enzymes digestives (**Filiglou & Alexis, 1989**).

Chapitre 2
Matériel et Méthodes

Chapitre 2 - Matériel et Méthode

2.1 Géolocalisation par GPS : échantillonnages

Les répartitions géographiques des variétés de caroube Libanaises sélectionnées ont été accompagnées avec un localisateur GPS (GPS, satellite Navigator, Korea) pour référencer les coordonnées géographiques d'altitude, de latitude et de longitude de chaque population.

Neuf populations ont été collectées durant les mois d'Août et de Septembre 2009 (pas le même degré de maturation) de différentes régions du Liban, du Nord au Sud, où elles poussent naturellement le long de la côte Libanaise à une altitude allant de 0 à 800 m. Les régions sélectionnées étaient Akkar (Akkari1 and 2), Selaata (Baladi), Batroune (Ahmar), Bourjen (Khachabi), Blat (Sandali ou Makdessi), Maaroub et Borj Rahal (Jnoubi 1 and Jnoubi 2), et Wadi Hojeir (la variété sauvage Barri). Les gousses de caroube ont été choisies par hiérarchie de plusieurs arbres représentatifs de la population dans une zone géographique ne dépassant pas les 500 m². Les échantillons étaient emballés et conservés dans une chambre froide à 4°C.

2.2 Caractéristiques morphologiques

Dix gousses de chaque variété de caroube ont été choisies au hasard pour mesurer les différents paramètres : longueur, largeur, masse, volume, épaisseur, la densité spécifique et l'indice de taille (longueur/largeur), ainsi que le nombre de graines/gousse, le rapport de masses graines/gousse et le pourcentage de graines/gousse.

2.2.1 Longueurs

Tout d'abord, la longueur (cm) de la gousse est déterminée à l'aide d'un fil, puis la longueur du fil est mesurée par une règle graduée.

2.2.2 Largeurs

À l'aide d'un pied à coulisse, 3 largeurs (cm) étaient mesurées (les 2 bouts et le centre de la gousse) et la moyenne des 3 mesures a été considérée comme étant la des largeurs moyenne.

2.2.3 Epaisseurs

Les épaisseurs (cm) ont été évaluées avec « Iwanson jauge » (1/10 mm) où elles représentaient la moyenne de 3 épaisseurs des trois parties de la gousse (latérales et centrale) (Annexe 1).

2.2.4 Volumes

Le volume (cm³) a été estimé en submergeant la gousse de caroube dans un volume connu d'eau à l'intérieur d'une éprouvette graduée (1000 cm³). La quantité d'eau déplacée est égale au volume de la forme irrégulière de la gousse de caroube.

2.2.5 Indice de taille

L'indice de taille est le rapport de la longueur sur la largeur.

2.2.6 La densité spécifique

La densité ou poids spécifique est la densité de la gousse de caroube sur la densité de l'eau.

2.2.7 Analyses Statistiques

Une ANOVA unidirectionnelle a été appliquée pour analyser les données expérimentales, après avoir réalisé les tests de normalité et d'homogénéité de la variance. Ensuite, le "test Tukey" ($p < 0,05$) a été utilisé pour trouver les paramètres sensiblement différentes l'une de l'autre. En outre, les données étant nombreux, une analyse en composantes principales (ACP) a été faite pour faire sortir les paramètres les plus distinctives expliquant les variations morphologiques et chimiques entre les différents cultivars de caroubiers. De même, l'analyse

de classification hiérarchique (ACH) a été utilisée pour étudier les similitudes et les différences entre les variétés. Pour la classification, la méthode de Variance Minimale de Ward a été utilisée. La distance euclidienne au carré a été utilisée comme mesure de dissimilarité pour la méthode de Ward. Le R freeware (v 2.13.1) a été utilisé pour l'analyse statistique. En outre, la corrélation entre les paramètres morphologiques, chimiques et facteurs géographiques (altitude, latitude, longitude) ont été évalués à l'aide du coefficient de corrélation de Pearson.

2.3 Analyses chimiques

Les caroubes choisies pour la caractérisation morphologiques ont été utilisées pour la caractérisation chimique.

2.3.1 Préparation de l'échantillon

Pour la détermination de la composition chimique de la pulpe (polyphénols totaux, sucres, fibres, protéines et cendres) les mêmes échantillons de gousses de caroube utilisés pour les mesures morphologiques (échantillons égrainés) ont été écrasés, puis broyés en poudre à l'aide d'un broyeur (\emptyset inférieur à 0,5 mm). Toutes les mesures ont été réalisées sur ces échantillons.

2.3.2 Polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été extraits et déterminés selon la méthode de Folin-Ciocalteu en utilisant une courbe d'étalonnage d'acide gallique (**Figure 8**).

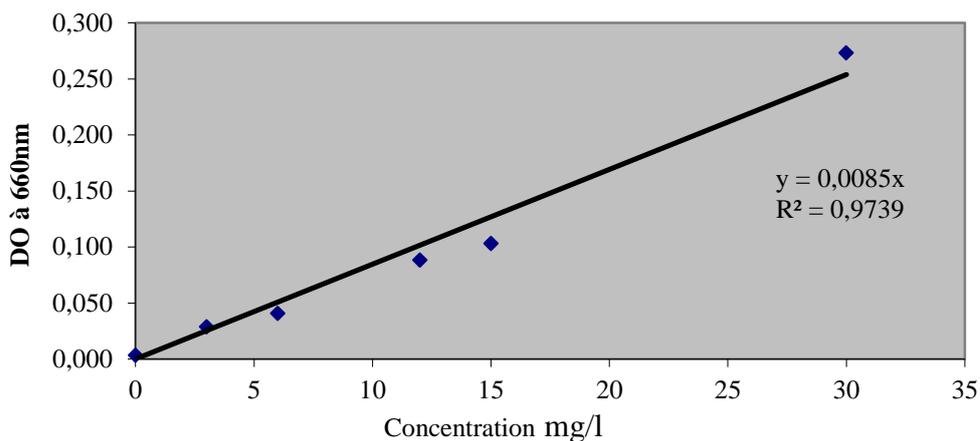


Figure 8. Courbe d'étalonnage d'acide gallique

2.3.2.1 Optimisation de la méthode d'extraction

Pour l'extraction des polyphénols, différents systèmes de solvants ou mélange de solvants ont été utilisés afin de déterminer celui le plus efficace (solvants: méthanol, éthanol et acétone).

Cette étude préliminaire a démontré qu'un mélange eau-acétone était le mélange le plus approprié pour extraire les phénols des gousses de caroube.

2.3.2.2 Protocole d'extraction

Un g de poudre de caroube est extraite avec 20 ml d'eau et 20 ml d'acétone (40 ml) dans un réacteur agité à température ambiante (20-22 °C pendant 60min). Après chaque centrifugation (10 min, 8000 tr / min) le surnageant est collecté, le solvant est évaporé sous vide, et enfin le volume perdu est remplacé par de l'eau distillée. Ensuite, une série de dilutions était faite car la solution mère était très concentrée en polyphénols. Ainsi, les solutions de caroube ont été diluées au 1/30. Au préalable une gamme d'étalonnage à partir d'acide gallique à 40mg/l avec des concentrations de 30, 15, 12, 6, 3, 0 mg/l a été réalisée. Le protocole consiste à prendre 1 ml de la solution étalon ou de solution à doser et d'ajouter 1 ml d'une solution de carbonate de sodium (100g/l). Le mélange est chauffé à 38 °C pendant 10 min, puis on ajoute 1 ml d'une solution de réactif de Folin (dilué au 1/3). Ensuite, on procède à une agitation par

vortex et on stocke les échantillons à température ambiante dans l'obscurité (15 min). La mesure de la densité optique est réalisée à 660nm.

2.3.3 Détermination des sucres totaux

Les sucres totaux ont été analysés suivant la méthode de phénol sulfurique (Dubois et al., 1956). Tout d'abord, la courbe d'étalonnage de monosaccharide (Figure 9) (moyenne de 3 solutions standard) a été déterminée, où 100 mg de glucose ont été ajoutés à 1 litre d'eau distillée et différentes concentrations de la solution standard de glucose (1, 3/4, 1/2, 1/4, 0 dilutions) ont été préparées.

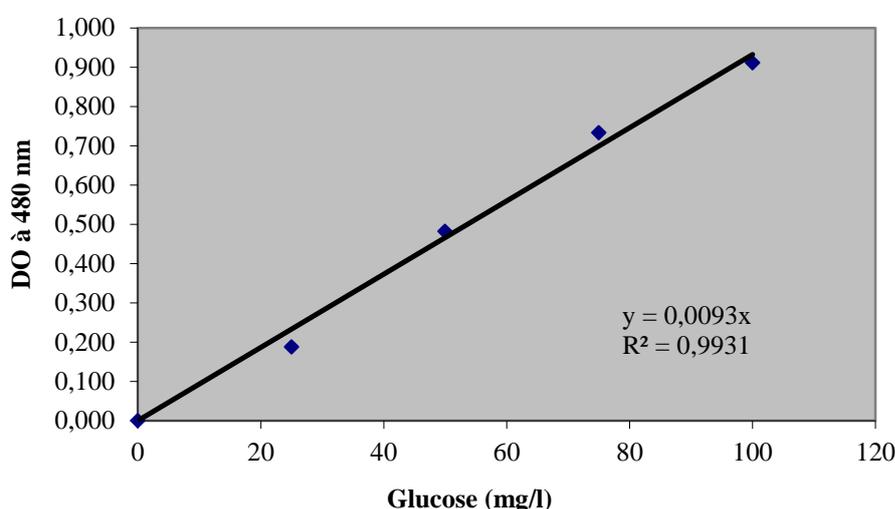


Figure 9. Courbe d'étalonnage d'acide gallique

2.3.3.1 Optimisation de la méthode

Les solutions d'extraction du sucre de caroube (25 g/l) ont été préparés comme décrit précédemment, mais directement en ajoutant 1 g de caroube à 40 ml d'eau distillée en tant que solvant. Ensuite les solutions de caroube ont été diluées à 1/500, car la caroube est très riche en sucres.

2.3.3.2 Protocole d'extraction

Le dosage consiste à préparer dans un premier temps une solution aqueuse de phénol 5 % (m/v) et de l'acide sulfurique concentré 98%. Le protocole consiste à introduire dans des

tubes à essai, à l'aide d'une micropipette, 200 µl d'eau distillée, ou de solution étalon ou de solution à doser (diluer à 1/500), 200 µl de la solution phénolique 5% et 1 ml de H₂SO₄ concentré (à additionner rapidement). On réalise une homogénéisation avant d'incuber le mélange dans un bain-marie 100 °C pendant 5mn. Ensuite, le mélange est refroidi pendant 30 min à l'obscurité et la lecture de la densité optique est faite à une longueur d'onde de $\lambda = 480$ nm.

2.3.4 Protéines

L'azote total de caroube a été déterminé selon la méthode officielle AOAC 955,04 (AOAC, 2007) en utilisant un appareil MacroKjeldahl (digestion et distillation). La détermination s'effectue en trois étapes : une étape de Digestion ou minéralisation de l'échantillon (0,5 g de caroube). Pendant cette étape de digestion, l'azote protéique est transformé en azote ammoniacal par oxydation de la matière organique dans l'acide sulfurique concentré à haute température (373°C, 3 heures environ), en présence d'un catalyseur (Hg (HgO), Cu (CuSO₄) ou Se) et d'un sel (K₂SO₄). L'acide sulfurique concentré a pour but d'oxyder la matière organique et de transformer l'azote protéique en ammoniaque (NH₃). Il sert également à piéger l'ammoniaque gazeuse sous la forme de sulfate d'ammonium, par action de la base avec l'acide. Ensuite, l'addition du sel K₂SO₄ qui a pour but d'élever le point d'ébullition de la solution pour accélérer la réaction de minéralisation de la matière organique.

L'étape 2 ou l'étape de distillation de l'ammoniaque consiste, en premier temps, à libérer l'ammoniaque sous la forme du sel (NH₄)₂SO₄ par l'addition d'une solution concentrée de NaOH en excès ; ensuite à distiller l'ammoniaque à la vapeur d'eau. L'ammoniaque distillée par la vapeur d'eau est piégée dans une solution d'acide borique. Elle réagit ensuite avec l'acide borique pour former des sels borates d'ammonium.

L'étape 3 ou titrage de l'ammoniaque. Durant cette étape, l'ammoniaque sous la forme de borates d'ammonium est titrée directement à l'aide d'une solution standardisée d'acide (HCl

ou du H₂SO₄), et d'un indicateur coloré. En outre, un blanc est réalisé en mettant tous les réactifs sauf l'échantillon, pour soustraire l'ammoniaque contenu dans les réactifs de l'ammoniaque contenu dans l'échantillon. Ensuite, Le pourcentage de protéines a été calculé en utilisant un facteur F de conversion de 6,25.

$$\% \text{ protéines} = \% \text{ N} \times F = (VE - VB) \times 14,01 \times F / me \times 1000$$

2.3.5 Fibres

Deux à cinq g de poudre de caroube (4g) sont digérés dans 200 ml de HCL à 5% pendant 30 minutes. Le mélange est filtré et lavé à l'eau chaude. Ensuite le résidu est digéré par 200 ml de NaOH à 5% sous reflux pendant 30 min. Le mélange est filtré et lavé à l'eau jusqu'à neutralité du pH. Le mélange est lavé avec 20 ml d'alcool éthylique et avec 20 ml d'éther éthylique. Le résidu est séché à 100 ° C pendant deux heures et la masse résiduelle était considérée comme des fibres (De Pádua et al, 2004).

2.3.6 Cendres

La teneur en cendres de la poudre de caroube a été déterminée selon la méthode officielle AOAC 972.15 (AOAC, 2006) où, 2 grammes de poudre de caroube ont été pesés dans des creusets en porcelaine préchauffés. Les creusets sont ensuite placés pour une nuit dans un four à moufle contrôlé et préchauffé à 600°C. A la suite, les creusets ont été refroidis dans un dessiccateur, avant d'être pesés et le pourcentage de teneur en cendres a été déterminé selon la formule suivante:

$$\% \text{ cendre} = \frac{\text{masse (g) creuset avec cendre après incinération} - \text{masse (g) creuset vide}}{\text{masse (g) initiale de poudre de caroube}} \times 100$$

2.3.7 Humidité

Environ 5 g de poudre de caroube ont été pesés et placés dans des coupelles en aluminium (préalablement chauffées et pesées). Après séchage à une température de 105 °C

pendant 6 heures, les coupelles sont refroidies dans un dessiccateur avant d'être pesées.

L'humidité était considérée comme étant les pertes de masse de l'échantillon après séchage.

Elle est calculée selon la formule suivante:

$$\% \text{ Humidité} = \frac{\text{masse (g) de l'échantillon avant séchage} - \text{masse (g) de l'échantillon après séchage}}{\text{masse (g) de l'échantillon après séchage}} \times 100$$

2.4 Extraction des gommages de caroube

L'extraction de la gomme de caroube (des différentes variétés Libanaises) nécessite plusieurs étapes pour obtenir la gomme de caroube purifiée. En premier temps, les gousses sont écrasées et les graines sont séparées manuellement.

2.4.1 Préparation de la gomme non purifiée

La gomme non purifiée est préparée après avoir séparé la cuticule et le germe de l'endosperme de la graine de caroube.

2.4.1.1 Décorticage par voie acide

Pour obtenir une gomme de couleur blanchâtre de hautes qualités, un traitement acide a été appliqué pour le décorticage, qui consiste à faire macérer 100 g de graines dans l'acide sulfurique dilué (60/40 ml) H₂SO₄/H₂O pendant 60 minutes à 60°C dans un bain marie d'eau préchauffé tout en agitant périodiquement (Dakia et al, 2007; Dakia et al, 2008) (**Figure 9a**).



Figure 9. Etapes de décortication et de broyages (a: macération dans l'acide sulfurique, b : élimination des cuticules carbonisées, c : séparation, d : broyage)

A la suite, un lavage intensif suivi d'un frottement a été réalisé à travers un tamis de 2 mm métallique pour éliminer la cuticule carbonisée (**Figure 9b**).

2.4.1.2 Trempage

Les graines décortiquées ont été trempées dans de l'eau distillée pendant une nuit pour faire gonfler l'endosperme et faciliter sa séparation manuelle du germe (**Figure 9c**).

2.4.1.3 Séchage et broyage

Les endospermes ont été lavés et séchés dans un four à 105°C pendant 4-5 heures. Enfin, les endospermes ont été ensuite broyés avec un broyeur de laboratoire (IKA-WERKE, MF10, 0,5 mm, Staufen Allemagne) pour obtenir ce qu'on appelle la gomme de caroube non purifiée, ou LBG brut (**Figure 9d**).

2.4.2 Purification

La qualité de la poudre, LBG non purifiée dépend du procédé de broyage qui assombrir parfois la poudre, en raison des températures élevées appliquées au cours du processus. Ce

processus détermine la taille et la couleur du produit final. Egalement, la couleur et la taille des particules sont une indication des impuretés (Samil Kök, 2007).

2.4.2.1 Préparation des Echantillons

La première étape consiste à laver sous vide la poudre d'endosperme avec de l'éthanol suivi d'un lavage à l'acétone afin de contrôler la charge microbologique (Kawamura, 2008) sur un fritté n°3, et ensuite récupérer le gâteau formé. La 2^{ème} étape consiste à provoquer la précipitation dans une solution aqueuse à une concentration de 1,3 g/100 ml (Bouzouita et al., 2007). La quantité nécessaire d'endosperme brut est progressivement ajoutée à l'eau distillée, en agitant doucement pendant 2 heures à température ambiante, et en maintenant la solution pendant une nuit à 4 °C. Ensuite, les solutions sont chauffées à 80 °C dans un bain marie pendant 30 minutes avec agitation continue. Après refroidissement, les solutions sont centrifugées pendant 1 h à 10000 rpm (20 °C) pour éliminer la matière insoluble (Mannion, 1992). La solution de la gomme brute contenant le galactomannane solubilisée est recueillie pour le processus de purification (Figure 10 a).



Figure 10. Processus de purification de la Gomme de caroube non purifiée (a: solubilisation, b: précipitation, c: filtration, d: lavage et récupération, e: lyophilisation, f: broyage)

2.4.2.2 Purification à l'isopropanol

Le galactomannane solubilisé a été purifié par précipitation à l'isopropanol. Ce processus élimine toutes les saveurs inacceptables de LBG brut et apporte une solution claire et plus stable, en raison de l'élimination des impuretés et des enzymes endogènes (**Dea & Morrison, 1975**). Le galactomannane a été précipité à partir de la solution de LBG brut, en versant un excès deux volumes d'isopropanol et en laissant le mélange au repos pendant 30 min (**Figure 10 b**). La matière fibreuse blanchâtre a été recueillie et filtrée à travers un tamis (53 μ m) et ensuite lavée deux fois avec de l'isopropanol et de l'acétone (**Figure 10c,d**).

2.4.2.3 Lyophilisation

Une étape de lyophilisation de 48 heures est réalisée après purification (**Figure 10 e**) ; le solide friable obtenu a été broyé en une poudre fine qui n'est autre que la gomme de caroube purifiée (**Figure 10 f**). **Bouzouita et al. (2007)** a signalé que la purification de LBG avec de l'isopropanol élimine pratiquement toutes les matières grasses et les fibres et réduit les teneurs en cendres et en protéines.

2.4.2.4 Rendement

Le rendement en gomme est déterminé comme étant le pourcentage de LBG purifiée présente dans la poudre de l'endosperme. En fait, ce rendement en gomme dépend de la méthode, de l'origine et des conditions de culture du caroubier (Bargallo et al, 1997; Lazaridou et al, 2000).

2.5 Analyses rhéologique

Les profils de viscosité pour toutes les gommes, y compris une gomme commerciale, ont été étudiés à différentes températures afin de déterminer leur comportement d'écoulement et l'influence de la température sur la viscosité apparente. Une gomme commerciale a été choisie pour la comparer aux différents LBG libanaises.

2.5.1 Préparation des solutions

Les solutions de LBG à 1% ont été préparées immédiatement avant les mesures rhéologiques en ajoutant 0,2 g de LBG purifiée à 20 ml d'eau distillée dans un réacteur agité (100 ml) relié à un bain marie pour chauffer les solutions pendant 30 min à 85 ° C (Heidolph RZR 2,021,383 rpm, Allemagne) et par la suite, le mélange est refroidi à température ambiante (Bouzouita et al, 2007; Dakia et al, 2008).

2.5.2 Paramètres rhéologiques de viscosité

Les propriétés rhéologiques ont été réalisées sur un rhéomètre rotatif (Kinexus, Malvern instrument, Orsay, France), en utilisant une géométrie cône-plan (CP4/40 de SC0075SS, 0,15 écart mm). Le programme pour l'analyse du profil de l'évolution de la viscosité a été défini comme suit: des rampes de vitesse de cisaillement de 1 à 1000 s⁻¹, le temps de rampe à 10 min; 12 échantillons par décade, et chaque échantillon (1,16 ml) a été mesurée séparément à 25, 35, 45 et 55 °C (à chaque température, les échantillons ont été changés et la géométrie a été nettoyée). Ceci nous a permis d'obtenir la courbe de viscosité en fonction de la rampe de taux de cisaillement.

Selon la littérature, le modèle en puissance d'Ostwald de Waele est l'équation la plus adaptée pour modéliser le profil de viscosité des polymères solubles dans l'eau (Higiro et al, 2007; Dakia et al, 2008), ce modèle a été utilisé pour représenter les courbes d'écoulement et analyser les données expérimentales. Ce modèle est newtonien, avec un exposant ajouté sur le terme de taux de cisaillement « shear rate term » (éq 1):

$$\eta = k\gamma^{n-1} \quad (\text{éq1})$$

où η est la viscosité (Pa.s), γ contrainte de cisaillement (s⁻¹), k l'indice de consistance (Pa.sⁿ), et n l'indice de comportement d'écoulement (sans dimension).

Les fluides représentés par une loi en puissance peuvent être subdivisés en trois différents types de fluides basés sur la valeur de leur indice de comportement d'écoulement : n<1 fluide

pseudoplastique ou « rhéo-fluidifiants », $n=1$ fluide newtonien (où la viscosité est constante indépendamment du cisaillement imposée) et $n > 1$ fluides dilatants ou « rhéo-épaississants ».

2.5.3 Oscillation

Les propriétés viscoélastiques d'une matière sont mesurées par un test d'oscillation. L'oscillation est une technique par laquelle un stress ou une déformation sinusoïdale est appliquée, qui excite continuellement l'échantillon et induit une réponse qui suit une onde sinusoïdale. Si le traitement est drastique, la structure élastique sera détruite. L'oscillation doit être effectuée dans le LVR (où la longueur de LVR région viscoélastique linéaire est une mesure de la stabilité d'une matière par rapport à un stress ou une tension). Inversement, l'oscillation peut être utilisée pour déterminer la force et la stabilité d'une matière et donner une indication claire du comportement de l'échantillon, s'il s'agit d'un comportement visqueux ou élastique, sur une gamme de fréquence donnée. Les propriétés viscoélastiques (essai dynamique oscillatoire) pour des solutions de gomme (1% w / v) ont été réalisées à 25 ° C sur Kinexus Malvern rhéomètre avec la même géométrie appliquée pour la rhéologie (CP4/40SC0075SS système de capteurs, 0,15 mm, cône écart à la plaque géométrie). L'analyse des données issues de ces courbes ont été à l'origine de la détermination du module élastique G' , le module de viscosité G'' et la viscosité complexe (η^*) en fonction de la fréquence (Hz) (Dakia et al., 2008).

2.6 Caractérisation Structurale

Les polysaccharides sont largement utilisés pour modifier les propriétés texturales des aliments liquides et semi-solides. Pour un polysaccharide donné, la texture sera largement affectée par son poids moléculaire (Harte & Venegas, 2010).

2.6.1 Préparation des échantillons

Les solutions de gomme de caroube purifiée ont été préparées à 0,1% w/v ou 1 g/l (0,02 g dans 20 ml d'eau distillée) et chauffées à 85 °C pendant 30 min dans un bain-marie sous

agitation mécanique (Heidolph RZR 2021, 383 min, Allemagne), puis centrifugées (10000 rpm, 20°C, 40 min, Eppendorf 5804R centrifugeuse, Hambourg, Allemagne). La microfiltration à travers un filtre de 0,45 µm est nécessaire avant l'injection sur la colonne et la détermination de concentration du polymère final (Dakia et al., 2008).

2.6.2 Détermination de la masse macromoléculaire

La moyenne en poids moléculaire (M_w) et la viscosité intrinsèque $[\eta]$ de la gomme de caroube ont été déterminés par chromatographie d'exclusion stérique (Viscotek, Malvern, UK) équipé d'un dégazeur VE 75010 GPC-Viscotek, pompe VE 1122 Système de délivrance de solvant (Viscotek, VE 5200 détecteurs de CPG Autosampler-Viscotek, UK) et 4 détecteurs : triples détecteurs (TD 305 triple détecteur array –Viscotek, UK), un détecteur de diffusion de la lumière, réfractomètre et viscosimètre. La colonne et les détecteurs ont été maintenus à 35°C, et le paramètre de l'échantillon dn/dc (mg/l) a été fixé à 0,1330 avec un débit de 0,7 ml/min. La phase mobile était de 0,05 M NaNO_3 , 0,05% de NaN_3 comme conservateur et le volume d'injection était de 100 µl.

2.7 Taille et potentiel Zeta

Un Zetasizer avec une cuve en plastique (forme de U) à 20 °C (nanoseries Nano-ZS Malvern, UK) est utilisé pour mesurer la taille moyenne des particules et le potentiel Zeta pour les différents polymères de galactomannane purifiés. Le diamètre moyen des particules (Z-average) est calculé à partir de l'intensité du signal en fonction du diamètre des particules. Une concentration de 2%, 1%, 0,5% et 0,1% g / l a été étudiée. Une concentration à 0,1% s'est avérée la concentration idéale pour réaliser les mesures des tailles. Alors, 0,02 g de poudre ont été ajoutés à 20 ml d'eau ultra-purifiée et chauffée à 85 ° C pendant 30 min dans un bain-marie sous agitation mécanique à 383 rpm (Heidolph RZR 2021, Allemagne). Cette solution a été centrifugée (10000 rpm, 20 °C, 40 min, Eppendorf 5804R centrifugeuse Hambourg, Allemagne) et maintenue pendant 2 jours à 4 °C pour une stabilisation optimale.

Ces solutions ont fait l'objet d'une sonication environ 10 minutes pour éliminer les microbulles d'air indésirables (Sonics 1510, BRANSON, nettoyeurs à ultrasons, France). Ensuite, la solution est micro-filtrée à travers un filtre 0,45 μm juste avant l'analyse.

2.8 Détermination du rapport mannose/galactose

Le dosage des sucres présent dans la gomme de caroube peut se faire par plusieurs méthodes (enzymatique, chimique, chromatographique). Ainsi, nous avons opté pour la chromatographie liquide à échange d'ions selon le protocole de Bouzouita et al. (2007).

2.8.1 Protocole expérimental

Tout d'abord, La courbe d'étalonnage est déterminée en faisant référence aux mélanges synthétiques de mannose et de galactose à 100g/l dilué au 1/2, 1/3, 1/4, 1/6, 1/8 et 0 (Figure 11), pour pouvoir déterminer les aires des mannoses galactoses des différentes gommes. Les conditions optimales pour l'hydrolyse de la gomme de caroube obtenue étaient 100°C, 1M H₂SO₄ et un temps d'hydrolyse de 2 h.

