



**HAL**  
open science

# Auto-assemblage de polysaccharides fonctionnalisés : une étude thermodynamique

Marie E. Vuillemin

► **To cite this version:**

Marie E. Vuillemin. Auto-assemblage de polysaccharides fonctionnalisés : une étude thermodynamique. Ingénierie des aliments. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0177 . tel-02559619

**HAL Id: tel-02559619**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02559619v1>**

Submitted on 13 Jan 2022

**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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

## Université de Lorraine

École Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles  
Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules

### THÈSE

Présentée à l'Université de Lorraine

Par

**Marie E. VUILLEMIN**

En vue d'obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Lorraine**

*Spécialité : Génie biotechnologique et alimentaire*

---

# Auto-assemblages de polysaccharides fonctionnalisés : une étude thermodynamique

---

Soutenue publiquement le 27 Novembre 2019 devant la commission d'examen

### Membres du jury

<b>Rapportrice</b>	Pr. Catherine Sarazin	Professeur, Université Jules Vernes, Picardie
<b>Rapporteur</b>	Dr. Saïd Bouhallab	Directeur de Recherche, INRA, Rennes
<b>Examinatrice</b>	Dr. Adeline Boire	Chargée de Recherche, INRA, Nantes
<b>Examinatrice</b>	Dr. Fabienne Gauffre	Directrice de Recherche, CNRS, Rennes
<b>Examineur</b>	Pr. Alain Durand	Professeur, Université de Lorraine
<b>Examineur</b>	Dr. Jordane Jasniewski	Maître de conférences-HDR, Université de Lorraine, Directeur de thèse
<b>Examineur</b>	Pr. Michel Linder	Professeur, Université de Lorraine, Co-directeur de thèse
<b>Invité</b>	Dr. Florentin Michaux	Maître de conférences, Université de Lorraine
<b>Invité</b>	Dr. Lionel Muniglia	Maître de conférences, Université de Lorraine









## Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio) à l'Université de Lorraine, France.

Je tiens à remercier tout d'abord le Professeur Catherine Sarazin et le Docteur Saïd Bouhallab d'avoir accepté d'analyser ce travail en tant que rapporteurs. Je tiens également à remercier le Docteur Adeline Boire, le Docteur Fabienne Gauffre et le Professeur Alain Durand qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail.

Je remercie très chaleureusement mon directeur de thèse, le Docteur Jordane Jasniewski, d'avoir accepté de diriger ce travail. Je vous remercie pour tout ce que vous avez été pour moi pendant ces trois années, autant sur le plan scientifique (la JJ-clopédie ne m'a jamais laissée tomber) que sur le plan personnel, pour tous ces cafés partagés et ces moments de détente. Je garde un excellent souvenir de notre conférence à Barcelone. Ce fut un réel plaisir de partager tous ces moments avec vous. Les mots me manquent pour vous exprimer à la fois toute mon admiration et ma gratitude.

Je remercie également mon co-directeur de thèse, le Professeur Michel Linder. Vous avez toujours été présent lorsque j'en avais besoin, que ce soit pour parler de la thèse ou pour me prodiguer vos précieux conseils sur l'après-thèse. Merci pour votre disponibilité et votre écoute.

J'exprime toute ma reconnaissance à mon co-encadrant, le Docteur Florentin Michaux, sans qui ce travail n'aurait jamais été le même. Tu m'as beaucoup apporté au cours de cette thèse, tu m'as également énormément inspiré, par ta rigueur, ta droiture, ton enthousiasme et ton humour. Ton perfectionnisme m'a poussé à donner le meilleur de moi-même tout au long de cette thèse. Merci infiniment d'avoir su toujours trouver le temps, dès que j'en avais besoin.

Merci également au Docteur Lionel Muniglia, mon deuxième co-encadrant. Merci pour tes conseils, ta gentillesse, ta bienveillance et ta bonne humeur à toute épreuve. Tu as toujours su trouver les mots pour me remonter le moral dans mes moments de doute.

Merci aux Professeurs Anne-Marie Révol et Claire Gaiani pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et pour ces beaux moments de partage aux réunions semestrielles.

Je tiens également à remercier tout particulièrement le Professeur Sabine Bonnet ainsi que Sophie Poinsignon pour m'avoir initié à la magie de la RMN. Merci pour votre bienveillance, votre disponibilité et votre gentillesse. Merci de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire pour se creuser ensemble les méninges (c'est peu de le dire) sur le sujet complexe du greffage

des produits d'oxydation.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de suivi, les Docteurs Denis Renard et Eric Husson, pour leurs conseils précieux et la motivation qu'ils ont su me communiquer.

Merci à tous les enseignants du laboratoire qui ont participé de près ou de loin à ma formation sur tous les appareils du LIBio et qui m'ont prodigué leurs conseils scientifiques. Merci à Cédric Paris pour son aide précieuse sur la LCMS.

Je remercie toutes les techniciennes du laboratoire pour l'aide qu'elles m'ont apportée, particulièrement Blandine Simard et Aurélie Seiler, qui ont contribué à mes travaux. Merci pour votre soutien à la fois dans mon travail mais aussi ma vie personnelle. Je suis aujourd'hui fière de vous compter parmi mes amies les plus proches.

Je te remercie également, Aurélie Chapé, pour ta disponibilité dès que j'avais besoin de toi pour les tâches administratives, mais aussi pour ton amitié précieuse.

J'ai également une pensée pour le Professeur Stéphane Desobry et pour Christine Fivet, auprès de qui j'ai pu découvrir les aspects administratifs d'une école doctorale. J'ai énormément appris à vos côtés. Je remercie bien sûr mes collègues représentants des doctorants pour tous ces moments passés ensemble à refaire le monde (enfin, surtout l'école doctorale).

Je tiens aussi à remercier mes collègues de travaux pratiques auprès desquels j'ai pu commencer à me former en tant qu'enseignante : JJ et Lionel, le Docteur Christelle Mathé, le Docteur Magda Corgneau et le Professeur Catherine Humeau. Je te remercie tout particulièrement Catherine, pour tes conseils scientifiques et je n'oublie pas nos belles discussions sur la mode !

Merci à tous les stagiaires et doctorants passés ou présents avec qui j'ai pu échanger des moments de convivialité qui rendent la vie au laboratoire si agréable. J'ai une pensée particulière pour Aurélie, Aldjia, Yoanna, Faustine, Imène, Laurène et Amine. Merci pour tous ces fous rires. Merci à Naima, collègue de bureau, pour toutes ces discussions un peu folles qui permettaient de souffler de temps en temps. Je garde dans un coin de ma tête nos beaux projets de librairie.

Un remerciement tout particulier à mes stagiaires, Lila, Nicolas et Kahina. Cela a été un immense plaisir de travailler avec des personnes aussi motivées. J'ai été fière d'avoir pu participer à la réussite de votre parcours.

J'ai également une pensée affectueuse pour mes collègues doctorants du Ventron, devenus depuis des amis. Merci pour ces jeudis soirs, à parler de tout, de rien, à se plaindre de nos thèses

tout en, paradoxalement, partageant notre passion pour celles-ci. Oriane, Vincent, Tom, Arnaud et Micka, merci à vous tous pour ces fous rires et ces soirées aux Artistes.

Merci à mes amies de toujours, Lucie et Estelle pour avoir été là et m'avoir soutenue pendant la thèse, pour tout ce qu'il y a eu avant et aussi pour tout ce qui viendra après.

Un grand merci à Marine, ma petite coloc'. Toi et moi avons partagé cette belle expérience à distance. J'ai l'impression que tu étais toujours un peu là avec moi ... Et que tu comprenais tout.

Merci à mon Loïc. Merci de m'avoir supportée pendant trois ans dans le bureau, d'avoir écouté mes musiques si particulières, de m'avoir si souvent préparé mes cafés ... La liste est si longue. Merci pour avoir tout partagé avec moi.

J'ai une pensée toute particulière pour Aya, ma Khanji. Tu as été mon prédécesseur, si bien que tu comprenais avec une parfaite clarté tout ce que je vivais. Amie si proche et conseillère de vie et de thèse, tu es l'une de mes plus belles rencontres pendant ces trois années et je n'ai pas assez de mots pour te remercier pour tout ce que tu m'as apporté.

Un merci spécial à Micka, qui a supporté plus que les autres, m'a soutenue et qui connaît sans doute les problèmes rencontrés au cours de cette thèse aussi bien que moi.

J'ai une pensée très particulière pour toute ma famille, Clément, Olivier et Parrain. Merci pour votre soutien et pour tout ce que vous êtes pour moi.

A ma maman, que j'aime plus que tout. Il n'existe pas assez de mots pour t'exprimer ma gratitude pour tout ce que tu as fait pour moi, pour avoir toujours cru en moi et pour m'avoir toujours montré le chemin. Tu es mon modèle et ma force.

Papi Claude et Nanane, je pense beaucoup à vous. J'espère que vous êtes fiers de moi.



---

*La vie n'est facile pour aucun de nous. Mais quoi, il faut avoir de la persévérance, et surtout de la confiance en soi. Il faut croire que l'on est doué pour quelque chose, et que, cette chose, il faut l'atteindre coûte que coûte.*

*Marie Curie*

*A Barbara,  
Ma plus grande source de soutien,  
Ma plus belle source d'inspiration.*





---

## Table des matières

Liste des figures hors publication	
Liste des équations hors publication	
Liste des tableaux hors publication	
Liste des abréviations	
Introduction générale.....	1
Synthèse bibliographique .....	5
I. Stabilité des mélanges de polymères .....	5
1. Introduction et définitions .....	5
1.1. Miscibilité.....	6
1.2. Séparation de phase ségrégative et associative .....	6
2. Nature des interactions .....	7
2.1. Interactions électrostatiques.....	8
2.2. Liaisons hydrogène .....	10
2.3. Interactions non-électrostatiques .....	10
2.3.1. Interactions hydrophobes.....	11
2.3.2. Interactions de Van der Waals.....	12
2.4. Interactions $\pi$ .....	12
3. Aspects thermodynamiques des assemblages de polymères.....	13
3.1. Définitions et généralités.....	13
3.2. Influence de la température .....	16
3.3. Influence du pH.....	17
4. Assemblages de polymères .....	18

II. La coacervation complexe .....	19
1. Définitions et historique de la coacervation complexe .....	19
2. Modèles de la coacervation complexe .....	21
3. Influence de différents paramètres sur la coacervation complexe de polymères .....	23
4. Application des coacervats .....	26
4.1. L'encapsulation de molécules d'intérêt .....	27
4.2. La purification de protéines .....	30
4.3. La formation de cellules artificielles .....	31
III. Système étudié .....	32
1. Le chitosane .....	32
1.1. Structure chimique .....	32
1.2. Propriétés physico-chimiques .....	33
1.2.1. Degré de désacétylation et structure cristalline .....	33
1.2.2. Masse molaire .....	34
1.2.3. Solubilité .....	35
1.2.4. Viscosité .....	36
1.2.5. Capacité d'adsorption .....	37
1.3. Propriétés biologiques .....	37
1.4. Principales applications .....	38
2. La gomme d'Acacia .....	41
2.1. Structure chimique .....	42
2.1.1. La fraction arabinogalactane-peptide (AG) .....	43
2.1.2. La fraction arabinogalactane-protéines (AGP) .....	44
2.1.3. La fraction glycoprotéines (GP) .....	46

---

2.2. Propriétés physico-chimiques .....	46
2.2.1. Solubilité et propriétés en solution .....	46
2.2.2. Mobilité électrophorétique .....	47
2.2.3. Viscosité .....	47
2.2.4. Propriétés interfaciales .....	48
2.3. Propriétés biologiques .....	49
2.4. Principales applications .....	49
3. La coacervation complexe de la gomme d'Acacia et du chitosane.....	52
3.1. Critères de définition de coacervation optimale.....	52
3.2. Impact du ratio .....	54
3.3. Influence du pH.....	55
3.4. Influence de la force ionique.....	57
3.5. Influence de la concentration totale en polymère.....	59
3.6. Influence de la structure des polysaccharides .....	60
3.7. Coacervation complexe de la gomme d'Acacia avec du chitosane modifié .....	62
IV. Modification des polymères pour l'assemblage de polysaccharides modifiés : la fonctionnalisation enzymatique.....	65
1. Modification de polysaccharides.....	65
2. Utilisation de la laccase pour la fonctionnalisation enzymatique .....	69
2.1. Laccases .....	69
2.1.1. Définition.....	69
2.1.2. Structure.....	69
2.1.3. Mécanisme réactionnel .....	70

2.1.4. Le substrat à greffer : l'acide férulique .....	72
2.1.5. Produits d'oxydation.....	73
2.2. Greffage des produits d'oxydation sur des polysaccharides .....	74
2.2.1. Greffage sur une amine.....	74
2.2.2. Greffage sur un carboxyle .....	75
2.2.3. Applications potentielles .....	77
Matériels et méthodes.....	79
I. Matériels .....	79
1. Polysaccharides utilisés : chitosane et gomme d'acacia .....	79
2. La Laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i> (E.C. 1.10.3.2) .....	79
3. Les produits chimiques.....	79
II. Méthodes de préparation des assemblages des deux polymères .....	81
1. Préparation des solutions.....	81
1.1. Dialyse des polymères.....	81
1.2. Solubilisation.....	81
1.3. Ajustement du pH.....	81
1.4. Préparation des assemblages .....	82
2. Caractérisation des assemblages .....	82
2.1. Mesure de la charge de surface .....	82
2.2. Mesure de la turbidité des échantillons après assemblages.....	84
2.3. Observations de la morphologie des assemblages par microscopie optique.....	84
2.4. Détermination des paramètres thermodynamiques des assemblages par titration calorimétrique isotherme.....	85
III. Modification de la gomme d'Acacia par greffage de produits d'oxydation de l'acide	

---

férulique obtenus par voie enzymatique.....	87
1. Oxydation de composés phénoliques par la laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i>	87
1.1. Détermination de l'activité spécifique de l'enzyme.....	87
1.1.1. Détermination de l'activité totale de l'enzyme.....	87
1.1.2. Détermination de la teneur en protéines de l'enzyme .....	88
1.2. Oxydation enzymatique de composés phénoliques par la laccase .....	89
1.3. Mesure de l'évolution de la couleur du milieu réactionnel .....	90
1.4. Dosage de l'acide férulique par HPLC .....	91
1.5. Identification des produits d'oxydation obtenus .....	92
1.5.1. Détermination de la masse moléculaire exacte par LCMS.....	92
1.5.2. Purification des produits d'oxydation obtenus .....	93
1.5.3. Identification de la structure des produits d'oxydation majoritaires par RMN	93
2. Fonctionnalisation enzymatique de la gomme d'acacia.....	94
2.1. Greffage enzymatique des produits d'oxydation sur la gomme d'acacia .....	94
2.2. Dosage de l'acide férulique par HPLC .....	95
2.3. Mesure de la couleur de la gomme d'Acacia fonctionnalisée.....	96
2.4. Caractérisation structurale de la gomme d'Acacia fonctionnalisée .....	96
2.4.1. Spectre d'absorbance de la gomme d'Acacia fonctionnalisée .....	96
2.4.2. Détermination des modifications structurales de la gomme d'Acacia fonctionnalisée par FTIR.....	96
2.4.3. Détermination des modifications structurales de la gomme d'Acacia	

fonctionnalisée par RMN .....	97
2.4.4. Modification de la masse moléculaire de la gomme d'Acacia (SECMALS) 97	
2.4.5. Détermination de la distribution de taille de la gomme d'Acacia native et fonctionnalisée dans l'eau par diffusion dynamique de la lumière.....	98
2.4.6. Mesure du potentiel Zêta de la gomme d'Acacia fonctionnalisée.....	99
2.5. Propriétés physico-chimiques de la gomme d'Acacia fonctionnalisée .....	99
2.5.1. Stabilité thermique.....	99
2.5.2. Comportement thermique .....	99
2.5.3. Etude de la solubilité de la gomme après fonctionnalisation .....	100
2.5.4. Détermination de la tension superficielle de solutions aqueuses de gomme d'acacia et de gomme d'acacia modifiée.....	101
2.5.5. Mesure du pouvoir antioxydant des gommes d'Acacia native et fonctionnalisée par la méthode ABTS .....	101
2.5.6. Modification de la viscosité de la gomme fonctionnalisée.....	102
Résultats et discussions .....	103
I. Publication 1 : Auto-assemblage de la gomme d'Acacia et du chitosane : approche thermodynamique et mécanismes .....	103
1. Introduction .....	103
2. Article: Gum Arabic and chitosan self-assembly: thermodynamic and mechanism aspects .....	105
3. Contribution de l'article .....	142
II. Publication 2 : Fonctionnalisation de la gomme d'Acacia par voie enzymatique : greffage des produits d'oxydation de l'acide férulique et identification de certains de ces produits .....	144
1. Introduction .....	144

---

2. Article: Gum Arabic fonctionnalization through an enzymatic process: reaction route and intermediate products characterization.....	146
3. Contribution de l'article .....	179
III. Publication 3 : Caractérisation physico-chimique de la gomme d'acacia fonctionnalisée par greffage des produits d'oxydation de l'acide férulique.....	182
1. Introduction .....	182
2. Article: Physicochemical characterization of gum Arabic grafted with oxidation products of ferulic acid.....	183
3. Contribution de l'article .....	214
IV. Publication 4 : Modification de polysaccharides par voie enzymatique pour contrôler le type d'assemblage : une approche thermodynamique.....	217
1. Introduction .....	217
2. Article: Polysaccharides enzymatic modification to control of the coacervation or aggregation formation: a thermodynamic approach.....	219
3. Contribution de l'article .....	251
Conclusion générale et perspectives .....	255
Références bibliographiques .....	267





---

## Liste des figures hors publication

Figure 1 : Les différents comportements du mélange de polymères en solution.....	5
Figure 2 : Les différents types d'interactions entre polymères. (a) interaction électrostatique, (b) liaison hydrogène, (c) interaction hydrophobe, (d) interaction de Van der Waals et (e) interactions $\pi$ (Adapté de [24]).....	7
Figure 3 : Schéma de l'interaction entre polyélectrolytes et des deux types d'appariement d'ions : intrinsèque et extrinsèque [42]......	9
Figure 4 : Représentation schématique des techniques top-down et bottom-up utilisées pour produire des nano et microparticules à base de polymères [12] .....	18
Figure 5 : Exemple de morphologie sphérique de coacervats complexes de gélatine et de cellulose carboxyméthylée (ratio 7:1, pH 4,25) observée en microscopie optique [56].....	20
Figure 6 : Représentation schématique de la coacervation complexe (adapté de [83]).....	21
Figure 7 : Paramètres influençant la formation de coacervats et leurs caractéristiques morphologiques (adapté de [87]) .....	22
Figure 8 : Représentation schématique du tractus gastro-intestinal humain (TGI). La dégradation des particules sur la voie principale est montrée et certains facteurs de dégradation possible des coacervats sont énumérés. Des exemples de coacervats à base de biopolymère qui pourraient convenir à la libération d'une molécule d'intérêt à la cible spécifique du TGI sont listés. [12].....	30
Figure 9 : Structure chimique de la chitine et du chitosane [206].....	33
Figure 10 : Structures de la glucosamine en milieu acide (A) et en milieu neutre (B) [213] ..	34
Figure 11 : Potentiel Zêta d'une solution de chitosane en fonction du pH et valeurs calculée du pourcentage de protonation avec une représentation schématique de la conformation du polymère [241]......	36
Figure 12 : Photographies d'exsudats de gomme d'Acacia [307,308] .....	41

Figure 13 : Modèle de la fraction AG de la gomme d'acacia [325] .....	44
Figure 14 : Modèle historique de Wattle blossom représentant la structure de l'AGP [310,330] .....	45
Figure 15 : Illustration schématique de la structure de l'AGP proposée par Renard et ses collaborateur [333]. .....	45
Figure 16 : Etat des molécules de gomme d'Acacia avec et sans cisaillement d'après [340] .	48
Figure 17 : Spectre FTIR de la gomme d'Acacia, du chitosane et de coacervats gomme d'Acacia : chitosane sous forme solide [11].....	53
Figure 18 : Mobilité électrophorétique de la phase à l'équilibre en fonction du ratio massique gomme d'Acacia : chitosane et de la concentration totale en polymères [10].....	54
Figure 19 : Taux de coacervation gomme d'Acacia : chitosane et turbidité de la phase à l'équilibre en fonction du pH de la solution pour un ratio massique gomme d'Acacia : chitosane de 5 : 1, une concentration totale en polymères de 6 % p/v après 72 h de décantation [10]....	55
Figure 20 : Distribution de taille de mélanges gomme d'Acacia : chitosane en fonction du pH de la solution pour un ratio massique gomme d'Acacia : chitosane de 1 : 1, une concentration totale en polymères de 0,3 % p/v après 30 min d'agitation à 800 rpm [387]. .....	57
Figure 21 : Taux de coacervation gomme d'Acacia : chitosane et turbidité de la phase à l'équilibre en fonction de la concentration en NaCl pour un ratio massique gomme d'Acacia : chitosane de 5 : 1, une concentration totale en polymères de 6 % p/v après 72 h de décantation [10] .....	58
Figure 22 : Taux de coacervation en fonction du ratio massique gomme d'Acacia : chitosane et de la concentration en chitosane après 72 h de décantation, pour une concentration totale en polymère constante [10] .....	59
Figure 23 : Observation macroscopiques (a) et turbidité (b) de complexes GA : CN immédiatement après mélange à différents ratios massiques et à deux concentrations différentes	

en CN (DD75 % à ■0,03 % et ●0,15% et DD93 % à □0,03 % et ○0,15 %) à pH 4,8 et pour une force ionique de 0,04 M [9].....	61
Figure 24 : Indice de polydispersité et potentiel Zêta de complexes GA : CN à différents ratios massiques et différents degrés de désacétylation du chitosane, diamètre hydrodynamique moyen des mélanges gomme d'Acacia : chitosane (DD75 % à ■0,03 % et ●0,15 % et DD93 % à □0,03 % et ○0,15 %)[9].....	61
Figure 25 : Structure chimique du chitosane et de différent type de chitosanes carboxyméthylés (CMC) montrant la modification de l'unité de D-glucosamine d'après [395].....	63
Figure 26 : Effet de la concentration totale en polymère et du ratio massique (a) gomme d'Acacia/O-CMC et (b) gomme d'Acacia/chitosane natif sur le taux de coacervation après une heure d'agitation à pH 3,0, 25 °C pour le O-CMC et à pH 4,5, 45 °C pour le chitosane natif. Les barres d'erreur ayant la (les) même(s) lettre(s) indiquent qu'il n'y a aucune différence significative à $p > 0,05$ . .....	64
Figure 27 : Conjugaison de la gomme arabique et de la curcumine par action de DCC/DMAP (couplage chimique) [403] .....	67
Figure 28 : Environnement des 4 atomes de cuivre du site actif de la laccase de <i>Bacillus subtilis</i> [402] .....	70
Figure 29 : Réactions catalysées par les laccases (E.C.1.10.3.2) [411] .....	70
Figure 30 : Oxydation de l'acide férulique catalysée par une laccase [415] .....	72
Figure 31 : Spectre LC–MS total du produit d'oxydation majeur de l'acide férulique [419]..	73
Figure 32 : Oxydation de l'acide férulique par la laccase pour produire des dimères $\beta$ – $\beta$ et $\beta$ -5 [420]. .....	74
Figure 33 : Spectre FTIR complet (A) et bande amide I (B) du chitosane natif (a), du chitosane fonctionnalisé avec du férulate d'éthyle (b) et avec de l'acide férulique (c) [205]. .....	75
Figure 34 : Spectres FTIR de la pectine native (en pointillés) et de la pectine fonctionnalisée	

par greffage des produits d'oxydation de l'acide férulique (ligne continue) [421].	76
Figure 35 : Représentation de la double couche électrique et du potentiel Zeta [426]	82
Figure 36 : Principe de la titration calorimétrique isotherme, schéma de principe d'une expérience, exemples de données brutes et de résultats issus de la modélisation.	85
Figure 37 : Oxydation de la syringaldazine catalysée par la laccase [428].	87
Figure 38 : Droite d'étalonnage de BSA pour la détermination de la quantité de protéines (équivalent BSA) dans la laccase de <i>Mycelyophthora thermophila</i>	89
Figure 39 : Résumé des objectifs de la thèse	256
Figure 40 : Principales conclusions du travail de thèse	260
Figure 41 : Perspectives du travail de thèse	263

---

## Liste des équations hors publication

Équation 1 : Mécanisme théorique d'attraction électrostatique entre polymères de charges opposées .....	9
Équation 2 : Calcul de l'énergie libre d'un mélange grâce à la théorie de Flory-Huggins [21] .....	14
Équation 3 : Calcul du taux de coacervation.....	53
Équation 4 : Calcul de la mobilité électrophorétique (modèle de Smoluchowski).....	83
Équation 5 : Calcul du potentiel Zêta (équation de Smoluchowski).....	83
Équation 6 : Calcul de la turbidité relative.....	84
Équation 7 : Calcul de l'indice de polydispersité.....	84
Équation 8 : Calcul de la variation d'énergie libre.....	86
Équation 9 : Calcul de la thermo-entropie .....	86
Équation 10 : Calcul de l'activité enzymatique totale ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ ) .....	88
Équation 11 : Calcul de l'activité spécifique de l'enzyme ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de protéine) .....	89
Équation 12 : Calcul de variation de couleur entre échantillons.....	91
Équation 13 : Calcul du diamètre hydrodynamique de la molécule .....	98
Équation 14 : Calcul du pourcentage d'inhibition des radicaux d'ABTS <sup>•+</sup> .....	102



---

## Liste des tableaux hors publication

Tableau 1 : Classification des interactions en fonction de la force de leur énergie et sensibilité aux conditions du milieu. ....	8
Tableau 2 : Exemples d'études portant sur la coacervation complexe entre différents polymères dans différentes conditions. ....	24
Tableau 3 : Biopolymères utilisés, composés encapsulés et paramètres étudiés pour l'encapsulation dans des coacervats de la littérature, avec les références. ....	28
Tableau 4 : Applications du chitosane dans différents domaines, leurs propriétés et leurs références. ....	40
Tableau 5 : Applications de la gomme d'Acacia dans différents domaines, leurs propriétés et leurs références. ....	51
Tableau 6 : Produits chimiques utilisés. ....	80
Tableau 7 : Solvants utilisés. ....	80
Tableau 8 : Gamme étalon de BSA pour le dosage de Bradford. ....	88
Tableau 9 : Gradient d'élution des phases A et B au cours de la méthode HPLC du dosage de l'acide férulique. ....	91
Tableau 10 : Gradient d'élution des phases A et B utilisées pour la méthode LCMS. ....	92
Tableau 11 : Gradient d'élution des phases A et B au cours de la méthode de chromatographie semi-préparative pour la séparation des produits d'oxydation de l'acide férulique. ....	93





## Liste des abréviations hors publication

ABTS : 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate

AcAc : Acide acétique

AF : Acide férulique

ATR : Atténuation totale de réflectance

BSA : Bovine serum albumin (albumine de sérum bovin)

CIE : Commission Internationale de l'Eclairage

CN : Chitosane natif dialysé

DD : Degré de désacétylation

Dh : Diamètre hydrodynamique des particules

DLS : Dynamic Light Scattering (Diffusion dynamique de la lumière)

DO : Densité optique

DSC : Differential Scanning Calorimetry (Calorimétrie différentielle à balayage)

FTIR : Fourier Transform InfraRed spectroscopy (Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier)

GA : Gomme d'Acacia

GAN : Gomme d'Acacia native dialysée

GAF : Gomme d'Acacia fonctionnalisée dialysée

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie liquide haute performance)

ITC : Isothermal Titration Calorimetry (Titration calorimétrique isotherme)

Laccase M : Laccase de *Myceliophthora thermophila*

LAMU : Laccase Unit (Unité enzymatique de la laccase) ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g d'enzyme}^{-1}$ )

LCMS : Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse)

MEB : Microscope électronique à balayage

MM : Masse molaire

Mw : Weight-average molecular weight (Masse molaire moyen)

MWCO : Molecular weight cut-off (seuil de coupure en masse molaire)

N : Normalité

PdI : Polydispersity Index (Indice de polydispersité)

PEO : Polyethylene Oxide

POX : Produits d'oxydation de l'acide férulique

R<sub>GA/CN</sub> : Ratio gomme d'Acacia / chitosane

RMN : Résonance magnétique nucléaire

rpm : Rotation Per Minute (tour par minute)

SEC-MALS : Size Exclusion Chromatography - Multi-Angle Light Scattering  
(Chromatographie d'exclusion de taille - Diffusion de lumière multi-angle)

TGA : ThermoGravimetric Analysis (Analyse thermogravimétrique)

UI : Unité enzymatique ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )

$\Delta G$  : Variation de l'énergie libre du mélange (J)

$\Delta H$  : Variation d'enthalpie du mélange ( $\text{J}\cdot\text{mole}^{-1}$ )

$\Delta S$  : Variation d'entropie du mélange ( $\text{J}\cdot\text{K}^{-1}$ )

$\tau$  : Turbidité ( $\text{cm}^{-1}$ )

$\gamma$  : Tension superficielle ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ )

$\zeta$  : Potentiel Zêta (mV)

## Liste des publications et communications

### Poster :

M. Vuillemin, F. Michaux, M. Linder, L. Muniglia et J. Jasniewski, 2018.

Auto-assemblages de polysaccharides fonctionnalisés : compréhension et contrôle des mécanismes thermodynamiques, Séminaire annuel 2018 de l'école doctorale RP2E « La recherche d'excellence à RP2E » (13 février 2018, Nancy) – Lauréate du prix poster.

### Présentation orale :

M. Vuillemin, F. Michaux, M. Linder, L. Muniglia et J. Jasniewski, 2019.

Gum Arabic and chitosan self-assembly: thermodynamic and mechanism aspects, International Symposium on SupraBiomolecular Systems (15 mai 2019, Barcelone)

### Publications scientifiques :

M. E. Vuillemin, F. Michaux, M. Linder, L. Muniglia, J. Jasniewski, 2019.

Gum Arabic and chitosan self-assembly: Thermodynamic and mechanism aspects. Food Hydrocoll. 2019, 96, 463–474.

M. E. Vuillemin, L. Muniglia, M. Linder, A. Adam, F. Michaux, J. Jasniewski

Physicochemical characterization of Arabic gum grafted with oxidation products of ferulic acid. Article soumis au journal “Food hydrocolloids”.

M. E. Vuillemin, L. Muniglia, M. Linder, S. Bouguet-Bonnet, S. Poinsignon, B. Simard, C. Paris, F. Michaux, J. Jasniewski

Gum Arabic functionalization through an enzymatic process: reaction route and intermediate products characterization. Projet d'article dans le journal Food Chemistry.

M. E. Vuillemin, L. Muniglia, M. Linder, A. Seiler, F. Michaux, J. Jasniewski

Polysaccharides enzymatic modification to control the coacervation or aggregation formation: a thermodynamic approach. Article soumis au journal “Journal of colloid and interface science”.



# Introduction générale

---



## **Introduction générale**

Les interactions faibles et transitoires régissent la formation et l'organisation des architectures supramoléculaires dans le monde du vivant (organisation du cytoplasme cellulaire, biosynthèse des parois végétales, transports intracellulaires...). Il est intéressant de détourner ces mécanismes naturels de structuration pour en tirer parti dans les domaines de l'agroalimentaire et de la santé. Cependant, avant de pouvoir les mettre en œuvre de façon rationnelle, il est indispensable de décortiquer et comprendre les mécanismes qui induisent et contrôlent ces phénomènes d'auto-assemblage d'un point de vue thermodynamique. Est-il possible de contrôler la formation d'architectures supramoléculaires de biopolymères en les modifiant à façon ?

Les mélanges de polymères en solution aqueuse conduisent généralement à trois types de phénomènes : une miscibilité totale, une séparation de phase ségrégative lorsque l'interaction entre le solvant et un des polymères est forte ou une séparation de phase associative lorsque l'interaction entre les deux polymères est forte. Ce dernier phénomène est appelé la coacervation complexe [1, 2]. Les coacervats formés peuvent être utilisés en industrie pour encapsuler des molécules d'intérêt et créer des aliments aux bienfaits multiples (encapsulation de vitamines par exemple [3, 4], texturation [5, 6] ...). La coacervation est une technique d'encapsulation dite « Bottom-up » car elle est définie comme la construction de capsules par auto-organisation de molécules. Cette coacervation est dépendante des conditions environnementales comme le pH, la force ionique, la température, la concentration en polymères [7–13]... Cette approche permet de former des vecteurs dans des conditions douces, sans apport extérieur d'énergie (cisaillement, par exemple).

La formation de ces coacervats pour encapsuler des molécules d'intérêt est dépendante des conditions du milieu, qui auront un impact sur la taille des coacervats, leur nombre, leur

structure et par conséquent sur le type de molécules qui pourront être vectorisées. L'objectif serait, *in fine*, de pouvoir comprendre la formation de ces coacervats. En quoi la structure des polymères utilisés impactera-t-elle sur la formation des vecteurs formés ? Quelle est la force motrice de cet assemblage spontané ?

Un des objectifs de cette thèse est d'étudier l'auto-assemblage de deux polysaccharides : la gomme d'Acacia et le chitosane, déjà connus pour s'auto-assembler et qui constituent donc un bon modèle pour l'étude des phénomènes thermodynamiques qui régissent la formation des auto-assemblages.

Plusieurs travaux ont montré que ces deux polymères établissent des interactions transitoires (qui se forment et se déforment facilement) qui dépendent de différentes conditions physicochimiques (température, pH, force ionique, concentrations, ratio molaire ...) [7–11, 13] et forment des structures supramoléculaires. Il apparaît néanmoins nécessaire de comprendre les paramètres thermodynamiques qui dirigent ces interactions pour pouvoir ensuite les contrôler. Le contrôle de ces interactions peut venir d'une modification de la structure des polysaccharides, notamment en modifiant les groupements ionisables et en les remplaçant par des groupements d'hydrophobie différentes par exemple, ceci diminuant en théorie les interactions électrostatiques en faveur des interactions hydrophobes.

Afin de jouer sur ces interactions et donc sur les conditions d'auto-assemblage, les polysaccharides seront fonctionnalisés par un greffage covalent de produits d'oxydation de l'acide férulique grâce à une enzyme : la laccase de *Myceliophthora thermophila*. De précédents travaux ont montré la faisabilité de la fonctionnalisation du chitosane puis de la pectine par des produits d'oxydation de l'acide férulique [14, 15]. Les polysaccharides étant polaires et les produits d'oxydation des phénols obtenus apolaires, la fonctionnalisation devrait permettre de moduler le caractère hydrophile/hydrophobe de la gomme d'Acacia et du chitosane. Cela permettrait ainsi modifier les interactions entre ces deux polymères (diminution des interactions



électrostatiques par greffage sur les groupements ionisables, augmentation des interactions hydrophobes), de les rendre potentiellement aptes à s'auto-assembler en suivant d'autres chemins thermodynamiques et d'obtenir des objets ayant d'autres structures. Afin de contrôler ces phénomènes, un objectif de la thèse consiste en la compréhension des mécanismes enzymatiques du greffage pour pouvoir maîtriser la structure du polymère modifié à façon et de mieux comprendre la structure des produits greffés sur les polymères.

L'objectif principal de ce travail de thèse est de comprendre l'influence de la structure des polymères sur leur faculté à s'auto-assembler. Pour répondre à cette question, la stratégie mise en place consiste, dans un premier temps, à étudier l'auto-assemblage de polymères non-modifiés (dits « natifs ») pour étudier l'influence du pH (qui joue sur la flexibilité et les interactions électrostatiques) et de la température (qui joue sur la flexibilité et les interactions hydrophobes). Dans un second temps, cette étude sera transposée à des assemblages avec des polymères modifiés. De cette approche découle quatre questions scientifiques :

- Quelle est l'influence du pH et de la température sur l'auto-assemblage des polymères natifs et sur les paramètres thermodynamiques de l'interaction ?
- Est-il possible de modifier la gomme d'Acacia avec des produits d'oxydation de l'acide férulique en utilisant une oxydoréductase (laccase) et, si oui, quelle est la structure des produits d'oxydation greffés ? Quelles sont les différences de propriétés physico-chimiques (couleur, comportement thermique et rhéologique, pouvoir antioxydant, taille...) entre la gomme d'Acacia native et la gomme d'Acacia fonctionnalisée ?
- Quel est l'impact de cette modification sur la structure des objets formés et sur les paramètres thermodynamiques de l'auto-assemblage entre le chitosane et la gomme d'Acacia modifiés?

Pour mener ce travail, la démarche suivie a consisté dans un premier temps à caractériser les paramètres thermodynamiques des interactions entre les polymères natifs en fonction des paramètres physico-chimiques (notamment pH et température). Parallèlement à cette partie, la faisabilité de la modification de la gomme d'Acacia par les produits d'oxydation de l'acide férulique produits par la laccase a été étudiée. Une fois la modification mise en évidence, la structure des produits d'oxydation et l'impact de leur présence sur les propriétés d'auto-assemblage avec le chitosane ont été étudiés.

La compréhension de l'influence des différents paramètres du milieu et de la fonctionnalisation sur l'auto-assemblage de la gomme d'Acacia et du chitosane devrait permettre de pouvoir façonner des vecteurs afin d'encapsuler des molécules d'intérêt. La maîtrise de l'élaboration de ces vecteurs et notamment des paramètres thermodynamiques de leur formation devrait permettre de contrôler leur comportement dans différentes conditions physico-chimiques (pH, température ...) afin de de libérer les molécules encapsulées dans des milieux ciblés.

# Synthèse bibliographique

---

I. Stabilité des mélanges de polymères .....	5
1. Introduction et définitions .....	5
2. Nature des interactions .....	7
3. Aspects thermodynamiques des assemblages de polymères.....	13
4. Assemblages de polymères .....	18
II. La coacervation complexe .....	19
1. Définitions et historique de la coacervation complexe .....	19
2. Modèles de la coacervation complexe .....	21
3. Influence de différents paramètres sur la coacervation complexe .....	23
4. Application des coacervats.....	26
III. Système étudié.....	32
1. Le chitosane.....	32
2. La gomme d'Acacia .....	41
3. La coacervation complexe de la gomme d'Acacia et du chitosane.....	52
IV. Modification des polymères pour l'assemblage de polysaccharides modifiés : la fonctionnalisation enzymatique.....	65
1. Modification de polysaccharides.....	65
2. Utilisation de la laccase pour la fonctionnalisation enzymatique .....	69



# Synthèse bibliographique

## I. Stabilité des mélanges de polymères

### 1. Introduction et définitions

Lorsque deux solutions de polymères sont mélangées (dans un même solvant), plusieurs phénomènes peuvent se produire (Figure 1). Les deux polymères peuvent être miscibles : le système est alors une solution homogène stable dans le temps. Dans le cas contraire, une séparation de phase peut se produire, notamment quand les deux polymères sont chargés de manière opposée. Deux types de séparation de phase sont généralement rencontrés. Une de ces séparations de phase est dite ségrégative lorsque les deux polymères se séparent en deux phases distinctes (Figure 1). A l'opposé, la séparation de phase est qualifiée associative dans le cas où les deux polymères s'auto-assemblent, formant des « micro-phases » dispersées dans une phase continue composée du solvant et d'une faible concentration en polymères. Après un délai plus ou moins long, ces « micro-phases » sédimentent, formant une « macro-phase » riche en polymère (Figure 1).

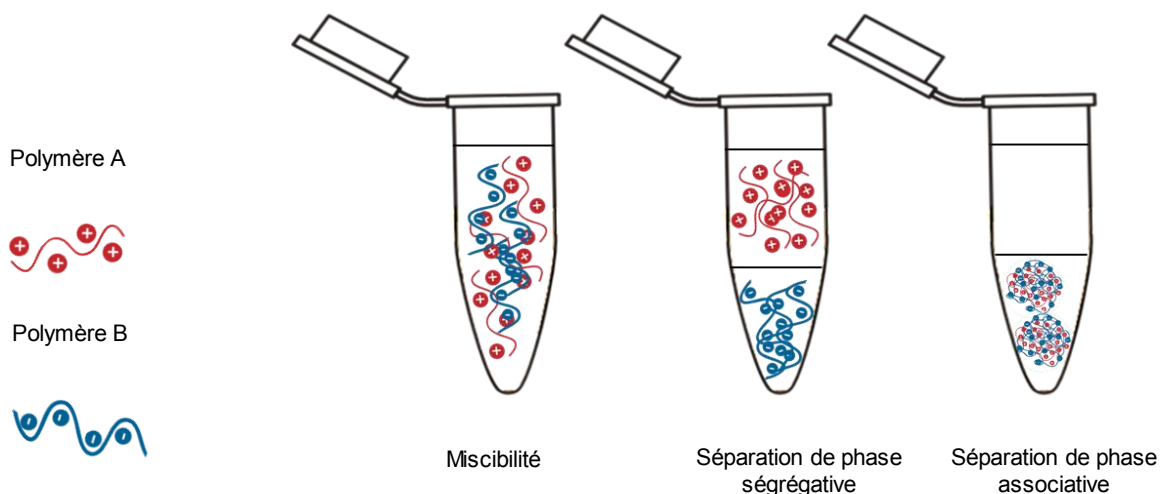


Figure 1 : Les différents comportements du mélange de polymères en solution

L'état final du mélange dépend ainsi des interactions entre les polymères et de leur affinité

respective pour le solvant. Les affinités polymère-polymère et polymères-solvant définissent le type de mélange obtenu. Lorsque l'affinité polymère-polymère est plus importante que l'affinité polymère-solvant, cela donne lieu à une séparation de phase associative. Lorsque l'affinité entre les deux polymères est égale à l'affinité entre les polymères et le solvant, il y a miscibilité totale des polymères. Si les polymères sont incompatibles thermodynamiquement, l'affinité polymère-solvant est plus importante que l'affinité polymère-polymère. Ce phénomène génère une séparation de phase dite ségrégative, où chaque biopolymère tend à s'entourer de biopolymères du même type (Figure 1).

### 1.1. Miscibilité

La miscibilité est le cas où le mélange de deux polymères conduit à la formation d'une solution homogène et stable dans le temps. Ce phénomène se produit la plupart du temps dans le cas de solutions diluées, lorsque les interactions entre les deux polymères sont égales aux interactions entre les polymères et le solvant [16–19]. Ce type de comportement a été par exemple mis en évidence dans le cas du mélange d'ABS (Acrylonitrile Butadiène Styrène) et de PC (Polycarbonate), dans du tétrahydrofurane (THF) [20].

### 1.2. Séparation de phase ségrégative et associative

Lorsque deux polymères n'ont pas d'affinité l'un pour l'autre, leur mélange conduit à une séparation de phase ségrégative. Ce phénomène se rencontre particulièrement lorsque l'un des polymères n'est pas chargé, ou lorsque les deux polymères sont de même charge et conduisent donc à des phénomènes de répulsions.

Lorsque l'affinité entre les deux polymères est forte, la séparation de phase est dite « associative ». Elle conduit à la formation de complexes entre les deux polymères. La composition et la structure de ces complexes dépend principalement de la concentration et du ratio en polymères. Les complexes peuvent devenir denses et compacts, formant des agrégats insolubles qui précipitent ou former un réseau de polyélectrolytes qui interagissent, dispersés

dans une phase continue composée majoritairement de solvant.

Ces deux types de séparation de phase peuvent s'expliquer par la théorie de Flory Huggins [21–23]. Dans le cas de la séparation de phase ségrégative, la composition des phases est asymétrique : chacune d'elles est enrichie en l'un des deux polymères. Dans le cas de la séparation de phase associative, l'une des phases est concentrée en un mélange des deux polymères et l'autre phase contient essentiellement le solvant. Ce phénomène est souvent appelé « coacervation complexe » à tort, car dans le cas de la coacervation complexe, la phase concentrée correspond à des gouttes d'eau riches en polymères, ce qui n'est pas nécessairement le cas de la séparation de phase associative : les complexes formés peuvent être des agrégats solides de structure aléatoire [23].

## 2. Nature des interactions

Différents types d'interactions sont susceptibles de s'établir lorsque deux polymères sont mélangés en solution. Ces interactions peuvent avoir différentes portées et être de différentes énergies.

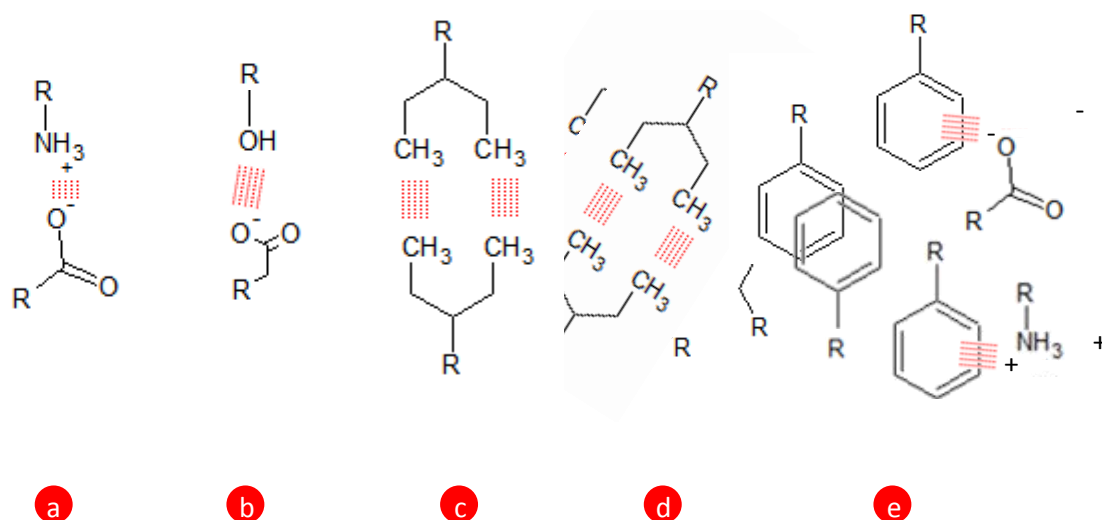


Figure 2 : Les différents types d'interactions entre polymères. (a) interaction électrostatique, (b) liaison hydrogène, (c) interaction hydrophobe, (d) interaction de Van der Waals et (e) interactions  $\pi$  (Adapté de [24]).

Les interactions responsables de la formation de complexes entre polymères peuvent être

regroupées en trois catégories [25, 26] :

- Interactions électrostatiques (Figure 2a) et liaisons hydrogènes (Figure 2b) ;
- Interactions non-électrostatiques (interactions hydrophobes (Figure 2c), interactions de Van der Waals (Figure 2d)) ;
- Interactions  $\pi$  (Figure 2f).

Ces interactions peuvent être attractives ou répulsives. Elles sont de faibles portées (1 à 5 Angström) et sont dépendantes des conditions du milieu. Il est possible de les classer en fonction de leur intensité Tableau 1.

Tableau 1 : Classification des interactions en fonction de la force de leur énergie et sensibilité aux conditions du milieu.

	Energie (kJ.mol <sup>-1</sup> )	Dépendante de ...
Interaction électrostatique	5 à 9	pH/force ionique
Liaison hydrogène	4 à 13	Température
Interaction hydrophobe	2 à 15	Température
Interaction de Van der Waals	2 à 4	Température
Interactions $\pi$	$\pi$ - $\pi$ stacking : de 1 à 50 Interaction cation- $\pi$ : de 8 à 20 Interaction anion- $\pi$ : de 20 à 50	pH/force ionique

### 2.1. Interactions électrostatiques

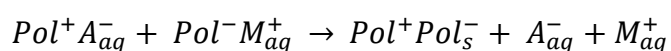
Les interactions électrostatiques dépendent de la charge électrique des atomes. Des études pionnières entre les interactions protéines-polysaccharides ont mis en évidence l'implication des interactions électrostatiques dans la formation de complexes gélatine/gomme arabique [34, 35].

Depuis, l'interaction électrostatique entre polymères a été le sujet de plusieurs théories au cours des dernières années [36–42]. L'interaction entre un polyanion (Pol<sup>-</sup>) et un polycation (Pol<sup>+</sup>) est souvent due à des interactions électrostatiques, dues à leurs charges opposées, selon l'Équation 1 [41]. L'établissement de liaisons électrostatiques entre les molécules chargées conduit à une



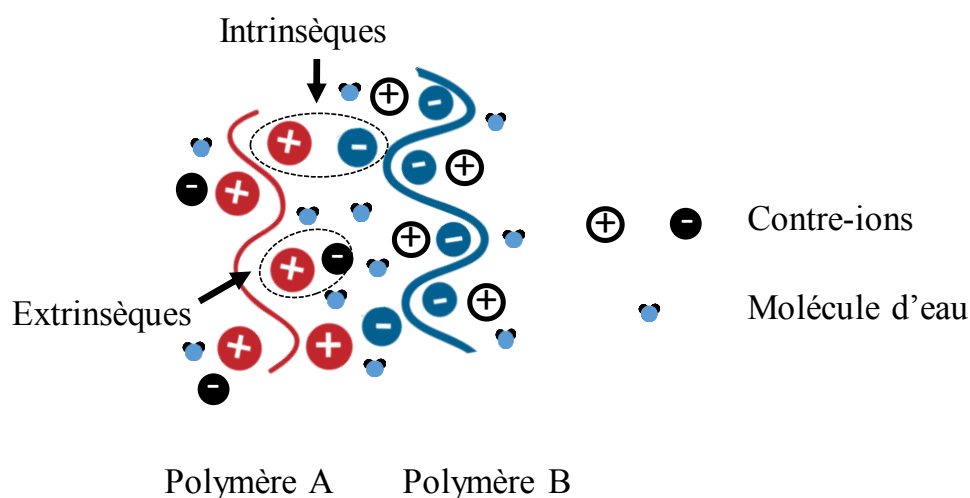
diminution de l'énergie libre du système. La perte d'entropie engendrée est compensée par les contributions enthalpiques et entropiques (provenant de la libération des contre-ions et de molécules d'eau) [23, 26]. Cependant, chaque unité chargée du polymère peut être accompagnée d'un contre-anion  $A^-$  ou un contre-cation  $M^+$  pouvant être condensé sur le polymère. La libération des contre-ions entraîne une augmentation de l'entropie. En parallèle, la diminution de la mobilité des chaînes de polymères entraîne une diminution de l'entropie du système.

*Équation 1 : Mécanisme théorique d'attraction électrostatique entre polymères de charges opposées*



La manière dont les contre-ions influencent les interactions électrostatiques entre polycations et polyanions reste une question centrale pour mieux comprendre les phénomènes d'assemblage entre polymères [44].

L'interaction électrostatique entre deux atomes de charges opposées séparés de 3 Å dans l'eau a une énergie de 5 à 9 kJ mol<sup>-1</sup> [29]. La formation de complexes de polymères est contrôlée par les interactions directes entre le polyanion et le polycation (interactions intrinsèques, Figure 3), mais également par des interactions indirectes entre les contre-ions du milieu et les molécules d'eau qui les entourent en solution (interactions extrinsèques, Figure 3) [45].



*Figure 3 : Schéma de l'interaction entre polyélectrolytes et des deux types d'appariement d'ions : intrinsèque et extrinsèque [42].*

Ainsi, l'élimination des sels dans des solutions de polymères favorise les interactions intrinsèques, augmentant généralement la viscosité des complexes. Augmenter la concentration en sels peut conduire à la solubilisation des polymères formant les complexes et conduire à l'obtention d'une solution [40]. La force ionique et la nature des ions du système peut ainsi être un levier pour contrôler les interactions électrostatiques, tout comme le pH en fonction des pKa des polymères mis en jeu. Lorsque les charges des deux polymères se neutralisent, la charge du complexe obtenu est nulle, formant des complexes insolubles, conduisant à une phase pauvre en polymères et à une phase riche en polymères ayant interagi [31, 46]. Lorsque deux polymères de charge identique sont mélangés, ce sont donc les interactions électrostatiques qui sont responsables de la séparation de phase ségrégative. Malgré l'influence de tous les types d'interaction possibles, la majeure partie des systèmes assemblés à base de polymères est fondée sur les interactions électrostatiques.

## 2.2. Liaisons hydrogène

Les liaisons hydrogène (Figure 2b) sont des liaisons de relativement faible énergie. Dans une liaison hydrogène, l'atome d'hydrogène est partagé entre deux atomes électronégatifs comme l'oxygène ou l'azote par exemple. Les liaisons hydrogène sont plus faibles que les liaisons covalentes. L'énergie de la liaison est comprise entre 4 et 13 kJ.mol<sup>-1</sup>. Toutefois, ces liaisons ont une portée plus importante que les liaisons covalentes. La distance entre l'hydrogène et les atomes électronégatifs peut aller de 1,5 à 2,6 Å. La distance entre les deux atomes électronégatifs est d'environ 2,4 à 3,5 Å [29]. Une diminution de la température dans un système favorise une augmentation des échanges de protons et semble donc favoriser la formation rapide d'interactions hydrogène. Les liaisons hydrogène dépendent directement de la structure des polymères et de leur conformation. Leur formation est de nature exothermique.

## 2.3. Interactions non-électrostatiques

Si dans un très grand nombre de cas les interactions électrostatiques prévalent lors de la

formation de complexes entre polymères de charges opposées en solution, il existe des systèmes dans lesquels les interactions initiales sont des interactions hydrophobes [2, 18]. De plus, les complexes électrostatiques peuvent être stabilisés par des interactions non-électrostatiques, en particulier lorsque le mélange est stabilisé *a posteriori* par un traitement thermique [30]. En effet, dans ce travail, lorsque les protéines sériques étaient chauffées, elles changeaient de conformation et les interactions protéines-protéines devenaient majoritairement hydrophobes. De ce fait, dans cette étude, 90 % des protéines s'agrégeaient.

### 2.3.1. Interactions hydrophobes

Les interactions hydrophobes (Figure 2c) sont des interactions qui favorisent le regroupement de molécules non polaires générées par des interactions entre des molécules polaires. Elles peuvent ainsi être qualifiées d'indirectes. Les molécules apolaires ne participent ni aux liaisons hydrogène, ni aux liaisons ioniques. Les interactions entre ces molécules et l'eau sont donc moins favorables que les interactions entre molécules d'eau. Les molécules d'eau en contact avec ces surfaces apolaires forment ainsi des « cages » autour de ces molécules apolaires. Lorsque deux molécules ou groupements apolaires sont proches, un phénomène d'attraction se produit. Les molécules d'eau qui les entourent sont libérées, favorisant la contribution entropique. Ces liaisons sont endothermiques. Les molécules apolaires ont donc tendance à se regrouper dans l'eau. L'énergie des liaisons hydrophobes est d'environ 2 à 15 kJ.mol<sup>-1</sup> [31]. Ces interactions sont favorisées lorsque la température augmente.

La formation d'interactions hydrophobes dépend également de la distribution du solvant autour des polymères : dans le cas où l'affinité des polymères pour le solvant est faible, ils s'agrègent par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes. Ce type de phénomène a été par exemple mis en évidence dans le système élastine/eau [32].

Les interactions hydrophobes peuvent donc être le moteur de la complexation entre polymères même si les deux sont de charges opposées. Elles peuvent aussi s'y opposer, dans le cas, plutôt

rare, où l'intensité des interactions hydrophobes vient contrebalancer les interactions électrostatiques, limitant ou supprimant ainsi le phénomène de complexation [33].

### 2.3.2. Interactions de Van der Waals

Les liaisons de Van der Waals (Figure 2d) résultent de l'interaction entre les nuages électroniques des atomes ou des molécules. La distribution de charge à un instant donné autour d'un atome n'est pas parfaitement symétrique et elle conduit à une asymétrie de distribution de charge des atomes voisins. L'attraction résultante augmente lorsque les deux atomes se rapprochent, jusqu'à ce qu'ils soient séparés par la distance de contact de Van der Waals. A une distance plus courte, les forces de répulsion des nuages électroniques qui se superposent deviennent prédominantes, conduisant non plus à une attraction mais à une répulsion [29].

Ces interactions sont de faible intensité, entre 2 et 4 kJ.mol<sup>-1</sup> par paire d'atomes. Cependant, quand les surfaces de deux molécules à hautes masses molaires se rencontrent, de nombreux atomes établissent des interactions de Van der Waals et la somme des forces de ces interactions peut être importante. Les interactions de Van der Waals regroupent plusieurs types d'interactions :

- Les interactions de Keesom (orientation de dipôles permanents sous l'effet d'un champ électrique provoqué par un dipôle permanent) ;
- Les interactions de Debye (orientation des dipôles induits au sein d'atomes ou de molécules polarisables par un dipôle permanent) ;
- Les interactions de London (orientation de dipôles dans le voisinage d'un dipôle instantané provoqué par une fluctuation dans la distribution de charges électriques).

### 2.4. Interactions $\pi$

Certaines interactions non covalentes impliquent des groupements fonctionnels aromatiques. Elles sont appelées « interactions  $\pi$  » (Figure 2f) et peuvent être réparties en plusieurs catégories, parmi lesquelles le  $\pi$ - $\pi$  stacking, les interactions cation- $\pi$  et anion- $\pi$  [25]. En général,

les effets  $\pi$  sont associés aux interactions des molécules avec les systèmes  $\pi$ - de molécules conjuguées comme le benzène. Le  $\pi$ - $\pi$  stacking est associé à l'interaction entre les  $\pi$ -orbitales. Par exemple, un anneau de benzène, avec son nuage  $\pi$  entièrement conjugué, interagira avec un anneau voisin de benzène par une interaction  $\pi$ - $\pi$ . Les deux principales façons dont les benzènes s'empilent sont dites « bord à face » et « parallèle empilé ». La configuration « débordé-empilé » n'est pas aussi stable que les deux autres, en raison de la forte répulsion électrostatique des électrons dans les orbitales  $\pi$ . Les distances centre-centre entre deux structures en parallèle sont d'environ 3,5 Å. Pour deux structures empilées non parallèles, l'angle centre-normal doit être inférieur à 20°. La plage d'intensité des forces  $\pi$ - $\pi$  est de 1 à 50 kJ.mol<sup>-1</sup> [47].

Les interactions cation- $\pi$  impliquent la charge positive d'un cation en interaction avec les électrons dans un système  $\pi$  d'une molécule. Cette interaction est forte (aussi forte ou plus forte que la liaison H dans certains contextes), elle possède une plage d'intensité comprise entre 8 et 20 kJ.mol<sup>-1</sup> [48]. Les interactions anion- $\pi$  sont très similaires aux interactions cation- $\pi$ . Dans ce cas, un anion se trouve au sommet d'un système  $\pi$  pauvre en électrons. Leur plage d'intensité est comprise entre 20 et 50 kJ.mol<sup>-1</sup> [49]. Il existe également des interactions CH<sub>3</sub>- $\pi$ . L'attraction dans les interactions C-H/ $\pi$  est principalement due aux interactions de dispersion et est plus faible (-6 kJ.mol<sup>-1</sup> entre une molécule de méthane et de benzène) [48].

### 3. Aspects thermodynamiques des assemblages de polymères

#### 3.1. Définitions et généralités

Dans le monde du vivant, le caractère structuré et organisé de la vie peut paraître surprenant. Cette organisation s'étend de l'état d'un organisme, au niveau cellulaire jusqu'au niveau moléculaire et les assemblages de polymères ne font pas exception. Cette organisation découle de lois de la physique : les lois de la thermodynamique. Ces lois se basent sur la définition du milieu en deux parties : le système, défini comme une région du milieu, et l'entourage du système (tout ce qui l'entoure). La première loi de la thermodynamique établit que l'énergie

totale du milieu (système et entourage du système) est toujours constante ; elle ne peut ni être créée, ni disparaître [49].

Cette énergie peut prendre différentes formes, comme la chaleur libérée par une réaction par exemple. Il en découle que l'énergie libérée par la formation d'une liaison ou d'une interaction doit être libérée sous forme de chaleur ou stockée sous une autre forme.

La deuxième loi de la thermodynamique concerne l'entropie ( $\Delta S$ ). L'entropie est communément présentée comme étant le désordre présent dans un système. Cette deuxième loi stipule que l'entropie du système et de l'entourage du système doit toujours augmenter pour qu'une réaction soit spontanée. Cette loi n'est pas simple à appréhender, car lorsque de l'ordre est créé dans un milieu, l'entropie devrait diminuer. Cependant, elle peut diminuer localement dans le système, à condition qu'elle augmente en compensation dans l'entourage du système.

La variation du facteur entropique est proportionnelle à la quantité de chaleur échangée entre le système et son entourage. La chaleur du système est appelée enthalpie ( $\Delta H$ ). Cette compensation peut s'exprimer au travers de la relation suivante (Équation 2) :

*Équation 2 : Calcul de l'énergie libre d'un mélange grâce à la théorie de Flory-Huggins [21]*

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Où  $\Delta G$  ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) correspond à la variation de l'énergie libre du système,  $\Delta H$  ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) correspond à la variation de l'enthalpie d'interaction,  $\Delta S$  ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ) correspond à la variation de l'entropie et  $T$  à la température (K).

L'énergie libre  $\Delta G$  correspond à l'état dans lequel se trouve le système constitué par deux polymères mélangés. Si  $\Delta G < 0$ , l'interaction entre les polymères est spontanée [50]. La contribution de l'enthalpie,  $\Delta H$ , repose également sur l'existence de forces intermoléculaires répulsives (hydratation, répulsions électrostatiques ou stériques) ou attractives (interactions électrostatiques, hydrophobes, Van der Waals) entre les molécules et les atomes des différents constituants du mélange.

En général, il est possible de jouer sur l'enthalpie  $\Delta H$  qui regroupe l'ensemble des forces internes d'attraction ou de répulsion qui peuvent exister, liées à la structure chimique et à la polarité des chaînes. Concernant la variation d'entropie  $\Delta S$ , par rapport à un volume de référence, plus les molécules seront petites, plus le nombre d'arrangements possibles sera grand et plus  $\Delta S$  sera élevée.

L'établissement de liaisons électrostatiques entre les molécules chargées entraîne une diminution de l'énergie libre du système par diminution de la mobilité et de la flexibilité des biopolymères. Cependant, la perte d'entropie engendrée est en partie compensée par la contribution enthalpique du mélange et celle entropique provenant de la libération des contre-ions et des molécules d'eau associées aux macromolécules [23,51,52].

En résumé, les interactions hydrophobes entre polymères et la libération d'eau qui en découle contribuent à augmenter le paramètre entropique donc à favoriser l'énergie libre du système. De plus, des transformations endothermiques peuvent également être liées à des phénomènes d'agrégation ou de réorganisation au sein d'un système [53,54].

*A contrario*, les liaisons hydrogène, les interactions de Van der Waals et les interactions électrostatiques entre polymères libèrent de la chaleur, favorisant le paramètre enthalpique ( $\Delta H$  est négatif dans le cas d'une transformation exothermique) [55,56]. La réorganisation des solvants représente également une grande partie du signal exothermique, des liaisons hydrogène à l'interface des complexes favorisant l'enthalpie, même si ce phénomène est contrebalancé par une pénalité entropique (pics endothermiques) [18]. Enfin, l'apparition successive de signaux exothermiques et endothermiques est typiquement caractéristique de la formation de complexes pour de nombreux systèmes [18]. Il a été démontré que ce phénomène était induit soit par l'agrégation de complexes, soit par de la coacervation [57–59]. Il est généralement admis que des interactions fortes favorisent l'agrégation, tandis que les interactions plus faibles favorisent des phénomènes de coacervation [60]. Bien que certaines interactions soient faibles

individuellement (les interactions de Van der Waals, l'effet hydrophobe ou les interactions électrostatiques ont une force entre 2 et 15 kJ.mol<sup>-1</sup>), l'interaction globale entre deux molécules résulte de la somme de toutes ces interactions. Lorsqu'elles sont nombreuses, elles peuvent donc devenir collectivement importantes [25,61]. La compensation de ces interactions doit rendre la variation d'énergie libre négative pour que l'assemblage des polymères soit spontané.

### 3.2. Influence de la température

D'après l'Équation 2,  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ . Ainsi, la température favorise généralement la contribution entropique tandis que la contribution enthalpique est peu dépendante de la température. Dans la littérature, il est généralement acquis que les interactions hydrophobes (et donc le paramètre entropique) sont plutôt défavorables à la formation de complexes entre polymères [53,54,62]. Girard et ses collaborateurs (2002) ont étudié la complexation entre la  $\beta$ -lactoglobuline et la pectine méthylée. Cette étude a révélé que le taux d'assemblage diminuait avec l'augmentation de la température, ce qui suggérait que la formation des complexes était attribuée à la formation de liaisons hydrogène. Dans ce cas, une augmentation de température favoriserait le paramètre entropique. Liu et ses collaborateurs (2010) ont étudié l'effet de la température sur la coacervation complexe entre la gomme d'Acacia et des isolats de protéines de pois. Ils ont découvert que les pH optimaux d'assemblages étaient dépendants de la température, et qu'ils diminuaient lorsque la température augmentait [63]. En effet, à haute température, les liaisons hydrogène sont défavorisées tandis que les interactions hydrophobes sont favorisées. Des températures élevées provoquent des changements de structure et de conformation des protéines et des polysaccharides. Toutefois, lorsque les températures deviennent trop élevées, les protéines peuvent se dénaturer et s'agréger, conduisant à des  $\Delta H$  faibles, comme cela a pu être montré sur le modèle  $\beta$ -lactoglobuline/gomme Persane [64]. Dans le cas d'assemblages protéine-protéine, comme pour la coacervation  $\alpha$ -lactalbumine/lysozyme [65], la contribution positive des interactions hydrophobes a été montrée par une augmentation



---

du ratio molaire optimal lorsque la température augmentait de 5 à 45 °C.