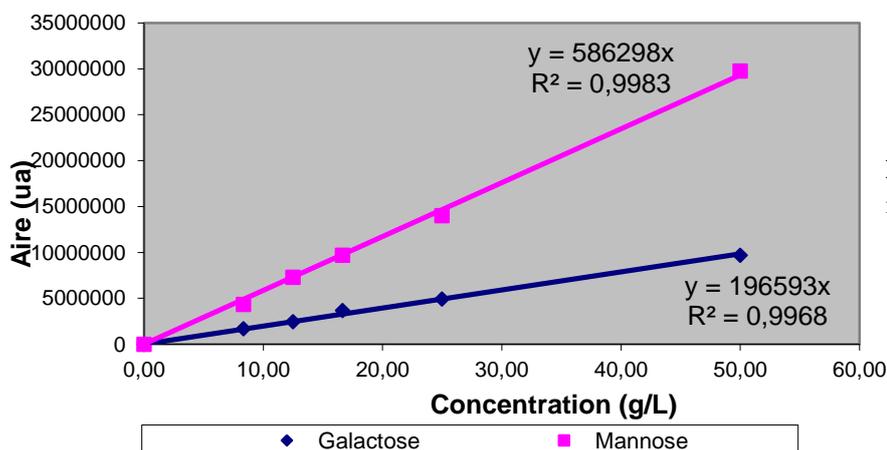


Figure 11. Courbes d'étalonnages mannose et galactose

2.8.2 Hydrolyse

Un échantillon de 400 mg de prise d'essai, pesé avec exactitude dans des tubes à essais (avec bouchon vissé) hermétiquement fermés, est mélangés avec 20 ml d'acide sulfurique à 1 M. L'ensemble est chauffé à 100°C dans un bain d'huile pendant deux heures. A l'issue de

cette période, la solution est refroidie, et placée dans un bécher avec agitation magnétique. Une solution de carbonate de baryum (en moyenne 14,5g en excès dans 300ml eau) est ajoutée progressivement tout en agitant la solution jusqu'à pH neutre (pH 6.5 et 7). Ensuite, le contenu est filtré sous vide sur un fritté à l'aide des filtres d'acétate de cellulose 0,2 μm . Ensuite le filtrat est évaporé avec sous vide à une température de 40°C jusqu'à l'obtention d'un résidu cristallin. Ce résidu est dissout dans 2ml d'eau MilliQ et filtré sur une seringue filtrante (le filtre est changé après chaque utilisation). La solution limpide obtenue est conditionnée hermétiquement dans un Vial prêt à l'analyse par HPLC.

2.8.3 Analyse par HPLC

Les analyses ont été effectuées par chromatographie en phase liquide à haute performance Agilent HP 1100 avec un détecteur de réfraction différentiel et équipée d'une colonne carbohydate WATERS (sugar pack, L = 300mm; diamètre interne = 6.5mm, température du four = 80°C), avec d'une phase mobile MilliQ. Un Logiciel CHEMSTATION est utilisé pour le contrôle du volume d'injection (10 μl), et du débit (0.6 ml/ min) et pour le traitement des résultats.

2.8.4 Traitement des résultats

À partir des 2 équations de la courbe d'étalonnage de mannose et de galactose, les aires des mannoses et des galactoses des différents échantillons des gommes de caroube ainsi que leurs concentrations, leurs masses et leurs rapports mannose galactose ont été calculés.

2.9 Détermination de l'isotherme de sorption

2.9.1 Protocole

La méthode utilisée pour déterminer l'isotherme de sorption est la méthode gravimétrique statique. Elle consiste à placer les échantillons dans des bocaux fermés contenant des solutions salines saturées. Chaque bocal contient une solution saline connue ayant la capacité d'imposer et de maintenir, à une température donnée, une humidité relative

constante dans l'atmosphère environnant. Les échantillons mis dans le bocal vont échanger la chaleur et la matière (vapeur d'eau) avec l'air du bocal jusqu'à l'obtention de l'équilibre thermodynamique. A ce stade, l'activité de l'eau de l'échantillon devient égale à l'humidité relative d'équilibre de l'ambiance.

2.9.2 Préparation des solutions salines

Les solutions salines utilisées dans cette étude sont : KOH ; $\text{KC}_2\text{H}_5\text{O}_2$; MgCl_2 ; K_2CO_3 ; $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$; CuCl_2 ; NaCl; KCl ; K_2SO_4 (tableau 6).

Tableau 6: Activité de l'eau des solutions salines à température 20°C

| Solutions salines | a_w à 20°C (%) |
|-----------------------------------|------------------|
| KOH | 0.093 |
| $\text{HC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ | 0.231 |
| MgCl_2 | 0.331 |
| KCO_3 | 0.432 |
| $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ | 0.544 |
| CuCl_2 | 0.68 |
| NaCl | 0.755 |
| KCl | 0.851 |
| K_2SO_4 | 0.976 |

Chaque solution a été préparée en dissolvant du soluté dans environ 300 ml d'eau distillée dans un récipient jusqu'à l'obtention d'une solution sursaturée, et la solution saturée a été placée dans un bocal hermétiquement fermé.

2.9.3 Préparation des échantillons

A peu près 0,5g de chaque gomme est placé dans des coupelles tarées au préalable avec balance de précision étalonnée (Sartorius, SP 2245, Max 220g). Ainsi, les coupelles des différentes gommes sont placées dans chaque bocal contenant la solution saline déjà préparée. L'ensemble est placé dans une chambre conditionnée à température constante de 20°C durant la durée de l'expérience. Les masses des coupelles ont été suivies périodiquement.

2.9.4 Détermination de l'activité de l'eau

L'équilibre thermodynamique est supposé atteint quand la variation de la masse de l'échantillon ne dépasse pas 1 mg entre deux pesées consécutives espacées d'une semaine. A la fin de cette période (20 jours), les masses finales des coupelles sont déterminées et sont utilisées pour déterminer la teneur en eau.

2.9.5 Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau de chaque échantillon a été déterminée par la balance à lampe halogène (Ohaus moisture analyzer, MB25, Switzerland) qui donne la teneur en eau ainsi que la matière sèche dans un temps très court de 3 à 4 min. A partir de ces données, les calculs sont faits et les isothermes de sorption ont été déterminées.

Chapitre 3
Caractérisation botanique et
chimique de la caroube
Libanaise

Chapitre 3 - Caractérisation botanique et chimique de la caroube Libanaise

3.1 Introduction

La caroube est un fruit à utilisation polyvalente qui suscite de plus en plus d'intérêt pour des nombreuses applications alimentaires et non alimentaires. En raison du développement de l'industrie alimentaire et l'augmentation de la demande pour les produits à base de caroube (Sidina et al, 2009; Yousif & Alghzawi, 2000), on a assisté ces dernières années à la plantation des arbres de caroubiers dans différentes région du Liban. En outre, les caroubiers nécessitent un entretien minimal, car ils sont résistants à la sécheresse et poussent bien dans les régions tempérées chaudes et dans les sols calcaires (Batlle et Tous, 1997; Biner et al, 2010; FAO, 2001; Gubbuk et al, 2010).

Selon les variétés, les gousses de caroube diffèrent morphologiquement dans leur taille, leur forme, leur qualité, leur couleur et dans leur rendement en graines. Ces variations peuvent être attribuées au génotype de la plante, l'origine géographique, les conditions climatiques et les méthodes de récolte et de stockage (Batlle et Tous 1997 ; Biner et al, 2007; Owen et al, 2003; Naghmouchi et al, 2009; Sidina et al, 2009). Ces variations sont aussi observées au niveau de la saveur, la teneur en sucre, la qualité et le contenu en gommés. De même, cette composition dépend aussi des facteurs technologiques tels que l'extraction et les méthodes d'analyse.

La gousse de caroube est constituée de pulpe et des graines. les principaux composants chimiques de la pulpe de caroube sont les sucres (>50%) notamment le saccharose, des polyphénols (16-20% tanins condensés) dont certains présentent une activité anti-oxydante, de

protéines (7%), des cendres, des fibres, et de petites quantités de plusieurs minéraux (Batlle & Tous, 1997; Gubbuk et al., 2010).

Au Liban, Les caroubiers sont plantés dans les zones côtières et sur les pentes inférieures des montagnes côtières (0-1000 m) (FAO, 2001). La production libanaise de caroube a augmenté récemment suite à des nouvelles plantations dans le cadre d'un programme de reforestation, de préservation de cet ingrédient alimentaire locale traditionnelle (sucreries traditionnels libanais et pâtisseries) et aussi suite à l'intérêt d'utilisation de la gomme de caroube comme agents de suspension naturels dans les produits alimentaires (FAO, 2001; Estephan, 2002). Cependant, malgré le grand intérêt aux plantes des caroubes et à leur utilisation dans différentes applications, peu d'études sont disponibles sur la caroube libanaise. Ainsi, le but de ce travail était d'étudier différentes variétés Libanaises (du point de vue composition chimique et morphologique) afin d'établir d'éventuelles corrélations entre les caractéristiques morphologiques et chimiques, et la localisation géographique principalement la latitude. Cette connaissance permet de proposer les meilleures caractéristiques des cultivars qui peuvent être utiles pour le développement de nouveaux vergers avec la meilleure rentabilité agro-industriel.

3.2 Article 1. Morphological and chemical variability of Lebanese carob varieties

European Scientific Journal June 2013 edition vol.9, No.18 ISSN: 1857 – 7881 (Print) e- ISSN 1857- 7431

MORPHOLOGICAL AND CHEMICAL VARIABILITY OF LEBANESE CAROB VARIETIES

Amira Haddarah

Université de Lorraine, LIBio (Laboratoire d'Ingénierie des biomolécules), Vandœuvre-lès-Nancy, France

Université Libanaise, Faculté d'Agronomie, Dekwaneh, Liban

Université Libanaise, Faculté des Sciences, Laboratoire MCEMA, EDST, Hadath, Liban

Ali Ismail

Ali Bassal

Tayssir Hamieh

Université Libanaise, Faculté d'Agronomie, Dekwaneh, Liban

Université Libanaise, Faculté des Sciences, Laboratoire MCEMA, EDST, Hadath, Liban

Irina Ioannou

Mohamed Ghoul

Université de Lorraine, LIBio (Laboratoire d'Ingénierie des biomolécules), Vandœuvre-lès-Nancy, France

Abstract

Morphological variation (pod length, width, thickness, seed number, volume, weight and specific gravity measurements) and chemical composition (protein, sugar, fiber, ash and total phenol content) of nine carob varieties from different regions of Lebanon were investigated. The obtained results showed that these two criteria exhibit significant differences ($p < 0.05$) allowing thus to establish correlations between morphological aspects and location, mainly latitude. Moreover, the principal component analysis (PCA) of the data allowed separating these varieties in two grouped and two ungrouped populations.

Keywords: Carob, Morphological characteristics, *Ceratonia siliqua*, Polyphenol, Sugar

Abbreviations: A1: Akkari 1, A2: Akkari 2, Ah: Ahmar, Bal: Baladi, Bar: Barri, H₂SO₄: sulfuric acid, J1: Jnoubi1, J2: Jnoubi2, Kh: khachabi, Na₂CO₃:

sodium carbonate, PCA: principal component analysis, p: probability, SM: Sandali Makdissi.

Introduction

Carob tree is a long-lived evergreen tree (*Ceratonia siliqua L.*) that has been widely cultivated around the world over the years and described as a plant with a large adaptability in the Mediterranean area (Lossaint, 1973; Batlle and Tous, 1997). It is found spontaneously on the coastal areas up to 800m on the western slopes of Lebanon Mount.

Carob tree has an economic and environmental importance in Lebanon. It is used in reforestation of arid and degraded areas and also as for ornamental purposes (Winer, 1980; Girolamo and Laura, 2002). The pulp and the seeds have some interesting properties and are often used in food and pharmacological industry (Batlle, 1997; Markis et Kefalas, 2004). The pulp content in the pod ranges from 73 to 95% (Caja et al. 1988; Marakis et al. 1988; Shawakfeh et Ereifej, 2005). Carob pods are also characterized by high sugar content (500 g/kg) (NAS, 1979; Petit and Pinilla, 1995; Batlle and Tous, 1997; Markis and Kefalas, 2004). Moreover, carob pods contain appreciable amount of fiber (4.2-39.8%), depending on the type of the extracted fiber (Thomson, 1971; Shawakfeh et Ereifej, 2005). Carob pulp is a good source of polyphenols (mainly tannins 16-20%) (Batlle and Tous, 1997; Owen et al., 2003; Biner et al., 2007), and protein (2.7-7.6%) but it is poor in lipid (0.4-0.8%).

The pulp and the seeds are valorized in different applications. Hariri et al. (2009) reported that the pod fiber content play a role in hypocholesterolemic and hypoglycemic regulation, whereas phenolic compounds can be used as antioxidant additive. Moreover, the locust bean gum (additive E 410) extracted from the endosperm of seeds is used as stabilizer and thickening agents in food industry (Batlle and Tous, 1997; Neukom, 1989). Moreover, seeds powder can be used in baby foods to prevent vomiting (FAO, 2001). The locust bean gum is also applied in pharmaceutical industry as drug delivery (Sandolo et al., 2007).

Chemical composition of carob had been studied extensively for different countries of the Mediterranean area. It had been observed that this composition is depending not only on technological factors such as the extraction and analytical methodologies, but also on the genotype of the plant, the geographical origin, the climate conditions and the harvesting and storage procedures (Batlle & Tous, 1997; Biner et al., 2007; Owen et al., 2003; Naghmouchi et al, 2009; Sidina et al., 2009). However, in spite of the great interest to carob and their use in different applications, few studies are available on Lebanese carob. So to select the best varieties, an intensive investigation on the morphological and chemical composition for the

different carob Lebanese varieties is needed. These studies will allow understanding correlations between fruit, seed characteristics and geographical coordinates in order to propose the best characteristics cultivars that can be helpful for the development of new orchards with the best agro industrial profitability. Based on the above considerations, the aim of the current study was to assess morphological characteristics and chemical composition of wild and cultivated types of carob in Lebanon and to establish correlation between morphological parameters and environmental factors such as altitude, latitude and longitude.

Materials and methods

Sampling and experimental method for morphological-and chemical analysis

Nine Lebanese carob populations, including a wild type, were randomly collected from various geographic sites with different altitudes of the Lebanese territories (Fig. 1, Table 1). Ten pods from each variety of the carob were randomly chosen to measure the different parameters. Populations were located on an axis North-south on different geographical regions (Fig. 1). J1, J2, Bar and SM come from south Lebanon with different geographical heights. Khachabi is in the middle of the country near the Mount Lebanon. Ahmar, Baladi, Akkari are located only in the north of Lebanon. Moreover, geographical repartitions of carob were accompanied with GPS locator in order to see whether there is any correlation between chemical and location parameters (Table 1).

Morphological parameters

For ten pods of each variety, following parameters have been measured: weight, length, width, thickness, volume, number of seeds, specific gravity, size index, number of seeds / pod, seeds weight / pod and % seed / pod.

Length (cm) of pod was measured using a measuring tape, whereas width (cm) was assessed with the Vernier caliper (top, middle, and bottom of pod). Thickness (cm) was evaluated with Iwanson gauge (1/10 mm) where three parts of the top, middle and bottom of the pod were covered. Weight (g) of pods and kernels were taken using a top-loading balance. Volume (cm³) was estimated by submerging carob pod in a known volume of water inside a graduated cylinder (1000 cm³). Size index was determined as the ratio of length over width and specific gravity is the density (pod Mass / pod volume) of carob pod over density of water.

Chemical analysis

To determine the chemical composition of carob pulp (total polyphenols, total sugars, fiber, protein and ash content), samples from seedless pods of morphological measurements were crashed, and then grounded into powder using a hammer mill (diameter less than 0.5 mm).

Extracts were prepared as follows: 1 g of carob powder was mixed with 20 ml of water and 20 ml of acetone in a reactor at room temperature (20 - 22 ° C, 30 min).

Determination of total phenols

Total phenolic compounds were determined colorimetrically at 660nm and expressed as gallic acid equivalents, according to the method described by Singleton et al. (1965). Samples were added to Folin–Ciocalteu reagent and CaCO₃ solution and placed in the dark for 15 min before spectrophotometric analysis.

Determination of sugar content

Total sugars were determined colorimetrically at 480 nm according to the method described by DUBOIS et al. (1956). Standards were prepared with glucose solutions at different concentrations.

Determination of protein content

Total nitrogen of carob powder was determined according to the AOAC official method 955.04 (AOAC, 2007) using a MacroKjeldahl digestion and distillation apparatus.

Determination of fiber content

Four grams of carob powder were digested with 200 ml of 5% HCL for 30 minutes. The mixture was filtered and washed with hot water. Then, residue was digested with 200 ml of 5% NaOH under reflux for 30 min. The mixture was filtered and washed with distilled water until neutrality of pH. The material was washed with 20 ml of ethyl alcohol and 20 ml of ethyl ether. Finally, the residue was dried at 100 ° C for two hours and the residual mass was considered fibers (De Pádua et al, 2004).

Determination of ash and moisture contents

The ash content of the carob powders was determined according to the AOAC official method 972.15 (AOAC, 2006). Moisture was determined according the procedure of AFNOR (NF VO4-282, December 1996).

Statistical Analysis

Data were analyzed by using the one-way analysis of variance (ANOVA), after testing normality and homogeneity of variance. Then, the “Tukey test” ($p < 0.05$) was performed in order to find parameters that are significantly different from each other. Moreover, data being numerous, a principal component analysis (PCA) was made to find the main variation trends between fruits characters in the carob cultivars. In addition, hierarchical cluster analysis (HCA) was used to investigate the similarities and dissimilarities among the varieties. For classification, the Ward’s Minimum Variance Method was utilized. The squared Euclidean distance was used as the dissimilarity measure for Ward’s method. The freeware R (v. 2.13.1) was used for the statistical analysis. Furthermore, correlation between morphological, chemical parameters and environmental or

geographical factors (altitude, latitude, longitude) were evaluated using Pearson's correlation coefficient.

Results and discussion

Morphological characteristics

Results of morphological traits of carob pod are presented in Table 2. One-way ANOVA is performed on the data and significant differences between them were found.

Among the morphological characteristics, different notions can be distinguished: the pod size (which gathers pod length, width, thickness and size index), the pod weight (mass, volume, specific gravity) and the seed yield in a pod (number, weight).

The pod size

The pod length had been distinguished in four groups that varied from 11.42 ± 1.84 cm to 24.25 ± 1.84 cm. The longest were Khachabi, Akkari 1 and 2 (group 1), the shortest being Jnoubi 2 (group 4). For the pod width and thickness, the different groups, formed by the Tukey's test, were overlapped. However, Khachabi belongs to the group with the highest width and thickness while the wild type (Barri) was the smallest in width and thickness. This explained that Khachabi was the taller and pulpier and the wild type was less pulpy and as a result was the thinnest. This result was also found by other authors; wild types are known for their non-fleshy pulp with higher seed production and higher seed to husk ratio (Marakis et al., 1988; Ouchkif, 1988; Di Lorenzo, 1991; Battle and Tous, 1997; Gubbuk, 2010).

The pod weight

For the pod mass and volume, classification was the same; all the volume is full of matter. Barri and Jnoubi 2 got the smallest mass and volume whereas Khachabi was the heaviest and has the highest volume. However, the ratio between mass and volume leads to a different classification. Khachabi having a high mass and volume has a specific gravity inferior to Barri, which has a small mass and volume. Since Khachabi was the longest so for sure it occupies a larger space (volume) but it doesn't mean that it was the denser. Since density is the amount of matter crammed into a given space, obviously and statistically, Khachabi is presented as the less juicy pulp among the other Lebanese carob types. So pods as Barri and Jnoubi 2 are fully denser than big pods as Khachabi.

Seed yield in a pod

According to kernels, the seed number and weight give the same classification: Akkari 2 and Khachabi had the highest seed number; in the opposite, Jnoubi 2 has few seeds. The variable seeds yield /pod gives different classification than the two others where Barri has the highest value and Khachabi the lowest. This is explained by the fact that, the wild type Barri had small pulp and high seeds yield among all carob pod varieties.

Many authors mentioned that the carob wild type is highly rich in kernels than the cultivated type (Marakis et al., 1988; Di Lorenzo, 1991; Biner et al., 2007, Gubbuk et al, 2010).

Principal Component Analysis

Principal Component Analysis was performed to objectively interpret and compare the morphologic data of the carob samples and evaluate the most important variables able to discriminate carob. The application of PCA allowed reducing data to PC1 (50.83%), PC2 (20.13%) and PC3 (12.34%), which expressed 83% of the total variance of the data set. PC1 is obtained by combination of the length, the width, the pod weight, the volume, the seeds yield and the seeds weight/pod. These variables are coherent with the description of pod size; PC1 describes “big carob pods”. This conclusion is coherent with the results of ANOVA, all these variables are linked and gives a same classification of carob. Then, PC2 is highly correlated with the seeds yield which describes the richness of seeds pod. Finally, PC3 is mainly explained by the specific gravity that described heavy pods with a low volume.

Furthermore, the individual factors map (Fig. 2) shows that it was difficult to separate varieties. We can see tendencies at the extremes: Khachabi correlated positively with PC1, thus it corresponds to big carob pods, Jnoubi2 is correlated negatively with PC1 and PC2, and it corresponds to small carob pods with less seeds. Barri is negatively correlated with PC1 and positively correlated with PC2. It corresponds to small carob pods with high seed content. Individuals are not well represented on the PC3, so this component was not interpreted.

Hierarchical cluster analysis

To investigate similarities between varieties and confirming PCA, analysis was completed by a hierarchical cluster analysis (Fig. 3). There are ten individuals by variety; thus, for almost all varieties, there is a gathering of the ten individuals except for Akkari 1 which is characterized by a high diversity inside this variety. Two clusters can be distinguished with two ungrouped varieties Barri and Khachabi, which confirms a high dissimilarity among all varieties particularly Barri the wild type and Khachabi.

Chemical characteristics

Table 3 presents the ten variables describing chemical characteristics of the carob pod. One-way ANOVA is performed on the data and significant differences between them are found. As in the literature, we found that carob pulp is highly rich in sugars (72.25 ± 0.50 for Khachabi to 89.46 ± 1.04 for Jnoubi 2), polyphenol (5.83 ± 0.91 for Khachabi to 21.87 ± 2.36 for Barri), in addition to an appreciable amount of fibre, and minerals (Custódio, 2011; Ayaz, 2007 Gruendel, 2007; Bengoechea, 2008; Zunft, 2001). The variable

protein content was low and not discriminative; it varied from 3.61 ± 0.72 (SM) to 5.62 ± 0.15 (Khachabi).

Principal Component Analysis

The application of PCA allowed reducing data to PC1 (31.92%), PC2 (29.42%) and PC3 (22.89%), which expressed 84% of the total variance of the data set. Thus, PC1 is obtained by combination of the sugar content and the fiber content. Then, PC2 is highly correlated with the polyphenol content and the mineral content. It describes carob with high nutritional properties. Finally, PC3 is explained positively by water content and negatively with protein content.

Furthermore, the individual factor maps (Fig. 4) allow separating some varieties. On figure 4a, we can see that the varieties Barri and Jnoubi are separated according the PC2. Wild type Barri had the highest polyphenol content whereas Khachabi had the lowest polyphenol content. On figure 4b, we see that Ahmar and SM are described by PC3, low water content and high protein content in opposition with Baladi.

Hierarchical cluster analysis

To investigate similarities between varieties, analysis was completed by a hierarchical cluster analysis (Fig. 5). Two groups and one ungrouped variety were discriminated. Wild carob was the ungrouped variety same as for morphological characteristics. The first group is composed of Jnoubi1, Jnoubi 2 and SM. The second group gathers the others varieties (Ahmar, Baladi, Khachabi, A1, A2).

Correlation between carob characteristics

The correlation matrix between morphological, chemical features and geographic parameters were summarized in Table 4. Pearson's coefficients were calculated and significant differences were found. The correlation analyses established by cultivar provided a specific understanding about the way how fruit, seed characteristics and geographical coordinates correlates within cultivar. Significant correlations were found between characteristics describing pod size, pod weight and seed yield. Thus, pods which are longer, heavier with a high volume and high size index have the highest seed number. Furthermore, seed yield was negatively correlated with pod width which explains that high seeds yield pods had the smallest width. These results agreed with those of Tous et al. (2009) and Barracosa et al. (2007), who showed that to achieve high seed yield, it is important to select thin, narrow carobs with pods that are not too heavy.

Besides, sugar content exhibited negative correlation with pod length, seeds number and weight which means that longest pod with heaviest and highest seed number furnished low sugar content. In addition, polyphenol content was positively correlated to seeds yield, so high polyphenol content is established by a high seeds yield.

Finally, the correlation between geographical coordinates and carob pod characters exhibited a highly positive and significant correlation between latitude and pod length weight volume, seeds weight and size index. It is coherent according to the repartition of varieties in Lebanon, country is more longer than larger. Thus, there is a significant difference on carob morphological characteristics according to the latitude. Big pods are located more in the north of the country and small pods in the south.

Conclusion

Carob seeds are the largest output of the locust bean gum in food industry. Thus, the industrial target is to get high seeds yield with high nutritional properties. Indeed, carob rich in sugars, polyphenols, fibre and minerals are interesting for health consumer particularly in food industry (dietary), medicinal and pharmacological industries (Custódio, 2011; Ayaz, 2007; Gruendel, 2007; Bengoechea, 2008; Zunft, 2001).

The relationship and correlations among all pods and seeds characters resulted in the separation of the 9 Lebanese populations into two grouped and two ungrouped populations. If we observed the two groups, we notice that there is a gathering according to latitude. The first group represents varieties with big pod size and high sugar content. These varieties are located in the north of Lebanon (A1, A2, Bal, Ah). The second group is less interesting in terms of nutritional properties. These varieties have small pod and are located in the south of Lebanon (J1, J2, SM). Furthermore, two varieties are very distinctive from the others and could have potential application for food industry: Khachabi has big pod size and high seed content with high sugar content and Barri the wild type which is characterized by small pods, high seed content, high sugar content and high polyphenol content. Finally, this study had brought supported information about Lebanese cultivars in order to help making breeding programs that helps for planting new carob orchards with best performing varieties.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support of the Azm and Saadeh Foundation.

References:

- AOAC. Official methods of Analysis of AOAC international. Gaithersburg, Maryland: AOAC 2006, 31: 931.04, 972.15.
- AOAC. Official methods of Analysis of AOAC international. Gaithersburg, Maryland: AOAC 2007, 2: 955.04, 33: 990.19, 945.46.
- Ayaz, F.A, Torun, H., Ayaz, S., Correia, P.J, Alaiz, M., Sanz, C., Gruz, J., Strnad, M., 2007. Determination of chemical composition of anatolian carob pod (*Ceratonia Siliqua* L.): sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. *J. food qual.* 30 (6), 1040–1055.

- Ayaz, F.A. & Torun, H., Glew, R.H., Bak, Z.D., Chuang, L.T., Presley, J.M. & Andrews, R., 2009. Nutrient Content of Carob Pod (*Ceratonia siliqua* L.) Flour Prepared Commercially and Domestically, *Plant Foods Hum. Nutr.* 64, 286–292.
- Barracosa, P., Osorio, J., & Cravador, A., 2007. Evaluation of fruit and seed diversity and characterization of carob (*Ceratonia siliqua* L.) cultivars in Algarve region. *Sci.Hort.* 114, 250–257.
- Batlle I., Tous J., 1997. Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. pp 92.
- Bengoechea C., Romero A., Villanueva A., Moreno G., Alaiz M.,F. Millan , Guerrero A., Puppo M.C., 2008. Composition and structure of carob (*Ceratonia siliqua* L.) germ proteins, *Food Chem.* 107, 675–683.
- Biner B., Gubbuk H., Karhan M., Aksu M., Pekmezci M., 2007. Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food Chem.* 100, 1453–1455.
- Caja, G., Albanell, E., Casanova, R., 1988. Caracterización morfológica de frutos de algarrobo cultivados en España. In: *Proceedings of the II International Carob Symposium*, Valencia, Spain, September 29–October 1, pp. 119–129.
- Custódio, J.L, Fernandes, E, Escapa, A.L, Fajardo, A., Aligue, R., Albericio, F., Neng, N.R., Nogueira, J.M., Romano, A. 2011. Antioxidant and cytotoxic activities of carob tree fruit pulps strongly influenced by gender and cultivar. *J. Agric. Food Chem.* 59, 7005–7012.
- De Pádua, M., Fontoura, P.S.G. & Mathias, A.L., 2004. Chemical composition of *Ulvaria oxysperma* (Kützinger) bliding, *Ulva lactuca* (Linnaeus) and *Ulva fasciata* (Delile). *Braz. arch. biol. technol.* 47, 49–55.
- Di Lorenzo, R., 1991. Carrubo. *Frutticoltura speciale*. Ed. REDA, Rome.
- Dubois, M.K.A., Gilli, Y.K., Hamilton, P.A., (1956), Colometric method for determination of sugari and related substances, *Anal. chem.J.* 28, 350– 356.
- Girolamo, R., Laura, D., 2002. Evaluation and preservation of genetic resources of carob (*Ceratonia siliqua* L.) in southern of Italy for pharmaceutical use. *Breeding Res. Aromatic Med.Plant.* 9, 367–372.
- Gruendel, S., Otto, B., Garcia, A.L., Wagner, K., Muelle, C., Weickert, M.O., Heldwein, W., Koebnick, C., 2007. Carob pulp preparation rich in insoluble dietary fibre and polyphenols increases plasma glucose and serum insulin responses in combination with a glucose load in humans *Br. J. Nutr.* 98 (1), 101–105.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2001). *Non-wood Forest Products in the Near East: A Regional and National Overview*. FAO Corporate Document Repository, 3.Country reports, 3.8,

- Lebanon. Retrieved on 12-18-2006 from <http://www.fao.org/docrep/003/Y1797E/y1797e13.htm>
- Gubbuk, H., Kafkas, E., Guven, D., Gunes, E., 2010. Physical and phytochemical profile of wild and domesticated carob. *Span. J. Agric. Res.* 8(4), 1129–1136.
- Hariri, A., Ouis, N., Sahnouni, F., Bouhadi, D., 2009. Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube. *Rev. microbiol. ind. san et environn.*, 37-55.
- Lossaint, P. (1973). Soil-vegetation relationships in Mediterranean ecosystems of southern France. In: Castri, F., Mooney, H.A. (Eds.), *Mediterranean type ecosystems origin and structure*. Heidelberg Press, New York, pp. 199–210.
- Marakis, S., Kalaitzakis J. & Mitrakos K. 1988. Criteria for recognizing carob tree varieties. In: Fito, P., Mulet, A. (Eds.), *Proceedings of the II International Carob Symposium Valencia, Spain*, pp. 558-566.
- Markis, D.P. & Kefalas, P., 2004. Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxydants. *Food Technol. Biotechnol.* 42 (2), 105–108.
- Neukom, H. 1989. Galactomannans: Properties and applications. *Lebensm. Wiss. Technol.* 22, 41–45.
- Naghmouchi S., Khouja M.L., Romero A., Tous J., Boussaid M. 2009. Tunisian carob (*Ceratonia siliqua* L.) populations: Morphological variability of pods and kernel. *Sci.Hort.* 121, 125–130.
- NAS, 1979. *Tropical Legumes: Resources for the Future*. National Academy of Sciences, Washington DC, USA, pp. 109–116.
- Owen R.W., Haubner R., Hull W.E., Erben G., Spiegelhalder B., Bartsch H., Haber B., 2003. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food Chem. Toxicol.* 41, 1727–1738.
- Petit, M.D., Pinilla, J.M., 1995. Production and purification of a sugar syrup from carob pods, *LWT-Food Sci. Technol.* 28, 145–152.
- Sandolo, C., Coviello, T., Matricardi, P., Alhaique, F., 2007. Characterization of polysaccharide hydrogels for modified drug delivery. *Eur. Biophys. J.* 36 (7), 693–700.
- Shawakfeh, K. and Ereifej, K. I., 2005. Pod Characteristics of two *Ceratonia siliqua* L. Varieties from Jordan. *Ital. J. Food Sci.* 17 (2):187–194.
- Sidina M.M., El Hansali M., Wahid N., Ouattmane A., Boulli A., Haddioui A., 2009. Fruit and seed diversity of domesticated carob (*Ceratonia siliqua* L.) in Morocco. *Sci.Hort.* 123, 110–116.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticul.*, 16, 144–158.

Thomson, P., 1971. The carob in California. California Rare Fruit Growers Yearbook 3, 61–102.

Winer, N., 1980. The potential of the carob (*Ceratonia siliqua* L.). Int.tree crop. J. 1, 15–26.

Zunft, H.J, Luder, W., Harde A., Haber, B., Graubaum, H.J., Gruenwald, J., 2001. Carob pulp preparation for treatment of hypercholesterolemia. Adv. Ther. 18, 1230–236.

Tous, J., Romero, A., Hermoso, J.F., Ninot, A., Plana, J., Batlle, I., 2009. Agronomic and commercial performance of four Spanish carob cultivars. HortTechnol. 19, 465–470.

Figure 1. Repartition map of selected Lebanese carob populations. Abbreviations indicate populations: (A1) Akkari 1; (A2) Akkari 2; (Ah) Ahmar; (Bal) Baladi; (Bar) Barri, (J1) Jnoubi1; (J2) Jnoubi2; (Kh) Khachabi; (SM) Sandali Makedissi.

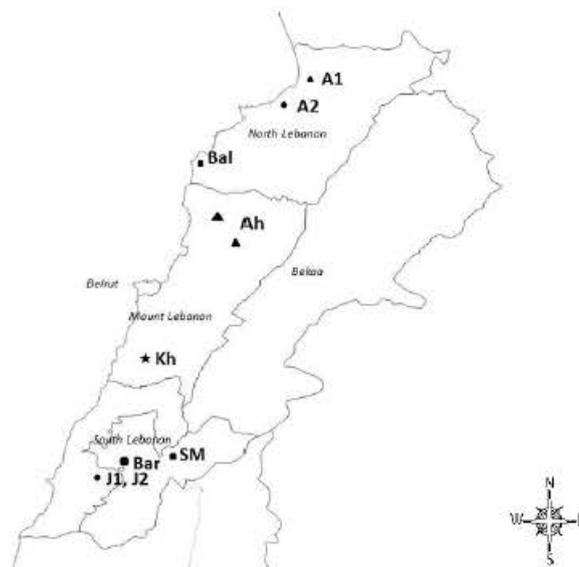


Figure 2. Pod size and seeds separation according to individual factor map (PC1 and PC2).

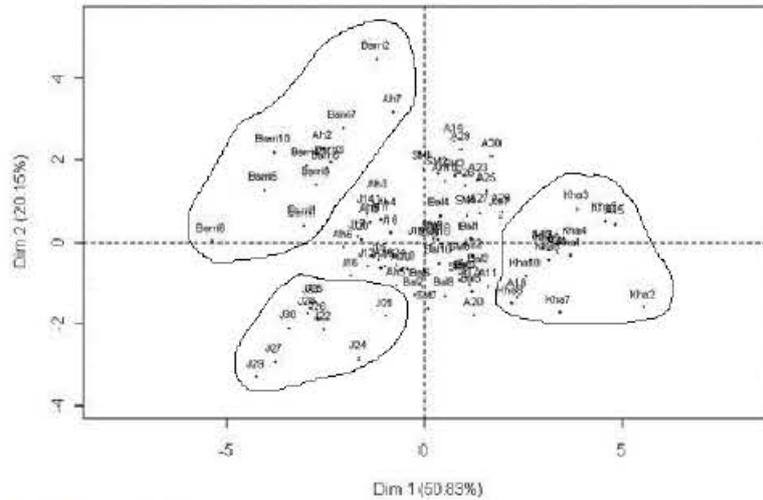


Figure 3. Hierarchical Ascendant Classification on morphological characters. Group 1 : A1, A2 and Bal ; Group 2 : J1, J2, AH and SM - Khachabi and Barri are ungrouped.

Dendrogram of agnes(x = scale(don[, 1:3]), method = "ward")

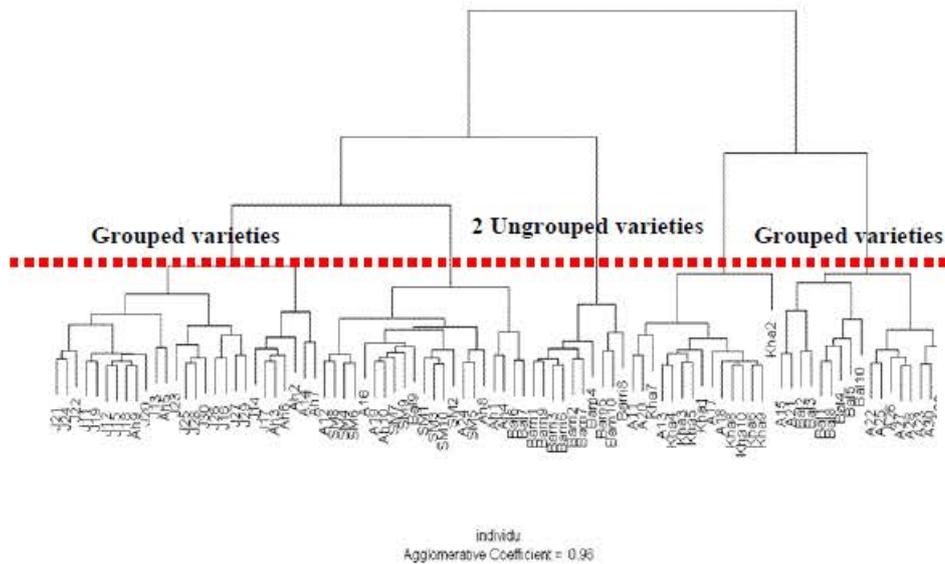


Figure 4.a. polyphenol content separation according to individual factor map (PC1 and PC2).

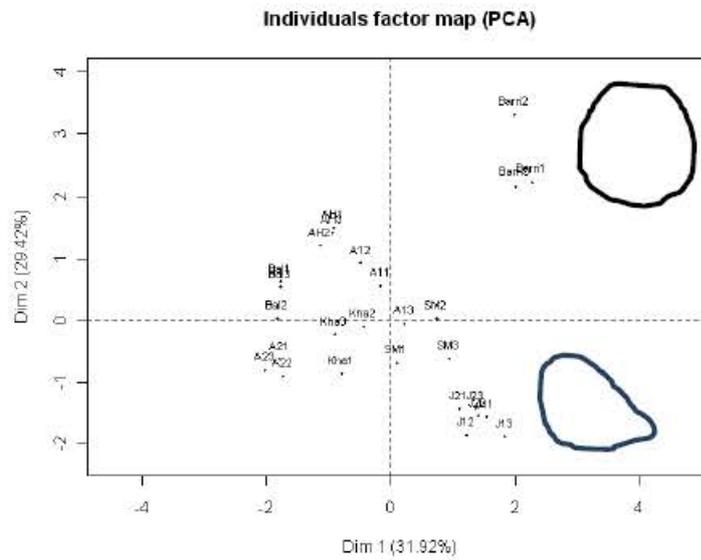


Figure 4.b

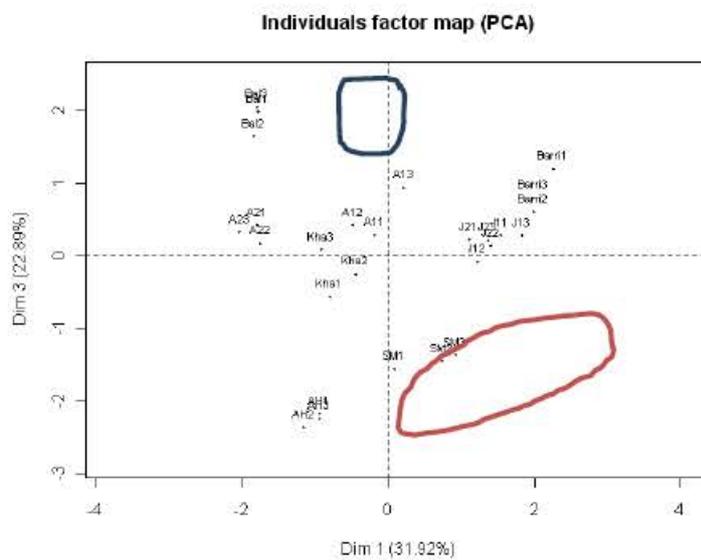


Figure 5. Hierarchical Ascendant Classification on chemical characters. Group 1: A1, A2, Bal, AH and Kh; Group 2 : J1, J2 and SM; ungrouped variety Barri.

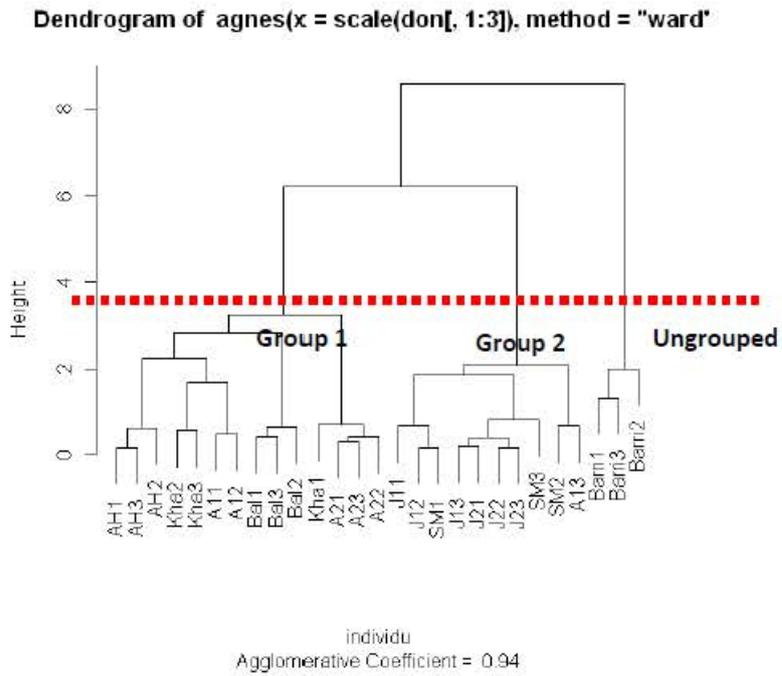


Table 1. GPS Locations of the analyzed Lebanese carob varieties.

| Variety | Elevation (feet) | Elevation (m) | Latitude N | | Longitude E | | Regions |
|-----------|------------------|---------------|------------|---------|-------------|---------|---------------------------|
| Akkari 11 | 600 | 182.88 | 34° | 30.841' | 36° | 01.948' | Akkar |
| Akkari 22 | 786 | 239.57 | 34° | 27.641' | 35° | 57.238' | Akkar |
| Ahmar | 188 | 57.30 | 34° | 17.259' | 35° | 40.256' | Batroune |
| Baladi | 663 | 202.082 | 34° | 16.693' | 35° | 40.315' | Selaata |
| Khachabi | 1350 | 411.48 | 33° | 39.065' | 35° | 28.789' | Bourjen |
| SM | 2147 | 654.41 | 33° | 22.906' | 35° | 35.943' | Marjayoun |
| Jnoubi 1 | 356 | 108.509 | 33° | 18.532' | 35° | 16.865' | Maaroub and Borj Rahal |
| Jnoubi 2 | 1574 | 479.76 | 33° | 15.014' | 35° | 25.247' | Maaroub and Borj Rahal |
| Barri | 1760 | 536.45 | 33° | 15.424' | 35° | 27.710' | Wadi El Hojeir |

° = Degree, ' = minutes

Table 2. Mean values of the Physical measurements of carob pods populations

| | A1 | A2 | Ah | Bal | Bar | J1 | J2 | SM | Kh |
|-------------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Pod length (cm) | 21.88±2.44 ^a | 22.82±2.42 ^a | 16.06±1.61 ^c | 19.14±1.41 ^b | 15.71±1.45 ^c | 14.66±0.86 ^c | 11.42±1.84 ^d | 18.91±1.78 ^b | 24.25±1.84 ^a |
| Pod width (cm) | 2.34±0.18 ^{bc} | 2.50±0.16 ^{ab} | 2.04±0.25 ^d | 2.74±0.27 ^a | 1.73±0.11 ^e | 2.02±0.12 ^d | 2.14±0.15 ^{cd} | 2.23±0.12 ^{bcd} | 2.49±0.16 ^{ab} |
| Pod thickness (cm) | 0.85±0.08 ^{ab} | 0.65±0.06 ^{de} | 0.71±0.10 ^{cde} | 0.60±0.11 ^e | 0.48±0.04 ^f | 0.80±0.07 ^{bc} | 0.76±0.06 ^{bcd} | 0.76±0.04 ^{bcd} | 0.92±0.11 ^a |
| Pod weight (g) | 27.70±7.05 ^b | 26.71±5.80 ^{bc} | 16.45±3.76 ^{de} | 27.14±4.57 ^b | 8.93±1.67 ^f | 17.72±2.08 ^{de} | 13.38±3.62 ^e | 20.91±3.02 ^{cd} | 36.85±3.97 ^a |
| Pod volume (cm ³) | 33.50±9.52 ^b | 26.60±4.62 ^c | 16.80±2.82 ^d | 29.1±2.92 ^{bc} | 9.95±1.91 ^e | 18.20±3.08 ^d | 14.22±3.43 ^{de} | 27.70±3.33 ^{bc} | 47.90±4.68 ^a |
| Specific gravity | 0.83±0.05 ^{cd} | 1±0.06 ^a | 0.97±0.10 ^{ab} | 0.93±0.10 ^{abc} | 0.90±0.03 ^{bc} | 0.98±0.10 ^{ab} | 0.94±0.08 ^{abc} | 0.76±0.11 ^d | 0.77±0.01 ^d |
| Size index | 9.43±1.26 ^a | 9.15±0.93 ^{ab} | 7.95±1.22 ^{bcd} | 7.03±0.62 ^d | 9.3±0.94 ^{ab} | 7.28±0.60 ^{cd} | 5.39±0.53 ^e | 8.51±0.95 ^{abc} | 9.75±0.84 ^a |
| No. seeds/pod | 12.40±2.5 ^{ab} | 13.90±2.28 ^a | 12.90±2.47 ^{ab} | 13.1±1.97 ^{ab} | 10.60±2.95 ^{bc} | 12.10±0.99 ^{ab} | 7.4±1.78 ^c | 13.10±1.97 ^{ab} | 14.10±2.08 ^a |
| Seeds weight | 2.73±0.65 ^{ab} | 3.02±0.47 ^a | 2.59±0.63 ^{ab} | 2.72±0.81 ^{ab} | 1.80±0.55 ^{cd} | 2.39±0.22 ^{bc} | 1.36±0.30 ^d | 2.72±0.81 ^{ab} | 3.10±0.43 ^{ab} |
| % seeds/pod | 9.85±2.82 ^{cd} | 11.30±4.72 ^{bcd} | 15.76±4.58 ^{ab} | 10.02±3.03 ^{cd} | 20.10±3.44 ^a | 13.47±1.24 ^{bc} | 10.14±1.84 ^{cd} | 13.00±4.81 ^{bc} | 8.41±1.16 ^d |

Values are the average of 10 pods, standard deviations are indicated below. Letters ^{abcde} show the significant differences (p<0.05)

Table 3. Mean values of the Physico-chemical measurements of carob pods populations

| | A1 | A2 | Ah | Bal | Bar | J1 | J2 | SM | Kh |
|-------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Eau | 14.37±0.05 ^c | 13.89±0.05 ^d | 17.05±0.05 ^a | 13.86±0.05 ^d | 14.40±0.05 ^c | 13.54±0.05 ^e | 13.58±0.05 ^e | 15.47±0.05 ^b | 14.37±0.05 ^c |
| Sucres | 78.38±6.54 ^{bc} | 74.50±0.75 ^c | 72.33±0.54 ^c | 81.17±0.87 ^{abc} | 81.98±6.29 ^{abc} | 85.33±3.02 ^{ab} | 89.46±1.04 ^a | 85.01±3.83 ^{ab} | 72.2±0.50 ^c |
| Protéines | 4.80±0.16 ^b | 4.81±0.14 ^b | 4.08±0.03 ^d | 5.62±0.15 ^a | 4.26±0.13 ^{cd} | 4.18±0.07 ^d | 3.92±0.08 ^{de} | 3.61±0.72 ^e | 4.62±0.23 ^{bc} |
| Fibres | 6.11±0.01 ^d | 5.28±0.03 ^e | 5.70±0.01 ^f | 4.80±0.02 ^h | 6.60±0.02 ^b | 7.74±0.01 ^a | 6.61±0.02 ^b | 5.87±0.03 ^e | 6.41±0.02 ^c |
| Cendres | 2.99±0.01 ^b | 2.46±0.06 ^d | 2.65±0.01 ^{cd} | 2.68±0.08 ^{bcd} | 3.56±0.16 ^a | 2.64±0.09 ^{cd} | 2.65±0.01 ^{cd} | 2.82±0.21 ^{bc} | 2.77±0.17 ^{bcd} |
| Polyphénols | 10.90±1.43 ^{bc} | 6.22±0.58 ^d | 13.26±1.50 ^b | 12.92±1.22 ^b | 21.87±2.36 ^a | 7.09±0.52 ^d | 6.61±0.38 ^{cd} | 6.73±0.10 ^d | 5.83±0.91 ^d |

Values are the average of 3 pods, standard deviations are indicated below. Letters ^{abcde} show the significant differences ($p < 0.05$)

Table 4. Pearson's correlations between morphological, chemical and geographical parameters

| | L | W | Th | Mp | Vol | SG | Si | Sn | Ms/p | Ps/p | S | Ppol | P | F | A | H2O | H | Lat | Long |
|-----|-----------|-----------|-----------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|------------------|-----------------|------------|------------|-----------------|------------|----------------|----------------|-------------|------------|
| L | 1.00 0 | 0.66 0 | 0.21 5 | 0.876* * | 0.856 ** | - 0.388 | 0.738 * | 0.813* * | 0.875* * | -0.450 | - 0.680 * | - 0.260 | 0.510 | - 0.442 | - 0.106 | 0.01 1 | - 0.07 2 | 0.866* * | 0.172 |
| W | | 1.00 0 | 0.18 3 | 0.827* * | 0.737 * | - 0.149 | - 0.002 | 0.517 | 0.630 | - 0.809* * | - 0.301 | - 0.476 | 0.705 * | - 0.702 * | - 0.529 | - 0.20 7 | - 0.150 | 0.481 | 0.323 |
| Th | | | 1.00 0 | 0.508 | 0.601 | - 0.472 | 0.114 | 0.161 | 0.282 | -0.632 | - 0.125 | - 0.643 | 0.203 | 0.379 | - 0.337 | 0.02 8 | - 0.08 6 | 0.588 | - 0.533 |
| Mp | | | | 1.000 | 0.970 ** | - 0.363 | 0.444 | 0.727* | 0.834* * | -0.778 | - 0.579 | - 0.529 | 0.562 | - 0.355 | - 0.400 | - 0.13 1 | - 0.18 9 | 0.852* * | 0.064 |
| Vol | | | | | 1.000 | - 0.571 | 0.481 | 0.669* | 0.776* | -0.738 | - 0.505 | - 0.512 | 0.420 | - 0.257 | - 0.261 | - 0.07 6 | - 0.01 4 | 0.895* * | - 0.048 |
| SG | | | | | | 1.000 | - 0.324 | -0.131 | -0.185 | 0.230 | - 0.090 | 0.152 | 0.201 | - 0.037 | - 0.378 | - 0.11 4 | - 0.66 4 | -0.532 | 0.334 |
| Si | | | | | | | 1.000 | 0.681* | 0.648 | 0.125 | - 0.645 | 0.094 | 0.122 | 0.066 | 0.309 | 0.14 7 | - 0.05 2 | 0.687* | - 0.085 |
| Sn | | | | | | | | 1.000 | 0.978* * | -0.238 | - | - | 0.391 | - | - | 0.29 | - | 0.594 | 0.333 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|-------|--------|-----------------|------------|------------|----------------|----------------|-----------|----------------|------------|-------|
| | | | | | | | | | * | | 0.789 * | 0.236 | | 0.409 | 0.299 | 0 | 0.33 5 | | |
| Ms/ p | | | | | | | | | 1.000 | -0.416 | - 0.769 * | - 0.368 | 0.426 | - 0.431 | - 0.382 | 0.21 6 | - 0.33 2 | 0.703* | 0.276 |
| Ps/p | | | | | | | | | 1.000 | 0.092 | 0.766 * | - 0.401 | 0.228 | 0.633 | 0.37 1 | 0.13 3 | -0.571 | 0.080 | |
| S | | | | | | | | | 1.000 | 0.015 | - 0.363 | 0.295 | 0.219 | - 0.42 0 | 0.53 4 | -0.573 | - 0.295 | | |
| Ppo l | | | | | | | | | | 1.000 | 0.134 | - 0.035 | 0.784 | 0.21 3 | - 0.03 4 | -0.470 | - 0.123 | | |
| P | | | | | | | | | | | 1.000 | - 0.543 | - 0.120 | - 0.37 2 | - 0.45 2 | 0.220 | 0.129 | | |
| F | | | | | | | | | | | | 1.000 | 0.239 | - 0.26 1 | 0.08 1 | -0.051 | - 0.629 | | |
| A | | | | | | | | | | | | | 1.000 | 0.03 4 | 0.44 1 | -0.133 | - 0.403 | | |
| H2 O | | | | | | | | | | | | | | 1.00 0 | - 0.10 7 | -0.059 | 0.211 | | |
| H | | | | | | | | | | | | | | | 1.00 0 | 0.020 | 0.044 | | |
| Lat | | | | | | | | | | | | | | | | | 1.000 | - 0.117 | |
| Lon g | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1.000 |

* significant differences at $p < 0.05$, ** significant differences at $p < 0.01$; L: Length, W: weight, Th: Thickness, Mp: mass of the pod, Vol: volume: SG: Specific Gravity, Si: Size index, Sn: Seed number, Ms/p: Masse seed /pod, Ps/p: percentage of seeds /pod, S: Sugar, Ppol: Polyphenol, F: Fiber, A: Ash, H2O: Humidity, H: Hight, Lat: Latitude, Long: Longitude.

3.3 Contribution de l'article

Les études morphologiques et chimiques ont permis de caractériser et de comprendre les corrélations entre les caractéristiques des gousses et des graines et les coordonnées géographiques des caroubiers.

Les analyses statistiques ont permis de classer les différents cultivars de caroubier libanais en 4 groupes séparés selon certains critères et selon leur localisation géographique (altitude). Ainsi, le groupe A1, A2, Bal et Ah, localisé dans le nord du Liban, est caractérisé par une grande taille et une forte teneur en sucre. Le deuxième groupe constitué par J1, J2, SM est moins intéressant en termes de propriétés nutritionnelles, il est caractérisé par des petites gousses et ces variétés sont localisées dans le sud du Liban.

Les deux variétés les plus intéressantes et qui se démarquent significativement des autres variétés sont Kh et Bar. Ces deux variétés pourront offrir une application potentielle pour l'industrie alimentaire. En effet, Kh possède la plus grande taille des gousses, un contenu élevé en graines et une teneur élevée en sucre, alors que, Bar du type sauvage a présenté des petites gousses mais un contenu élevé en graines, un taux élevé en sucre et une haute teneur en polyphénols.

Cette étude a apporté des informations sur les caractéristiques des cultivars Libanais et a offert une base de données pour les programmes visant à la plantation de nouveaux vergers de caroube avec des variétés plus performantes économiquement et écologiquement.

Chapitre 4

Les caractéristiques structurales et les propriétés rhéologiques de la gomme de caroube libanaise

Chapitre 4 - Etudes des caractéristiques structurales et des propriétés rhéologiques de la gomme de caroube libanaise

4.1 Introduction :

La gomme de caroube ou E410 est un galactomannane (polysaccharides hydrosolubles et neutres) largement utilisé dans des préparations de l'industrie alimentaire et non-alimentaire comme agent épaississant et gélifiants en raison de sa capacité à former des solutions visqueuses à des concentrations relativement faibles (**Richardson et Norton, 1988**). Ainsi, De nombreux produits industriels comprennent souvent dans leur formulation des polysaccharides pour obtenir les propriétés désirées pendant et après le traitement.

L'importance économique de la culture du caroubier vient principalement de l'utilisation industrielle de cette gomme de caroube extraite à partir de l'endosperme des graines de caroube (**Custódio et al., 2005**).