La température joue un rôle important lors de l'interaction entre molécules. Lorsque la température augmente, la mobilité des molécules est plus importante. Les interactions hydrophobes sont favorisées tandis que la vitesse de formation des liaisons hydrogène diminue, favorisant ainsi le paramètre entropique [53,54,66].

### 3.3. Influence du pH

Le pH des solutions polymériques est l'un des paramètres influençant le plus les paramètres thermodynamiques des mélanges. En effet, il contrôle le degré d'ionisation des groupements ionisables des chaînes latérales des protéines, mais aussi celui des groupements ionisables chargés des résidus polysaccharidiques.

Un mélange composé d'une protéine et d'un polysaccharide anionique aura le plus d'interactions électrostatiques pour des pH inférieurs au pHi de la protéine qui portera alors un excès de charges positives (et inversement). Le point de neutralisation totale du nombre de charges portées par les deux biopolymères correspond au pH d'équivalence électrique (EEP), pH pour lequel l'intensité d'interaction électrostatique est maximale [67].

Sur le système  $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'Acacia, l'EEP se situe autour du pH de 4,2 [68]. Le rendement maximal de coacervation était obtenu pour un pH et une force ionique spécifique, car ils conditionnent la neutralisation de charges protéine/polysaccharide [69,70]. L'EEP est généralement déterminée par mesure du potentiel Zêta des polymères en cherchant le pH pour lequel la valeur des deux potentiels Zêta sont égaux en valeur absolue mais de charges opposées [10,41,68,71]. Cette méthode permet d'approcher le pH optimal d'interaction mais reste imparfaite, car elle ne prend pas en compte l'encombrement stérique des polymères, ceci mène inévitablement à ce que toutes les charges n'interagissent pas *in situ*. Toutefois, plus les polymères sont chargés, plus il y a d'interactions électrostatiques possibles entre eux et plus le facteur enthalpique sera favorable à l'interaction des polymères.

#### 4. Assemblages de polymères

Les auto-assemblages constituent la future génération de synthèse de matériaux. Les techniques utilisées peuvent être classifiées en deux catégories, en fonction des techniques physico-chimiques utilisées : les assemblages « Top-down » et « Bottom-up » Figure 4.

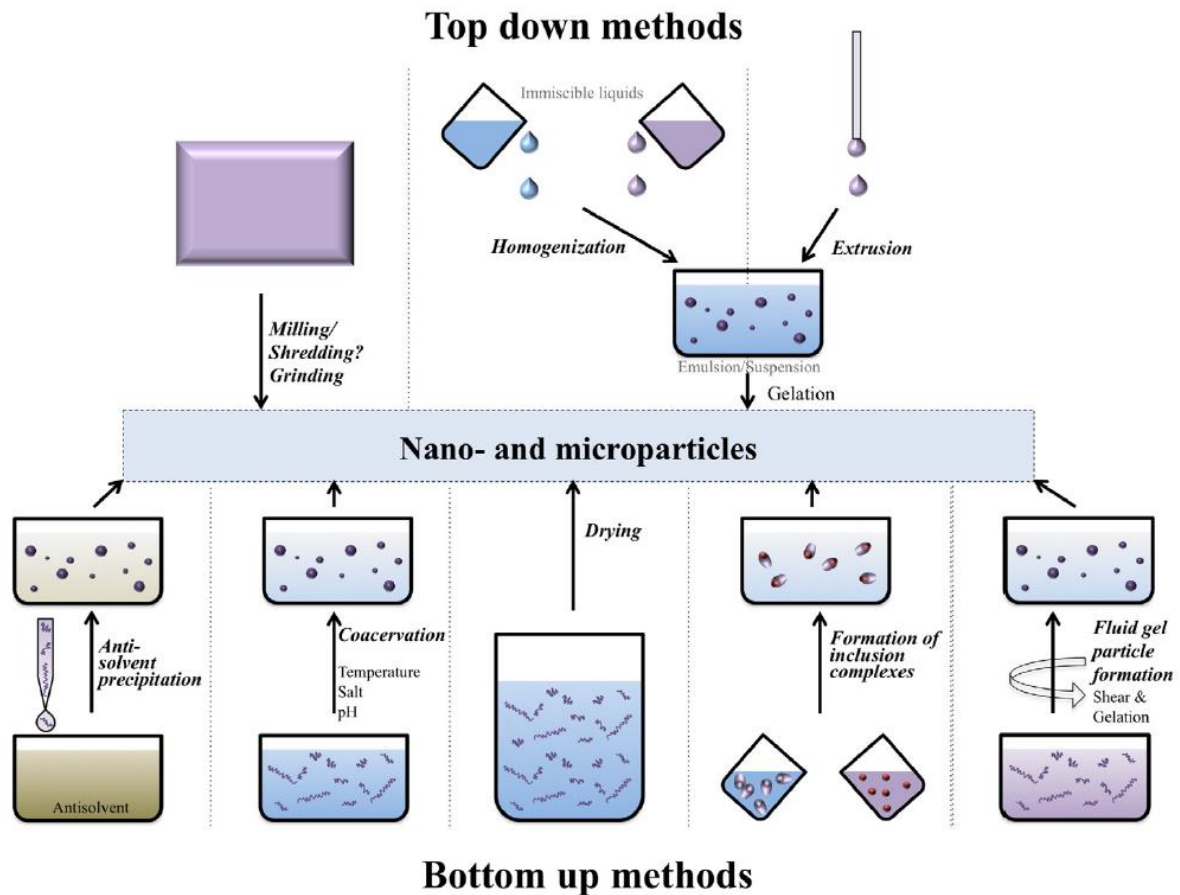


Figure 4 : Représentation schématique des techniques top-down et bottom-up utilisées pour produire des nano et microparticules à base de polymères [12]

Les approches dites “Top-down” couramment utilisées impliquent du broyage et de l’homogénéisation qui impliquent la décomposition de solides ou de liquides (grosses particules) en particules plus petites [12,72]. En règle générale, ces approches reposent sur trois types de forces pour la décomposition des particules : le cisaillement, l’impact et la compression. Ces approches sont largement utilisées dans l’industrie pour former des particules de biopolymère, mais elles ont certaines limites, telles que le coût de l’équipement, l’entretien, et les coûts de fonctionnement ainsi que les difficultés dans la création de particules avec des

propriétés structurelles bien définies.

Les approches dites « Bottom-up » sont définies comme la construction de particules par l'auto-assemblage ou l'auto-organisation de molécules en raison de changements dans les conditions environnementales telles que le pH, la force ionique, la température ou la concentration en polymères. Les exemples sont les précipitations liquides d'anti solvant, la coacervation, la complexation d'inclusion et la formation de gel liquide. En général, les besoins énergétiques pour les méthodes « Bottom-up » sont inférieurs à ceux des méthodes « Top-down » [73]. Les approches « Bottom-up » permettent la production de particules très fines avec un meilleur contrôle des propriétés des particules, telles que la taille ou la morphologie. Les coacervats sont généralement formés lorsque deux biopolymères de charge opposée interagissent les uns avec les autres par le biais d'une attraction électrostatique, mais d'autres interactions peuvent également être importantes, telles que les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogène. C'est cette technique de formation de particules qui sera étudiée dans ce travail.

## **II. La coacervation complexe**

### **1. Définitions et historique de la coacervation complexe**

La coacervation complexe est une séparation de phase associative entre deux espèces différentes qui donne lieu à la formation de complexes : les coacervats. Il existe aussi un phénomène de coacervation simple qui se produit avec une seule espèce : ce système ne sera pas détaillé ici. Les coacervats sont des objets sphériques constitués d'une solution aqueuse concentrée en polymères (25 % en poids) présentant un diamètre de l'ordre du micromètre dispersé dans une phase aqueuse faiblement concentrée en polymère. Il s'agit donc d'une dispersion d'une phase aqueuse concentrée dans une phase aqueuse diluée. (Figure 5) [56,74,75].

Les coacervats sont omniprésents dans la nature, comme par exemple dans la colle contenue

dans la bave de *Phragmatopoma californica* (vers de sable) [76], dans les nucléotides bactériens [77,78] ou dans les complexes ADN-histones des fibres de chromatines [79,80]. La formation de coacervats peut être observée dans un mélange de protéines et/ou de polysaccharides en milieux aqueux [1,81,82].

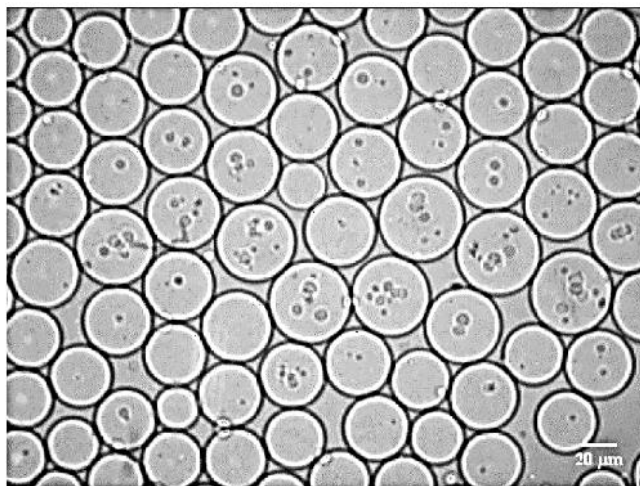


Figure 5 : Exemple de morphologie sphérique de coacervats complexes de gélatine et de cellulose carboxyméthylée (ratio 7:1, pH 4,25) observée en microscopie optique [56].

Cette séparation de phase liquide/liquide sous forme d'un système colloïdal est induite par des interactions électrostatiques entre deux polymères de charges opposées. La phase la plus concentrée en polymères contient les coacervats et l'autre phase est la solution à l'équilibre (phase diluée) (Figure 6). Le coacervat est ainsi formé par assemblage de deux polymères de charges opposées grâce à des interactions électrostatiques. Le phénomène de séparation de phase dans une solution contenant des polymères de charges opposées a été décrit pour la première fois en 1911 par Tiebackx [34]. Puis Bungenberg de Jong (1949) a introduit le terme de coacervation complexe et a posé les bases théoriques et expérimentales du phénomène avec le système gélatine/gomme d'Acacia [35].

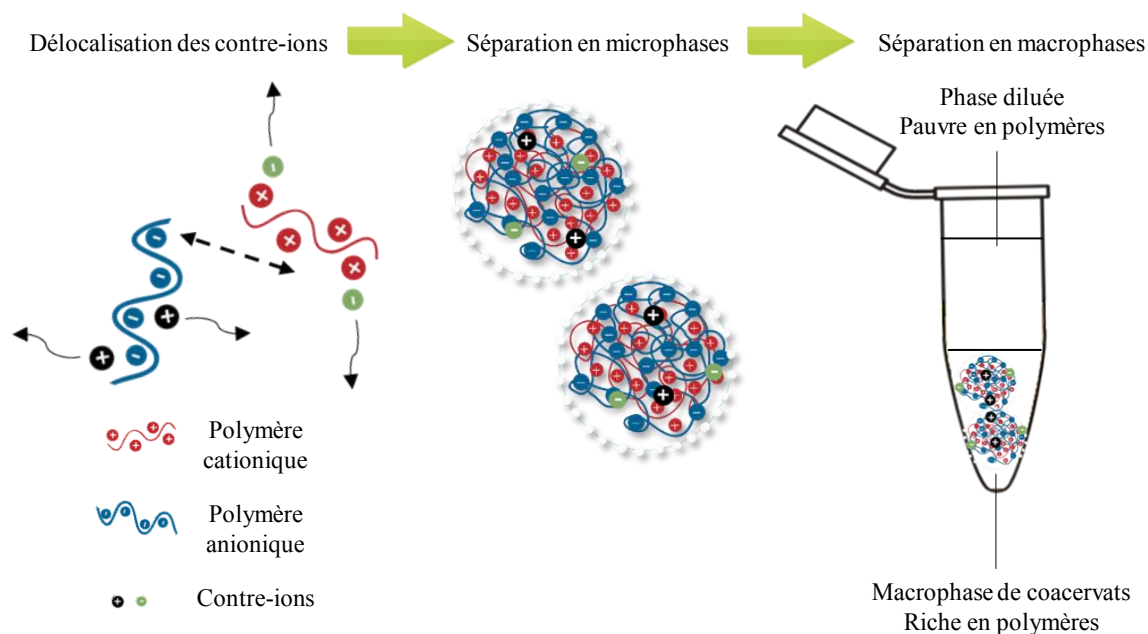


Figure 6 : Représentation schématique de la coacervation complexe (adapté de [83])

## 2. Modèles de la coacervation complexe

Plusieurs modèles ont été développés depuis les années 1950 pour expliquer la coacervation complexe. La théorie la plus utilisée est celle de Voorn et Overbeek [77]. Elle est basée sur les résultats expérimentaux obtenus sur le système gélatine/gomme d'Acacia [35]. La coacervation entre ces deux polymères y est décrite comme spontanée. Elle résulte de la compétition entre forces électrostatiques qui tendent à rapprocher les molécules de charges opposées, et les effets entropiques qui tendent à les éloigner. Les polymères de charges opposées s'associent pour former des coacervats qui contiennent aussi des molécules d'eau. La présence de solvant dans la phase coacervat contribue à augmenter l'entropie du système en favorisant les réarrangements moléculaires. Le coacervat est de nature liquide et le phénomène de coacervation est totalement réversible. Cette théorie est basée sur quelques postulats :

- Les polymères possèdent une chaîne désordonnée ;
- Les interactions solvant/soluté sont négligeables ;
- La distribution des charges dans le mélange est homogène ;
- Il n'y a pas d'association spécifique entre les polymères.

Dans leur traitement théorique, Voorn et Overbeek utilisent les équations de Debye et Hückel pour rendre compte des interactions électrostatiques et la théorie de Flory-Huggins pour ce qui concerne les effets entropiques.

Toutefois, la coacervation complexe est dépendante de nombreux paramètres (Figure 7), tels que le pH, la force ionique, la charge des polymères et la flexibilité des chaînes des polymères [18,74,84–86]. Le modèle de Voorn-Overbeek prend en compte certains de ces paramètres, mais pas tous.

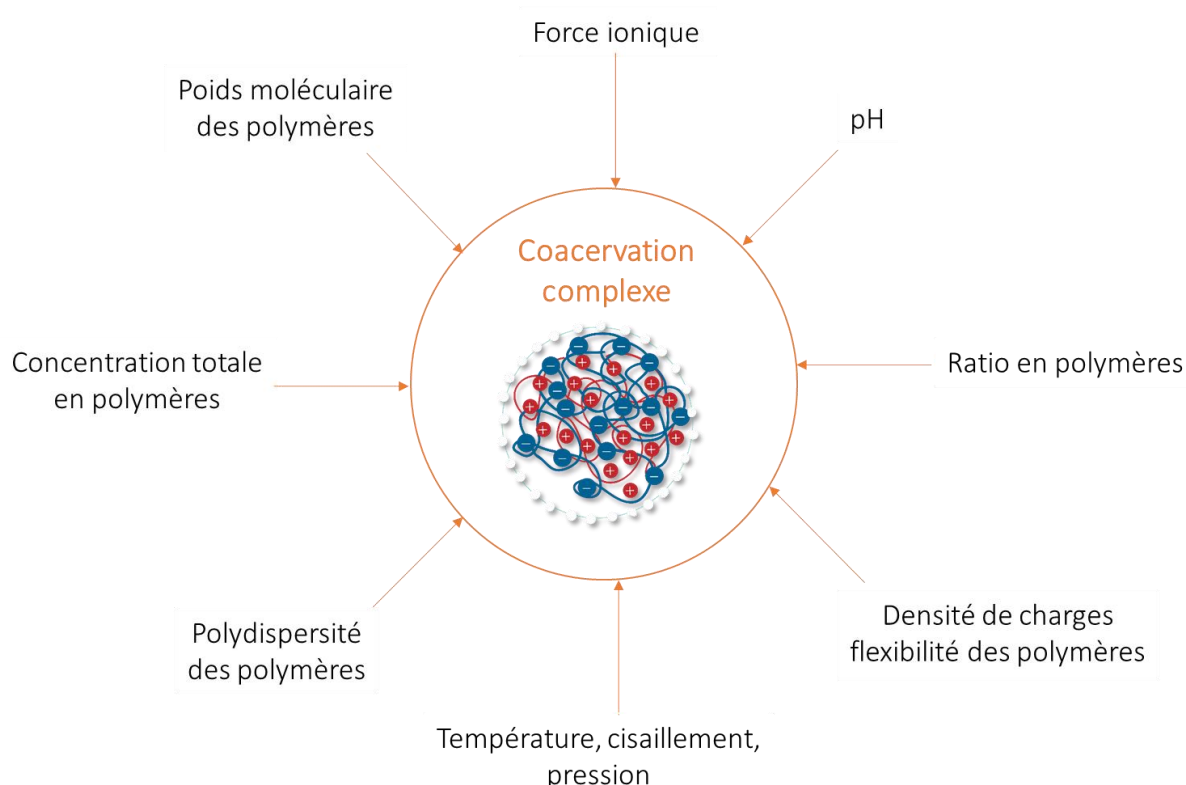


Figure 7 : Paramètres influençant la formation de coacervats et leurs caractéristiques morphologiques (adapté de [87])

De nombreux autres modèles théoriques ont vu le jour afin d'essayer de prendre en compte un maximum de paramètres et de permettre de prévoir les diagrammes de phases de la coacervation entre deux polymères, les paramètres thermodynamiques de l'interaction ou même la tension de surface des coacervats... Les modèles RPA (Robotic Process Automation) permettent par exemple de mieux comprendre la relation entre les connexions établies entre polymères et les

interactions électrostatiques [88]. Toutefois, ces modèles sophistiqués sont limités au domaine théorique et ne sont pas toujours applicables au domaine expérimental, en particulier dans les cas où les interactions électrostatiques sont fortes ou que la valence des ions est grande [89,90]. Le même problème est rencontré avec les autres modèles connus tels que l'approche d'Edwards basée sur la théorie des champs de polymères, les théories sur le relargage des contre-ions, des simulations de dynamique moléculaire, la théorie de la fluctuation incorporée, le modèle PRISM (Polymer Reference Interaction Site Model). Les avantages et les inconvénients, ainsi que les domaines d'application de ces modèles sont détaillés dans la revue de Charles E. Sing sur les théories modernes sur la coacervation complexe [88].

Toutefois, aucun de ces modèles ne permet de prendre en compte les différents paramètres qui jouent sur la coacervation complexe, ou ils sont focalisés uniquement sur un ou deux des événements qui interviennent dans le phénomène de coacervation (attraction/répulsion des polymères, complexation, exposition des contre-ions, relargage de l'eau, réarrangements des coacervats ou coalescence ...).

### **3. Influence de différents paramètres sur la coacervation complexe de polymères**

La complexité de l'élaboration d'un modèle sur la coacervation a conduit à de nombreuses approches expérimentales sur des systèmes très variés. Toutefois, les paramètres étudiés sont souvent les mêmes : le pH, la force ionique, le ratio entre polymères (massique ou molaire), la température ou la concentration totale en polymères. Le Tableau 2 regroupe de nombreux systèmes présentés dans la littérature.

La plupart des études focalisent principalement sur le ratio entre polymères et le pH de coacervation. Si les systèmes étudiés diffèrent, les outils pour les étudier sont souvent proches. Les études convergent vers une étape de formation de complexes solubles avant l'étape de coacervation à proprement parlé. Cette étape est suivie par la coacervation, étape de neutralisation des charges des deux polymères en présence.

Tableau 2 : Exemples d'études portant sur la coacervation complexe entre différents polymères dans différentes conditions.

Biopolymères		pH	Force ionique (M)	Ratio massique	T (°C)	Concentration (% wt. m/m)	Références
Gélatine	Gomme d'Acacia	4	-	1:1	50	2,5-7,5	[91]
WPI	Gomme d'Acacia	3,0-6,5	-	2:1 1:1-4:1	TA	0,05-3,00 ; 1,00	[92,93]
IP soja	Gomme d'Acacia	2,5-4,5	0,0-1,0	1:1	50	7,5	[94]
Chitosane	Gomme d'Acacia	2,0-4,0	-	4:1 (molaire)	TA	-	[8]
Gélatine	CMC	9,0-11,0	-	1:0,5-1:2	35	-	[95]
Gélatine	Chitosane	4,5-6,5	-	0:1-1:0	30-50	-	[96]
Chitosane	CMC	3,0-5,0	-	0,5-2,0:1	15	-	[97]
IP soja	Pectine LM	4,4	-	1:1	40	-	[98]
IP lentille	Gomme d'Acacia	1,5-8,0	-	1:1	TA	0,05	[99]
IP pois	Gomme d'Acacia	2,4-4,3	-	2:1	TA	0,5	[100,101]
IP pois	Chitosane	2,0-10,0	-	1:1-20:1	TA	-	[102]
IP pois	Alginate	1,5-7,0	-	1:1-20:1	TA	0,1	[103]
Alpha gliadines	Gomme d'Acacia	2,0-4,0	0,05	3:7	30	0,1-1,0	[104]
Globulines de pois	Gomme d'Acacia	2,0-4,0	0,01-0,05	1:1	30	0,1-1,0	[104]
SAB	Pectine LM	1,6-4,7	0,01-0,4	1:1-20:1	25	0,1-2,0	[105]
Gélatine	Alginate	2,0-5,0	-	3,5:1	60	1-4	[106]
$\beta$ -lactoglobuline	Gomme d'Acacia	3,5-4,4	-	2:1	TA	0,1	[84]
Chitosane	Gomme d'Acacia	4,5	-	1:1-9:1	20	5	[107]
IP canola	Carraghénane $\kappa$ , $\iota$ et $\lambda$	1,5-7,5	-	1:1-75:1	TA	0,05	[108]
$\beta$ -lactoglobuline	Carraghénane $\kappa$	0,5-7,0	-	2:1	TA	0,15	[109]



Biopolymères		pH	Force ionique (M)	Ratio massique	T (°C)	Concentration (% wt. m/m)	Références
WPI	Gomme Puka	3,4-7,0	0-0,1	2:1-4:1	20	0,3-3,0	[110]
IP de lin	Gomme de lin	1,5-8,0	-	1:1-15:1	TA	0,5	[111]
Ovalbumine	Gomme d'Acacia	3,0-7,0	-	2:1	TA	0,6	[112]
Peptides de leucine	Gomme d'Acacia	1,0-12,0	0-0,5	1,3:1-6,6:1	TA	-	[113]
Chitosane	IP de canola	4,0-8,0	-	1:2-30:1	TA	-	[114]
Chitosane	IP de soja	6,3	-	4:1	50-90	-	[115]
CMC	Gélatine	4,25-4,5	-	7:1	45	1,0	[56]
Chitosane	Acide Hyaluronique	6,25	0,3	0,31 (charge)	TA	-	[116]
Caséine	Gomme d'Acacia	1,0-7,5	-	1:1	25	-	[117]
IP pomme de terre	Alginate, gomme d'Acacia et CMC	3,0-9,0	0-0,09	0,1:1-5:1	TA	0,1	[118]

TA = Température ambiante, IP = Isolat de protéine, CMC = Cellulose carboxyméthylée ; SAB = Sérum Albumine Bovine, WPI = Isolats de protéines sériques du lactosérum, LM = « low methoxy », faiblement méthylée

La plupart des études débutent par une analyse des charges des polymères, afin de savoir dans quelles conditions de pH leurs charges seront opposées et d'essayer de prédire le ratio optimal pour lequel toutes les charges du premier polymère sont neutralisées par toutes les charges du second polymère [1,119]. Les études s'accordent en général pour considérer le ratio optimal comme le ratio pour lequel les coacervats sont neutres. Elles s'entendent également sur le fait que lorsque le ratio optimal est atteint, la turbidité du mélange est maximale. Les coacervats présentent en général de faibles tensions de surface (à la surface de l'échantillon), un comportement visqueux à faible cisaillement et un comportement plus élastique à fort cisaillement [1,120–122]. Les coacervats ne sont pas stables dans le temps, ils coalescent pour former des coacervats de tailles plus importantes jusqu'à un certain moment où ils ne coalescent plus. Ce phénomène a été observé par plusieurs auteurs, mais n'est toujours pas expliqué [123]. Toutes ces études ont montré un impact important de la force ionique, du pH et de la concentration en polymères sur la coacervation. Une quantité trop importante de sel, un changement de pH ou un phénomène de dilution peut conduire à la destruction des coacervats [124]. Pour cette raison, beaucoup d'études tendent à s'intéresser à la compréhension de la coacervation d'un point de vue fondamental. De plus, de nombreuses études se focalisent sur les applications de la coacervation, notamment dans la texturation de matrices alimentaires [5, 6]. Cependant, à l'heure actuelle, la plupart des études publiées portent sur l'encapsulation de molécules d'intérêt. Toutefois, ces approches restent limitées à l'échelle industrielle du fait de l'instabilité des coacervats *in vivo*.

#### **4. Application des coacervats**

Les coacervats ont de nombreuses applications grâce à leur facilité de préparation. À ce jour, l'une des utilisations les plus courantes des coacervats est leur utilisation dans les produits alimentaires pour stabiliser les petites molécules [125–130], mais d'autres applications ont également été étudiées.

#### 4.1. L'encapsulation de molécules d'intérêt

La coacervation complexe de polymères peut servir à protéger et délivrer des molécules d'intérêt vers une cible choisie. Cela peut servir à protéger des ingrédients sensibles, ou à masquer le goût de composés bioactifs. Une vaste gamme de matériaux peut être utilisée, y compris plusieurs polysaccharides, comme l'amidon, la pectine, le chitosane ou la gomme d'Acacia, mais également des protéines comme les caséines, les protéines de soja ou les protéines sériques [119]. Ces coacervats peuvent être utilisés pour incorporer des agents bioactifs polaires, non polaires et amphiphiles dans le même système [131]. Une liste non-exhaustive des travaux récents sur l'encapsulation par coacervation complexe est présentée dans le Tableau 3.

Une grande variété de molécules d'intérêt peut être encapsulée, y compris des vitamines, des antioxydants, des acides gras polyinsaturés, des caroténoïdes, des phytostérols et des peptides bioactifs (Tableau 3). L'efficacité de ces molécules dépend de leur biodisponibilité. Les facteurs qui affectent la biodisponibilité sont une déstabilisation durant le procédé de fabrication, une faible solubilité et/ou perméabilité au sein du tractus gastro-intestinal et une dégradation/métabolisation au sein du tractus gastro-intestinal [12]. En sélectionnant soigneusement le matériau de la matrice, des sites spécifiques de libération dans le corps humain peuvent être ciblés (Figure 8). Une étude récente menée par Lim et ses collaborateurs [132], a étudié l'encapsulation de la glucose oxydase et de l'insuline dans des coacervats (réalisés à partir de peptides de becs de calamar) pour la libération contrôlée d'insuline. La concentration de glucose contrôle le taux de libération d'insuline. Lorsque le glucose se disperse dans les coacervats, la glucose oxydase le convertit en acide gluconique. La diminution du pH qui en résulte entraîne la dissolution des coacervats et la libération subséquente d'insuline [130,132]. Les perspectives de l'encapsulation par coacervation sont multiples et c'est un sujet très prometteur dans des domaines comme l'agroalimentaire, la pharmacie ou la cosmétique.

Tableau 3 : Biopolymères utilisés, composés encapsulés et paramètres étudiés pour l'encapsulation dans des coacervats de la littérature, avec les références.

Biopolymères utilisés pour la coacervation	Composés encapsulés	Paramètres étudiés	Références
Poly (L-lysine) et poly (D/L)-acide glutamique	BSA	pH, FI	[133,134]
Alginate et chitosane	BSA	pH, Rt	[135–137]
Gomme de guar carboxyméthylée et alginate	Rouge Congo	Rt	[138]
Lactotransferrine et $\beta$ -lactoglobuline	Vitamine B9	Rt	[139,140]
Gélatine et gomme d'Acacia	Sucralose, acide tannique, fucoxanthine, huile essentielle de jasmin	Rt, pH, TT, homogénéisation, FI	[141–151]
Gélatine et alginate	Facteur de croissance	pH, Rt	[106,152]
Gélatine et carraghénane $\kappa$	Huile de neem	pH, Rt	[153]
Gélatine et CMC	Huile de neem, huile essentielle d'arbre à thé, Ibuprofène	pH, Rt	[154–156]
WPI et gomme d'Acacia	Acides gras riches en Omega 3, bactéries probiotiques	pH, Rt, TT, conditions de stockage	[123,129,157,158]
Alginate et pectine LM	Ciprofloxacine	pH, Rt, FI	[159,160]
Caséine et gomme adragante	$\beta$ -carotène	Rt, pH, TT, FI	[161]
Caséinate de sodium, WPI et CMC	$\beta$ -pinène (arôme)	Rt	[162]
Caséinate de sodium, BSA et chitosane	Fluorescéine, rhodamine B, riboflavine	pH, Rt	[163,164]
Gélatine et gomme d'Acacia	Huile de poisson	Conditions de stockage	[165–167]
Gomme ghatti, gomme d'Acacia et IP de soja	Acide $\alpha$ -linoléique	pH, Rt	[168]
Gélatine et acide oléique/myristoléique	Rhodamine B	Rt	[169]
Gomme d'Acacia et BSA	Curcumine	pH, Rt	[170]
Gélatine et gomme de guar sodium-carboxyméthylée	Huile de clou de girofle, sulphaméthoxazole	pH	[171]
Gélatine et hexamétophosphate de sodium	Huile de thon, Huile de thon enrichie en vitamines A, D3, E, K2, curcumine, coenzyme Q10	pH, Rt, homogénéisation	[172,173]

Biopolymères utilisés pour la coacervation	Composés encapsulés	Paramètres étudiés	Références
IP de soja et gomme d'Acacia	Huile d'orange douce	pH, Rt, FI	[94]
WPI et gomme d'Acacia	Acétate de dodécyle	pH, Rt	[93,174]
$\beta$ -lactoglobuline et gomme d'Acacia	Quercétine	pH, Rt, TT	[93,175]
IP de soja et chitosane	Capsanthine	pH, Rt, TT, FI	[176,177]
Carraghénane $\lambda$ , CMC et protéines de soja	Polydextrose	pH, Rt, TT	[178]
WPI et pectine LM	Polyphénols	pH, FI, taux de cisaillement	[179,180]
Alginate de calcium et chitosane	$\alpha$ -Amylase	Lyophilisation, atomisation	[181]
IP de soja et gomme d'Acacia	Huile de lin	pH, Rt	[182]
WPI et carraghénane $\kappa$ , $\iota$ et $\lambda$	Bactérie probiotique	pH, Rt	[183,184]
Gélatine et chitosane	Ethylcellulose	pH, Rt	[185]
BSA et lysozyme	CaCO <sub>3</sub>	pH, Rt	[186]
Lysozyme et CMC	Curcumine	pH, Rt	[128]
Poly (L-lysine) et sulfates de cellulose	Rifampicine, bisphosphonate, risédronate	pH, Rt, FI	[187]
Gélatine et gomme de cajou	Astaxanthine	pH, conditions de stockage	[188]
Collagène et alginate, collagène et pectine LM	Extrait de peau d'avocat et nisine	Lyophilisation, atomisation	[189]
Gomme d'Acacia et chitosane O-carboxyméthylé	BSA	pH	[190]
WPI et chitosane	Extrait d'ail	Rt, atomisation	[191]
Gélatine et pectine LM	Cinnamaldéhyde	pH, Rt, degré d'estérification, masse molaire	[192]
Gélatine et alginate	BSA	pH, Rt	[193]
Gélatine et CMC	Acide linoléique conjugué	pH, Rt	[56]

FI = Force ionique, Rt = Ratio total en biopolymère, TT = Traitement thermique, IP = Isolat de protéine, CMC = Cellulose carboxyméthylée ; SBA = Sérum Albumine Bovine, WPI = Isolats de protéines sériques du lactosérum, LM = « low methoxy », faiblement méthylée

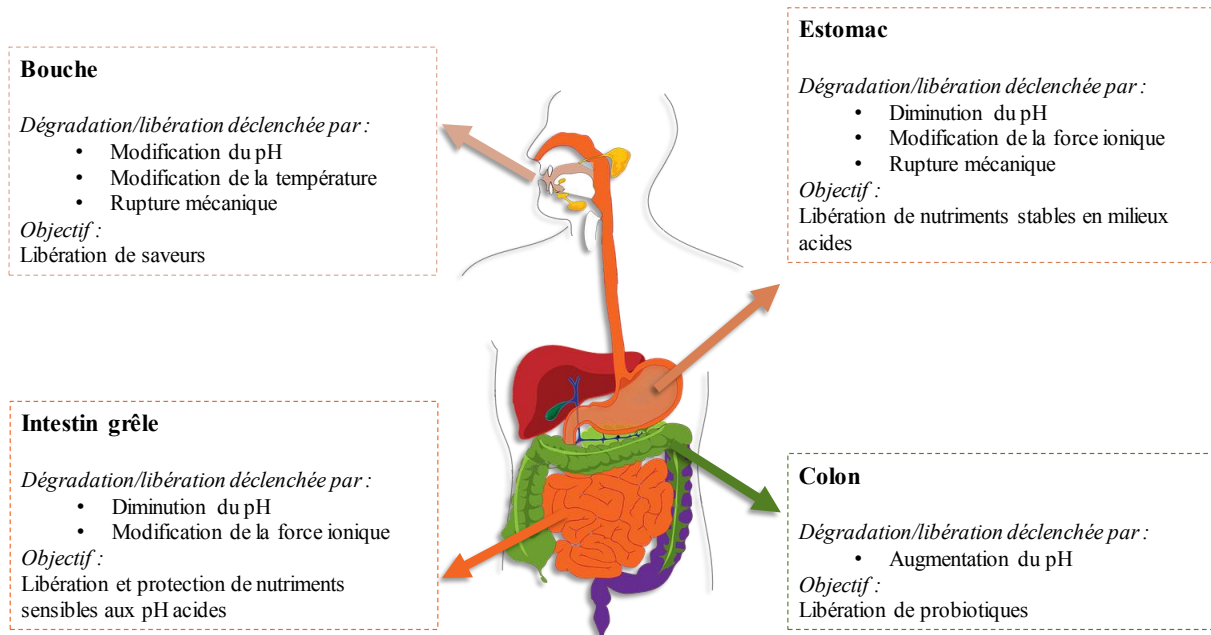


Figure 8 : Représentation schématique du tractus gastro-intestinal humain (TGI). La dégradation des particules sur la voie principale est montrée et certains facteurs de dégradation possible des coacervats sont énumérés. Des exemples de coacervats à base de biopolymère qui pourraient convenir à la libération d'une molécule d'intérêt à la cible spécifique du TGI sont listés. [12]

#### 4.2. La purification de protéines

Les protéines à divers degrés de pureté sont des matières premières pour les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Les développements rapides des biotechnologies ont considérablement augmenté la variété et la disponibilité des protéines, qui doivent être fournies à un haut degré de pureté. Les procédures de séparation et de purification des protéines sont donc de plus en plus importantes, et le coût et l'efficacité de ces processus influencent la commercialisation des protéines issues du génie biologique et la productivité des industries concernées [194].

Les protéines sont habituellement concentrées et purifiées en plusieurs étapes. Bien que la chromatographie joue un rôle clé dans les étapes finales de purification, les précipitations, l'ultrafiltration et la dialyse sont également importantes. La coacervation complexe offre plusieurs avantages par rapport aux autres moyens de séparation. Par rapport à la chromatographie ou l'ultrafiltration, la coacervation est une étape de concentration et non de

dilution, avec une réduction de 100 à 1000 fois de la teneur en eau. D'autre part, le coacervat est une phase aqueuse et la protéine cible n'est pas susceptible d'être dénaturée [195,196]. Pour se faire, un polyélectrolyte d'une masse molaire différente est incorporé dans un système contenant, entre autres la protéine cible afin de générer des complexes protéine-polyélectrolyte sélectifs. Une séparation de phase se produit et la phase « coacervat » est récupérée. Le pH ou la force ionique sont ensuite modifiés et la désintégration des complexes est suivie de la séparation de la protéine (par exemple par ultrafiltration) [119,195]. Dans une étude de Pathak et ses collaborateurs [197], l'albumine du sérum bovin (BSA) et la  $\beta$ -lactoglobuline ont été efficacement séparées en utilisant la gélatine B pour qu'elle se complexe avec la BSA à un pH précédemment défini. Les différentes affinités de liaison entre les chaînes BSA et  $\beta$ -lactoglobuline et les chaînes gélatine B ont été établies grâce à des études d'extinction de fluorescence et de transfert d'énergie par résonance (FRET). La BSA a ensuite été retirée du coacervat en utilisant de l'éthanol qui a causé l'agrégation et la précipitation de la gélatine tandis que la BSA est restée dans le surnageant et a pu être séparée par centrifugation [119,197].

#### 4.3. La formation de cellules artificielles

Certains chercheurs pensent que les premières cellules vivantes étaient des coacervats, en raison de leur ressemblance avec les cellules primitives [12,130,198,199]. Les coacervats ont des structures relativement ouvertes avec des canaux [123,131] qui permettent l'apport d'éléments nutritifs et l'échange de déchets [200]. En outre, les coacervats sont des structures métastables adaptables, capables de répondre aux changements environnementaux [126,201]. La possibilité d'utiliser des coacervats pour des applications qui imitent des fonctions cellulaires évoluées a été étudiée [130]. Dans une étude récente de Nott et ses collaborateurs [202], la répartition de différents ADN et ARN dans les gouttelettes de coacervats protéiques a été quantifiée. Le réseau de protéines formé lors de la séparation de phase affectait la répartition des différents acides nucléiques et pouvait donc être utilisé comme filtre moléculaire pour exclure les

séquences à double brin, en contrôlant l'environnement cellulaire. En effet, à l'intérieur des gouttelettes, l'ADN était déstabilisé (sans avoir besoin d'ATP) et simultanément, les structures monobrins étaient stabilisées. En raison des différences dans la répartition de l'ADN et de l'ARN, ces filtres moléculaires pourraient être utilisés comme des réacteurs *in vivo* [202].

### III. Système étudié

Afin d'étudier la coacervation complexe entre polysaccharides chargés, le choix s'est rapidement orienté vers le chitosane, potentiellement chargé positivement, et la gomme d'Acacia, potentiellement chargée négativement dans une gamme de pH définie.

#### 1. Le chitosane

##### 1.1. Structure chimique

Le chitosane est un polymère de glucosamine et de N-acétyl-glucosamine liés en  $\beta$  (1-4) et présentant une grande densité de charges positives lorsqu'il est sous sa forme ionisée [203,204] (Figure 9). C'est une propriété que peu de polysaccharides présentent et c'est la raison principale qui a conduit au choix du chitosane dans cette étude. De plus, ce polysaccharide modèle a été utilisé pour développer le procédé de fonctionnalisation enzymatique au sein du laboratoire [205].

Le chitosane est produit à partir de la chitine, qui est un polysaccharide extrêmement abondant dans la carapace des arthropodes et qui est considéré comme le 2<sup>ème</sup> polymère le plus répandu dans la nature après la cellulose. C'est l'une des substances ayant le taux de production et de biodégradabilité le plus élevé dans la nature [206]. Toutefois, elle possède un inconvénient majeur pour des applications industrielles : elle est très peu soluble dans l'eau ou dans les milieux acides [207,208]. De plus, le chitosane ne peut être consommé par les personnes étant allergiques aux crustacés.

Le chitosane est obtenu à partir de la désacétylation alcaline de la chitine (Figure 9) [206]. Le



rapport D-glucosamine / N-acétyl-D-glucosamine donne le degré de désacétylation du chitosane [207,209]. Lorsqu'il atteint environ 50 %, le chitosane devient soluble dans un milieu aqueux acide [210], ce qui n'est pas le cas de la chitine.

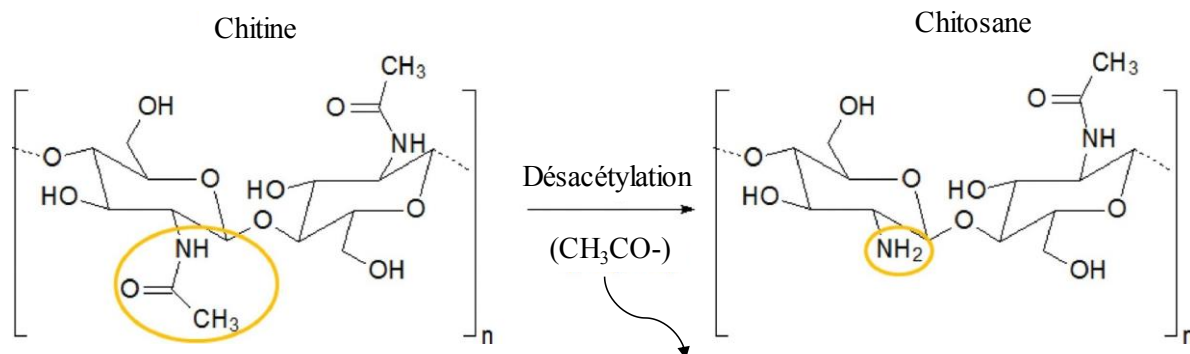


Figure 9 : Structure chimique de la chitine et du chitosane [206].

Lorsque le chitosane est dissous en milieu acide, les groupements aminés sont protonés et le polymère devient cationique, ce qui lui permet d'interagir avec de nombreuses molécules [211]. Cette charge positive serait responsable de son activité antimicrobienne, par l'interaction avec les membranes plasmiques cellulaires chargées négativement des micro-organismes [206,212].

## 1.2. Propriétés physico-chimiques

Pour comprendre les propriétés fonctionnelles du chitosane, il faut prendre en compte le fait qu'elles peuvent varier en fonction du degré de désacétylation, de la masse molaire, de la pureté, la cristallinité, la composition en matières inorganiques ou en eau du chitosane, entre autres [211]. Pour maîtriser les applications du chitosane, il est nécessaire de contrôler ces caractéristiques.

### 1.2.1. Degré de désacétylation et structure cristalline

Le degré de désacétylation (DD) du chitosane est une caractéristique importante car elle a une influence sur la flexibilité du chitosane et sur son comportement en solution, en particulier sur la solubilité du chitosane mais aussi sur la flexibilité des chaînes macromoléculaires, la conformation du polymère et par conséquent la viscosité des solutions [213]. En effet, le pKa

du chitosane est d'environ 6,3, mais dépend de son degré de désacétylation.

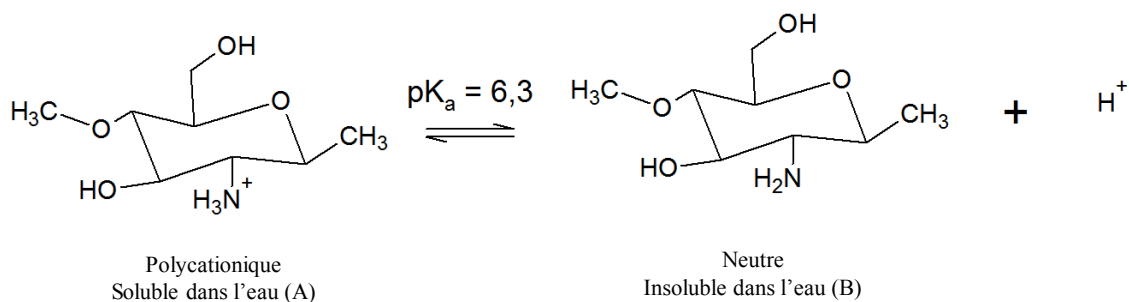


Figure 10 : Structures de la glucosamine en milieu acide (A) et en milieu neutre (B) [213]

À des pH inférieurs à son pKa, les groupements amines du chitosane sont protonnés. Les répulsions électrostatiques entre les charges portées par les amines protonnées deviennent alors plus importantes que les interactions attractives intra et inter-chaînes et permettent la solvation de la chaîne. La solubilité du chitosane est donc principalement gouvernée par l'hydratation des sites chargés [214], qui est directement lié à son degré de désacétylation. Le chitosane devient alors un polycation (Figure 10) qui permet de fortes interactions électrostatiques avec de petites molécules chargées négativement et des polyanions pour former divers types de complexes, comme des particules colloïdales, des agrégats ou des coacervats [114,215,216]. La viscosité dépend également du degré de désacétylation du polymère, car il est étroitement lié à sa densité de charge [217].

La cristallinité du chitosane est également un paramètre important car elle influence un certain nombre de ses caractéristiques comme l'accessibilité des sites internes dans les chaînes macromoléculaires ou ses propriétés de gonflement dans l'eau [218]. Le degré de désacétylation du chitosane ne semblait cependant pas avoir d'influence sur la température de transition vitreuse du chitosane, qui avait toujours une valeur comprise entre 140 et 150 °C [222]

### 1.2.2. Masse molaire

La masse molaire du chitosane ainsi que sa polydispersité en masse molaire sont des caractéristiques ayant une influence déterminante sur la plupart de ses propriétés fonctionnelles [223]. Ce polymère est polydispense : un échantillon est composé d'un mélange de molécules

de chitosane de masses molaires variées [211]. Les chitosanes obtenus industriellement ont une masse molaire (MM) de l'ordre de 100-500 kDa. La masse molaire a une influence sur la viscosité et la solubilité du chitosane, car comme le degré de désacétylation, il a une influence sur la densité de charges du polymère. Plus la masse molaire du chitosane est élevée, moins il est soluble et plus il est visqueux à une température donnée. De plus, la masse molaire influence également les propriétés antioxydantes du polymère.

### 1.2.3. Solubilité

Contrairement à la chitine, le chitosane peut être dissout dans un milieu aqueux acide [225]. Il pourrait être considéré comme une base faible, car les groupes aminés répartis le long de la molécule de chitosane peuvent être protonés. Il peut avoir une densité de charge aussi élevée qu'une charge cationique par unité de glucosamine [211].

Deux caractéristiques contribuent principalement à la solubilité du chitosane à pH neutre et alcalin : sa masse molaire et son degré de désacétylation. Un chitosane fortement désacétylé commence à être soluble à un pH neutre si la masse molaire est très faible [226]. Par exemple, un chitosane de masse molaire moyenne avec un pourcentage d'acétylation de 30 % précipite lorsque le pH est augmenté vers la neutralité. Un chitosane fortement désacétylé (DD = 100 %) commence à être soluble à pH neutre si la masse molaire est réduite au point d'atteindre un degré de polymérisation inférieur à 10 [227]. En revanche, les chitosanes de masses molaires moyennes à élevées ne sont solubles à pH neutre que si le degré de désacétylation est compris entre 40 et 60 % [228,229]. Le chitosane est soluble dans la plupart des acides organiques (acide acétique [230,231], acide chlorogénique [232,233], acide lactique [234,235], acide chlorhydrique [236]...). Cependant, le chitosane est le plus souvent dissous dans une solution aqueuse d'acide acétique à 1% p/v [237].

Par ailleurs, lorsque la température augmente, le rayon hydrodynamique du chitosane en solution augmente également, car la flexibilité des chaînes augmente et le volume spécifique

diminue [238,239]. Cette flexibilité des chaînes provoque également une diminution du potentiel Zêta du chitosane en solution lorsque la température augmente [240]. Ce phénomène est également observé lors d'une augmentation de pH [241]. Entre pH 3,5 et pH 6,0, une diminution de la charge superficielle de 65 mV à un pH de 3,5 à environ 0 mV proche du pH de 6,0 a été observée (Figure 11). Ces résultats suivent la même tendance que celle de l'étendue de la protonation en fonction du pH : une valeur de Zêta plus élevée a été mesurée pour une teneur plus élevée de groupes de  $\text{NH}_3^+$ .

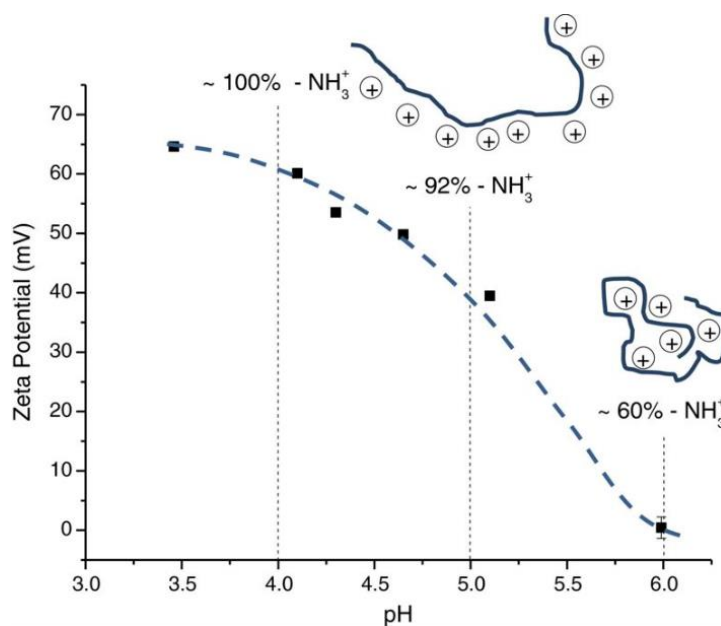


Figure 11 : Potentiel Zêta d'une solution de chitosane en fonction du pH et valeurs calculée du pourcentage de protonation avec une représentation schématique de la conformation du polymère [241].

#### 1.2.4. Viscosité

La viscosité de solutions de chitosane est une caractéristique majeure concernant son comportement en solution et ses potentielles applications. Le chitosane en solution a généralement un comportement non-newtonien rhéofluidifiant [242], c'est-à-dire que la viscosité de la solution dépend de la contrainte mécanique appliquée (taux de cisaillement par exemple) et que plus la contrainte appliquée est forte, moins la solution sera visqueuse. Toutefois, les études rhéologiques ont montré que la viscosité et les propriétés d'écoulement de solutions de chitosane sont liées à la conformation des chaînes macromoléculaires en solution.

La viscosité dépend du degré de désacétylation du polymère, de sa masse molaire mais également du pH de la solution, car ces paramètres sont étroitement liés à la densité de charge du polymère [217]. Plus le pH est bas, plus la viscosité est forte (la viscosité diminue de  $9,16 \times 10^{-4}$  Pa.s à  $1,02 \times 10^{-3}$  Pa.s entre pH 3,50 et pH 2,00 [217]). La viscosité augmente également avec la concentration. En effet, en solution, le chitosane a tendance à s'enchevêtrer et à former des réseaux physiques en raison des liaisons hydrogènes intermoléculaires abondantes, même à de faibles concentrations [211]. La densité des enchevêtrements moléculaires dans des solutions de chitosane dépend de la concentration, de la température et du taux de cisaillement appliqués [243]. Comme pour les autres polysaccharides, la viscosité dynamique du chitosane (en d'autres termes, la résistance opposée par une solution de chitosane à un écoulement laminaire) chute lorsque la température augmente. Le chitosane a généralement un comportement non-Newtonien, mais une augmentation de température de 25 à 50 °C provoque l'apparition d'un comportement Newtonien [213,244–246].

#### 1.2.5. Capacité d'adsorption

Le chitosane possède un degré élevé de réactivité chimique de par ses fonctions amines primaires libres qui lui confèrent une forte densité de charges positives [213]. De plus, la présence de la fonction amine permet de réaliser des réactions chimiques spécifiques telles que des réactions de N-alkylation ou de N-carboxylation [218]. Mais le chitosane est surtout connu pour ses capacités d'adsorption. L'adsorption est un processus mettant en œuvre des forces ioniques, des liaisons hydrogènes ou des interactions de Van der Waals [211]. Cette capacité d'adsorption dépend principalement de son degré de désacétylation et de sa masse molaire, mais aussi du pH ou de la force ionique de la solution [247]. La capacité d'adsorption du chitosane est fondamentale pour de nombreuses applications industrielles, comme agent de floculation dans les eaux usées ou pour des applications alimentaires [248].

### 1.3. Propriétés biologiques

Le chitosane inhiberait la croissance de nombreux parasites et il réduirait le développement des infections : il serait un agent antibactérien et antifongique [249]. Le chitosane aurait également des propriétés antitumorales, antivirales, ainsi que des propriétés cicatrisantes remarquables [250,251]. Il est toutefois important de noter que ces propriétés sont sujettes à débat, car dans la plupart des études sur le chitosane, il est solubilisé dans de l'acide acétique qui possède lui-même une partie de ces propriétés. Le chitosane a la capacité d'induire des mécanismes de résistance et de croissance chez les végétaux et possède également divers effets d'intérêt biomédical [252–256].

Le chitosane est biodégradable et biocompatible. Certaines études ont montré que le chitosane est dégradé par les enzymes bactériennes du côlon [257]. Il a été démontré que la dégradation par les enzymes bactériennes dépendait à la fois de la masse molaire et du degré de désacétylation du chitosane. Les échantillons ayant une masse molaire plus faible et un degré de désacétylation plus faible se sont avérés être des substrats plus sensibles à la dégradation enzymatique. La dégradation enzymatique du chitosane entraîne la libération de sucres aminés, qui peuvent être incorporés dans les voies métaboliques des glycosaminoglycanes et des glycoprotéines ou être excrétés sous forme de composés non toxiques [254,258]. Le chitosane est considéré comme biocompatible : sa toxicité est d'environ 16 g/kg (essai chez la souris), ce qui est semblable à la toxicité du sel ou du sucre [211,259,260].

Enfin, les atomes d'hydrogène protiques des groupements amines au niveau du carbone C2 ou hydroxyles au niveau des carbones C3 et C6 du chitosane lui confèreraient une activité antioxydante significative d'après certaines études [251,261,262]. Toutefois, cette activité dépend de la masse molaire et du degré de désacétylation du chitosane : un chitosane à faible masse molaire aura une activité antioxydante très importante en comparaison avec un chitosane à masse molaire élevée [224].

#### 1.4. Principales applications

Le chitosane a de nombreuses applications. Par exemple, le chitosane peut être utilisé pour retarder ou prévenir l'oxydation des graisses (lipides), ce qui évite le rancissement de certains aliments [263,264]. Le chitosane a ainsi montré des capacités à réduire l'oxydation lipidique dans la chair de poisson [261,265] et dans les viandes. L'utilisation du chitosane comme un additif alimentaire en tant que capteur de graisses est liée au fait qu'il inhibe la métabolisation des graisses grâce aux interactions entre ses fonctions amines et les groupements carboxyliques des lipides [266]. L'application majeure du chitosane reste cependant sa capacité à former des films, qui peuvent être utilisés en agroalimentaire [267], pour fabriquer des emballages [268,269] ou à des fins médicales [270].

Le chitosane possède également de nombreuses applications dans les domaines médical, agricole, d'encapsulation de médicaments, de l'emballage et d'autres domaines. Une liste non-exhaustive de ces applications est dressée Tableau 4.

Le chitosane est également connu pour ses capacités d'adsorption [264]. La capacité du chitosane à adsorber les lipides permettrait de réduire le cholestérol lorsqu'il est consommé par les humains et les animaux [271].

40 *Tableau 4 : Applications du chitosane dans différents domaines, leurs propriétés et leurs références.*

Domaines d'application	Propriétés	Références
Alimentaire	Antimicrobien et agent de conservation (bactéricide, fongicide, ...)	[272]
	Film comestible	[273]
	Accélérateur d'absorption du calcium et du fer	[274]
	Fibres alimentaires	[253,275]
	Additif (texturant, épaississant, stabilisant de couleur, désacidification de fruits, ...)	[253]
	Qualités nutritionnelles (effet hypo-cholestérol, réduction de l'absorption des lipides, ...)	[253]
	Packaging (films)	[211,231,276,277]
Biomédical et biotechnologie	Effet protecteur contre les infections bactériennes	[278]
	Immuno-amplificateur et agent antitumoral	[250,251]
	Action anti-ulcère et anti-acide	[279]
	Vecteurs de molécules d'intérêt	[258,280–283]
	Antioxydant	[251,256]
	Accélérateur de cicatrisation des plaies	[253,283–286]
	Support des enzymes immobilisées	[287]
	Perles poreuses pour bioréacteurs et matériau à membrane	[288]
Environnement et agriculture	Fabrication de films pour l'ingénierie tissulaire	[226,258]
	Anticoagulant	[206]
	Traitement des eaux usées	[206,289]
	Préparation du revêtement des semences	[290]
	Activateur pour cellules végétales	[253,291]
Cosmétique	Chélateur de métaux	[211,292]
	Alternative aux pesticides	[206,293]
	Agent hydrofuge et hydratant pour les crèmes, shampoings et dentifrices	[294]
Autres	Matrice antimicrobienne dans des crèmes solaires	[295,296]
	Encapsulation d'ingrédients actifs	[297]
Autres	Renforcement des feuilles de papier	[298]
	Finition de matériaux textiles (enrobage de coton, ...)	[299–301]



## 2. La gomme d'Acacia

La gomme d'Acacia est un exsudat collant de sève solidifiée à l'air provenant du tronc ou des branches d'arbre du genre *Acacia* [302,303]. Elle est recueillie sous forme d'un solide granulaire de couleur blanche à ambrée pâle (Figure 12). Il existe plusieurs espèces d'*Acacia*, cependant les deux espèces les plus exploitées pour produire la gomme sont *Acacia senegal* (première qualité) et *Acacia seyal* qui donne essentiellement de la gomme friable [304]. La gomme d'*Acacia senegal* tient son nom de son emplacement géographique. Les *Acacias* sont en effet présents dans une large bande de terres semi-arides s'étendant à travers l'Afrique subsaharienne, le Soudan étant le plus grand producteur de gommes d'Acacia. La gomme d'Acacia est utilisée par l'homme depuis l'antiquité [305,306].



Figure 12 : Photographies d'exsudats de gomme d'Acacia [307,308]

Elle était déjà employée il y a des millénaires en Afrique du Sud et du Nord-Est pour ses propriétés adhésives dans la fabrication d'outils [309]. Dans l'Égypte ancienne, elle était utilisée comme adhésif pour la momification et comme liant pigmentaire dans les peintures minérales pour la fabrication des hiéroglyphes [310]. Aujourd'hui, la gomme d'Acacia est employée dans diverses applications industrielles. Elle est utilisée par exemple comme

floculant dans l'industrie de la céramique, en confiserie, comme adhésif dans l'industrie cosmétique, comme additif (épaississant alimentaire E414) pour les procédés de micro-encapsulation ou pour ses propriétés émulsifiantes car elle est relativement hydrophile, mais possède tout de même un caractère amphiphile qui lui permet d'augmenter la stabilité des émulsions. Récemment, elle a également été utilisée pour la stabilisation de nanotubes de carbone [311–313].

La gomme d'Acacia possède à la fois des groupements amines et des groupements carboxyliques [314,315], en faisant un polymère de choix pour envisager des modifications de structure, malgré le fait que cette dernière soit complexe.

### 2.1. Structure chimique

La gomme d'Acacia est un polysaccharide riche en sels de calcium, de magnésium et de potassium et est composée pour la plus grande partie de D-galactose (39 à 42 %), de L-arabinose (24 à 27 %), de L-rhamnose (12 à 16 %), d'acide D-glucuronique et d'acide 4-O-Methyl- $\beta$ -D-glucuronique (15 et 16 %), mais également d'une faible fraction protéique (1,5 à 2,4 %). Ces pourcentages varient en fonction de l'âge des *Acacias*, de leurs emplacements et de l'espèce [303]. La chaîne principale est composée de  $\beta$ -D-galactopyranoses liées en 1,3. Ces unités  $\beta$ -D-galactopyranoses sont composées de chaînes latérales reliées à la chaîne principale par des liaisons  $\beta$ 1,6. Les chaînes principales et latérales contiennent des unités de glucides présentées auparavant, les acides uroniques étant principalement les unités finales [303,316–318].

La structure de la gomme d'Acacia est étudiée depuis les années 60. Selon son origine et l'âge de l'arbre, la masse molaire moyenne de la gomme d'Acacia totale peut varier de  $3,0 \cdot 10^5$  jusqu'à  $1,0 \cdot 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>. Le fractionnement de la gomme d'Acacia a permis de révéler sa composition hétérogène en masse moléculaire [319,320]. Elle a été identifiée comme un mélange de trois fractions :

- La fraction arabinogalactane-peptide (AG) ;

- La fraction arabinogalactane-protéines (AGP) ;
- La fraction glycoprotéines (GP).

La composition du polysaccharide influe sur la solubilité de la gomme d'Acacia (pourcentage d'unités polysaccharides par rapport à celle des unités polypeptidiques) et sur sa mobilité électrophorétique (principalement influencée par le pourcentage de fractions d'acide glucuronique). De plus, le pourcentage de fractions protéiques est un paramètre clé en ce qui concerne l'adsorption de la gomme d'Acacia aux interfaces huile/eau. La gomme d'Acacia et ses fractions ont été étudiées par diffusion de rayonnements aux petits angles [321–323]. Il a été observé que la gomme d'Acacia en solution, même à de faibles concentrations (0,5 % p/v), s'auto-assemble et s'agrège, à cause d'interactions électrostatiques avec elle-même. Ces expériences ont révélé que la gomme d'Acacia est probablement composée de nombreuses structures sphéroïdales entrelacées avec une petite quantité de grandes bobines. Les interactions électrostatiques dirigeraient la structuration de la gomme d'Acacia en solution. Les études ont montré des différences de structure entre chaque fraction.

#### 2.1.1. La fraction arabinogalactane-peptide (AG)

La gomme d'Acacia *A. senegal* contient 88 % de polysaccharides (fraction AG) [314,324]. Cette fraction possède une masse molaire de  $2,8 \cdot 10^5$  g.mol<sup>-1</sup> et un indice de polydispersité faible de 1.28. Elle ne contient que des traces de peptides [325]. À partir d'expériences de diffusion des neutrons aux petits angles, Sanchez et ses collaborateurs [325] ont mis en évidence que la fraction AG semblait être une dispersion d'ellipsoïdes possédant une structure interne ramifiée dense. Cette structure interne ramifiée serait majoritairement composée de sucres. Cette fraction posséderait une morphologie en forme d'ellipsoïde aplatie avec un diamètre de 20 nm et une épaisseur inférieure à 2 nm (Figure 13). La structure ouverte et la grande flexibilité de la fraction AG pourraient expliquer la faible viscosité des solutions de gomme d'Acacia par rapport à la plupart des polysaccharides connus [326].

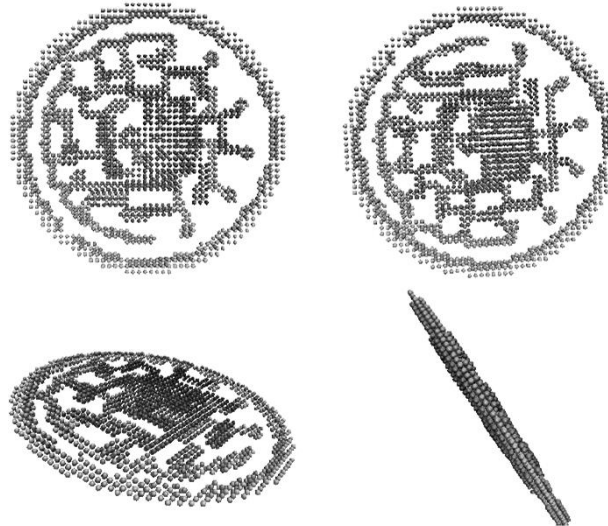
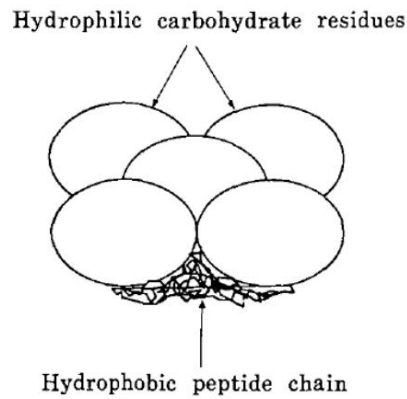


Figure 13 : Modèle de la fraction AG de la gomme d'acacia [325]

La morphologie en réseau du disque, avec la présence de résidus de sucres chargés pourrait jouer un rôle dans les propriétés d'auto-assemblage de la gomme d'Acacia ainsi que dans sa capacité à interagir avec les protéines [68,325,327].

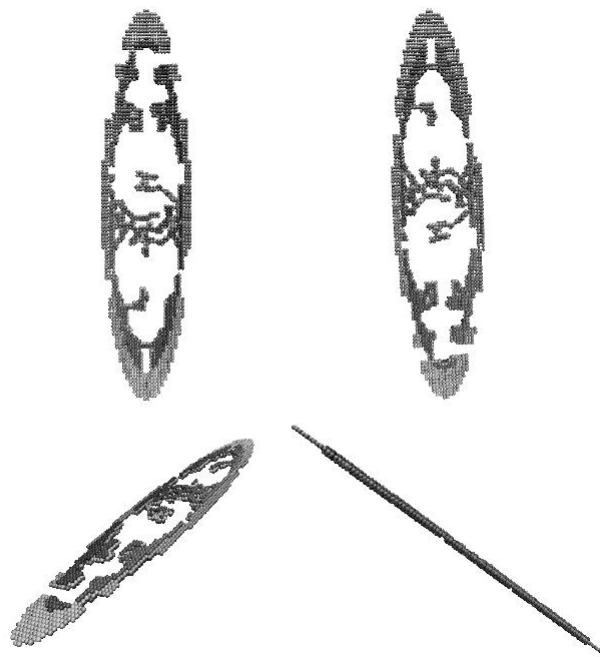
#### 2.1.2. La fraction arabinogalactane-protéines (AGP)

La gomme d'Acacia contient 10 % d'arabinogalactane-protéines. Le rayon hydrodynamique mesuré suggère que ces macromolécules possèdent une structure hyper-ramifiée. La fraction AGP a été étudiée et a été représentée historiquement sous la forme du modèle « Wattleblossom », où les sucres sont liés par liaison covalente à une chaîne centrale de polypeptides [328]. Il a été montré que chaque molécule d'AGP est composée en moyenne de cinq blocs de sucres de masses molaires d'environ  $2 \cdot 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , liés ensemble par des résidus d'acides aminés pour former une structure compacte [328]. L'AGP ressemblerait un bloc de copolymère (Figure 14), ce qui expliquerait sa capacité à stabiliser les émulsions par fortes répulsions stériques. Depuis, de nombreux modèles ont été proposés, comme le modèle « twisted hairy rope » (structure torsadée ramifiée) qui présente l'AGP comme une tige polypeptidique ramifiée à intervalle réguliers par de petits sucres [329], amélioré par la suite par d'autres études, suggérant une structure plus symétrique qui pourrait être la cause de plusieurs propriétés de la gomme.



*Figure 14 : Modèle historique de Wattle blossom représentant la structure de l'AGP [310,330]*

La symétrie des groupements protéiques pourrait être responsable de certaines propriétés d'auto-assemblage de la gomme d'Acacia [331]. D'autres auteurs ont proposé une structure améliorée (Figure 15), dans laquelle les glucides seraient liés à la chaîne protéique principalement par ses sérines et ses hydroxyprolines [332].



*Figure 15 : Illustration schématique de la structure de l'AGP proposée par Renard et ses collaborateurs [333].*

L'AGP aurait une masse molaire comprise entre  $1 \cdot 10^6$  et  $4 \cdot 10^4$  Da et serait polydispersé ( $M_w/M_n = 1.33$ ). Elle consisterait en une chaîne de polypeptides pouvant contenir environ 250 acides aminés avec de courtes chaînes latérales d'arabinose et des blocs beaucoup plus grands de

glucides. La séquence d'acides aminés a été déterminée par Goodrum et ses collaborateurs [331]. Toutefois, des études plus récentes ont suggéré que la fraction AGP pourrait être constituée de deux populations : une population de masse molaire faible composée de longues chaînes ramifiées sous une forme globulaire et une population de masse molaire élevée avec une de courtes chaînes ramifiées et une forme allongée. L'AGP se comporterait en solution comme un polymère ramifié ou hyper-ramifié avec des conformations allant de forme globulaire à allongée selon la taille des branches de glucides. Son diamètre mesurerait environ 64 nm [322].

### 2.1.3. La fraction glycoprotéines (GP)

La fraction glycoprotéines (GP) représente 2 % de la gomme d'Acacia [324,325] et a une masse molaire de  $1,6 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Sa structure a été identifiée comme étant un mélange d'anneaux sphéroïdaux de monomères composés de longues ramifications homogènes, et d'oligomères anisotropes résultant de l'auto-association des monomères. Sa conformation en solution correspondrait à une particule mince de 16 nm de diamètre ayant une morphologie ellipsoïdale triaxiale.

## 2.2. Propriétés physico-chimiques

### 2.2.1. Solubilité et propriétés en solution

La gomme d'Acacia a une solubilité dans l'eau élevée et une viscosité relativement faible. Elle peut se dissoudre dans l'eau à une concentration de 43–48 % v/v, [334], formant une solution ayant des propriétés acides (pH  $\sim$  4,5). La solution résultante est incolore, transparente, sans goût et inodore. La viscosité des solutions de gomme d'Acacia est très faible mais peut être modifiée par l'ajout de base ou d'acide qui modifient les charges électrostatiques de la macromolécule.

La présence d'une composante protéique hydrophobe et d'une composante hydrophile sur la gomme d'Acacia lui confère des propriétés émulsifiantes. La composante glucidique

hydrophile inhibe les phénomènes de floculation et de coalescence par des répulsions électrostatiques et stériques dans des formulations alimentaires [321,325].

### 2.2.2. Mobilité électrophorétique

En solution aqueuse, la mobilité électrophorétique de la gomme d'Acacia est d'environ  $-1,5 \mu\text{m.cm.V}^{-1}.\text{s}^{-1}$  au-dessus de pH 4,5. Cette charge de la molécule est due aux groupements carboxyliques présents sur les résidus d'acide glucuronique [335]. Le pKa des fractions d'acide glucuronique est de 3,2 à 3,6 [31] ce qui signifie que la mobilité électrophorétique est environ à la moitié de sa charge totale lorsque le pH est égal au pKa de la gomme d'Acacia [336].

### 2.2.3. Viscosité

Bien que la gomme d'Acacia soit composée de fractions de masse molaire élevée, ses propriétés épaississantes restent limitées par rapport à d'autres gommages. Par exemple, une solution aqueuse de gomme d'Acacia à 50 % p/v a une viscosité apparente comparable à celle d'une solution de gomme de xanthane de 1,5 % p/v [316].

Les solutions aqueuses de gomme d'Acacia ont un comportement rhéofluidifiant avec un plateau Newtonien aux fortes vitesses de cisaillement ( $>100 \text{ s}^{-1}$ ) [313,337]. De plus, une augmentation importante de la température (environ  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ ) entraînera une diminution irréversible de la viscosité de la solution de gomme due à la dénaturation des fractions riches en protéines [338]. Il existerait un équilibre d'association/dissociation des molécules de gomme d'Acacia qui dépendrait du taux de cisaillement imposé et du temps de repos de la solution. Plus ce temps est long, plus les agrégats de gomme d'Acacia seraient compacts (Figure 16). Plus le taux de cisaillement est rapide, plus les agrégats sont lâches et plus la suspension a un comportement Newtonien. Par conséquent, l'historique d'une solution de gomme a un impact sur sa structure et sur son comportement rhéologique. Il a été constaté que la fraction AGP pourrait être la principale source d'association moléculaire bien qu'elle ne représente que 10 % de la gomme totale. Lorsque cette fraction est retirée, le comportement de la gomme d'Acacia

devient totalement Newtonien [339]. Il semble donc que les mécanismes d'associations seraient dirigés majoritairement par la fraction AGP.

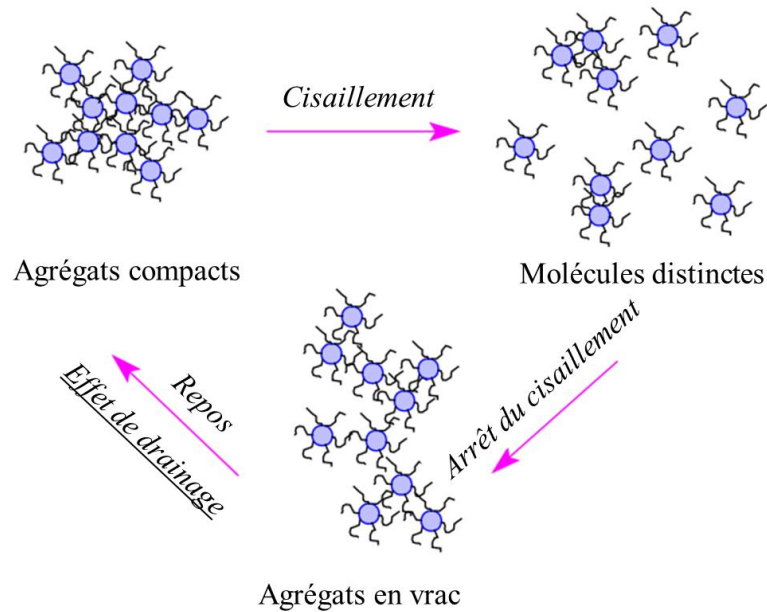


Figure 16 : Etat des molécules de gomme d'Acacia avec et sans cisaillement d'après [340]

#### 2.2.4. Propriétés interfaciales

La fraction protéique hydrophobe de la gomme d'Acacia contribue, associée à sa fraction glucidique hydrophile, à lui conférer des capacités émulsifiantes. En effet, le traitement de la gomme par une protéase inhibe ses capacités émulsifiantes [330]. D'autre part, chauffer une solution de gomme d'Acacia à 100 °C pendant 6 heures détruit de façon importante les propriétés émulsifiantes de la gomme, alors qu'une température de 65 °C n'a pas vraiment d'incidence sur cette propriété [338].

Malgré ses propriétés de surface intéressantes, la gomme d'Acacia est loin d'être aussi efficace que les protéines pour former et stabiliser des émulsions d'huile dans l'eau. Un ratio huile-émulsifiant d'environ 1:1 est donc nécessaire pour la gomme d'Acacia, tandis qu'un ratio inférieur de 1:10 est courant pour les protéines. Il n'est donc pas surprenant que sa fraction riche en protéines jouent un rôle important dans les propriétés émulsifiantes/stabilisatrices de la gomme d'Acacia [313,330]. Sur des échantillons de diverses espèces d'Acacias, ayant des



teneurs en azote allant de 0,1 % à 7,5 %, une bonne corrélation entre la teneur en azote de la gomme et sa tension interfaciale a été observée [341].

Les propriétés de surface de la gomme d'Acacia regroupent sa capacité à diminuer la tension interfaciale entre les interfaces gaz-eau, liquide-liquide ou solide-liquide, et à stabiliser ces interfaces par des interactions et des forces d'hydratation stériques et électrostatiques. Ces propriétés peuvent être utilisées pour former et stabiliser des mousses [326], des émulsions et pour stabiliser des nanoparticules solides [313].

### 2.3. Propriétés biologiques

Plusieurs études ont indiqué que la gomme d'Acacia exerçait un effet protecteur contre la gentamicine (antibiotique) et la néphrotoxicité induite par le cisplatine chez le rat [342]. La gomme d'Acacia permettrait également, conjointement avec d'autres polysaccharides, de réduire la peroxydation des lipides [343]. Toutefois, c'est un sujet qui fait aujourd'hui débat, car d'autres études ont montré que l'administration de solutions de gomme d'Acacia à des rats à des concentrations de 2,5 %, 5,0 % et 10,0 % pendant huit jours consécutifs ne modifiait pas de façon significative le captage des radicaux libres du glutathion, de la vitamine C, de l'acide ascorbique ou de la peroxydation des lipides [344].

Le mécanisme d'action par lequel la gomme d'Acacia améliorerait les capacités antioxydantes pourraient être due au fait qu'elle contienne plusieurs types de résidus d'acides aminés tels que la tyrosine et l'histidine, qui sont communément considérés comme des antioxydants [345,346].

### 2.4. Principales applications

La gomme d'Acacia possède de nombreuses applications industrielles en tant que stabilisant et émulsifiant, principalement dans l'industrie alimentaire (épaississant alimentaire E414), mais aussi dans le textile, la poterie, la lithographie, les industries cosmétiques et pharmaceutiques [347]. En médecine, la gomme d'Acacia a été utilisée en interne pour le traitement de l'inflammation de la muqueuse intestinale et en externe pour couvrir les surfaces inflammées

[348]. Elle est également utilisée pour la fabrication de vecteur de molécules d'intérêt dans des expériences physiologiques et pharmacologiques, et elle est supposée être une substance « inerte ». D'après certaines études la gomme d'Acacia posséderait des propriétés antioxydantes, néphroprotectrices (elle protégerait les reins contre les mécanismes d'autodestruction qui se mettent en œuvre dès qu'une partie importante de la masse rénale est lésée par une agression), entre autres [348–350].

Les propriétés des émulsions huile/eau stabilisées avec 1 % p/v de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) et de courlis écarlate (*P. coccineus* L.), à pH 7,0 et 5,5, avec l'addition de gomme d'Acacia ont été étudiées par Makri et ses collaborateurs [351]. La stabilité des émulsions a été évaluée sur la base de mesures de la taille des gouttelettes d'huile, de leur stabilité vis-à-vis du crémage et de leur viscosité. L'ajout de gomme d'Acacia a entraîné une augmentation de la taille des particules et une diminution de la quantité de protéines adsorbées à l'interface. D'autres applications industrielles de la gomme d'Acacia sont listées dans le Tableau 5.

Toutefois, la gomme d'Acacia ne semble pas fournir une stabilité à long terme contre l'oxydation des mono-terpènes [352]. Plusieurs auteurs ont cherché à étudier ses interactions avec d'autres biopolymères pour améliorer ses propriétés antioxydantes. L'utilisation combinée de la gomme d'Acacia avec le chitosane pourrait fournir un complexe électrostatique inter-biopolymère qui pourrait permettre de former des films viscoélastiques résistants autour de gouttelettes d'huile et de leur donner de bonnes propriétés antioxydantes [10].

Tableau 5 : Applications de la gomme d'Acacia dans différents domaines, leurs propriétés et leurs références

Domaines d'application	Propriétés et utilité	Références
Alimentaire	Stabilisation des émulsions, viscosant	[313,351]
	Amélioration de la consistance et durée de conservation des purées	[353]
	Stabilise les émulsions eau-huile-eau	[354]
	Améliorateur de saveur, couleur, turbidité des jus et des boissons	[355]
	Enrobage comestible des fruits et légumes. Retarde les changements de fermeté, de pourriture, de modification de couleur	[356,357]
	Stabilise la poudre de fraise lyophilisée en réduisant son hygroscopicité par microencapsulation	[358]
Biomédical et biotechnologie	Diminution de la tension artérielle systolique	[359]
	Augmente l'excrétion intestinale et rénale de Mg <sup>2+</sup> et de Ca <sup>2+</sup>	[360]
	Améliore la clairance de la créatinine et l'excrétion hormonale d'antidiurétique urinaire, tout en diminuant l'excrétion de Na <sup>+</sup>	[361]
	Diminution des concentrations plasmatiques de phosphate et d'urée	[362]
	Améliore la reminéralisation des dents et protège contre les acides	[363]
	Entraîne une réduction importante de l'absorption des graisses	[364]
	Réduit le stockage de graisse par stimulation des adipocytes β3-adrénergique	[365]
	Agent antimicrobien	[366,367]
	Agent anti-inflammatoire et anticoagulant	[368–371]
	Vecteurs de molécules d'intérêt (sulfate de fer, naproxène, amphrotéricine B, insuline, cellules de Lactobacillus, ...)	[200,372–376]
Environnement et agriculture	Ingénierie tissulaire	[377,378]
	Pansement pour plaie à base d'hydrogel	[379]
	Réduction du taux de glucose dans le sang	[380]
	Synthèse d'oxydes de nickel non toxiques et peu onéreux	[381]
	Utilisation pour lutter contre la pollution des teintures organiques	[382]
Cosmétique	Stabilisation des nanotubes de carbone	[383]
	Inhibiteur de corrosion "ecofriendly"	[384]
Autres	Adoucissant dans les lotions et les crèmes protectrices et adhésif dans les masques et les poudres pour le visage	[347]
	Agent de stabilisation pour nanoparticules d'or	[385]
	Liant dans les procédés de fabrication d'électrodes à base d'eau	[386]

### 3. La coacervation complexe de la gomme d'Acacia et du chitosane

Nous avons vu dans le chapitre II qu'un certain nombre d'études ont montré qu'un phénomène de coacervation complexe pouvait être observé dans des mélanges protéine-polysaccharide ou polysaccharides-polysaccharides.

Nous avons également vu dans les chapitres I et II que la coacervation complexe était principalement dirigée par les interactions électrostatiques, qui sont liées à un certain nombre de paramètres extérieurs, tels que le pH, la force ionique, le ratio de biopolymères, la concentration totale des biopolymères ou la densité de charge de polyélectrolytes. La formation des coacervats serait également dirigée par l'entropie, qui peut être corrélée à la libération de l'eau et des contre-ions lorsque les coacervats se forment, à la flexibilité ou la rigidité des chaînes de polymères.

Si les paramètres et les conditions physico-chimiques qui régissent la coacervation complexe gomme d'Acacia-chitosane sont connus, les paramètres thermodynamique associés ainsi que les variations de ces paramètres en fonction des conditions physico-chimique n'ont pas encore été reporté dans la littérature.

#### 3.1. Critères de définition de coacervation optimale

La plupart des études sur la coacervation gomme d'Acacia-chitosane ont adopté les trois mêmes critères pour définir les conditions de coacervation optimales, c'est-à-dire les conditions pour lesquelles toute la gomme d'Acacia en présence interagit avec tout le chitosane. Le premier critère est le potentiel Zêta. En effet, si toutes les charges de la gomme d'Acacia interagissent avec toutes les charges du chitosane aux conditions optimales de coacervation, le potentiel Zêta du mélange doit être proche de zéro [8, 10, 11]. De plus, dans ces conditions optimales, la turbidité du mélange doit être maximale [9,10,131]. Les coacervats ont une structure sphérique et dans les conditions idéales, la distribution de taille des coacervats est monodisperse [387]. Plusieurs auteurs ont utilisé le « taux de coacervation » (Équation 3) pour quantifier la

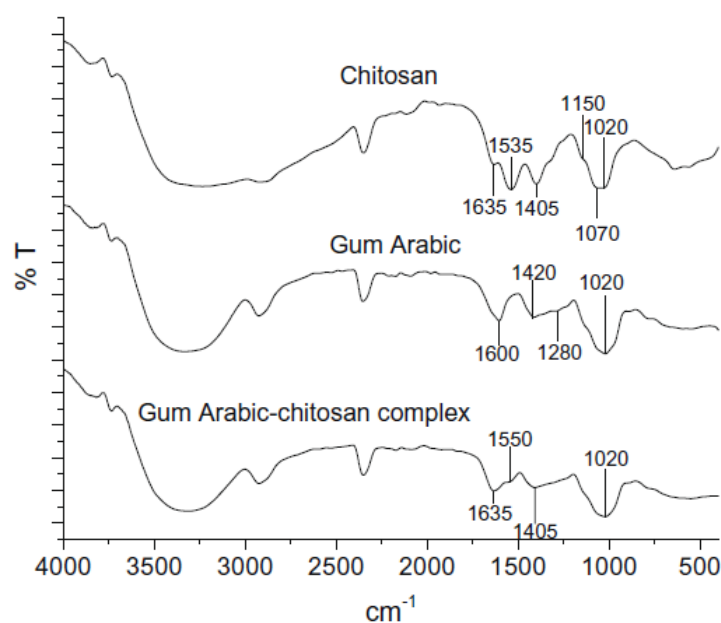
coacervation et définir un optimal, théoriquement atteint à 100 % si tous les polymères mis en jeu forment des coacervats [8–11,388,389]. Expérimentalement, le taux de coacervation n'atteint jamais 100 %. Il est obtenu selon les auteurs par centrifugation du mélange ou par décantation plusieurs heures voire plusieurs jours.

*Équation 3 : Calcul du taux de coacervation*

$$\text{Taux de coacervation (\%)} = \frac{m_i}{m_0} \times 100$$

Avec  $m_0$  la masse totale de poudre de polymères utilisée pour préparer la solution et  $m_i$  la masse solide de coacervat lyophilisé obtenue après décantation de la phase « coacervat ».

Espinosa et ses collaborateurs [11] ont étudié la coacervation sur les coacervats après séchage à 45 °C dans un séchoir sous vide. Ils ont tenté de comprendre l'interaction de la gomme et du chitosane par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Figure 17).



*Figure 17 : Spectre FTIR de la gomme d'Acacia, du chitosane et de coacervats gomme d'Acacia : chitosane sous forme solide [11]*

Ils ont montré qu'en raison de l'interaction entre les polymères, le spectre infrarouge des coacervats changeait de manière significative dans la région carbonyle-amide. Les groupes  $\text{NH}_3^+$  (pic à 1535  $\text{cm}^{-1}$ ) et les  $\text{COO}^-$  asymétriques et symétriques (élongation des pics à 1600  $\text{cm}^{-1}$  et 1420  $\text{cm}^{-1}$ , respectivement) ont disparu, ce qui indiquerait selon eux, des interactions

électrostatiques entre les groupes amines du chitosane ( $\text{NH}_3^+$ ) et les groupes carboxyles de gomme d'Acacia ( $\text{COO}^-$ ). Cette étude semble néanmoins plutôt surprenante, car un coacervat se définit comme une structure très hydratée et peu d'auteurs se sont intéressés à des coacervats lyophilisés. De plus, la diminution des pics attribuée ici à des interactions électrostatiques pourrait être due à un phénomène de dilution, la spectroscopie infrarouge étant quantitative. Dans ce cas précis, les auteurs ayant mélangés la gomme et le chitosane en proportions 5 : 1, il semble normal que l'intensité du signal des groupements caractéristiques du chitosane diminue en comparaison du témoin composé de chitosane pur.

### 3.2. Impact du ratio

Le ratio (massique ou molaire) entre polymères est un paramètre qui est systématiquement étudié dans la plupart des travaux sur la coacervation gomme d'Acacia-chitosane, dans le but de trouver les proportions optimales en polymères. Espinosa et ses collaborateurs [10] ont étudié l'impact du ratio gomme d'Acacia : chitosane sur la mobilité électrophorétique des mélanges.

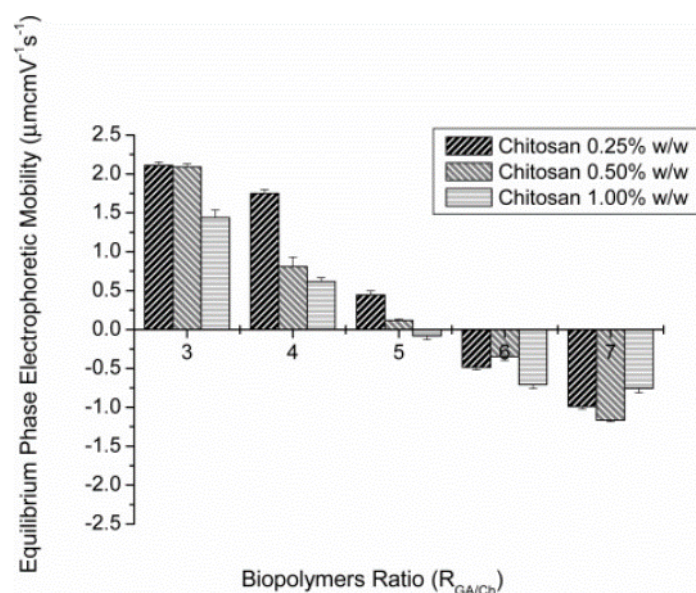


Figure 18 : Mobilité électrophorétique de la phase à l'équilibre en fonction du ratio massique gomme d'Acacia : chitosane et de la concentration totale en polymères [10]

La mobilité électrophorétique de la phase à l'équilibre indiquait une prédominance des groupes

amines libres lorsque les valeurs de «  $R_{GA/CN}$  » étaient inférieures à 5. La mobilité électrophorétique était négative, indiquant une plus grande quantité de groupes carboxyles ionisés qui prédominerait dans la solution, lorsque les valeurs de «  $R_{GA/CN}$  » étaient supérieures à 5 (Figure 18). Une mobilité électrophorétique proche de zéro a été trouvée pour un ratio massique de 5 g de gomme d'Acacia pour 1 g de chitosane. Il y avait donc dans ce cas neutralisation des charges des deux polymères.

Le taux de coacervation qu'ils ont obtenu était corrélé à la valeur de mobilité électrophorétique nulle : le meilleur taux de coacervation était obtenu pour un ratio massique «  $R_{GA/CN}$  » de 5 : 1, indépendamment de la concentration totale en polymère. D'autres études sur le même système ont également montré que le ratio massique optimal de coacervation était un ratio  $R_{GA/CN}$  de 5 : 1 [11,131,390]. En 2008, Espinosa et ses collaborateurs [391] ont complété cette première étude en montrant qu'au ratio optimal de 5 : 1, la quasi-totalité de la gomme d'Acacia était dans la phase « coacervat ».

### 3.3. Influence du pH

La charge des polymères est directement liée à leur degré d'ionisation, et donc au pH de la solution. Ce paramètre a donc également été étudié par plusieurs auteurs.

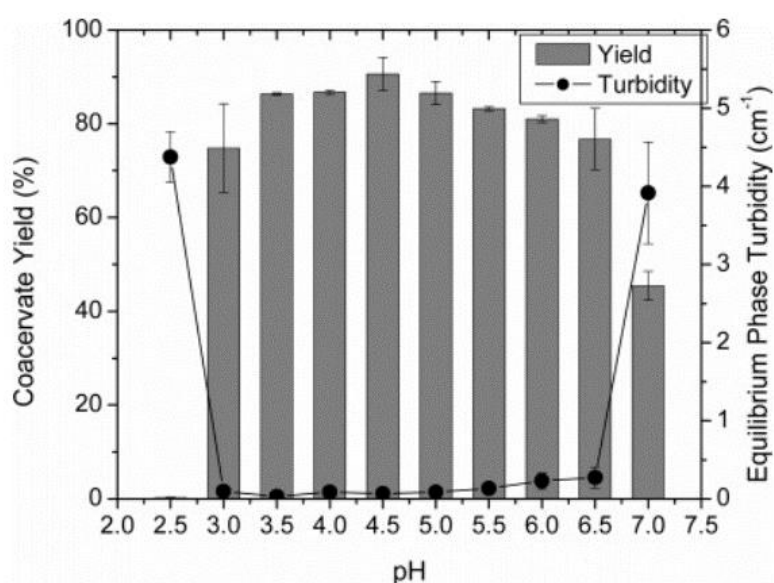


Figure 19 : Taux de coacervation gomme d'Acacia : chitosane et turbidité de la phase à

*l'équilibre en fonction du pH de la solution pour un ratio massique gomme d'Acacia : chitosane de 5 : 1, une concentration totale en polymères de 6 % p/v après 72 h de décantation [10]*

Toujours dans une étude d'Espinosa et ses collaborateurs [10], les rendements de coacervation et la turbidité des mélanges gomme d'Acacia/chitosane ont été étudiés à différents pH. Les rendements de coacervation obtenus à des valeurs de pH comprises entre 3,5 et 5,0 étaient relativement plus élevés que ceux obtenus à d'autres valeurs de pH. En effet, sur cette gamme de pH, les charges des deux polymères semblaient être stoechiométriquement équilibrées. Ces résultats ont été corroborés par les valeurs de turbidité de la phase à l'équilibre qui, à ces valeurs de pH, étaient relativement plus faibles. À des valeurs de pH inférieures à 3,5 et supérieures à 5, le rendement de coacervation était plus faible, et à mesure que le pH s'éloignait de ces valeurs, le rendement diminuait davantage (Figure 19). Ils ont expliqué ce phénomène de deux manières : la protonation des groupes carboxyliques de la gomme d'Acacia en deçà de son pKa (en dessous de pH 3,5) et le repliement de sa chaîne moléculaire, qui semblent atteindre un maximum à pH 2,5, de sorte qu'à ce pH le phénomène de coacervation est complètement supprimé.

D'autre part, à des valeurs de pH supérieures à 5,0, le taux de coacervation était diminué, principalement en raison de phénomènes associés à la molécule de chitosane. Lorsque le pH de la solution approche de la valeur de pKa du chitosane (pour des pH supérieurs à 6,5), son degré d'ionisation et sa solubilité diminuent, à tel point qu'une partie du chitosane précipite à pH 7,0 [10]. L'influence du pH sur le phénomène de coacervation a déjà été montré par plusieurs auteurs sur d'autres systèmes [43,54,92,392], qui ont montré que l'intervalle de pH pour lequel l'interaction se produit est très dépendant des polymères, de leur densité de charge et de leur flexibilité. Une variation de pH modifie la charge des polymères, causant des modifications de conformation des chaînes des polysaccharides et réduisant ainsi le nombre de sites disponibles pour les interactions. Lorsque le pH diminue en dessous de pH 4,5, des complexes insolubles enrichis en gomme d'Acacia se forment [11, 17]. Ces modifications dans la composante



électrostatique des mélanges expliqueraient des modifications de densité des complexes et du comportement viscoélastique avec la variation du pH [11]. Tan et ses collaborateurs [387] ont étudié la distribution de taille des complexes gomme d'Acacia/chitosane sur une gamme de pH comprise entre pH 3,0 à 5,0 (Figure 20).

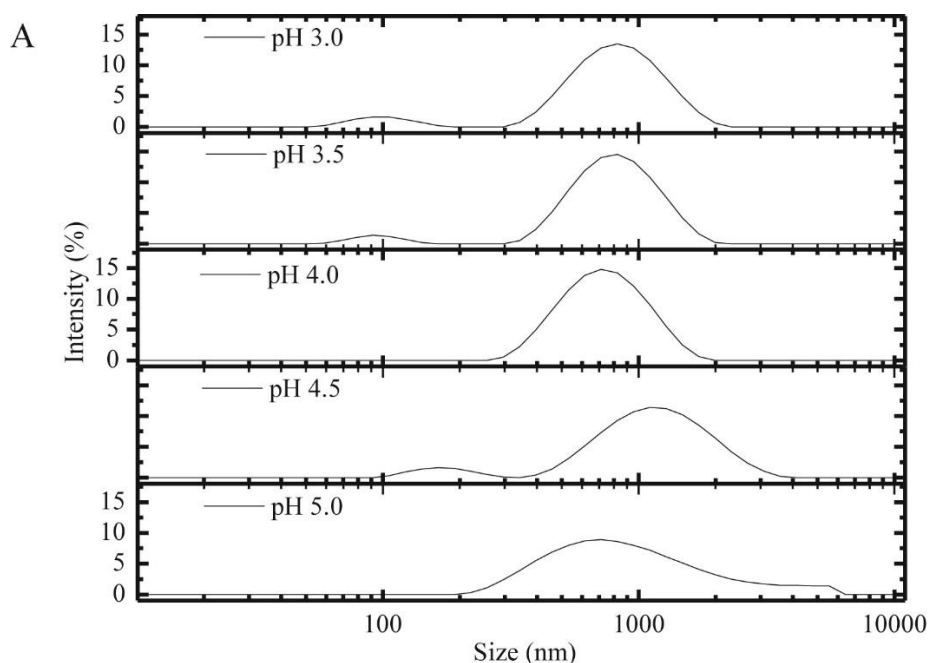


Figure 20 : Distribution de taille de mélanges gomme d'Acacia : chitosane en fonction du pH de la solution pour un ratio massique gomme d'Acacia : chitosane de 1 : 1, une concentration totale en polymères de 0,3 % p/v après 30 min d'agitation à 800 rpm [387].

Les complexes formés présentaient une distribution bimodale à des pH de 3,0, 3,5, 4,0 et 5,0 mais une distribution monomodale a été détectée à un pH de 4,0. Cette observation était très similaire aux résultats reportés par d'autres auteurs [10]. Le rendement maximal de coacervation GA/CN se situerait ainsi entre pH 3,5 et 5,0. Lorsque les valeurs de pH étaient supérieures à 4,0, le degré d'ionisation et la solubilité du CN diminuaient, ce qui a probablement induit l'hétérogénéité de la distribution des tailles. De même, si le pH était trop bas, le faible degré d'ionisation des groupements carboxyles de la GA n'a pas facilité la formation de complexes homogènes dans le système. Par conséquent, l'hypothèse ici était que les densités de charge des biopolymères de signe opposé étaient équilibrées stoechiométriquement à pH 4,0.

#### 3.4. Influence de la force ionique

La force ionique a une très forte influence sur le phénomène de coacervation. En effet, une quantité trop importante de sel peut conduire à la destruction des coacervats [124]. L'influence de la force ionique sur la coacervation gomme d'Acacia/chitosane a ainsi été étudiée.

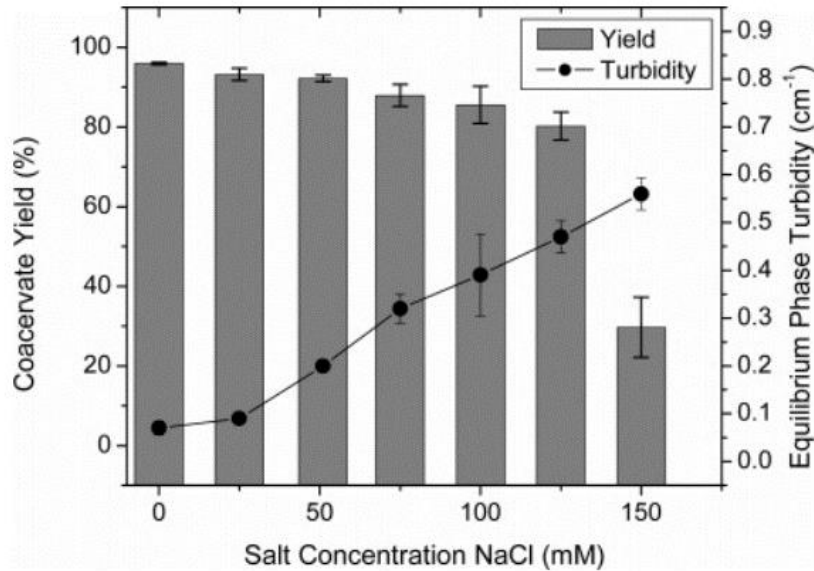


Figure 21 : Taux de coacervation gomme d'Acacia : chitosane et turbidité de la phase à l'équilibre en fonction de la concentration en NaCl pour un ratio massique gomme d'Acacia : chitosane de 5 : 1, une concentration totale en polymères de 6 % p/v après 72 h de décantation [10]

Espinosa et ses collaborateurs [10] ont mis en évidence que le taux de coacervation gomme d'Acacia/chitosane était inversement proportionnel à la concentration en NaCl. Une force ionique importante est connue pour entraver le relargage des contre-ions et l'attraction électrostatique supprimant ainsi l'une des forces motrices de la coacervation [77,393] et réduisant considérablement les sites disponibles pour les interactions entre la gomme d'Acacia et le chitosane. Ce phénomène avait déjà été observé sur d'autres modèles. Dans le cas de la coacervation entre la gomme d'Acacia et les protéines sériques du lactosérum [92], une addition de NaCl d'une concentration supérieure à 54 mmol.L<sup>-1</sup> empêchait le phénomène de coacervation. Dans le cas du système gomme d'Acacia/chitosane, une concentration en NaCl de 150 mmol.L<sup>-1</sup> entraînait une diminution considérable du taux de coacervation (Figure 21), [10].

### 3.5. Influence de la concentration totale en polymère

Les études menées sur la coacervation complexe ont également montré l'importance de la concentration totale en polymères sur la coacervation. Un simple phénomène de dilution peut conduire à la destruction des coacervats [124]. Espinosa et ses collaborateurs ont étudié l'influence de la concentration en polymères sur la formation de coacervats gomme d'Acacia-chitosane [10].

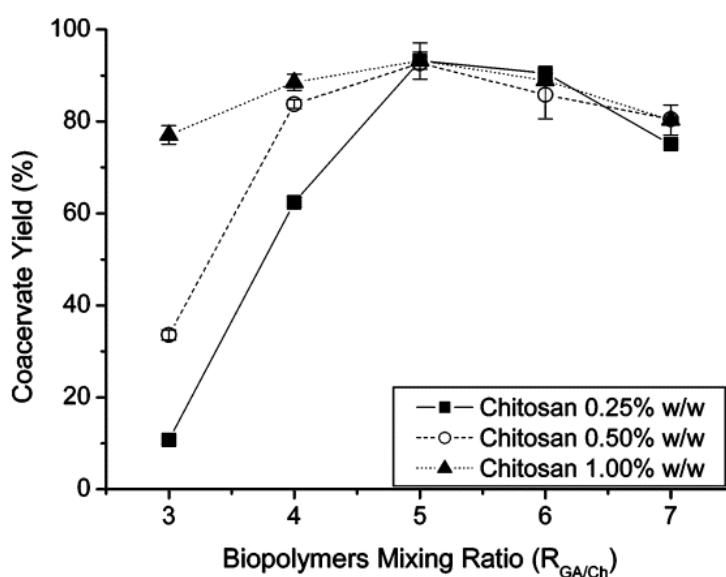


Figure 22 : Taux de coacervation en fonction du ratio massique gomme d'Acacia : chitosane et de la concentration en chitosane après 72 h de décantation, pour une concentration totale en polymère constante [10]

Leurs résultats ont indiqué qu'à de faibles rapports de biopolymères («  $R_{GA/CN}$  » de 3 et 4), des concentrations relativement élevées en biopolymères sont nécessaires pour obtenir des rendements de coacervation d'environ 80 % ou plus, mais qu'à des rapports de biopolymère plus élevés («  $R_{GA/CN}$  » de 5, 6 et 7) il n'y avait pratiquement aucune différence dans le rendement de coacervation, que la concentration totale soit de 2, 4 ou 8 % en poids de biopolymères utilisés (Figure 22).

L'effet de la concentration totale en biopolymère sur le rendement de coacervation peut s'expliquer en termes de comportement polyélectrolytique des macromolécules [394]. L'ionisation des fonctions ionisables aide à la solubilisation du polyélectrolyte, qui se dissout

pour produire un polyion et des contre-ions. Le polyion possède un grand nombre de charges attachées à la chaîne principale et bien que le polyion soit mobile, les charges individuelles attachées à la chaîne ne le sont pas. Tous les contre-ions ne sont pas libres de se déplacer.

Les ions libres forment un nuage de contre-ions autour du polyion, tandis que les ions immobilisés sont liés à un site ou à un point spécifique de la chaîne macromoléculaire.

Lorsque la solution de polyélectrolyte est diluée, de plus en plus de contre-ions liés au site sont libérés, augmentant la charge du polyion. Ce phénomène ne peut se produire indéfiniment, en raison des contraintes de flexibilité dans la chaîne macromoléculaire. De plus, le nombre de polyions disponibles dans les systèmes dilués est plus faible, ce qui explique la diminution marquée du rendement de coacervation à de faibles concentrations en biopolymères. Ces résultats sont importants dans la mesure où ils indiquent que des concentrations trop faibles ou des concentrations trop élevées en biopolymères totaux ne permettent pas la formation efficace de coacervats [10].

De plus, des mesures de taille des complexes formés ont montré qu'il existe une corrélation entre la taille moyenne des complexes et la concentration totale en polymère. Il a été démontré que l'augmentation de la concentration du polymère diminue son degré d'ionisation et il devient plus flexible car il a une structure moins ouverte. Ainsi, les sites chargés sont davantage disponibles pour l'interaction, ce qui est lié au fait que le nombre de macromolécules disponibles dans les systèmes concentrés est plus élevé, conduisant à la formation de complexes de plus grande taille moyenne [9].

### 3.6. Influence de la structure des polysaccharides

Le degré de désacétylation (DD) du chitosane est une caractéristique importante car elle a une influence sur son comportement en solution notamment sa solubilité ainsi que sur les propriétés des chaînes macromoléculaires telle que leur flexibilité, et sur leur conformation et par conséquent la viscosité des solutions [213]. Ce paramètre a donc nécessairement une influence

sur la coacervation du chitosane avec un autre polymère[182]. Coelho et ses collaborateurs [9] ont réalisé une étude sur la coacervation complexe gomme d'Acacia / chitosane, en comparant deux chitosanes de degrés de désacétylation différents (l'un de 75 % : Ch75 et l'autre de 93 % : Ch93). Une première observation visuelle (Figure 23a) permettait de mettre en évidence que le degré de désacétylation du chitosane avait une influence sur la turbidité des complexes. Plus le chitosane possédait un degré de désacétylation important, plus les mélanges étaient turbides, et ce, même pour des ratios GA/CN plus faibles (Figure 23).

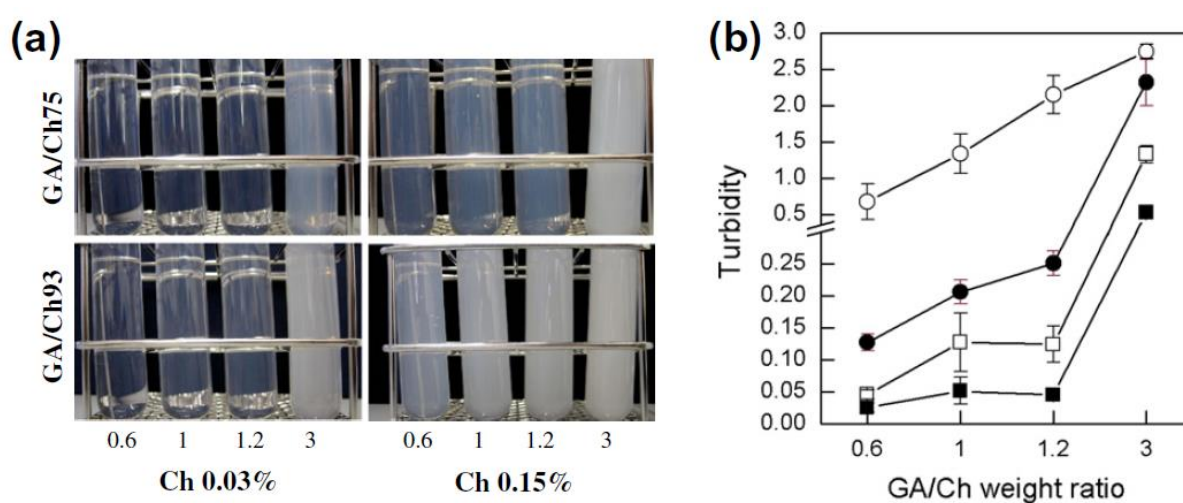


Figure 23 : Observation macroscopiques (a) et turbidité (b) de complexes GA : CN immédiatement après mélange à différents ratios massiques et à deux concentrations différentes en CN (DD75 % à ■0,03 % et ●0,15% et DD93 % à □0,03 % et ○0,15 %) à pH 4,8 et pour une force ionique de 0,04 M [9].

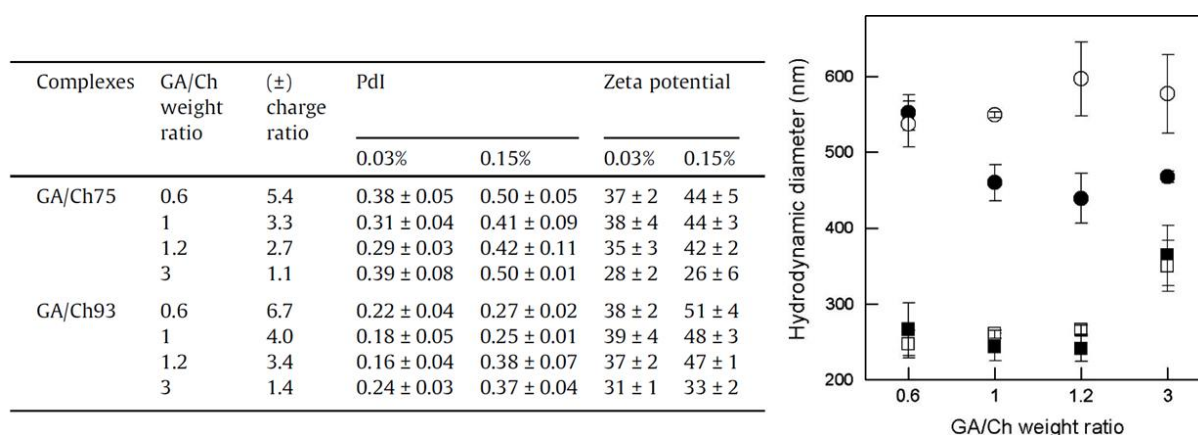


Figure 24 : Indice de polydispersité et potentiel Zéta de complexes GA : CN à différents ratios massiques et différents degrés de désacétylation du chitosane, diamètre hydrodynamique moyen des mélanges gomme d'Acacia : chitosane (DD75 % à ■0,03 % et ●0,15 % et DD93 % à □0,03 % et ○0,15 %)[9]

Si la turbidité des mélanges GA/CN à un DD de 75 % était faible et qu'aucune séparation de phase n'était observée (Figure 23), la détection de particules par diffusion dynamique de la lumière à des ratios massiques «  $R_{GA/CN}$  » entre 0,6 et 1,2 et à une concentration en chitosane de 0,03 % pouvait s'expliquer par la formation de complexes solubles (Figure 24).

À des concentrations plus élevées ou en utilisant du chitosane à plus haut DD (93 %), les complexes devenaient insolubles. Le diamètre hydrodynamique des complexes contenant du chitosane à un DD de 75 % et à une concentration de 0,15 % diminuait conjointement à l'augmentation de la concentration de gomme d'Acacia, d'un ratio massique «  $R_{GA/CN}$  » de 0,6 à 1,0. Les auteurs ont expliqué ce phénomène par une diminution de la taille des complexes lorsque davantage de groupes carboxyliques interagissaient avec des groupes amines du chitosane, ce qui réduisait les répulsions intramoléculaires.

La densité de charge du chitosane avait un impact significatif sur la solubilité des complexes formés avec la gomme d'Acacia. Si le chitosane avait une densité de charge faible (degré de désacétylation de 75 %), les complexes étaient solubles à condition que les concentrations demeurent suffisamment faibles dans le milieu (concentration en chitosane de 0,03 %) et que le rapport de charge soit non-stœchiométriques (Figure 24). Lorsque la densité de charge était plus élevée (degré de désacétylation de 93 %), les interactions GA/CN entraînaient la formation de complexes sphériques stables. À des concentrations plus élevées (concentration en chitosane de 0,15 %) ou à un rapport quasi-stœchiométrique, le mélange devenait turbide. Ces résultats sont en accord avec les études sur les interactions entre polysaccharides et protéines, qui ont montrés que la force de complexation dépendait de la densité de charge des deux polymères [92], qui est directement liée au degré de désacétylation dans le cas du chitosane.

### 3.7. Coacervation complexe de la gomme d'Acacia avec du chitosane modifié

Des études ont été réalisées en modifiant le chitosane par voie chimique, majoritairement dans le but d'améliorer sa solubilité et sa capacité à interagir avec d'autres substances. Les effets de

l'acidité, de la température, de la force ionique et du ratio en biopolymère sur la viscoélasticité des coacervats N, O-carboxyméthylchitosane (NOCC, Figure 25) / gomme d'Acacia ont été étudiés par Huang et ses collaborateurs [388] en utilisant le rendement de coacervation comme indicateur de la force d'interaction électrostatique entre les deux polymères.

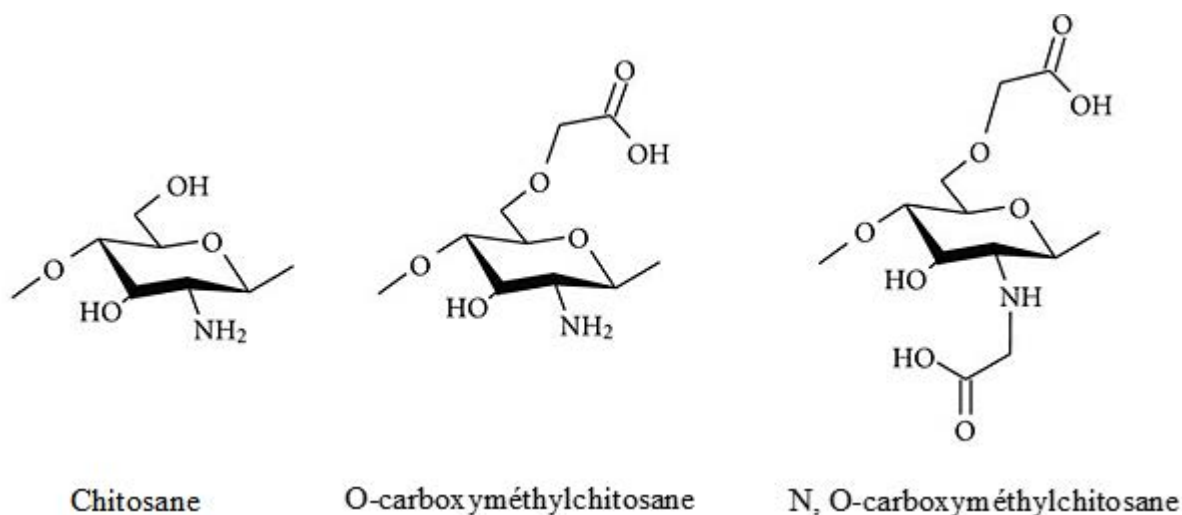


Figure 25 : Structure chimique du chitosane et de différent type de chitosanes carboxyméthylés (CMC) montrant la modification de l'unité de D-glucosamine d'après [395].

L'interaction la plus forte entre le N, O-carboxyméthylchitosane (NOCC, degré de substitution de 0,56, point isoélectrique de 7,0) et la GA s'est produite à un pH de 3,0, tandis que les valeurs de module élastique les plus élevées ont été trouvées la phase « coacervat » séparée à un pH de 6,0. Le rendement de coacervation ne variait pas avec la température de séparation de phase sur la gamme de 4 à 55 °C, mais la viscoélasticité des coacervats diminuait à mesure que la température augmentait de 25 à 45 °C, pour être maximale à 55 °C, ce qui suggérait d'après les auteurs une prédominance des interactions hydrophobes à 55 °C.

La présence de NaCl a affaibli les interactions électrostatiques entre les deux polyélectrolytes, mais aucune réduction de viscoélasticité n'a été observée pour les coacervats. En outre, la plus forte interaction électrostatique et la viscoélasticité des coacervats la plus importante ont été enregistrées à différents ratio massiques GA/NOCC. Les auteurs ont conclu que la force de l'interaction électrostatique n'était pas le seul paramètre qui déterminait la viscoélasticité des

coacervats NOCC/GA. En plus de l'interaction électrostatique, les propriétés rhéologiques des polyélectrolytes impliqués dans la formation de coacervats et la formation de liaisons hydrogène entre eux détermineraient également les propriétés viscoélastiques des coacervats NOCC/GA[388].

Les effets de la modification du chitosane par O-carboxyméthylation (Figure 25) sur sa coacervation avec la gomme d'Acacia ont été étudiés [125,190,389,396–399]. Le chitosane O-carboxyméthylé (O-CMC) avait une charge positive nette plus faible que le chitosane en solution acide ainsi le pH et le ratio optimal pour la coacervation étaient inférieurs à ceux observés avec le chitosane natif (Figure 26).

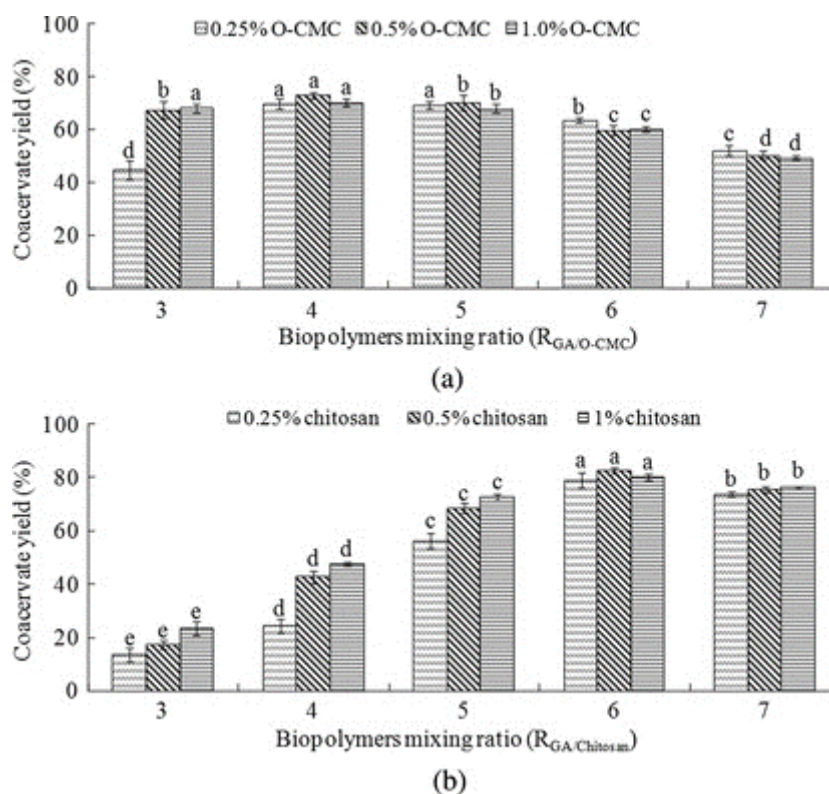


Figure 26 : Effet de la concentration totale en polymère et du ratio massique (a) gomme d'Acacia/O-CMC et (b) gomme d'Acacia/chitosane natif sur le taux de coacervation après une heure d'agitation à pH 3,0, 25 °C pour le O-CMC et à pH 4,5, 45 °C pour le chitosane natif. Les barres d'erreur ayant la (les) même(s) lettre(s) indiquent qu'il n'y a aucune différence significative à  $p > 0,05$ .

La modification par O-carboxyméthylation a réduit la température de coacervation optimale de 45 à 25 °C et a considérablement augmenté la sensibilité à la force ionique. Des coacervats



insolubles O-CMC-GA se sont formés à une concentration critique totale de biopolymère relativement plus faible que les coacervats chitosane-GA. Il a été conclu que la modification du chitosane par O-carboxyméthylation a eu une influence marquée sur l'interaction électrostatique du chitosane avec la gomme d'Acacia [398].

Les travaux sur la modification du chitosane pour modifier les forces dirigeant la coacervation sont encore peu nombreux. Pourtant, il a été montré que modifier le chitosane pourrait permettre de diminuer les interactions électrostatiques tout en conservant des rendements de coacervation aussi importants. D'autres forces entreraient alors en considération pour que le chitosane et la gomme d'Acacia forment ces coacervats. La modification des polymères pourrait permettre, à terme, d'avoir des conditions de coacervation différentes des conditions optimales obtenues avec les polymères natifs. Cela pourrait permettre dans un premier temps de mieux comprendre les mécanismes et les forces qui dirigent la formation des coacervats, et *in fine*, cela pourrait conduire à modifier les polymères à façon pour que les coacervats libèrent des molécules encapsulées dans des conditions de pH, de température, de force ionique ou de concentration ciblées.

#### **IV. Modification des polymères pour l'assemblage de polysaccharides modifiés : la fonctionnalisation enzymatique**

##### **1. Modification de polysaccharides**

Comme nous avons pu le voir dans la partie précédente, les polysaccharides sont largement utilisés dans diverses applications industrielles, notamment pour la formulation d'aliments, d'adhésifs, de produits pharmaceutiques ou cosmétiques. Leur utilisation reste cependant parfois limitée en raison de leur faible solubilité à pH neutre et dans les solvants organiques, de leur effet parfois limité ou nécessitant des quantités importantes de polymères, des effets potentiellement négatifs tels qu'une augmentation importante de la viscosité parfois non voulue

ou l'apparition d'une turbidité du produit. Dans ce contexte, une modification de leur structure chimique apparaît comme un moyen pertinent d'améliorer leurs propriétés et donc d'élargir le champ de leurs applications potentielles.

Dans ce travail, l'objectif est plutôt de modifier et d'identifier leur structure afin de la mettre en relation avec la potentialité du polymère de former des coacervats en présence d'un autre polysaccharide. Cependant, l'étude bibliographique de ces modifications s'appuiera en grande partie sur des sources cherchant à les modifier afin d'améliorer leurs propriétés physicochimiques et biologiques.

De nombreuses études existent sur la modification chimique du chitosane. Le plus souvent, l'objectif est d'améliorer sa solubilité à pH neutre ou alcalin ou ses propriétés fonctionnelles spécifiques. Les groupements aminés et hydroxyles accessibles du chitosane ouvrent la voie à différents types de modifications par voie chimique. En parallèle, une approche enzymatique est également développée en raison de sa spécificité et de son impact environnemental relativement faible [205,211,400,401].

Les groupements amines très réactifs peuvent être acylés, alkylés notamment *via* la formation de base de Schiff ou d'adduit Michaelien. De plus, il est possible de mettre à profit la réactivité de ces amines lors de réaction de copolymérisation et de génération d'amine quaternaire. La N-acétylation est la N-acylation la plus courante du chitosane. Cette réaction est utilisée pour produire du chitosane semi-acétylé soluble dans l'eau. Les groupements amines libres du chitosane peuvent réagir avec des aldéhydes et des cétones pour donner la base de Schiff correspondante. Le groupe imine formé est stable dans des environnements neutres ou alcalins et peut être réduit pour produire des dérivés N-alkyles [211,402].

Si les exemples de modifications du chitosane sont nombreux, ceux portant sur la modification de la gomme d'Acacia sont plus rares dans la littérature. Sarika et ses collaborateurs [403] ont étudié le greffage par voie chimique de la curcumine sur la gomme d'Acacia afin d'augmenter

la biodisponibilité du polyphénol. Il a été mis en évidence que greffer la curcumine à un polymère hydrophile augmente sa solubilité dans les matrices aqueuses mais aussi sa stabilité dans l'organisme, ce qui mène à une augmentation de sa biodisponibilité. Pour coupler la curcumine à la gomme d'Acacia, les auteurs ont mis en œuvre un couplage DCC/DMAP (diméthylamino pyridine (DMAP) et N,N'dicyclohexyl carbodiimide (DCC)). Le groupe hydroxyle de la curcumine est conjugué aux groupes acides de la GA *via* la formation d'une liaison ester (Figure 27).

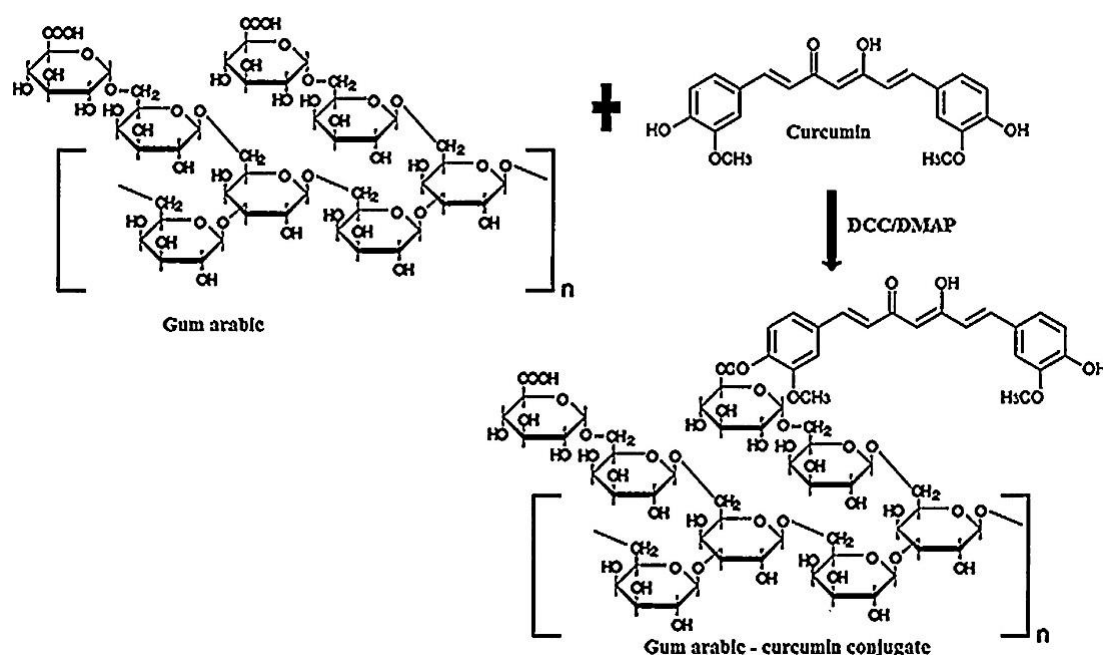


Figure 27 : Conjugaison de la gomme arabique et de la curcumine par action de DCC/DMAP (couplage chimique) [403]

Après fonctionnalisation, le conjugué formé se dispersait bien dans l'eau. Ceci était dû à la formation de complexes par auto-assemblage du polysaccharide modifié contenant un cœur hydrophobe de curcumine et une surface hydrophile composée de gomme d'Acacia. L'auto-assemblage de ce conjugué était donc dirigé par la minimisation de l'énergie interfaciale en jouant sur la balance hydrophile/hydrophobe des composés mis en présence. Des particules sphériques ont été observées par microscopie électronique à balayage. Le diamètre de ces particules était de  $270 \pm 5$  nm, résultats confirmés par DLS. Le potentiel Zêta a aussi été mesuré comme étant de -36,4 mV. Ce potentiel négatif était dû aux groupements carboxylates de la

gomme et permettrait d'éviter l'agrégation de la gomme. La gomme d'Acacia conjuguée à la curcumine s'auto-assemble et présente de nouvelles caractéristiques par rapport aux composés seuls. Quelques autres études témoignent d'un intérêt croissant pour la modification de la gomme d'Acacia, en particulier pour améliorer ses propriétés émulsifiantes [404–406]. Shi et ses collaborateurs, 2017 [406] ont estérifié la gomme d'Acacia *seyal* avec différentes teneurs en anhydride octényle succinique, augmentant significativement sa viscosité apparente, ses capacités émulsifiantes et sa capacité à stabiliser des émulsions. D'autre part, Wang et ses collaborateurs, 2014 [404] ont modifié la gomme en utilisant de l'anhydride succinique en solution aqueuse. Ils ont montré que cette gomme modifiée s'agrégeait en solution à une concentration dite « concentration critique d'agrégation ». Les propriétés émulsifiantes de la gomme modifiée ont été améliorées par augmentation de son hydrophobie, ainsi que sa capacité à réduire l'écumage. Les deux études ont suggéré que la gomme modifiée pourrait être utilisée pour réaliser de la micro-encapsulation ou pour réaliser des émulsions.

Néanmoins, ces approches ont été réalisées par voie chimique avec l'utilisation de composés chimiques toxiques. La voie enzymatique est donc une voie à explorer, car elle serait plus respectueuse de l'environnement, qu'elle permettrait une réduction du coût en énergie et serait beaucoup moins toxique.

La modification enzymatique des polysaccharides est connue pour modifier leurs propriétés physicochimiques et biologiques [407]. Selon le substrat greffé et l'enzyme utilisée les propriétés modifiées varient. Par exemple, les enzymes phénol-oxydases, telles que les laccases, les tyrosinases et les peroxydases, ont permis l'oxydation de composés phénoliques, permettant ainsi leur greffage sur des polysaccharides. Ces modifications par voie enzymatique ont permis d'améliorer les propriétés existantes des polymères telles qu'une augmentation de la solubilité dans l'eau, et du pouvoir viscosant et parfois d'ajouter de nouvelles propriétés comme des capacités antimicrobiennes, des activités antioxydantes et des propriétés biologiques telles que

---

l'adhésion cellulaire [213,407].

## 2. Utilisation de la laccase pour la fonctionnalisation enzymatique

### 2.1. Laccases

#### 2.1.1. Définition

Il existe plusieurs types d'enzymes catalysant des réactions d'oxydation. Les plus utilisées pour oxyder des composés phénoliques sont les polyphénols-oxydases (PPO) (EC 1.10.3.1) qui utilisent l'oxygène moléculaire comme co-substrat et les peroxydases (POD) (EC 1.11.1.7) qui utilisent le peroxyde d'hydrogène. Les PPO sont des métalloprotéines. Elles contiennent du cuivre dans leur site actif et peuvent catalyser l'oxydation des composés phénoliques avec réduction de l'oxygène en eau [408].

Les PPO peuvent être divisées en monophénol-oxydases ou crésolases (EC 1.14.18.1) conduisant à l'hydroxylation en *ortho* d'un substrat monophénolique et en diphénol-oxydases catalysant l'oxydation d'un diphénol (*ortho*- ou *para*-) en benzoquinone. La classe des diphénoloxydases est divisée, selon la classification internationale, en deux sous-groupes : les catécholoxydases (CO) (EC 1.10.3.1) et les laccases (oxygène oxydoréductase : EC 1.10.3.2). L'enzyme utilisée dans cette étude pour la fonctionnalisation est la laccase de *Myceliophthora thermophila*. Le choix de cette enzyme repose sur le fait qu'elle est efficace pour un grand nombre de substrats phénoliques et à des valeurs de pH proche de la neutralité favorisant la réactivité des phénols. Cette enzyme appartient à un groupe d'enzymes nommé « oxydases bleues » car elle possède quatre atomes de cuivre dans son site actif (Hoegger *et al.*, 2006). Elle est capable d'oxyder des *ortho* ou des *para*-diphénols en quinones correspondantes et oxydent les monophénols en semiquinones, sans hydroxylation préalable.

#### 2.1.2. Structure

Le site actif de l'enzyme est composé de quatre atomes de cuivre qui sont liés à des acides aminés : deux histidines, une cystéine et selon l'origine de l'enzyme, une méthionine ou une

phénylalanine/leucine pour le cuivre T1, deux histidines pour le cuivre T2 et trois histidines pour chaque cuivre T3 (Figure 28). Dans le site actif, un groupe de 3 atomes de cuivre (le cuivre de T2 et les deux cuivres de T3) est responsable de l'activation de l'oxygène, alors qu'un quatrième atome de cuivre (celui de T1) est responsable de l'oxydation des phénols [409].

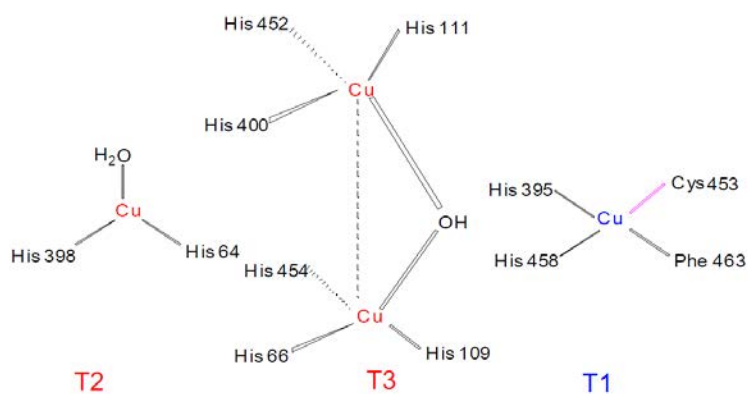


Figure 28 : Environnement des 4 atomes de cuivre du site actif de la laccase de *Bacillus subtilis* [402]

### 2.1.3. Mécanisme réactionnel

L'enzyme peut oxyder les phénols en positions *ortho* ou *para*, en quinones et semi-quinones [410,411] (Figure 29). Ces quinones sont instables et peuvent réagir ensuite spontanément avec d'autres molécules.