En générale, les galactomannanes sont constitués d'une chaîne principale de mannane sur laquelle sont greffées des ramifications d'unités de galactose. Ils se distinguent selon leur teneur en unités galactose exprimées par le rapport mannose sur galactose (M/G), selon la répartition des unités galactose le long de la chaîne de mannane et aussi dans selon la masse molaire de ces polymères (Fox, 1992 ; Azero et al., 2002). Cette différence dans la « microstructure » influencerait fortement les interactions moléculaires (da Silva et al., 1990 ; Mao et al., 2006) et les propriétés rhéologiques des solutions de galactomannanes. Ces propriétés moléculaires peuvent changer au sein d'une même variété en fonction de la région de culture ou des conditions climatiques et du sol (Lazaridou et al., 2000).

Les valeurs de masse molaire des galactomannanes (de la LBG en particulier) sont en général relativement élevées en raison des associations intermoléculaires qui persistent souvent, même à de faibles concentrations ($C = 0,1 \%$) (Richardson et al., 1998).

Au Liban, les caroubiers sont abondants et répartis le long des basses collines côtières. Les gousses de caroube Libanais sont principalement utilisées pour la préparation de Dibs, une mélasse locale consommée par la population libanaise, tandis que les graines sont souvent jetées sans aucune valorisation. De plus, malgré le potentiel économique que pourrait représenter cette plante pour le pays, aucune étude, à notre connaissance, n'a été faite jusqu'à présent pour caractériser les propriétés rhéologiques et structurales des variétés libanaises.

Ainsi, le but partie du travail était : i) étudier les propriétés rhéologiques et déterminer les caractéristiques structurales de LBG de 9 populations de caroube libanais ; et ii) faire sortir les variables les plus distinctives séparant les différentes gommages par analyse statistique (PCR).

4.2 Article 2: The structural characteristics and rheological properties of Lebanese Locust Bean Gum



The structural characteristics and rheological properties of Lebanese locust bean gum



Amira Haddarah^{a,b,c}, Ali Bassal^{b,c}, Ali Ismail^{b,c}, Clair Gaiani^a, Irina Ioannou^a, Celine Charbonnel^a, Tayssir Hamieh^{b,c,*}, Mohamed Ghoul^a

^a Université de Lorraine, LIBio (Laboratoire d'Ingénierie des biomolécules), 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

^b Université Libanaise, Faculté d'Agronomie, Dekwaneh, Lebanon

^c Université Libanaise, Faculté des Sciences, Laboratoire MCEMA, EDST, Hadath, Lebanon

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 January 2013

Received in revised form 5 July 2013

Accepted 19 July 2013

Available online 31 July 2013

Keywords:

Carob

Locust bean gum

Polysaccharides

Galactomannan

Rheology

Viscoelastic behavior

ABSTRACT

To characterize and study the rheological behavior of Lebanese locust bean gum (LBG), nine Lebanese carob varieties, including a wild type, were randomly collected from various sites and different altitudes of the Lebanese territories. After an extraction and purification (p LBG) step, the obtained locust bean gum was submitted to several physico-chemicals (size distribution, charge and macromolecular weight) and rheological characterization in a wide range of temperature (25–55 °C). The obtained results showed that the gum yield (40–60%), the charge (–2.67 to –12.95), the size (56.37–92.23 nm), the weight-average molecular weight (535–826 kDa) and intrinsic viscosity $[\eta]$ (7.25–10.76 dl/g) vary significantly depending upon the variety and the geographical localization. However, principal component analysis (PCA) indicated that the size and molecular weight are the most distinctive variables. The rheological investigation indicated that p LBG exhibit Newtonian flow behavior at a concentration less or equal to 0.1% (w/v) and shear-thinning behavior for higher concentrations (0.5–2%). The effect of temperature on flow behavior was well fitted by Ostwald–de Waele model (power law model) and the flow behavior index (n) was less than 1 for all studied varieties; which means that LBGs had a pseudo-plastic flow. The all new knowledge obtained in this study on the Lebanese locust bean gum will open to these interesting macromolecules new niches in food and cosmetics applications.

Crown Copyright © 2013 Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The evergreen carob (*Ceratonia siliqua*), a legume tree relatively common in the Mediterranean region, is grown today in many mild and semi-arid regions (Batlle and Tous, 1997), especially at low altitudes [0–300, sometimes 500, rarely 800 m]. Furthermore, certain in some countries, such as Lebanon, there are regional variations in the naming of this tree. Internationally, carob and locust bean are the best known names.

The economic importance of the crop comes from the industrial use of locust bean gum obtained from the seeds (Custódio et al., 2005). Besides economic importance, these species have great ecological significance in the reforestation of arid degraded areas and for limiting spread of fires (Barracosa et al., 2007).

Locust bean gum (LBG) or E410 is widely used as a thickener, gel strengthening in the food industry due to its ability to form viscous solutions (Richardson and Norton, 1998) at relatively low concentrations, which are only slightly affected by pH, added ions, and heat processing (Sittikijyothin et al., 2005). For this reason, the gum is used as a substitute for pectin and agar. This galactomannan (GM) is also used widely in pharmaceutical and cosmetic industries as a stabilizer and emulsifier, due to its high water binding capacity, emulsification properties and ability to form synergistic interactions with other components, such as carbohydrates or proteins, thereby increasing its viscosity (Wu et al., 2012; Rizzo et al., 2004; Sand, 1982). GM is a bland, notably white in color, nearly odorless powder and an excellent binder in cream and other soft cheeses. In ice cream, GM improves texture, adds body to the mixture, prevents lactose crystal formation (sandy) and

Abbreviations: A1, Akkari 1; A2, Akkari 2; Ah, Ahmar; Bal, Baladi; Bar, Barri; dLBG, crude locust bean gum; Da, Dalton; G' , elastic modulus; G'' , viscous modulus; GC, commercial gum; GM, galactomannan; M/G, mannose to galactose ratio; J1, Jnoubi1; J2, Jnoubi2; K, consistency index or apparent viscosity; kDa, kilo Dalton; Kh, khachabi; Mw, molecular weight; n, flow behavior index; pLBG, purified locust bean gum; SM, Sandali Makkissi; η^* , complex viscosity; $[\eta]$, intrinsic viscosity; η , viscosity.

* Corresponding author at: Université Libanaise, Faculté des Sciences, Laboratoire MCEMA, EDST, Hadath, Lebanon.

E-mail address: tayssir.hamieh@ul.edu.lb (T. Hamieh).

reduces ice cream meltdown (Samil Kk, 2007). Moreover, to extend the shelf life of mandarins, LBG-based edible coatings were developed and optimized for postharvest storage (Rojas-Argudoa et al., 2009).

Lower-grade galactomannan (cLBG) sources are frequently used in canned products. These sources differ substantially from higher quality gum (pLBG), in composition as a result of high levels of non-galactomannan material (Samil Kk, 2007). For instance, the galactomannan (GM) in LBG is partially soluble in water, so the lowest viscoelastic properties correspond to the system prepared at room temperature; at this temperature, LBG is poorly hydrated. In contrast, when LBG is dissolved in water for at least 80 °C, G' and G'' are much higher (i.e., the viscous modulus G'' is approximately 25 times higher (Zrate-Ramírez et al., 2010), and therefore full solubility and delayed viscosification require heating to at least 80 °C, and maximum viscosity is obtained at 95 °C (Pollard et al., 2007; Luruea-Martínez et al., 2004).

The carob galactomannan polysaccharides do not lead to gel formation and it is used generally as a thickening to obtain highly viscous aqueous solutions (Lazaridou et al., 2000). The rheological characterization of LBG is scarcely studied. The main model used to describe the rheological behavior of LBG are Ostwald–de Waele model (Dakia, 2008; Wu et al., 2009), cross model (Lopes Da Silva et al., 1992; Bourbon et al., 2010), carreau model (Sittikijyothin et al., 2005; Pollard et al., 2008) and the cascade model (Richardson et al., 1999). However, the Ostwald–de Waele model (power law model) is the most used in the case of the polymer studies.

All GM have the similar general structure that consists of a main chain of mannane on which there is a branching unit of galactose. They differ in their galactose content unit expressed by the mannose to galactose ratio (M/G), in the distribution of galactose units along the mannane chain and also in their molecular weight (Fox, 1992; Azero and Andrade (2002)), which results in differing solubilities (LBG 4:1, tara gum TG 3:1, guar gum (GG) 2:1 and fenugrec Gum (FG) 1:1) (Fernandes et al., 1992; Dea and Morrison, 1975; Batlle and Tous, 1997). Pollard et al. (2007), Lopes da Silva et al. (1996) and Azero and Andrade (2002) reported that the LBG galactomannan has a non-regular, non-statistically random distribution of D-galactose. It has random coil structure composed of linear 1,4- β -linked D-mannan backbone to which single D-galactosyl units are attached to the C6 of some of the D-mannosyl residues, thus, water solubility increases with increasing content of galactose, presumably because the galactose substituents inhibit solid-state packing of the mannan chains and contribute to conformational entropy in the solution state by freedom of rotation about the (1 \rightarrow 6) linkages (Silveira and Bresolin, 2011).

In Lebanon, carob trees are abundant and distributed along the coastal lower hills. Lebanese carob pods are mainly used for the preparation of Dibs, a local molasses consumed by the Lebanese population, while the seeds are often thrown without any valorization. Recent studies indicated that the composition (carbohydrates, proteins, phenolic compounds, minerals, etc.) of different varieties of Lebanon carob varies considerably depending upon the variety and localization (Amira Haddarah et al., 2013); However, in our knowledge, no study has been done till now to characterize the rheological properties of the locust bean carob of the Lebanese varieties, despite the economic potential that could represent this plant for the country. Thus, the aim of the present work was to characterize the LBG of 9 Lebanese carob populations; study the viscometric properties as a function of temperature; and quantify the viscoelastic behavior since hydrocolloids promote specific rheological and textural properties when used as ingredients in the food industry.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Nine carob bean varieties (A1, A2, Ah, Bal, Kh, J1, J2, SM and Bar) Lebanon were collected in August–September in 2009 from several regions of Lebanon (from north to south) where they grow naturally along the Lebanese coast at an altitude of 0–800 m. Selected regions were Akkar (Akkari 1 and 2), Selaata (Baladi), Batroune (Ahmar), Bourjen (Khachabi), Blat (Sandali or Makdessi), Maaroub and Borj Rahal (Jnoubi 1 and 2), and Wadi Hojeir (wild variety). The samples were kept at 4 °C. The pods were crushed, and the seeds were manually separated.

2.2. Samples preparation

To obtain gum with high qualities and whitish color, an acid treatment was applied for decortication, which consisted of macerating 100 g of seeds in diluted sulfuric acid H₂SO₄/H₂O [60/40 ml] for 60 min at 60 °C in a preheated water bath while stirring periodically (Dakia et al., 2007, 2008). Extensive washing and rubbing were performed through a 2-mm metallic sieve to eliminate the charred hull. Next, the dehulled seeds were soaked in distilled water overnight to swell to make possible manual separation of germs from endosperms. After that, they were washed and dried in an oven at 105 °C for 4–5 h. Finally, endosperms were then milled with a laboratory miller (IKA-WERKE, MF10, 0.5 mm, Staufen Germany) to obtain the powdered, unpurified locust bean gum, or crude LBG (cLBG).

The quality of powdered, unpurified LBG depends on the milling process that sometimes darkens the powder, due to the high temperatures encountered during the process. This process determines the size and color of the end product. The color and particle size are also an indication of impurities (Samil Kk, 2007).

2.3. Preparation of solutions

Crude powdered endosperm or crude LBG was washed with ethanol and acetone (to control the microbiological load (Kawamura, 2008) on a sintered no. 3. The precipitation was initiated in an aqueous solution at a concentration of 1.3 g/100 ml (Bouzouita et al., 2007). The required amount of crude endosperm was gradually added to the distilled water, stirred gently for 2 h at room temperature, and was kept overnight at 4 °C to swell slowly. Afterwards, the solutions were heated to 80 °C in a water bath for 30 min with continuous agitation. The resulting solution was allowed to cool and centrifuged for 1 h at 10,000 rpm (20 °C) to remove the insoluble matter (Mannion et al., 1992). The supernatant or crude locust bean gum solution containing the solubilized galactomannan was collected for the purification process.

2.4. Purification of gum

The solubilized galactomannan was purified by precipitation with isopropanol. This process eliminates all unacceptable flavors of crude LBG and provides a clear and more stable solution, due to elimination of impurities and endogenous enzymes (Dea and Morrison, 1975). The galactomannan was precipitated from the crude LBG solution by pouring an excess of two volumes of isopropanol and allowing the mixture to stand for 30 min. The white fibrous matter was collected and filtered through a screen (53 μ m) and subsequently washed twice with isopropanol and acetone. After a 48-h freeze-drying step, the obtained friable solid was crushed into a fine powder (purified locust bean gum). Bouzouita et al. (2007) reported that purification of LBG with isopropanol

Table 1
Yield of purified LBG different varieties.

| Variety | Mass of endosperm powder (g) | Mass of pLBG (g) | pLBG yield in endosperm powder (%) |
|---------|------------------------------|------------------|------------------------------------|
| J1 | 27.79 | 11.13 | 40.03 |
| A1 | 35.50 | 17.96 | 50.59 |
| Ah | 36.69 | 19.26 | 52.50 |
| A2 | 31.96 | 16.97 | 53.10 |
| Kh | 27.78 | 14.85 | 53.45 |
| Bar | 28.04 | 16.43 | 58.61 |
| SM | 33.80 | 19.93 | 58.98 |
| Bal | 31.56 | 18.72 | 59.33 |
| J2 | 31.77 | 19.15 | 60.26 |

eliminates practically all fat and fiber and reduces ash and protein content.

2.5. Size and zeta potential

A Zetasizer with a plastic tub (U shaped) at 20 °C (nanoseries Nano-ZS Malvern, United Kingdom) was used to measure the mean particle size and the potential zeta for different purified galactomannan polymers. Mean particle diameters were reported as “Z-average” diameters, which were calculated from the signal intensity versus particle diameter. Concentration of 2%, 1%, 0.5% and 0.1% g/l were investigated, and 0.1% was the ideal concentration to obtain suitable signal for size measurements. Then, 0.02 g of powder were poured into 20 ml of ultra-purified water, heated at 85 °C for 30 min in a water bath under mechanical stirring at 383 rpm (Heidolph RZR 2021, Germany) and centrifuged (10,000 rpm, 20 °C, 40 min, Eppendorf 5804R centrifuge, Hamburg, Germany) and maintained for 2 days at 4 °C for optimal stabilization. Sonication for approximately 10 min was necessary to remove undesirable air microbubbles (Sonics 1510, BRANSON, ultrasonic cleaners, France), and the solution was later micro-filtered through a 0.45-µm filter prior to analysis.

2.6. Determination of macromolecular weight by size exclusion chromatography (SEC/MALLS)

Polysaccharides are extensively used to modify the textural properties of fluid and semi-solid foods. For a given polysaccharide, the texture will be greatly affected by its molecular weight (Harte and Venegas, 2010). Solutions of purified locust bean gum were prepared at 0.1% w/v or 1 g/l (0.02 g in 20 ml deionized water), heated at 85 °C for 30 min in a water bath under mechanical stirring (Heidolph RZR 2021.383 rpm, Germany) and later centrifuged (10,000 rpm, 20 °C, 40 min, Eppendorf 5804R centrifuge, Hamburg, Germany). Microfiltration through a 0.45-µm filter is necessary prior to injection onto the column and final polymer concentration determination (Dakia et al., 2008).

The weight-average molecular weight (Mw) and intrinsic viscosity [η] of carob gums were determined using Size Exclusion Chromatography (Viscotek, Malvern, United Kingdom) equipped with a VE 75010 GPC Degasser – Viscotek, pump VE 1122 solvent delivery system (Viscotek, VE 5200 GPC Autosampler – Viscotek, United Kingdom) and 4 detectors: triple detectors (TD 305 triple detector array – Viscotek, United Kingdom), light scattering detector, refractometer and viscometer. The column and detectors were set at 35 °C, and the sample parameter dn/dc (mg/l) was set at 0.1330 with a flow rate of 0.7 ml/min. The mobile phase was 0.05 M NaNO₃, 0.05% NaN₃ served as conservator and the injection volume was 100 µl.

2.7. Rheological properties

2.7.1. Solution preparation

solutions of 1% LBG were prepared immediately before rheological measurements by adding 0.2 g of purified LBG to 20 ml distilled water, heating the mixture in a reactor (100 ml) connected to a water bath for 30 min at 85 °C stirred under mechanical force (Heidolph RZR 2021.383 rpm, Germany) and cooling the mixture at room temperature (Bouzouita et al., 2007; Dakia et al., 2008).

2.7.2. Rheological parameters for viscosity

Rheological properties were performed on a rotational Rheometer (Kinexus, Malvern instrument, Orsay, France) on which cone-and-plane geometry was applied (sensor system CP4/40 SC0075SS, 0.15 mm gap). The program for viscosimetry analysis was set as follows: shear rate ramps 1–1000 s⁻¹; ramp time to 10 min; 12 samples per decade; and each sample (1.16 ml) was measured separately at 25, 35, 45 and 55 °C (samples were changed and geometry were cleaned at each temperature) to obtain curve viscosity versus shear rate ramp. The range of the studied temperature was chosen to be enough large but without provoking evaporation of solution. In fact, for set point of temperature above 55 °C a slight evaporation was observed. According to literature, power-law model (Ostwald de Waele) is the most frequently equation used to fit well water soluble polymers to a more or less acceptable degree (Higiro et al., 2007; Dakia et al., 2008), so this model was used to fit the flow curves and analyze the experimental data (the software works with rheometer). This model is Newtonian, with an added exponent on the shear rate term (Eq. (1)):

$$\eta = K\gamma^n \tag{1}$$

where η is the apparent viscosity (Pa s), γ the shear rate (s⁻¹), K the consistency index (Pa sⁿ), and n the flow behavior index (dimensionless).

Power-law fluids can be subdivided into three different types of fluids based on the value of their flow behavior index: n < 1 pseudoplastic fluid or shear-thinning fluids, n = 1 Newtonian fluid (where apparent viscosity is constant regardless of imposed stress) and n > 1 dilatant or shear thickening fluids.

2.7.3. Viscoelastic behavior

The viscoelastic properties of a material are measured in an oscillation test. Oscillation is a technique by which sinusoidal stress or strain is applied, which continuously excites the sample and induces a response that follows a sine wave. If the sample is overstrained, the elastic structure will be destroyed. Oscillation

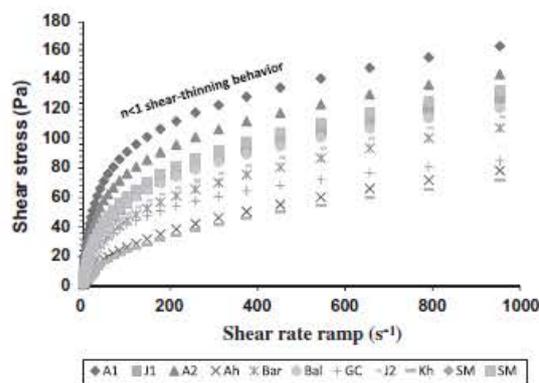


Fig. 1a. Shear stress flow behavior for different LBG solutions versus shear rate ramps (1% w/v, 25 °C).

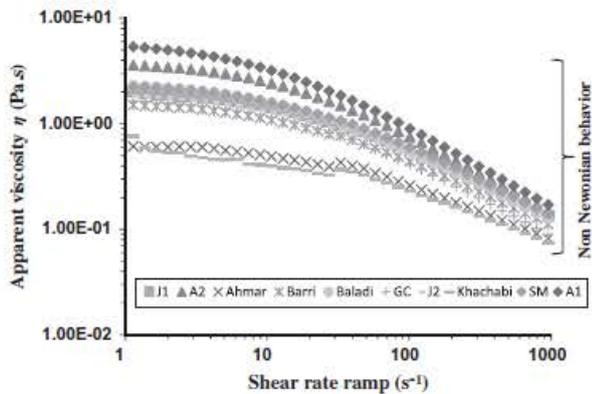


Fig. 1b. Apparent viscosity flow behavior for different LBG solutions versus shear rate ramps (1% w/v, 25 °C).

should be performed in the LVR (where the length of LVR Linear Viscoelastic Region is a measure of the stability of a material versus a stress or strain). Conversely, oscillation may be used to determine the strength and stability of a material and gives a clear indication of the behavior of the sample, whether viscous or elastically dominated, over a given frequency range. Viscoelastic properties (oscillatory dynamic test) for gum solutions (1% w/v) were carried out at 25 °C on Kinexus Malvern Rheometer with the same geometry applied for the rheology (sensor system CP4/40SC0075SS, 0.15 mm gap, cone to plate geometry). The oscillation curves presenting the complex modulus, elastic modulus G' , viscous modulus G'' and complex viscosity (η^*) versus frequency (Hz) were obtained with frequency sweep shear stress-control (rheometer software) with a frequency ranging from 0.01 to 1 Hz, 10 samples per decade and a shear stress of 1 Pa (Dakia et al., 2008).

3. Results and discussion

3.1. Appearance and productivity of purified locust bean gum

In the acidic pre-treatment of the kernels, the skin was burnt and the carbonized husk was easily eliminated by washing seeds through a 2-mm metallic sieve. At the joint of the two endosperms (teguments), a thin skin layer around the dehulled seed was more resistant to the acidic attack and thus contaminated the endosperm flours during the milling operation. Therefore, the color and the particle size indicate the presence of impurities in crude LBG.

In comparison to cLBG, pLBG samples are lighter in color (white to off-white) and texture (fluffy) and smaller in particle size (flour-like). These samples can also vary from one variety to another. Purification by isopropanol precipitation removes particulates from purified LBG samples (Samir Kók, 2007). Therefore, the commercial LBG used in this study was found to contain large amounts of insoluble material that remained after heating, whereas all purified LBG of different varieties were fully soluble. The separation of the seed components by boiling water pre-treatment provided a higher yield of yellowish endosperm (51–61% w/w), whereas acid dehulling pretreatment yielded a white to off-white gum yield (37–48% w/w) (Dakia, 2008).

Purified LBG for the nine varieties showed high yield percentages up to 59% (Table 1) in acid pre-treatment. These figures were determined as the percentage of purified LBG present in endosperm powder. Compared to the 43% reported by Dakia et al., 2008 and the 42–46% by Herald (1986) and Neukom (1988) for the same method of dehulling, almost all purified LBG for the nine Lebanese varieties demonstrated the highest percentage (50–60%). This difference in yield could be explained by the fact that the extraction of locust bean gum from whole seed depends on the method, the origin and the culture conditions of the carob tree (Bargallo et al., 1997; Lazaridou et al., 2000). In fact, after acid pre-treatment, dehulled kernels were immersed in distilled water

Table 2
Rheological parameter of viscosity measured at 25 °C.

| Variety | A1 | A2 | Bal | SM | J1 | J2 | GC | Bar | Ah | Kh |
|---|--------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|
| Dynamic viscosity (Pa s) 1 s ⁻¹ | 5.34 | 3.54 | 2.29 | 2.11 | 2.01 | 1.84 | 1.59 | 1.50 | 0.61 | 1.40 |
| Dynamic viscosity (Pa s) 10 s ⁻¹ | 3.19 | 2.42 | 1.57 | 1.50 | 1.44 | 1.27 | 1.12 | 1.08 | 0.49 | 0.64 |
| Dynamic viscosity (Pa s) 100 s ⁻¹ | 0.90 | 0.75 | 0.56 | 0.57 | 0.56 | 0.48 | 0.40 | 0.44 | 0.26 | 0.31 |
| Dynamic viscosity (Pa s) 1000 s ⁻¹ | 0.17 | 0.15 | 0.13 | 0.13 | 0.13 | 0.12 | 0.90 | 0.11 | 0.08 | 0.098 |
| K (consistency index) (Pa s ⁿ) | 9.25 | 6.27 | 3.76 | 3.43 | 3.17 | 2.96 | 2.63 | 2.36 | 0.90 | 1.52 |
| n (Flow behavior index) | 0.47 | 0.51 | 0.56 | 0.58 | 0.59 | 0.58 | 0.56 | 0.61 | 0.70 | 0.63 |
| r ² | 0.97 | 0.98 | 0.98 | 0.98 | 0.98 | 0.99 | 0.98 | 0.99 | 0.99 | 0.99 |
| Chi square | 3.038* | 2.32* | 1.45* | 1.55* | 1.58* | 1.19* | 7.20** | 1.02* | 4.62** | 5.57** |

* =10⁵

** =10⁴.

Table 3
Rheological parameter of viscosity measured at 35 °C.

| Variety | A1 | A2 | Bal | SM | J1 | J2 | GC | Bar | Ah | Kh |
|---|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|
| Dynamic viscosity (Pa s) 1 s ⁻¹ | 3.83 | 2.39 | 1.61 | 1.43 | 0.91 | 1.31 | 1.19 | 1.24 | 0.48 | 1.17 |
| Dynamic viscosity (Pa s) 10 s ⁻¹ | 2.60 | 1.77 | 1.24 | 1.10 | 0.79 | 0.98 | 0.90 | 0.91 | 0.40 | 0.35 |
| Dynamic viscosity (Pa s) 100 s ⁻¹ | 0.81 | 0.64 | 0.50 | 0.48 | 0.39 | 0.43 | 0.36 | 0.41 | 0.23 | 0.21 |
| Dynamic viscosity (Pa s) 1000 s ⁻¹ | 0.16 | 0.14 | 0.12 | 0.12 | 0.11 | 0.11 | 0.09 | 0.11 | 0.08 | 0.07 |
| K (consistency index) (Pa s ⁿ) | 6.69 | 4.06 | 2.64 | 2.27 | 1.50 | 2.02 | 1.92 | 1.88 | 0.70 | 0.91 |
| n (Flow behavior index) | 0.51 | 0.57 | 0.61 | 0.63 | 0.68 | 0.63 | 0.61 | 0.64 | 0.73 | 0.66 |
| r ² | 0.98 | 0.98 | 0.98 | 0.99 | 0.99 | 0.99 | 0.98 | 0.99 | 0.99 | 1.00 |
| Chi square | 2.75* | 1.89* | 1.32* | 1.25* | 9.69** | 1.04* | 6.56** | 9.50* | 4.05** | 0.66** |

* =10⁵

** =10⁴.

Table 4
Rheological parameter of viscosity measured at 45 °C.

| Variety | A1 | A2 | Bal | SM | J1 | J2 | GC | Bar | Ah | Kh |
|---|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Dynamic viscosity (Pa s) 1 s ⁻¹ | 2.69 | 2.57 | 1.54 | 1.08 | 1.52 | 0.89 | 0.79 | 0.76 | 0.47 | 0.76 |
| Dynamic viscosity (Pa s) 10 s ⁻¹ | 2.01 | 1.50 | 1.15 | 0.96 | 0.76 | 0.76 | 0.67 | 0.68 | 0.38 | 0.40 |
| Dynamic viscosity (Pa s) 100 s ⁻¹ | 0.71 | 0.58 | 0.18 | 0.44 | 0.39 | 0.36 | 0.32 | 0.34 | 0.21 | 0.20 |
| Dynamic viscosity (Pa s) 1000 s ⁻¹ | 0.15 | 0.13 | 0.12 | 0.12 | 0.11 | 0.11 | 0.08 | 0.10 | 0.07 | 0.68 |
| K (consistency index) (Pa s ⁿ) | 4.65 | 3.79 | 2.40 | 1.77 | 1.89 | 1.39 | 1.27 | 1.18 | 0.67 | 0.85 |
| n (Flow behavior index) | 0.56 | 0.56 | 0.62 | 0.66 | 0.60 | 0.68 | 0.66 | 0.70 | 0.72 | 0.67 |
| r ² | 0.98 | 0.99 | 0.99 | 0.99 | 1.00 | 0.99 | 0.99 | 0.99 | 0.99 | 1.00 |
| Chi square | 2.32* | 1.55* | 1.29* | 1.17* | 6.07** | 8.77** | 5.84** | 8.03** | 3.18** | 2.60** |

* =10⁵
** =10⁴.