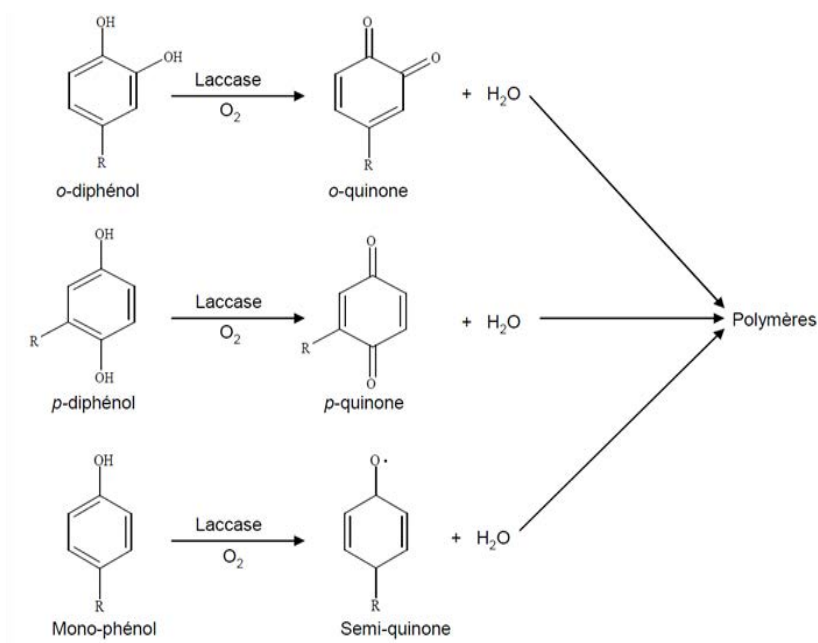


Figure 29 : Réactions catalysées par les laccases (E.C.1.10.3.2) [411]

Le mécanisme de l'oxydation des composés phénoliques par la laccase est de type « donneur accepteur ». Il comprend 3 étapes [412] :

- L'oxydation du substrat et la réduction du cuivre Cu1 ( $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$ ) (Figure 28), avec perte d'un électron du substrat au profit de l'atome de cuivre du site T1.

-Les électrons extraits du substrat réducteur sont transférés vers le site T2 / T3 tri-nucléaire. L'atome Cu1 du site T1 est oxydé ( $\text{Cu}^+$  en  $\text{Cu}^{2+}$ ) et les atomes Cu2, Cu3a et Cu3b des sites T2 et T3 sont réduits ( $\text{Cu}^{2+}$  à  $\text{Cu}^+$ ).

- Après la réduction complète du centre tri-nucléaire, les atomes de cuivre Cu2, Cu3a et Cu3b réduisent l'oxygène moléculaire en eau. Les atomes de cuivre agissent en donneurs d'électrons ( $\text{Cu}^+$  en  $\text{Cu}^{2+}$ ) vis-à-vis de l'oxygène moléculaire qui constitue l'accepteur (Figure 30).

Dans le cas des substrats mono-phénoliques, les laccases catalysent l'oxydation de ces substrats en radicaux phénoxy « semiquinones » par interaction directe avec le réseau d'atomes de cuivre et réduction concomitante d'une molécule d'oxygène. Cette réaction génère des radicaux instables très réactifs qui peuvent se réorganiser spontanément, par délocalisation des électrons. Ils peuvent conduire soit à des quinones s'ils subissent un deuxième arrachement d'électrons, soit à des dimères puis des oligomères ou des polymères générés par combinaison des dimères formés, s'ils subissent des réactions de couplage non enzymatique [413]. De nombreuses modifications structurales, notamment par décarboxylation oxydative, peuvent se produire augmentant ainsi le nombre de structures possibles greffées sur un polysaccharide [205,414]. Dans un milieu réactionnel riche en sites nucléophiles, ces produits d'oxydation réagissent pour former des liaisons covalentes avec les groupements amines ou carboxyles libres des polysaccharides, formant soit des bases de Schiff, soit des adduits de type Michaelien, soit des liaisons esters. Les monomères et oligomères ainsi créés sont greffés sur le polymère, ou éventuellement sur d'autres motifs déjà greffés, lui conférant de nouvelles propriétés fonctionnelles.

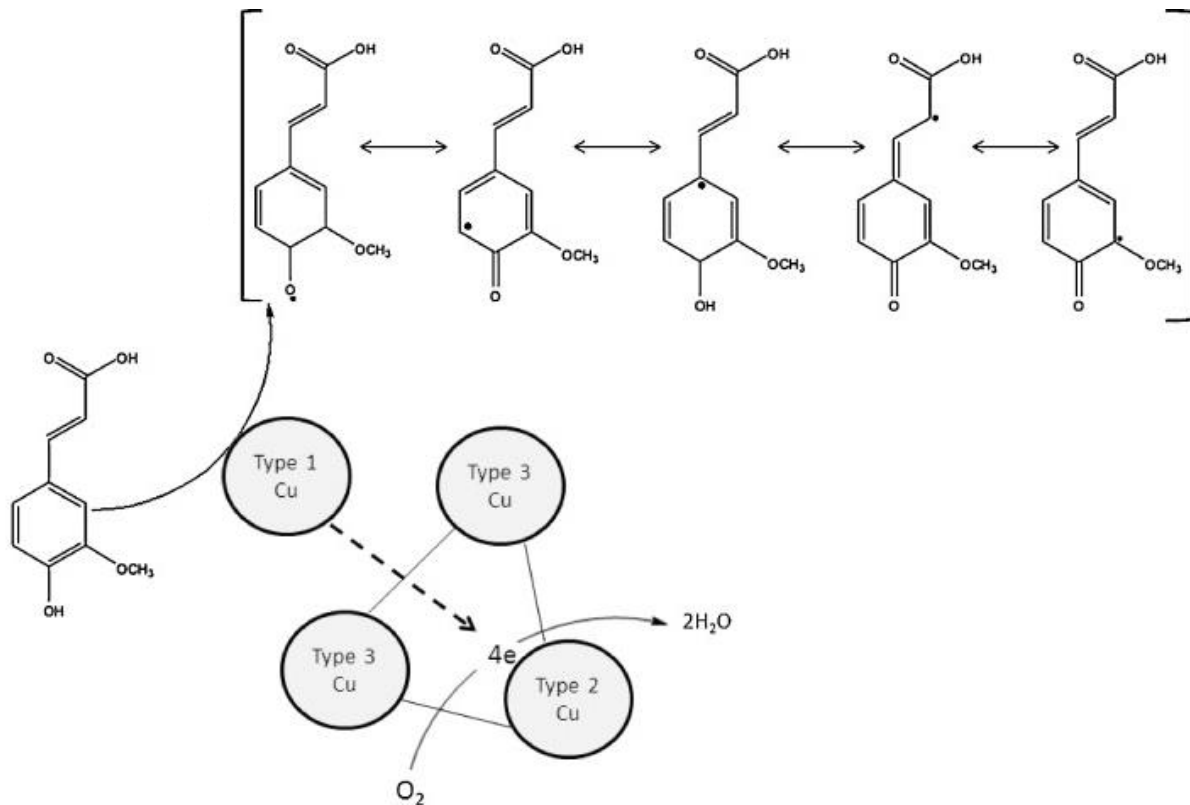


Figure 30 : Oxydation de l'acide férulique catalysée par une laccase [415]

Dans cette voie enzymatique, seul le composé phénolique est initialement pris en charge par l'enzyme pour former une espèce réactive allant ensuite réagir avec des groupements présents sur le polysaccharide. Cette stratégie ne nécessite donc pas d'interaction entre l'enzyme et le polysaccharide, interactions généralement difficiles et limitées à cause de l'encombrement stérique lié à la taille du polymère.

#### 2.1.4. Le substrat à greffer : l'acide férulique

L'acide férulique ou acide 3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl) acrylique ou acide 3-méthoxy-4-hydroxycinnamique est un acide qui est déjà naturellement présent dans la gomme d'acacia en très faible quantité (la gomme d'acacia contient environ 2,8 % m/m de composés phénoliques dont 1,4 % est de l'acide férulique ce qui correspond à 0,03 % m/m d'acide férulique naturellement présent dans la gomme d'Acacia [416]). Il est naturellement très présent dans le règne végétal car il entre dans la biosynthèse de la lignine. Il est peu soluble dans l'eau et il a été étudié depuis quelques années pour ses propriétés antioxydantes [413,417–419]. Des thèses



réalisées par Aljawish (2013) et Karaki (2015) ont déjà montré que la fonctionnalisation du chitosane et de la pectine par l'acide férulique conduisait à des dérivés de ces polysaccharides de couleur orangée, ayant des propriétés fonctionnelles différentes et intéressantes (pouvoir antioxydant, colorant, faible cytotoxicité...).

### 2.1.5. Produits d'oxydation

Les produits d'oxydation de l'acide férulique par la laccase de *Myceliophthora thermophila* ont été partiellement étudiés. Aljawish et ses collaborateurs [419] ont étudié l'oxydation enzymatique de l'acide férulique par cette enzyme à pH neutre et à température contrôlée (30°C et pH de 7,5). Ils ont identifié un produit d'oxydation majoritaire issu de l'acide férulique par LC-MS (Figure 31) et par fragmentation MS<sup>2</sup> et MS<sup>3</sup>. Ils ont déterminé que ce produit avait une masse moléculaire de 386 g.mol<sup>-1</sup> et était un dimère 8-5' d'acide férulique.

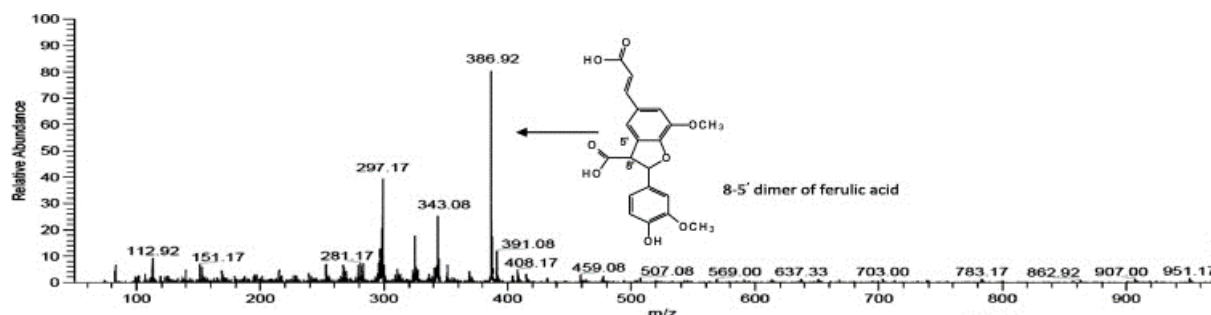


Figure 31 : Spectre LC-MS total du produit d'oxydation majeur de l'acide férulique [419].

La détermination structurale de produits d'oxydation d'acide férulique a été étudiée par d'autres auteurs avec d'autres laccases. Par exemple, Adelakun et ses collaborateurs [420] ont oxydé l'acide férulique en utilisant la laccase de *Trametes pubescens*. Ils ont identifié deux dimères ayant une masse moléculaire de 386 g.L<sup>-1</sup> également. L'un était lié en  $\beta$ -5 et l'autre en  $\beta$ - $\beta$ . La détermination de ces structures s'est basée à la fois sur l'utilisation de la LC-MS mais également sur des analyses de résonance magnétique nucléaire (RMN). A partir de ces structures, ils ont proposé un mécanisme de formation de ces dimères (Figure 32).

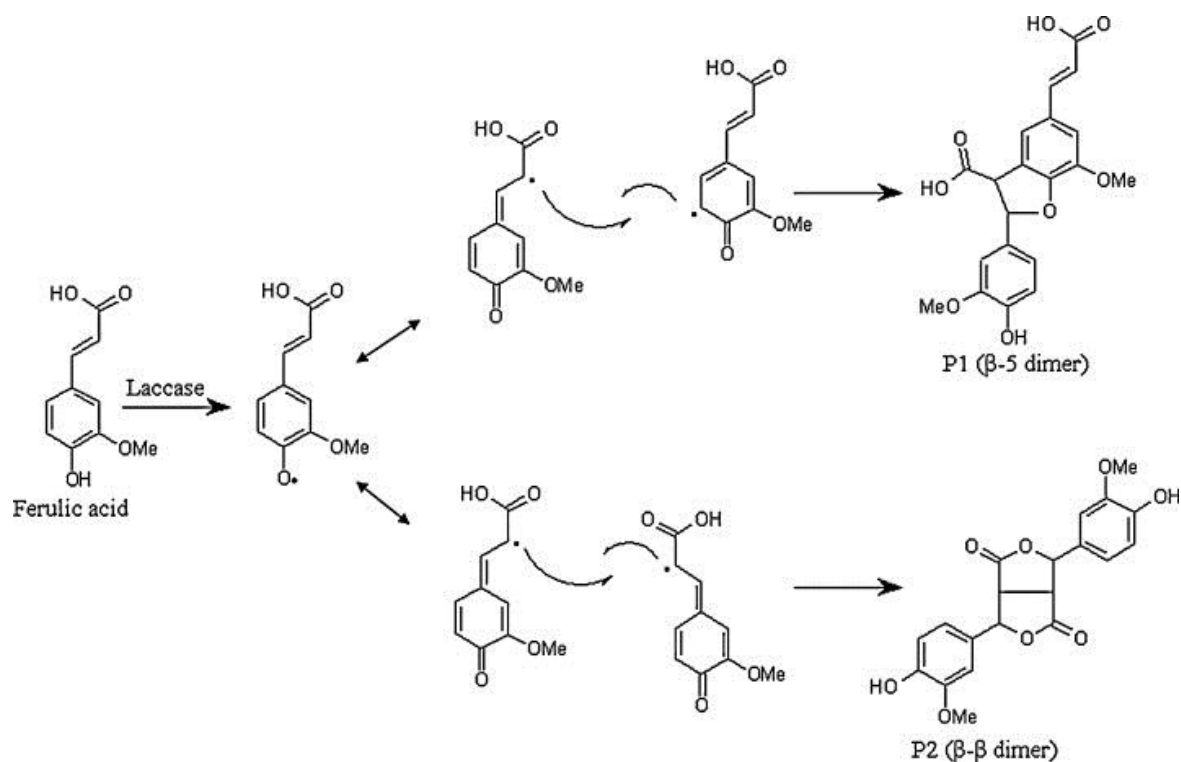


Figure 32 : Oxydation de l'acide férulique par la laccase pour produire des dimères  $\beta$ - $\beta$  et  $\beta$ -5 [420].

## 2.2. Greffage des produits d'oxydation sur des polysaccharides

### 2.2.1. Greffage sur une amine

Dans les travaux d'Aljawish [205], le chitosane a été fonctionnalisé avec des dérivés oxydés de l'acide férulique (AF) et du férulate d'éthyle (FE) comme substrats phénoliques à l'aide de la laccase de *Myceliophthora thermophila*. Les auteurs ont montré que la fonctionnalisation du chitosane avait été réalisée sur le carbone C2 *via* la formation d'une base de Schiff (la formation d'une liaison C=N a été prouvée par des analyses FTIR (Figure 33)).

Les auteurs ont mis en évidence l'apparition de deux nouveaux pics d'absorbance à 1620 et 1640  $\text{cm}^{-1}$ . Ils les ont attribués à la vibration des liaisons C=N caractéristique des imines et à des elongations des liaisons C-C dues à la formation d'une base de Schiff entre les groupes amine du pyranose du chitosane et les groupements phénoliques de l'acide férulique et du férulate d'éthyle.

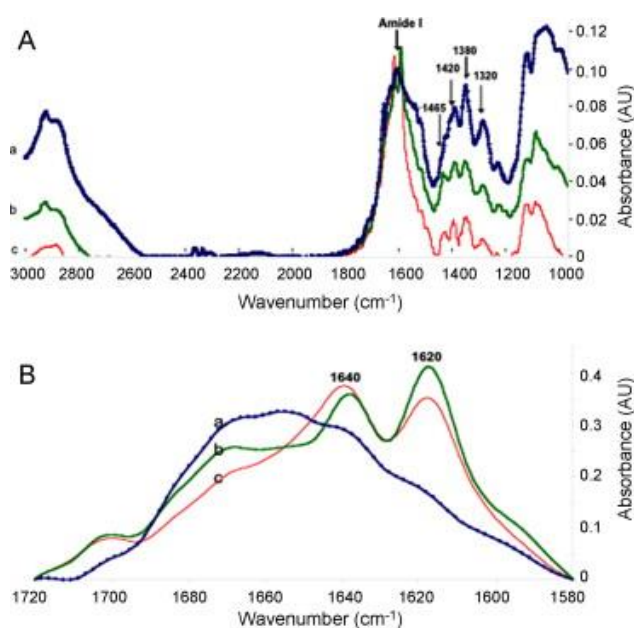


Figure 33 : Spectre FTIR complet (A) et bande amide I (B) du chitosane natif (a), du chitosane fonctionnalisé avec du férulate d'éthyle (b) et avec de l'acide férulique (c) [205].

### 2.2.2. Greffage sur un carboxyle

Karaki et ses collaborateurs [421] ont tenté de greffer des produits d'oxydation de l'acide férulique par la laccase de *Myceliophthora thermophila* sur de la pectine faiblement méthylée. Ils ont observé une modification de couleur de la pectine persistante même après diverses procédures de lavage, ce qui suggérerait que les produits d'oxydation étaient greffés sur le polymère par des liaisons fortes. Le dosage des phénols a montré une plus grande quantité de composés phénoliques sur la pectine fonctionnalisée par rapport la pectine native. La fonctionnalisation enzymatique de la pectine a également entraîné une diminution de la mobilité électrophorétique de la pectine modifiée. D'après ce résultat, ils ont conclu que le greffage des produits d'oxydation de l'acide férulique ciblait la pectine au niveau de l'acide carboxylique. Pour confirmer cette hypothèse, une analyse par spectroscopie infrarouge a été réalisée. L'analyse FTIR de la pectine fonctionnalisée (Figure 34) a montré de nouveaux pics dans la région  $900-1000\text{ cm}^{-1}$ , attribués aux groupements aromatiques des produits d'oxydation de l'acide férulique. De plus, une légère différence de l'aire du pic représentatif des groupements  $\text{COO}^-$  à  $1745\text{ cm}^{-1}$  pourrait venir appuyer l'hypothèse d'une estérification de la pectine.

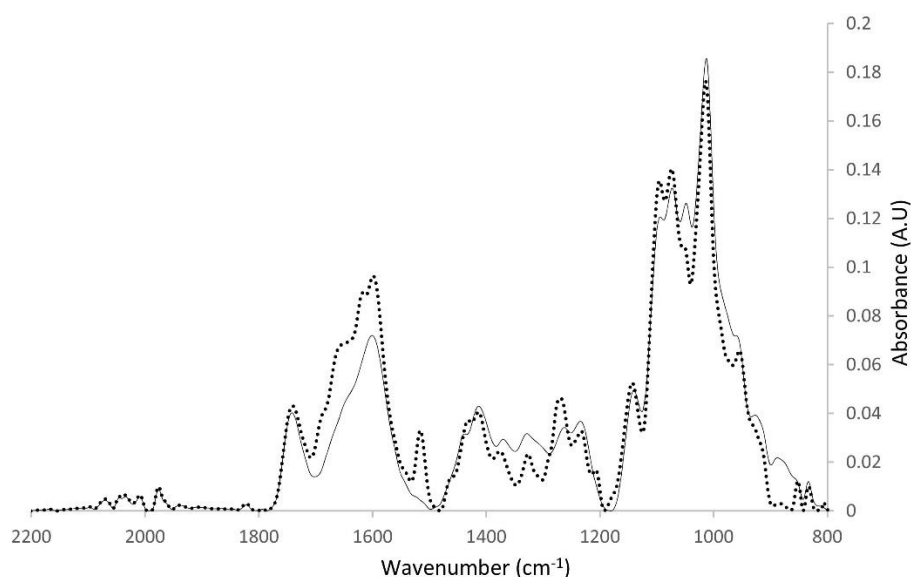


Figure 34 : Spectres FTIR de la pectine native (en pointillés) et de la pectine fonctionnalisée par greffage des produits d'oxydation de l'acide férulique (ligne continue) [421].

Les auteurs ont analysé la pectine modifiée par RMN. Les spectres  $^{13}\text{C}$  des pectines native et fonctionnalisée étaient semblables et n'ont révélé aucun changement significatif d'un échantillon à l'autre, ce qui indiquait que la structure principale de la pectine était maintenue. Les spectres  $^1\text{H}$  étaient plus instructifs : certaines différences sont apparues et pourraient être un indice des modifications structurelles apportées à la pectine greffée par les produits d'oxydation. La zone du H5 du spectre  $^1\text{H}$  (4,6-5,0 ppm) a été modifiée, ce qui suggèrait une modification chimique des carbones C6 des unités galacturoniques. De plus, les signaux observés dans la région aromatique du spectre  $^1\text{H}$  (6,0-8,0 ppm) correspondaient principalement aux produits d'oxydation de l'acide férulique. Un grand signal est apparu dans cette zone dans le cas de la pectine modifiée, témoignant du greffage des composés phénoliques.

Toutefois, en raison du faible degré de fonctionnalisation et de la faible sensibilité de ces mesures RMN, aucune autre différence significative avec la pectine native n'a pu être attestée. Ces observations ont permis de conclure que la structure de la pectine a été modifiée au cours du processus d'oxydation par la laccase, mais les changements structurels profonds qui accompagnent cette réaction n'ont pas pu être complètement révélés en raison de la faible sensibilité des mesures [421]. Les auteurs ont donc donné un certain nombre de pistes qui

conduisent à penser que les produits d'oxydation sont greffés par formation d'une liaison ester entre les carboxyles de la pectine et les POX.

### 2.2.3. Applications potentielles

Les mécanismes de fonctionnalisation des polysaccharides ont été mis en évidence, montrant que des groupes amines et carboxyles étaient impliqués. Les caractéristiques physicochimiques telles que la solubilité, le comportement rhéologique, les activités antioxydantes et les propriétés biologiques telles que l'adhésion cellulaire, l'activité antimicrobienne pourraient être modifiées par la fonctionnalisation par voie enzymatique. Cette réaction enzymatique a permis la formation de dérivés du chitosane aux propriétés antioxydantes améliorées [401,422]. La pectine fonctionnalisée présentait, malgré une altération de la morphologie de la surface des particules, de meilleures propriétés antioxydantes que celles du polymère natif et un comportement hygroscopique différent. Les résultats des isothermes de sorption obtenus ont permis de montrer que la pectine modifiée avait une structure moins ouverte, lui conférant un caractère moins hygroscopique que la pectine native à des activités de l'eau inférieure à 0,45 et une structure plus ouverte à des valeurs d' $a_w$  élevées permettant d'absorber des quantités plus importantes d'eau. Des analyses thermiques ont suggéré une structure moins organisée et moins compacte pour la pectine fonctionnalisée par rapport au polymère natif. D'un point de vue rhéologique, les solutions aqueuses de pectine modifiée formaient toujours un fluide non-Newtonien rhéofluidifiant mais que les viscosités et les vitesses de gélification ont diminué significativement en comparaison avec la pectine native [414]. Toutes ces nouvelles propriétés des polymères fonctionnalisés ouvrent la voie vers la création d'ingrédients fonctionnels aux propriétés ciblées.

La gomme d'Acacia possède à la fois des groupements amines et des groupements carboxyliques offrant plusieurs sites d'intérêt pour la fonctionnalisation [314,315].



# Matériels et Méthodes

---

I. Matériels .....	79
1. Polysaccharides utilisés : chitosane et gomme d'acacia .....	79
2. La Laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i> (E.C. 1.10.3.2) .....	79
3. Les produits chimiques.....	79
II. Méthodes de préparation des assemblages des deux polymères .....	81
1. Préparation des solutions.....	81
2. Caractérisation des assemblages .....	82
III. Modification de la gomme d'Acacia par greffage de produits d'oxydation de l'acide férulique obtenus par voie enzymatique.....	87
1. Oxydation de composés phénoliques par la laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i>	87
2. Fonctionnalisation enzymatique de la gomme d'acacia.....	94





---

## Matériels et méthodes

### I. Matériels

#### 1. Polysaccharides utilisés : chitosane et gomme d'acacia

Le chitosane (chitosan MMW medium molecular weight) provient de chez Sigma-Aldrich (France). D'après le fournisseur, il présente une masse molaire d'environ 310 kDa, ainsi qu'un degré de désacétylation compris entre 75 % et 85 % (confirmé par FTIR). La viscosité d'une solution à 1 % p/v dans l'acide acétique (1 % v/v) à 20 °C est comprise entre 200 et 800 mPa.s. La gomme d'Acacia utilisée est fournie par Nexira (France) sous le nom d'Instantgum AA. Elle est issue de l'exsudat d'*Acacia senegal* et est purifiée. Sa masse molaire est d'environ 400 kDa [423], son taux d'humidité est de 10 % et son taux de cendres de 4 %. La viscosité d'une solution à 25 % p/v dans l'eau à 20 °C varie entre 60 et 130 mPa.s.

#### 2. La Laccase de *Myceliophthora thermophila* (E.C. 1.10.3.2)

La laccase de *Myceliophthora thermophila* (E.C. 1.10.3.2), commercialisée par la société Novozymes sous le nom de "Novozym® 51003". Il s'agit d'une polyphénoloxydase issue du champignon *Myceliophthora thermophila* produite par expression hétérologue par *Aspergillus oryzae* [424]. Elle se présente sous forme d'un liquide marron d'une densité de 1,05 g/mL. Elle a une masse molaire de 85 kDa [419], une pureté d'environ 10 % (m/m) et une activité théorique de 1000 LAMU/min (LAMU = unité enzymatique définie comme étant la quantité d'enzyme catalysant l'oxydation de 0,01 µM de syringaldazine (C<sub>18</sub>H<sub>2</sub>ON<sub>2</sub>O<sub>6</sub>) par minute à pH 7,5 et à 30 °C [425]. D'après la fiche technique, l'enzyme est stable à température ambiante (stockage entre 0 et 25 °C) et possède une activité optimale à pH 7,5 et à 30 °C.

#### 3. Les produits chimiques

Les produits chimiques utilisés sont listés dans le Tableau 6 et les solvants utilisés sont listés

dans le

Tableau 7 :

*Tableau 6 : Produits chimiques utilisés*

Désignation	Fabricant	Référence
Hydroxyde de potassium	Merck	100778
Phosphate de sodium dibasique anhydre	Sigma-Aldrich	71649
Phosphate de potassium monobasique anhydre	Sigma-Aldrich	795488
Sérum albumine bovine	Sigma-Aldrich	A2153
Chlorure de sodium	Prolabo	27810.295
Hydroxyde de sodium	Fluka	71690
Acide férulique	Sigma-Aldrich	128708
Syringaldazine	Sigma-Aldrich	57896
2,2'-Azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) (ABTS)	Sigma-Aldrich	A1888
Bleu brillant	Sigma-Aldrich	B0770
Acide phosphorique	Sigma-Aldrich	P5811
Persulfate de potassium	Sigma-Aldrich	77214
Oxyde de Polyéthylène (PEO)	Malvern	U0408
Dextran	Malvern	U0408

*Tableau 7 : Solvants utilisés*

Désignation	Fabricant	Référence
Acétonitrile	Carlo-Erba	412412
Ethanol	Carlo-Erba	528151
Méthanol	Carlo-Erba	525102
Acide acétique	Sigma	33209
Eau deutérée	Sigma	151882
Méthanol deutéré	Sigma	548537

## **II. Méthodes de préparation des assemblages des deux polymères**

### **1. Préparation des solutions**

#### **1.1. Dialyse des polymères**

La gomme d'Acacia et le chitosane ont été solubilisés respectivement dans de l'eau ultra pure et dans de l'acide acétique à 1 % v/v. Les solutions de gomme d'Acacia et de chitosane ont été placées dans des membranes semi-perméables (MWCO 10 000 Da de Membrane Filtration Products Inc.) pour être dialysées respectivement contre de l'eau ultra pure et de l'acide acétique à 1 % v/v afin d'éliminer les sels. Les conductivités des phases à l'extérieur des sacs de dialyse ont été mesurées avant d'y placer les sacs et ont été suivies toutes les 2 h. La solution externe est changée lorsque la conductivité mesurée diffère de la conductivité initiale. La dialyse a été stoppée lorsque la conductivité mesurée est identique à la conductivité initiale.

Après l'étape de dialyse, le contenu des sacs a été centrifugé pendant 30 min à 12 000 g avec une centrifugeuse Beckmann (Beckman Coulter Inc., Villepinte, France) pour éliminer les insolubles. Les échantillons ont ensuite été congelés puis lyophilisés. Ils ont ensuite été stockés à 4 °C jusqu'à utilisation.

#### **1.2. Solubilisation**

Les solutions ont été préparées en dissolvant la GA et le CN purifiés respectivement dans de l'eau ultra pure ou dans de l'acide acétique à 1 % v/v. Les solutions ont été agitées à 400 rpm pendant une nuit à 4 °C afin d'assurer la solubilisation totale des polymères.

#### **1.3. Ajustement du pH**

Les pH des solutions de polymères ont été mesurés à l'aide d'un pH-mètre, préalablement étalonné. Afin d'augmenter la valeur du pH (pH initial du chitosane  $\approx$  4,1 et pH initial de la gomme d'Acacia  $\approx$  4,3), une solution d'hydroxyde de sodium a été ajoutée (NaOH 5 N). Cette concentration permettait de négliger l'influence du volume d'hydroxyde de sodium sur la

concentration en polymère des solutions (pour augmenter le pH d'une solution de 30 mL d'une demi-unité, seulement 50  $\mu$ L d'hydroxyde de sodium 5 N étaient nécessaire).

#### 1.4. Préparation des assemblages

Les solutions de GA et de CN ont été préparées en amont. Les pH des solutions ont été ajustés aux pH visés pour l'assemblage. Les solutions ont été placées pendant 20 min dans une chambre de dégazage (TA Instruments, Waters SAS, France) thermostatée afin d'atteindre la température désirée pour le mélange et d'éliminer les bulles d'air dans les solutions. La solution de GA a ensuite été ajoutée à la solution de CN dans les proportions souhaitées afin d'obtenir les ratios molaires visés.

## 2. Caractérisation des assemblages

### 2.1. Mesure de la charge de surface

La charge de surface ou potentiel Zêta correspond à la charge d'une particule au niveau du plan de cisaillement (la limite entre les ions accrochés à une particule et les ions de la couche diffuse, non liés) (Figure 35). Cette charge de surface permet de prédire les interactions entre les polymères en solution.

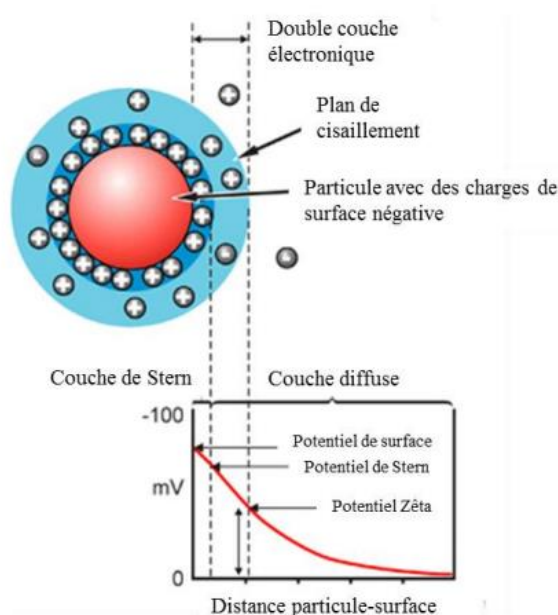


Figure 35 : Représentation de la double couche électrique et du potentiel Zeta [426]

Une tension alternative est appliquée aux deux électrodes d'une cellule spécifique dans laquelle est placé l'échantillon, provoquant la migration des particules de l'échantillon. Le potentiel Zêta est calculé à partir de la mobilité électrophorétique en utilisant le modèle de Smoluchowski [427] selon l'Équation 4. Ce modèle s'applique aux particules dures, ce qui n'est pas exactement le cas dans le système étudié. Le potentiel Zêta est ainsi qualifié d'approximatif.

*Équation 4 : Calcul de la mobilité électrophorétique (modèle de Smoluchowski)*

$$\mu_E = v/E$$

Où  $v$  est la vitesse des particules ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ),  $E$  le champ électrique appliqué par unité de longueur ( $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) et  $\mu_E$  la mobilité électrophorétique ( $\mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{V}^{-1}$ ).

Plusieurs paramètres sont utilisés par le logiciel afin de corriger la valeur du potentiel Zêta en fonction des propriétés du polysaccharide utilisé (constante diélectrique, indice de réfraction et viscosité) et des paramètres du milieu (viscosité, permittivité électrique) selon l'équation de Smoluchowski (Équation 5).

*Équation 5 : Calcul du potentiel Zêta (équation de Smoluchowski)*

$$\mu_E = \zeta \cdot \varepsilon / \eta$$

Où  $\mu_E$  la mobilité électrophorétique ( $\mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{V}^{-1}$ ),  $\zeta$  le potentiel Zêta (mV),  $\varepsilon$  la permittivité électrique du solvant et  $\eta$  la viscosité dynamique du solvant.

Les mesures de potentiel Zêta ont été réalisées en utilisant un appareil Zetasizer Nano ZS de Malvern Panalytical (Angleterre) équipé d'un laser vert (532 nm, He/Ne). Les mesures ont été collectées par un détecteur situé à un angle de  $173^\circ$  par rapport au faisceau incident (rétrodiffusion). Chaque mesure a été réalisée en triplicat avec un minimum de 20 « runs » de 10 s. Un titreur automatique (Malvern Panalytical, MPT-2) a été utilisé afin de reproduire les mêmes séquences qu'en titration calorimétrique isotherme (mêmes volumes d'une solution de GA injectés dans une solution de CN), à températures contrôlées (5, 25 et  $45^\circ\text{C}$ ). 25 injections de solution de GA ont été ajoutées à 12 mL d'une solution de CN (les quantités et les

concentrations ont été adaptées en fonction des ratios molaires visés). Les échantillons ont été placés dans des cuves capillaires jetables (DTS1070) pour les mesures de potentiel Zêta ponctuelles et dans une cellule de mesure de potentiel Zêta à haute concentration (ZEN1010) lorsque le titreur automatique (MPT-2) était utilisé.

## 2.2. Mesure de la turbidité des échantillons après assemblages

La turbidité des assemblages GA/CN a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu 1280, Japon) à 660 nm. Le blanc a été réalisé à l'aide d'une solution d'acide acétique à 1 % p/V et la turbidité relative des échantillons ( $\tau$ ) a été calculée avec l'Équation 6 :

*Équation 6 : Calcul de la turbidité relative*

$$\tau = -\frac{1}{L} \cdot \ln \frac{I_0}{I_t}$$

Où L est la longueur du trajet optique (1 cm) et  $I_t$  et  $I_0$  sont respectivement l'intensité de la lumière transmise et l'intensité de la lumière incidente.

## 2.3. Observations de la morphologie des assemblages par microscopie optique

Les échantillons ont été observés par microscopie optique (Olympus BH2, Japon) avec un grossissement x400. Les images ont été enregistrées avec une caméra CMOS 5 MPixel (Olympus) contrôlée grâce au logiciel Toupview. Les micrographies sélectionnées étaient toujours représentatives de ce qui a été observé à plusieurs endroits de plusieurs échantillons.

Les micrographies ont été traitées avec le logiciel d'analyse d'image ImageJ. Le contraste et le niveau du seuil ont été ajustés. Les images ont été binarisées et le traitement de l'image a permis de déterminer la distribution de taille et le nombre de particules observées. L'indice de polydispersité des coacervats a été obtenu grâce à l'Équation 7. Les résultats présentés sont une moyenne des analyses réalisées sur 3 micrographies différentes.

*Équation 7 : Calcul de l'indice de polydispersité*

$$\text{Indice de polydispersité} = \left( \frac{\text{Déviation standard}}{\text{Diamètre moyen}} \right)^2$$

## 2.4. Détermination des paramètres thermodynamiques des assemblages par titration calorimétrique isotherme

Les paramètres thermodynamiques régissant les assemblages ont été déterminés par titration calorimétrique isotherme (ITC). Ces expériences ont été effectuées avec un système “Affinity ITC” équipé d’une cuve standard en or de 965  $\mu\text{L}$  (TA instruments, Waters SAS, France). L’appareil mesure les chaleurs libérées ou absorbées lors d’une injection d’un volume contrôlé de la solution de GA dans la solution de CN contenue dans la cellule de mesure. L’appareil mesure la différence de température entre une cellule de référence contenant de l’eau ultra pure et la cellule de mesure. Les valeurs brutes sont ensuite modélisées pour déterminer la constante de dissociation ( $K_d$ ), l’enthalpie ( $\Delta H$ ) et la stœchiométrie ( $n$ ) de l’interaction (Figure 36).

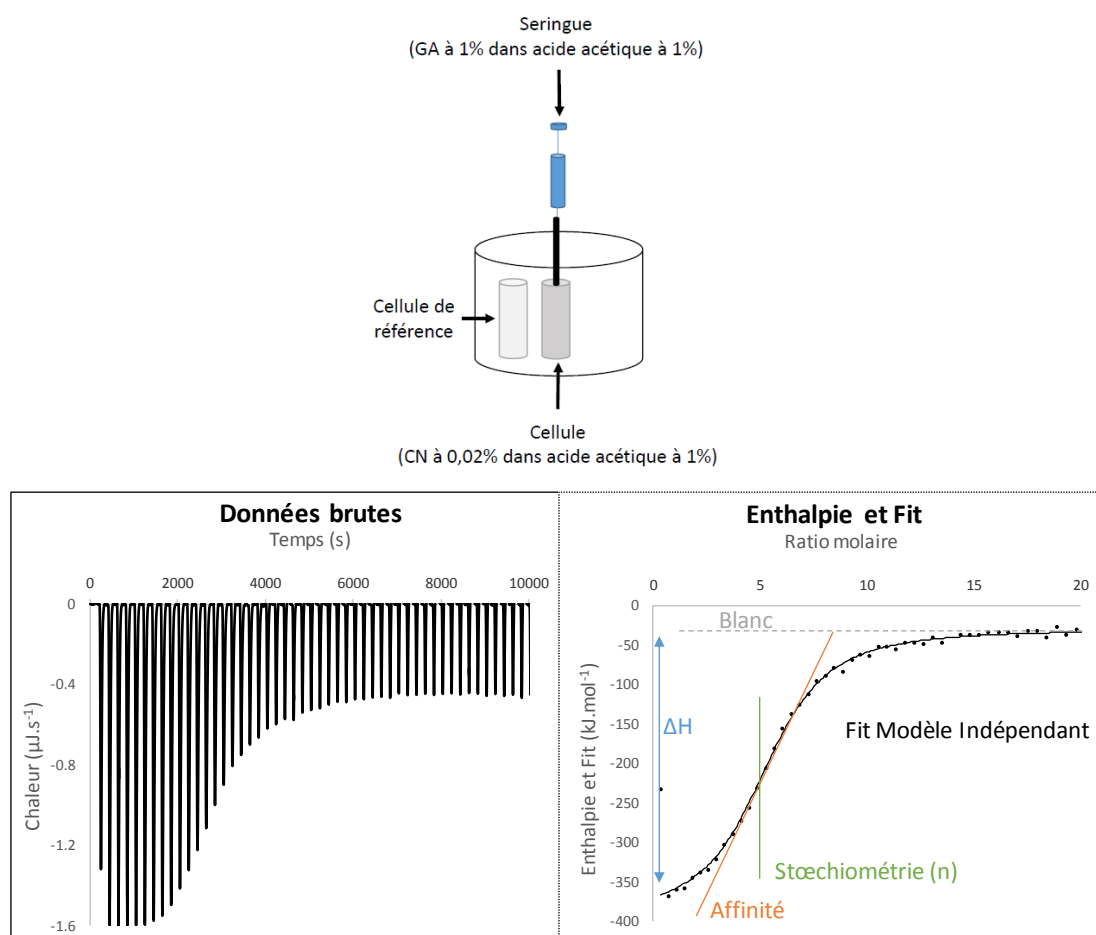


Figure 36 : Principe de la titration calorimétrique isotherme, schéma de principe d'une expérience, exemples de données brutes et de résultats issus de la modélisation

La thermo-entropie ( $T\Delta S$ ) et la variation d'énergie libre ( $\Delta G$ ) sont calculées à partir des

Équation 8 et Équation 9 :

*Équation 8 : Calcul de la variation d'énergie libre*

$$\Delta G = -R.T.\ln\left(1/K_d\right)$$

*Équation 9 : Calcul de la thermo-entropie*

$$T.\Delta S = \Delta H - \Delta G$$

Avec  $\Delta G$  la variation d'énergie libre ( $\text{kJ.mol}^{-1}$ ),  $\Delta H$  la variation d'enthalpie ( $\text{kJ.mol}^{-1}$ ),  $\Delta S$  la variation d'entropie ( $\text{kJ.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ),  $K_d$  la constante de dissociation,  $T$  la température (K) et  $R$  la constante des gaz parfaits ( $8,3144598 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ).

Toutes les solutions ont été au préalable dégazées sous vide en utilisant la station de dégazage associée à l'appareil (TA Instruments, Waters SAS, France) pendant 15 min à la température de titration. La concentration de la solution de GA contenue dans la seringue doit toujours être supérieure à la concentration de CN dans la cellule, sans quoi il n'est pas possible d'atteindre les ratios molaires visés. En ITC, des expériences préliminaires sont toujours réalisées afin d'optimiser les concentrations dans la cellule et dans la seringue. Les concentrations utilisées ont été choisies de façon à obtenir une titration complète sans saturation du signal. La microseringue d'injection ( $320 \mu\text{L}$ ) a été remplie avec une solution de GA (1,00 % p/v de GA dans une solution d'acide acétique à 1,00 % v/v).  $5 \mu\text{L}$  ont été injectés dans la cellule à 50 reprises, chaque injection étant séparée par 300 s afin d'avoir un retour du signal à la ligne de base.

Pour chaque mesure, le pH et la température étaient les mêmes dans la cellule et dans la seringue. La chaleur de dilution du blanc a été soustraite des données brutes dans chaque expérience. L'acquisition des données est réalisée à l'aide du logiciel ITC RUN et les données collectées sont analysées grâce au logiciel NanoAnalyse (TA instruments, Waters SAS, France). Le modèle « Independent » a été choisi car il correspondait le mieux aux données brutes et qui avait la meilleure déviation standard autour des résidus pour les thermogrammes obtenus.



### III. Modification de la gomme d'Acacia par greffage de produits d'oxydation de l'acide férulique obtenus par voie enzymatique

#### 1. Oxydation de composés phénoliques par la laccase de *Myceliophthora thermophila*

##### 1.1. Détermination de l'activité spécifique de l'enzyme

##### 1.1.1. Détermination de l'activité totale de l'enzyme

L'activité enzymatique de la Laccase de *Myceliophthora thermophila* a été mesurée par suivi spectrophotométrique de l'apparition du produit d'oxydation d'un substrat phénolique [213,411]. Le substrat choisi était la syringaldazine qui est un substrat de référence utilisé pour caractériser l'activité enzymatique de la laccase (Figure 37).

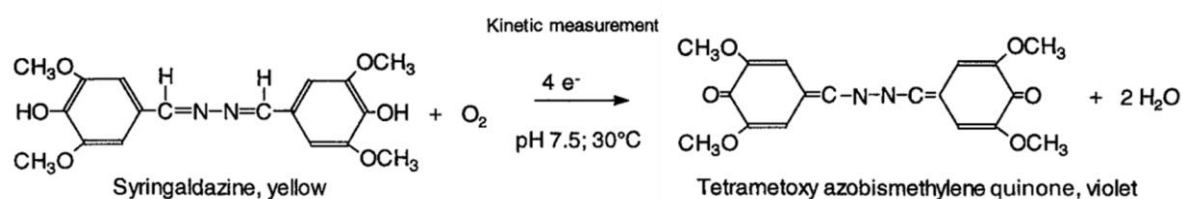


Figure 37 : Oxydation de la syringaldazine catalysée par la laccase [428]

400  $\mu$ L de solution de syringaldazine à 0,2 mM dans de l'éthanol ont été mélangés à 1560  $\mu$ L de solution de tampon de phosphate de sodium à 50 mM (pH 7,4), préparée en mélangeant 81 mL d'une solution de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydre à 7,09 g/L dans de l'eau ultra pure et 19 mL d'une solution de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhydre à 6,81 g/L dans de l'eau ultra pure.

Le mélange a été placé dans une cuve en quartz et le blanc a été mesuré sur le mélange avant ajout de la laccase. La réaction a été déclenchée par l'ajout de 10  $\mu$ L de laccase diluée 50 fois dans du tampon phosphate. La cuve a été placée dans un spectrophotomètre Shimadzu UV-1605 thermostaté à 30 °C et l'évolution de l'absorbance au cours du temps a été enregistrée à 526 nm pendant 5 min toutes les 5 s. La vitesse initiale a été obtenue par la détermination de la pente initiale de la courbe donnant l'évolution de l'absorbance de la solution en fonction du

temps (Équation 10).

Équation 10 : Calcul de l'activité enzymatique totale ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ )

$$\text{Activité } (\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}) = \frac{\text{vitesse initiale}}{\varepsilon_{526} \times l} \times 10^3 \times d$$

Avec  $\varepsilon_{526}$  le coefficient d'extinction molaire de la syringaldazine ( $\varepsilon_{526} = 65000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ),  $l$  l'épaisseur de la cuve (cm) et  $d$  le facteur de dilution de l'enzyme.

L'activité totale de l'enzyme était de  $33 \pm 2 \mu\text{mol}$  de substrat. $\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$  de solution.

#### 1.1.2. Détermination de la teneur en protéines de l'enzyme

Afin de connaître l'activité spécifique de l'enzyme, il faut connaître sa concentration en protéines. Pour cela, un dosage des protéines selon la méthode Bradford a été réalisé.

Pour réaliser la gamme étalon, une solution étalon de Sérum Albumine Bovine (BSA) a été préparée à  $1,00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  et 6 dilutions ont été réalisées (de  $1,00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  à  $0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Tableau 8).

Tableau 8 : Gamme étalon de BSA pour le dosage de Bradford

Concentration ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Quantité de protéines en équivalent BSA ( $\mu\text{g}$ )	Absorbance à 595 nm (moyenne $\pm$ écart-type)
0,00	0,00	$0,00 \pm 0,00$
0,05	1,00	$0,06 \pm 0,01$
0,15	3,00	$0,12 \pm 0,05$
0,25	5,00	$0,22 \pm 0,03$
0,50	10,00	$0,40 \pm 0,07$
1,00	20,00	$0,82 \pm 0,01$

Le réactif de Bradford a été préparé en mélangeant successivement 100 mg de bleu brillant, 50 mL d'éthanol, 100 mL d'acide phosphorique à 85 % et 100 mL d'eau.

Dans une cuve en quartz, 20  $\mu\text{L}$  de chaque solution de la gamme étalon ont été placés auxquels 1 mL du réactif de Bradford dilué 5 fois a été ajouté. La cuve a été laissée 3 min à l'obscurité, puis placée dans un spectrophotomètre Shimadzu UV-1605 thermostaté à 30 °C. Le blanc a été réalisé sur une cuve contenant 20  $\mu\text{L}$  d'eau et 1 mL du réactif de Bradford dilué 5 fois.

L'absorbance a été enregistrée à 526 nm. Les expériences ont été réalisées en triplicat. La droite d'étalonnage obtenue est présentée en Figure 38.

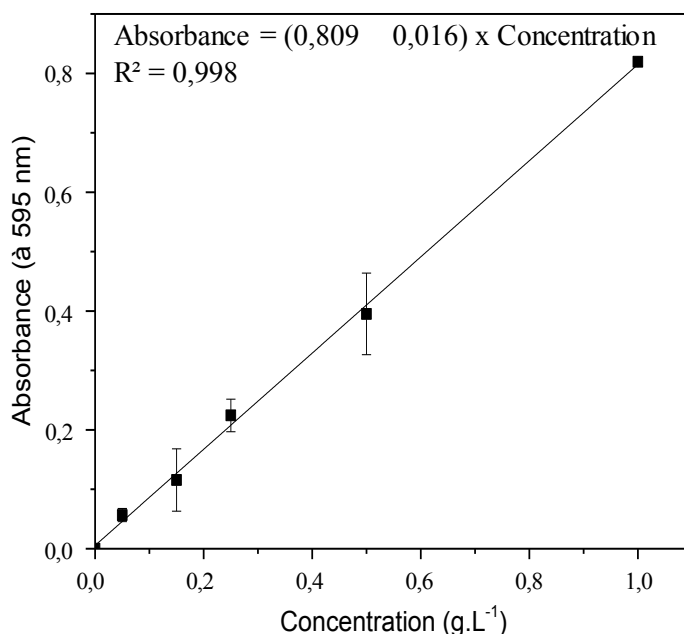


Figure 38 : Droite d'étalonnage de BSA pour la détermination de la quantité de protéines (équivalent BSA) dans la laccase de *Myceliophthora thermophila*

L'expérience a été réalisée sur la laccase diluée au 10<sup>ème</sup>. La concentration en protéines dans la solution stock de laccase obtenue était de  $10,01 \pm 0,69$  g.L<sup>-1</sup>. Or, une unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à l'oxydation de 1  $\mu$ mol de syringaldazine par minute [213,411,413]. L'activité enzymatique spécifique se calcule grâce à l'Équation 11.

Équation 11 : Calcul de l'activité spécifique de l'enzyme ( $\mu$ mol/min/g de protéine)

$$\text{Activité spécifique } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g prot}) = \frac{\text{Activité } (\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1})}{\text{Concentration en protéines } (\text{g} \cdot \text{L}^{-1})}$$

L'activité spécifique moyenne de la solution stock de laccase était de  $32\,038 \pm 1\,322$   $\mu$ mol.min<sup>-1</sup>.g de protéines<sup>-1</sup>.

## 1.2. Oxydation enzymatique de composés phénoliques par la laccase

Le protocole d'oxydation de l'acide férulique (AF) par la laccase de *Myceliophthora thermophila* a été adapté des méthodes développées dans deux précédentes thèses effectuées au laboratoire par Abduladi Aljawish et Nadine Karaki [213,413].

Un tampon phosphate a été préparé en mélangeant 81 mL d'une solution de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 7,09 g/L dans de l'eau ultra pure et 19 mL d'une solution de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 6,81 g/L dans de l'eau ultra

pure. Le tampon ainsi préparé avait un pH d'environ 7,4. 45 mL de ce tampon phosphate ont été placés à 4 °C pendant une nuit. Le tampon a ensuite été agité à 450 rpm pendant une heure à 30 °C. Une solution d'AF à 50 mM dans du méthanol a été préparée, puis 5 mL de cette solution ont été ajoutés au tampon sous agitation à 30 °C. Lorsque la température était stabilisée (environ 15 min après ajout de l'AF), la réaction a été déclenchée par ajout de 36 µL d'enzyme à 32 038 LAMU.g<sup>-1</sup> (LAMU = unité enzymatique de la laccase en µmol.min<sup>-1</sup>.g d'enzyme). Le mélange a été agité à 30 °C pendant 50 min, puis la réaction a été stoppée en y ajoutant 3 volumes d'éthanol à -20 °C. Le mélange a été stocké au congélateur à -20 °C pendant une nuit. Le mélange a ensuite été centrifugé à 12 000 g pendant 20 min à 20 °C. Le surnageant a été placé dans un évaporateur rotatif et l'éthanol a été éliminé par évaporation sous une dépression de 175 mbar à 40 °C (point d'ébullition). Une fois l'éthanol évaporé, la pression a progressivement été diminuée jusqu'à 72 mbar pour éliminer en partie l'eau. La solution obtenue a ensuite été congelée pendant 24 h avant d'être lyophilisée. La poudre obtenue a été stockée dans un dessiccateur à 4 °C jusqu'à utilisation.

### 1.3. Mesure de l'évolution de la couleur du milieu réactionnel

Pendant la réaction d'oxydation de l'acide férulique, un changement de couleur de l'incolore au marron foncé a été observé. L'évolution de la couleur du milieu réactionnel a été mesurée avec un spectrophotomètre CR-5-Konica Minolta (Konica Minolta Sensing Europe B.V.). Avant chaque série d'analyse, l'appareil était étalonné grâce à deux standards (blanc et noir). Toutes les 10 min, les paramètres de couleurs du référentiel CIE [429] (L\*, a\* et b\*) ont été mesurés en quelques secondes en plaçant 4 mL du mélange réactionnel en cours d'oxydation dans la cuve. L\* correspond à la valeur de luminance et varie de 0 % (noir) à 100 % (blanc). Le paramètre a\* correspond à la variation de couleur entre le vert et le rouge et b\* entre le bleu et le jaune. La différence de couleur entre les échantillons est obtenue grâce à l'Équation 12.

Équation 12 : Calcul de variation de couleur entre échantillons

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

#### 1.4. Dosage de l'acide férulique par HPLC

La consommation de l'AF au cours de la réaction enzymatique a été déterminée pendant la réaction d'oxydation. 100  $\mu$ L du milieu réactionnel ont été prélevés puis placés dans des microtubes à centrifuger de 2 mL contenant 900  $\mu$ L de méthanol pur afin de stopper la réaction. Les prélèvements ont été réalisés toutes les 2 min pendant 30 min, puis toutes les 5 min pendant 20 min. Les échantillons ont été ensuite congelés à -20 °C pendant 48 h.

Avant l'analyse, les prélèvements ont été filtrés sur un filtre seringue de 0,2  $\mu$ m puis dilués au demi dans de l'eau ultra pure. Ils ont été placés dans des vials. 5  $\mu$ L ont été injectés dans le système HPLC (Shimadzu Class-VP HPLC). La séparation a été effectuée sur une colonne de chromatographie GRACE Apollo C18 (150 x 2,1 mm x 5  $\mu$ m) apolaire. La méthode d'élution comportait un gradient de deux phases : une phase A (eau ultra pure/méthanol/TFA 80 : 20 : 0,1) et une phase B (100 % méthanol).

Le gradient d'élution des phases est donné Tableau 9.

La détection a été réalisée entre 190 et 700 nm par un détecteur à barrettes de diodes UV/VIS : SPD-M 10 A VP. Les résultats ont été enregistrés et traités par un logiciel de traitement de chromatogramme (LC solution). La quantité d'AF était mesurée à son maximum d'absorption (322 nm) après avoir réalisé une gamme étalon de l'AF à concentrations comprises entre 0,1 et 0,5 mM.

Tableau 9 : Gradient d'élution des phases A et B au cours de la méthode HPLC du dosage de l'acide férulique

Temps (min)	Quantité de phase A (%)	Quantité de phase B (%)
0,01	80	20
2	80	20
16	10	90
21	10	90
31	80	20

## 1.5. Identification des produits d'oxydation obtenus

### 1.5.1. Détermination de la masse moléculaire exacte par LCMS

Les spectres de masse ont été obtenus en utilisant une HPLC-MS (LTQ-MS, Thermo FisherScientific, San Jose, CA, USA), consistant en une pompe binaire de distribution de solvant connectée à un détecteur de matrice de photodiode (PDA) et un spectromètre de masse hybride LTQ Orbitrap équipé d'une interface d'ionisation de pression atmosphérique fonctionnant en mode électrospray (ESI). 20  $\mu\text{L}$  d'extraits ont été séparés sur une colonne de chromatographie GRACE Alltech C18 (150 x 2,1 mm – 5  $\mu\text{m}$ ) apolaire. Le débit a été fixé à 0,2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  et les phases mobiles consistaient en une phase A (eau ultra pure avec de l'acide formique à 0,1 %) et une phase B (acétonitrile avec de l'acide formique à 0,1 %). Le gradient d'élution des phases est donné Tableau 10.

Tableau 10 : Gradient d'élution des phases A et B utilisées pour la méthode LCMS

Temps (min)	Quantité de phase A (%)	Quantité de phase B (%)
0,0	95	5
60,0	53	47
60,1	1	99
65,0	1	99
65,11	95	5
71,0	95	5

L'analyse de masse a été réalisée en mode ion positif ESI (ESI +). Les conditions spectrométriques de masse étaient les suivantes pour le mode ESI + : la tension de pulvérisation était fixée à 5 kV ; les gaz de source ont été fixés respectivement (en unités arbitraires  $\text{min}^{-1}$ ) pour le gaz de gaine, le gaz auxiliaire et le gaz de balayage à 40, 10 et 10 ; la température capillaire a été fixée à 300 °C ; la tension capillaire à 48 V ; lentille de tube, lentille fendue et tensions de lentille frontale respectivement à 80 V, -44 V et -3.25 V. Les paramètres de l'optique ionique ont été optimisés en mode ESI + par réglage automatique à l'aide d'une solution étalon de rutine à 0,1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  perfusé en phase mobile (A/B : 50/50) à un débit de 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Des spectres MS à balayage complet ont été effectués à haute résolution ( $R = 30\ 000$ )

sur l'analyseur Orbitrap de 120 à 1000 m/z pour obtenir des masses exactes. Les scans MS2 ont été automatiquement effectués sur l'analyseur LTQ (quadripôle de piège linéaire) pour l'investigation structurale (100 à 200 m/z). Les données brutes ont été traitées à l'aide du logiciel XCALIBUR (version 2,1, ThermoScientific).

### 1.5.2. Purification des produits d'oxydation obtenus

La séparation et la purification des produits d'oxydation (POX) ont été effectuées avec une chromatographie liquide semi-preparative à haute performance (Gilson). Les résultats ont été traités grâce au logiciel Trilution @ LC. La séparation des POX a été réalisée à l'aide d'une colonne en phase inversée GRACE Apollo C18 (250 x 22 mm, taille des particules 5 µm) apolaire. La détection a été réalisée à 322 nm sur un détecteur UV/Vis 156. Le gradient d'élution était composé d'une phase A (eau ultra-pure et acide formique 100 : 0.1) et d'une phase B (acétonitrile et acide formique 100 : 0.1) à un débit de 10 mL.min<sup>-1</sup>. 1 mL d'échantillon a été injecté dans la colonne à une concentration de 4 % p/v.

Le gradient d'élution utilisé est présenté Tableau 11.

*Tableau 11 : Gradient d'élution des phases A et B au cours de la méthode de chromatographie semi-préparative pour la séparation des produits d'oxydation de l'acide férulique*

Temps (min)	Quantité de phase A (%)	Quantité de phase B (%)
0,01	90	10
2,00	90	10
80,00	40	60
85,00	1	99
90,00	90	10

Les POX séparés et purifiés ont été récupérés en sortie de colonne dans des tubes en verre. Les solvants ont été évaporés à l'évaporateur rotatif, puis ils ont été congelés et lyophilisés. Ils ont été stockés dans des dessiccateurs à 4 °C jusqu'à utilisation.

### 1.5.3. Identification de la structure des produits d'oxydation majoritaires par RMN

Les POX ont été solubilisés dans un mélange eau deutérée : méthanol deutéré 50 : 50 à une concentration de 20 mM. Les solutions ont été ensuite analysées par RMN afin de déterminer

leur structure moléculaire et la proximité des atomes entre eux. L'analyse zgpg (séquence Bruker qui permet une pré-saturation du signal de l'eau) permet d'étudier le signal des protons, caractérisé par son déplacement chimique, qui dépend de l'atome qui le porte mais également de son environnement chimique proche et moins proche. L'analyse jmod (J-modulated spin-echo) permet d'étudier le signal des carbones qui est caractéristique du nombre de protons qu'ils portent et également de leur environnement chimique proche et moins proche. Le couplage à deux dimensions ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -) permet de déterminer la position relative des protons et des atomes de carbone voisins (HSQC, Heteronuclear Single Quantum Correlation) et plus éloignés (HMBC, Heteronuclear Multiple Bond Correlation). Le couplage COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , Correlation Spectroscopy) permet de déterminer les corrélations entre protons voisins.

Les spectres RMN- $^{13}\text{C}$  et RMN- $^1\text{H}$  ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Bruker AVANCE 400 III (champ magnétique : 9,4 T, correspondant à une fréquence de résonance proton de 400 MHz).

## 2. Fonctionnalisation enzymatique de la gomme d'acacia

### 2.1. Greffage enzymatique des produits d'oxydation sur la gomme d'acacia

Le protocole de fonctionnalisation de la GA par le greffage de POX issus de l'oxydation de l'acide férulique par la laccase de *Myceliophthora thermophila* a été adapté à partir des méthodes développées précédemment [213,413].

1 g de GA a été dispersé dans 45 mL de tampon phosphate à 50 mM pendant 2 h à température ambiante. La dispersion obtenue est ensuite stockée à 4 °C pendant une nuit. La gomme d'acacia native (GAN) n'étant pas soluble dans ce tampon, la fonctionnalisation a donc été réalisée en milieu hétérogène. La dispersion de GAN dans le tampon a été ensuite agitée à 450 rpm pendant 1 h à 30 °C dans un bécher. 5 mL d'AF à 50 mM dans du méthanol ont été ajoutés dans le milieu réactionnel. Lorsque la température était stabilisée (environ 15 min après ajout de l'AF), la réaction a été déclenchée par l'ajout de 36  $\mu\text{L}$  d'enzyme à  $32\,038 \pm 1\,322$  LAMU.g $^{-1}$ . Le



mélange a été agité à 450 rpm à 30 °C pendant 50 min, puis la réaction a été stoppée en y ajoutant 3 volumes d'éthanol 95 % pré-refroidi à -20 °C. Le mélange a été stocké au congélateur à -20 °C pendant une nuit. La GAN n'est pas soluble dans l'éthanol/eau 3 : 1 alors que la GAF (gomme d'Acacia fonctionnalisée) y est soluble. Le mélange a été centrifugé à 12 000 g pendant 20 min à 20 °C. Le surnageant a été ensuite placé dans un évaporateur rotatif et l'éthanol est éliminé par évaporation sous une dépression de 175 mbar à 40 °C. La pression a été ensuite progressivement diminuée jusqu'à 72 mbar pour éliminer en partie l'eau.

La solution obtenue contenait de l'eau, des restes de sels de tampon, de la GAF et une partie des POX non greffés qui étaient solubles dans le mélange eau/éthanol. Cette solution a été ensuite dialysée contre de l'eau ultra pure à l'aide d'une membrane de dialyse (MWCO 10 000 Da, Membrane Filtration Products Inc.) afin d'éliminer les sels résiduels du tampon ainsi que les POX non greffés. La dialyse a été stoppée lorsque la conductivité à l'extérieur du sac de dialyse était égale à celle de l'eau ultra pure (18,2 MΩ). Le contenu du sac (eau + GAF) a été ensuite congelé avant d'être lyophilisé. La poudre obtenue a été stockée dans un dessiccateur à 4 °C jusqu'à utilisation.

## 2.2. Dosage de l'acide férulique par HPLC

La consommation de l'AF au cours de la réaction enzymatique a été déterminée pendant la réaction de fonctionnalisation de la GA. 100 µL du milieu réactionnel ont été prélevés puis placés dans des microtubes à centrifuger de 2 mL contenant 900 µL de méthanol pur afin de stopper la réaction. Les prélèvements ont été réalisés toutes les 2 min pendant 30 min, puis toutes les 5 min pendant 20 min. Les échantillons ont été ensuite congelés à -20 °C pendant 48 h avant d'être analysés par HPLC. La méthode utilisée était la même que pour le dosage de l'acide férulique durant l'oxydation de l'acide férulique seul (dosage de l'acide férulique par HPLC, partie 1.4).

### 2.3. Mesure de la couleur de la gomme d'Acacia fonctionnalisée

La modification de la couleur de la poudre après fonctionnalisation a été mesurée avec un spectrocromimètre Chromamètre CR-400 / CR-410 (Konica Minolta Sensing Europe B.V.). Avant chaque série d'analyse, l'appareil a été étalonné grâce à deux standards (blanc et noir). Les paramètres de couleurs du référentiel CIE [429] ( $L^*$ ,  $a^*$  et  $b^*$ ) ont été mesurés en plaçant 2 g de poudre dans la cuve en verre de l'appareil. La cellule a été flashée et les paramètres  $L^*$ ,  $a^*$  et  $b^*$  ont été obtenus. La différence de couleur entre les échantillons a été obtenue grâce à l'Équation 12.

### 2.4. Caractérisation structurale de la gomme d'Acacia fonctionnalisée

#### 2.4.1. Spectre d'absorbance de la gomme d'Acacia fonctionnalisée

Des solutions de GAN, de GAF et de POX ont été respectivement préparées à 1, 0,01 et 0,01 % m/m dans de l'eau ultra pure. Ces solutions ont été agitées à 450 rpm pendant une nuit pour assurer leur totale solubilisation. L'échantillon a été placé dans une cuve en quartz. Un balayage de spectre d'absorbance entre 190 et 900 nm (résolution 2 nm) a été effectué en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu UV-1605) sur un blanc (eau ultra pure) qui a été directement soustrait de l'échantillon.

#### 2.4.2. Détermination des modifications structurales de la gomme d'Acacia fonctionnalisée par FTIR

La GAN, la GAF et les POX ont été analysés par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FT-IR) avec un spectromètre TENSOR 27 (Brucker, Allemagne) équipé d'un détecteur pyroélectrique DTGS. Cette technique permet de mesurer à un nombre d'onde donné la quantité de lumière infra-rouge qu'un échantillon absorbe. L'échantillon a été placé sur une cellule ATR (Attenuated Total Reflectance, ATR Platinum Brucker) munie d'un cristal en diamant mono-réflexion (45°). L'échantillon était comprimé par un poinçon sur le cristal. 64 scans ont été réalisés à une résolution de 6  $\text{cm}^{-1}$  et à une fréquence d'acquisition de 10 kHz à température

ambiante dans une gamme spectrale allant de 400 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

Une transformée de Fourier est appliquée aux interférogrammes afin d'obtenir des spectres en utilisant le logiciel OPUS (Brucker).

Avant chaque mesure, un spectre de l'air a été enregistré dans les mêmes conditions que celles de l'échantillon. Ce spectre référence a été automatiquement soustrait au spectre de l'échantillon.

Les spectres bruts ont subi ensuite plusieurs traitements : une compensation des pics  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{CO}_2$  et une génération de ligne droite entre 2280 et 2400  $\text{cm}^{-1}$  permettant de masquer le pic d'absorbance causé par le diamant. Le spectre ATR a été ensuite converti en spectre d'absorbance avant d'être normalisé avec une méthode vectorielle. Enfin, une correction de ligne de base a été appliquée. Pour chaque échantillon 6 spectres indépendants ont été enregistrés. Les spectres obtenus ont été moyennés et la déviation standard autour de la moyenne a permis de s'assurer de la répétabilité et de la reproductibilité des mesures.

#### 2.4.3. Détermination des modifications structurales de la gomme d'Acacia fonctionnalisée par RMN

GAN et GAF ont été caractérisées par RMN selon la méthode décrite précédemment pour les POX. La seule différence réside dans le solvant utilisé qui dans ce cas est de l'eau deutérée uniquement. Des échantillons de GAN et de GAF à des concentrations respectives de 5,0 et 4,5 % p/v ont ainsi été analysés.

#### 2.4.4. Modification de la masse moléculaire de la gomme d'Acacia (SECMALS)

La chromatographie d'exclusion de taille (SECMALS, Size exclusion chromatography with multi-angle laser light scattering detectors) permet la détermination de la masse moléculaire et l'étude de la distribution de masse molaire des polysaccharides. Cette méthode a été utilisée pour évaluer les masses molaires moyennes (MW) du chitosane et de la gomme d'Acacia native et fonctionnalisée. Un réfractomètre, un détecteur de diffusion statique de la lumière ainsi qu'un

micro-viscosimètre ont été utilisés. La masse molaire moyenne a été déterminée grâce à l'utilisation de standard PEO (PEO 24K et Dextran-T70K). Pour chaque échantillon, une solution a été réalisée en solubilisant les polysaccharides à tester à 2 % p/v dans un tampon acétate (0,3 M d'acide acétique ; 0,3 M d'acétate de sodium ; pH=4,5). Ce tampon a été filtré sur membrane de porosité 0,45 µm (Durapore® 47 mm diam. Millipore) à 20 °C. Le tampon acétate sert également de phase mobile pour la chromatographie. Les analyses ont été menées à 30 °C à un débit de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> avec un volume d'injection de 5 µL et en utilisant un viscosimètre de type Viscotek A4000M (colonne de 7,8 mm de diamètre interne et 30 cm de long).

#### 2.4.5. Détermination de la distribution de taille de la gomme d'Acacia native et fonctionnalisée dans l'eau par diffusion dynamique de la lumière

Les distributions de taille des solutions de GAN et GAF ont été déterminées avec un système NanoSight LM10-T14 (Malvern Panalytical, Angleterre) équipé d'un laser à 532 nm (50 mW) et d'une caméra sCMOS. Ce dispositif permet de déterminer les distributions de tailles de dispersion de particules colloïdales polydisperses comprises entre 10 et 2000 nm [430]. Les mesures ont été réalisées à 25 °C par acquisition de 25 images par secondes pendant 30 secondes. Les échantillons ont été préparés à 1 % p/v dans de l'eau ultra pure puis dilués 1000 fois. Le coefficient de diffusion a été mesuré, puis le diamètre hydrodynamique des particules a été déterminé en utilisant l'Équation 13 avec le logiciel NTA 3.3.

*Équation 13 : Calcul du diamètre hydrodynamique de la molécule*

$$v_d = \frac{kT}{6\pi \cdot \eta \cdot l_{rh}}$$

où  $\eta$  est la viscosité dynamique du solvant, et  $l_{rh}$  le rayon hydrodynamique de la molécule supposée sphérique,  $k$  constante de Boltzmann ( $1,3806503 \cdot 10^{-23}$  J.K<sup>-1</sup>) et  $T$  la température absolue en Kelvin.

#### 2.4.6. Mesure du potentiel Zêta de la gomme d'Acacia fonctionnalisée

Les mesures de potentiel Zêta de la GAN ont été réalisées selon la méthode décrite précédemment.

Les solutions de GAN, de GAF et de POX ont été préparées à 1 % p/v dans de l'eau ultra pure. Elles sont placées dans des cellules capillaires jetables (DTS1070) et laissées 5 min dans l'appareil à température contrôlée. Leur potentiel Zêta approximatif a été calculé à partir de la mobilité électrophorétique en utilisant le modèle de Smoluchowski [427] selon l'Équation 5. Chaque mesure a été réalisée en triplicat.

#### 2.5. Propriétés physico-chimiques de la gomme d'Acacia fonctionnalisée

##### 2.5.1. Stabilité thermique

L'analyse thermogravimétrique, ATG (thermogravimetric analysis, TGA) est une technique d'analyse thermique qui permet d'étudier la décomposition d'un échantillon en mesurant sa perte de masse en fonction de l'augmentation de la température. Les échantillons de GAN et de GAF sous forme de poudre (entre 1 et 5 mg) ont été placés dans l'appareil puis ont été chauffés sous azote. La rampe de température était de 30 à 600 °C à une vitesse de 20 °C/min. Cette approche permet d'estimer la quantité d'eau et de matière organique présentes dans l'échantillon (perte de masse avant 120 °C : déshydratation ; perte entre 120 et 250 °C : décomposition brutale de certains composés organiques ; perte > 250 °C : élimination de tous les composés). Les thermogrammes ont ensuite été traités grâce au logiciel TRIOS (TA Instruments).

##### 2.5.2. Comportement thermique

Le comportement thermique des gommes d'Acacia native et modifiée a été analysé par calorimétrie différentielle à balayage (Modulated Dynamic Scanning Calorimetry, MDSC). Cette technique est basée sur la mesure de la différence de température entre une référence et un échantillon pendant le chauffage, le refroidissement ou l'isotherme.

La capsule de référence est en aluminium. Les analyses sont effectuées sous azote pour empêcher toute réaction de la substance à étudier avec l'atmosphère du four. Sur la base de la différence dans les énergies entre référence et échantillon, la DSC fournit l'enthalpie de l'événement thermique. Une valeur positive de l'enthalpie indique un événement exothermique (cristallisation), une valeur négative indique que la réaction est endothermique (fusion, transition vitreuse). La courbe d'analyse thermique obtenue par DSC permet de déterminer les phénomènes de transition vitreuse, de fusion, de cristallisation, et de dégradation [41,431].

Entre 2,5 et 5,0 mg de poudre ont été pesés et placés dans des capsules en aluminium hermétiquement scellées. La capsule de référence ne contenait que de l'air. Le protocole réalisé était une chauffe avec modulation de température. Un premier équilibrage a été réalisé à -50 °C suivi d'un isotherme pendant 5 min. Une rampe de température jusque 100 °C à une vitesse de 5 °C/min a été réalisée avec une modulation d'1 °C d'amplitude sur une période de 60 secondes. De plus, pour éviter d'atteindre les températures de dégradation, ces dernières ont été préalablement déterminées à partir des thermogrammes obtenus par TGA. Les thermogrammes obtenus en DSC ont été traités et étudiés grâce au logiciel TRIOS (TA Instruments) afin d'obtenir les températures de transition vitreuse des polymères.

#### 2.5.3. Etude de la solubilité de la gomme après fonctionnalisation

La GAN est très soluble dans l'eau (jusqu'à 50 g/L [432]). La solubilité de la GAF a été mesurée. Différentes concentrations de GAF (entre 1 et 20 % p/v) et de GAN (entre 15 et 60 % p/v) ont été préparées en ajoutant la poudre à 1 mL d'eau ultra pure. Les échantillons ont été agités à 450 rpm pendant 2 h à température ambiante, puis une nuit à 4 °C. Ils ont ensuite été centrifugés 25 min à 15 000 g. Le culot et le surnageant ont été récupérés et lyophilisés, puis pesés. La quantité solubilisée a été déterminée en pesant la quantité de GA présente dans le surnageant. La limite de solubilité est déterminée comme étant la concentration pour laquelle moins de 90 % de la GAN et la GAF étaient solubilisées.

#### 2.5.4. Détermination de la tension superficielle de solutions aqueuses de gomme d'acacia et de gomme d'acacia modifiée

La tension superficielle  $\gamma$  se mesure en  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  à l'aide d'un tensiomètre à une interface liquide/gaz. Elle correspond à la quantité de travail nécessaire pour augmenter la surface d'une interface. La tension superficielle de l'eau ultra pure à 25 °C est ainsi égale à  $72,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  alors que celle d'une huile végétale est plus proche des  $35\text{-}40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . Les résultats de tensions superficielles obtenus peuvent être reliés à la capacité d'une molécule à faciliter la formation d'émulsions à une interface eau/huile.

Les valeurs de tensions superficielles des solutions de GAN ont été comparées à celles de solutions de GAF dans le but de mettre en évidence l'influence de la fonctionnalisation sur les capacités d'abaissement de la tension superficielle de l'eau des gommages étudiées.

Les mesures de tension superficielle ont été réalisées à l'aide d'un tensiomètre Kruss K100 par la méthode d'arrachement de Wilhelmy utilisant une lame de platine. Cette lame a été immergée partiellement dans le liquide à étudier. La tension superficielle a été déterminée en mesurant la force exercée par le liquide sur la lame lors de retrait de cette dernière. Les mesures ont été réalisées à 25 °C jusqu'à atteindre l'équilibre (variation nulle ou négligeable de la tension superficielle en fonction du temps pouvant nécessiter des mesures durant 14 000 s). Avant chaque expérience, la propreté de la verrerie utilisée pour préparer les solutions, de la cuvette de mesure et de la lame de platine a été vérifiée en effectuant une mesure sur de l'eau ultra pure.

#### 2.5.5. Mesure du pouvoir antioxydant des gommages d'Acacia native et fonctionnalisée par la méthode ABTS

Le pouvoir antioxydant des solutions de GAN, de GAF et de POX a été déterminé par la méthode de désactivation du radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Une solution d'ABTS (7 mM) et une solution de persulfate de potassium (2,45 mM) ont été préparées dans de l'eau ultra pure. Les deux solutions ont été mélangées en proportion 50 : 50 v/v, agitées et maintenues à l'obscurité pendant 24 h à

température ambiante. La solution obtenue d'ABTS<sup>•+</sup> avait une coloration bleue intense. Elle a été diluée afin d'obtenir une absorbance à 734 nm de l'ordre de  $0,693 \pm 0,005$ . Au contact d'un composé donneur d'hydrogène, les radicaux disparaissent au profit des ions ABTS<sup>+</sup> et la solution se décolore [433]. La décoloration a été suivie à 734 nm avec un spectrophotomètre Shimadzu UV-1605. Les poudres de GAN, de GAF et de POX ont été solubilisées dans de l'eau ultra pure à différentes concentrations (entre 0,1 et 1,0 g/L pour la GAF et les POX, et entre 25 et 200 g.L<sup>-1</sup> pour la GAN). Dans une cuve en quartz, 10 µL de ces solutions ont été mélangés à 1 mL de solution d'ABTS<sup>•+</sup>. Les échantillons ont été incubés 15 min à 30 °C puis l'absorbance a été mesurée à 734 nm. Le blanc a été réalisé sur de l'eau ultra pure. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition des radicaux d'ABTS<sup>•+</sup> selon l'Équation 14.

*Équation 14 : Calcul du pourcentage d'inhibition des radicaux d'ABTS<sup>•+</sup>*

$$\% \text{ d'inhibition ABTS}^{\bullet+} = 1 - \left( \frac{\text{Abs finale}}{\text{Abs initiale}} \right) \times 100$$

Avec Abs initiale l'absorbance de la solution d'ABTS<sup>•+</sup> et Abs finale l'absorbance de la solution testée.

L'activité antiradicalaire est un bon indicateur de l'activité antioxydante. Elle est exprimée en valeur EC<sub>50</sub> qui représente la concentration du produit testé nécessaire pour réduire les radicaux d'ABTS<sup>•+</sup> de 50 %.

#### 2.5.6. Modification de la viscosité de la gomme fonctionnalisée

La viscosité et le comportement d'écoulement des solutions de GAN et de GAF ont été caractérisés en utilisant un rhéomètre rotatif Kinexus (Malvern Panalytical, Angleterre) avec une géométrie cône/plan (diamètre 50 mm, angle 2°). GAN et GAF ont été solubilisées dans de l'eau ultra pure à 1,00 % (p/v) sous agitation à 250 rpm pendant une nuit à 4 °C. La variation de la viscosité des solutions a été mesurée à 25 °C. Les échantillons ont été soumis à une rampe de cisaillement allant de 0,001 à 100,000 s<sup>-1</sup>.



---

# Résultats et discussions

---

I. Publication 1 : Auto-assemblage de la gomme d'Acacia et du chitosane : approche thermodynamique et mécanismes .....	103
1. Introduction .....	103
2. Article: Gum Arabic and chitosan self-assembly: thermodynamic and mechanism aspects .....	105
3. Contribution de l'article .....	142
II. Publication 2 : Fonctionnalisation de la gomme d'Acacia par voie enzymatique : greffage des produits d'oxydation de l'acide férulique et identification de certains de ces produits .....	144
1. Introduction .....	144
2. Article: Gum Arabic functionalization through an enzymatic process: reaction route and intermediate products characterization .....	146
3. Contribution de l'article .....	179
III. Publication 3 : Caractérisation physico-chimique de la gomme d'acacia fonctionnalisée par greffage des produits d'oxydation de l'acide férulique.....	182
1. Introduction .....	182
2. Article: Physicochemical characterization of gum Arabic grafted with oxidation products of ferulic acid.....	183
3. Contribution de l'article .....	214
IV. Publication 4 : Modification de polysaccharides par voie enzymatique pour contrôler le type d'assemblage : une approche thermodynamique.....	217
1. Introduction .....	217
2. Article: Polysaccharides enzymatic modification to control of the coacervation or aggregation formation: a thermodynamic approach.....	219
3. Contribution de l'article .....	251



## **Résultats et discussions**

### **I. Publication 1 : Auto-assemblage de la gomme d'Acacia et du chitosane : approche thermodynamique et mécanismes**

#### **1. Introduction**

Il est généralement admis que les mécanismes de la coacervation complexe reposent sur l'établissement spontané d'interactions électrostatiques entre des polymères de charge opposée [1,81]. La formation et la stabilité de ces interactions sont directement dépendantes des conditions physicochimiques du milieu, particulièrement de la force ionique, du pH, de la température et du ratio entre polymères. Le système gomme d'Acacia (GA) / chitosane (CN) ne fait pas exception. De nombreux travaux se sont focalisés sur l'étude de la séparation de phases associatives liquide-liquide entre ces deux polysaccharides en solution. Les auteurs avaient pour but de déterminer l'influence des paramètres environnementaux sur le rendement de coacervation entre les deux polymères. Malgré cela, de nombreuses zones d'ombre subsistent pour parfaire la compréhension du mécanisme de la coacervation complexe entre la gomme d'Acacia et le chitosane. En effet, un des inconvénients des polysaccharides naturels est leur grande hétérogénéité en masse moléculaire (distribution large pour le chitosane) ou en structure (3 fractions dans la gomme d'Acacia). L'influence des proportions relatives en polymère est majoritairement rapportée dans la littérature en fonction du ratio massique et non en fonction du ratio molaire comme à l'accoutumée dans l'étude de la coacervation complexe avec des modèles d'étude moins complexes, contribuant ainsi à une analyse plus fine des phénomènes mis en jeux.

D'après la bibliographie, diverses techniques sont à disposition pour étudier la coacervation

complexe. La mobilité électrophorétique est couramment utilisée dans l'étude de la coacervation complexe afin de déterminer le ratio permettant d'obtenir des objets non chargés. La turbidimétrie permet quant à elle d'observer la formation des premiers objets et donc de déterminer le début de la séparation de phases. Ces approches sont souvent couplées avec un outil très simple d'utilisation, l'observation par microscopie optique des coacervats formés. Malheureusement, ces techniques ne permettent pas de « décortiquer » finement le phénomène de séparation de phases associatives. Pour répondre à cette problématique, de plus en plus de travaux se sont orientés sur l'utilisation de la calorimétrie, et notamment la titration calorimétrique isotherme (ITC). Cette technique, permet de mesurer en une seule titration, l'enthalpie, la constante d'association et la stœchiométrie de l'auto-assemblage puis de déterminer l'entropie et la variation d'énergie de Gibbs. La connaissance de ces paramètres thermodynamiques est la clé de voûte pour comprendre et contrôler les auto-assemblages spontanés.

A notre connaissance, la coacervation complexe entre la gomme d'Acacia et le chitosane n'a jamais été étudiée par ITC avec une approche en ratio molaire. De plus, il n'existait pas de donnée permettant de mesurer l'impact de la variation du pH et/ou de la température sur les paramètres thermodynamiques de l'interaction entre la gomme d'Acacia et le chitosane. Est-il possible d'établir une corrélation entre les paramètres thermodynamiques mesurés par ITC en fonction du pH et ou de la température avec les résultats obtenus avec des méthodes plus ubiquistes telles que la turbidimétrie, la mobilité électrophorétique et l'observation microscopique ? **Quelle est l'influence du pH et de la température sur l'auto-assemblage des polymères natifs et sur les aspects thermodynamiques des assemblages ?** Enfin, ce faisceau de données permettra-t-il de mieux entrevoir le mécanisme de la coacervation complexe entre la gomme d'Acacia et le chitosane ?

## 2. Article: Gum Arabic and chitosan self-assembly: thermodynamic and mechanism aspects

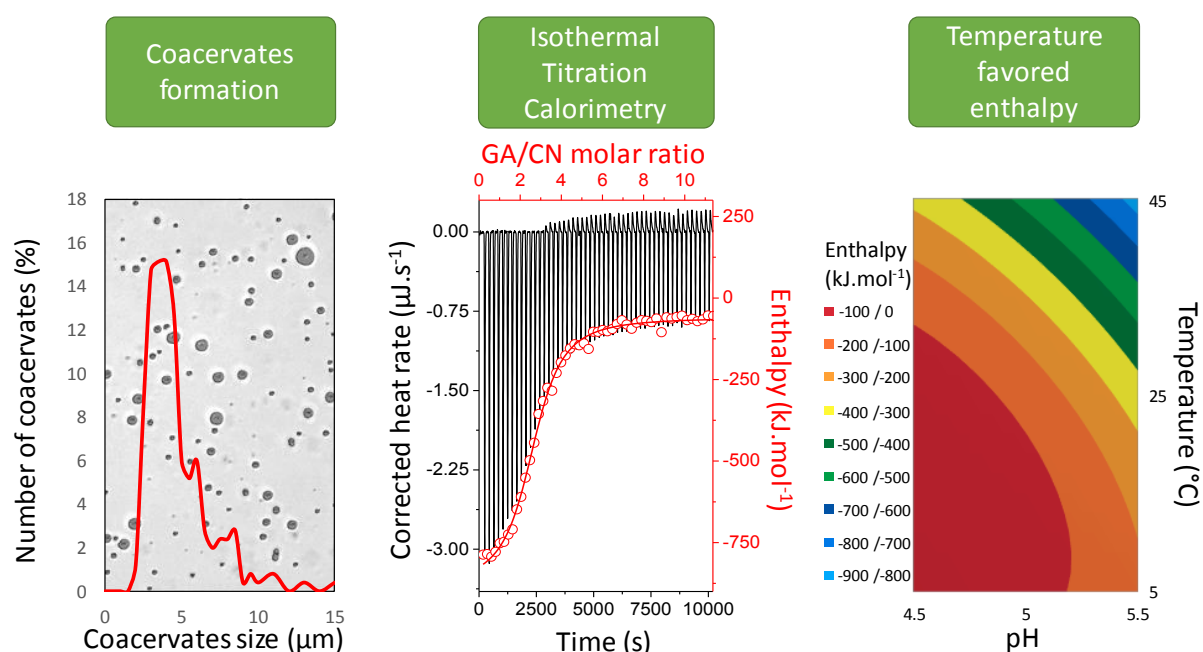
Article accepté dans Food Hydrocolloids : Food Hydro. 96, 463-474 (2019),

Marie E. Vuillemin, Florentin Michaux, Lionel Muniglia, Michel Linder and Jordane Jasniewski \*

\*Corresponding author: jordane.jasniewski@univ-lorraine.fr

Université de Lorraine, LIBio, F-54000 Nancy, France

### Gum Arabic/Chitosan complex coacervation



### Highlights

- pH and temperature affected thermodynamics of gum Arabic-chitosan interactions
- At all pH (4.5-5.5)-T (5-45  $^{\circ}\text{C}$ ) combinations, self-assembly was enthalpy driven
- Contrarily to reports in literature, enthalpy increased with temperature
- Formation of biopolymer complexes can be controlled by pH-temperature conditions

## **Abstract**

The interactions between gum Arabic (GA) and chitosan (CN) in solution have been investigated upon pH (4.5, 5.0 and 5.5) and temperature (5, 25 and 45 °C). Isothermal titration calorimetry (ITC) has been used to determine the thermodynamic parameters involved in the complex coacervation process between these two polymers. Zeta potential, turbidity measurements and optical microscopy were used as complementary methods to have a better understanding of the phenomenon at the origin of the self-assembly. Unlike data already published by authors, concerning the GA-CN coacervation model, a raise in temperature seemed to favor electrostatic interactions. The enthalpy became more favorable upon temperature, a phenomenon probably related to the availability of CN charges. A raise in temperature would lead to a compaction of CN, decreasing its steric hindrance during self-assembly. According to all experiments conducted in this study, the GA/CN interaction optimal molar ratio would be 4:1. However, this optimal ratio changed upon pH-temperature combinations. The results presented in this study should lead to a better understanding of the interactions between charged polymers and in the end, help in their application in the food, pharmaceutical and cosmetic industries.

**Keywords:** Complex coacervation; interactions; Isothermal titration calorimetry; gum Arabic; chitosan; self-assembly

## **1. Introduction**

Complex coacervation is a phenomenon in which polyelectrolytes interact to form a liquid phase rich in polymer called coacervate and an equilibrium phase poor in polymer called the diluted phase (Kizilay, Kayitmazer, & Dubin, 2011). It is used in the industry to encapsulate several molecules of interest such as vitamins, plants oils and flavors (Bhatia, Khattak, & Roberts, 2005; Lankalapalli & Kolapalli, 2009). This bottom-up approach is a construction of complexes by self-assembly of molecules due to interactions between two polymers, which depend on changes in environmental conditions, such as pH, ionic strength, temperature, or concentration (Joye & McClements, 2014; Kim, Yang, Park, Lim, & Cha, 2017; Schmitt & Turgeon, 2011). This eco-friendly approach does not need an external energy contribution and is performed under soft conditions (in aqueous medium). Several polyelectrolytes are suitable for this approach such as proteins and polysaccharides. Polysaccharides are good candidates for complex coacervation because they can be charged in solution, they are not expensive, readily available, bio-compatible and have low toxicity (Anwunobi & Emeje, 2011). Complex coacervation of polyelectrolytes has been studied by several authors (Kayitmazer, 2017; Priftis, Laugel, & Tirrell, 2012; Veis, 2011) who agreed that different parameters drive the formation of complexes. Early studies (Overbeek & Voorn, 1957) suggested that coacervation results from electrostatic attractions. Most of the time, the two polyelectrolytes attract each other because they are oppositely charged, forming complexes prior to coacervation (Veis & Aranyi, 1960). When the two oppositely-charged polymers form a complex driven by electrostatic interaction, counterions and water molecules are released in the bulk, contributing to an entropy gain of the system.

In this study, complex coacervation between chitosan (CN) and gum Arabic (GA), two polysaccharides of opposite charges, has been studied through thermodynamic and mechanistic aspects. CN is a  $\beta$  (1-4)-linked glucosamine which is found in the cellular wall of zygomycetes,

bacteria and yeast. The main source of CN comes from the deacetylation under alkaline conditions of the chitin of crustaceans shells. This biopolymer is film-forming, biodegradable and biocompatible. It exhibits antimicrobial and antioxidant activities (Fathi, Martín, & McClements, 2014; Soni, Mahmoud, Chang, El-Giar, & Hassan, 2018; Sonia & Sharma, 2012). Furthermore, CN is well-known for presenting a large density of positive charges (Fathi et al., 2014). In order to have a coacervation phenomenon with CN, GA was chosen as polyanion. This polymer comes from an exudate from the stems and branches of acacia trees, which grow across the Sahelian belt of Africa (*Acacia senegal* and *Acacia seyal*) (Lopez-Torrez, Costalat, Williams, Doco, & Sanchez, 2015). It is an effective encapsulation agent due to its high water solubility, the low viscosity of concentrated solutions and its ability to act as an oil-in-water emulsifier. Furthermore, GA is often used as polyanion in several studies on complex coacervation (Aberkane, Jasniewski, Gaiani, Scher, & Sanchez, 2010; Butstraen & Salaün, 2014; Eratte, Wang, Dowling, Barrow, & Adhikari, 2014; Shaddel et al., 2018). GA is essentially made of polysaccharides and salts. It contains three different fractions: 85-90 wt. % of arabinogalactan, 10 wt. % of arabinogalactan-protein complex and 2 wt. % of one or two glycoproteins (Lopez-Torrez et al., 2015). The fractions containing proteins, responsible for the surfactant activity of the GA, are found in higher amount in *Acacia senegal* exudate than in the one of *Acacia seyal* (1.8% w/w vs. 0.9% w/w, respectively) (Lopez-Torrez et al., 2015). In this study, the dialyzed total gum was used. Ionized CN (pKa from 6.3 to 7.0 (Beppu & Santana, 2002)) has an extended conformation in acetic acid solution, so its charges are accessible (Espinosa-Andrews, Báez-González, Cruz-Sosa, & Vernon-Carter, 2007; Schatz et al., 2004). Ionized GA (pKa close to 3.6 (Aberkane et al., 2010)) has a globular structure (Moschakis, Murray, & Biliaderis, 2010; Renard, Garnier, Lapp, Schmitt, & Sanchez, 2012) in aqueous solution. The influence of pH, ionic strength, temperature, or polyelectrolytes concentration on GA and CN coacervation has already been studied by several authors (Avadi et al., 2010a,



2010b; Butstraen & Salaün, 2014; Espinosa-Andrews et al., 2007; Espinosa-Andrews, Sandoval-Castilla, Vázquez-Torres, Vernon-Carter, & Lobato-Calleros, 2010; Maqbool, Ali, & Alderson, 2010; Roldan-Cruz, Carmona-Ascencio, Vernon-Carter, & Alvarez-Ramirez, 2016; Sakloetsakun, Preechagoon, Bernkop-Schnürch, & Pongjanyakul, 2015; Tan, Xie, Zhang, Cai, & Xia, 2016). However, the comprehension of the coacervates formation mechanism is still an issue to be tackled. This study aimed to better understand this mechanism by determining the corresponding thermodynamic parameters (stoichiometry, entropy and enthalpy) using Isothermal Titration Calorimetry to understand what drove the complex coacervation between these two polymers. Another aim of this work was to understand the part played by the different parameters to shed some light on the mechanism of this phenomenon.

## **2. Materials and Methods:**

### **2.1. Materials**

Chitosan (CN) MMW (medium molecular weight, Mw 310 kDa, deacetylation degree of 75%) was purchased from Sigma-Aldrich (France). Gum Arabic (GA) Instantgum AA from *Acacia senegal* (Mw 400 kDa (Renard, Lavenant-Gourgeon, Ralet, & Sanchez, 2006)) was a gift from Nexira (France). Acetic acid, NaOH and ultrapure water were of analytical grade.

### **2.2. Methods**

#### **2.2.1. Polymers purification**

CN and GA were dialyzed against acetic acid (1% v/v) and water, respectively, with a high grade regenerated membrane (MWCO 10 000 Da from Membrane Filtration Products Inc.) to eliminate excess salts. Dialysis was stopped when the conductivity outside the membrane was equal to the one of acetic acid (1% v/v) or ultrapure water, respectively. Samples were centrifuged then for 30 min at 12 000 g to remove insoluble material and air bubbles and then freeze-dried and stored at 4 °C. The molecular weights of both polysaccharides were verified

by SEC-MALS measurement post-dialysis and were very close to the ones provided by the suppliers (Mw 390 kDa for CN and Mw 412 kDa for GA).

### **2.2.2. Polymers stock solutions preparation**

CN 0.02% w/v ( $6.45 \times 10^{-4}$  mM) and GA 1.00% w/v ( $2.50 \times 10^{-2}$  mM) stock solutions were prepared by dissolving purified CN or GA in acetic acid (1% v/v in ultrapure water). The solutions were stirred on a magnetic plate at 400 rpm overnight at 4 °C to make sure the polymers were completely dissolved. Though GA is soluble in water, the mixtures were made by adding GA solubilized in acetic acid, so the dilution of acetic acid in water signal would not interfere with the polymers interaction signal, during ITC measurements when GA solution was added to CN solution. The CN solution was prepared at 0.02% w/v ( $6.45 \times 10^{-4}$  mM), concentration for which its viscosity was low enough.

### **2.2.3. Polymers mixtures preparation**

Polymers mixtures were prepared at different temperatures (5, 25 and 45 °C), at different pH (4.5, 5.0 and 5.5 by adding either acetic acid (1 N) or NaOH (5 N) as required), and different polymers molar ratio. After pH adjustment, the required amount of polymer solutions recovered from stocks solutions were placed 15 min in a thermostatic degassing chamber to reach the targeted temperature and remove bubbles. GA solutions were then added to CN solutions and then analyzed after 5 min to compare samples in identical conditions.

### **2.2.4. Isothermal titration calorimetry (ITC)**

ITC measurements were carried out with an Affinity ITC equipped with a standard volume (965  $\mu$ L) gold cell (TA instruments, Waters SAS, France) to measure the dissociation constant ( $K_d$ ) and the enthalpic variation due to interaction between CN and GA. The entropy and the Gibbs free energy were obtained from the following equations:

$$\Delta G = - R.T.\ln(1/K_d) \quad (\text{Eq. 1})$$

$$T\Delta S = \Delta H - \Delta G \quad (\text{Eq. 2})$$

With  $\Delta G$ : Gibbs free energy variation ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),  $\Delta H$ : enthalpy variation ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),  $\Delta S$ : entropy variation ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ),  $T$ : temperature (K) and  $R$  is the specific gas constant ( $8.3144598 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ).

Ultrapure water was used in the reference cell. All solutions were degassed under vacuum for 15 min using the associated degassing station (TA instruments, Waters SAS, France) at the temperature of titration (5, 25 or 45 °C). The injector microsyringe (320  $\mu\text{L}$ ), was loaded with stock solution of GA (1.00% w/v GA ( $2.50\times 10^{-2}$  mM) in 1.00% v/v acid acetic solution). 5  $\mu\text{L}$  were sequentially injected 50 times each 300 s to the titration cell (volume = 965  $\mu\text{L}$ ) filled with CN solution (0.02% w/v CN ( $6.45\times 10^{-4}$  mM) in 1.00% v/v acid acetic solution). The polymers concentrations were chosen based on preliminary measurements to optimize concentrations in order to have complete titrations without signal saturation. For each measurement, the pH, the temperature and the acetic acid solvent were the same in the cell and in the syringe to limit the dilution effect. The heat of dilution from the blank titration was subtracted from the raw data in all experiments. Data acquisition was performed using the ITC Run software and data were analyzed with the NanoAnalyse software (TA instruments, Waters SAS, France). The “Independent” model was chosen as the best model from the plot residual values to fit the obtained isotherms. All measurements were made in triplicate.

### 2.2.5. Approximate Zeta potential

The approximate Zeta potential of the polymers alone (0.02 w/v for CN ( $6.45\times 10^{-4}$  mM) and 1.00% w/v for GA ( $2.50\times 10^{-2}$  mM)) and of the mixtures were calculated from measurement of the electrophoretic mobility at controlled temperatures (5, 25 and 45 °C) using a Zetasizer Nano-ZS instrument (Malvern Panalytical, United Kingdom) equipped with a He/Ne ion laser ( $\lambda = 532 \text{ nm}$ ). Measurements were collected on a detector at 173°. An automatic titrator (Malvern Multipurpose Titrator MPT2) was also used for the automation of Zeta potential measurements upon the GA/CN molar ratio (0.02 w/v for CN ( $6.45\times 10^{-4}$  mM) and 1.00% w/v

for GA ( $2.50 \times 10^{-2}$  mM)). 25 injections of 124  $\mu$ L of GA solution were made in 12 mL of CN solution. Investigated solution was filled into a Zeta potential folded capillary cell (DTS1070, Malvern Panalytical). The instrument determined the Zeta potential with the Smoluchowski equation (Jayme, Dunstan, & Gee, 1999). All measurements were made in triplicate.

#### **2.2.6. Turbidity measurements**

Turbidities of the GA/CN mixtures were measured with a UV-visible spectrophotometer (Shimadzu 1280, Japan) at 660 nm. The transmittance (T) of the spectrophotometer was calibrated with 0.1 N acetic acid to 100% and the turbidity of the samples was reported as 100-T%. The relative turbidity ( $\tau$ ) was calculated from the equation 3:

$$\tau = -\frac{1}{L} \cdot \ln \frac{I_t}{I_0} \quad (\text{Eq. 3})$$

Where L was the optical path length (1 cm) and  $I_t$  and  $I_0$  were the transmitted light intensity and the incident light intensity, respectively. All measurements were made in triplicate.

#### **2.2.7. Optical microscopy**

The mixtures were observed by optical microscopy (Olympus BH2, Japan) at x40 magnification. The images were recorded with a CMOS 5 MPixel camera (Olympus) under the control of TouPView software. The micrographs presented are representative of the samples. They were analyzed by using an image analysis software (ImageJ) in order to obtain the particles size and number. Polydispersity index of the sample was obtained using equation 4:

$$\text{Polydispersity index} = \left( \frac{\text{Standard deviation}}{\text{Average size}} \right)^2 \quad (\text{Eq. 4})$$

#### **2.2.8. Statistical analysis**

The values were expressed in mean  $\pm$  standard deviation. Differences between mean values were assessed using the one-way analysis of variance (ANOVA) which was performed using Excel for Statistical Analysis and XLSTAT. Differences were considered statistically significant when  $p_{\text{value}}$  was below 0.05.

### 3. Results and discussion:

#### 3.1. pH influence over the approximate Zeta potentials of GA and CN

Complex coacervation depends on a few parameters, such as: polymer ratio, total polymer concentration, polymer backbone flexibility, polymer charges, ionic strength and pH (de Kruif, Weinbreck, & de Vries, 2004; Espinosa-Andrews et al., 2007; Sanchez, Mekhloufi, & Renard, 2006; Schmitt, Sanchez, Desobry-Banon, & Hardy, 1998; Turgeon, Schmitt, & Sanchez, 2007). Since coacervation is supposed to be mostly driven by electrostatic interactions, the influence of the pH on the coacervate formation was first investigated. The chosen pH range was 4.5 to 5.5. Below pH 3.5, carboxylic groups of GA were protonated and contraction of its molecular backbone could suppress the coacervation phenomenon (Espinosa-Andrews et al., 2007). For pH values above 6.0, close to CN pKa, its degree of ionization and its solubility decreased (Espinosa-Andrews et al., 2007; Sonia & Sharma, 2012).

From **Table 1** CN and GA were charged in the chosen pH range. The pH strongly modified the CN surface charge but not the one of GA. The approximate Zeta potential of CN in acetic acid solution was thus higher at pH 4.5 ( $37.2 \pm 3.1$  mV) than at pH 5.5 ( $24.5 \pm 1.9$  mV) at 5 °C and twice higher at 5 °C ( $37.2 \pm 3.1$  mV) than at 45 °C ( $17.8 \pm 0.8$  mV) at pH 4.5. The CN Zeta potential decreased upon pH and temperature, which was consistent with the literature (Fan, Yan, Xu, & Ni, 2012; Fillion, Lavertu, & Buschmann, 2007). GA charge in acetic solution did not change upon pH. The pKa of CN was in a range from 6.3 to 7.0 (Beppu & Santana, 2002) and the pKa of GA was close to 3.6 (Aberkane et al., 2010) which could explain the changes of charges upon pH. In the studied conditions, when the pH value was distant to the pKa of CN, the positive value of Zeta potential increased, suggesting an increase of the cationic charge onto the polymer. Similar results were observed with GA in ultrapure water but not in acetic acid (data not shown).

Normally, GA was supposed to be more charged when pH increased beyond its pKa.

Nevertheless, in acetic acid solution it was not the case. This may be explained by an increase of the ionic strength when the pH increased due to the addition of NaOH to obtain the targeted pH; indeed it is known that when the ionic strength increases along with the pH, the net charge of the polymer decreases, as it has been shown on pectin, CN and alginate (Abodinar, Smith, & Morris, 2014).

**Table 1.** Approximate Zeta potential of chitosan (0.02% w/v) and gum Arabic (1.00% w/v) solutions in acetic acid 1.00% v/v upon pH and temperature and comparative Zeta potential ratios ( $|ZP_{CN}/ZP_{GA}|$ ). “a, b, c, d, e and f” mean that the statistical analysis showed no significant differences between the results

Temperature (°C)	pH	Approximate Zeta Potential (mV)					
		Chitosan 0.02% w/v in acetic acid		Gum Arabic 1.00% w/v in acetic acid		$ ZP_{CN}/ZP_{GA} $	
5	4.5	37.2	3.1 <sup>a</sup>	-9.9	0.4 <sup>f</sup>	3.1	1.5
	5	22.9	0.7 <sup>b</sup>	-9.8	1.0 <sup>f</sup>	2.3	0.2
	5.5	24.5	1.9 <sup>b</sup>	-9.4	0.2 <sup>f</sup>	1.6	1.1
25	4.5	28.0	0.9 <sup>c</sup>	-10.5	0.8 <sup>f</sup>	2.7	0.2
	5	21.6	0.8 <sup>bd</sup>	-10.2	0.2 <sup>f</sup>	2.1	0.1
	5.5	20.3	1.0 <sup>d</sup>	-9.1	0.3 <sup>f</sup>	2.2	0.1
45	4.5	17.8	0.8 <sup>e</sup>	-10.3	0.2 <sup>f</sup>	2.0	0.5
	5	23.0	0.4 <sup>b</sup>	-9.8	1.2 <sup>f</sup>	2.2	0.1
	5.5	15.6	1.5 <sup>e</sup>	-9.1	0.3 <sup>f</sup>	1.8	0.4

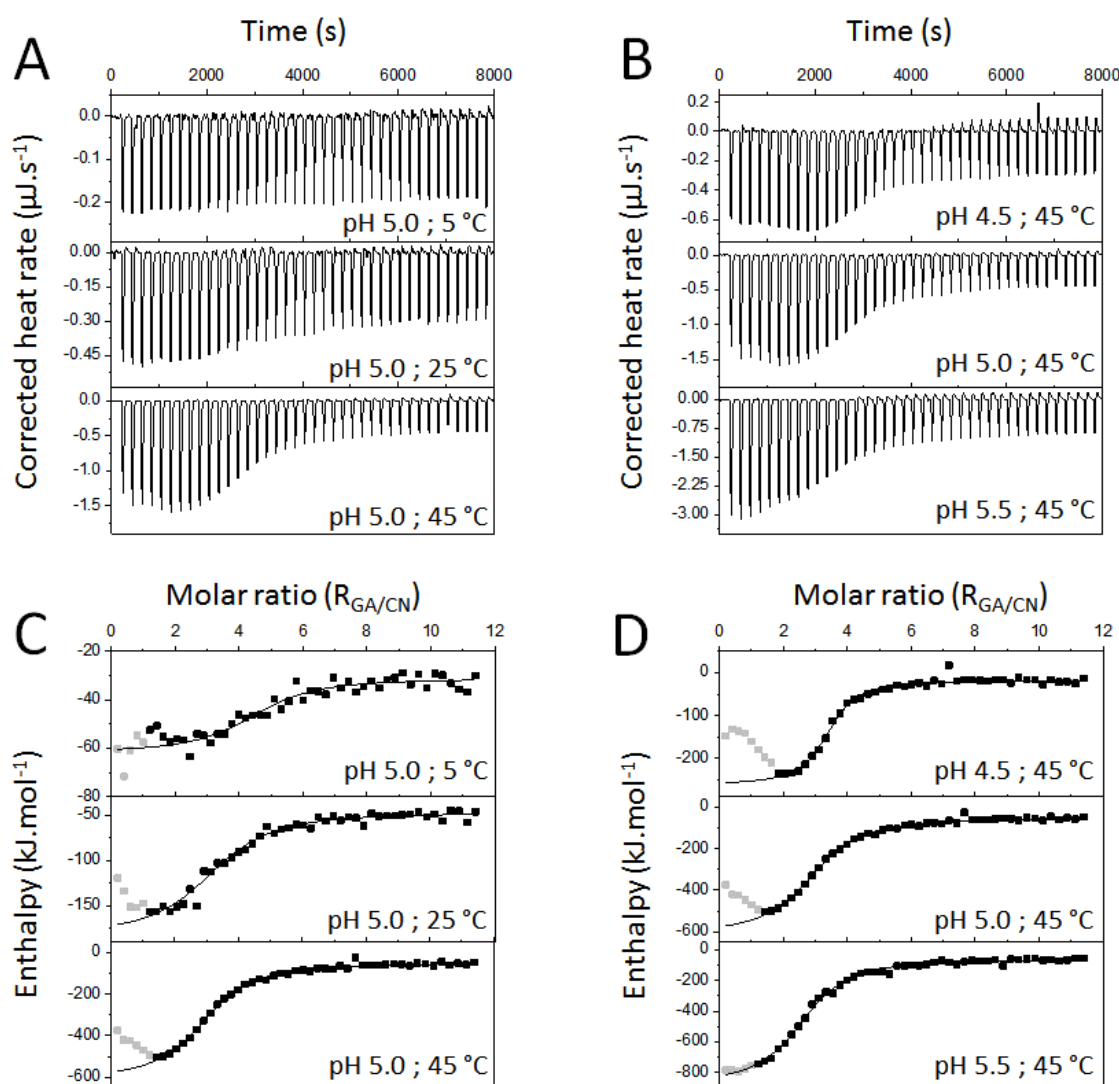
It was chosen to focus on the pH 4.5, 5.0 and 5.5, so the pH would be far enough from the pKa of both polysaccharides. As many authors already reported (Butstraen & Salaün, 2014; Espinosa-Andrews et al., 2013), the data from the biopolymers approximate Zeta potentials led to presume that more GA than CN in the mixtures was necessary in order to reach stoichiometry (in other words, the optimal molar ratio where all CN charges were neutralized by GA charges), at any pH (between four and five times more GA than CN in the literature (Butstraen & Salaün, 2014; Espinosa-Andrews et al., 2007, 2010)). The results from **Table 1** suggested that the

higher the pH, the fewer GA would be needed to neutralize the CN positive charges ( $|ZP_{CN}/ZP_{GA}|$  of 2.7 for pH 4.5, 2.1 for pH 5.0 and 2.2 for pH 5.5 at 25 °C). Therefore, it seemed that twice the amount of GA compared to CN would be needed to obtain neutral complexes if all the charges were involved in the interaction, for all experimental conditions. The obtained results have also shown that the temperature had no influence over the Zeta potentials of GA. On the contrary, the CN Zeta potentials decreased with the raise of temperature in acetic acid solutions. A raise in temperature would lead to a compaction of CN, decreasing its steric hindrance during self-assembly so the charges would be less available for the interaction. Since this study aimed to understand what drives complex coacervation between GA and CN, ITC measurements were performed in order to elucidate the thermodynamic pathway related to the complexation between GA and CN. Complex coacervation of GA and CN upon molar ratio was thus first investigated.

### **3.2. Thermodynamic parameters and energies involved in the coacervation process**

The thermodynamic parameters involved in complex coacervation between GA and CN were determined using ITC (Aberkane et al., 2010; Xiong et al., 2016) at different pH and different temperatures (**Figure 1**). This method leads to determine the stoichiometry ( $n$ ) of the interaction, if the coacervation is enthalpy-driven or entropy-driven and the related thermodynamic values as  $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $T\Delta S$  and dissociation constant  $K_d$ .

Since corrected heat rates were negative in all cases, the interaction major contribution was mostly exothermic (**Figure 1.A and B**) related to a spontaneous phenomenon. The peak areas corresponded to the energy released or absorbed by the cell containing the CN solution after each GA solution injection. A sequence of successive exothermic peaks of decreasing intensity was initially observed in most cases. The binding energy decreased upon GA addition until it stabilized (around the 20<sup>th</sup> injection).



**Figure 1.** (A) Corrected heat rate upon time of mixtures of gum Arabic and chitosan at pH 5.0 at 5, 25 and 45 °C (A) and at 45 °C at pH 4.5, 5.0 and 5.5 (B). Enthalpy and fit upon GA/CN molar ratio of mixtures of gum Arabic and chitosan at pH 5.0 at 5, 25 and 45 °C (C) and at 45 °C at pH 4.5, 5.0 and 5.5 (D)

At the end of the experiment, a stabilized sequence of weaker exothermic peaks was always observed, related to a dilution phenomenon. This heat of dilution was nevertheless temperature-dependent (at pH 5.0,  $-0.2$ ,  $-0.3$  and  $-0.5 \mu\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$  at 5 °C, 25 °C and 45 °C, respectively) and pH-dependent (at 45 °C,  $-0.3$ ,  $-0.5$  and  $-0.75 \mu\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$  for pH 4.5, 5.0 and 5.5, respectively). Moreover, constant endothermic peaks were observed at the end of titration, when GA was in excess. Peaks intensities varied upon studied conditions, which were more important at 45 °C



(between 0.1 to 0.2  $\mu\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$ ) than at 5 °C (0.005 to 0.008  $\mu\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$ ). A switch from an exothermic phenomenon to an endothermic one indicated two successive molecular events (Aberkane et al., 2010; Kayitmazer, 2017). The first one might be attributed to the electrostatic interaction between macromolecules (formation of soluble complexes or coacervates) while the second one could be attributed to aggregation, coalescence of the complexes or to a reorganization of the complexes. In some cases, as for pH 5.0 at 45 °C, at the beginning of titration an increase of the binding energy were observed before titration, which is often encountered in ITC measurements for the first 20  $\mu\text{L}$  injected. It could be explained either by a diffusion of GA into the cell during the temperature equilibration or because the two polymers were forming complexes prior to coacervation, opening the chitosan structure in some conditions. Both pH and temperature influenced the intensity of the exothermic signals of the interaction. At a given pH (**Figure 1.A**), the intensity of the signal increased upon temperature. The same behavior has been observed upon pH at a given temperature (**Figure 1.B**). This was observed at all studied conditions (data not shown).

The binding isotherms were then fitted using the “Independent” model in order to obtain the corresponding thermodynamic parameters (**Figure 1.C and D**). At 5 °C, due to weak signals, the repeatability was not optimal. The first five enthalpy values were not taken into account while modeling the raw data (grey dots **Figure 1.C and D**). According to raw data, enthalpy values were increasing in absolute value when the temperature and the pH increased, corresponding to more electrostatic interactions.

The enthalpy upon molar ratio followed a typical titration curve with the center of the linear segment of the sigmoid corresponding to the stoichiometry of the interaction (the molar ratio where all the charges of the CN were neutralized by the charges of the GA). Since the inflection point was not always at the same molar ratio, the stoichiometry appeared to be slightly different upon studied conditions. The thermodynamic parameters obtained from the fit and from Eq. 1

and Eq. 2 were given in **Table 2** and are represented on **Figure 2**.

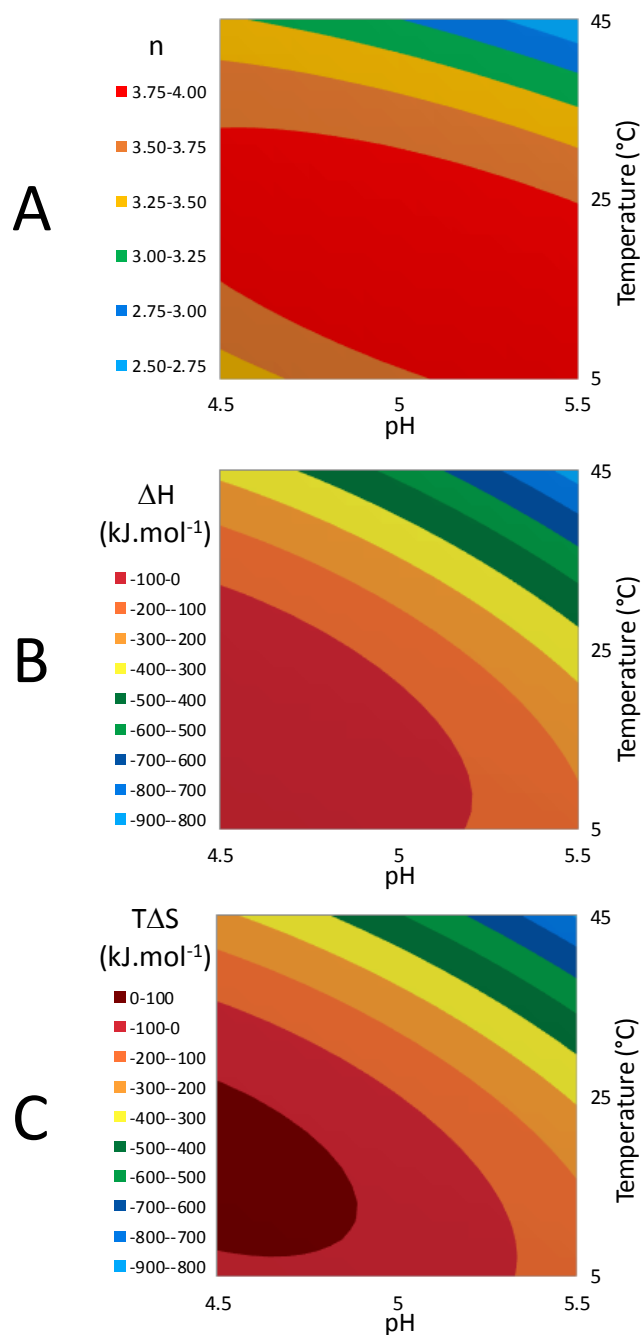
**Table 2.** Thermodynamic parameters (stoichiometry (n), enthalpic contribution ( $\Delta H$ ), entropic contribution (T $\Delta S$ ), Gibbs free energy ( $\Delta G$ ) and dissociation constant (K<sub>d</sub>)) of binding between gum Arabic and chitosan upon pH and temperature.

T (°C)	pH	n		$\Delta H$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )		T $\Delta S$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )		$\Delta G$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )		K <sub>d</sub> (10 <sup>-8</sup> )	
5	4.5	3.0	0.5	-59.6	14.2	-21.3	14.0	-38.3	0.2	6.6	0.7
	5.0	3.8	0.2	-37.6	11.6	+0.6	14.2	-38.2	2.7	13.3	1.8
	5.5	4.0	0.1	-217.1	18.8	-183.3	19.4	-33.8	0.6	26.8	16.9
25	4.5	4.1	0.8	-67.7	2.7	-23.3	2.3	-44.3	0.5	1.7	0.3
	5.0	4.0	0.9	-135.2	0.2	-95.4	2.3	-39.7	2.0	12.9	9.5
	5.5	3.3	0.2	-322.3	10.8	-283.0	11.8	-39.3	0.9	13.5	5.0
45	4.5	3.2	0.3	-293.9	70.6	-249.0	70.7	-44.9	0.1	4.4	0.1
	5.0	2.9	0.2	-561.6	2.5	-519.8	2.0	-41.8	0.5	16.0	2.6
	5.5	2.7	0.1	-854.1	45.7	-812.5	46.0	-41.5	0.3	15.2	1.6

For all experimental conditions,  $\Delta G$  was negative and close to -40 kJ.mol<sup>-1</sup> which confirmed that the interactions between GA and CN were always spontaneous.  $\Delta H$ , corresponding to electrostatic interactions (Aberkane et al., 2010; Duhoranimana et al., 2018; Kayitmazer, 2017; Priftis et al., 2012), was always negative (from -37.6 11.6 to -854.1 45.7 kJ.mol<sup>-1</sup>), so favorable to the interaction (negative contribution to  $\Delta G$ ). T $\Delta S$  was almost always negative, so unfavorable to the interaction (positive contribution to  $\Delta G$ ). The K<sub>d</sub> values were always very small (from 1.7 x 10<sup>-8</sup> to 26.8 x 10<sup>-8</sup>) which meant that the interactions between the two polymers were quite strong because complexes are considered to have high-affinity when their K<sub>d</sub> value is smaller than 10<sup>-6</sup> (Qin & Gronenborn, 2014).

The entropic and enthalpic contributions were strongly influenced by temperature and pH. When temperature increased, the entropy significantly (p-value = 2.5 x 10<sup>-5</sup>) decreased (from +0.6 14.2 kJ.mol<sup>-1</sup> at 5 °C to -519.8 2.0 kJ.mol<sup>-1</sup> at 45 °C, at pH 5.0) and the enthalpy significantly (p-value = 3.4 x 10<sup>-5</sup>) increased (from -37.6 11.6 kJ.mol<sup>-1</sup> at 5 °C to -561.6 2.5 kJ.mol<sup>-1</sup> at 45 °C, at pH 5.0). The same phenomenon was observed when pH increased (entropy

decreased significantly from  $-23.3 \pm 2.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  at pH 4.5 to  $-283.0 \pm 11.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  at pH 5.5 at 25 °C with a p-value of 0.0001, and enthalpy decreased from  $-67.7 \pm 2.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  at pH 4.5 to  $-322.3 \pm 10.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  at pH 5.5, at 25 °C with a p-value of 0.0009). The enthalpy became thus more favorable to the interaction when pH and temperature increased, whereas the entropy did not.



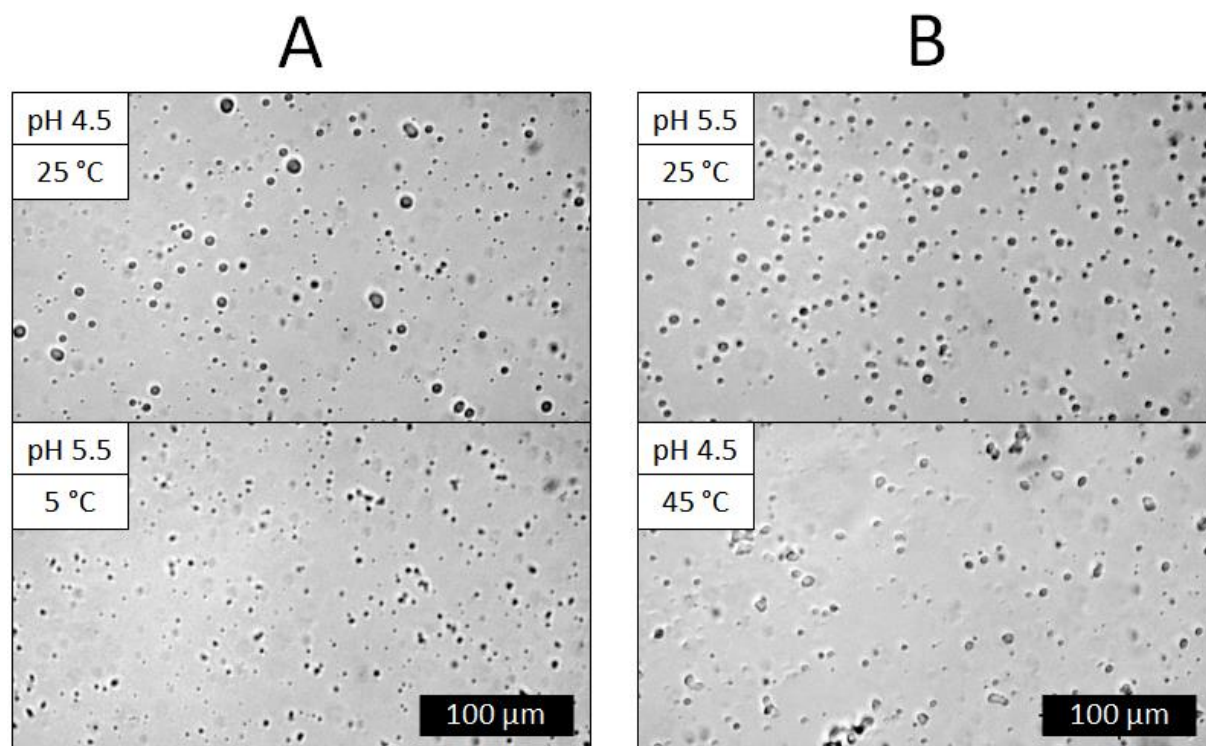
**Figure 2.** Influence of pH and temperature on (A) the optimal molar ratio (n), (B) the enthalpic ( $\Delta H$ ) and (C) and the entropic ( $T\cdot\Delta S$ ) contributions of gum Arabic and chitosan interactions.

Enthalpy depended on pH for most systems because it was related to the ionization of the polymers (Feng, Leduc, & Pelton, 2008; Kayitmazer, 2017). Authors have reported that complex coacervation between weak polyelectrolytes was mostly driven by a negative enthalpy due to the electrostatic interactions between two oppositely charged components. However, it was unexpected that the raise in temperature would decrease the entropic contribution to the interaction (Li, Kelkar, & Wagner, 2012; Priftis et al., 2012). This result was unexpected because the opposite is generally observed in the literature (Aberkane et al., 2010; Li et al., 2012; Priftis et al., 2012). Indeed, hydrophobic interactions are enhanced by increasing the temperature due to conformational changes of polysaccharide structure and release of binding water and counterions in the bulk favoring entropic contribution (Kelly, Gudo, Mitchell, & Harding, 1994; Schmitt et al., 1998). In the cases of biopolymer-based complexes, the temperature-induced conformational changes play dominant roles (Dickinson et al., 2001; Priftis et al., 2012; Schmitt et al., 1998). It has also been described that CN hydrodynamic diameter should decrease upon temperature and pH (Chen & Tsaih, 1998; Fan et al., 2012). Furthermore, the CN was degassed and incubated at the temperature of experiment for 20 minutes before ITC measurements. At 45 °C, the structure of CN was more compact and binding water was already released before titration. Due to the thermodynamic equilibrium of the sample, the corresponding entropic contribution was not measured. At 45 °C or at pH 5.5, fewer charges onto CN would be available for the GA charges, making the whole system less random, disfavoring entropic contribution. The counterions release entropy only played a minor role, which might be explained by the fact that the two polymers were dialyzed. The unfavorable entropic effects could be due to the loss of polymer conformation freedom after complexation (Dickinson, 2008). When all charges were involved in the interactions, the system became less random and more ordered, which could explain why the entropy was more unfavorable for higher temperatures. Moreover, a more compacted structure lead to a better interaction between

CN and GA, since the steric hindrance of CN decreased.

The stoichiometry ( $n$ ) slightly changed upon temperature or pH. For example, it went from  $3.2 \pm 0.3$  at pH 4.5 to  $2.7 \pm 0.1$  at pH 5.5, at 45 °C (with a p-value of 0.02) and to  $4.0 \pm 0.1$  at 5 °C to  $2.7 \pm 0.1$  at 45 °C, at pH 5.5, with a p-value of  $2.2 \times 10^{-6}$ ). The Zeta potential of CN evolved with temperature contrary to the one of GA. The theoretical values of the Zeta potential of the mixtures suggested that the stoichiometry should decrease a little with the raise from pH 4.5 to 5.5 (**Table 1**). However, as mentioned previously, pH and temperature had a small influence over the stoichiometry consistently with the ZP values. The higher the pH, the lower the stoichiometry; at 25 °C the stoichiometry got from  $4.1 \pm 0.8$  at pH 4.5 to  $3.3 \pm 0.2$  at pH 5.5 (with a p-value of 0.07, so the values were not statistically different but the tendency was strong). The higher the temperature, the lower the stoichiometry; at pH 5.5, the stoichiometry got from  $4.0 \pm 0.1$  at 5 °C to  $2.7 \pm 0.1$  at 45 °C (with a p-value of  $2.2 \times 10^{-6}$ ). A raise in temperature also meant that the backbones of the polymers were more flexible and more likely to encounter each other since the solvent should be less viscous (Qiao, Di, Ma, Ma, & Xia, 2010; Roy, Ghosh, & Sarkar, 2010). Even if the tendencies were consistent with the expectations regarding the Zeta potential values of both polymers (**Table 1**), the values were not the same (at 25 °C the stoichiometry was expected to decrease from  $2.7 \pm 0.2$  at pH 4.5 to  $2.2 \pm 0.1$  at pH 5.5). Furthermore, though the GA Zeta potential did not evolve upon temperature, the CN Zeta potential decreased upon temperature (Filion et al., 2007), so the ratio of charges between the two polymers became smaller.

It can also be noted that the thermodynamic parameters and stoichiometry were really close between pH 4.5 at 25 °C and pH 5.5 at 5 °C (**Table 2**), and between pH 4.5 at 45 °C and pH 5.5 at 25 °C (**Table 2**). This suggested that a raise of pH could be tempered by a decrease in temperature (**Table 2 and Figure 2**). The optical micrographs of these conditions were shown in **Figure 3**.



**Figure 3.** Optical micrographs of gum Arabic and chitosan mixtures (A) at pH 4.5 at 25 °C and pH 5.5 at 5 °C and (B) at pH 4.5 at 45 °C and pH 5.5 at 25 °C at 5 °C (B), 5 min after mixing for a GA/CN molar ratio of 4:1.

Between pH 4.5 at 45 °C and pH 5.5 at 25 °C and between pH 4.5 at 25 °C and pH 5.5 at 5 °C, the objects on the micrographs looked almost the same (same number of coacervates and same average diameter of the coacervates for each combinations). Table of analysis of these micrographs are provided in supplementary material.

Even if the enthalpy and entropy varied upon pH and temperature, the Gibbs energy was found to be almost constant whatever the physicochemical conditions (around  $-40 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ). This could mean that the formation of the complexes were not driven by the same forces and that the complexes formed did probably not have the same shape. The Zeta potential of the mixtures in the different conditions were measured to appreciate how it coincided with the ITC measurements. The macroscopic aspect of the samples, the turbidity of the mixtures and the shape of the complexes observed from optical microscopy were studied to corroborate ITC data.

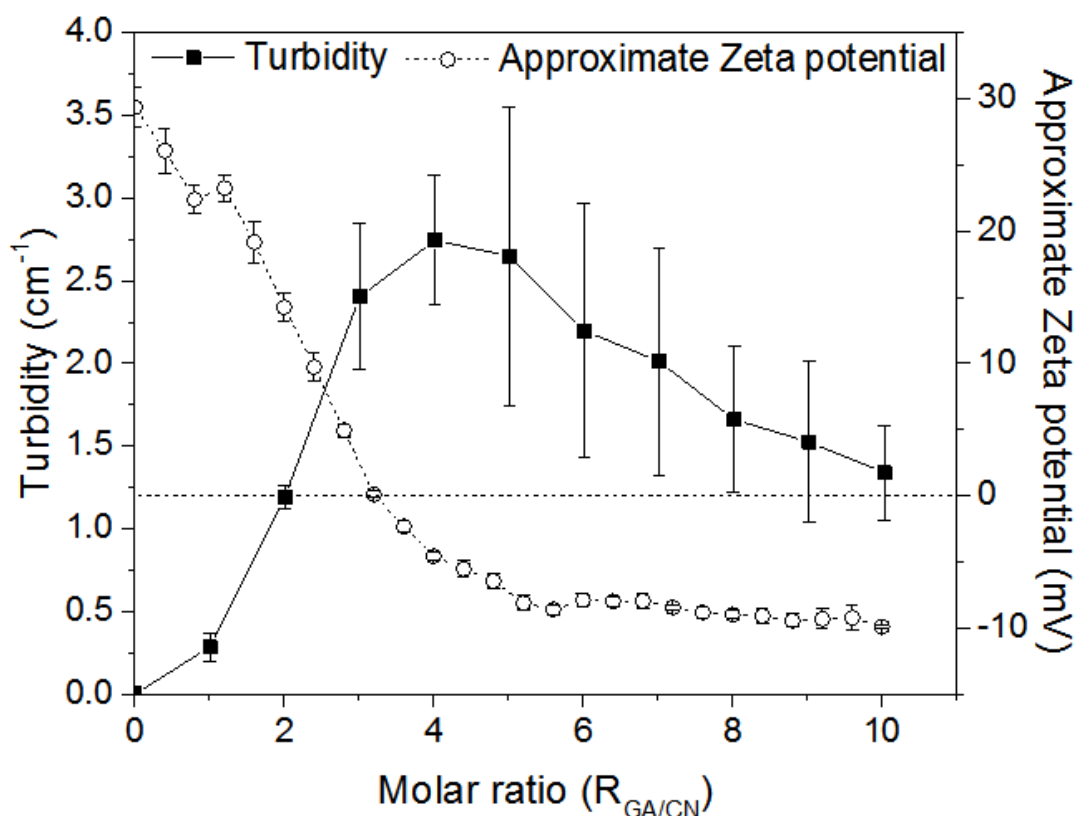
### 3.3. Turbidimetric and Zeta potential measurements and optical microscopy upon molar ratio of gum Arabic and chitosan complex coacervation

The influence of the GA/CN molar ratio on the coacervate formation was investigated (**Figure 4**). These experiments were performed at pH 5.0 so the pH would be far enough from the pKa of both polymers, in order for them to be charged. For CN and GA mixtures, Zeta potential and turbidity were measured.