Table 5
Rheological parameter of viscosity measured at 55 °C.

| Variety | A1 | A2 | Bal | SM | J1 | J2 | GC | Bar | Ah | Kh |
|---|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Dynamic viscosity (Pa s) 1 s ⁻¹ | 2.64 | 1.50 | 2.18 | 0.84 | 1.16 | 2.22 | 0.80 | 1.98 | 0.45 | 0.25 |
| Dynamic viscosity (Pa s) 10 s ⁻¹ | 1.85 | 1.20 | 0.97 | 0.78 | 0.61 | 0.68 | 0.60 | 0.57 | 0.30 | 0.22 |
| Dynamic viscosity (Pa s) 100 s ⁻¹ | 0.69 | 0.53 | 0.42 | 0.39 | 0.32 | 0.33 | 0.29 | 0.30 | 0.27 | 0.16 |
| Dynamic viscosity (Pa s) 1000 s ⁻¹ | 0.16 | 0.13 | 0.12 | 0.12 | 0.11 | 0.10 | 0.08 | 0.09 | 0.06 | 0.068 |
| K (consistency index) (Pa s ⁿ) | 4.39 | 2.57 | 2.34 | 1.48 | 1.46 | 1.05 | 1.27 | 1.01 | 0.57 | 0.34 |
| n (Flow behavior index) | 0.57 | 0.63 | 0.58 | 0.68 | 0.65 | 0.58 | 0.64 | 0.59 | 0.64 | 0.81 |
| r ² | 0.99 | 0.99 | 1.00 | 0.99 | 1.00 | 0.99 | 0.99 | 1.00 | 1.00 | 0.99 |
| Chi square | 2.28* | 1.55* | 8.77** | 9.81** | 6.44** | 5.48** | 4.59** | 4.71** | 4.05** | 2.60** |

* =10⁵
** =10⁴.

overnight; teguments swelled, germs were released at the joint of the 2 endosperms and were manually separated. On the other hand, Dakia (2008), Herald (1986) and Neukon (1988) milled the entire dehulled seed (endosperm and germ), which may have increased the possibility of impurities (germ fractions) in the crude endosperm and affected the purification of galactomannans, considering that germ is especially rich in protein.

3.2. Rheological properties

Viscosity profiles for all gums, including a commercial one, were investigated at different temperatures to determine their flow behavior and the influence of temperature on their apparent viscosity. Commercial gum was selected to compare to Lebanese LBG. The plot of the shear stress against shear rate (Fig. 1a) indicated that the flow behavior of the investigated LBGs at a concentration of 1% and a stress starting at 1 s⁻¹ can be described by a non-Newtonian profile characterized by an index less than 1 (thinning fluid). Thus, the rheological parameters for viscosity were studied, and shear thinning region of the flow curves were fitted to power law model (Fig. 1b) to determine the extent of deviation of each flow curve from Newtonian behavior. The results (Fig. 1b) indicated that all studied LBGs solutions (1% w/v) seemed to have a plateau of stability that preceded the lowest shear rate ramp (1 s⁻¹) and as the stress increased, viscosities decreased accordingly. Similar observation was reported by Ostwald (1924 and 1925) and more recently by Wu et al. (2009) who indicated that GMs exhibit Newtonian flow behavior at a concentration of 0.1% (w/v) and shear-thinning region for higher concentrations (0.5–2%). This trend could be explained by the fact that because this GM has a coil structure, the disruption of molecular entanglements by shearing was balanced by the reformation of new ones at lower shear rates. This process was reversible (Fox, 1992), meaning that viscosity was kept constant, but at higher shear rates, the disruption of the entanglements dominated the reformation of new ones.

This reorganization of the molecules results in a decrease in viscosity (Mao and Chen, 2006; Wu et al., 2009; Sittikijyothin et al., 2005).

Figs. 1a and 1b also indicate that all flow curves had the same flow behavior, but the varieties exhibited shifting viscosity. This behavior could be related to the variety, M/G ratio or difference in molecular weight. It was reported that a solution's viscosity mainly depends on its molar mass (Bourbon et al., 2010).

Among all gums studied, A1 and A2 were the most viscous, followed by other LBG varieties, for which the commercial gum showed poor rheology (mixture of many non-purified seeds gum) compared with A1 and A2, and Ahmar and Khachabi were the worst. Thus, the Lebanese varieties could compete with commercial gum in the food industry.

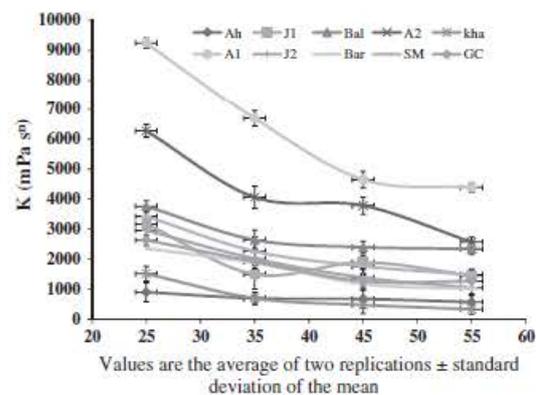


Fig. 2. Consistency index behaviors for one commercial and LBGs at different temperatures.

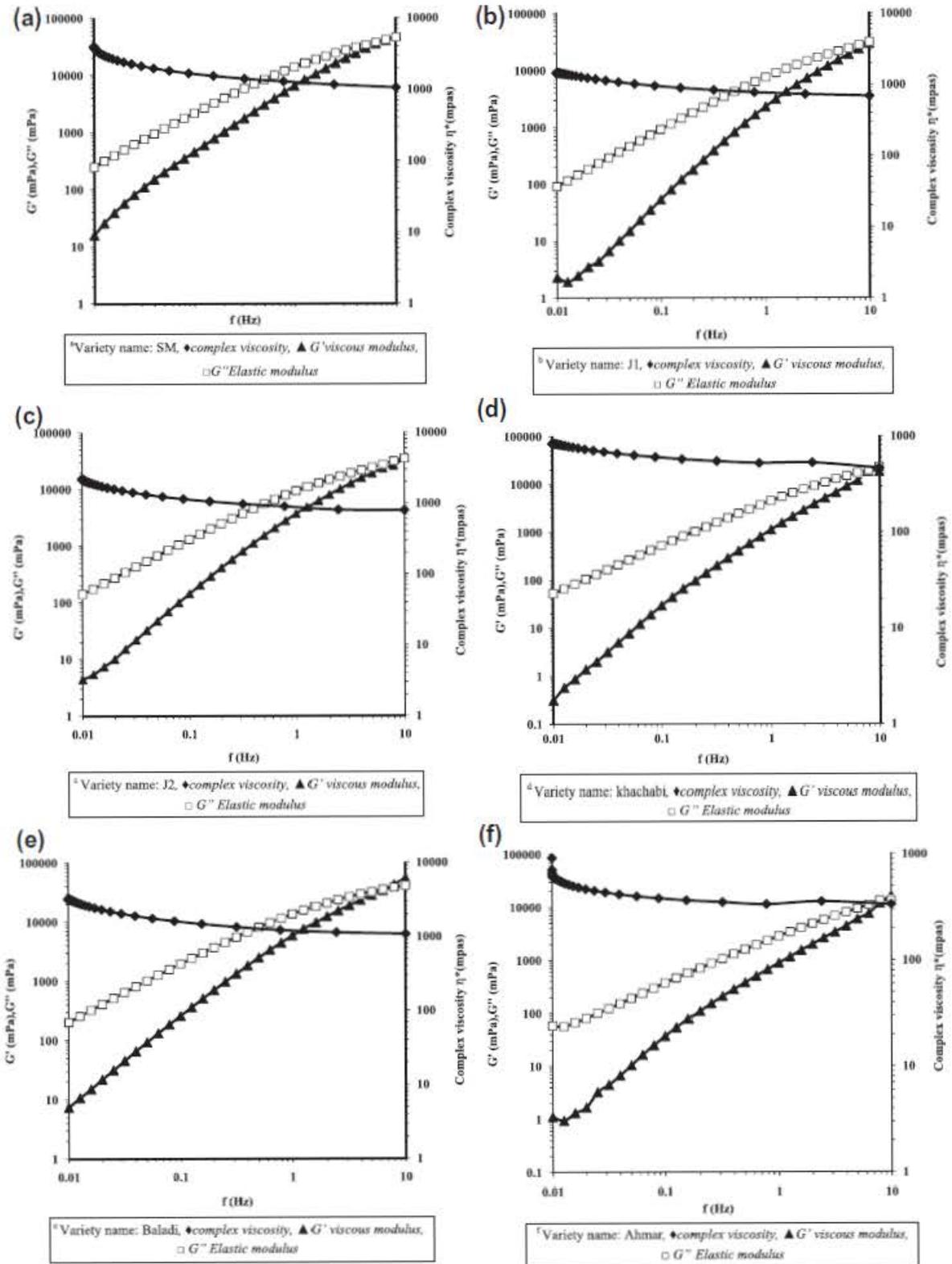


Fig. 3. Loss storage modulus and complex viscosity for all varieties to frequency sweep (a: SM, b: J1, c: J2, d: Kh, e: Bal, f: Ah, g: GC, h: A2, i: Bar, j: A1).

It should be mentioned that the order of viscosity for all varieties was similar to the order of molecular weight and intrinsic viscosity. The viscosity of a given polysaccharide has been reported to be molecular-weight dependent (Lapasin and Pricl, 1999), and molecular weight is an important factor in determining the viscosity of biopolymer solutions (Jones, 2004).

To study the effect of temperature on flow behavior, indices were extracted from a power law-model for all viscosity flow curves at 25, 35, 45 and 55 °C. The results are presented as indices, namely, apparent viscosity K (consistency index) and n flow behavior index (Tables 2–5). It can be observed that the flow behavior index n for all varieties at the applied temperature was $n < 1$, which means that LBGs had a shear-thinning behavior or pseudo-plastic flow. This typical pseudoplastic behavior was reported by several authors concerning hydrocolloid dispersion (Lazaridou et al., 2000; Doublier and Launay, 1981).

Furthermore, Fig. 2 showed a significant difference in the apparent viscosities between varieties. This difference could be related to variety, molecular weight or galactose mannose ratio. In fact, Fernandes et al. (1991) have observed a linear relationship between viscosity and M/G ratio. For a given concentration (1% (w/v)) of LBG the viscosity decreased as temperature increased confirming thus the non-Newtonian behavior of the studied solution.

Usually, galactomannan solutions exhibit a non-Newtonian behavior in which the viscosity decreases with increasing shear rate (Bourbon et al., 2010), but this behavior is concentration-dependent, as previously mentioned (Wu, 2009). This apparent viscosity showed a shifting between varieties in viscosity with increasing temperature from one variety to another.

3.3. Viscoelastic behavior

All mechanical spectra (G' , G'' and η^* function of frequency sweep) of oscillatory dynamic tests for 1% LBG solutions are represented in Figs. 3a–j. Complex viscosity (η^*), which is related to the global viscoelastic response, depends on both frequency and (G' , G'') values (Dakia, 2008) and decreases as a function of frequency. As can be observed, the viscous modulus G'' for all gums remains higher than the elastic modulus G' ($G'' > G'$), which means that the viscosity response to frequency sweeps is continuously higher than the elastic response. In this case, the system behaves as a liquid until a cross-over appears at a specific frequency ($G'' = G'$), where the system reverses. In this case, the elastic modulus G' becomes higher than the viscous modulus G'' ($G' > G''$), and the system behaves as a solid. Furthermore, viscoelastic behavior and shifting of cross-over depend on system concentration (Ibñaez

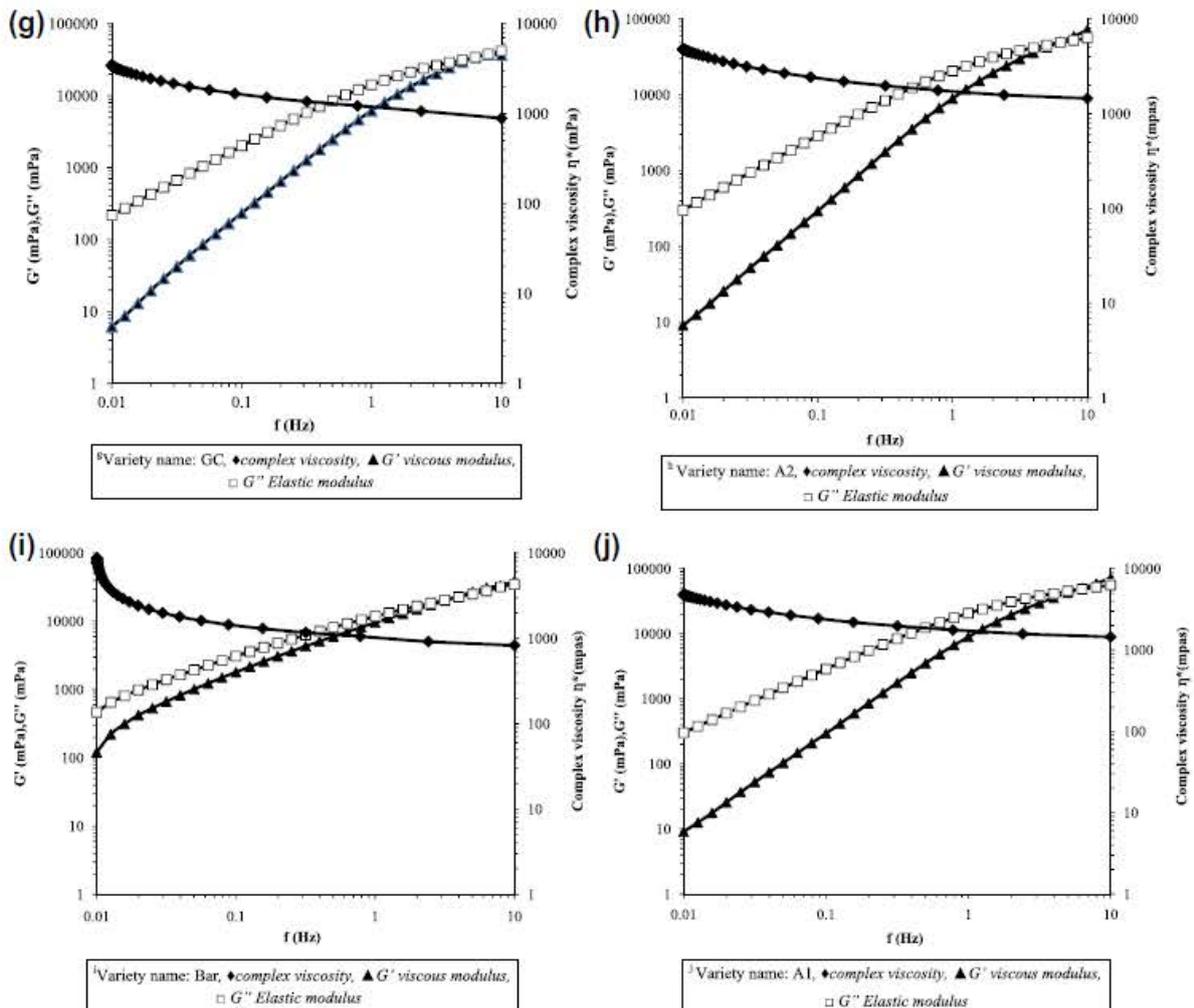


Fig. 3 (continued)

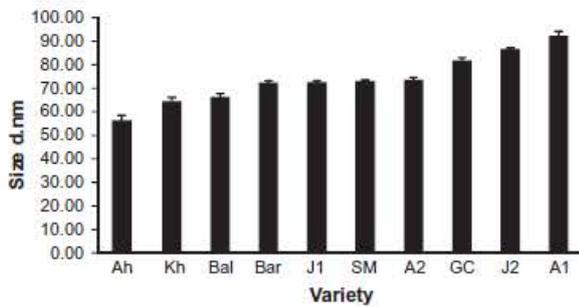


Fig. 4. Molecular size of pLBG and commercial LBG prepared at 80 °C/30 min measured at 20 °C for 0.1% LBG concentration.

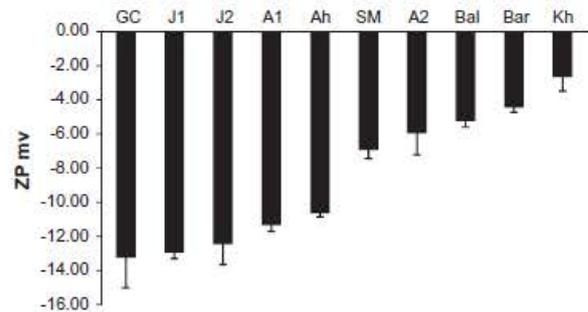


Fig. 5. Zeta potential of pLBG and commercial LBG prepared at 80 °C/30 min measured at 20 °C for 0.1% LBG concentration.

and Ferrero, 2003). The crossover frequency shifts to higher values when the polysaccharide content decreases; thus, the typical viscous response of the diluted, non-entangled solutions prevails. GC, A1, A2, Baladi, and Barri varieties had an earlier crossing than others, even for the same concentration (1%). This finding could be explained by their relationship with molecular weight (highest molecular weight) or by their variability.

3.4. Particle size and zeta potential

It was difficult to determine the size particles of LBG galactomannan because polysaccharides are polydispersed in molecular weight, meaning that each polysaccharide contains chains of different numbers of monosaccharide units, which yields a polydisperse mixture of molecular size distributions, i.e., the particle size distribution and mean droplet diameter. However, after sonication, a particle diameter was obtained that ranged from 56.37 nm for Ah to 92.23 nm for A1 (Fig. 4). All LBGs, including the commercial gum, were negatively charged and ranged from -2.67 to -12.95 (Fig. 5).

Table 6

LBG macromolecular characteristics obtained by Sec Malls.

| Variety | Conditions | | LBG prepared at 80 °C/30 min | | |
|---------|---------------------|---------------------|--------------------------------|------------|---------|
| | Mw (Dalton) | Mn (Dalton) | Intrinsic viscosity [η] (dl/g) | Pi = Mw/Mn | Rg (nm) |
| Gc | 0.848×10^6 | 0.616×10^6 | 11.34 | 1.37 | 64.48 |
| A1 | 0.826×10^6 | 0.548×10^6 | 10.76 | 1.16 | 63.97 |
| A2 | 0.791×10^6 | 0.529×10^6 | 10.63 | 1.51 | 66.74 |
| Bal | 0.752×10^6 | 0.394×10^6 | 9.67 | 1.8 | 58.05 |
| SM | 0.746×10^6 | 0.429×10^6 | 9.46 | 1.78 | 58.14 |
| J2 | 0.691×10^6 | 0.358×10^6 | 9.02 | 1.93 | 52.7 |
| J1 | 0.673×10^6 | 0.347×10^6 | 8.42 | 1.94 | 55.24 |
| Bar | 0.69×10^6 | 0.262×10^6 | 8.77 | 2.05 | 51.04 |
| Ah | 0.604×10^6 | 0.201×10^6 | 6.93 | 2.58 | 43.6 |
| Kh | 0.535×10^6 | 0.224×10^6 | 6.75 | 2.72 | 39.79 |

3.5. Analysis of macromolecular weight and its characteristics

SecMalls measurements showed a molecular weight ranging from 535 to 826 kDa for all Lebanese pLBG varieties and 848 for the commercial gum (Table 6). The results were within the values

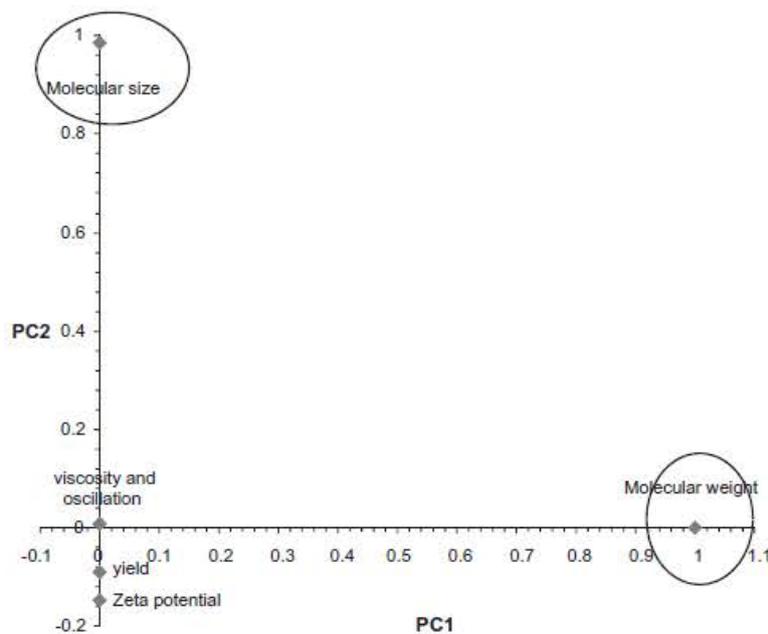


Fig. 6. PCA components loading plot to discriminate distinctive variables for different LBGs.

(319–1380 kDa) reported by Gaisford et al. (1986), Doublier and Launay (1981), Richardson and Norton (1998). Values of molar mass of galactomannan (LBG in particular) are generally artificially high due to intermolecular associations which often persist even at low concentrations ($C = 0.1\%$) (Richardson and Norton, 1998). Moreover, the difference in molecular weight could be related to geographical origin, climatic changes and their structural features. Conversely, intrinsic viscosity $[\eta]$ of LBGs varied from 6.93 to 10.76 dl/g according to varieties. This variance could be explained by the fact that $[\eta]$ depends on the dimensions (the shape and size) and provides information regarding about the molecular size and conformation of the polymer chain and its relation to the volume occupied by each coil (Azero and Andrade, 2002). These results were lower those that for the commercial one ($[\eta] = 11.34$ dl/g). This result might be explained by the fact that the commercial gum could originate from a LBG mixture of many unknown seed varieties (a blend of different molecular weights). Additionally, (Pollard et al., 2007) reported that all commercial gums were sold in markets as crude LBG, which may explain these differences.

It is noteworthy that there is a relationship between intrinsic viscosity $[\eta]$ (contribution of particles to the viscosity of a fluid) and molecular weight (Mw) (Owens et al., 1946), which indicates that with increasing molecular weight the viscosity increases accordingly. This relationship was confirmed in this study, where macromolecules (Table 6) with low molecular weight had low intrinsic viscosity, and as the molecular weight increased from one variety to another, intrinsic viscosity increased as well. This relationship is related to the conformation of the molecules in such a way that higher values of intrinsic viscosity represent a more extended structure at a given chain length (Wang and Cui, 2005). Additionally, this relationship provides rigidity coil conformation for the polysaccharide (Ginzberg et al., 2008). The results of polydispersity (Mw/Mn) for all samples are within the range of 1.16–2.86. Usually, the polydispersity index of natural polysaccharides ranges from 1.5 to 2.0 (Wang and Cui, 2005). Moreover and as mentioned before, that the

viscosity of a polysaccharide is molecular-weight dependent, the relation between MW and viscosity was confirmed in this study. LBGs with low molecular weight lead to the less viscous solutions; while higher MW correspond to high viscous LBG with high rheological behavior. Thus, greater decrease in viscosity would be noticed in the order of $A1 > A2 > Bal > SM > J1 > J2 > GC > Bar > Ah > Kh$ (Table 2), which is analogous to the order of molecular weight: $GC > A1 > A2 > Bal > SM > J2 > J1 > Bar > Ah > Kh$ (Table 6). Only the commercial gum was the exception with the highest MW with low viscosity. This behavior can attribute to the presence of impurities.

4. Statistical analysis

Principal component analysis (PCA) can determine similarities and differences between samples. In addition, the identification of the most important variables is possible. Therefore, statistical analyses in Principal Component Analyses (PCA) were performed with the Camo software (Unscrambler V7.6, Oslo, Norway) for different LBGs. From the loading plot (graph of variables Fig. 6), the results illustrated that the size and molecular weight are the most distinctive variables. Molecular weight has a strong influence on the principal component 1 on the horizontal axis (PC1), and size influence the principal component 2 on the vertical axis (PC2). The viscosity and oscillation results do not truly allow the differentiation of samples (close to 0, 0). These variables showed little variation from one sample to another compared with size and molecular weight. Similar to the zeta potential, analysis of the LBG yield exhibited only a notably slight influence on the principal component 2. Thus, according to all variables, the molecular weights and sizes for locust bean gum were dominant, whereas the others were decreased compared to the discriminated one.

The score plot for component 1 PC1 (horizontal axis Fig. 7) differentiates the samples according to their weight. The molecular weight follows the direction of PC1 from the lower to the higher

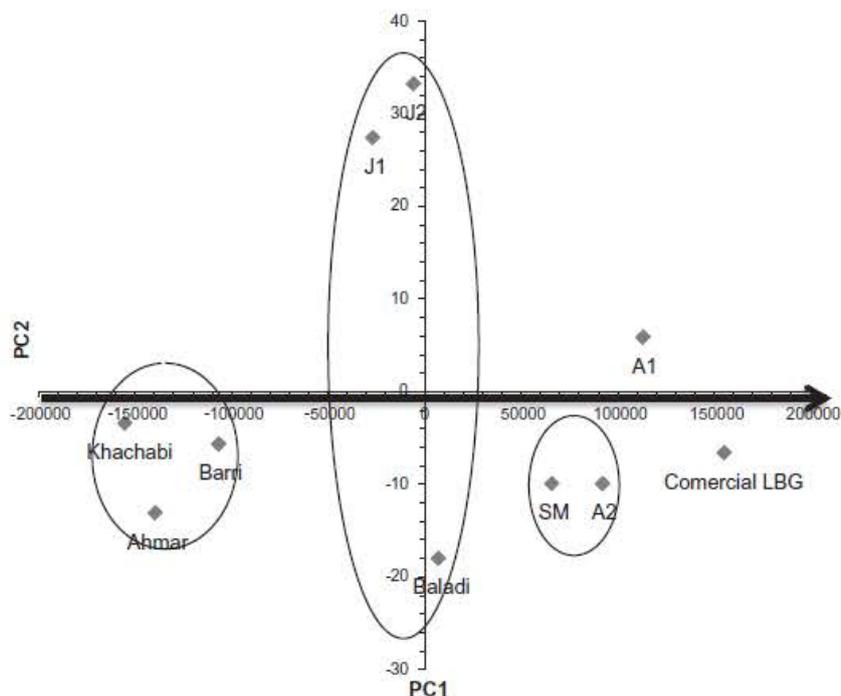


Fig. 7. PCA Score plot PC1 to differentiate samples in function of molecular weight.

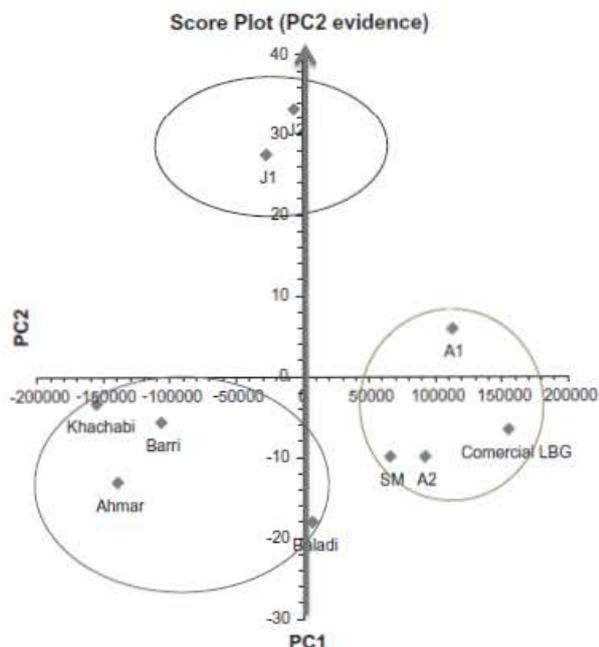


Fig. 8. PCA Score plot PC2 to differentiate samples in function of their molecular size.

weight; thus, we can observe 4 groups of LBG differentiated according to their molecular weight from the lowest to the highest (i.e., Khachabi, Ahmar and Barri, A1 and commercial LBG, SM and A2 between Baladi J1 and J2).

In the score plot for component 2, PC2 (vertical axis Fig. 8) is used to differentiate samples according to their size. The samples also follow the direction of PC2 from the lower to the higher size. Therefore, the samples were split into 4 groups: Khachabi, Ahmar, Barri and Baladi, A1 and SM and A2, Commercial, A1 and, finally, J1 and J2.