When the two polymers solutions were mixed together the sample became turbid, which meant new objects were formed (**Figure 4**). Moreover, after 24 hours, two different phases appeared (data not shown). The upper phase was transparent, the phase below was turbid: it was a liquid/liquid associative phase separation (complex coacervation). It is known that coacervates are not stable and that they coalesce upon time. Knowing this, it is important to characterize the samples in the same conditions, so all measurements were made 5 minutes after mixing the solutions.

The turbidity of the mixture increased from  $0.283 \pm 0.088 \text{ cm}^{-1}$  at the ratio 1:1 to  $2.744 \pm 0.392 \text{ cm}^{-1}$  at the ratio 4:1. Ratio 4:1 to ratio 10:1 were not statistically different from each other ( $p_0 > 0.05$ ). However the turbidity seemed to have a tendency to decrease with the increase of the GA proportion in the mixtures (**Figure 4**). This decrease can either be related to a change of structure of the objects, or to a dilution of the system. The volumes of GA added excluded the dilution hypothesis. In addition, a change of structure of the complexes would be consistent with the endothermic peaks at the end of ITC titration (**Figure 1.A and B**).

This result was consistent with published data from other authors and with the ITC stoichiometry (**Table 2** and **Figure 2**): at 25 °C pH 5.0, the stoichiometry was  $4.0 \pm 0.9$  and in the literature, in the same conditions, optimal molar ratios were in a range from 4 to 5 (Butstraen & Salaün, 2014; Espinosa-Andrews et al., 2007).



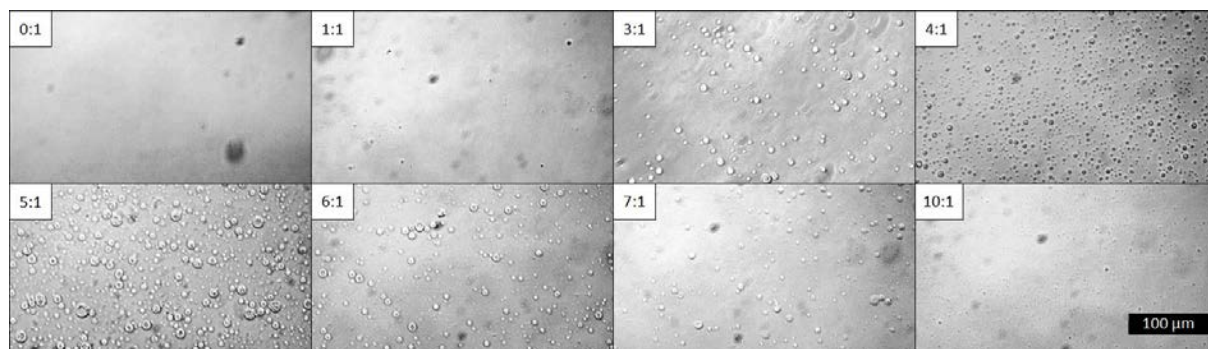
**Figure 4.** Turbidity ( $cm^{-1}$ ) and approximate Zeta potential (mV), of gum Arabic and chitosan mixtures upon GA/CN molar ratio at pH 5.0 and 25 °C, 5 min after mixing.

Objects were formed when the molar ratio was sufficient, in other words when there was enough GA to neutralize the charges of CN. When the molar ratio GA/CN was higher than 4:1 the turbidity decreased. This phenomenon could be explained by a reorganization of the coacervates due to an excess of GA in order to obtain thermodynamic equilibrium in the system. These results were corroborated with optical microscopy discussed further (**Figure 5**) and with the sequence of endothermic peaks obtained at the end of titration by ITC measurements (**Figure 1**).

The Zeta potential of the objects has also been investigated. For molar ratio below 1:1, CN was in excess so the mixture Zeta potential was close to the one of CN ( $21.6 \pm 0.8$  mV). When more gum was added, the Zeta potential got closer to neutrality (around ratio 3:1). Finally, when GA was in excess, the Zeta potential of the mixture tended to the one of GA ( $-10.2 \pm 0.2$  mV, **Table 1**). Similar results with mixtures GA/CN at different pH were already published by Butstraen



*et al.*, 2014 and Espinosa-Andrews *et al.*, 2007 (Butstraen & Salaün, 2014; Espinosa-Andrews *et al.*, 2007). The maximum turbidity ( $2.744 \pm 0.362 \text{ cm}^{-1}$ ) was observed when the Zeta potential value was close to zero at a molar ratio of 4:1, which was consistent with the ITC stoichiometry in these given conditions ( $4.0 \pm 0.9$ ) (Coelho *et al.*, 2011).



**Figure 5.** Optical micrographs of gum Arabic and chitosan mixtures upon different GA/CN molar ratios 5 min after mixing at 25 °C, pH 5.0

Optical micrographs of the mixtures were collected to study the shape of the objects and to confirm if the loss of turbidity was due to dilution or to a change of shape of the coacervates. In the ITC measurements (**Figure 1**) when the GA was in excess, there was an exothermic/ endothermic sequence which would support the theory of complexes reorganization.

For molar ratios below 3:1, no object was observed. From ratio 3:1, some coacervates appeared. When more GA was added (from molar ratios 4:1) more coacervates were formed (**Figure 5**), from  $88 \pm 8$  coacervates in the optical field for 3:1 to  $747 \pm 82$  for 4:1. Table of results from image analyses is provided in supplementary material. These molar ratios were consistent with the ITC molar ratio at 25 °C, pH 5.0 ( $4.0 \pm 0.9$ ). For molar ratios above 6:1 ( $245 \pm 59$  coacervates in the optical field for 6:1), the coacervates size and number decreased and then disappeared (molar ratio 10:1). These results were consistent with the turbidity behavior of the mixtures and their macroscopic aspects (**Figure 4 and Figure 5**). For extreme ratios (1:1 and 10:1), due to low turbidity, no object was observed by optical microscopy. It was possible that complexes

were formed at these ratios but that they were too small to be observed by optical microscopy. A change of the size and shape of the objects, observed when the molar ratio increased, was consistent with the endothermic sequences observed on the ITC measurements (**Figure 1**). Moreover, a change of the shape of the complexes observed by optical micrographs confirmed the absence of dilution phenomenon.

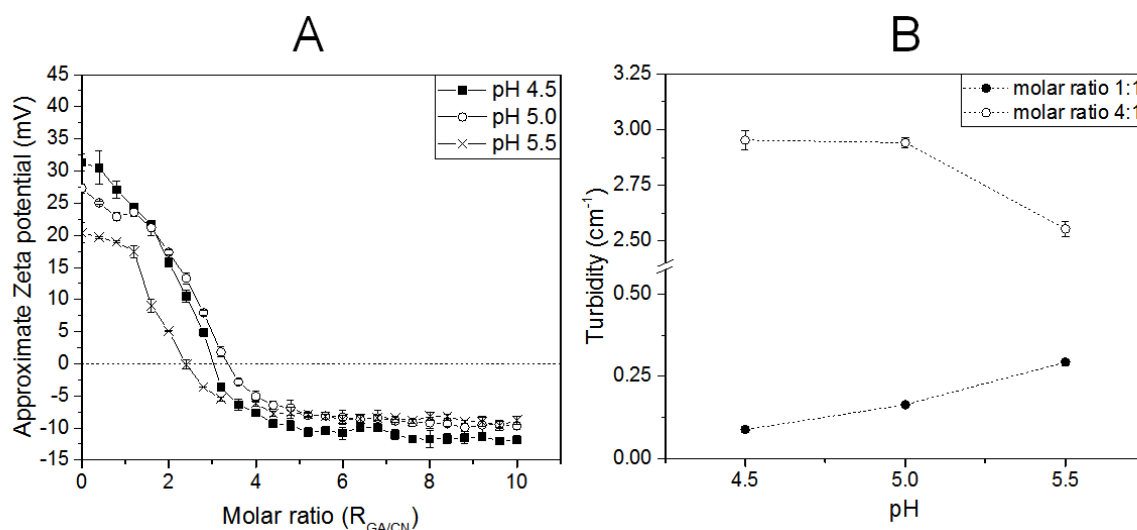
From the microscopy observations, one can note that the polydispersity of size of the objects was quite high. CN had indeed non-charged polar residues (Coelho et al., 2011) because its deacetylation degree was around 75%, so 25% of its N-acetylglucosamine residues were not charged and GA has large non-charged segments. Indeed, GA contains only 23% of glucuronic acid, which are the GA residues charged when deprotonated (Coelho et al., 2011; Renard et al., 2006). The charges were heterogeneously distributed on polydisperse polymers, which can explain the irregularity of the sizes of the coacervates.

The optimal molar ratio for the formation of coacervate determined by optical microscopy (between to 4:1 and 5:1) was consistent with the stoichiometry determined from ITC measurements ( $4.0 \pm 0.9$  for pH 5.0 at 25 °C) (**Figure 1**) and the optimal ratio obtained by Zeta potential measurements ( $3.2 \pm 0.2$ ), when the value was close to zero and with the maximum turbidity of the mixture ( $4.0 \pm 0.4$ ). However, the first complexes were formed for a ratio 3:1, but other phenomenon occurred for higher molar ratio. On the **Figure 5** from molar ratio 4:1 to 5:1 the coacervates were different, which could be explained by a reorganization of the system. The loss in turbidity along with the increase of the ratio could be explained by a reorganization of the complexes to achieve thermodynamic equilibrium. These results were also observed on the optical micrographs and were correlated by the ITC measurements.

These interactions between the polymers were indeed partially driven by the pH-related net charge of the two polymers. The influence of the pH on the interactions between GA and CN had thus been investigated.

### 3.4. Effect of the pH of the solutions on the interactions between gum Arabic and chitosan

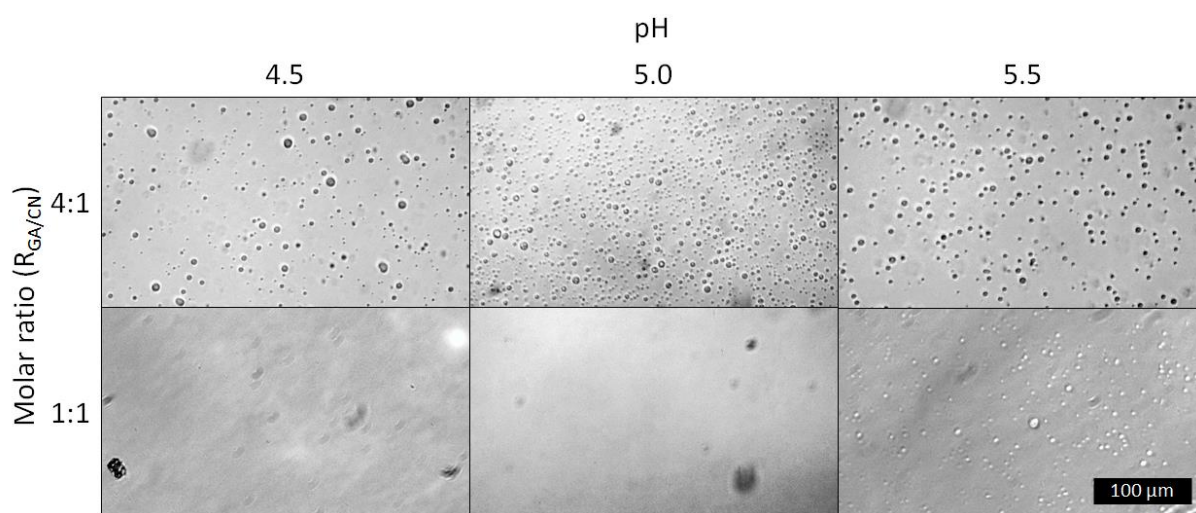
From ITC results, it seemed that the major interaction that drove complex coacervation was the electrostatic interactions related to the enthalpy (**Table 2** and **Figure 2**). Since the charges of CN varied upon pH (**Table 1**), the influence of pH on the mixtures was investigated. These experiments were conducted at 25 °C. The approximate Zeta potential of the mixtures was measured at pH 4.5, 5.0 and 5.5 for different molar ratios (**Figure 6.A**). For low GA/CN molar ratio (below 1:1), the approximate Zeta potential was close to the one of CN ( $21.6 \pm 0.8$  mV). The more GA was added, the lower the Zeta potential of the mixture got until it almost reached the GA Zeta potential ( $-10.2 \pm 0.2$  mV, **Table 1**). At pH 4.5, 5.0 and 5.5, the Zeta potential reached zero for a molar ratio of 3.0:1; 3.3:1 and 2.4:1, respectively (**Figure 6A**). Turbidity measurements were conducted at low molar ratio (1:1) and at optimal molar ratio for pH 5.0 (4:1) determined by ITC (**Figure 6B**).



**Figure 6.** (A) Approximate Zeta potential (mV) of the gum Arabic and chitosan mixtures upon GA/CN molar ratios at different pH, at 25 °C and (B) turbidity ( $cm^{-1}$ ) of gum Arabic and chitosan mixtures for GA/CN molar ratios of 1:1 and 4:1 at different pH, 5 min after mixing

For the molar ratio 1:1, the turbidity was low all along the pH range ( $0.089 \pm 0.005$  and  $0.164 \pm 0.007$   $cm^{-1}$  at pH 4.5 and 5.0, respectively) but it was higher at pH 5.5 ( $0.293 \pm 0.011$   $cm^{-1}$ )

(**Figure 6.B**). From the results obtained by optical micrographs and ITC (**Figure 5** and **Table 2**), the molar ratio 4:1 was supposed to be almost optimal at pH 5.0. At this ratio, when the pH increased, the turbidity decreased from  $2.953 \pm 0.044 \text{ cm}^{-1}$  at pH 4.5 to  $2.554 \pm 0.033 \text{ cm}^{-1}$  at pH 5.5 (**Figure 6**). Indeed, the higher the pH, the smaller the difference of charge between GA and CN (**Table 1**) and the lower the stoichiometry, as the tendencies have been seen previously in the ITC results ( $n = 4.1 \pm 0.8$  at pH 4.5 and  $n = 3.3 \pm 0.2$  at pH 5.5) and with the Zeta potential data (the Zeta potential reached zero for a molar ratio of 3.0:1 at pH 4.5 and 2.4:1 at pH 5.5). There should be one optimal molar ratio for each pH.



**Figure 7.** Optical micrographs of gum Arabic and chitosan mixtures upon pH for GA/CN molar ratios 4:1 and 1:1 at 25 °C

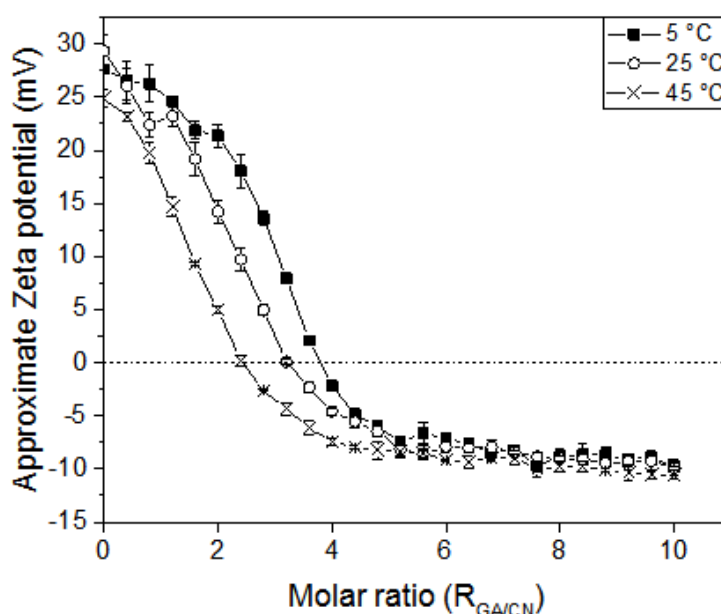
From the optical micrographs (**Figure 7**) coacervates were formed for all pH for a ratio of 4:1. At ratio 1:1, no visible coacervate was formed at pH 4.5 and 5.0, whereas some coacervates were formed at pH 5.5. This result was consistent with the Zeta potential and turbidity of the mixtures (**Figure 6**). For a molar ratio of 4:1, though pH had no influence over the size or polydispersity of the coacervates formed, it impacted the number of coacervates ( $264 \pm 18$  coacervates in the optical field for pH 4.5,  $747 \pm 82$  for pH 5.0 and  $353 \pm 17$  for pH 5.5). Table of results from image analyses is provided in supplementary material.

At different pH, the complexes between GA and CN had different shapes and were driven by different enthalpy and entropy contributions. According to ITC results (**Figure 1**) at 25 °C the

stoichiometry at pH 4.5 would be  $4.1 \pm 0.8$ , at pH 5.0:  $4.0 \pm 0.9$  and at pH 5.5:  $3.3 \pm 0.2$ . Even for low molar ratios, it was possible to obtain coacervates by decreasing pH. ITC measurement also revealed that the interactions were also different upon temperature. At pH 5.0, the complex coacervation of GA and CN was then investigated at different temperatures (5, 25 and 45 °C).

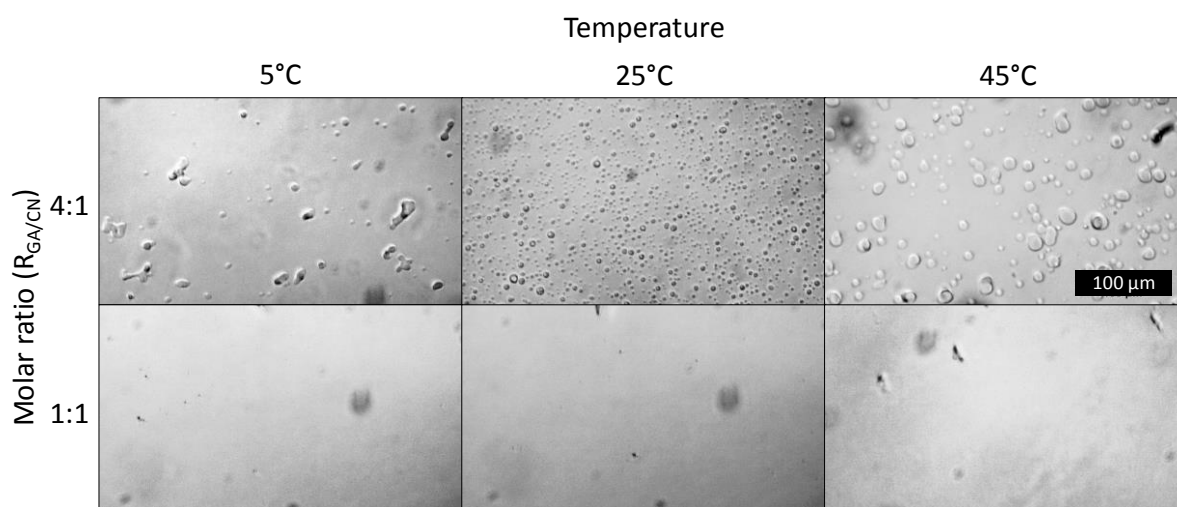
### 3.5. Effect of the temperature of the solutions on the interactions between gum Arabic and chitosan

At the beginning of titration, the Zeta potential (**Figure 8**) corresponded to the one of the CN ( $21.6 \pm 0.8$  mV), and at the end of the titration, the Zeta of the mixture corresponded to the one of GA alone ( $-10.2 \pm 0.2$  mV). Between the beginning and the end of the titration, for all temperatures the Zeta potential decreased. However, it differed according to the temperature. The stoichiometry decreased when temperature increased (**Figure 8**) as observed by ITC. Indeed the molar ratio for which the approximate Zeta potential was close to 0 mV varied with temperature from 4.2:1 at 5 °C to 3.4:1 at 25 °C and 2.5:1 at 45 °C at pH 5.0 (against  $3.8:1 \pm 0.2$ ,  $4.0:1 \pm 0.9$  and  $2.9:1 \pm 0.2$  with the ITC, respectively). These results were strongly consistent with the ones obtained from ITC (**Table 2** and **Figure 2**).



**Figure 8.** Approximate Zeta potential (mV) of the gum Arabic and chitosan mixtures upon molar ratio at different temperatures, at pH 5.0

These results were consistent with the previous hypothesis: this could mean that the CN had different conformation at different temperatures and that some of its charges were not accessible at high temperatures (the stoichiometry being reached for lower molar ratio at 45 °C than at 5 °C). At 5 °C, more GA was needed to counter the charges of the CN because more CN charges were accessible, so the enthalpy was less favorable than at 45 ° (Table 2 and Figure 2). The aspect of the sample has been investigated by optical microscopy (Figure 9).



**Figure 9.** Optical micrographs of gum Arabic and chitosan mixtures upon different temperatures for GA/CN molar ratios 4:1 and 1:1 at pH 5.0

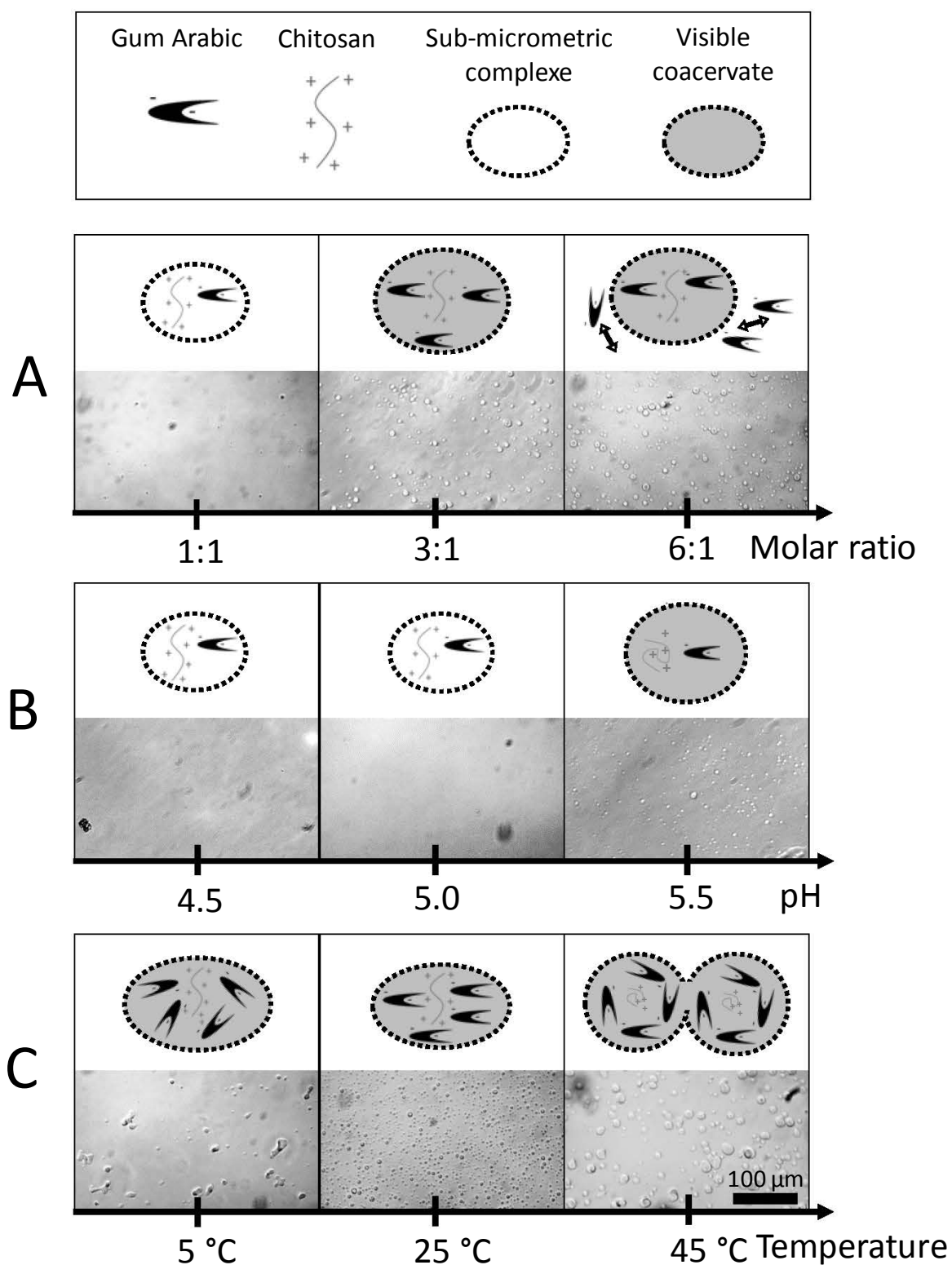
At molar ratio 1:1, whatever the temperature, no object was formed. At molar ratio 4:1, coacervates were observed for all temperatures and the complexes formed were strongly different. However, the number and shape of the coacervates varied upon temperature. At 5 °C, the coacervates were less numerous than at 25 °C (Figure 9) ( $63 \pm 9$  coacervates in the optical field at 5 °C against  $747 \pm 82$  at 25 °C). Table of results from image analyses is provided in supplementary material. Temperature seemed to have an impact on the size of the coacervates, as reported previously in this study. At 45 °C for a ratio of 4:1, the coacervates were bigger and less numerous (the average diameter of the coacervates was  $7.3 \pm 0.8 \mu\text{m}$  at 45 °C against  $3.6 \pm 0.5$  at 25 °C and the number of coacervates was  $173 \pm 36$  at 45 °C), which could be explained by a coalescence phenomenon of the complexes at higher temperature. Even though the coacervates were bigger, no settling was observed 5 minutes after mixing.

### 3.6. Possible mechanism of the interaction between gum Arabic and chitosan

From previous experiments, it was observed that pH, temperature and molar ratio strongly influenced the coacervation phenomenon, in terms of thermodynamic pathway and structural aspects of the objects formed. The obtained results allowed us to propose a mechanism involved in the formation of GA/CN complexes (**Figure 10**).

The complex coacervation between GA and CN were investigated. When mixed in solution, those two oppositely charged polysaccharides formed a turbid dispersion which led to assume they were forming complexes (**Figure 4**). The optical micrographs of the mixtures in different conditions of pH and temperature showed that these parameters had a significant influence over the complexes formed (**Figure 10**). The different thermodynamic parameters obtained for each condition confirmed this influence (**Table 2** and **Figure 2**).

In order to study the influence of the molar ratio, the interactions between GA and CN were investigated at a given pH and a given temperature. At a ratio of 1:1, no complexe was visible (pH 5.0, 25 °C, **Figure 10.A**). However, it was possible that objects were formed (GA charges would interact with CN charges), but that they were too small to be seen by optical microscopy. When more GA was added to the CN, more charges of the polymers interacted. The stoichiometry value determined by ITC was confirmed from optical microscopy (ratio 4:1), turbidity (maximum turbidity between ratios 3:1 to 4:1) and Zeta potential (close to 0 between 3:1 and 4:1). Upon molar ratio, visible complexes were indeed formed (ratio 3:1) and all GA charges interacted with all CN charges, obtaining neutral visible coacervates. At a ratio 6:1, when GA was in excess, the complexes got smaller. In order to reach an equilibrium in the system, the GA could desorb and the coacervates could change. This hypothesis is consistent with the small endothermic event at the end of titration (ITC results, **Figure 1**). This could be explained by this reorganization within the system.



**Figure 10.** Optical micrographs and schematic representation of the influence of (A) the molar ratio at pH 5.0, 25 °C, (B) the pH at 25 °C, GA/CN molar ratio 1:1 and (C) the temperature at pH 5.0, GA/CN molar ratio 4:1 on the coacervation of gum Arabic and chitosan



---

To study the influence of the pH, the interactions between GA and CN were investigated at a given temperature and a given molar ratio (25 °C, ratio 1:1, **Figure 10.B**). The complexes were different upon pH. At pH 4.5 and 5.0, no complex was observed. At pH 5.5, visible coacervates were formed. Even at a small molar ratio, it was possible to have a coacervation phenomenon by tempering with the pH, since pH affected the Zeta potential of CN (**Table 1**), so less GA would be needed to achieve stoichiometry. The optimal molar ratio was smaller at higher pH (2.2:1 ± 0.1 at pH 5.5 against 2.7:1 ± 0.2 at pH 4.5). Since when the pH raised, the Zeta potential of CN decreased, there were fewer free charges available for the interaction in the system which might explain that the entropy was less favorable when the pH increased (the system was more ordered).

To study the influence of the temperature, the interactions between GA and CN were investigated at a given pH and a given molar ratio (pH 5.0, ratio 4:1, **Figure 10.C**). The complexes between GA and CN changed upon temperature in the same way that they did upon pH. When GA was in excess (more GA than was necessary to achieve stoichiometry), at 25 °C, more coacervates were formed. At 45 °C, the coacervates were bigger, suggesting a coalescence of the coacervate because of enhanced thermal motion at this temperature. At a given pH, there was an optimal molar ratio for each temperature (**Figure 10.C**). This was inherent to the shape of the polymers at different temperature, especially the one of CN. Indeed, CN was compacted at 45 °C, so less charges were available for the interaction, needing less GA to achieve stoichiometry. This was consistent with the stoichiometry determined by ITC. The fewer GA involved in the interaction, the smaller the coacervates.

For each pH-temperature combination, there was an optimal molar ratio for coacervation. For example, at a pH 5.0, at 5 °C the optimal molar ratio was 4:1, and at 25 and 45 °C the stoichiometry was around 3:1 and 2:1, respectively (**Figure 10**). The size and shape of the coacervates changed upon pH, temperature and molar ratio.

## **4. Conclusions**

The interactions of gum Arabic (GA) and chitosan (CN) in solution have been investigated upon pH (4.5, 5.0 and 5.5) and temperature (5, 25 and 45 °C). The stoichiometry and the thermodynamic parameters of the interaction in these conditions were determined using ITC. The approximate Zeta potential and the turbidity were confirmed to be strong methods to approximate the stoichiometry of the interaction. For each pH-temperature combination, there was a given optimal molar ratio. The interaction was always spontaneous ( $\Delta G$  negative) and it was always enthalpy-driven (negative enthalpy). Unlike what can be found in literature, a raise in temperature also favored electrostatic interactions between GA and CN, which was related to the conformation and charges of the polymers. A raise in temperature lead to a compaction of CN and to a diminution of its steric hindrance and to the accessibility of its charges, forming coacervates for lower molar ratios. The same phenomenon happened upon a raise of pH. High temperatures favored coalescence leading to a more ordered system, disfavoring entropy (negative entropy parameter). It was also shown that a raise of pH could be tempered by a decrease in temperature in order to obtain the same objects, using a close thermodynamic pathway. Even for low molar ratios, by choosing a fitted pH/temperature combination, it was possible to form coacervates. Based on these results, it should be possible to control the formation of complexes by controlling the pH-temperature combination.

In the different conditions studied, different shaped-complexes were formed. The way they were formed and the shape of the objects might strongly influence their capacity to encapsulate and to deliver a molecule of interest. This study showed that by knowing the charges of polymers upon different parameters, it could be possible to predict the effect of these parameters on the coacervation of these polymers. It would also be interesting to find the better pH/temperature combination to limit coalescence. Moreover, it would be interesting to study the influence of ionic strength on the coacervates formation, due to the presence of counterions

masking the charges. Now that the mechanism and driving forces of the interactions are better understood, it should be used to investigate the relation between the shape of the complexes and their ability to encapsulate a molecule and to study the impact of the molecule on the coacervate added during the coacervates formation. Hopefully the different forms of the complexes could lead to encapsulation in different medium and to deliver the molecule to a chosen target. Other shapes of complexes could be obtained by taking other polymers or by modifying GA or CN for example.

## Acknowledgments

The authors acknowledge support of the LIBio by the "Impact Biomolecules" project of the "Lorraine Université d'Excellence"(Investissements d'avenir – ANR).

The authors acknowledge support of the CPER Agrovalor.

We would like to thank Nexira for kindly providing the gum Arabic used in this article.

We also thank Aurélie Seiler and Blandine Simard for the technical support.

## References

Aberkane, L., Jasniewski, J., Gaiani, C., Scher, J., & Sanchez, C. (2010). Thermodynamic characterization of acacia gum-beta-lactoglobulin complex coacervation. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 26(15), 12523–12533. <https://doi.org/10.1021/la100705d>

Abodinar, A., Smith, A. M., & Morris, G. A. (2014). A novel method to estimate the stiffness of carbohydrate polyelectrolyte polymers based on the ionic strength dependence of zeta potential. *Carbohydrate Polymers*, 112, 6–9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.063>

Anwunobi, A. P., Emeje, M. O. (2011). Recent applications of natural polymers in nanodrug delivery. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, s4(1). <https://doi.org/10.4172/2157-7439.S4-002>

Avadi, M. R., Sadeghi, A. M. M., Mohammadpour, N., Abedin, S., Atyabi, F., Dinarvand, R., & Rafiee-Tehrani, M. (2010a). Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1), 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.007>

Beppu, M. M., & Santana, C. C. (2002). Influence of calcification solution on in vitro chitosan mineralization. *Materials Research*, 5(1), 47–50. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392002000100008>

Bhatia, S. R., Khattak, S. F., & Roberts, S. C. (2005). Polyelectrolytes for cell encapsulation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10(1), 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.05.004>

Butstraen, C., & Salaün, F. (2014). Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum Arabic and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 99, 608–616. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.006>

Chen, R. H., & Tsaih, M. L. (1998). Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosans in dilute HCl solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23(2), 135–141. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(98\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00036-1)

Coelho, S., Moreno-Flores, S., Toca-Herrera, J. L., Coelho, M. A. N., Carmo Pereira, M., & Rocha, S. (2011). Nanostructure of polysaccharide complexes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363(2), 450–455. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.098>

de Kruif, C. G., Weinbreck, F., & de Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(5), 340–349. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.09.006>

Dickinson, E. (2008). Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein–polysaccharide interactions. *Soft Matter*, 4(5), 932–942. <https://doi.org/10.1039/B718319D>

Dickinson, E., Miller, R., Sanchez, C., Despond, S., Schmitt, C., & Hardy, J. (2001). Effect of heat and shear on  $\beta$ -lactoglobulin-acacia gum complex coacervation. *Food Colloids*, 332–342. <https://doi.org/10.1039/9781847550842-00332>

Duhoanimana, E., Yu, J., Mukeshimana, O., Habinshuti, I., Karangwa, E., Xu, X. Muhoza, B., Xia, S., Zhang, X. (2018). Thermodynamic characterization of Gelatin–Sodium carboxymethyl cellulose complex coacervation encapsulating Conjugated Linoleic Acid (CLA). *Food Hydrocolloids*, 80, 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.011>

Eratte, D., Wang, B., Dowling, K., J. Barrow, C., & P. Adhikari, B. (2014). Complex coacervation with whey protein isolate and gum arabic for the microencapsulation of omega-3 rich tuna oil. *Food & Function*, 5(11), 2743–2750. <https://doi.org/10.1039/C4FO00296B>

Espinosa-Andrews, H., Báez-González, J. G., Cruz-Sosa, F., & Vernon-Carter, E. J. (2007). Gum Arabic–chitosan complex coacervation. *Biomacromolecules*, 8(4), 1313–1318. <https://doi.org/10.1021/bm0611634>

Espinosa-Andrews, H., Enríquez-Ramírez, K. E., García-Márquez, E., Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C., & Vernon-Carter, J. (2013). Interrelationship between the zeta potential and viscoelastic properties in coacervates complexes. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.053>

Espinosa-Andrews, H., Sandoval-Castilla, O., Vázquez-Torres, H., Vernon-Carter, E. J., & Lobato-Calleros, C. (2010). Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological

features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers*, 79(3), 541–546. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.040>

Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.042>

Fathi, M., Martín, Á., & McClements, D. J. (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 39(1), 18–39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.06.007>

Feng, X., Leduc, M., & Pelton, R. (2008). Polyelectrolyte complex characterization with isothermal titration calorimetry and colloid titration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 317(1), 535–542. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.11.053>

Filion, D., Lavertu, M., & D. Buschmann, M. (2007). Ionization and solubility of chitosan solutions related to thermosensitive chitosan/glycerol-phosphate systems. *Biomacromolecules*, 8(10), 3224–3234. <https://doi.org/10.1021/bm700520m>

Jayme, M. L., Dunstan, D. E., & Gee, M. L. (1999). Zeta potentials of gum arabic stabilised oil in water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 13(6), 459–465. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(99\)00029-6](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(99)00029-6)

Joye, I. J., & McClements, D. J. (2014). Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 19(5), 417–427. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2014.07.002>

Kayitmazer, A. B. (2017). Thermodynamics of complex coacervation. *Advances in Colloid and Interface Science*, 239, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.07.006>

Kelly, R., Gudo, E. S., Mitchell, J. R., & Harding, S. E. (1994). Some observations on the nature of heated mixtures of bovine serum albumin with an alginate and a pectin. *Carbohydrate Polymers*, 23(2), 115–120. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)90035-3](https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)90035-3)

Kim, H. J., Yang, B., Park, T. Y., Lim, S., & Cha, H. J. (2017). Complex coacervates based on recombinant mussel adhesive proteins: their characterization and applications. *Soft Matter*, 13(42), 7704–7716. <https://doi.org/10.1039/C7SM01735A>

Kizilay, E., Kayitmazer, A. B., & Dubin, P. L. (2011). Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1–2), 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.06.006>

Lankalapalli, S., & Kolapalli, V. R. M. (2009). Polyelectrolyte complexes: a review of their applicability in drug delivery technology. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(5), 481–487. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.58165>

Li, D., Kelkar, M. S., & Wagner, N. J. (2012). Phase behavior and molecular thermodynamics of coacervation in oppositely charged polyelectrolyte/surfactant systems: a cationic polymer JR 400 and anionic surfactant SDS mixture. *Langmuir*, 28(28), 10348–10362. <https://doi.org/10.1021/la301475s>

Lopez-Torrez, L., Costalat, M., Williams, P., Doco, T., & Sanchez, C. (2015). Acacia senegal

vs. Acacia seyal gums – Part 1: Composition and structure of hyperbranched plant exudates. *Food Hydrocolloids*, 51, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.019>

Maqbool, M., Ali, A., & Alderson, P. G. (2010). A combination of gum arabic and chitosan can control anthracnose caused by *Colletotrichum musae* and enhance the shelf-life of banana fruit. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 85(5), 432–436. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/14620316.2010.11512693>

Moschakis, T., Murray, B. S., & Biliaderis, C. G. (2010). Modifications in stability and structure of whey protein-coated o/w emulsions by interacting chitosan and gum arabic mixed dispersions. *Food Hydrocolloids*, 24(1), 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.07.001>

Overbeek, J. T. G., & Voorn, M. J. (1957). Phase separation in polyelectrolyte solutions. Theory of complex coacervation. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 49(S1), 7–26. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030490404>

Priftis, D., Laugel, N., & Tirrell, M. (2012). Thermodynamic characterization of polypeptide complex coacervation. *Langmuir*, 28(45), 15947–15957. <https://doi.org/10.1021/la302729r>

Qiao, Y., Di, Z., Ma, Y., Ma, P., & Xia, S. (2010). Viscosities of pure water, acetic acid + water, and p-Xylene + acetic acid + water at different temperature and pressure. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 18(3), 446–454. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(10\)60242-X](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(10)60242-X)

Qin, J., & Gronenborn, A. M. (2014). Weak protein complexes: challenging to study but essential for life. *The FEBS Journal*, 1948–1949. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/febs.12744>

Renard, D., Garnier, C., Lapp, A., Schmitt, C., & Sanchez, C. (2012). Structure of arabinogalactan-protein from Acacia gum: from porous ellipsoids to supramolecular architectures. *Carbohydrate Polymers*, 90(1), 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.046>

Renard, D., Lavenant-Gourgeon, L., Ralet, M.-C., & Sanchez, C. (2006). Acacia senegal Gum: continuum of molecular species differing by their protein to sugar ratio, molecular weight, and charges. *Biomacromolecules*, 7(9), 2637–2649. <https://doi.org/10.1021/bm060145j>

Roldan-Cruz, C., Carmona-Ascencio, J., Vernon-Carter, E. J., & Alvarez-Ramirez, J. (2016). Electrical impedance spectroscopy for monitoring the gum Arabic–chitosan complexation process in bulk solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 495, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.02.004>

Roy, M. N., Ghosh, G., & Sarkar, L. (2010). Viscous synergic behaviour and solvent–solvent interactions occurring in liquid mixtures of aqueous alkanols with some alkanolic acids. *Physics and Chemistry of Liquids*, 48(5), 564–579. <https://doi.org/10.1080/00319100903161507>

Sakloetsakun, D., Preechagoon, D., Bernkop-Schnürch, A., & Pongjanyakul, T. (2015). Chitosan–gum arabic polyelectrolyte complex films: physicochemical, mechanical and mucoadhesive properties. *Pharmaceutical Development and Technology*, 1–10. <https://doi.org/10.3109/10837450.2015.1035727>

Sanchez, C., Mekhloufi, G., & Renard, D. (2006). Complex coacervation between  $\beta$ -lactoglobulin and Acacia gum: A nucleation and growth mechanism. *Journal of Colloid and*

---

*Interface Science*, 299(2), 867–873. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.02.031>

Schatz, C., Lucas, J.-M., Viton, C., Domard, A., Pichot, C., & Delair, T. (2004). Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers. *Langmuir*, 20(18), 7766–7778. <https://doi.org/10.1021/la049460m>

Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., & Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(8), 689–753. <https://doi.org/10.1080/10408699891274354>

Schmitt, C., & Turgeon, S. L. (2011). Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.10.001>

Shaddel, R., Hesari, J., Azadmard-Damirchi, S., Hamishehkar, H., Fathi-Achachlouei, B., & Huang, Q. (2018). Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 1800–1810. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.044>

Soni, B., Mahmoud, B., Chang, S., El-Giar, E. M., & Hassan, E. B. (2018). Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan/TEMPO biocomposite packaging films. *Food Packaging and Shelf Life*, 17, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.06.001>

Sonia, T. A., & Sharma, C. P. (2012). An overview of natural polymers for oral insulin delivery. *Drug Discovery Today*, 17(13–14), 784–792. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.019>

Tan, C., Xie, J., Zhang, X., Cai, J., & Xia, S. (2016). Polysaccharide-based nanoparticles by chitosan and gum arabic polyelectrolyte complexation as carriers for curcumin. *Food Hydrocolloids*, 57, 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.021>

Turgeon, S. L., Schmitt, C., & Sanchez, C. (2007). Protein–polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12(4–5), 166–178. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.07.007>

Veis, A. (2011). A review of the early development of the thermodynamics of the complex coacervation phase separation. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1–2), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.01.007>

Veis, A., & Aranyi, C. (1960). Phase separation in polyelectrolyte systems. I. Complex coacervates of gelatin. *The Journal of Physical Chemistry*, 64(9), 1203–1210. <https://doi.org/10.1021/j100838a022>

Xiong, W., Ren, C., Jin, W., Tian, J., Wang, Y., Shah, B. R., Li, J., Li, B. (2016). Ovalbumin-chitosan complex coacervation: phase behavior, thermodynamic and rheological properties. *Food Hydrocolloids*, 61, 895–902. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.018>

## Supplementary materials

Supplement data for Figure 3, 5, 7 and 9. ImageJ analysis of the micrographs (made on three micrographs per conditions) presenting the number of coacervates per micrograph, the coacervates average diameter and polydispersity index for each condition. Different letters mean that the statistical analysis showed significant differences between the results (p-value < 0.05).

**Table S1**

Conditions	Figure 3A		Figure 3B	
	pH 4.5 25 °C	pH 5.5 5 °C	pH 5.5 25 °C	pH 4.5 45 °C
Number of coacervates	264 18 <sup>a</sup>	194 52 <sup>a</sup>	353 17 <sup>b</sup>	359 51 <sup>b</sup>
Average diameter (µm)	4.0 0.5 <sup>ce</sup>	3.8 0.1 <sup>c</sup>	5.5 0.1 <sup>d</sup>	4.7 0.2 <sup>e</sup>
Polydispersity index	0.23 0.04 <sup>f</sup>	0.13 0.01 <sup>g</sup>	0.12 0.01 <sup>g</sup>	0.28 0.01 <sup>f</sup>

**Table S2**

Conditions	Figure 5									
	0:1	1:1	3:1	4:1	5:1	6:1	7:1	10:1		
Number of coacervates			88 8 <sup>a</sup>	747 82 <sup>b</sup>	663 65 <sup>b</sup>	245 59 <sup>c</sup>	149 30 <sup>d</sup>			
Average diameter (µm)	N/A	N/A	3.5 0.1 <sup>a</sup>	3.6 0.5 <sup>ab</sup>	3.9 0.1 <sup>b</sup>	3.9 0.1 <sup>b</sup>	3.4 0.1 <sup>a</sup>			N/A
Polydispersity index			0.06 0.01 <sup>a</sup>	0.09 0.03 <sup>ab</sup>	0.14 0.01 <sup>b</sup>	0.14 0.01 <sup>b</sup>	0.12 0.04 <sup>b</sup>			



**Table S3**

		Figure 7					
Conditions	1:1 4.5	1:1 5.0	1:1 5.5	4:1 4.5	4:1 5.0	4:1 5.5	
Number of coacervates			177 1 <sup>a</sup>	264 18 <sup>b</sup>	747 82 <sup>c</sup>	353 17 <sup>d</sup>	
Average diameter (µm)	N/A	N/A	4.3 0.5 <sup>a</sup>	4.0 0.5 <sup>a</sup>	3.6 0.5 <sup>a</sup>	5.5 0.1 <sup>b</sup>	
Polydispersity index			0.17 0.05 <sup>a</sup>	0.23 0.04 <sup>z</sup>	0.09 0.03 <sup>a</sup>	0.12 0.01 <sup>a</sup>	

**Table S4**

		Figure 9					
Conditions	1:1 5 °C	1:1 25 °C	1:1 45 °C	4:1 5 °C	4:1 25 °C	4:1 45 °C	
Number of coacervates				63 9 <sup>a</sup>	747 82 <sup>b</sup>	173 36 <sup>c</sup>	
Average diameter (µm)	N/A	N/A	N/A	5.3 0.5 <sup>a</sup>	3.6 0.5 <sup>b</sup>	7.3 0.8 <sup>c</sup>	
Polydispersity index				0.48 0.02 <sup>a</sup>	0.09 0.03 <sup>b</sup>	0.40 0.05 <sup>a</sup>	

### **3. Contribution de l'article**

Ce travail a permis d'étudier les interactions et les objets formés entre la gomme d'Acacia et le chitosane en fonction du pH (de pH 4,5 à 5,5) et de la température (entre 5 et 45 °C). Les paramètres thermodynamiques associés aux interactions ont été déterminés par titration calorimétrique isotherme (ITC). Des mesures de potentiel Zêta et de turbidité ont permis de corréler les résultats d'ITC. Ces résultats ont été étayés par des observations microscopiques afin de comprendre le mécanisme de formation des objets formés.

Dans un premier temps, il a été vérifié que les stœchiométries obtenues par ITC étaient proches de celles obtenues par mesure de potentiel Zeta (confirmant ainsi la présence d'une contribution majoritaire des interactions électrostatique), par turbidimétrie et par microscopie optique. Dans des conditions de pH et de température fixées (pH 5,0, 25 °C), des coacervats visibles en microscopie optique apparaissaient pour un ratio molaire GA/CN de 3 : 1. Le ratio optimal de coacervation était compris entre 3 : 1 et 4 : 1. Ce ratio correspondait au mélange pour lequel toutes les charges du chitosane étaient neutralisées par les charges de la gomme d'Acacia. Au-delà de ce ratio optimal, lorsque la gomme d'Acacia était en excès, la taille des coacervats diminuait jusqu'à disparaître. Ce phénomène était corrélé à des pics endothermiques en fin de titration calorimétrique isotherme, ce qui pouvait laisser penser à une **réorganisation de la matière** lorsque la gomme d'Acacia était en excès afin d'atteindre un nouvel équilibre dans le système. **La température et le pH influençaient le phénomène de coacervation complexe, que ce soit en terme de taille et de quantité des objets formés ou de paramètres thermodynamiques.**

De plus, il a été constaté que dans toutes les conditions étudiées, **l'interaction entre les polysaccharides était majoritairement dirigée par le paramètre enthalpique**. Une augmentation de pH ou de température favorisait le paramètre enthalpique et défavorisait le paramètre entropique. Ce résultat s'expliquait facilement en ce qui concerne le pH, car lors

---

d'une augmentation de pH de 4,5 à 5,5, la charge de la gomme d'Acacia restait inchangée mais celle du chitosane diminuait, ce qui signifiait que moins de gomme d'Acacia était nécessaire dans le mélange pour neutraliser les charges du polycation. Le système étant ainsi plus ordonné, l'entropie était défavorisée ou masquée par un phénomène enthalpique plus important.

Cependant, le fait que **l'augmentation de la température entre 5 et 45 °C défavorise le paramètre entropique était un résultat surprenant**, car l'opposé est généralement décrit dans la littérature. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait qu'à 45°C, le chitosane était moins chargé, car sa structure adopte une forme compactée à cette température, diminuant son encombrement stérique : moins de charges pouvaient interagir avec la gomme d'Acacia. Le système deviendrait alors plus ordonné et défavoriserait la contribution entropique. Les interactions électrostatiques avec la gomme d'Acacia seraient favorisées car l'encombrement stérique sur le chitosane serait diminué, favorisant le paramètre enthalpique [238,240].

Finalement, il a été observé que des coacervats pouvaient être obtenus même à des ratios différents de 4 :1 en jouant sur le couple pH/température. Il serait possible, **en contrôlant le ratio molaire et le couple pH/température, de contrôler la taille et le nombre des coacervats.**

Ces résultats ont permis de **mieux comprendre les interactions entre les polymères** lors du phénomène de coacervation complexe, d'avoir une idée plus précise du **mécanisme de formation des objets** ainsi que des paramètres thermodynamiques qui entrent en jeu lors de la coacervation entre la gomme d'Acacia et le chitosane. Afin d'approfondir la connaissance de ce système et d'avoir une idée plus précise des interactions potentielles entre les polysaccharides, il serait intéressant de les modifier pour, dans un premier temps, mieux comprendre les interactions précises qui régissent la formation d'objets, et dans un second temps d'essayer de modifier à la fois les conditions physico-chimiques et les polymères afin de fabriquer des objets à façon.

## **II. Publication 2 : Fonctionnalisation de la gomme d'Acacia par voie enzymatique : greffage des produits d'oxydation de l'acide férulique et identification de certains de ces produits**

### **1. Introduction**

Plusieurs études récentes sur la modification de la gomme d'Acacia sont le témoin de l'intérêt grandissant que suscite l'amélioration des propriétés de ce polymère, en particulier de ses capacités émulsifiantes [404–406]. Cependant, ces études portent exclusivement sur la modification de la gomme par voie chimique. Le laboratoire LIBio possède une grande expertise dans le domaine de la modification de polysaccharides par voie enzymatique, procédé réalisé dans des conditions douces et plus respectueuse de l'environnement. En effet, des travaux antérieurs [205,421] ont montré qu'il était possible de modifier respectivement le chitosane et la pectine par voie enzymatique en oxydant l'acide férulique grâce à la laccase de *Myceliophthora thermophila*. Les produits d'oxydation (POX) sont greffés sur les groupements amines (carbone C2 de la glucosamine) du chitosane par formation d'une base de Schiff et au niveau des acides carboxyliques (carbones C6 des unités galacturoniques) de la pectine par formation d'une liaison ester, modifiant ainsi certaines de leurs propriétés. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a à ce jour été réalisée sur la modification de la gomme d'Acacia par voie enzymatique. La gomme d'Acacia possédant à la fois des groupements amine et carboxylates, c'est par conséquent un polysaccharide de choix pour mettre en œuvre ce procédé de fonctionnalisation enzymatique. Ce travail visera dans un premier temps à répondre à cette question : **est-il possible de modifier la gomme d'Acacia par voie enzymatique ?**

Il est cependant assez peu envisageable de modifier la gomme d'Acacia par voie enzymatique par voie directe, car à cause de son encombrement stérique important, ses sites ne seraient

---

probablement pas accessibles à l'enzyme. Une solution était donc d'oxyder les produits à greffer pour les rendre réactifs et afin qu'ils puissent attaquer les groupements nucléophiles de la gomme d'Acacia. La réaction d'oxydation de l'acide férulique par la laccase de *Myceliophthora thermophila* génère des radicaux instables très réactifs qui peuvent se réorganiser spontanément par délocalisation des électrons. Ce phénomène peut conduire à la formation de dimères (phénomène principalement observé dans la littérature) puis d'oligomères par des réactions de couplage non enzymatique. De nombreuses modifications structurales, notamment par décarboxylation oxydative, peuvent également se produire augmentant ainsi le nombre de molécules potentiellement greffées sur le polysaccharide. Si des études ont commencé à s'intéresser aux structures de ces produits néoformés, la plupart d'entre elles se basent uniquement sur la masse des produits déterminée par LCMS. Cette technique permet de formuler des hypothèses, souvent très nombreuses, sur la structure d'un produit d'oxydation mais ne permet pas une identification précise. Des études plus poussées en utilisant la résonance magnétique nucléaire (RMN) sur des produits purifiés devraient permettre d'identifier précisément **la structure des produits d'oxydation**.

L'étude visera donc dans un premier temps à montrer la faisabilité de la fonctionnalisation de la gomme d'Acacia. La gomme d'Acacia étant un polysaccharide polydisperse, de grande taille et composé de plusieurs fractions, l'étude structurale de la gomme modifiée est complexe. Il a donc été envisagé, dans un second temps, d'étudier les produits d'oxydation en absence de gomme d'Acacia afin d'élucider leur structure.

## 2. Article: Gum Arabic functionalization through an enzymatic process: reaction route and intermediate products characterization

### Projet d'article dans Food Chemistry

Marie E. Vuillemin\*, Lionel Muniglia\*, Sabine Bouguet-Bonnet<sup>♦</sup>, Sophie Poinçon<sup>♦</sup>, Blandine Simard\*, Cédric Paris\*, Florentin Michaux\*, Jordane Jasniewski\*

Corresponding author: jordan.jasniewski@univ-lorraine.fr

\* Université de Lorraine, LIBio, F-54000 Nancy, France

<sup>♦</sup> Faculté des Sciences et Techniques, Methodologie RMN, UMR 7036, CNRS-Université de Lorraine, CNRS, F-54000 Vandoeuvre Cedex, France

KEYWORDS: gum Arabic; functionalization, phenol grafting, ferulic acid, oxidation product

### 1. Introduction

Gum Arabic (GA) is a sticky exudate of air-solidified sap from the trunks or tree branches of Acacia trees such as *Acacia Senegal* (*high quality gum*) and *Acacia seyal*, which essentially provides a friable gum (Idris, Williams, & Phillips, 1998; McNamee, O'Riorda, & O'Sullivan, 1998; Nussinovitch, 1997). GA is mainly composed of D-galactose (39 to 42%), L-arabinose (24 to 27%), L-rhamnose (12 to 16%), D-glucuronic acid and 4-O-Methyl- $\beta$ -D-glucuronic acid (15 and 16 %) a small amount of proteins (1.5 to 2.4%) (Idris et al., 1998). The polysaccharides and proteins present in GA are generally split into three main fractions (Hallén, 1972; Lewis & Smith, 1957): arabinogalactan (AG), arabinogalactan protein (AGP) and glycoprotein (GP). These fractions differ in their molecular weight, protein content and chemical composition.

The AG fraction, which represents about 88 % (in weight) of the total gum, has a molecular weight of  $2.8 \times 10^5$  g.mol<sup>-1</sup> and has only low protein content, below 1 % w/w (Sanchez et al., 2008). The AGP fraction, which represents 10 % of the total gum, is composed of five blocks

---

of carbohydrates of a molecular weight of  $2.10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ , bound together by amino-acid residues to form a compact structure (Randall, Phillips, & Williams, 1989). Its molecular weight is around  $1.10^6 \text{ g.mol}^{-1}$  (Mahendran, Williams, Phillips, Al-Assaf, & Baldwin, 2008) and its protein content is around 10 % w/w (Shi et al., 2017). The GP fraction, which represents about 2 % of the total gum (Sanchez et al., 2008; Thevenet, 2009), has a molecular weight of  $1.6.10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ . The association of the protein fraction and of the carbohydrate fraction of gum Arabic is responsible for its emulsifying capacity (Randall, Phillips, & Williams, 1988; Sanchez et al., 2017).

Recently, several studies are the witness of a growing interest for the modification of gum Arabic, especially aiming to improve its emulsifying properties (Sarika, James, Kumar, Raj, & Kumary, 2015; Shi et al., 2017; Wang, Williams, & Senan, 2014). Esterification of Acacia seyal gum with various octenyl succinate anhydride contents, significantly increase its apparent viscosity, emulsifying ability and enhancer of emulsion stability (Shi et al., 2017). On the other hand, the modification of the gum using dodecenyl succinic anhydride in aqueous solution caused its aggregation in solution at a given critical aggregation concentration (Wang et al., 2014). The emulsification efficiency was enhanced with increasing the hydrophobic content, along with the modified gum ability to reduce emulsion phase separation. Both studies suggested that their modified gum could be used for microencapsulation and emulsions stabilization purposes.

However, those studies are only focusing of the modification of the polysaccharide by chemical pathways. No study has been performed on the enzymatic modification of gum Arabic, which would be a greener way of modifying the polysaccharide. Some authors have been investigated the enzymatic pathway on other polysaccharides. Previous studies demonstrated that it was possible to modify chitosan and pectin by grafting oxidation products of ferulic acid activated by a laccase from *Myceliophthora thermophila* (Aljawish et al., 2012; Karaki et al., 2017).

Oxidation products were grafted to the amine groups (carbon C2 of glucosamine) of chitosan (by formation of a Schiff base) and onto the carboxylic acids (carbon C6 of galacturonic units) of pectin (by the formation of an ester bond), thus modifying many of their properties (Aljawish et al., 2016; Karaki, Aljawish, Muniglia, Humeau, & Jasniewski, 2016). NGA contains both amine groups and carboxyl groups, so the OXP could be grafted onto either or both sites. Furthermore, gum Arabic already contains approximately 2.8% w/w of phenolic compounds, 1.4% of which is ferulic acid, corresponding to 0.03% w/w ferulic acid naturally present in gum Arabic (Ayaz, Ramadan, Farid, & Alnahdi, 2016).

The main issue with this approach is that the laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid is currently not well-controlled. It generates highly reactive unstable radicals that can spontaneously reorganize and may lead to the formation of phenolic oligomers. Many structural changes, including oxidative decarboxylation, may occur, thus increasing the number of possible structures grafted onto the polysaccharide. Those structures have not been completely identified yet. Furthermore, the existing identification of such products rely mostly on hypothesis based on the products molecular weight obtained by liquid chromatography-mass spectrometry (LCMS) measurements (Aljawish et al., 2014; Carunchio, Crescenzi, Girelli, Messina, & Tarola, 2001; Karaki et al., 2017). Yet, for one molecular weight, multiple structures could be proposed. Some studies have demonstrated that several structures of the same molecular weight could coexist, based on nuclear magnetic resonance (Ralph, Quideau, Grabber, & Hatfield, 1994).

The first aim of this study was to prove the feasibility of modifying gum Arabic by an enzymatic pathway. The laccase of *Myceliophthora thermophila* was used to initiate the reaction in an aqueous medium and under soft conditions. Color tracking upon reaction time, FTIR and NMR spectroscopies have been performed to confirm the modification of the polysaccharide. The second aim of this study was to investigate the structure of the products grafted on gum Arabic,



---

in order to better understand the structural changes observed on the modified gum. HPLC, LCMS and NMR analysis were used to resolve the structure of reactions products coming from the ferulic acid oxidation by the laccase. This eco-friendly procedure was expected to improve phenol content of gum Arabic and to provide then a new functional ingredient.

## 2. Experimental

### 3.1. Materials

Gum Arabic (GA) Instantgum AA from *Acacia senegal* was a gift from Nexira (France). Ferulic acid (purity about 99%) (FA), anhydrous sodium phosphate dibasic ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), anhydrous potassium phosphate monobasic ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), trifluoroacetic acid (TFA), deuterated water and deuterated methanol were purchased from Sigma-Aldrich (France). Analytical grade Methanol, ethanol, formic acid and acetonitrile were purchased from Carlo Erba (Milwaukee, WI, USA). The enzyme used for the oxidation was commercialized as "Novozym® 51003" from Novozym (Bagsvaerd, Denmark). It is a fungal laccase from *Myceliophthora thermophila*, a polyphenol oxidase produced by submerged fermentation of a genetically modified *Aspergillus oryzae* (Berka et al., 1997). The laccase activity was determined by following the apparition of the oxidation product of syringaldazine (the reference substrat for laccase activity determination). The laccase stock activity was  $32\,038 \pm 1\,322$  LAMU.g<sup>-1</sup> (at 30 °C, pH 7.4).

### 3.2. Methods

#### 2.2.1. Enzymatic oxidation of FA and its grafting onto gum Arabic

The method used to functionalize gum Arabic through an ferulic acid oxidation was adapted from previous protocols (Aljawish et al., 2012; Karaki et al., 2017). 1 g of gum Arabic was dispersed in 45 mL of phosphate buffer (50 mM, pH 7.4). For the preparation of ferulic acid oxidation products (OXP) the same protocol has been performed but without gum. The

dispersion was stirred at 450 rpm for 1 h at 30 °C. 5 mL of ferulic acid dissolved in methanol (50 mM) was added to the batch. Once the temperature was stable, 13.5 UI.mL<sup>-1</sup> of Novozym® 51003 was added to trigger the reaction. The batch was then stirred at 30 °C for 50 min. 150 mL of ethanol stored at -20 °C was then added to stop the reaction and separate the non-functionalized GA from the functionalized GA. The obtained mixture containing functionalized GA (FGA), non-grafted FA oxidation products (OXF) (soluble in the phosphate buffer/ethanol mixture) and non-functionalized GA (insoluble in the phosphate buffer/ethanol mixture) was then centrifuged for 20 min at 20 °C 12000 g with a Beckmann centrifuge (Beckman Coulter Inc., Villepinte, France).

For FGA experiments, the precipitate contained non-functionalized GA and a part of phosphate buffer salts (verified by FTIR measurements, data not shown), whereas the supernatant contained the functionalized GA and the ferulic acid oxidation products not grafted on GA. For the experiments without gum Arabic (oxidation products formation), the precipitate only contained buffer salts and the supernatant contained the OXF.

The ethanol was then eliminated with a rotary evaporator BuchiR144 (Buchi SARL, Rungis, France) at a boiling point of 40 °C at 175 mbar. Some amount of water from the buffer solution was also evaporated by decreasing the pressure until 72 mbar.

### 2.2.2. Purification of the component

For FGA, the residual solution was dialyzed against ultrapure water with a high grade regenerated membrane (MWCO 10 000 Da from Membrane Filtration Products Inc.) to eliminate excess salts from the buffer and non-grafted FA oxidation products (OXF). Dialysis was stopped when the conductivity outside the membrane was equal to the one of ultrapure water. The same method was used to eliminate excess salt from native gum Arabic (NGA). For the OXF, they were purified using Sephadex PD-10 pre-packed columns (Sephadex™,

Buckinghamshire, United Kingdom). The dialyzed FGA and NGA and the purified OXP were then freeze-dried for 72 h. The powders obtained were stored in a desiccator, in the dark, at 4 °C until use.

### 2.2.3. Solubilization of the products

The solutions were prepared by dissolving FGA, NGA or OXP in ultra-pure water. The solutions were stirred at 400 rpm overnight at 4 °C to ensure total solubilization of the products.

### 2.2.4. Color modification during the oxidation reaction

During the functionalization of gum Arabic and the oxidation of ferulic acid by the laccase *Myceliophthora thermophila*, a change of the color of the mixtures was observed. The color evolution of the reaction medium was measured with a spectrophotometer CR-5-Konica Minolta (Konica Minolta Sensing, Europe B.V.). Prior to each run, the device was calibrated using two standards (white and black). Every 10 min, CIE color parameters ( $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ ) were measured by placing 4 mL of the reaction mixture in the spectrophotometer tank.  $L^*$  defines lightness and ranges from 0% (black) to 100% (white). The  $a^*$  parameter denotes the red/green value and  $b^*$  the blue/yellow value. The color difference ( $\Delta E$ ) between samples was obtained using Eq.1.

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

### 2.2.5. Monitoring of the ferulic acid consumption during the oxidation reaction (HPLC)

The oxidation of ferulic acid during the enzymatic reaction was monitored by high performance liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu Class-VP HPLC). 100  $\mu\text{L}$  of the reaction medium was collected and placed in 2 mL microtubes containing 900  $\mu\text{L}$  of pure methanol to stop the

reaction (the enzyme precipitate in methanol). Prior to analysis, samples were filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  syringe filter and half diluted in ultra-pure water. 5  $\mu\text{L}$  was injected into the HPLC system. The separation was performed on an apolar GRACE Apollo C18 chromatography column (150 x 2.1 mm x 5  $\mu\text{m}$ ). The elution method consisted of a two-phase gradient: a phase A (ultra-pure water/methanol./TFA 80:20:0.1) and a phase B (100% methanol). The gradient used consisted in 2 min of 20% of phase B, then 19 min of 90% of phase B and finally 10 min of 20% of phase B. The detection was carried out between 190 and 900 nm on a multichannel photo-diode-array detector (SPD-M10A VP). The results were recorded and processed by a chromatogram processing software (LC solution). The amount of AF was measured at its maximum absorption (322 nm) after making a standard ferulic acid calibration from 0.1 to 0.5 mM.

#### 2.2.6. Measurement of the approximate Zeta potential

The approximate Zeta potential of FGA, NGA and OXP (1.00% w/v) were calculated from measurement of the electrophoretic mobility at 25 °C, at pH 5.5, using a Zetasizer Nano-ZS instrument (Malvern Panalytical, United Kingdom) equipped with a He/Ne ion laser ( $\lambda= 532$  nm). Measurements were collected on a detector at 173°. The instrument determined the Zeta potential with the Smoluchowski equation (Jayme, Dunstan, & Gee, 1999). All measurements were made in triplicate.

#### 2.2.7. Structural characterization of the modified gum Arabic

##### 2.2.7.1. Fourier-transform infrared spectroscopy analyses (FT-IR)

To compare the NGA, FGA and OXP structures, Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) analyses were performed using a Tensor 27 spectrometer equipped with a DTGS detector (Bruker, Germany). The sample was placed on an ATR cell (Attenuated Total Reflectance,

ATR Platinum Brucker) and compressed on the crystal. 64 scans were performed at a resolution of  $6\text{ cm}^{-1}$  and an acquisition frequency of 10 kHz at room temperature in a spectral range of 400 to  $4000\text{ cm}^{-1}$ . A Fourier transform was applied to the raw interferograms to obtain spectra using OPUS software (Brucker). Before each measurement, an air spectrum was recorded under the same conditions as the sample. This reference spectrum was automatically subtracted from the sample spectrum. The results presented are the average result of three measurements, which have undergone successive treatments. The peaks of  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CO}_2$  were compensated. A straight line was generated from  $2280$  to  $2400\text{ cm}^{-1}$  to remove the artefact peak of absorbance caused by the diamond. Then the spectrum was converted from attenuated total reflexion to absorbance spectrum. Then a vector normalization and a baseline correction were performed. For each sample, 6 independent spectra were recorded. The spectra obtained were averaged and the standard deviation ensured the repeatability and reproducibility of the measurements.

#### 2.2.7.2. Nuclear magnetic resonance analyses

Native gum Arabic (NGA) and functionalized gum Arabic (FGA) were characterized by NMR. They were solubilized in a deuterated water at concentrations of 5.0% and 4.5% w/v, respectively. The solutions were then analyzed by NMR to determine their molecular structure and the proximity of the atoms from each other, by using a combination of 1D and 2D NMR techniques. Experiments were performed on a spectrometer operating at 9.4 Tesla (Bruker Avance III, frequencies of 400 MHz and 100.6 MHz for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ , respectively), using a Bruker 5mm BBFO probe. Pulse widths were 14.1 and 10.5  $\mu\text{s}$  for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ , respectively. All experiments were performed at room temperature. The  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  decoupled from  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY and  $^1\text{H}$  diffusion NMR experiments were run under standard conditions. For HMBC experiment, a 50 ms waiting period was used for the evolution of long-range coupling and a value of 3.4 ms for the low-pass  $J$  filter. ROESY was

run with a spin-lock of 100 ms for mixing and diffusion measurements were done using standard stimulated echoes with bipolar gradient pulses, with  $\Delta$  300 ms,  $\delta$  2.3 ms, and 64 points for linear increment of the gradient between 0.96 and 47.2 G.cm<sup>-1</sup>.

## 2.2.8. Structural characterization of the oxidation products

### 2.2.8.1. Separation and purification of oxidation products

Separation and purification of the oxidation products (OXP) were performed using high-performance semi-preparative liquid chromatography (Gilson Inc., Middleton, USA). Results were processed using the Trilution @ LC software. The OXP separation was carried out using an apolar inverted phase column GRACE Apollo C18 (250 x 22 mm x 5  $\mu$ m). The detection was carried out at 322 nm on a UV/Vis 156 detector. The elution gradient consisted in a phase A (ultra-pure water and formic acid 100:0.1) and a phase B (acetonitrile and formic acid 100:0.1) at a flow rate of 10 mL.min<sup>-1</sup>. 1 mL of sample was injected into the column at a concentration of 4% w/v. The gradient consisted in 10% of the phase B for 2 min, then 60% for 78 min, 99% for 5 min and finally 10% for 5 min. The separated, purified OXP were recovered from the column outlet in glass tubes. The solvents were evaporated using a rotary evaporator Buchi R144 (Buchi SARL, Rungis, France). The OXP were freeze-dried and then stored at 4 °C in a desiccator until use.

### 2.2.8.2. Determination of the molar mass of the oxidation products by Liquid chromatography-mass spectrometry measurements

The mass spectra of the OXP were obtained with a HPLC-MS system, which comprised of a binary solvent delivery pump and a linear ion trap mass spectrometer (LTQ-MS, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). The LTQ was equipped with an atmospheric pressure ionization interface operating in APCI positive mode (Atmospheric Pressure Chemical

Ionisation). Data were processed using Xcalibur software (version 2.1, ThermoScientific). The spray voltage was 5.0 kV. The temperature of the heated capillary was set to 300 °C. The flow rates of sheath gas, auxiliary gas, and sweep gas were set (in arbitrary units/min) to 40, 10, and 10, respectively. Capillary voltage was 48 V, tube lens was 80 V, split lens was -44 V, and the front lens was -3.25 V. All parameters were optimized by infusing a standard solution of ferulic acid at 0.1 g/l in mobile phase (phase A = water + formic acid 0.1% and phase B = acetonitrile + formic acid 0.1%) at a flow rate of 5  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ . In addition to a full scan between 50 m/z and 1000 m/z, the products were monitored through specific MS<sup>n</sup> scans (MS<sub>2</sub>, MS<sub>3</sub>) in order to obtain structural information.

#### 2.2.8.3. Nuclear magnetic resonance analyses

OXP were characterized by NMR according to the same method described for NGA and FGA. The only difference was the solvent and concentration used which in this case were a deuterated water/deuterated methanol mixture (50:50) at a concentration of 20 mM. The structure determination was done using <sup>1</sup>H, J-modulated <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-TOCSY, and <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Color modification during the reaction

The first event that reflected a significant change during the functionalization of gum Arabic (GA) and the oxidation of ferulic acid (FA) was a color change (pictures from Figure 1). Indeed, it was already shown in a previous study (Aljawish et al., 2014) that the oxidation products of ferulic acid (OXP) were generally colored. Other polymers grafted with ferulic acid oxidation products color were gradually modified towards yellow–orange during functionalization (Aljawish et al., 2014; Karaki et al., 2017). On Figure 1, the color difference of the reaction

medium between the initial mixture and the oxidation reaction of ferulic acid at different time are presented with and without gum Arabic. FGA and OXP color difference (between  $t_0$ , the beginning of the reaction and a chosen time  $t$ ) increased upon time, meaning that changes occurred from the beginning of the reaction until its end (50 min). The values of color difference of FGA were significantly different when compared with those of OXP. The color change was more pronounced without gum Arabic (OXP). However, the tendencies were close. One hypothesis was that the difference of color between FGA and OXP was not due to a difference of oxidation rate but that it was due solely to the presence of gum Arabic. Indeed, gum Arabic was not soluble in the buffer (heterogeneous catalysis), so the presence of the polymer could have made the mixture a little turbid, thus changing the color parameters. In order to verify the presence of Arabic gum did not change the laccase activity or the ferulic acid consumption rate, the consumption of ferulic acid in the reaction mixtures was monitored by HPLC throughout the functionalization.

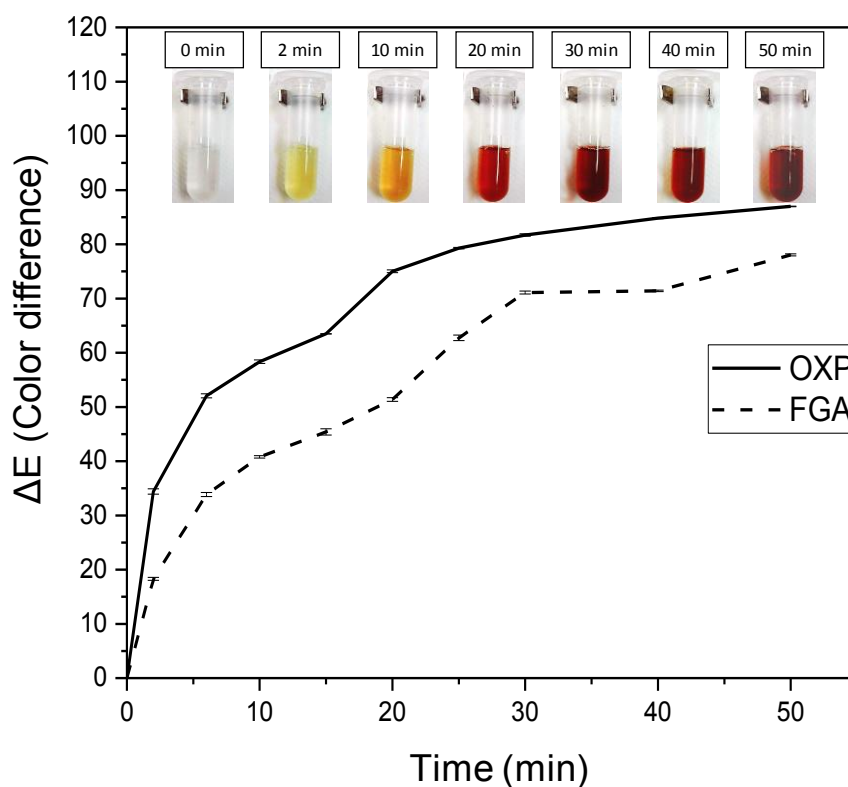
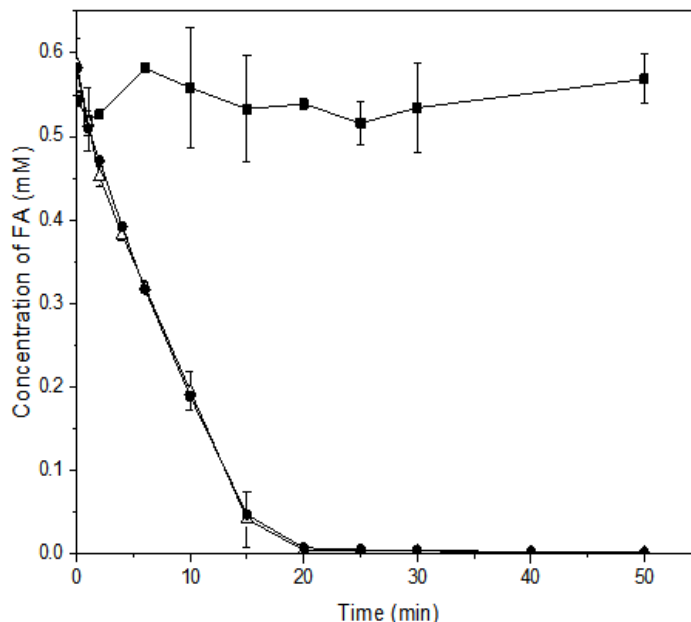


Figure 1: Color difference of the reaction medium between the initial batch and the oxidation reaction of ferulic acid at different time, with gum Arabic (dashed curve) and without gum



*Arabic (straight curve). Photographs of the macroscopic aspect of the batch without gum Arabic during the reaction.*

### 3.2. Monitoring of the ferulic acid consumption during the reaction



*Figure 2: Ferulic acid concentration in phosphate buffer (50 mM, pH 7.4, 30 °C) containing ferulic acid + gum Arabic + laccase (Δ), ferulic acid + laccase without gum Arabic (●) and ferulic acid + gum Arabic without laccase (control) (■).*

The consumption of ferulic acid during the reaction with or without gum Arabic was monitored by assaying its disappearance from HPLC analysis. A control was made with gum Arabic and ferulic acid without laccase to ensure the FA concentration would not decrease without laccase, i.e. that FA did not adsorb onto gum Arabic. The results presented on Figure 2 indeed confirmed that FA concentration did not decrease upon time without the enzyme. Physicochemical interactions between phenolic acids and polysaccharides have already been observed by other authors (Padayachee et al., 2012), but in this case, the assumption that ferulic acid would adsorb onto gum Arabic chains was ruled out. However, when laccase was added, the FA concentration decreased rapidly and similarly with or without gum Arabic ( $0.52 \pm 0.01$  mM FA/min for OXP and  $0.52 \pm 0.02$  mM AF/min for FGA). These results suggested the presence of gum Arabic did

not interfere with the laccase activity and did not affect the reaction rate. Some authors have reported the rate of reaction of phenol substrate would be slowed down by adding a polymer (Karaki et al., 2017; Sun, Payne, Moas, Chu, & Wallace, 1992; Wada, Ichikawa, & Tatsumi, 1993) but another study on functionalization (Aljawish et al., 2012), also performed under heterogeneous catalysis, demonstrated that the presence of the polymer would not change the reaction rate.

On Figure 2, it can be observed that almost all ferulic acid was consummated after 20 min ( $0.005 \pm 0.001$  mM remained for OXP and  $0.002 \pm 0.001$  mM for FGA). This result was quite surprising because the color of the reaction still evolved between 20 and 50 min for both reactions (Figure 1). This could be explained by the reaction pathway. Laccase oxidize phenols in ortho or para position into quinones and semi-quinones (Witayakran & Ragauskas, 2009) that are unstable and can then react with other molecules. Once they are formed, according to the resulting structure, the oxidation products can still be “re-oxidized” by the enzyme. Numerous structural changes may also occur, for example by oxidative decarboxylation, thus increasing the number of possible structures grafted onto the polysaccharide (Aljawish et al., 2012; Karaki et al., 2016). In order to understand the changes that occurred after FA was consummated, the number of oxidation products formed and their evolution upon time, the absorbance at 322 nm of the oxidation products of ferulic acid at different retention time, from the beginning of the reaction to its end was studied. The ferulic acid area under the curve at 11.4 min was used to follow its disappearance upon time. The other peaks that appeared corresponded to the oxidation products.

The absorbance peak at 11.4 min corresponded to the one of ferulic acid. The decrease of the area of this peak was used to determine the concentration of ferulic acid upon time (Figure 2). The absorbance at 322 nm of the mixtures (Figure 3) revealed the presence of several peaks that corresponded to different oxidation products. Their retention times were higher than the

one of ferulic acid (11.4 min), meaning they were more hydrophobic related to the eluent composition.

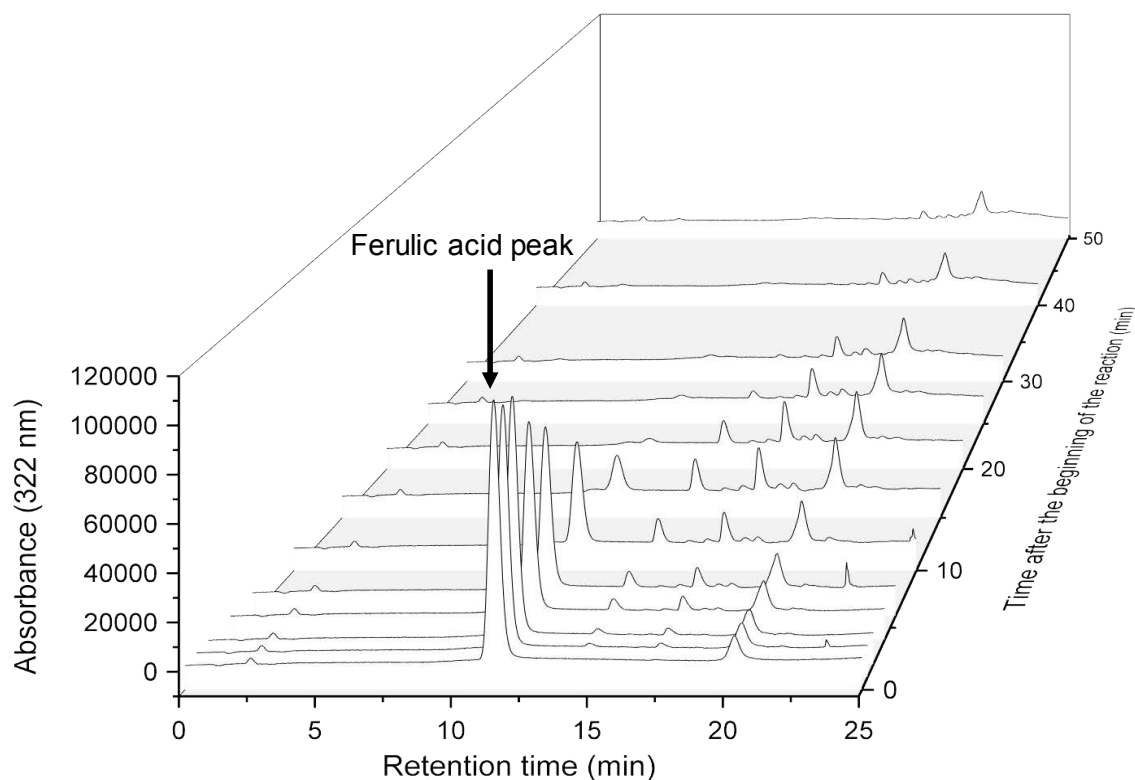


Figure 3: Chromatogram at 322 nm of the oxidation products of ferulic acid at different reaction time, from the beginning of the reaction to the end of the reaction (50 min).

Some products were formed during the reaction but had disappeared before the end (for example the peak at a retention time of 14.7 min). At the end of the reaction, a massive group of peaks was observed in the range of retention time from 17.0 to 21.1 min. The oxidation products did indeed change between 20 and 50 min of reaction, thus explaining why the color of the samples would change (Figure 1) even after all FA was consummated.

Two interrogations arose from these results. First, gum Arabic has several sites which may react with the oxidation products present in the reaction media. The OXP could react with these functional groups to be covalently linked to the polysaccharide or could react with each other. The grafting of these products onto gum Arabic was thus investigated. Secondly, each observed absorbance peaks corresponded to one oxidation product which may react with the

polysaccharide.

### 3.3. Charge of native and functionalized gum Arabic

The Approximate Zeta potentials of NGA, FGA and OXP in ultrapure water were measured at pH 5.5, 25 °C, at 1 % w/v (Table 1). The NGA Approximate Zeta potential was  $-25.8 \pm 0.6$  mV, which was related to the presence of the carboxylic groups of the glucuronic acid, deprotonate at this pH. This value decreased to  $-30.1 \pm 0.9$  mV when gum Arabic was functionalized. The oxidation products approximate Zeta potential was also measured.

*Table 1: Approximate Zeta potential (mV) of native gum Arabic, functionalized gum Arabic and oxidation products solutions at 1 % w/v, at pH 5.5 and 25 °C.*

Approximate Zeta potential (mV)	
NGA	$-25.8 \pm 0.6^a$
FGA	$-30.1 \pm 0.9^b$
OXP	$-36.5 \pm 1.8^c$

Their charge was even lower. Indeed, several authors already studied the ferulic acid oxidation products molar mass and suggested that they would be mostly charged dimers of ferulic acid (Adelakun et al., 2012; Aljawish et al., 2014). The decrease of the charge of gum Arabic after functionalization was the first hint that the oxidation products were absorbed or grafted onto it, however it was not possible to make hypothesis on where it was grafted. They could possibly be grafted onto amino groups of the proteinaceous fraction by forming a Schiff base bound as for chitosan (Aljawish et al., 2012) or onto carboxyl groups of the glucuronic acids by forming an ester as for pectin (Karaki et al., 2017). Since the OXP were negatively charged, the negative charge of gum Arabic was expected to be stable or to increase, whether they replace a carboxylic charge or an amine charge. IR spectroscopy was expected to provide more detailed information

about the location of the grafting.

### 3.4. Structural modification of gum Arabic after functionalization

FT-IR analyses were performed aiming to highlight the chemical differences between the native and the modified gum Arabic (Figure 4) using OXP signal to ease the comparison. It was shown that the fingerprint of gum Arabic (between 900 and 1200  $\text{cm}^{-1}$ ) was maintained in FGA, confirming that the polysaccharide backbone was unchanged by the enzymatic reaction.

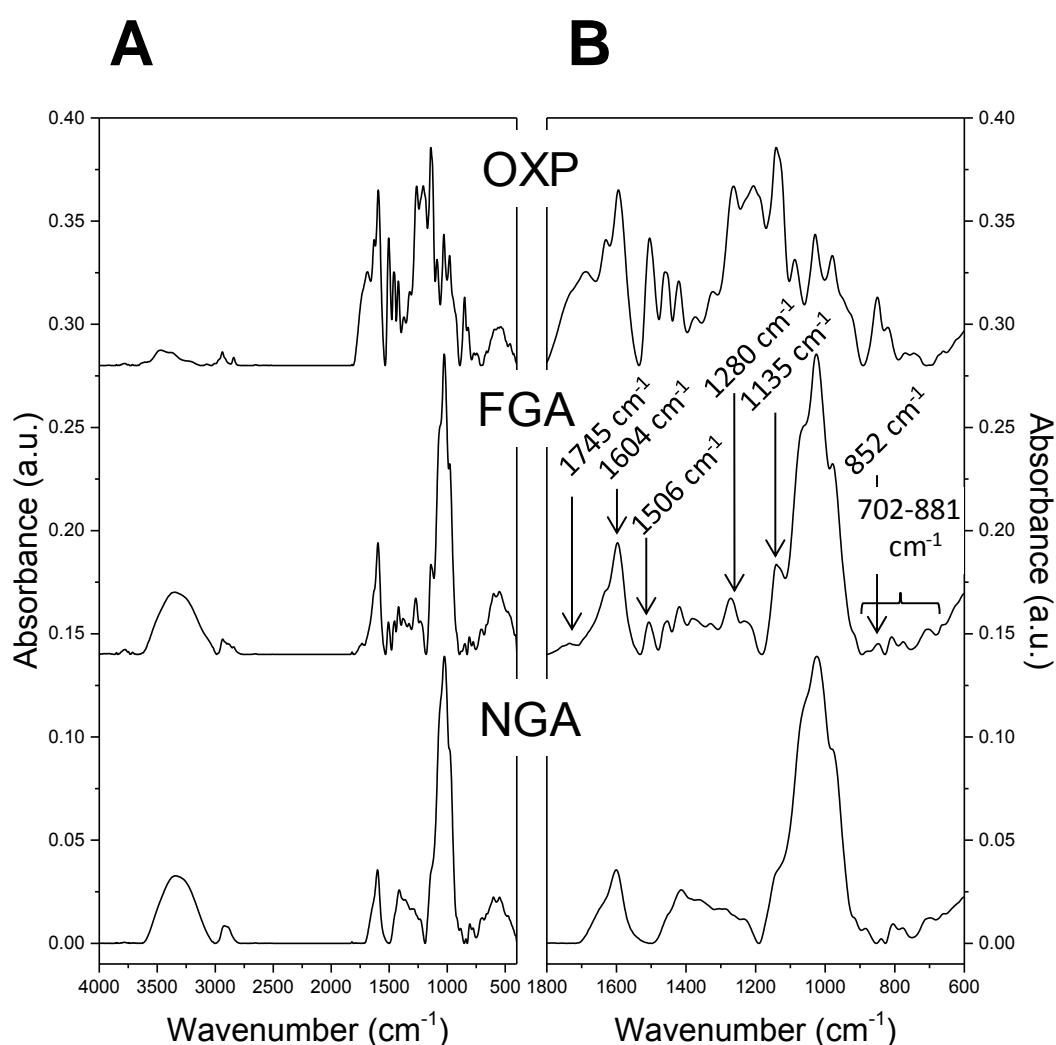


Figure 4: FTIR spectra of oxidation products (OXP) (shifted from 0.48 a.u.), functionalized gum Arabic (FGA) (shifted from 0.14 a.u.) and native gum Arabic (NGA) (A: whole wavenumber range from 400 to 4000  $\text{cm}^{-1}$ , B: focused between 600 and 1800  $\text{cm}^{-1}$ ).

The higher absorbance at 1135  $\text{cm}^{-1}$  observed for FGA could be attributed to a C-O stretches

(Gnanasambandam & Proctor, 2000) and could be correlated to the signal at  $1280\text{ cm}^{-1}$  related to the elongation of ester bounds between the carboxyl groups of GA and the OXP (Espinosa-Andrews, Sandoval-Castilla, Vázquez-Torres, Vernon-Carter, & Lobato-Calleros, 2010). The absorption increase at  $1506\text{ cm}^{-1}$  and  $1604\text{ cm}^{-1}$  on FGA could be linked to the apparition of a monosubstituted amide. At  $1745\text{ cm}^{-1}$  the absorption peak could be linked to the vibration of a C=O. It could be related to a gain in amide II or in ester bound (Gnanasambandam & Proctor, 2000). Finally, the absorption peak at  $3778\text{ cm}^{-1}$  could be related to an elongation of the free NH groups. It could not be excluded that the grafting could have been performed by forming both amide and ester bonds. The presence of the oxidation products can also be detected at  $852\text{ cm}^{-1}$ , which is usually attributed to para-substituted aromatic rings of FA-oxidation products (Kačuráková, Capek, Sasinková, Wellner, & Ebringerová, 2000; Karaki et al., 2017). The main uncertainty relied on the presence of these new peaks also being in the spectra of OXP, so their mere presence could enhance the intensities of the peaks. However, FGA was dialyzed, so not-grafted products should have been removed from the sample. These observations led to conclude that the structure of gum Arabic was modified by the grafting of oxidation products but they could not be located. In order to get better insight of the location of the grafting, modified gum Arabic was studied by Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

NMR was used in order to characterize the changes brought to the structure of gum Arabic chains due to the grafting of OXP.  $^1\text{H}$  NMR experiments were performed on three samples: OXP, NGA and FGA (Figure 5). The signals of NGA and FGA were crowded between 3.0 and 6.0 ppm, which is typical of polysaccharides and reflects the presence of the sugar residues (Nie et al., 2013). Those signal have not been deteriorated after functionalization, meaning that the polymer main structure was preserved. On the OXP spectrum, the peaks between 6.0 and 7.5 ppm were characteristic of aromatic proton (Sajjadi, Shokoohinia, & Moayedi, 2012). On the spectrum of dialyzed FGA, broad signals are visible in this aromatic compounds area (6.0 to

7.5 ppm), which corresponded to the grafted OXP. The signal was not very intense due to the weak grafting rate and to the broadening due to the loss of mobility occurring in the grafting.

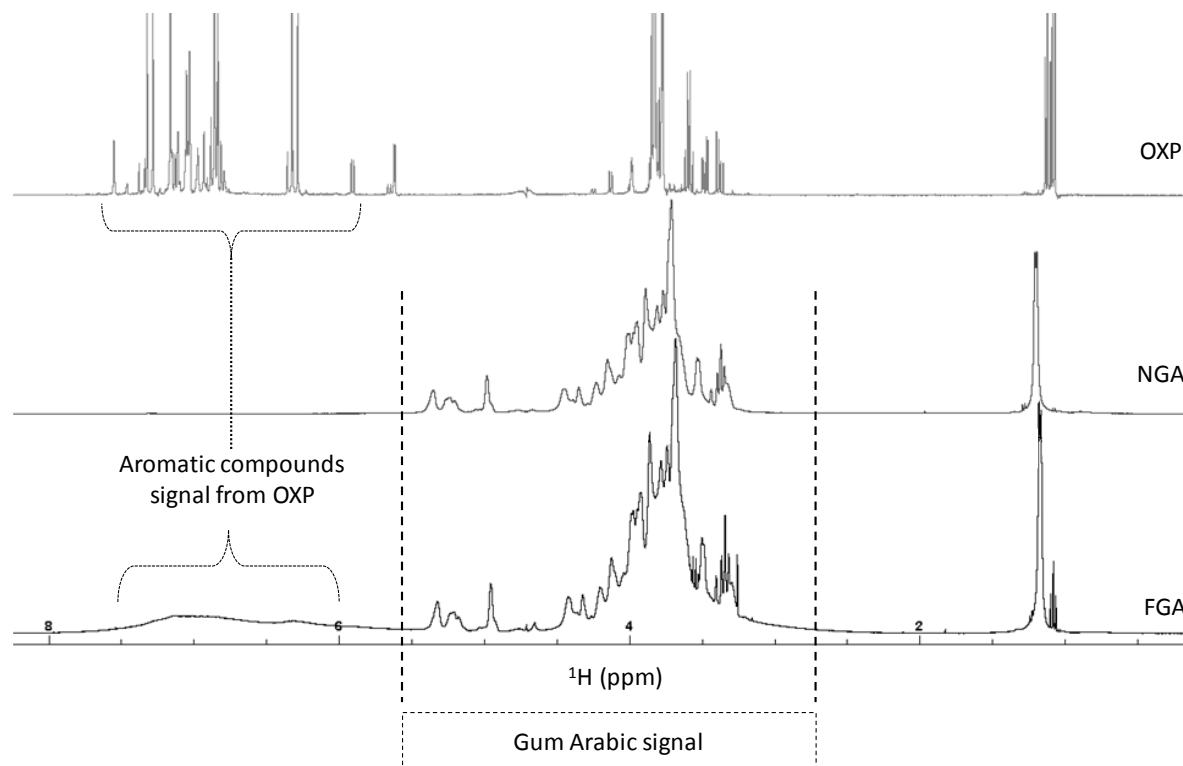


Figure 5:  $^1\text{H}$  NMR spectra of oxidation products (OXP), native gum Arabic (NGA) and functionalized gum Arabic (FGA).

Pulsed field gradient (PFG) is a common NMR technique to study the diffusion of polymers (Callaghan & Pinder, 1985; Dixon & Larive, 1997; Oostwal, Bles, de Bleijser, & Leyte, 1993). Such measurement was made on the NGA and FGA samples.

NGA was found to have a unique diffusion coefficient (around  $1 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , data not shown). Results obtained on the FGA sample (Figure 6) were analyzed considering two distinct areas of the  $^1\text{H}$  one-dimensional NMR spectrum. In the area corresponding to the gum signal only (between 5.0 and 5.5 ppm), a unique diffusion coefficient was obtained, as shown by signal monotonous evolution obtained in the inset of Figure 6. The obtained value of  $2 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , slightly higher than the one obtained with NGA, indicated a decrease in medium viscosity and/or a decrease of the polymer size after functionalization. In the area corresponding to OXP

signals (6.0 to 7.5 ppm), two diffusion coefficients were obtained, as indicated by the slope break on the inset of Figure 6.

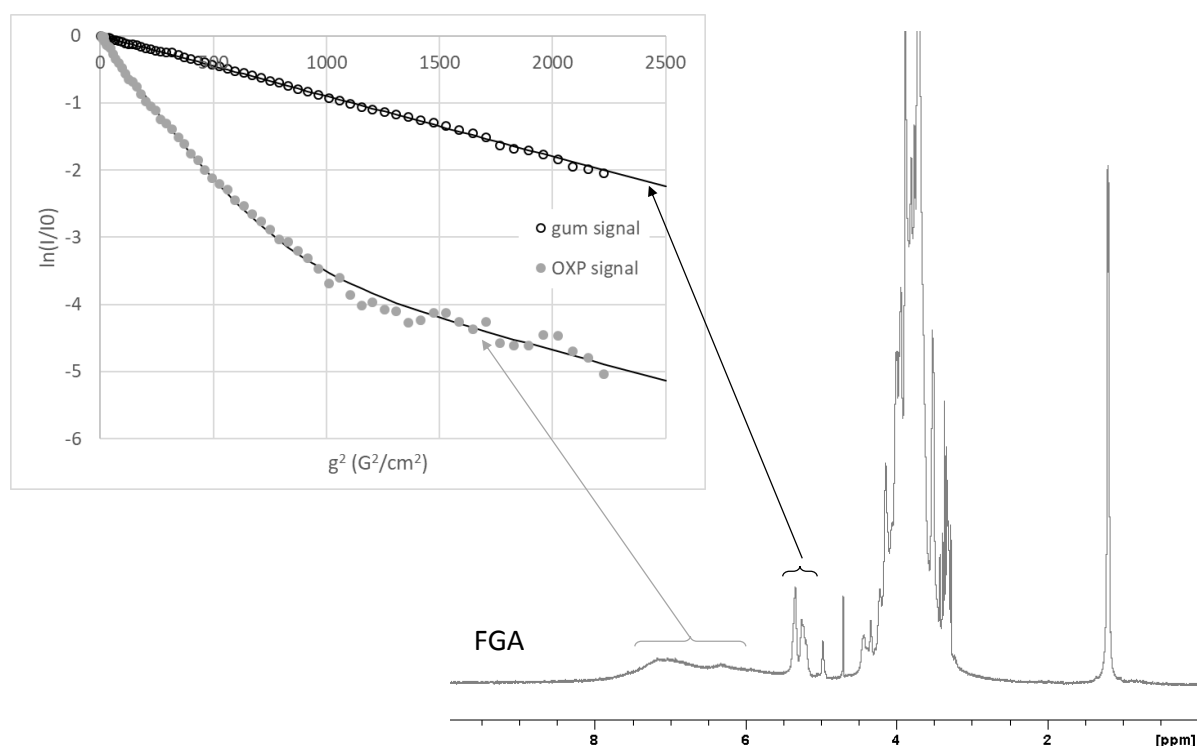


Figure 6:  $^1\text{H}$  NMR spectra of functionalized gum Arabic (FGA). In the inset: evolution of the signal ( $\ln$  of the signal in function of the gradient  $g$  applied) obtained by pulsed field gradient measurement, for two different areas of the spectra. ( $\bullet$ ) Signal of OXP from 6.0 to 7.5 ppm; ( $\circ$ ) signal of gum Arabic from 5.0 to 5.5 ppm. The diffusion coefficients were obtained from these evolutions.

These two coefficients indicated that there were two types of OXP. One of the diffusion coefficients was the same as the one of the gum signal of FGA ( $2 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , parallel lines on the graph from 1000 to  $2500 \text{ G}^2 \cdot \text{cm}^{-2}$ ) and could therefore be attributed to a fraction of OXP linked to the gum. The other coefficient was faster (around  $8 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) and could be attributed to a fraction of OXP that were not directly linked to the functionalized gum Arabic. This fraction could correspond to a small fraction of non-grafted oxidation products that were not eliminated during dialysis because they were strongly adsorbed on FGA. Diffusion measurements could thus show that a fraction of OXP was grafted onto FGA, 2D NMR approaches were then performed in order to locate where they were grafted.



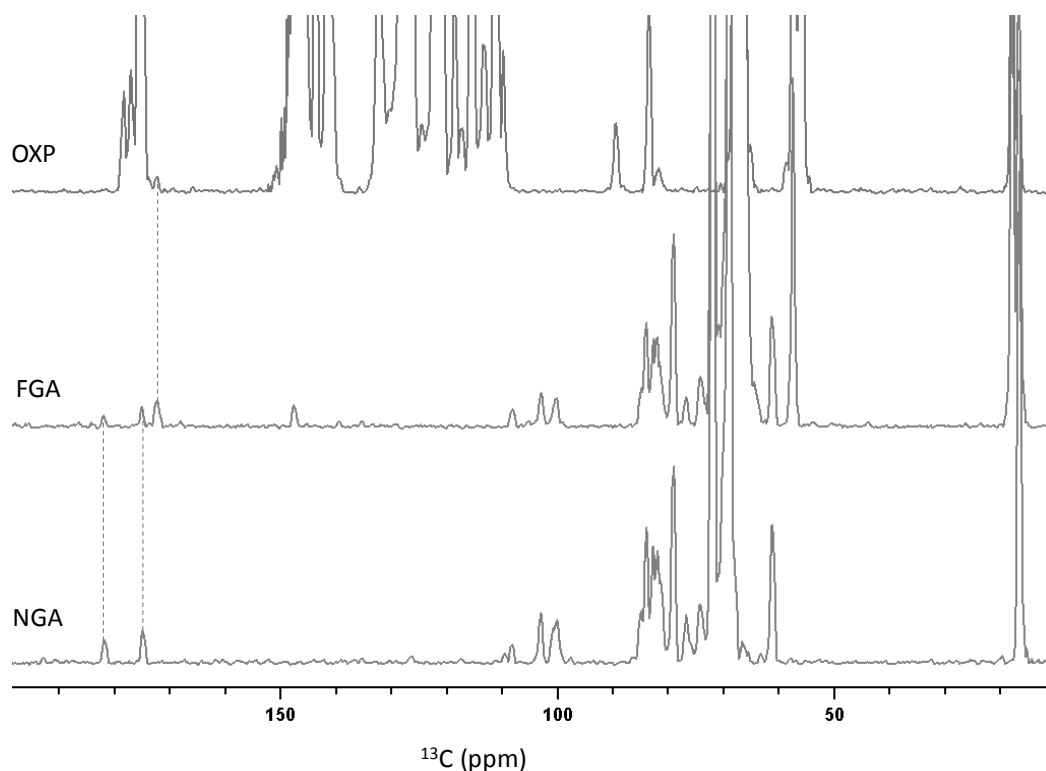


Figure 7:  $^{13}\text{C}$  NMR spectra obtained from the projections of HMBC recorded on oxidation products (OXP), native gum Arabic (NGA) and functionalized gum Arabic (FGA).

HMBC spectra were obtained on the three samples. These spectra were first used in order to obtain information on the carboxyl zone before and after functionalization, which from the FTIR results was interesting (Figure 4). Indeed a direct  $^{13}\text{C}$  measurement was not conceivable because of a lack of sensitivity, indirectly detected  $^{13}\text{C}$  spectra (using  $^1\text{H}$  polarization) of the three samples were thus obtained from projections of the HMBC (Figure 7). It appeared on these spectra the additional peaks observed on the functionalized gum corresponded to phenolic groups signals. In a second step, and in order to verify if there was a correlation between the FGA carbons and the protons from OXP, HMBC correlation were finely analyzed (Figure 8). The weak proportions of OXP did not make it possible to visualize a direct correlation between the aromatic  $^1\text{H}$  of OXP and a carbon of FGA. However, carboxyl carbon moved from 175.4 ppm in the OXP mixture to 168.2 ppm in the FGA sample, which may indicate that OXP were possibly esterified.

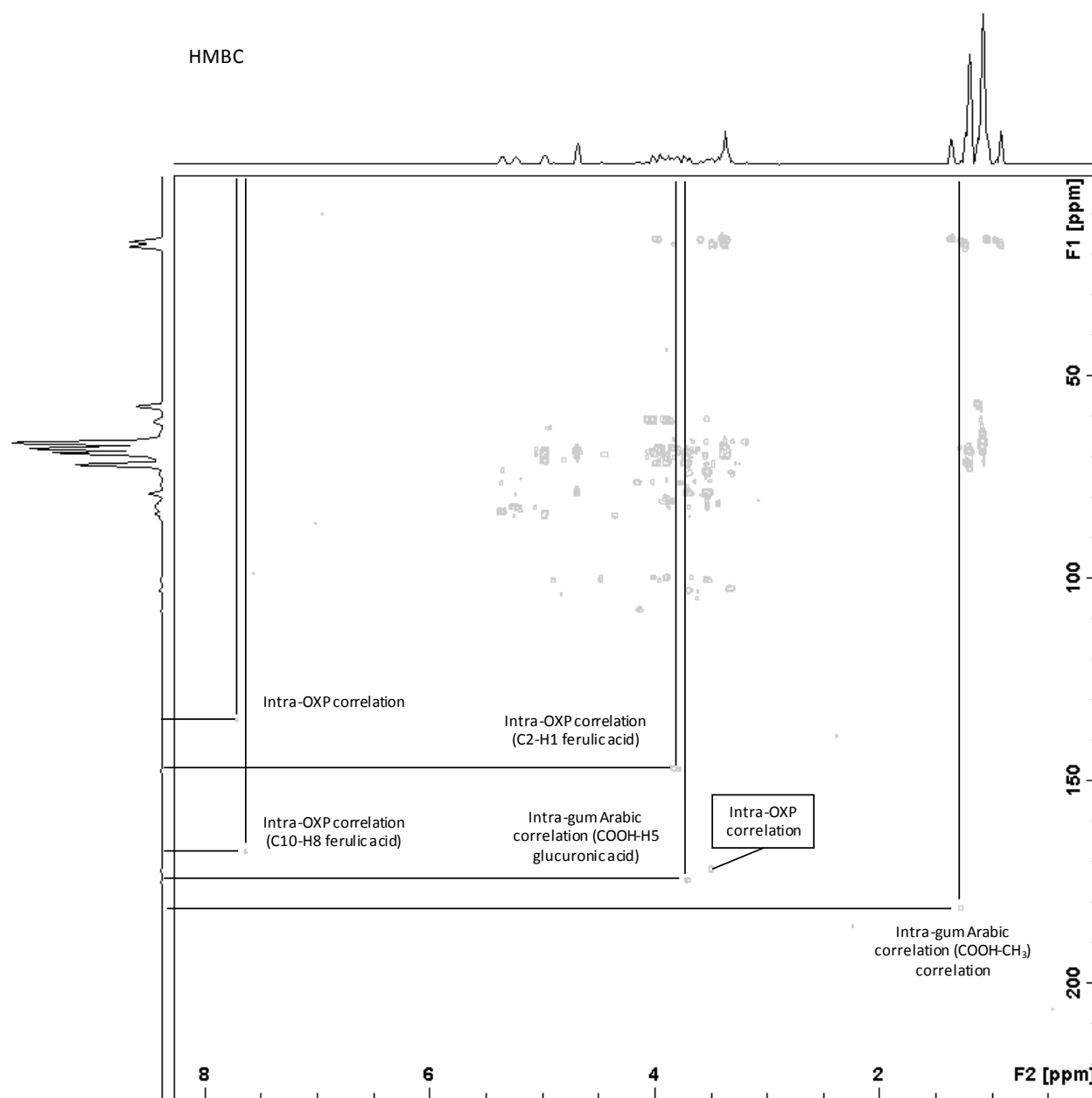


Figure 8: HMBC spectra obtained on the FGA sample, with a highlight on the correlations of interest.

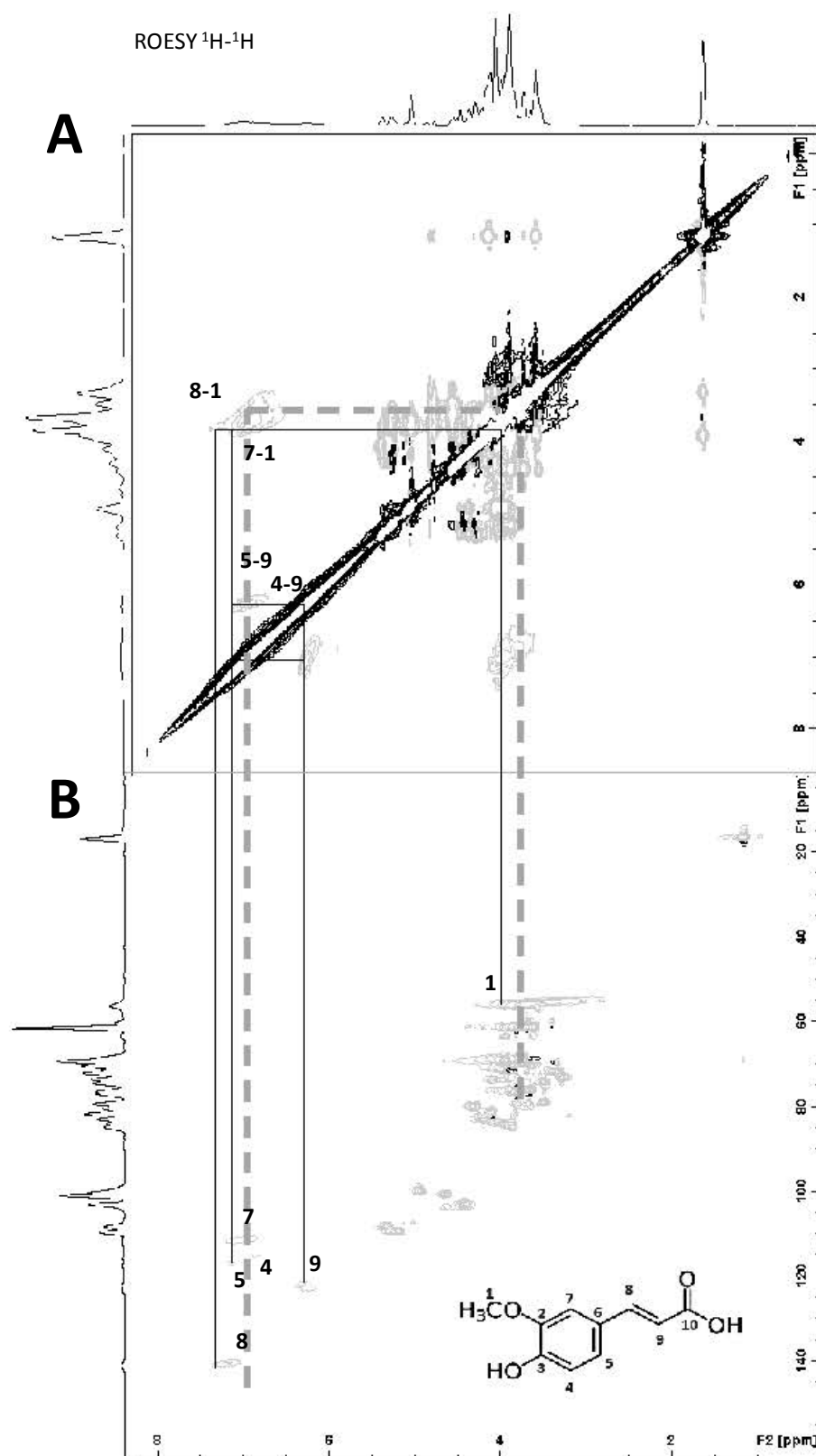


Figure 9: (A) ROESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  and (B) HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  of functionalized gum Arabic FGA. As a reference for OXP, the signals corresponding to ferulic acid are indicated according to the numbering of the figure in the inset of (B). Intra-OXP correlations are indicated by straight lines. Gum Arabic-OXP correlation is indicated by a dotted line.

ROESY experiments of FGA were recorded (Figure 9). They allowed the visualization of a  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  correlation by dipolar effect and thus drove to identify protons that were close in space. A  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  dipolar interaction was visible between the aromatic  $^1\text{H}$  of OXP and gum Arabic but it was difficult to clearly identify the corresponding  $^1\text{H}$  due to the width of the correlation spots and their low intensity. However, a correlation was brought out between one aromatic  $^1\text{H}$  of OXP and possibly the  $\text{CH}_2$  of FGA galactose units (C6) or the  $^1\text{H}$  linked to the C5 of the glucuronic acid units of gum Arabic, meaning the OXP would be grafted either onto them or onto the near carbons. This result was in correlation with the higher absorbance observed on the FTIR spectrum at  $1135\text{ cm}^{-1}$  (related to C-O stretches) and to the elongation of the peak of ester bounds between the carboxyl groups of GA and the OXP at  $1280\text{ cm}^{-1}$ . The results obtained in a previous study on pectin modification by grafting OXP of ferulic acid (Karaki et al., 2017) with the same pathway also concluded on a grafting onto the C6 carbon of the galacturonate units of pectin.

To resume, the pulsed field gradient (PFG) measurements indicated that after dialyses there were still two fractions of OXP in solution. One of them could be referred to as “free OXP” and the other one was strongly linked to FGA. The presence of a chemical bonding between OXP and FGA was not obvious, due to the complexity of the spectra and especially sensitivity problems because of the low grafting rate of OXP. In  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  decoupled from  $^1\text{H}$  measurements, the signals resulting from functionalization were small compared to the signals of gum Arabic. However, there was a set of clues proving that the grafting was conclusive, the strongest one being that the diffusion coefficient of gum Arabic was modified after functionalization and this coefficient was also measured in the spectral area corresponding to the OXP species. The ROESY and HSQC experiment made it possible to locate the site of the grafting. The OXP would be grafted either close to the  $\text{CH}_2$  of FGA galactose units (C6) or close to the C5 of the glucuronic acid units of gum Arabic, which was consistent with what was

observed on other polymers.

### 3.5. Study of the molar mass of the OXP

Based on the absorbance at 322 nm of OXP in ultrapure water recorded on a HPLC-MS system, 11 oxidation products were readily identified by their retention time order and exact molar mass characteristics (Figure 10). Two of the peaks (n° 1 and 6) seemed to be modified ferulic acid (ferulic acid has a molar mass of  $194.18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) based on their molar mass. OXP n° 2 and 9 were most probably ferulic acid trimers whereas the majority of the OXP (the 7 others) were obviously ferulic acid dimers. In order to investigate further their structure, the OXP were separated using high-performance semi-preparative liquid chromatography. Based on the purity and quantity of the OXP obtained for each peak, further NMR investigations were performed only on OXP n° 3, 4, 5, 8 and 9.

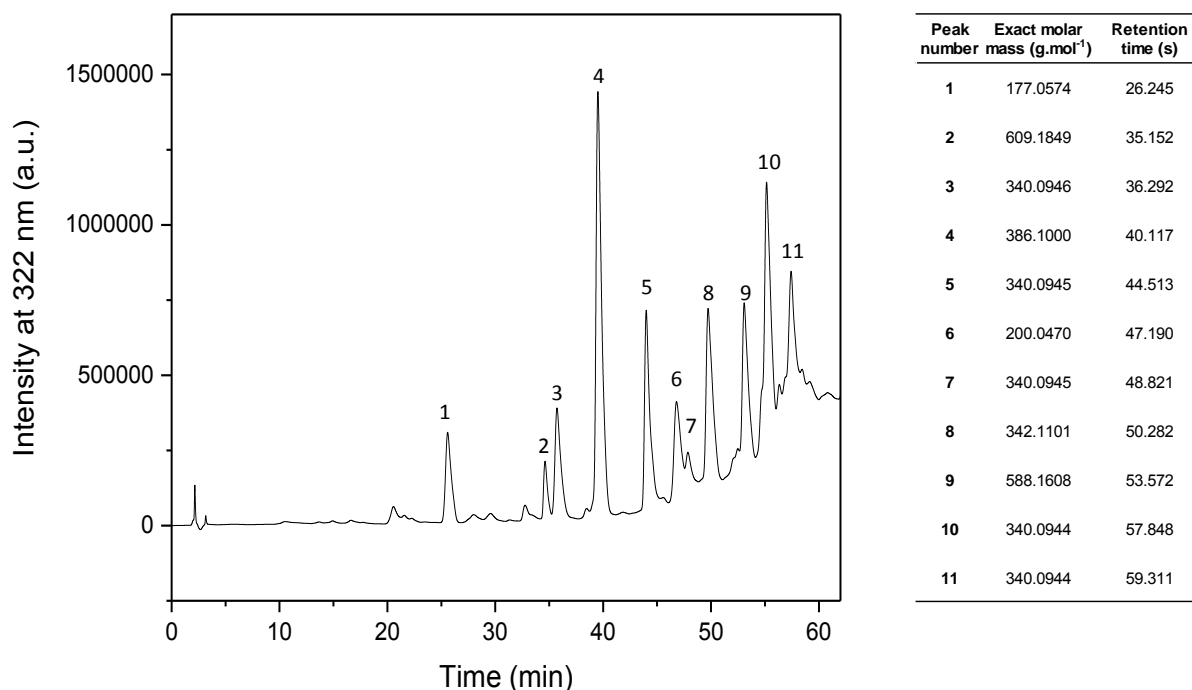


Figure 10: Absorbance at 322 nm and retention time of the oxidation products of ferulic acid and corresponding molar mass (precise until  $10^{-4} \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

The chosen OXP were studied on a HPLC-MS system. From the exact molar mass, formula predictions were generated. The most probable formula prediction (the one for which the exact mass was closest to the one measured) was presented in Table 2, along with fragments identified from the fragmentation into second and third daughter ions fragments from LCMS measurements. These OXP were also analyzed by NMR ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  measurements). Due to problems of concentration and thus NMR sensitivity issues, it was not possible to fully elucidate the structure of all studied OXP. Information obtained from standard NMR measurements ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  measurements) are computed in Table 2.

This preliminary study revealed four of these five OXP were ferulic acid dimers which probably kept their aromatic rings along with their methoxy groups. The fragmentation of the OXP n° 9 revealed it was probably a trimer of the OXP n° 4 and another ferulic acid. Another interesting result was the OXP fragmentations were different, even for the one with the same molar mass (n° 3 and 5). Furthermore, these OXP had different retention times (Figure 10), meaning their hydrophobia was different. Though the most probable formulas for these products were the same, it would be difficult to presume to design their structure solely based on their molar mass, however this approach is often available in literature.

From these results, it was admitted that most oxidation products were ferulic acid dimers with two aromatic rings and methoxy groups onto it, meaning the most of the oxidation product mechanism would involve forming ester bound between ferulic acids carboxyl groups and hydroxyl groups. Further NMR experiments were conducted on the OXP n° 3 to clarify its structure.

Table 2: Pic number from Figure 10, second and third daughter ions fragments from LCMS measurements, most probable formula prediction and fragments identified by NMR

Pic number	Exact mass (g.mol <sup>-1</sup> )	Identification of MS2 fragments LCMS	Identification of MS3 fragments LCMS	Most probable formula prediction	Fragments identified by NMR		
3	340.0945	CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> OH	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	3 aromatic 1H (2 being in 3J, ie in ortho configuration)	2 methoxy groups	carbonyl group(s)
4	386.1000	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	too low sensitivity for assignment	aromatic ring(s) (1 with 3 aromatic 1H, 2 being in 3J, ie in ortho configuration),	2 methoxy groups
5	340.0945	CO	H <sub>2</sub> O	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	2 aromatic rings with 3 aromatic 1H (2 being in 3J, ie in ortho configuration)	2 methoxy groups	carbonyl group(s) only visible in HMBC 1 1H-1H coupling constant of 16Hz (possibly protons in trans alkene)
8	342.1101	2H <sub>2</sub> O	none	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>6</sub>	high symmetry of the molecule because only 10 signals in the carbon-13 spectrum	aromatic ring (no 1H in ortho configuration)	methoxy groups carbonyl group(s) only visible in HMBC 1 1H-1H coupling constant of 16Hz (possibly protons in trans alkene)
9	588.1608	M=386 g.mol <sup>-1</sup> = POX 4	none	C <sub>32</sub> H <sub>28</sub> O <sub>11</sub>	aromatic rings	methoxy groups	carbonyl group(s) only visible in HMBC at least 2 1H-1H coupling constants of 16Hz (possibly protons in trans alkene)

### 3.6. Determination of the oxidation product n° 3 structure

Since it was the one with the highest signal/noise ratio in  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  measurements, the structure of the OXP 3 was investigated further.

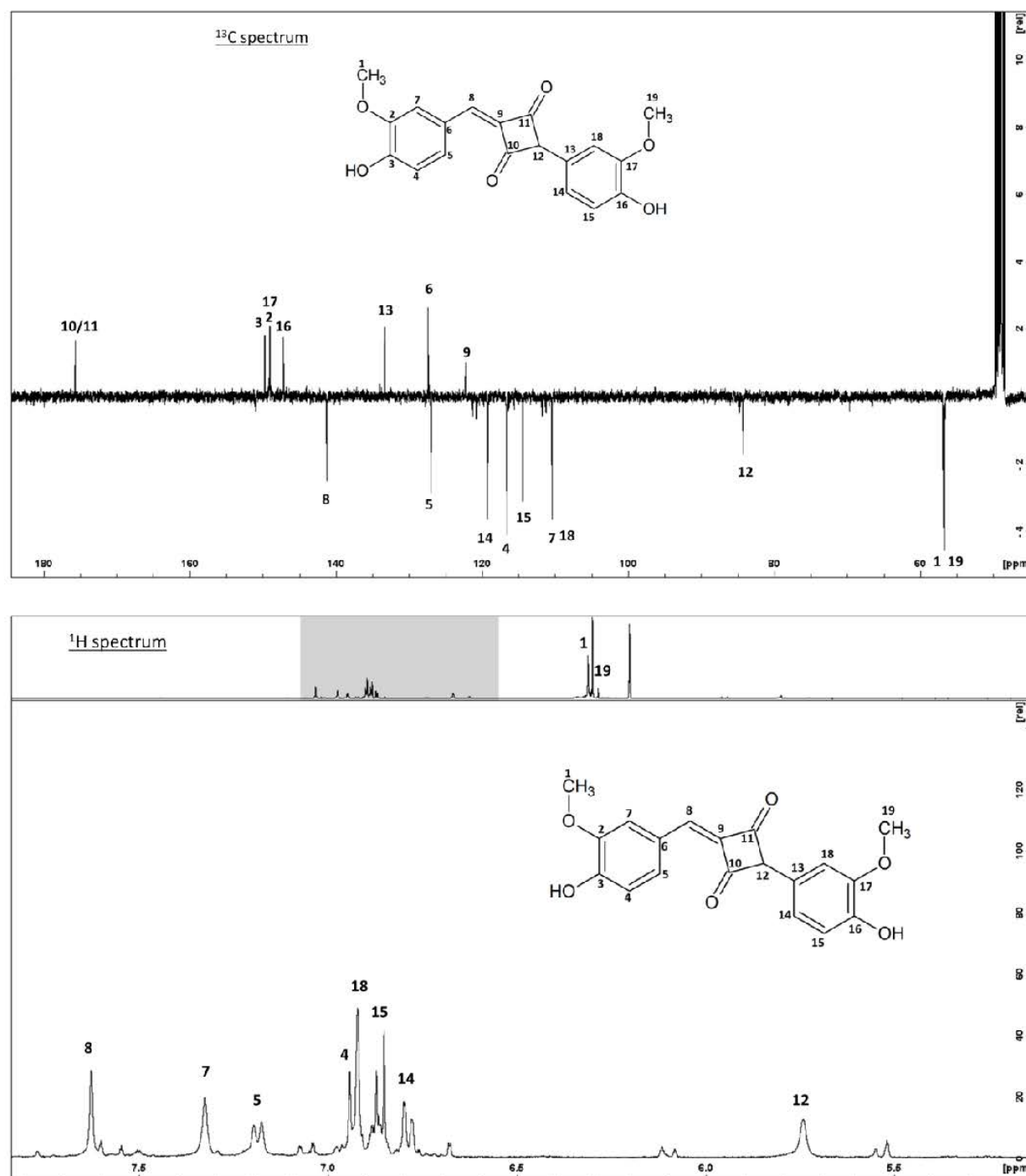


Figure 11:  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  spectra of the OXP n°3 with the peaks attribution

$^{13}\text{C}$  spectrum of the OXP n°3 is presented Figure 11. It showed the presence of 18 signals. However, the predicted formula obtained from the molar mass of the compound contained 19



C (Table 2), which meant that two carbons were probably equivalent.  $^1\text{H}$  spectrum of the OXP n°3 was presented Figure 11 and  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY experiment was presented Figure 12. The characteristic signals for methoxy groups were displayed at 3.88 and 3.82 ppm. The compound spectrum also showed six aromatic protons at 6.91 (d;  $J=8$  Hz), 6.84 (d;  $J=8$  Hz), 7.17 (dd;  $J=8$  and 1.7 Hz), 6.77 (dd;  $J=8$  and 1.5 Hz), 7.31 (d;  $J=1.7$  Hz) and 6.90 (d;  $J=1.5$  Hz), characteristics for the H-4, H-15, H-5, H-14, H-7 and H-18 of aromatic part of the compound. These results, along with the knowledge of the substrate structure (ferulic acid (Sajjadi et al., 2012)) led to presume there were two aromatic rings from ferulic acid with the methoxy and the hydroxy groups on them. The correlations obtained by  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC measurements confirmed this hypothesis. Only one peak was observed in the aldehyde/ketone area of the carbon-13 spectrum (175.7 ppm) leading to the assumption there were C=O equivalent groups. They were both correlated to the proton in C-8. This OXP was then identified to be 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) methylidene] cyclobutane-1, 3-dione. This molecule possesses a tautomeric form that could potentially be charged in solution (Figure 14), but in NMR measurement only one form was detected, probably because it was predominant in the conditions used.

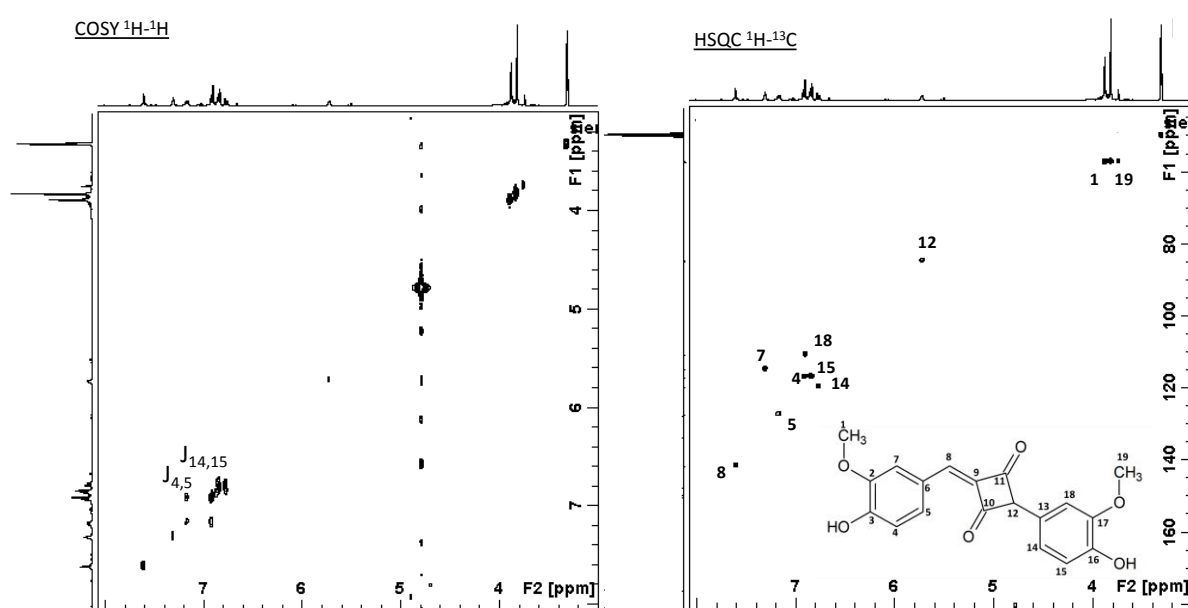


Figure 12:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spectra of the OXP n°3

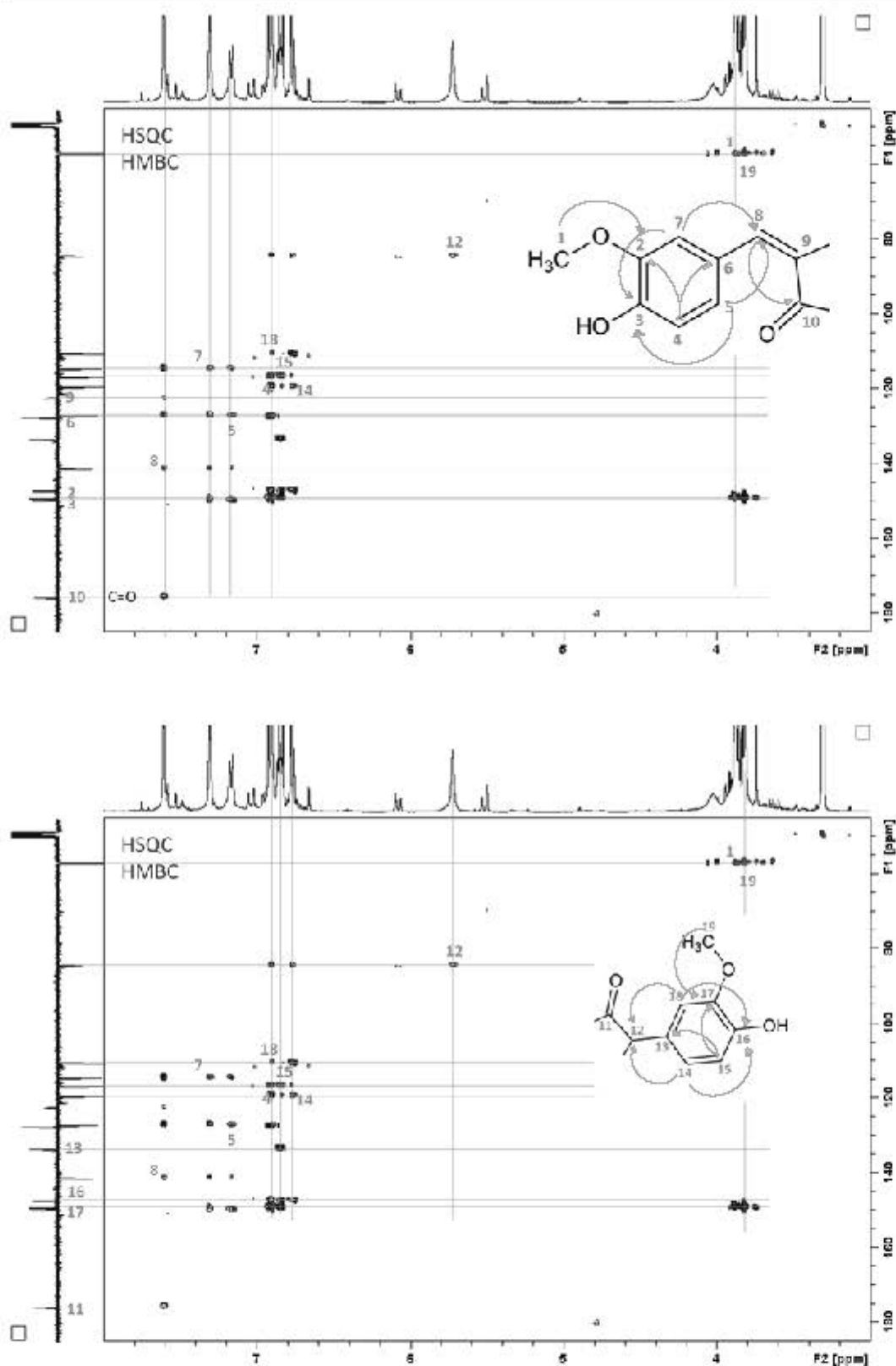


Figure 13:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC measurements on the OXP n° 3. Main HMBC correlations are represented simultaneously on the 2D map and as arrows on the chemical structures drawn on the right of the spectra (up: carbons numbered from 1 to 10, bottom: carbons numbered from 11 to 19).