Therefore, the samples gathered on a score plot are rather similar; the more they are opposed, the more they are different. Basically, there are three groups: J1 and J2; Barri, Ahmar and khachabi; and the last 4, which are rather similar.

The sample located on or close to the center represents the average of all samples. In this study, the sample closest to the center is the Baladi.

5. Conclusion

In view to develop new niches for the use of Lebanese locust bean gum of carob (LBG) several physico-chemicals (size distribution, charge and macromolecular weight) and rheological properties of nine varieties were deeply investigated. The obtained results showed that the gum yield (40–60%), the charge (−2.67 to −12.95), the size distribution (56.37–92.23 nm), the weight-average molecular weight (535–826 kDa) and intrinsic viscosity [η] (7.25–10.76 dl/g) vary significantly depending upon the variety and the geographical localization. The highest difference was observed for size distribution and molecular weight. The rheological studies of Lebanese locust bean gum, at a concentration of 1% (w/v), showed pseudo-plastic behavior whatever the studied variety. In fact, apparent viscosity of LBGs is a decreasing function of the shear rate; therefore they are classified as a non-Newtonian fluid. This behavior was well fitted by power law model

(Ostwald–de Waele model). This model is already used for LBG and other polymers. The observed difference in the rheological profile between populations could be related to galactomannan content, molecular weight, or diversity in geographical origin. LBG solutions are thermo-dependent fluids. The increase of the temperature provokes a progressive drop of the viscosity, but compared to other macromolecules, this viscosity remains relatively high. This is could be attributed to the high molecular weight of carob galactomannan. The best thickening properties among all populations were for A1 and A2. These two varieties exhibit a high GM contents. These new insights into the properties of Lebanese locust bean gum of carob could open new niches for the use of these molecules in food and non-food applications.

Acknowledgment

The authors are grateful for the financial support of the Azm Saadeh Foundation.

References

- Azero, E.G., Andrade, C.T., 2002. Material properties testing procedures for galactomannan purification. *Polymer Testing* 21, 551–556.
- Bargallo, M.G., Lorenzo, R.D., Meli, R., Crescimanno, F.G., 1997. Characterization of carob germplasm (*Ceratonia siliqua* L.) in Sicily. *Journal of Horticultural Science* 72, 537–543.
- Barracosa, P., Osorio, J., Cravador, A., 2007. Evaluation of fruit and seed diversity and characterization of carob (*Ceratonia siliqua* L.) cultivars in Algarve region. *Scientia Horticulturae* 114, 250–257.
- Batlle, L., Tous, J., 1997. Carob tree *Ceratonia Siliqua* L. promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute: Rome, Italy.
- Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Ribeiro, C., Miranda, C., Maia, J.M., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2010. Characterization of galactomannans extracted from seeds of *Gleditsia triacanthos* and *Sophora japonica* through shear and extensional rheology: comparison with guar gum and locust bean gum. *Food Hydrocolloids* 24, 184–192.
- Bouzouita, N., Khaldi, A., Zgoulli, S., Chebil, L., Chekki, R., Chaabouni, M.M., Thonart, P., 2007. The analysis of crude and purified locust bean gum: a comparison of samples from different carob tree populations in Tunisia. *Food Chemistry* 101, 1508–1515.
- Custódio, L., Carneiro, M.F., Romano, A., 2005. Microsporogenesis and anther culture in carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *Scientia Horticulturae* 104, 65–77.
- Dakia, P.A., Wathelet, B., Paquot, M., 2007. Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ. *Food Chemistry* 102, 1368–1374.
- Dakia, P.A., Blecker, C., Roberta, C., Wathelet, B., Paquot, M., 2008. Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. *Food Hydrocolloids* 22, 807–818.
- Dea, I.C.M., Morrison, A., 1975. Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 31, 241–312.
- Doublier, J.L., Launay, B., 1981. Rheology of galactomannan solutions: comparative study of guar gum and locust bean gum. *Journal of Texture Studies* 12, 151–172.
- Fernandes, P.B., Gonçalves, M.P., Doublier, J.L., 1991. A rheological characterization of kappa-carrageenan/galactomannan mixed gels: a comparison of locust bean gum samples. *Carbohydrates Polymers* 16 (3), 253–274.
- Fernandes, P.B., Doublier, M.P., Gonçalves, J.L., 1992. Rheological behaviour and sol-gel transition of galactomannan/carrageenan blends. In: Phillips, G.O., Wedlock, D.J., Williams, P.A. (Eds.), *Gums and Stabilizers for the Food Industry*. IRL Press, Oxford, pp. 181–1906.
- Fox, J.E., 1992. Seed gums. In: Imeson, A. (Ed.), *Thickening and Gelling Agents for Food*. Chapman and Hall, London, pp. 153–169.
- Gaisford, S.E., Harding, S.E., Mitchell, J.R., Bradley, T.D., 1986. A comparison between the hot and cold water soluble fractions of two locust bean gum samples. *Carbohydrate Polymers* 6, 423–442.
- Ginzberg, A., Korin, E., Arad, S.M., 2008. Effect of drying on the biological activities of a red microalgal polysaccharide. *Biotechnology and Bioengineering* 99 (2), 411–420.
- Haddarah, A., Ismail, A., Bassal, A., Hamieh, T., Ioannou, I., Ghoul, M., 2013. Morphological and chemical variability of Lebanese carob varieties. *European Scientific Journal* 9 (18), 353–369.
- Harte, F., Venegas, R., 2010. A model for viscosity reduction in polysaccharides subjected to high-pressure homogenization. *Journal of Texture Studies* 41, 49–61.
- Herald, C.T., 1986. In: Glucksman, M. (Ed.), *Food Hydrocolloids*, vol. 3. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 161–170.
- Higiro, J., Herald, T.J., Alavi, S., Bean, S., 2007. Rheological study of xanthan and locust bean gum interaction in dilute solution: effect of salt. *Food Research International* 40, 435–447.

- Ibañez, M.C., Ferrero, C., 2003. Extraction and characterization of the hydrocolloid from *Prosopis flexuosa* DC seeds. *Food Research International* 36, 455–460.
- Jones, G.M.J. 2004. Rheological Properties of Gelatin, Carrageenan and Locust Bean Gum Mixtures. PhD Thesis, University of Nottingham.
- Kawamura, Y. 2008. Carob Bean Gum Chemical and Technical Assessment (CTA), Draft Ph.D. (6) (pp. 1). Prepared for the 69th JECFA.
- Lapasin, R., Prici, S., 1999. Rheology of Industrial Polysaccharides. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD.
- Lazaridou, A., Biliaderis, C.G., Izydorczyk, M.S., 2000. Structural characteristics and rheological properties of locust bean galactomannans: a comparison of samples from different carob tree populations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 68–75.
- Lopes Da Silva, J.A., Gonçalves, M.P., Rao, M.A., 1992. Rheological properties of high-methoxyl pectin and locust bean gum solutions in steady shear. *Journal of Food Science* 57 (2), 443–448.
- Lopes da Silva, J.A., Gonçalves, M.P., Doublier, J.L., Axelos, M.A.V., 1996. Effect of galactomannans on the viscoelastic behavior of pectin/calcium networks. *Polymer Gels and Networks* 4, 65–83.
- Lurueña-Martínez, M.A., Vivar-Quintana, A.M., Revilla, I., 2004. Effect of locust bean/xanthan gum addition and replacement of pork fat with olive oil on the quality characteristics of low-fat frankfurters. *Meat Science* 68, 383–389.
- Mao, C.F., Chen, J.C., 2006. Interchain association of locust bean gum in sucrose solutions: an interpretation based on thixotropic behavior. *Food Hydrocolloids* 20 (5), 730–739.
- Mannion, R.O., Melia, C.D., Launy, B., Cuvelier, G., Hill, S.E., Harding, S.E., Mitchell, J.R., 1992. Xanthan/locust bean gum interactions at room temperature. *Carbohydrate Polymers* 19, 91–97.
- Neukom, H. 1988. Carob bean gum: properties and applications. In: Fito, P., Mulet, A. (Eds.), Proceedings of the III International Carob Symposium. Valencia, Spain, pp. 551–555.
- Owens, H.S., Lotzkar, H., Schultz, Th., Maclay, W.D., 1946. Shape and size of pectinic acid molecules deduced from viscometric measurements. *Journal of the American Chemical Society* 68 (8), 1628–1632.
- Ostwald, W., 1924. *Z. Phys. Chem.* A111, 62.
- Ostwald, W., 1925. *Kolloid-Zeit* 36, 99.
- Pollard, M.A., Kelly, R., Wahl, C., Fischer, P., Windhab, E., Eder, B., Amado, R., 2007. Investigation of equilibrium solubility of a carob galactomannan. *Food Hydrocolloids* 21, 683–692.
- Pollard, M.A., Kelly, R., Fischer, P., Windhab, E., Eder, B., Amado, R., 2008. Investigation of molecular weight distribution of LBG galactomannan for flours prepared from individual seeds mixtures and commercial samples. *Food Hydrocolloids* 22, 1596–1606.
- Richardson, P.H., Norton, I.T., 1998. Gelation behavior of concentrated locust bean gum solutions. *Macromolecules* 31, 1575–1583.
- Richardson, P.H., Clark, A.H., Russell, A.L., Aymard, P., Norton, I.T., 1999. Galactomannan Gelation: A Thermal and Rheological Investigation Analyzed Using the Cascade Model. *Macromolecules* 32 (5), 1519–1527.
- Rizzo, V., Tomaselli, F., Gentile, A., La Malfa, S., Maccarone, E., 2004. Rheological properties and sugar composition of locust bean gum from different carob varieties (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7925–7930.
- Rojas-Argudo, C., Del Río, M.A., Pérez-Gago, M.B., 2009. Development and optimization of locust bean gum (LBG)-based edible coatings for postharvest storage of 'Fortune' mandarins. *Postharvest Biology and Technology* 52, 227–234.
- Samil Kök, M., 2007. A comparative study on the compositions of crude and refined locust bean gum in relation to rheological properties. *Carbohydrate Polymers* 70, 68–76.
- Sand, R., 1982. Structure and conformation of hydrocolloids. In: Glicksman, M. (Ed.), *Food Hydrocolloids*. SRC Press, Florida, pp. 19–46.
- Silveira, J.L.M., Bresolin, T.M.B., 2011. Pharmaceutical use of galactomannans. *Quim. Nova* 34 (2), 292–299.
- Sittikijyothin, W., Torres, D., Gonçalves, M.P., 2005. Modeling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers* 59, 339–350.
- Wang, Q., Cui, S.W. 2005. Understanding the physical properties of food polysaccharides, food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications (Chapter 4).
- Wu, Y., Cui, W., Eskin, N.A.M., Goff, H.D., 2009. An investigation of four commercial galactomannans on their emulsion and rheological properties. *Food Research International* 42, 1141–1146.
- Wu, Y., Li, W., Cui, W., Eskin, N.A.M., Goff, H.D., 2012. A molecular modeling approach to understand conformation functionality relationships of galactomannans with different mannose/galactose ratios. *Food Hydrocolloids* 26, 359–364.
- Zárate-Ramírez, L.S., Bengoechea, C., Cordobés, F., Guerrero, A., 2010. Linear viscoelasticity of carob protein isolate/locust bean gum blends. *Journal of Food Engineering* 100, 435–445.

4.3 Contribution de l'article

En vue de développer de nouvelles niches pour l'utilisation de la gomme de caroube libanaise (LBG) plusieurs propriétés physico-chimiques (distribution taille, la charge et le poids macromoléculaire) et rhéologiques des neuf variétés ont été étudiées.

Les résultats obtenus ont montré que le rendement de gomme (40 à 60%), la charge (de -2,67 à -12,95), la distribution de taille (56,37 nm à 92,23 nm), le poids moléculaire moyen (535-826 kDa) et la viscosité intrinsèque $[\eta]$ (de 7,25 à 10,76 dl / g) varient considérablement selon la variété et la localisation géographique. La plus grande différence a été observée pour la distribution de taille et de poids moléculaire.

Les études rhéologiques de la gomme de caroube Libanaise, à une concentration de 1%, ont montré un comportement pseudo-plastique quelle que soit la variété étudiée. En fait, la viscosité apparente des LBGs est une fonction décroissante du taux de cisaillement. Ainsi, ils ont été considérés comme un fluide non-newtonien. Ce comportement a été bien expliqué par le modèle d'Ostwald-de Waele.

La différence observée dans le profil rhéologique entre les populations pourrait être liée au contenu galactomannane, au poids moléculaire, ou à la diversité dans l'origine géographique. En outre, les solutions de LBG sont des fluides thermo-dépendants. Ainsi, l'augmentation de la température provoque une diminution progressive de la viscosité. Cependant, par rapport à d'autres macromolécules, cette viscosité demeure relativement élevée. Ceci est peut-être attribuée à la masse moléculaire élevée de ce galactomannane.

Les meilleures propriétés rhéologiques de toutes les populations étaient obtenues avec les variétés A1 et A2. Ces deux variétés présentent une teneur élevée en GM.

Ces nouvelles connaissances sur les propriétés des gommes de caroube libanaise pourraient ouvrir de nouvelles niches pour l'utilisation de ces macromolécules dans les applications alimentaires et non alimentaires.

Chapitre 5

Investigations

complémentaires

Chapitre 5 - Investigation complémentaires

5.1 Projet d'article: L'influence du rapport mannose/galactose des gommés de caroube purifiées sur les propriétés rhéologiques et macromoléculaires et leur relation avec les cultivars

The Influence of mannose to galactose ratio of LBG on rheological and macromolecular properties and their relation to carob varieties

Amira Haddarah^{a,b,c*}, Ali Bassal^{b,c}, Ali Ismail^{b,c}, Tayssir Hamieh^{b,c}, Mohamed Ghoul^a.

^aUniversité de Lorraine, LIBio (Laboratoire d'Ingénierie des biomolécules), 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

^bUniversité Libanaise, Faculté d'Agronomie, Dekwaneh, Liban

^cUniversité Libanaise, Faculté des Sciences, Laboratoire MCEMA, EDST, Hadath, Liban

Abstract

Lebanese purified locust bean gum of nine varieties had shown difference in their molecular structural and functional properties. This difference in the same type of plant has a high potential relation to mannose/ galactose ratio, which may influence the molecular interactions and the rheological properties of galactomannan, and all, could be variety or geographically dependent. Lebanese LBG M/G ratio had a range between 3.43- 4.31 for J1 and A1 respectively. Moreover, varieties with M/G ratio more than 4 had the highest viscosities, intrinsic viscosities and Molecular weight, while varieties with M/G less than 4 had the lowest ones.

Keywords: Carob galactomannan; Locust Bean Gum; Polysaccharides; Mannose to Galactose ratio, Rheology.

Abbreviations: A1: Akkari 1, A2: Akkari 2, Ah: Ahmar, Bal: Baladi, Bar: Barri, LBG: Locust Bean Gum, Da: Dalton, GM: Galactomannan, M/G: Mannose to Galactose ratio, J1: Jnoubi1, J2: Jnoubi2, K: Consistency index or Apparent viscosity, Da: Dalton, Kh: khachabi, Mw: Molecular weight, SM: Sandali Makdissi, $[\eta]$: intrinsic viscosity.

Introduction

galactomannans are neutral water-soluble polysaccharides, isolated from seeds endosperm of many legumes species and from some bacterial cell wall (**Dea & Morrison, 1975**). Locust bean gum LBG is the galactomannan extracted from the seed endosperm of carob pods is a versatile material used in many industrial applications (pharmaceutical, biomedical, cosmetics and food industries). They are excellent stiffeners and stabilizers of emulsions, and the absence of toxicity allows their use in the textile (**Srivastava & Kapoor, 2005; Vieira, 2007**). They all have a similar general structure, consisting of a mannane main chain on which there are ramifications of a galactose unit. The mannan main chain that is less substituted by the galactose units are those GM which interact more among themselves or most readily form complexes with other biopolymers leading to network formation in solution. These polysaccharides differ primarily in terms of their galactose content (degree of branching) expressed by the mannose to galactose ratio M/G, in the galactose units distribution along the mannane chain, in their molecular weight (**Fox, 1992; Azero & Andrade, 2002**) where all strongly influence the molecular interactions and the rheological properties in galactomannan solutions (**Da Silva & Gonçalves, 1990; Mao & Chen, 2006**).

The distribution of galactose along the mannose linear chain controls: the rheological properties of LBG (a higher ratio leads to a higher thickening ability), influences the solubility, the mechanism and temperature of gel formation (Richardson, 1998; Kök et al, 1999; Bresolin, 1999). Furthermore, the extent of galactose substitution is depending on the source species (LBG 4:1, tara gum TG 3:1, guar gum (GG) 2:1 and fenugrec Gum (FG) 1:1) (Dea and Morrison, 1975; Battle and Tous, 1997). Besides, many authors had showed that,

based on the same type of plant or source of galactomannan (GM), the molecular characteristics of GM such as the M/G ratio and the molecular weight (Mw) can vary depending on the variety and growing conditions (climate, soil) (Bargallo et al, 1997; Lazaridou et al, 2000; Rizzo et al, 2004), and according to the method of extraction or preparation of the polymer (**Da Silva & Gonçalves, 1990; Sittikijyothin et al, 2005; Dakia et al, 2008**). Macromolecules containing more galactose residues are more readily soluble in cold, like guar gum (M/G = 2:1) and reaches its maximum solubility and viscosity at 40 ° C. on the other side, macromolecules with little or no branching are poorly soluble and sometimes lead to the formation of clusters of polymers very difficult to access to the solvent. Thus, a heating (with vigorous stirring) will be required to achieve a maximum viscosity and solubilization. This is the case of carob (M/G = 4:1), with 20% content of galactose, reaches its maximum viscosity and solubility 80 ° C (**Gaisford et al, 1986; Maier et al, 1993; Kök et al, 1999. Dakia et al., 2008**). Further, the analysis of the composition of monosaccharide product degradation has proposed three types of galactose units distribution: regular disposition, random and arranged into uniform blocks ("smooth areas " completely without branching galactose alternating with "ruffled areas" where the galactose residues are present in all mannose units) (**Dea and Morrison, 1975; McCleary et al., 1984 ; 1985 ; 1988**). The unsubstituted chains of galactomannans areas are the basis of intra-molecular and intermolecular associations. In fact, the aggregation phenomenon that controls the properties of the water-soluble polymers (especially when they are neutral like LBG) finds its origin in the establishment of Hydrogen bonds between areas devoid of galactose residues (**Rinaudo, 2001**). Thereby, an elevated ratio of mannose to galactose causes a high viscosity. Furthermore, this could explains the high values of molecular weight of the LBG galactomannan even at low concentrations (C = 0.1%), due to intermolecular associations that often persist (**Richardson et al., 1998**).

Thus, the main objective of this article was to determine the mannose to galactose ratio (M/G of LBG) of different Lebanese carob gum varieties, which is a complementary study of the rheological and structural properties and their relation to M/G ratio.

2. Material and Methods

2.1 Materials

To determine the degree of substitution of galactose expressed by the mannose to galactose ratio nine Lebanese purified locust bean gums were used in this study. The used LBGs were extracted by acidic pretreatment from nine different varieties then purified by isopropanol precipitation (**Haddarah et al., 2013**).

2.1.1 Protocol

The determination of sugars present in the locust bean gum can be done by several methods (enzymatic, chemical, and chromatographic). HPLC had been chosen according to the protocol proceeded by **Bouzouita et al. (2007)**.

The calibration curve is determined by a synthetic mixtures of mannose and galactose (100g / l), then diluted 1/2, 1/3, 1/4, 1/6, 1/8 and 0. The optimum conditions for the hydrolysis of locust bean gum were determined (100 ° C, 1M H₂SO₄ and a hydrolysis time of 2 h). So, twenty milliliters of H₂SO₄ was added to 400 mg of carob bean gum. After boiling, the mixture was cooled and neutralized with BaCO₃ to pH 6.5-7, the content was filtered under vacuum on a sintered using cellulose acetate filters (0.2-microns) then the filtrate was evaporated under vacuum with a temperature of 40 ° C until crystalline residue is obtained. This residue was dissolved in 2 ml of MilliQ water and filtered through a syringe filter. The clear solution was sealed in a vial ready for analysis by HPLC.

2.1.2 HPLC analysis

Analyses were performed by liquid chromatography high performance (Agilent HP 1100, differential refractive detector, Waters column carbohydrate sugar pack, L = 300mm, inner diameter = 6.5mm, 80°C oven temperature, and a mobile phase MilliQ.

Areas of mannose and galactose of different samples of locust bean gums were performed on ChemStation (the injection volume 10µl, flow 0.6 ml / min) and the concentrations, masses and mannose to galactose ratios were calculated.

3. Results and discussions

The sugar content obtained for the different samples of galactomannan are presented in **table 7**. The total amount of sugars (mannose + galactose) ranged between 61.66±0.48 for J1 and 93.64±0.38 for Kh. Thus, the solids content of the LBG gum is formed largely of these two sugars. The percentage of galactose had showed values ranging between 15.08±0.03 for A2 and 19.63±0.06 for Kh.

Table.7 Determinations of mannose-galactose ratios

| Variety | galactose (mg) | Mannose (mg) | Galactose mg/100mg (dry matter) | Mannose mg/100mg (dry matter) | %G+M (dry matter) | M/G ratio |
|------------|----------------|--------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------|-----------|
| A1 | 33.20±3.81 | 143.22±0.52 | 16.50±0.21 | 71.19±0.21 | 87.68±0.42 | 4.31±0.04 |
| Bal | 32.26±0.22 | 135.96±1.18 | 15.89±0.11 | 66.97±0.58 | 82.87±0.69 | 4.21±0.01 |
| SM | 28.14±0.65 | 117.83±2.51 | 16.55±0.38 | 69.27±1.48 | 85.82±1.35 | 4.19±0.16 |
| A2 | 30.25±0.05 | 121.23±0.53 | 15.08±0.03 | 60.43±0.26 | 75.51±0.29 | 4.01±0.01 |
| AH | 35.34±0.13 | 140.41±3.50 | 17.61±0.09 | 69.98±1.63 | 87.59±0.84 | 3.97±0.02 |
| J2 | 36.79±0.87 | 139.36±2.48 | 18.13±0.11 | 68.67±0.43 | 86.79±0.65 | 3.79±0.02 |
| Kh | 39.38±0.18 | 148.56±0.85 | 19.63±0.06 | 74.02±0.32 | 93.64±0.38 | 3.77±0.01 |
| Bar | 37.86±1.84 | 135.75±2.80 | 18.64±0.92 | 66.84±1.42 | 85.48±2.34 | 3.59±0.10 |
| J1 | 36.20±0.18 | 124.24±0.97 | 17.97±0.09 | 61.66±0.48 | 61.66±0.48 | 3.43±0.01 |

Values are the average of three replications ± standard deviation of the mean.

Rizzo et al (2004) have mentioned that the degree of galactose substitution varies from one botanical source to the next as well as between molecular species of one gum. Mannose had showed also values between 60.43±0.26 for A2 and 74.02±0.32 for Kh. Moreover, Mannose

to galactose ratio of the different Lebanese LBG had shown a range between 3.43 ± 0.10 for J1 and 4.31 ± 0.04 for A1. Results in M/G ratios are in good agreement with those generally reported for carob gums by others authors: **Lazaridou et al., (2000)** had showed difference in M/G ratio of Greek carob (3.14-3.82) within the same variety depending on the growing region or climate and soil conditions, **Dakia et al, (2008)** presented a ratio of 3.6, **Rizzo et al., (2004)** have shown a difference in the M/G (2.9-4.0) of different Italian carob varieties issued from different regions while **Da Silva et al. (1990)** had shown a differences in the M/G between crude (4.17) and purified LBG (4.58). Thus, the difference in M/G ratios of the Lebanese galactomannas could be related to the difference within Lebanese carob varieties or depending on the growing conditions. In fact, J1 with the smallest M/G ratio of 3.43 ± 0.01 is geographically located in the south of Lebanon while A1 with M/G ratio of 4.31 ± 0.04 is located in the north (**Table8**).

Table 8. Geographical locations of the different M/G ratios

| Variety | M/G ratio | Elevation (feet) | Elevation (m) | Latitude N | Longitude E | Regions |
|------------|-----------------|------------------|---------------|-------------|-------------|--------------------------------|
| A1 | 4.31 ± 0.04 | 600 | 182.88 | 34° 30.841' | 36° 01.948' | Akkar (North) |
| Bal | 4.21 ± 0.01 | 663 | 202.082 | 34° 16.693' | 35° 40.315' | Selaata (North) |
| SM | 4.19 ± 0.16 | 2147 | 654.41 | 33° 22.906' | 35° 35.943' | Marjayoun (South) |
| A2 | 4.01 ± 0.01 | 786 | 239.57 | 34° 27.641' | 35° 57.238' | Akkar (North) |
| Ah | 3.97 ± 0.02 | 188 | 57.30 | 34° 17.259' | 35° 40.256' | Batroune (North) |
| J2 | 3.79 ± 0.02 | 1574 | 479.76 | 33° 15.014' | 35° 25.247' | Maaroub and Borj Rahal (South) |
| Kh | 3.77 ± 0.01 | 1350 | 411.48 | 33° 39.065' | 35° 28.789' | Bourjen (Mount Lebanon) |
| Bar | 3.59 ± 0.10 | 1760 | 536.45 | 33° 15.424' | 35° 27.710' | Wadi El Hojeir (South) |
| J1 | 3.43 ± 0.01 | 356 | 108.509 | 33° 18.532' | 35° 16.865' | Maaroub and Borj Rahal (South) |

Moreover, in this study, carob varieties were originated from different regions of the Lebanese territories. In a recent study (**Haddarah et al., 2013**) on the morphological and chemical characteristics of the same Lebanese carob cultivars had showed a positive correlation between geographical coordinates (altitude, latitude and longitude) and the physico-chemical characteristics that had exhibited a highly positive and significant correlation between latitude and pod length, weight, volume and size index, and seeds weight. And since the locust bean gum was extracted from seeds of the same varieties in the study of **Haddarah et al. (2013)** thus, this difference in mannose galactose ratio could be highly dependent on the growing regions.

Besides, A1, Bal, SM and A2 variety with the highest M/G ratio > 4 had the highest viscosities (for the same conditions of : extraction, concentration 1%, temperature 25°C), intrinsic viscosities and molecular weight, while Ah, J2, Kh, Bar, J1 with M/G < 4 had the lowest ones (**Table 9**). This could be explained reasonably by the fact that the molecular properties of the GM can change with changing in M/G ratios (**Lazaridou et al., 2000**). Moreover, A1, Bal, SM and A2 with high M/G ratio had showed low percentage of galactose residues while Ah, J2, Kh, Bar and J1 with low ratios had higher percentage of galactose, this ensure the dependence of viscosity, intrinsic viscosity and MW on the galactose residues content in the chain of GM since low galactose content is expressed by high viscosity of the GM (**Rizzo et al., 2004**). This explains the difference in viscosities within the GM of the different varieties (**Table 9**). Furthermore, the increase of the percentage of galactose in the chain of GM (the case of Kh with the highest galactose content, the lowest $[\eta]$ and Mw) results in more solubilization of the galactomannans thus the decrease of intermolecular interactions (decrease of building Hydrogen bonds between areas of chains devoid of galactose residues (unsubstituted area), thus resulting in the decrease in viscosity (**Rizzo et**

al., 2004; Rinaudo, 2001), Mw and also in the decrease of intrinsic viscosity. Since, this specific hydrodynamic volume and the Mw is

influenced by intramolecular and intermolecular associations (the more are the unsubstituted area the more are the intermolecular interactions the more is high the Mw). This explains, the high Mw of A1 with the highest $[\eta]$.

| Variety | Galactose mg/100mg (dry matter) | Mannose mg/100mg (dry matter) | K (Pa.s ⁿ) 25°C | Intrinsic viscosity [η] (dl/g) | Mw (Da) | M/G ratio |
|---------|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|--|-----------------------|--------------|
| A1 | 16.50±0.21 | 71.19±0.21 | 9.25 | 10.76 | 0.826x10 ⁶ | 4.31±0.04 |
| A2 | 15.082±0.03 | 60.43±0.26 | 6.27 | 10.63 | 0.791x10 ⁶ | 4.01±0.01 |
| Bal | 15.89±0.11 | 66.97±0.58 | 3.76 | 9.67 | 0.752x10 ⁶ | 4.21±0.01 |
| SM | 16.55±0.38 | 69.27±1.48 | 3.43 | 9.46 | 0.746x10 ⁶ | 4.19±0.16 |
| J2 | 18.13±0.11 | 68.67±0.43 | 2.96 | 9.02 | 0.691x10 ⁶ | 3.79±0.02 |
| Ah | 17.61±0.09 | 69.98±1.63 | 0.90 | 6.93 | 0.604x10 ⁶ | 3.97±0.02 |
| Bar | 18.64±0.92 | 66.84±1.42 | 2.36 | 8.77 | 0.69x10 ⁶ | 3.59±0.10 |
| Kh | 19.63±0.06 | 74.02±0.32 | 1.52 | 6.75 | 0.535x10 ⁶ | 3.77±0.01 |
| J1 | 17.97±0.09 | 61.66±0.48 | 3.17 | 8.42 | 0.673x10 ⁶ | 3.43±0.01 |

Table 9. Parameters that influence GM functional properties

On the other hand, the little disorder in the ratio of LBGs within high and small ratios for all varieties could be related to the percentage of mannose over galactose units.

4. Conclusion

It appears from this article, that the galactose content influences macromolecular characteristics (molecular weight and intrinsic viscosity) and the functional properties of galactomannan. Thus, the ratio M/G controls the mechanism of macromolecular interactions that explains the increase in the strength of interactions with reducing the number of galactose units and its distribution along the galactomannan chains. Then, the increase in the percentage of galactose in the chain of GM (Kh) had explained the decrease in viscosity, Mw and also the

decrease in intrinsic viscosity due to some reduction of intermolecular interactions. Also, this difference in galactose content between varieties could be explained by the difference inside Lebanese carob varieties. Similarly, M/G ratios > 4 (A1, Bal, SM and A2) had viscosities, intrinsic viscosities and molecular weights highest than Ah, J2, Kh, Bar, J1 with M / G <4.

Furthermore, results showed also that geographical origin (by mean of latitude) could have a potential in the variability in M/G ratio and the galactose content for the same type of

plant. Then, M / G had showed a difference between the different purified gums which vary between 3.43 ± 0.10 for J1 and 4.31 ± 0.04 for A1.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support of the Azm Saadeh Foundation.

References

- Azero, E.G. & Andrade, C.T. , 2002. Material Properties Testing procedures for galactomannan purification. *Polymer Testing*, 21, 551-556.
- Bargallo M.G., Di Lorenzo R., Meli R. & Crescimanno F. G., 1997. Characterization of carob gerplasm (*Ceratonia siliqua* L.) in Sicily. *J. Hortic. Sci.*, 72(4), 537-543.
- Battle, I. & Tous, J., 1997. Carob tree *Ceratonia Siliqua* L. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected crops.17, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben / International Plant Genetic Resources Institute: Rome, Italy.
- Bouzouita, N., Khaldi, A., Zgoulli, S., Chebil, L., Chekki, R., Chaabouni, M.M. & Thonart, P. (2007). The analysis of crude and purified locust bean gum: A comparison of samples from different carob tree populations in Tunisia. *Food Chemistry*, 101, 1508-1515.

- Bresolin T. M. B., Milas M., Rinaudo M, Reicher, F. and Ganter J. L. M. S. Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1999, 26, 225-231.
- Dakia, P. A., Blecker, C., Roberta, C., Wathelet, B. & Paquot M. (2008). Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. *Food Hydrocolloids*, 22, 807-818.
- Da Silva J.A.L. & Gonçalves M.P., 1990. Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with isopropanol. *Food Hydrocolloids*, 4, 277-287. Dea, I. C. M. & Morrison, A. 1975, Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 31, 241-312.
- Fox, J. E., 1992. Seed Gums. Thickening and gelling agents for food. A. Imeson., Chapman and Hall (pp.153-169). London.
- Gaisford, S. E., Harding, S. E., Mitchell, J. R. & Bradley, T. D. (1986). A comparison between the hot and cold water soluble fractions of two locust bean gum samples. *Carbohydrate Polymers*, 6, 423-442.
- Haddarah, A., Ismail, A., Bassal, A., Hamieh, T., Ioannou, I., Ghoul, M., (2013). Morphological and chemical variability of Lebanese carob varieties. *European Scientific Journal*, 9 (18), 353-369.
- Kök M. S., Hill S. E. and Mitchell, J. R. A comparison of the rheological behaviour of crude and refined locust bean gum preparations during thermal processing. *Carbohydr. Polym.*, **1999**, 38, 261-265.
- Lazaridou A., Biliaderis C.G. & Izydorczyk M.S, 2000. Structural characteristics and rheological properties of locust bean galactomannans: a comparison of samples from different carob tree populations. *J. Sci. Food Agric.*, 81, 68-75.

- Maier, H., Anderson, M., Karl, C., Magnuson, K. & Whistler, R. L. (1993). Guar, locust bean, tara and fenugreek gums. In R. L. Whistler, J. N. BeMiller (Eds.), *Industrial Gums, Polysaccharides and their Derivates* (pp. 205-215). Academic Press, San Diego.
- Mao C.F. & Chen J.C., 2006. Interchain association of locust bean gum in sucrose solutions: an interpretation based on thixotropic behavior. *Food Hydrocolloids*, 20 (5), 730-739.
- McCleary B.V., Dea I.C.M., Windust J. & Cooke D., 1984. Interaction properties of D-galactose-depleted guar galactomannan samples. *Carbohydr. Polym.*, 4(4), 253-270.
- McCleary B.V., Clark A.H., Dea I.C.M. & Rees D.A., 1985. The fine structures of carob and guar galactomannans. *Carbohydr. Res.*, 139, 237-260.
- McCleary B.V., 1988. Carob and guar galactomannans. *Methods Enzymol.*, 160, 523-527.
- Richardson P. H., Willmer J. and Foster T. J. Dilute solute properties of guar and LBG in sucrose solution. *Food Hydrocolloids*, **1998**, 12, 339-348. Rinaudo M., 2001. Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. *Food Hydrocolloids*, 15, 433-440.
- Rizzo, V., Tomaselli, F., Gentile, A., La Malfa, S. & Maccarone, E., 2004. Rheological Properties and Sugar Composition of Locust Bean Gum from Different Carob Varieties (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7925-7930.
- Sittikijyothin, W., Torres, D. & Gonçalves, M. P., 2005. Modeling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 59, 339-350.
- Srivastava M. and Kapoor V. P., 2005. Seed galactomannans: An overview. *Chemistry and Biodiversity*, 2, 295-317.
- Vieira I. G. P. V., Mendes F. N. P., Gallao M. I. and Brito E. S., 2007. NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). *Food Chemistry*, 101, 70-73.

5.2 Etude des isothermes de sorption

La relation entre l'activité de l'eau de la gomme de caroube et sa teneur en eau, à une température donnée, s'exprime par la courbe d'isotherme de sorption. Celle-ci illustre l'affinité pour l'eau des gommes étudiées. Les isothermes d'adsorption des différentes gommes de caroube, obtenues par la méthode statique à 20°C, présentent des allures sigmoïdes. Les courbes expérimentales obtenues montrent que pour une même activité de l'eau (Figure 12), la teneur en eau varie d'une gomme à une autre. En outre, la variété Barri (Bar) a les teneurs en eau les plus élevées dans les zones 1 (de la monocouche) et 2 de multicouches. Alors que, la variété Kh donne les plus faibles teneurs en eau dans les zones 2 de multicouche et 3 d'eau faiblement liée. Cette différence pourrait être liée : aux différences de poids et de taille macromoléculaires, à la configuration spatiale des macromolécules et au nombre de sites de sorption.

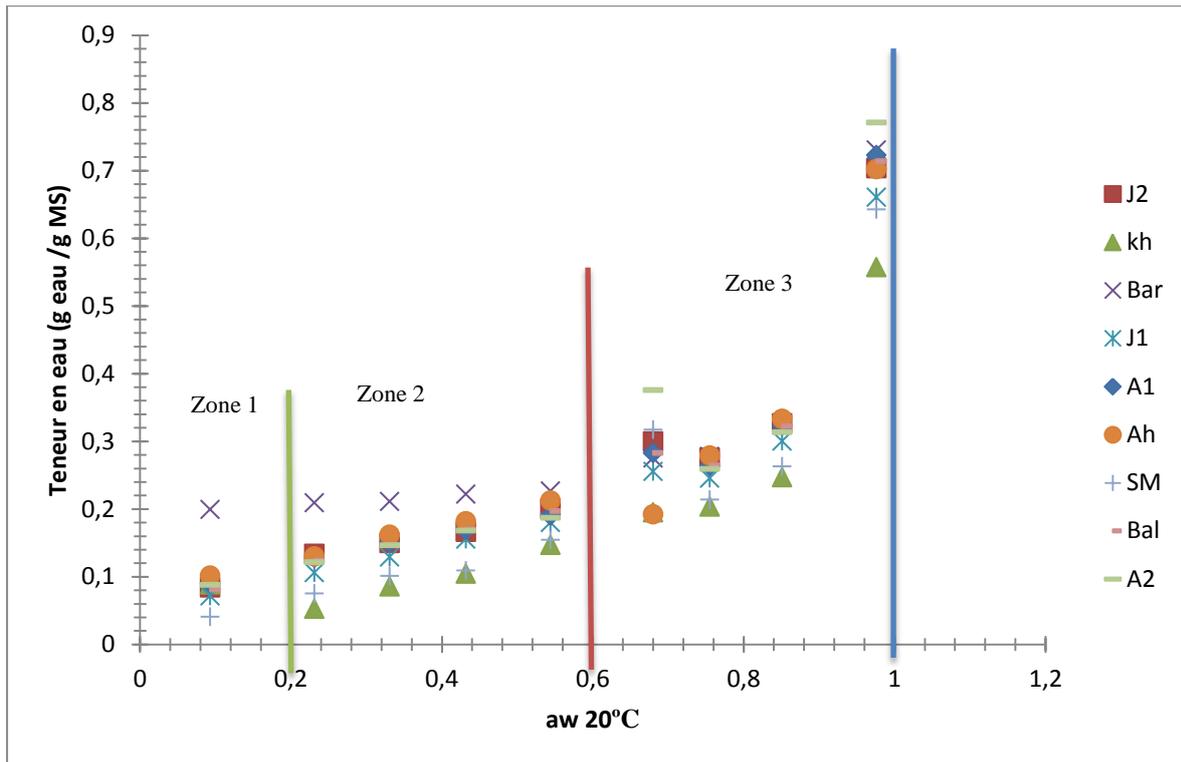


Figure. 12. Isothermes d'adsorption des différentes gommes de caroube

5.2.1 Modélisations des isothermes de sorption

Pour modéliser les isothermes de sorption de chaque gomme, huit modèles mathématiques ont été testé pour trouver le meilleur modèle qui optimise le lissage des points expérimentaux. Ainsi, les résultats des huit modèles sont présentés dans le tableau 10.

5.2.2 Identification des coefficients des modèles

Les méthodes d'optimisation utilisées pour identifier les coefficients des modèles des isothermes de sorption, dépendent de la forme du modèle utilisé. Dans la plupart de cas, quand on peut linéariser le modèle concerné on utilise la méthode de régression linéaire.

Dans le cas où le modèle est non linéaire, les coefficients sont calculés par des méthodes d'optimisation non linéaires en utilisant le système Solver du logiciel EXCEL, la fonction objective à minimiser est la suivante:

$$F = \sum_{i=1}^N (X_{i \text{ mes}} - X_{i \text{ calc}})^2$$

où:

$X_{i \text{ mes}}$ est la valeur expérimentale

$X_{i \text{ calc}}$ est la valeur prédite par le modèle

Pour évaluer l'aptitude de chaque modèle testé à lisser les courbes expérimentales, on a utilisé l'erreur relative moyenne (err%) :

$$\text{err \%} = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|X_{i \text{ mes}} - X_{i \text{ calc}}|}{X_{i \text{ mes}}}$$

On a classé les modèles en fonction des err%, le plus satisfaisant étant celui qui a donné la plus faible valeur d'erreur relative. Ainsi, le modèle d'Oswin était le plus approprié pour décrire les isothermes de sorption des gommés des variétés A1, A2, J2, J1, SM, et Bal, Ah alors que GAB était le plus performants pour lisser l'isotherme de la gomme Kh, et le modèle Iglesias et Chirifie était le meilleurs pour lisser Bar. Ainsi, à partir de ces modèles on peut déterminer à chaque point des isothermes, les a_w ou les teneurs en eau de chaque gomme purifiée déjà étudié.

| Auteurs | Oswin | Halsey modifié | Henderson | Iglesias and Chirife modifié | Chung and Post | Harkins and Jura | Bradley | Guggenheim Anderson Boer (GAB) |
|---------------|---|---|--|---|---------------------------------------|---|--|---|
| Modele | $X = K1 \cdot \left(\frac{2w}{1-a_w}\right)^{K2}$ | $X = \left(\frac{K1}{\ln(a_w)}\right)^{K2}$ | $X = \left(\frac{\ln(a_w - a_{w0})}{K1}\right)^{K2}$ | $\ln a_w = \frac{-K1}{X^{K2}}$ | $\ln a_w = -K1 \ln(X^{K2} - K2X)$ | $X = \left(\frac{-1}{K1 + K2 \ln a_w}\right)^{0.5}$ | $\ln a_w = K1K2^X$ | $X = \frac{C \cdot K \cdot a_w}{(1 - K \cdot a_w) \cdot (1 - K \cdot a_w + C \cdot K \cdot a_w)}$ |
| A1 | K1=18,715 K2=0,365 ERR%=4,477 | K2=0,111 K1=6,055 ERR%=7,087 | K2=2,118 K1=0,001 ERR%=9,408 | K2=2,464 K1=6,765 ERR%=7,219 | K2=0,111 K1=6,045 ERR%=7,089 | K1=1,02E-04 K2=0,004130636 ERR%=6,735418999 | K2=0,895 K1=6,049 ERR%=7,090 | C=32,744 K=0,866 Xm=10,943 ERR%=6,371 |
| J2 | K1=18,797 K2=0,356 ERR%=4,477 | K2=0,111 K1=6,055 ERR%=7,087 | K2=2,118 K1=0,0012 ERR%=9,408 | K2=2,464 K1=6,765 ERR%=7,219 | K2=0,111 K1=6,045 ERR%=7,089 | K1=1,02E-04 K2=0,004 ERR%=6,735 | K2=0,895 K1=6,049 ERR%=7,090 | C=32,744 K=0,866 Xm=10,943 ERR%=6,371 |
| Kh | K1=12,884 K2=0,39 ERR%=15,496 | K2=0,094 K1=2,404 ERR%=16,724 | K2=2,000 K1=3,000 ERR%=96,517 | K2=1,966 K1=4,436 ERR%=16,489 | K2=0,675 K1=961,292 ERR%=36,322 | K1=0,000 K2=0,008 ERR%=16,479 | K2=0,346 K1=28000,00 ERR%=38,652 | C=121,568 K=0,906 Xm=6,460 ERR%=12,516 |
| Bar | K1=23,879 K2=0,177 ERR%=9,07 | K2=0,171 K1=41,741 ERR%=9,019 | K2=3,046 K1=4,697E-05 ERR%=13,818 | K2=4,447 K1=13,656 ERR%=6,878 | K2=0,953 K1=1304 ERR%=15,196 | K1=-0,0001 K2=0,003 ERR%=16,253 | K2=0,843 K1=41,715 ERR%=9,0189 | C=578,261 K=0,8544 Xm=12,143 ERR%=16,203 |
| J1 | K1=16,726 K2=0,371 ERR%=3,206 | K2=0,121 K1=5,500 ERR%=6,561 | K2=1,915 K1=0,003 ERR%=7,900 | K2=2,276 K1=5,920 ERR%=8,736 | K2=0,117 K1=5,158 ERR%=6,547 | K1=-5,01E-05 K2=7,37E-03 ERR%=12,165 | K2=0,887 K1=5,375 ERR%=6,556 | C=21,796 K=0,872 Xm=9,933 ERR%=5,690 |
| Ab | K1= 19,954 K2= 0,338 ERR%=6,8153 | K2=0,117 K1=7,297 ERR%=8,502 | K2=2,105 K1=0,001 ERR%=11,246 | K2=2,526 K1=7,032 R2=-0,987 ERR%=7,064 | K2=0,117 K1=7,314 ERR%=8,502 | K1=-0,0001 K2=0,004 ERR%=6,892 | K2=0,890 K1=7,253 ERR%=8,502 | C=33,578 K=0,577 ERR%=11,350 Xm=14,645 |
| SM | K1=13,248 K2=0,426 ERR%=10,590 | K2=0,123 K1=3,871 ERR%=11,442 | K2=1,595 K1=0,010 ERR%=10,749 | K2=2,114 K1=5,084 ERR%=19,817 | K2=0,123 K1=3,925 ERR%=11,409 | K1=-2,27E-06 K2=9,88E-03 ERR%=17,555 | K2=0,884 K1=3,925 ERR%=11,409 | C=29,780 K=0,919 Xm=6,662 ERR%=12,419 |
| Bal | K1=18,591 K2=0,363 ERR%=3,874 | K2=0,116 K1=6,053 ERR%=6,073 | K2=2,021 K1=0,002 ERR%=8,402 | K2=2,414 K1=6,586 ERR%=7,580 | K2=0,117 K1=7,314 ERR%=11,933 | K1=0,000 K2=0,004 ERR%=7,393 | K2=0,891 K1=6,022 ERR%=6,078 | C=7,812 K=0,854 Xm=12,049 ERR%=7,386 |
| A2 | K1=18,379 K2=0,324 ERR%=7,828 | K2=0,122 K1=6,540 ERR%=10,279 | K2=2,160 K1=0,001 ERR%=12,457 | K3=2,244 K=6,032 ERR%=8,094 | K2=0,121 K1=6,519 ERR%=10,283 | K1=-5,661E-05 K2=4,602E-03 ERR%=8,256 | K2=0,886 K1=6,511 ERR%=10,285 | C=26,503 K=0,717 Xm=12,503 ERR%=9,434 |

Ce qui offre à la gomme libanaise, une base d'informations dans le contrôle des conditions fonctionnelles pour une meilleure conservation durant l'opération de stockage.

Le modèle BET (Baunauer, Emmett et Tellar) permet de déterminer la teneur en eau de la monocouche (Pour des a_w entre 0 et 0,4). Ce paramètre est important dans l'étude des détériorations des aliments (Erol et Tsami, 1991). Les valeurs des teneurs en eau de la monocouche (X_m) de variétés étudiées sont récapitulées dans le tableau 11. Une différence entre les valeurs de X_m est remarquée entre les variétés. La teneur en eau de la monocouche est la plus faible pour la gomme de Kh (5.989), et la plus élevée pour

Tableau.11:Teneur en eau X_m des monocouches de gommes déterminées à partir du modèle BET

| Variétés | Modèle de BET | |
|------------|--|-----------------------------|
| Kh | R2=0.931 CB=47.619 Xm=5.989 | |
| Bar | R2=0.994 CB=-22.679 Xm=11.169 | |
| A1 | R2=0.998 CB=157.755 Xm=9.982 | Moyenne= 9.542± 1.19 |
| J2 | R2=0.996 CB=153.044 Xm=9.925 | |
| J1 | R2=0.997 CB=53.917 Xm=9.210 | |
| Ah | R2=0.999 CB=154.387 Xm=10.662 | |
| SM | R2=0.983 CB=29.812 Xm=7.029 | |
| Bal | R2=0.997 CB=73.872 Xm=10.119 | |
| A2 | R2=0.999 CB=112.057 Xm=9.883 | |

la variété Barri (11.169). Tandis que, pour les autres variétés les teneurs en eau de la monocouche sont proches les unes des autres. Alors, ces gommes offrent une teneur en eau X_m avec une moyenne de toutes les variétés de 9.542 ± 1.19 .

Ainsi, cette investigation complémentaire obtenue a permis de donner des informations sur l'hygroscopicité de ces gommes afin de mieux les utiliser lors de la formulation des aliments ou de médicaments, ainsi que pour le conditionnement de ces gommes afin de prolonger leur durée de conservation sans qu'il y ait altération de leurs qualités fonctionnelles et nutritionnelles.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Malgré le grand intérêt écologique et le potentiel économique des différentes parties de caroube (gousse et graines) et leur utilisation dans différentes applications (industrie alimentaire, pharmacologique, cosmétique,...), peu d'études sont disponibles sur la caroube libanaise.

Cette thèse a permis d'établir une base de données scientifique sur toutes les variétés libanaises ainsi que les facteurs affectant leurs propriétés. Des nouvelles connaissances ont été apportées concernant les caractéristiques morphologiques et chimiques de la gousse et des graines. Ces caractéristiques ont été corrélées avec la localisation géographique. De même, les caractéristiques physico-chimiques et rhéologiques des différentes gommes, ainsi que leurs isothermes de sorption ont été établies pour les différentes variétés étudiées. L'ensemble de ces informations ouvre des nouvelles niches d'applications dans les domaines alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques et renforce le potentiel écologique des ces arbres pour lutter contre l'érosion du sol de certaines régions Libanaises.

Les caractéristiques morphologiques et la composition chimique des types sauvages et cultivés des caroubes libanaises ont été évaluées pour établir une corrélation entre les paramètres morphologiques, chimiques et les facteurs géographiques. De même, pour sélectionner les variétés qui permettront le développement d'un programme d'hybridation afin d'obtenir des cultivars libanais qui pourraient être exploitées pour la plantation de nouveaux vergers avec des variétés plus performantes (rendement élevé soit en gousse soit en graines avec la meilleure qualité).

La recherche des corrélations entre la morphologie des gousses, des graines et leurs compositions et la localisation géographique a permis de classer les 9 populations étudiées en

2 populations non groupés (Kh et Bar) et les 7 autres en 2 groupements. Ainsi, en termes de taille des gousses, Kh avait la taille la plus grande. Alors, qu'en termes de graines la variété sauvage Barri (Bar) avait la plus haute teneur en graines et en polyphénols. Le nombre élevé des graines est synonyme d'un pourcentage élevé en LBG) et la richesse en polyphénols est un bon indicateur sur un pouvoir antioxydant élevé.).

La variété J2 présente le pourcentage de sucres le plus élevé, alors que les variétés SM et Ahmar sont les plus riches en protéines. La différence observée aussi bien au niveau de la morphologie que la composition chimique des gousses est étroitement corrélée à la position géographique des plantes, et plus particulièrement à l'altitude. De même la différence morphologiques et chimiques peut être liée au degré de maturation qui n'était pas le même selon les prélèvements.

La distribution de taille, la charge, la masse macromoléculaire et les propriétés rhéologiques des gomme purifiées ont été étudiées pour les 9 variétés. Les résultats obtenus ont montré que le rendement de la gomme (40 à 60%), la charge (de -2,67 à -12,95), la distribution de taille (56,37 nm à 92,23 nm), le poids moléculaire moyen en poids (535-826 kDa) et la viscosité intrinsèque $[\eta]$ (de 7,25 à 10,76 dl / g) varient considérablement selon la variété et la localisation géographique. La plus grande différence a été observée pour la distribution de taille et le poids moléculaire. Les études rhéologiques des gomme purifiées, à une concentration de 1%, ont montré un comportement pseudo-plastique quelle que soit la variété étudiée. En effet, la viscosité apparente des gomme est une fonction décroissante en fonction du taux de cisaillement. Ce comportement non Newtonien a été bien ajusté par une loi de puissance selon le modèle Ostwald-de Waele. La différence observée dans le profil rhéologique entre les 9 populations pourrait être liée au contenu de galactomannane en d'autres termes au rapport Mannose/Galactose, au masse moléculaire, ou à la diversité dans

l'origine géographique. Ces études ont montré aussi que les solutions des LBGs sont des fluides thermo-dépendants. L'augmentation de la température provoque une diminution progressive de la viscosité. Cependant, par rapport à d'autres macromolécules, cette viscosité demeure relativement élevée. Ceci est peut être attribuée à la masse moléculaire élevée du galactomannane de la gomme de caroube. Les meilleures propriétés épaississantes ont été obtenues avec les variétés A1 et A2. Ces deux variétés présentaient une teneur élevée en galactomannane.

La détermination du rapport mannose galactose et du contenu en galactose a été menée pour apporter des informations complémentaires et expliquer les différences observées au niveau des propriétés macromoléculaire et rhéologique entre les différentes gommes. Ainsi, il ressort de cette étude (chapitre 5, première partie) que la teneur en galactose influence les caractéristiques macromoléculaires (masse molaire et viscosité intrinsèque) et les propriétés fonctionnelles des galactomannanes. Ces dernières contrôlent le mécanisme des interactions macromoléculaires qui s'expliquent par l'augmentation de la force des interactions avec la diminution du nombre d'unités galactose et sa distribution dans les galactomannanes. Les résultats obtenus ont montré que les rapports M/G sont significativement différents entre les différentes gommes purifiées et varient entre $3,43 \pm 0,10$ pour J1 et $4,31 \pm 0,04$ pour A1. Cette différence pourrait être attribuée à la différence dans l'origine géographique ou à la différence entre les variétés. En fait, J1 avec le plus petit rapport (3,43) est géographiquement situé dans le sud du Liban, tandis que A1 avec le rapport le plus élevé (4,31) est situé dans le nord de Liban. De même, les résultats ont démontré que les gommes purifiées issue des variétés A1, Bal, SM et A2 avec un rapport $M/G > 4$ avaient les viscosités, viscosités intrinsèques et les masses moléculaires les plus élevées, alors que celles de Ah, J2, Kh, Bar, J1 avec des $M/G < 4$ avaient les viscosités, viscosités intrinsèques et les masses moléculaires les plus faibles. De même, l'augmentation du pourcentage de

galactose dans la chaîne de galactomannane (cas de Kh avec sa teneur la plus élevée en galactose, et sa $[\eta]$ et sa Mw les plus faible) peut aussi entraîner une diminution des interactions intermoléculaires conduisant ainsi à la diminution de la viscosité, de la Mw et de la viscosité intrinsèque.

Dans la 2ème partie du chapitre 5 les courbes d'isothermes de sorption des différentes gommes purifiées de caroube ont montré que, pour une même activité d'eau, la teneur en eau varie d'une gomme à une autre. Les allures sigmoïdales les plus distinctives ont été obtenues avec les variétés Bar et Kh. Cette différence pourraient être liée aux différences de masse macromoléculaires, à la configuration spatiale des macromolécules et au nombre de sites de sorption.

L'ensemble des isothermes de sorption ont fait l'objet d'une modélisation pour obtenir les paramètres caractéristiques de chaque variété. Ainsi, huit modèles mathématiques ont été utilisés pour optimiser le lissage de ces isothermes. Les résultats obtenus indiquent que le modèle d'Oswin était le plus approprié pour décrire les isothermes de sorption des gommes des variétés A1, A2, J2, J1, SM, et Bal, Ah, alors que le modèle GAB et Iglesias et Chirifie sont plus appropriés pour lisser respectivement les gommes Kh et Bar. De même, la teneur en eau de la monocouche a été déterminée par le modèle BET (Baunauer, Emmett et Tellar). Ce teneur de nouveau a révélé que les 2 variétés Kh (5.989) et Bar (11.169) étaient différents des autres. Pour les autres variétés, les teneurs en eau de la monocouche sont proches les unes des autres avec une moyenne X_m de 9.542 ± 1.19 .

L'ensemble de ces résultats issus des isothermes de sorption de différentes gommes libanaises permettent de définir des conditions appropriées pour chaque variété et une préservation adéquate des qualités fonctionnelles et nutritionnelles de ces gommes.

Perspectives

Perspectives

1. Développer des procédés d'extraction et de purification des sucres de la pulpe de caroube (vu sa teneur plus élevées en sucre que la canne à sucre et la betterave sucrière (limitations par polyphénol).

2. Etudes génétiques des différentes variétés afin de déterminer la variabilité. Ainsi que d'optimiser un programme d'hybridation pour faire sortir les variétés avec les caractéristiques les plus performantes.

3. Optimisation d'une méthode d'élimination des tanins des tourteaux de caroube (après extraction des mélasses) qui est un facteur Limitant dans l'alimentation des bétails (car la digestibilité des protéines est réduite par ces tannins, soit par liaison directe à certaines parties de la molécule ou par l'inhibition des enzymes digestives.

4. Investigations et développement des biofilms à partir des différentes gommes de caroube libanaises (la gomme produit un biofilm à des températures supérieures à 60°C). Et étudié leur perméabilité aux échanges gazeux.

*Références
Bibliographiques*

Références bibliographiques

Abi Azar R., (2007), Complexations des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier. Propriétés technologiques des coagulums obtenus, Agroparistech Ecole Doctorale Abies, Thèse de doctorat.

Ait Chitt M., Belmir M. et Lazrak A., (2007), Production des plantes sélectionnées et greffées du caroubier. Transfert de technologie en Agriculture, N°153, IAV Rabat, pp.1-4.

Albanell, E., Caja, G., Plaixats, J., (1991). Characteristics of Spanish carob pods and nutritive value of carob kibbles. *Cahiers Options Mediterranean* 16, 135–136.

Avallone R. , Plessi M. , Baraldi M. ,Monzan A., (1997). Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *J. Food Comp. Anal.*, 10 (2): 166-172.

Ayaz F.A., Torun H., Ayaz S., Correia P.J., Alaiz M., Sanz C., Gruz J.I. and Strand M., (2007). Determination of Chemical Composition of Anatolian Carob Pod (*Ceratonia siliqua* L.): Sugars, Amino and Organic Acids, Minerals and Phenolic Compounds, *Food Qual.* 30, 1040-1055.

Ayaz F. A., Torum H., R. H. Glew, Bak Z. D., Chuang L.T., Presley J. M. & Andrews R. (2009). Nutrient Content of Carob Pod (*Ceratonia siliqua* L.) Flour Prepared Commercially and Domestically. *Plant Foods Hum Nutr* 64, 286–292.

Azero, E.G. & Andrade, C.T. , 2002. Material Properties Testing procedures for galactomannan purification. *Polymer Testing*, 21, 551-556.

Bate-Smith, E.C., (1973). Hachm analysis of tannins: the concept of relative astringency. *Phytochemistry* 12, 907–911.

Battle, I. & Tous, J. (1997). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops (carob tree, *Ceratonia siliqua* L.). International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy.

Bargallo M.G., Di Lorenzo R., Meli R. & Crescimanno F. G., 1997. Characterization of carob gerplasm (*Ceratonia siliqua* L.) in Sicily. *J. Hortic. Sci.*, 72(4), 537-543.

Belgacem M.N. and Gandini A., editors. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Amsterdam: Elsevier, (2008). p.511. Bamforth C.W., 1999. Beer haze, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 57, no 81–90.

Bengoechea, C., Romero, A., Villanueva, A., Moreno, G., Alaiz, M., Milla´ n, F., Guerrero, A., Puppo, M.C., (2008). Composition and structure of carob (*Ceratonia siliqua* L) germ proteins. *Food Chemistry* 107, 675–683.

- Berrougui H., (2007). Le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.), une richesse nationale aux vertus médicinales. *Maghreb Canada Express* 5, 20.
- Biner B., H. Gubbuk, M. Karhan, M. Aksu, M. Pekmezci, (2007). Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food Chemistry* 100, 1453–1455.
- Bouzouita, N., Khaldi, A., Zgoulli, S., Chebil, L., Chekki, R., Chaabouni, M.M. & Thonart, P. (2007). The analysis of crude and purified locust bean gum: A comparison of samples from different carob tree populations in Tunisia. *Food Chemistry*, 101, 1508-1515.
- Bresolin T. M. B., Milas M., Rinaudo M, Reicher, F. and Ganter J. L. M. S. Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1999, 26, 225-231.
- Boscher, D., Van Caillie-Bertrand, M., & Deelstra, H. (2001). Effect of thickening agents, based on soluble dietary fiber, on the availability of calcium, iron, and zinc from infant formulas. *Nutrition*, 17(7-8), 614-618.
- Bernardo-Gil, M. G., Roque R., Roseiro L.B., Duarte L.C., Gírio, F., Esteves P., (2011). Supercritical extraction of carob kibbles (*Ceratonia siliqua* L.). *J. of Supercritical Fluids* 59, 36– 42.
- Bravo, L., Grados, N. and Calixto, F.S. (1994). Composition and Potential Uses of Mesquite Pods (*Prosopis pallid* L): Comparison with Carob Pods (*Ceratonia siliqua* L.). *J. Sci Food Agric.*, 65, 303-306.
- Calixto, F.S., Canellas, J., (1982). Components of nutritional interest in carob pods *Ceratonia siliqua*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 33, 1319–1323.
- Carneiro-da-Cunha M. G., Cerqueira M.A., Souza B.W.S.,Teixeira J. A., Vicente A. A., (2011). Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and meanhydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production *Carbohydrate Polymers* 85, 522–528.
- Correia, P. J., & Martins-Loucao, M. A. (1995). Seasonal variations of leaf water potential and growth in ferrigated carob-trees (*Ceratonia siliqua* L.). *Plant and Soil*, 172, 199–206.
- Correia, P. J., & Martins-Loucao, M. A. (2005). The use of macronutrients and water in marginal mediterranean areas: the case of carob-tree. *Field Crops Research*, 91, 1–6.
- Corsi L., R. Avallone, F. Cosenza, F. Farina, C. Baraldi, M. Baraldi, (2002). Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line, *Fitoterapia* 73 674–684.
- Custódio, L., Carneiro, M. F. & Romano, A. (2005). Microsporogenesis and anther culture in carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *Scientia Horticulturae*, 104: 65–77.

Custódio L., A.L. Escapa, E. Fernandes, A. Fajardo, A. Rosa, F. Albericio, N. Neng, J.M.F. Nogueira, A. Romano, (2011). Phytochemical profile antioxidant cytotoxic activities of the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) germ flour extracts, *Plant Foods Human Nutrition* 66 78–84.

Dakia, P. A., Wathelet, B. & Paquot, M. (2007). Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ. *Food Chemistry*, 102, 1368-1374.

Dakia, P. A., Blecker, C., Roberta, C., Wathelet, B. & Paquot M. (2008). Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. *Food Hydrocolloids*, 22, 807-818.

Dakia P.A., Wathelet B. & Paquot M. (2010). Influence of galactose content on interactions phenomena and on galactomannans physicochemical properties in solution. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14(1), 213-223.

Da Silva J.A.L. & Gonçalves M.P., (1990). Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with isopropanol. *Food Hydrocolloids*, 4, 277-287.

Diamantoglou and Mitrakos K. (1981). Leaf longevity in Mediterranean evergreen sclerophylls. In *Components of Productivity of Mediterranean Climate Region. Basic and Applied Aspects*(N.S.Margaris and H.A. Mooney, eds), pp: 17-19. Junk Publishers, The Hague ISBN. 90: 6193-9445.

Dubois, M., K. A. Gilles, et al. (1956). "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances". *Analytical Chemistry* 28: 350-356.

Dea, I. C. M. & Morrison, A. (1975), Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 31, 241-312.

Dea, I. C. M., McKinnon, A. A., Rees, D. A., (1972). Tertiary and quaternary structure in aqueous polysaccharide systems which model cell wall cohesion: reversible changes in conformation and association of agarose, carrageenan and galactomannans. *J. Mol. Biol.*, 68, 153-72.

Dewick P. M., (1995). «The Biosynthesis of Shikimate Metabolites», *Natural Product Reports*, 12, 579-607,

Estéphan, J. (2002). Lebanon, country reports, Ministry of Agriculture-Beirut, retrieved from <http://www.google.com/search?q=cache:tZiwpCPF3A0J:ressources.ciheam.org/om/pdfb40/02001653.pdf+carob+molasses&hl=en&ct=clnk&cd=4>.

FAOSTAT (2010), www.fao.org

Feillet, P., & Roulland, T. M. (1998). Caroubin: A gluten-like protein isolate from carob bean germ. *Cereal Chemistry*, 75, 488–492.

Filioglou, M. D., & Alexis, M. N. (1987). Use of the carob products in trout nutrition: the effects of growth inhibitors of the carob seed germ meal on digestion and studies on deactivation methods. *Proceedings of the Second Panhellenic Symposium of Oceanography and Fisheries* 618-624.

Filioglou, M. D., & Alexis, M. N. (1989). Protein digestibility and enzyme activity in the digestive tract of rainbow trout fed diets containing increasing levels of carob seed germ meal. In N. De Pauw, E. Jaspers, H. Ackefors, & N. Wilkins (Eds.), *Aquaculture. A biotechnology in progress* (pp. 839-843). Bredene, Belgium: European Aquaculture Society.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2001). *Non-wood Forest Products in the Near East: A Regional and National Overview*. FAO Corporate Document Repository, 3. Country reports, 3.8, Lebanon. Retrieved on 12-18- 2006 from <http://www.fao.org/docrep/003/Y1797E/y1797e13.htm>.

Food and Agriculture organization of the United Nations, 2003-2004 FAOSTAT Carob Tree. *Production Mondiale du Caroubier*. (<http://www.fao.org>)

Fox, J. E., 1992. *Seed Gums. Thickening and gelling agents for food*. A. Imeson., Chapman and Hall (pp.153-169). London.

Gharnit N., Mtili N., Ennabili A. T. and Ennabili A. (2001). Social characterization and exploitation of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) from Mokrisset and Bab Taza (NW of Morocco). *Sci. Lett.* 3 n^o2.

Garti N., Madar Z., Aserin A. & Sternheim B., (1997). Fenugreek galactomannans as food emulsifiers. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 30(3), 305-311.

Gonçalves, S., Correia, P.J., Martins-Loução, M.A. and Romano, A., (2005). A new medium formulation for in vitro rooting of carob tree based on leaf macronutrients concentrations, *Biologia Plantarum* 49 (2), 277-280.

Girolamo, R., Laura, D., (2002). Evaluation and preservation of genetic resources of carob (*Ceratonia siliqua* L.) in southern of Italy for pharmaceutical use. *Breeding Research on Aromatic and Medicinal Plants* 9, 367–372.

Gruendel S., A.L. Garcia, B. Otto, C. Mueller, J. Steiniger, M.O. Weickert, M. Speth, N. Katz, C. Koebnick, (2006). Carob pulp preparation rich in insoluble fiber and polyphenols enhances lipid oxidation and lowers postprandial acylated ghrelin, *British J. Nutrition* 136 1533–1538.

Gruendel S., B. Otto, A.L. Garcia, K. Wagner, C. Mueller, M.O. Weickert, W. Heldwein, C. Koebnick, (2007). Carob pulp preparation rich in insoluble dietary fibre and polyphenols increases plasma glucose and serum insulin responses in combination with a glucose load in humans, *British J. Nutrition* 98 101–105.

Guggenbichler J.P., (1983). Adherence of enterobacteria in infantile diarrhea and its prevention. *Infection*, 11, 239-242.

Goycoola F.M., Morris E.R. & Gidley M.J., (1995). Viscosity of galactomannans at alkaline and neutral pH: evidence of “hyperentanglement” in solution. *Carbohydr. Polym.*, 27, 69-71.

Gaisford, S. E., Harding, S. E., Mitchell, J. R. & Bradley, T. D. (1986). A comparison between the hot and cold water soluble fractions of two locust bean gum samples. *Carbohydrate Polymers*, 6, 423-442.

Haddarah, A., Ismail, A., Bassal, A., Hamieh, T., Ioannou, I., Ghoul, M., (2013). Morphological and chemical variability of Lebanese carob varieties. *European Scientific Journal*, 9 (18), 353-369.

Hariri A., N.Ouis, Sahnouni F et D.Bouhadi (2009), mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube, *rev. microbiol. ind. san et environn.* pp. 37-55.

Iipumbu, L., Sigge, G.O., & Britz, T.J. (2008). Compositional analysis of locally cultivated carob (*Ceratonia Siliqua*) cultivars and development of nutritional food products for a range of market sectors. South Africa: Faculty of AgriSciences, department of Food Sciences, Stellenbosch University.

Klenow S., M. Gleib, B. Haber, R. Owen, Pool-Zobel L., (2008). Carob fibre compounds modulate parameters of cell growth differently in human HT29 colon adenocarcinoma cells than in LT97 colon adenoma cells, *Food and Chemical Toxicology* 46 1389–1397.

Klenow S., Jahns F., Pool-Zobel L., M. Gleib, (2009) Does an extract of carob (*Ceratonia siliqua* L.) have chemopreventive potential related to oxidative stress and drug metabolism in human colon cells? *J. Agriculture and Food Chemistry* 57 2999–3004.

Kök M. S., Hill S. E. and Mitchell, J. R. A comparison of the rheological behaviour of crude and refined locust bean gum preparations during thermal processing. *Carbohydr. Polym.*, 1999, 38, 261-265.

Kok M. S., Hill S. E., et al. (1999). A comparison of the rheological behaviour of crude and refined locust bean gum preparations during thermal processing. *Carbohydrate Polymers* 38(3): 261-265.

Hoichman, D., Gromova., L.I., Sela, J., (2007). Synergistic gel formation in aqueous solutions of guar–gellan composition. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 41, 42–45.

Karkacier, M., Artık, N., (1995). Determination of physical properties, chemical composition and extraction conditions of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.). *Gıda* 20 (3), 131–136.

Kumazawa, S., Taniguchi, M., Suzuki, Y., Shimura, M., Kwon M.S., Nakayama, T., (2002). Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *J Agric Food Chem.*50:373–7.

Labuza T.P. and Altunakar B.,(1970) .Chap 5 Water activity prediction and moisture sorption isotherms in Water activity in foods Fundamentals and applications 2008 Editors G.V. Barbosa-Cánovas, A. J. Fontana, Jr., S.J. Schmidt, T. P. Labuza 109p.

Lafuente, B., 1961. Azticares de la algarroba I. La fermentación selectiva de las hexosas en la obtención de sacarosa. *Revista de Agricultura y Tecnologia de Alimentos* 1, 1–7.

Lazaridou A., Biliaderis C.G. & Izydorczyk M.S, 2000. Structural characteristics and rheological properties of locust bean galactomannans: a comparison of samples from different carob tree populations. *J. Sci. Food Agric.*, 81, 68-75.

- Linskens H. and Scholten W. (1980). The flower of carob. *Potug. Acta. Bilo. (A) XVI (1-4):95-102.*
- Lizardo R., Cañellas J., MAS F., Torrallardona D., Brufau J., (2002). L'utilisation de la farine de caroube dans les aliments de sevrage et son influence sur les performances et la santé des porcelets. *Journées de la Recherche Porcine*, 34, 97-101.
- Loeb H., Vandenplas Y., Würsch P., Guesry P., (1989). Tannin-rich carob pod for the treatment of acute onset diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 8, 480-485.
- Maier, H., Anderson, M., Karl, C., Magnuson, K. & Whistler, R. L. (1993). Guar, locust bean, tara and fenugreek gums. In R. L. Whistler, J. N. BeMiller (Eds.), *Industrial Gums, Polysaccharides and their Derivates* (pp. 205-215). Academic Press, San Diego.
- Mao C.F. & Chen J.C., 2006. Interchain association of locust bean gum in sucrose solutions: an interpretation based on thixotropic behavior. *Food Hydrocolloids*, 20 (5), 730-739.
- Matthausa B., Ozcan M. M., (2011). Lipid evaluation of cultivated and wild carob (*Ceratonia siliqua L.*) seed oil growing in Turkey. *Scientia Horticulturae* 130 181–184.
- Lopes Da Silva J.A., Gonçalves M.P. & Rao M.A., (1992). Rheological Properties of High-Methoxyl Pectin and Locust Bean Gum Solutions in Steady Shear. *Journal of Food Science*, 57 (2), 443-448
- Lopes da Silva, J. A., Gonçalves, M. P., Doublier, J. L. & Axelos, M. A. V. (1996). Effect of galactomannans on the viscoelastic behavior of pectin/ calcium networks. *Polymer Gels and Networks*, 4, 65-83.
- Manso, T., Nunes, C., Raposo, S., Lima-Costa, M.E., 2010. Carob pulp as raw material for production of the biocontrol agent *P. agglomerans* PBC-1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1367–5435.
- Markis, D.P & Kefalas, P. (2004). Carob pods (*Ceratonia siliqua L.*) as a source of polyphenolic Antioxidants. *Food technol*, 42 (2), 105-108.
- Marakis, S., Kalaitzakis J. & Mitrakos K. (1988). Criteria for recognizing carob tree varieties. In: Fito, P., Mulet, A. (Eds.), *Proceedings of the II International Carob Symposium Valencia, Spain*, pp. 558-566.
- Marakis S., 1996. Carob bean in food and feed: current status and future potentials-A critical appraisal. *J Food Sci Technol*. 33, 365-383.
- Mathur N.K., (2011). Functional properties of hydrocolloids and their structure-function correlation. *Industrial Galactomannan Polysaccharides*. Chap 3, CRC Press.
- McCleary B.V., Dea I.C.M., Windust J. & Cooke D., (1984). Interaction properties of D-galactose-depleted guar galactomannan samples. *Carbohydr. Polym.*, 4(4), 253-270.
- McCleary B.V., Clark A.H., Dea I.C.M. & Rees D.A., (1985). The fine structures of carob and guar galactomannans. *Carbohydr. Res.*, 139, 237-260.

- McCleary B.V., (1988). Carob and guar galactomannans. *Methods Enzymol.*, 160, 523-527.
- Makris, D.P., Kefalas, P., (2004). Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Technology and Biotechnology* 42, 105–108.
- Multon J.L., (1984). *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires*. Paris: Lavoisier.
- Neukom, H. (1988). Carob bean gum: properties and applications. In: P.Fito, A. Mulet (Eds.), *Proceedings of the III International Carob Symposium* (pp. 551-555). Valencia, Spain.
- Neukom, H. 1989. Galactomannans: Properties and applications. *Lebensm. Wiss. Technol.* 22, 41–45.
- Orphanos P.I. & Papaconstantinou J. (1969). The carob varieties of Cyprus. *Tech. Bull.*, 5. Cyprus Agricultural Research Institute. Ministry of Agriculture and Natural Resources. Nicosia.
- Owens, H. S, Lotzkar, H., Schultz, Th. & Maclay, W. D. (1946). Shape and size of pectinic acid molecules deduced from viscometric measurements. *Journal of the American Chemical Society*, 68(8), 1628-1632.
- Owen R.W., Haubner R., Hull W.E., Erben G., Spiegelhalder B., Bartsch H., Haber B., (2003). Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food Chem Toxicol.* 41, 1727–1738.
- Papagiannopoulos M., H.R. Wollseifen, A. Mellenthin, B. Haber and R. Galensa (2004). Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/ MSn, *J. Agric. Food Chem.* 52, 3784-3791.
- Patmore J.V., Goff H.D. & Fandes S., (2003). Cryo-gelation of galactomannans in ice cream model systems. *Food Hydrocolloids*, 17(2), 161-169.
- Petit M. D. & Pinilla J. M., (1995). Production and Purification of a Sugar Pods Syrup from Carob Pods *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 28, 145-152.
- Plowright, T. R. (1951). The use of carob flour (Arobon) in a controlled series of infant diarrhoea. *J. Pediatr.*, 39, 16.
- Pollard, M. A., & Fischer, P. (2006). Partial aqueous solubility of low-galactosecontent galactomannans –what is the quantitative basis? *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11(2–3), 184–190.
- Pollard, M. A., Kelly, R., Wahl, C., Fischer, P., Windhab, E., Eder, B. & Amado, R. (2007). Investigation of equilibrium solubility of a carob galactomannan. *Food Hydrocolloids*, 21, 683-692.
- Pollard, M. A., Kelly, R., Fischer, P., Windhab, E., Eder, B. & Amado, R. (2008). Investigation of molecular weight distribution of LBG galactomannan for flours prepared from individual seeds mixtures and commercial samples. *Food Hydrocolloids*, 22, 1596-1606.

- Rejeb M. N. (1995). Le caroubier en Tunisie: Situations et perspectives d'amélioration, in *Quel avenir pour l'amélioration des plantes?* Edit. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 79-85.
- Richardson P. H., Willmer J. and Foster T. J. Dilute solute properties of guar and LBG in sucrose solution. *Food Hydrocolloids*, 1998, 12, 339-348. Rinaudo M., (2001). Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. *Food Hydrocolloids*, 15, 433-440.
- Rizzo, V., Tomaselli, F., Gentile, A., La Malfa, S. & Maccarone, E., 2004. Rheological Properties and Sugar Composition of Locust Bean Gum from Different Carob Varieties (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7925-7930.
- Roukas T., (1993). Ethanol production from carob pods by *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Biotechnology* 7,159–176.
- Roukas T., (1996). Continuous ethanol production from nonsterilized carob pod extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on mineral kissiris using a two-reactor system, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 59, 299–307.
- Roukas T., (1998). Citric acid production from carob pod extract by cell recycle of *Aspergillus niger*, *Food Biotechnology* 12, 91–104.
- Roukas T., (1999). Citric acid production from carob pod by solid-state fermentation, *Enzyme and Microbial Technology* 24, 54–59.
- Santos M., Rodrigues A, Teixeira J. A., (2005). Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f), *Biochemical Engineering Journal* 25, 1–6.
- Samil K k M., (2007). A comparative study on the compositions of crude and refined locust bean gum: In relation to rheological properties, *Carbohydrate Polymers* 70, 68–76.
- Shawakfeh, K. and Ereifej, K. I., 2005. Pod Characteristics of two *Ceratonia siliqua* L. Varieties from Jordan. *Ital. J. Food Sci.* 17 (2):187–194.
- Sittikijyothin, W., Torres, D. & Gonçalves, M. P., (2005). Modeling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 59, 339-350.
- Srivastava M. and Kapoor V. P., (2005). Seed galactomannans: An overview. *Chemistry and Biodiversity*, 2, 295–317.
- Smith B.M., Bean S.R., Schober T.J., Tilley M., Herald T.J., Aramouni F., (2010). Composition and molecular weight distribution of carob germ protein fractions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58(13),7794-800.
- Tous J., Batlle I. and Romero A. (1995). Prospecci n de variedades de algarrob en Andaluc a. *Informaci n T cnica Econ mica Agraria*. 91 (3):164-174.
- Tous J., Romero A., Plana J. and Batlle I. (1996). Current situation of carob plant material. In *Proceedings of the III International Carob Symposium*. Cabanas-Tavira. Portugal (in press)

- Tous, J., Romero, A., Hermoso, J.F., Ninot, A., Plana, J., Battle, I., 2009. Agronomic and commercial performance of four Spanish carob cultivars. *HortTechnol.* 19, 465–470.
- Tucker S. C. (1992a). The developmental basis for sexual expression in *Ceratonia siliqua* (Leguminosae:Cesalpinoideae: Cassieae). *Am. J. Bot.* 79 (3): 367-327.
- Tucker S. C. (1992b.) The role of floral development in studies of legume evolution. *Can. J. Bot.* 70:692-700.
- Turhan, I., Bialka, K.L., Demirci, A., Karhan, M., (2010). Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* 101, 5290–5296.
- Vieira I. G. P. V., Mendes F. N. P., Gallao M. I. and Brito E. S., (2007). NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). *Food Chemistry*, 101, 70–73.
- Vourdoubas, J., Makris, P., Kefalas, J., Kaliakatsos, G., (2002). In: Proceedings of the 12th National Conference and Technology Exhibition on Biomass for Energy. Industry and Climate Protection, Amsterdam, pp. 489–493.
- Wang Y., Belton P. S, Bridon H., Garanger E., Wellner N., Parker M. L., Grant A., Feillet P., and Noel T.R, (2001). Physicochemical Studies of Caroubin: A Gluten-like Protein, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3414-3419.
- Wang, Q., & Cui, S. W. (2005). Understanding the Physical Properties of Food Polysaccharides, *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications*, (Chap 4).
- Winer, N., (1980). The potencial of the carob (*Ceratonia siliqua* L). *Int. Tree Crops J.* 1, 15–26.
- Yousif, A. K., & Alghzawi, H. M. (2000). Processing and characterization of carob powder. *Food Chemistry*, 69, 283–287.
- Zengin E., Aka Sagliker H., Darici C., (2008). Carbon Mineralization of *Ceratonia siliqua* L. Soils under Different Temperature and Humidity Conditions, *Turk J Bot*, 32,123-127.
- Zunft H.J.F., Luder W., A. Harde, B. Haber, H.J. Graubaum, J. Grunwald, (2001). Carob pulp preparation for treatment of hypercholesterolemia, *Advances in Therapy* 18, 230–236
- Zunft H.J., Luder W., Harde A., Haber B., Graubaum H.J., Koebnick C., Grunwald J, (2003). Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients. *Eur J Nutr*, 42, 235–242.

Titre : L'influence de cultivar sur les propriétés fonctionnelles alimentaires de la caroube libanaise

Résumé: Le caroubier est considéré comme l'un des arbres fruitiers et forestiers qui présente le plus grand potentiel de valorisation puisque toutes les parties de cette plante sont utilisables dans plusieurs applications industriels. Le caroubier est cultivé dans plusieurs régions du Liban mais peu d'études sont disponibles sur les voies de valorisation et sur les propriétés fonctionnelles et structurales des graines et des gousses. Ainsi, dans le cadre d'une démarche qui vise à promouvoir et contribuer à une meilleure valorisation et gestion de cette ressource renouvelable, nous avons entrepris dans cette thèse des travaux consacrés à la caractérisation et à l'évaluation de la valeur nutritive et fonctionnelle des gousses de caroube issues de plusieurs régions Libanaise. Ces travaux ont porté notamment sur la caractérisation morphologique et physico-chimique des gousses et sur la purification des gommages extraits des graines. Ces gommages ont fait l'objet d'une étude approfondie portant sur leur comportement rhéologique et la relation entre ce comportement, la variété et le lieu géographique. Nous avons aussi déterminé les isothermes de sorption de ces gommages pour prédire les conditions idéales de leur conservation.

Les résultats obtenus à l'issue de cette étude ont démontré clairement la présence des corrélations morphologie, composition chimique et coordonnées géographiques de différents cultivars étudiés. De même, les études structurales et rhéologiques ont montrées des différences significatives entre les gommages purifiés. Cette différence semble être liée à une variation du rapport galactose/mannose et de la masse molaire observée selon les variétés. Par ailleurs, les études des isothermes de sorption ont permis de fournir des informations complémentaires sur leurs hygroscopicités et par conséquent sur les conditions idéales de leur conservation.

Mots clés : Caroube, Rheologie, Gomme de caroube, Comportement viscoélastique, Rapport mannose galactose, Galactomannane, Isotherme de Sorption.

Title: The influence of cultivar on food functional properties of the Lebanese carob

Abstract: The carob plant is considered as one of the fruit and forester tree that has the greatest potential of valorization since all the parts of this plant can be used in several food and cosmetic applications. The carob is cultivated in several areas of Lebanon but few studies are available on the ways of valorization and the functional and structural properties of the different fractions of this tree (seeds and pods). Thus, in view to develop a strategy aims to promote and contribute to a better valorization and management of this renewable resource, we undertook in this thesis of work devoted to the characterization and the evaluation of nutritive and functional properties of the carob pods resulting from several Lebanese areas. This work focused particularly on the morphological and physicochemical characterization of the pods and the purified fraction of gum. These gums were the subject of a thorough study relating to their rheological behavior and the relation between this behavior, the variety and the geographical localization of the studied varieties. We also determined the isotherms of sorption of these gums to predict the ideal conditions of their conservation.

The obtained results clearly showed the presence of the correlations between morphology, chemical composition and geographical localization of the different studied cultivars. In the same way, the structural and rheological studies showed significant differences between purified gums. This difference seems to be related to a variation of the galactose /mannose ratio and molar mass according to the varieties. These interesting rheological properties open the carob gums a new niches of valorization with added values. In addition, the studies of the isotherms of sorption provided additional information on their hygroscopicités and by consequence on the ideal conditions of their conservation.

Keywords : Carob (*Ceratonia siliqua*), Rheology, Locust bean gum, Viscoelastic behavior, M/G ratio, Galactomannan, Isotherm of sorption