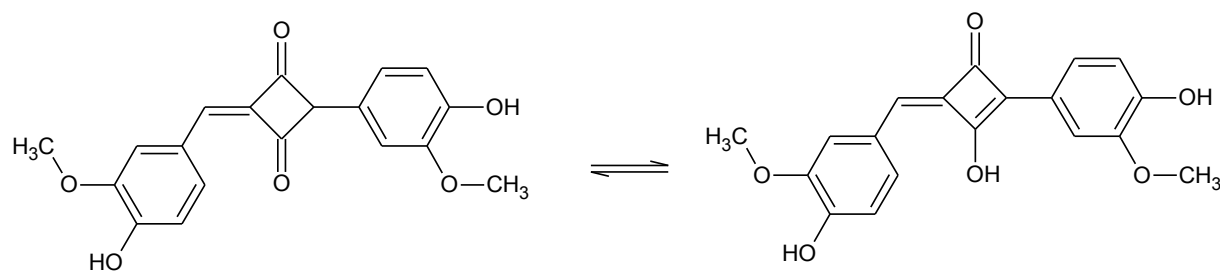


Figure 14: 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) methylidene] cyclobutane-1, 3-dione and its tautomeric form.

#### 4. Conclusions

This study focused on the modification of gum Arabic by an enzymatic pathway. The first result was that GA did not alter the enzymatic oxidation of ferulic compounds since the ferulic acid consumption were not modified in the presence of the polysaccharide. Furthermore, it was observed by HPLC several oxidation products were formed which may then react with GA. Other than modifying gum Arabic charge (its approximate Zeta potential decreased), the grafting of the ferulic acid oxidation products also modified gum Arabic structure. From FTIR and NMR analysis, oxidation products were undeniably present on modified gum Arabic, probably close to the glucuronic acid C5 carbon or close to the galactose CH<sub>2</sub>. The study did not rule out the possibility of a small quantity of OXP being grafted onto the amine groups of gum Arabic. Furthermore, the exact mass of each OXP was determined by LCMS, leading to the conclusion that the majority of the products obtained were ferulic acid dimers which kept their aromatic rings and the O-CH<sub>3</sub> groups onto them. Assumptions were made about their respective raw formulas, but one of them was clearly identified from NMR experiments as 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) methylidene] cyclobutane-1,3-dione. Further experiments will have to be carried out in order to make it possible for all OXP structures to be elucidated.

## AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author Email: [jordane.jasniewski@univ-lorraine.fr](mailto:jordane.jasniewski@univ-lorraine.fr)

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge support of the LIBio by the “Impact Biomolecules” project of the “Lorraine Université d’Excellence”(Investissements d’avenir – ANR).

We would like to thank Nexira for kindly providing the Gum Arabic used in this article.

We also thank Aurélie Seiler for the technical support.

## REFERENCES

- Adelakun, O. E., Kudanga, T., Parker, A., Green, I. R., le Roes-Hill, M., & Burton, S. G. (2012). Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74(1), 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.08.010>
- Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Paris, C., Scher, J., & Muniglia, L. (2014). Laccase-catalysed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate in aqueous medium: A green procedure for the synthesis of new compounds. *Food Chemistry*, 145, 1046–1054. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.119>
- Aljawish, A., Muniglia, L., Klouj, A., Jasniewski, J., Scher, J., & Desobry, S. (2016). Characterization of films based on enzymatically modified chitosan derivatives with phenol compounds. *Food Hydrocolloids*, 60, 551–558. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.032>
- Aljawish, Chevalot, I., Piffaut, B., Rondeau-Mouro, C., Girardin, M., Jasniewski, J., ... Muniglia, L. (2012). Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.016>
- Ayaz, N. O., Ramadan, K. S., Farid, H. E. A., & Alnahdi, H. S. (2016). Protective role and antioxidant activity of arabic gum against trichloroacetate-induced toxicity in liver of male rats. *Indian Journal Of Animal Research*, 51(2), 303–309. <https://doi.org/10.18805/ijar.10976>
- Berka, R. M., Schneider, P., Golightly, E. J., Brown, S. H., Madden, M., Brown, K. M., ... Xu, F. (1997). Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3151–3157.
- Callaghan, P. T., & Pinder, D. N. (1985). Influence of polydispersity on polymer self-diffusion measurements by pulsed field gradient nuclear magnetic resonance. *Macromolecules*, 18(3), 373–379. <https://doi.org/10.1021/ma00145a013>
- Carunchio, F., Crescenzi, C., Girelli, A. M., Messina, A., & Tarola, A. M. (2001). Oxidation of ferulic acid by laccase: identification of the products and inhibitory effects of some dipeptides. *Talanta*, 55(1), 189–200. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00417-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00417-9)

- Dixon, A. M., & Larive, C. K. (1997). Modified Pulsed-Field Gradient NMR Experiments for Improved Selectivity in the Measurement of Diffusion Coefficients in Complex Mixtures: Application to the Analysis of the Suwannee River Fulvic Acid. *Analytical Chemistry*, 69(11), 2122–2128. <https://doi.org/10.1021/ac961300v>
- Espinosa-Andrews, H., Sandoval-Castilla, O., Vázquez-Torres, H., Vernon-Carter, E. J., & Lobato-Calleros, C. (2010). Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers*, 79(3), 541–546. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.040>
- Gnanasambandam, R., & Proctor, A. (2000). Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 68(3), 327–332. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00191-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00191-0)
- Hallén, A. (1972). Chromatography of acidic glycosaminoglycans on DEAE-cellulose. *Journal of Chromatography A*, 71(1), 83–91. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)85691-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)85691-0)
- Idris, O. H. M., Williams, P. A., & Phillips, G. O. (1998). Characterisation of gum from Acacia Senegal trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. *Food Hydrocolloids*, 12(4), 379–388. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(98\)00058-7](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(98)00058-7)
- Kačuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N., & Ebringerová, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43(2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00151-X)
- Karaki, N., Aljawish, A., Muniglia, L., Bouguet-Bonnet, S., Leclerc, S., Paris, C., ... Humeau-Virot, C. (2017). Functionalization of pectin with laccase-mediated oxidation products of ferulic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 104, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.05.001>
- Karaki, N., Aljawish, A., Muniglia, L., Humeau, C., & Jasniewski, J. (2016). Physicochemical characterization of pectin grafted with exogenous phenols. *Food Hydrocolloids*, 60, 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.004>
- Lewis, B. A., & Smith, F. (1957). The heterogeneity of polysaccharides as revealed by electrophoresis on glass-fiber paper. *Journal of the American Chemical Society*, 79(14).
- Mahendran, T., Williams, P. A., Phillips, G. O., Al-Assaf, S., & Baldwin, T. C. (2008). New Insights into the Structural Characteristics of the Arabinogalactan–Protein (AGP) Fraction of Gum Arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9269–9276. <https://doi.org/10.1021/jf800849a>
- McNamee, B. F., O’Riorda, E. D., & O’Sullivan, M. (1998). Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11), 4551–4555. <https://doi.org/10.1021/jf9803740>
- Nie, S.-P., Wang, C., Cui, S. W., Wang, Q., Xie, M.-Y., & Phillips, G. O. (2013). The core carbohydrate structure of Acacia seyal var. seyal (Gum arabic). *Food Hydrocolloids*, 32(2), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.12.027>
- Nussinovitch, A. (1997). Exudate gums. In A. Nussinovitch (Ed.), *Hydrocolloid Applications: Gum technology in the food and other industries* (pp. 125–139). Boston, MA: Springer US.
- Oostwal, M. G., Bles, M. H., de Bleijser, J., & Leyte, J. C. (1993). Chain self-diffusion in aqueous salt-free solutions of sodium poly(styrenesulfonate). *Macromolecules*, 26, 7300–7308. <https://doi.org/10.1021/ma00078a028>
- Padayachee, A., Netzel, G., Netzel, M., Day, L., Zabarás, D., Mikkelsen, D., & Gidley, M. J. (2012). Binding of polyphenols to plant cell wall analogues – Part 1: Anthocyanins. *Food Chemistry*, 134(1), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.082>

- Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J. H., & Hatfield, R. D. (1994). Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (23), 3485–3498. <https://doi.org/10.1039/P19940003485>
- Randall, R. C., Phillips, G. O., & Williams, P. A. (1988). The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 2(2), 131–140. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(88\)80011-0](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(88)80011-0)
- Randall, R. C., Phillips, G. O., & Williams, P. A. (1989). Fractionation and characterization of gum from *Acacia senegal*. *Food Hydrocolloids*, 3(1), 65–75. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(89\)80034-7](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(89)80034-7)
- Sajjadi, S. E., Shokoohinia, Y., & Moayedi, N.-S. (2012). Isolation and identification of ferulic acid from aerial parts of *Kelussia odoratissima* Mozaff. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 7(4), 159–162. <https://doi.org/10.17795/jjnpp-4861>
- Sanchez, C., Nigen, M., Mejia Tamayo, V., Doco, T., Williams, P., Amine, C., & Renard, D. (2017). Acacia gum: History of the future. *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.008>
- Sanchez, C., Schmitt, C., Kolodziejczyk, E., Lapp, A., Gaillard, C., & Renard, D. (2008). The Acacia Gum Arabinogalactan Fraction Is a Thin Oblate Ellipsoid: A New Model Based on Small-Angle Neutron Scattering and Ab Initio Calculation. *Biophysical Journal*, 94(2), 629–639. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.109124>
- Sarika, P. R., James, N. R., Kumar, P. R. A., Raj, D. K., & Kumary, T. V. (2015). Gum arabic-curcumin conjugate micelles with enhanced loading for curcumin delivery to hepatocarcinoma cells. *Carbohydrate Polymers*, 134, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.068>
- Shi, Y., Li, C., Zhang, L., Huang, T., Ma, D., Tu, Z., ... Ouyang, B. (2017). Characterization and emulsifying properties of octenyl succinate anhydride modified Acacia seyal gum (gum arabic). *Food Hydrocolloids*, 65, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.043>
- Sun, W.-Q., Payne, G. F., Moas, M. S. G. L., Chu, J. H., & Wallace, K. K. (1992). Tyrosinase Reaction/Chitosan Adsorption for Removing Phenols from Wastewater. *Biotechnology Progress*, 8(3), 179–186. <https://doi.org/10.1021/bp00015a002>
- Thevenet, F. (2009). Gomme d'acacia, hydrocolloïde multifonctionnel et nutritionnel.
- Wada, S., Ichikawa, H., & Tatsumi, K. (1993). Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(7), 854–858. <https://doi.org/10.1002/bit.260420710>
- Wang, H., Williams, P. A., & Senan, C. (2014). Synthesis, characterization and emulsification properties of dodecyl succinic anhydride derivatives of gum Arabic. *Food Hydrocolloids*, 37, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.033>
- Witayakran, S., & Ragauskas, A. J. (2009). Synthetic Applications of Laccase in Green Chemistry. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 351(9), 1187–1209. <https://doi.org/10.1002/adsc.200800775>

---

### 3. Contribution de l'article

Ces travaux ont permis de confirmer des modifications de structure sur la gomme d'Acacia fonctionnalisée. Plusieurs résultats ont permis de conclure sur le greffage des produits d'oxydation sur la gomme d'Acacia :

- Les POX pourraient être greffés sur les groupements amine de la gomme d'Acacia (par formation d'une liaison amide) et/ou carboxyle (par formation d'une liaison ester). Les spectres infrarouges (FTIR) permettent de façon claire de voir des modifications structurales de la gomme fonctionnalisée, mais ne permettent pas de distinguer si cette modification a lieu sur l'amine ou le carboxyle, de par la proximité des signaux obtenus en infrarouge.
- Les résultats obtenus par mesure d'autodiffusion par gradient de champs pulsé sur les pics associés au squelette polysaccharidique et aux groupements phénoliques greffés permettent de voir que la gomme fonctionnalisée possède un coefficient de diffusion unique supérieur à celui de la gomme native, ce qui indique une diminution de taille de la gomme fonctionnalisée et/ou de sa viscosité. De plus, dans la zone des aromatiques correspondant aux POX, un des coefficients de diffusion correspondait à celui de la gomme et pouvait être attribué sans ambiguïté à la présence de POX liés à la gomme.
- Enfin, d'après les résultats de RMN, des signaux de POX ont été observés sur la gomme fonctionnalisée. Même s'il n'y avait pas de corrélation visible entre les signaux de POX et ceux de la gomme d'Acacia par HMBC, l'analyse du déplacement chimique des carboxyles des POX (corrélation C(10)-H(8)) a montré que le signal du  $^{13}\text{C}$  était un peu

blindé (mélange POX  $d=175,4$  ppm, GAF  $d=168,2$  ppm) lorsque la gomme était fonctionnalisée, indiquant une possible estérification du POX. De plus, les résultats de ROESY ont permis de mettre en évidence une corrélation entre les protons aromatiques des POX et la gomme fonctionnalisée, indiquant que le greffage avait probablement lieu à proximité du carbone C5 de l'acide glucuronique ou du CH<sub>2</sub> des galactoses. Toutefois, les résultats obtenus n'ont pas permis exclure la possibilité d'un faible greffage sur les groupements amines de la gomme d'Acacia.

Afin d'identifier la structure des produits greffés, les 11 POX ont été séparés par chromatographie semi-préparative et étudiés séparément. Le greffage sur un polysaccharide peut néanmoins bloquer les sites réactifs des produits d'oxydation, arrêtant ainsi le phénomène de polymérisation. Il est donc important de noter que les polymères greffés sur un polysaccharide n'auront pas nécessairement strictement la même forme que ceux oxydés en absence de polysaccharide.

La masse exacte de chacune de ces molécules a été déterminée par LCMS, permettant de conclure que les produits obtenus sont majoritairement des dimères d'acide férulique et de formuler des hypothèses quant à leurs formules brutes respectives. Cependant, la grande variété des masses molaires des produits d'oxydation et la grande variabilité de structures possibles pour une seule masse molaire a conduit à une grande variabilité d'hypothèses. Seuls les produits purifiés en grande quantité ont pu être analysés en RMN pour identifier leur structure. Des formules partielles ont été déterminées, permettant de conclure que la plupart des dimères obtenus conservaient deux cycles aromatiques et leurs groupements O-CH<sub>3</sub>. La structure complète d'un POX a pu être élucidée en croisant les informations obtenues par LCMS et par RMN. Cette approche est intéressante d'un point de vue



---

méthodologique car dans la littérature, beaucoup d'auteurs se basent uniquement sur la masse obtenue par LCMS pour déterminer la structure de petites molécules. Cependant, les résultats issus de cette technique présentés dans cette étude ont montré la présence de plusieurs POX de même masse molaire, mais ayant des hydrophobies différentes. L'utilisation de la RMN a permis de déterminer et d'identifier avec certitude la structure de l'un des greffons comme étant du 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methylidene]cyclobutane-1,3-dione. D'autres expériences devront être réalisées afin de permettre de connaître la structure des POX tout au long de la réaction de fonctionnalisation, ce qui pourrait permettre *in fine* de sélectionner les structures des produits à greffer sur la gomme d'Acacia en contrôlant la durée de la réaction, afin d'obtenir un polymère à façon en fonction des applications recherchées.

### **III. Publication 3 : Caractérisation physico-chimique de la gomme d'acacia fonctionnalisée par greffage des produits d'oxydation de l'acide férulique**

#### **1. Introduction**

Les travaux présentés dans le chapitre 2 (Publication 2) ont permis de démontrer la faisabilité de la modification de la gomme d'acacia par des produits d'oxydation de l'acide férulique *via* la mise en œuvre de la laccase de *Myceliophthora thermophila*. Cette modification permet ainsi de disposer d'un polysaccharide avec de nouveaux groupements chimiques entraînant potentiellement de nouvelles interactions possibles avec d'autres polymères. Par ailleurs, lors d'études précédentes menées au laboratoire sur d'autres polysaccharides, il a été montré que le greffage de composés phénoliques, même en faible quantité, avait un impact significatif sur les propriétés physico-chimiques de ces polymères [422,434]. Lors de ces précédents travaux, l'apparition d'une coloration et d'une activité antioxydante a été mise en évidence. Ces investigations ont été transposées sur la gomme d'acacia modifiée.

D'un point de vue structural, l'encombrement stérique apporté par le greffage de composés phénolique devrait accroître la mobilité des chaînes du polymère. Ce phénomène se traduirait par une température de transition vitreuse différente entre le polymère natif et le polymère modifié. Cette dernière a par conséquent été mesurée. Il est important de garder à l'esprit qu'une modification structurale entraîne souvent un changement de stabilité thermique. La résistance à la température de la gomme modifiée a donc été déterminée.

La gomme d'acacia, connue pour sa grande solubilité dans l'eau et sa faible viscosité en solution, est habituellement utilisée industriellement pour ses propriétés émulsifiantes. Sachant que les composés phénoliques présentent généralement une hydrophobie significative, leur greffage sur la gomme arabe devrait modifier sa solubilité dans l'eau et la rendre davantage amphiphile. Pour vérifier cette hypothèse, la solubilité dans l'eau de la gomme modifiée a été mesurée et des mesures précises de la tension de surface de solution aqueuses de gomme

modifiée à différentes concentrations ont été réalisées. En parallèle, l'impact du greffage des produits d'oxydation sur la viscosité de la gomme modifiée en solution a été déterminé.

L'ensemble de ces approches devrait permettre répondre à la question suivante : **quel est l'impact de la modification enzymatique de la gomme d'Acacia par greffage des produits d'oxydation de l'acide férulique sur ses propriétés physico-chimiques ?**

## 2. Article: Physicochemical characterization of gum Arabic grafted with oxidation products of ferulic acid

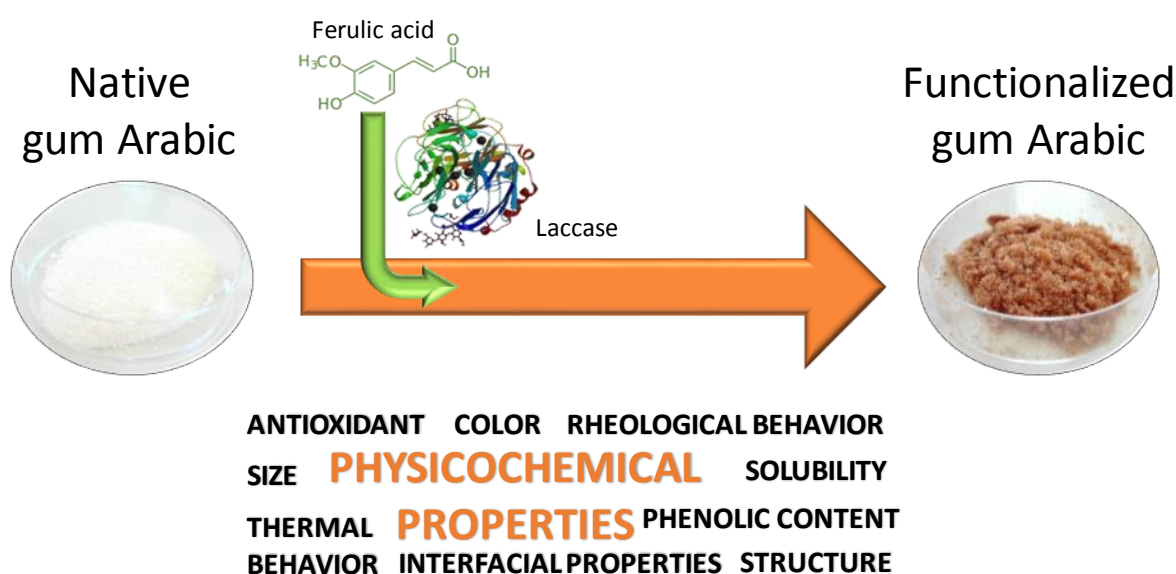
Article soumis dans Food Hydrocolloids

Marie E. Vuillemin, Florentin Michaux, Aurélie Adam, Michel Linder, Lionel Muniglia, Jordane Jasniewski\*

Université de Lorraine, LIBio, F-54000 Nancy, France

\* Corresponding author: [jordane.jasniewski@univ-lorraine.fr](mailto:jordane.jasniewski@univ-lorraine.fr)

**KEYWORDS:** Gum Arabic; functionalization, phenol grafting, surface tension, rheological behavior, thermal behavior



## ABSTRACT

Gum Arabic is a natural polysaccharide with valuable properties that enable its use in many industrial fields. This work aims to study the impact of the grafting of oxidation products of phenolic compounds on the modified Arabic gum properties. The enzymatic grafting of ferulic acid onto gum Arabic changed its thermal properties. Moreover, modified gum Arabic underwent a change of color from white to orange powder. Though its rheological behavior did not change, its solubility decreased a little (from  $42.5 \pm 2.6$  to  $10.6 \pm 0.1$  % w/v). However, the amphiphilic behavior of functionalized gum Arabic seemed to be more important than the one of native gum Arabic. For a given concentration, the surface tension of the modified polymer was lower ( $31.2 \pm 0.8$  mN.m<sup>-1</sup> for native gum Arabic against  $52.5 \pm 2.4$  mN.m<sup>-1</sup> for the modified gum at 1 % w/v). Finally, a significant improvement of the antioxidant properties of modified gum Arabic was observed. The modification of gum Arabic with phenolic compounds appeared as a promising way to produce a polysaccharide with new properties that could enlarge the field of its potential applications and could make it an interesting food ingredient.

## 1. Introduction

Gum Arabic is a sticky exudate of air-solidified tree sap coming from the stems or tree branches of *Acacia* species (Idris, Williams, & Phillips, 1998; Nussinovitch, 1997). Acacias are present in a broad band of semi-arid lands extending across sub-Saharan Africa, Sudan being the largest producer of gum Arabic. There are several species of *Acacia*, however, the two most common gum species come from the high-quality *Acacia senegal* and *Acacia seyal* (McNamee, O'Riorda, & O'Sullivan, 1998), which gives essentially brittle gum. Gum Arabic is a negatively charged polymer, although it contains both amino groups and carboxylic groups (Boulet, Williams, & Doco, 2007; Lopez-Torrez, Costalat, Williams, Doco, & Sanchez, 2015).

---

Gum Arabic is used in various industrial applications. It is used for example as flocculants in ceramics, as an adhesive in the cosmetic industry, as a food thickener additive (E414) for microencapsulation processes or for its emulsifying properties due to an amphiphilic character. In medicine, gum Arabic has been used internally to treat inflammation of the intestinal mucosa and externally to cover inflamed surfaces (Gamal el-din, Mostafa, Al-Shabanah, Al-Bekairi, & Nagi, 2003). For clinical applications, gum Arabic has been injected to patients with chronic renal failure, and its use has been claimed to help reduce plasma concentrations of urea and creatinine and reduce the need for dialysis 3 to 2 times per week (Ali, Ziada, & Blunden, 2009). Gum Arabic was also used in particular microencapsulation involving complex coacervation processes, which could in the end be used for the delivery of molecules of interest (Aberkane et al., 2012; Burgess & Carless, 1984; Renard, Lavenant-Gourgeon, Ralet, & Sanchez, 2006; Schmitt, 2000).

The gum Arabic used in this study comes from *Acacia senegal*. It contains 88 % w/w polysaccharides, 10% w/w arabinogalactan-proteins and 2% w/w proteins (Lopez-Torrez et al., 2015; Thevenet, 2009). Depending on the origin and age of the trees, the averaged molar mass of the whole gum can vary from  $3.0 \times 10^5$  to  $1.0 \times 10^6$  g.mol<sup>-1</sup> (A. Valiente et al., 2019; Renard et al., 2006). It has a heterogeneous molecular mass composition (Hallén, 1972; Lewis & Smith, 1957; Renard et al., 2006). Indeed, it has been identified as a mixture of three fractions: arabinogalactan peptides (AG), arabinogalactan-protein conjugates (AGP) and glycoproteins (GP), which differ in molecular weight and protein levels. The hydrophobic protein content causes gum Arabic to act as an emulsifier that adsorbs on the surface of oil droplets, while the hydrophilic carbohydrate component inhibits flocculation and coalescence of molecules by electrostatic and steric repulsions in food additives (Dror, Cohen, & Yerushalmi- Rozen, 2006; C. Sanchez et al., 2008). Although gum Arabic is composed of a fraction of high molecular weight, its thickening properties are limited compared to other gums. For example, a 50% w/v

aqueous solution of gum Arabic has an apparent viscosity comparable to that of a 1.5% w/v xanthan gum solution (Islam, Phillips, Slijivo, Snowden, & Williams, 1997).

Gum Arabic has a high water solubility. Gum Arabic from *Acacia senegal* can dissolve in water up to 43–48% w/v, (Viscione, 2013), forming a solution with acidic properties (pH ~ 4.5). Nevertheless, only the proteinaceous fraction of GA (AGP and GP) is responsible of the emulsification ability of GA. Then, a high GA/oil ratio is needed to generate and stabilize the oil droplets in an oil in water emulsion (Dickinson, Murray, Stainsby, & Anderson, 1988) This ratio is usually close to 1:1 while it is much lower (around 1:10) for chemical surfactant or milk protein as example. One way to overcome this major drawback may be to modify the chemical composition of GA by grafting specific compounds on the polysaccharide scaffold. To the best of our knowledge, only few studies report the chemical modification of GA and concern mainly the grafting of hydrophobic molecules to modify the amphiphilic character of GA. N-octenyl and dodecenyl succinic anhydride have then been grafted on GA to increase the hydrophobicity of GA (Sarkar, Gupta, Variyar, Sharma, & Singhal, 2013; Sarkar & Singhal, 2011; Shi et al., 2017; Wang, Williams, & Senan, 2014). Hydrophobic modified GA presented better emulsifying properties than native GA and the grafting of dodecenyl succinic derivative have even conduct to confer to the modified polysaccharide self-assembly properties. The grafting of curcumin onto GA have also conducted to the formation of aggregates of 270 nm (Sarika, James, Kumar, Raj, & Kumary, 2015).

One green pathway to modify polysaccharide consist in an approach using laccase-catalyzed oxidation reaction of ferulic acid was used to enhance the antioxidant properties of chitosan and pectin (Aljawish et al., 2012; Karaki, Aljawish, Muniglia, Humeau, & Jasniewski, 2016). In this reaction, exogenous ferulic acid units were oxidized leading to reactive semi-quinones that could subsequently react with nucleophilic center onto polysaccharides. Moreover, it has been shown that the phenolic compound were grafted onto the amine groups

of glucosamine of chitosan (Aljawish et al., 2012) and onto the carboxyl group of the galacturonic acid units of pectin (Karaki et al., 2017). The grafting of phenolic compounds have also shown improved rheological properties.

The main objective of this work was to compare the physicochemical properties of native gum Arabic with those of functionalized gum Arabic modified with exogenous phenolic species issued from laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid. The color, the thermal behavior, the rheological properties and the antioxidant capacity were more specifically studied for a quantitative examination of the polysaccharide. In order to create a techno-functional ingredient, the functionalized gum Arabic should exhibit an improvement in some of its properties.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Gum Arabic (GA) Instantgum AA from *Acacia senegal* (Mw 450 kDa determined by SEC-MALS experiments) was a gift from Nexira (France). Ferulic acid >99% (FA), Folin & Ciocalteu's phenol reagent and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) (ABTS) and Gallic acid were purchased from Sigma-Aldrich (France). Methanol and ethanol were purchased from Carlo Erba (France).

The enzyme used for the functionalization was commercialized as "Novozym® 51003" from Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). It is a fungal laccase from *Myceliophthora thermophila*, a polyphenol oxidase produced by submerged fermentation of a genetically modified *Aspergillus oryzae* (Berka et al., 1997). Its density is around 1.05 g.mL<sup>-1</sup> and its molecular weight is 85 kDa (Aljawish et al., 2014). The laccase stock activity was 32 038 ± 1 322 LAMU.g<sup>-1</sup>.

## 2.2. Methods

### 2.2.1. Functionalization of Gum Arabic by grafting ferulic acid oxidation products

The method used to functionalize Gum Arabic was adapted from Aljawish *et al.* and Karaki *et al.* (Aljawish *et al.*, 2012; Karaki *et al.*, 2017). 1 g of gum Arabic was added to 45 mL of phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) and gently stirred at 4 °C overnight. GA is not soluble in this buffer so the functionalization was performed under heterogeneous conditions. The dispersion was stirred at 450 rpm for 1 h at 30 °C. 5 mL of ferulic acid dissolved in methanol (50 mM) was added to the batch. Once the temperature was stable, 13.5 UI.mL<sup>-1</sup> of Novozym® 51003 was added to trigger the reaction. The batch was then stirred at 30 °C for 50 min. 150 mL of ethanol stored at -20 °C was then added to stop the reaction and separate the non-functionalized GA from the functionalized GA. The obtained mixture of functionalized GA (FGA) and non-grafted FA oxidation products (OXP) soluble in the phosphate buffer/ethanol mixture and non-functionalized insoluble GA was then centrifuged for 20 min at 20 °C 12000 g with a Beckmann centrifuge (Beckman Coulter Inc., Villepinte, France). The precipitate contained non-functionalized GA and a part of phosphate buffer salts (verified by FTIR measurements, data not shown), whereas the supernatant contained the functionalized GA and the ferulic acid oxidation products not grafted on GA. The ethanol was then eliminated with a rotary evaporator BUCHI R144 (BUCHI SARL, Rungis, France) at a boiling point of 40 °C at 175 mbar. Some amount of water from the buffer solution was also evaporated by decreasing the pressure until 72 mbar. The residual solution was then dialyzed against ultrapure water with a high grade regenerated membrane (MWCO 10 000 Da from Membrane Filtration Products Inc.) to eliminate excess salts from the buffer and non-grafted FA oxidation products (OXP). A dialyze was performed on the OXP alone to verify that all OXP were eliminated from inside the membrane. Dialysis was stopped when the conductivity outside the membrane was equal to



the one of ultrapure water. The dialyzed functionalized GA (FGA) was frozen and then freeze-dried for 72 h. The powder obtained was stored in a desiccator until use.

## 2.2.2. Presence and grafting of OXP onto FGA

### 2.2.2.1. Color measurement

Color measurements were performed on dialyzed NGA (native Gum Arabic) and dialyzed FGA (Functionalized Gum Arabic) at a powder state. They were carried out with a Chromameter spectrophotometer CR-400 / CR-410 (Konica Minolta Sensing Europe B.V.). The color parameters  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  (lightness, redness and yellowness, respectively) were obtained. Measurements were made in triplicate. The color difference  $\Delta E$  between NGA and FGA was obtained using Equation 1.

*Equation 1 :*

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

Color scientists estimate that the threshold of perceptibility equates to a  $\Delta E$  of 1. The minimal detectable difference for the human eye is between 1.0-2.0  $\Delta E$  (Wee, Monaghan, & Johnston, 2002). A color difference from 1.0  $\Delta E$  can be perceived by 50% of observers (Kuehni & Marcus, 1979) and a color difference from 2.0  $\Delta E$  can be perceived by 100% of observers (Seghi, Hewlett, & Kim, 1989).

### 2.2.2.2. UV visible properties

UV-visible analyses were performed using a Shimadzu UV-1605 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). NGA and FGA samples were dissolved in ultrapure water (1.0 and 0.01% w/v, respectively, optimal concentrations for a sufficient and unsaturated signal. The solution were placed in a 1 cm quartz cell and scanned from 200 to 900 nm against ultrapure water as blank. All analyses were performed in triplicate.

#### 2.2.2.3. Evaluation of the grafting efficiency

The grafting efficiency has been evidenced by the determination of the phenolic content of NGA and FGA. It was measured according to the Folin & Ciocalteu's method using gallic acid as reference (Karaki et al., 2016; Singleton et al., 1999). A control stock solution of gallic acid was prepared ( $0.5 \text{ g.L}^{-1}$ ) to obtain a calibration curve from  $0.05 \text{ g.L}^{-1}$  to  $5 \text{ g.L}^{-1}$  from absorbance measurements at 760 nm using a UV-visible spectrophotometer (Shimadzu UV-1605). 500  $\mu\text{L}$  of NGA, FGA and non-dialyzed FGA solutions ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) of each solution were mixed with 2.5 mL of Folin-Ciocalteu's reagent 2 N diluted 10 times in water. After 2 min, 2 mL of sodium carbonate at  $200 \text{ g.L}^{-1}$  was added. The mixtures were stirred for 30 min in the dark at room temperature. The absorbance was then measured at 760 nm. The recorded values obtained for NGA, FGA and non-dialyzed FGA solutions were compared to the gallic acid standard curve ( $\text{Abs}_{760 \text{ nm}} = 3.348 [\text{Gallic acid}] \text{ g.L}^{-1}$ ,  $r^2 = 0.9927$ ) to determine the phenolic content expressed in mg equivalent gallic acid.g dry material<sup>-1</sup>. All analyses were performed in triplicate.

#### 2.2.2.4. Structure of functionalized Gum Arabic

To compare the NGA and FGA chemical structures, Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) analyses were performed using a Tensor 27 spectrometer equipped with a DTGS detector (Bruker, Germany). Samples were analyzed with 64 scans, 10 kHz scanning in a range from 400 to  $4000 \text{ cm}^{-1}$  with a resolution of  $6 \text{ cm}^{-1}$ . The powder were placed on a universal diamond ATR top-plate (ATR Platinum, Bruker, Germany) and then analyzed. Raw data were collected, then processed using the OPUS software (Bruker, Germany). Reference spectra from air was subtracted. The results presented are the average result of three measurements, which have undergone successive treatments. The peaks of  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CO}_2$  were compensated. A straight line was generated from  $2280$  to  $2400 \text{ cm}^{-1}$  to remove the artefact peak of absorbance caused by the diamond. Then the spectrum was converted from attenuated total reflexion to

absorbance spectrum. Then a vector normalization and a baseline correction were performed.

#### 2.2.2.5. Size measurements

Size distribution profiles were obtained using Nanosight LM10-T14 system (Malvern Panalytical, UK) equipped with a 532 nm laser at 50 mW and the sCMOS camera. NGA and FGA were solubilized in ultrapure water (a solution of gum was prepared at 1% w/v, then diluted  $10^6$  times, giving a final solution concentration of  $1.10^{-6}$  % w/v). Each samples was recorded five times for 30 s (25 images per second). Temperature was regulated at 25 °C. Particle diameter was calculated from Stokes-Einstein equation (Equation 2) with NTA 3.3 software.

$$D = kT / 6\pi \cdot \eta \cdot R_h \quad \text{Equation 2}$$

With D the diffusion coefficient,  $\eta$  the dynamic viscosity of the solvent,  $R_h$  the hydrodynamic radius, k the Boltzmann constant ( $1.3806503 \cdot 10^{-23}$  J.K<sup>-1</sup>) and T the absolute temperature in Kelvin.

### 2.2.3. Thermal analyses

#### 2.2.3.1. Stability against temperature

NGA and FGA stability upon heating has been analyzed by thermogravimetric measurements using a Thermogravimetric analysis apparatus (TGA 5500, TA Instruments, Waters, New Castle, USA). The thermal analyses were performed under N<sub>2</sub> gas at a flow of 25 mL.min<sup>-1</sup>. The sample mass was in a range of 5 mg. The heating rate was 20 °C.min<sup>-1</sup> for a temperature range from 30 °C to 600 °C. First derivative of the thermograms were obtained using the TRIOS software (TA Instruments). Measurements were made in triplicate and average values and standard deviation were recorded.

#### 2.2.3.2. Thermal behavior

NGA and FGA behaviors upon heating have been analyzed by Modulated Dynamic Scanning Calorimetry (DSC 2500, TA Instruments, Waters, New Castle, USA). 5.0 mg of powder were weighted and hermetically closed into an aluminum pan. The reference cell only contained air. A modulated temperature test was performed. First, the temperature was stabilized at -50 °C. This step was followed by an isotherm for 5 min. Then, the temperature increased to 100 °C with a modulation amplitude of 1.000 °C for a 60 s period at 5 °C.min<sup>-1</sup> were then performed. The total heat flow was recorded and separated into reversing and non-reversing components. The reversing signal contains heat capacity related events such as the glass transition. The non-reversing signal contains kinetic events such as crystallization, crystal reorganization and decomposition. Thermograms were analyzed using the TRIOS software (TA Instruments). Measurements were made in triplicate and average values and standard deviation were recorded. The T<sub>g</sub> (glass transition temperature) were obtained from the thermograms (Glass transition analysis option).

#### 2.2.4. Evaluation of antioxidant properties

Antioxidant properties of NGA and FGA solutions were determined using the spectrophotometric analysis of ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging activity (Božič, Gorgieva, & Kokol, 2012). A solution of ABTS (7 mM) and a solution of potassium persulfate (2.45 mM) were prepared in ultrapure water. They were mixed at a volume ratio of 1:1, then stirred at 450 rpm in the dark at room temperature overnight. The solution was diluted in ultrapure water in order to reach an absorbance at 734 nm of 0.690 ± 0.005.

NGA and FGA samples were solubilized in ultrapure water at different concentration (between 0.1 and 1.0 g.L<sup>-1</sup> for FGA and between 25.0 and 200.0 g.L<sup>-1</sup> for NGA). A control was made without gum samples. 10 µL of these solutions were mixed with 1 mL of ABTS<sup>•+</sup> solution. The

mixture was incubated 15 min at 30 °C. The absorbance was measured in a quartz cell at 734 nm after performing a blank on ultrapure water. The scavenging ability of this radical was calculated at different times using Equation 3.

*Equation 3*

$$ABTS^{*+} \text{ radical scavenging activity (\%)} = 1 - \left( \frac{Abs \text{ sample}}{Abs \text{ control}} \right) \times 100$$

ABTS<sup>\*+</sup> radical scavenging activity was expressed as EC50 value, which is the sample concentration necessary to reduce 50% of the ABTS<sup>\*+</sup> radicals. All measurements were made in triplicate.

### **2.2.5. Surface tension measurements**

The influence of the NGA and the FGA concentration (0.0001-1.000% w/v) over the surface tension of ultrapure water  $\gamma$  (mN.m<sup>-1</sup>) was measured with a Kruss K100 tensiometer (Krüss, Hamburg, Germany). The Wilhelmy plate method was used with a roughened platinum plate. Measurements were performed at 25 °C for 14 000 s (time for which the equilibrium was reached; the surface tension variation was insignificant). Before each experiment, cleanness of the glassware, the measuring cup and the platinum plate were verified by performing a measurement of the surface tension of ultrapure water. Material was considered clean when the surface tension of water was equal to 72.5 ± 0.2 mN.m<sup>-1</sup>. Measurements were made in triplicate and the results were expressed in mean ± standard deviation.

### **2.2.6. Solubility measurements**

NGA and FGA solubility were measured in ultrapure water. Different concentrations were tested (from 1 to 20% w/v for FGA and from 15 to 60% w/v for NGA). Samples were solubilized for 2 h at room temperature, then stirred overnight at 4 °C at 450 rpm. They were centrifuged then for 25 min at 12 000 g. The supernatant and the precipitate were freeze-dried

for 72 h, then weighted. The solubility limit was determined as the concentration for which 90% of the sample was solubilized in the supernatant (Milani, Ghanbarzadeh, & Maleki, 2012).

### **2.2.7. Rheological measurements**

NGA and FGA were solubilized in ultrapure water at 5.00% w/v for 2 h at room temperature, then stirred overnight at 4 °C at 450 rpm. The viscosity of the solutions were determined using a Kinexus rotative rheometer (Malvern-Panalytical, KNX 2100, UK) with a cone-plate geometry (50 mm of diameter, angle of 2°) at 25 °C. The shear rate increased from 0.0001 to 100 s<sup>-1</sup> for 10 min. Each viscosity measurement was performed in triplicate.

### **2.2.8. Statistical analysis**

The values were expressed in mean ± standard deviation. Differences between mean values were assessed using the one-way analysis of variance (ANOVA) which was performed using Excel for Statistical Analysis. Differences were considered statistically significant when p<sub>value</sub> was below 0.05.

## **3. Results and discussion**



### **3.1. Impact of the functionalization on the GA color**

The first and most visible modification of the functionalized gum Arabic (FGA) was its color change (see pictures from Table 1). Indeed, the oxidation products of phenolic compounds (OXP) are generally colored (Aljawish et al., 2014), so the grafting of OXP onto native gum Arabic (NGA) strongly modified the color properties of FGA.

The color parameters of FGA and NGA powders were determined by using the CIE L\*a\*b\* system. NGA powder was white and showed a lightness L\* of 88.8 ± 0.1, a redness a\* of 1.2 ±

0.1 and a yellowness  $b^*$  of  $9.3 \pm 0.1$ , whereas FGA powder appeared orange-brown and showed a lightness  $L^*$  of  $68.6 \pm 0.2$ , a redness  $a^*$  of  $5.5 \pm 0.1$  and a yellowness  $b^*$  of  $21.8 \pm 0.1$  (Table 1).

Table 1: Color parameters ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $\Delta E$  (total color difference)) and pictures of Native Gum Arabic (NGA) and Functionalized Gum Arabic (FGA) powders

	NGA	FGA
Aspect		
$L^*$ (Lightness)	$88.8 \pm 0.1$	$68.6 \pm 0.2$
$a^*$ (Redness)	$1.2 \pm 0.1$	$5.5 \pm 0.1$
$b^*$ (Yellowness)	$9.3 \pm 0.1$	$21.8 \pm 0.1$
$\Delta E$ (Color difference)	$24.2 \pm 0.2$	

The  $\Delta E$  value of  $24.2 \pm 0.2$  indicated that the colors of FGA and NGA powders were markedly different ( $24.2 > 2.0$  so the color change was macroscopically visible (Kuehni & Marcus, 1979)). The color change of the FGA powder was the first evidence of the presence of OXP in the FGA sample.

### 3.2. Presence of phenolic compound in the functionalized gum Arabic sample

UV-visible analyses were performed in order to highlight the presence of phenolic compounds after enzymatic reaction supporting the observation of color change. The main difference between absorbance spectra of NGA and FGA was reported between 270 and 280 nm (Figure

1). A high absorbance was recorded for FGA while the one of NGA was lower but also significant in this area. This spectral region has been attributed to aromatic compounds in other studies about pectin modification (Karaki et al., 2017; Morris et al., 2002). The higher absorbance of FGA compare to NGA in this range, in addition with the higher absorbance around 325 nm (Figure 1) (maximum absorption wavelength of ferulic acid) reinforced the evidence of the presence of phenolic compounds in the FGA sample (Karaki et al., 2017). No significant absorbance difference could be observed in the visible region (> 400 nm) because the dilution of FGA at 0.01 % w/w made it colorless.

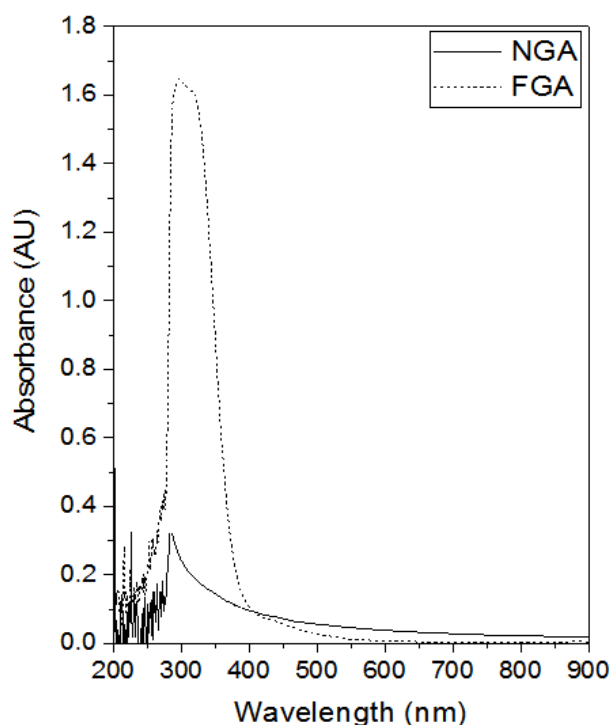


Figure 1 : UV-visible spectra of native gum Arabic (NGA) (1.00% w/v) and functionalized gum Arabic (FGA) (0.01% w/v in water) from 190 to 900 nm.

### 3.3. Quantification of the oxidation products within the functionalized gum Arabic sample

The total phenol content in NGA and FGA solutions was determined using Folin-Ciocalteu's method with gallic acid as standard to study the presence of the phenolic compound onto gum



Arabic. Studies already showed that the total phenolic content in NGA was low (28.0 ± 0.1 mg equivalent gallic acid.g dry material<sup>-1</sup>) and ferulic acid represented only 1.14% of the NGA total phenolic compound (Ayaz, Ramadan, Farid, & Alnahdi, 2016) whereas the main phenolic compound in gum Arabic would be gallic acid (22% w/w). In this study, the total initial phenol content in NGA was too low to be measured (Table 2), probably because the gum provided by Nexira was purified from phenolic content to appear as a white powder.

After 50 min of enzymatic reaction and without dialysis of the obtained product, the total phenol content was higher (232.9 ± 16.2 mg equivalent gallic acid.g dry material<sup>-1</sup>). These phenols could only have been brought by the functionalization process, because no phenol was detected on the NGA. However, after enzymatic reaction, the obtained powder contained a mixture of FGA and of oxidation products that were not grafted onto gum Arabic. The sample was then dialyzed against ultrapure water (MWCO 10 000 Da) to insure that all non-grafted oxidation products would be eliminated. The oxidation products were soluble in water up to 5% w/v. A control was made by dialyzing OXP. Only water was left in the dialyzed cellulose bag. The results showed indeed that the sample contained non-grafted phenol compounds, as the amount of phenol after dialyses was lower than before dialyses (86.2 ± 4.8 mg equivalent gallic acid.g dry material<sup>-1</sup>) (Table 2). This result confirmed that FGA was composed of 9% w/w of oxidation products of ferulic acid.

*Table 2: Quantification of phenolic content in native gum Arabic (NGA), functionalized gum Arabic (FGA) and non-dialyzed functionalized gum Arabic (non-dialyzed FGA) using the Folin & Ciocalteu's method.*

	Amount of phenol (mg equivalent gallic acid.g dry material <sup>-1</sup> )
NGA	Not detected
Non-dialyzed FGA	232.9 ± 16.2
FGA	86.2 ± 4.8

Colorimetry and UV visible measurements, confirmed the presence of phenolic compounds in the FGA sample. Some OXP were still onto FGA after dialyses. They were either grafted or

very strongly adsorbed onto it. The phenol content determination confirmed a very strong interaction or a covalent grafting of ferulic acid oxidation products onto gum Arabic during the enzymatic reaction. FTIR spectroscopy was performed in order to provide more detailed information about the chemical bound making the connection between the oxidation products and the polysaccharides.

### **3.4. Nature of the interaction between oxidation products and functionalized gum Arabic**

FTIR analyses were performed to highlight the nature of the bound between oxidation products and GA by comparing the structure of NGA and FGA. The grafting of OXP of ferulic acid onto other polysaccharides was already studied and confirmed by FTIR spectroscopy. They can be grafted on amino groups of glucosamine of the chitosan by forming a Schiff base bound (Aljawish et al., 2012). They could also be grafted onto carboxyl groups of the galacturonic acid of the pectin by forming an ester (Karaki et al., 2017). NGA contains both amine groups and carboxyl groups, so the OXP could be grafted onto either or both sites.

As shown in Figure 2, the fingerprint of gum Arabic (between 900 and 1200  $\text{cm}^{-1}$ , related to the galactose, arabinose and rhamnose content (Dong, Sørensen, He, & Engelsen, 2017; Ibekwe, Oyatogun, Esan, & Oluwasegun, 2017)) was found both in the NGA and the FGA, confirming that the polysaccharide backbone was unchanged by the enzymatic reaction.

An absorption increase was observed at 1506  $\text{cm}^{-1}$  and 1604  $\text{cm}^{-1}$  that could be linked to the apparition of a monosubstituted amide. At 1745  $\text{cm}^{-1}$  the raise of absorption peak could be linked to the vibration of a C=O. It could be related to a gain in amide II or in ester bound (Gnanasambandam & Proctor, 2000). Finally, the raise at 3778  $\text{cm}^{-1}$  could be explained by an elongation of the free NH groups. An amide signal should have been seen at 3100  $\text{cm}^{-1}$  but it was overlapped by the signal of NH groups and OH groups. These results were in agreement

with what was observed on other polysaccharides (Aljawish et al., 2012; Jin, Wang, & Bai, 2009) which confirmed the presence of a Schiff base bond between amino groups of polysaccharides and carboxyl groups of ferulic acid oxidation products.

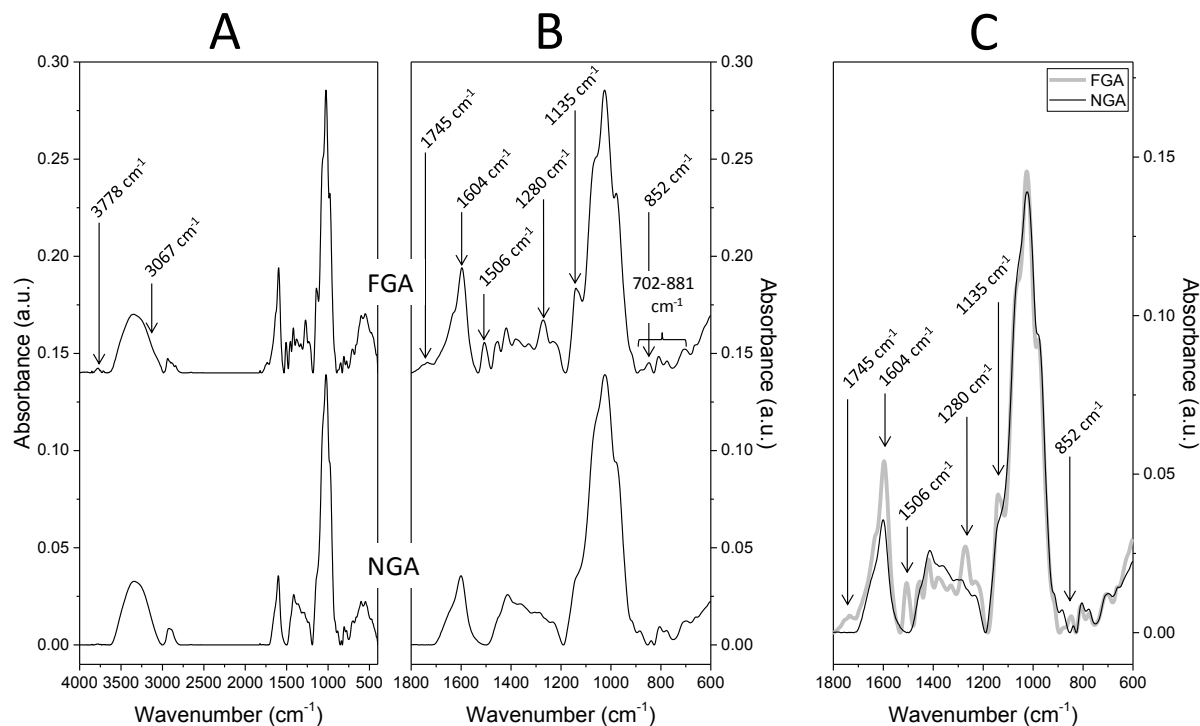


Figure 2: FTIR spectra of native gum Arabic and functionalized gum Arabic (A: whole wavenumber range, B: focused between 600 and 1800  $\text{cm}^{-1}$ , C: overlay focused between 600 and 1800  $\text{cm}^{-1}$ ).

A new band was also observed at 852  $\text{cm}^{-1}$ , which is usually attributed to para-substituted aromatic rings of FA-oxidation products (Kačuráková, Capek, Sasinková, Wellner, & Ebringerová, 2000; Karaki et al., 2017). The higher absorbance at 1135  $\text{cm}^{-1}$  could be attributed to a C-O stretches (Gnanasambandam & Proctor, 2000) and could be correlated to the elongation of the peak of an ester bounds between de carboxyl groups of GA and the OXP at 1280  $\text{cm}^{-1}$  (Espinosa-Andrews, Sandoval-Castilla, Vázquez-Torres, Vernon-Carter, & Lobato-Calleros, 2010). The peak at 1745  $\text{cm}^{-1}$  supported this information, because it could be due to a C=O stretch from an ester. This C=O stretch could also come from an amide group. It was not excluded that the grafting could have been performed by forming both amide and ester groups. The shouldering is observed at 3067  $\text{cm}^{-1}$ , that could be correlated to an aromatic CH stretch.

Due to the weak degree of functionalization (9% of OXP grafted) no further meaningful differences could be attested. These observations led to conclude that the structure of NGA was modified during the laccase-mediated oxidation process, but the deep structural changes accompanying this reaction could not be completely revealed. Thus, the small modifications observed in the spectra suggested that gum Arabic was grafted with the products of laccase-catalyzed oxidation of FA onto its amine and carboxyl groups.

### **3.5. Physicochemical properties of functionalized gum Arabic: thermal analyses**

When submitted to a temperature ramp, polysaccharides often undergo two major stages : the water desorption stage and the major decomposition stage (Jamaludin, Adam, Abdul Rasid, & Hassan, 2017; Zohuriaan & Shokrolahi, 2004). During the initial phase below 100 °C, about 10% of the total mass of gums were lost due to water evaporation (Cozic, Picton, Garda, Marlhoux, & Le Cerf, 2009; Zohuriaan & Shokrolahi, 2004)). No drastic weight loss occurred between 100 and 200 °C. Above 200 °C, an important degradation of polysaccharides occurred. A constant mass residue was obtained at high temperature (between 23 and 26% at 600 °C) (Cozic et al., 2009; Jamaludin et al., 2017).

The smaller weight loss during step 1 for FGA could be attributed to the grafting of OXP. Indeed, those were less hydrophilic than NGA, so once they were grafted onto gum Arabic, the FGA should be less hydrophilic, which would result in less water being retained by the modified polysaccharide. However, it seemed that FGA had 3 other steps after the first one. The step 3 of FGA (Figure 3) was similar to the one of NGA (step 2), but the steps 2 and 4 from FGA were not present on NGA. Step 2 could be linked to the decarboxylation of OXP onto FGA (Karaki et al., 2017). Moreover the FGA final residue was more important than the one of NGA ( $31.9 \pm 0.5\%$  for FGA against  $12.1 \pm 1.7\%$  for NGA).

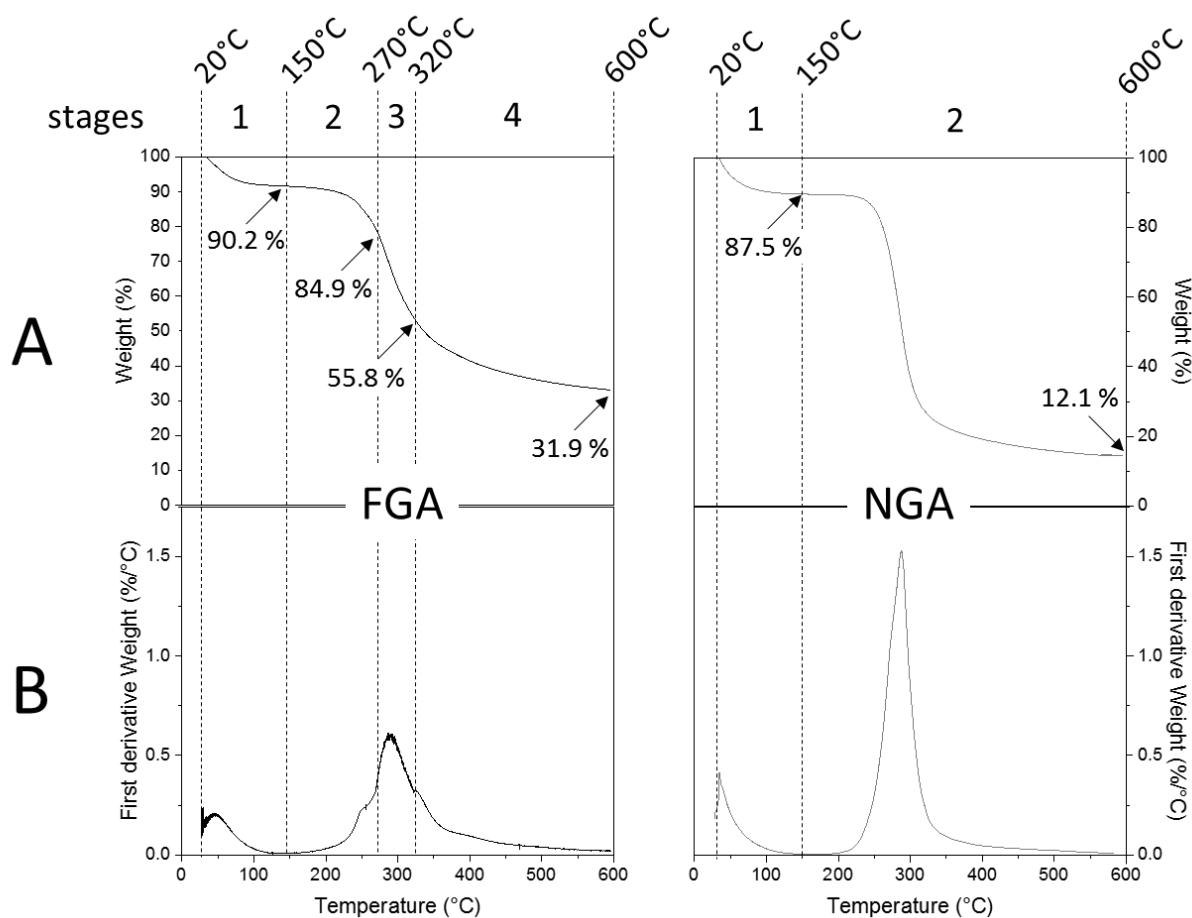


Figure 3: (A) Thermograms and (B) first derivative Weight:  $d(\text{Weight})/d(T)$  (%/°C) of FGA and NGA powder. Standard deviation (%): NGA  $\pm$  2.1% - FGA  $\pm$  2.0%

The modulated DSC thermograms of NGA and FGA in a range of temperature from -45 to 85 °C are shown in figure 5. The glass transition steps were broad because of the non-uniform nature of the transition and of the polydispersity of gum Arabic (Puspendu, 2013). Furthermore, it is difficult to see the glass transition because of the overlap with other thermal events, like the water evaporation or the enthalpic relaxation of amorphous areas. To tackle this issue, the non-reversing heat flow was measured to ensure the glass transition could be seen. The determination of the glass transition ( $T_g$ ) was carried out with the method of the tangents. In literature, gum Arabic  $T_g$  was reported to be between 49 and 54 °C (Puspendu, 2013).

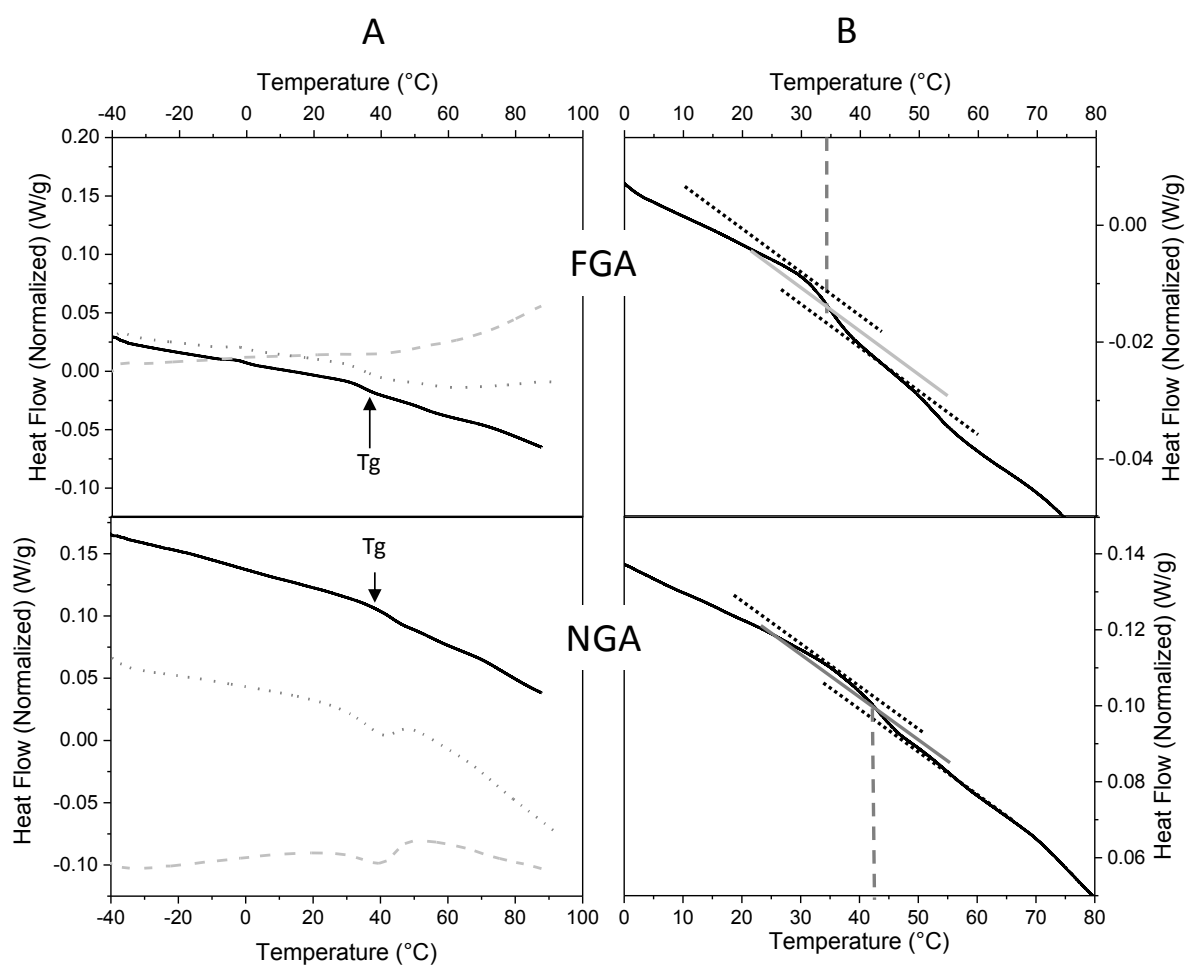


Figure 4: (A) Reversing (solid curve), total (dashed) and non-reversing (dot) heat flow normalized (W/g) of NAG (Standard deviation = 0.06%) and FGA (Standard deviation = 0.03%) and (B) zoomed Reversing heat flow normalized (W/g) and glass transition analysis (Exo Up).

In this work, the NGA  $T_g$  was found to be  $41.2 \pm 1.7$  °C and the one of FGA was  $34.0 \pm 0.4$ . The grafting of phenolic compound seemed to have lowered the glass transition of the functionalized polymer. Indeed, the grafting of OXP would have added to the steric hindrance of the FGA, so the chains would be in their glass state at lower temperature than the NGA (Karaki et al., 2017).

### 3.6. Physicochemical properties of functionalized Gum Arabic

#### 3.6.1. Solubility measurements

The solubility in water of FAG was compared to the one of NAG. The measured solubility of NAG was  $42.5 \pm 2.6\%$  w/v. This result was consistent with the data from literature, gum Arabic is well-known for its high solubility in water (up to 43–48% w/v) (Viscione, 2013). FGA solubility in water was  $10.6 \pm 0.1\%$  w/v, significantly lower than NGA one. This could be explained by the grafting of OXP onto FGA leading it less hydrophilic than NGA. However, NGA was not soluble in a water:ethanol mixture of 1:3, whereas FGA was. Since the solubility of FGA changed upon functionalization, its size and its viscosity were then studied.

#### 3.6.2. Size distribution of functionalized Gum Arabic

The size distribution from NGA and FGA solutions in ultrapure water at  $1.10^{-6}\%$  w/v was measured using Nanosight. The predominant diameter of FGA was  $93.5 \pm 3.4$  nm and the one of NGA was  $126.9 \pm 10.5$  nm (Figure 5). The span of FGA was lower than the one of NGA ( $1.0 \pm 0.1$  against  $1.5 \pm 0.1$ ).

Indeed, the average diameter of FGA was lower than the one of NGA. Furthermore, its size distribution was thinner than the one of NGA (Figure 5). This result was unexpected, because when the OXP were grafted onto gum Arabic, it could have been expected to grow larger. This could be explained by a compaction of the FGA backbone because of its gain in hydrophobic interaction within its chain. Usually, NGA size was reported smaller. In some studies, the hydrodynamic radius was 14.1 nm, (Randall, Phillips, & Williams, 1989) 11.9 nm, (Masuelli, 2013), or 35.3 nm (Renard et al., 2006) at room temperature).

It was possible that in ultrapure water, the dialyzed NGA aggregated to some extent, leading to higher hydrodynamic diameter values.

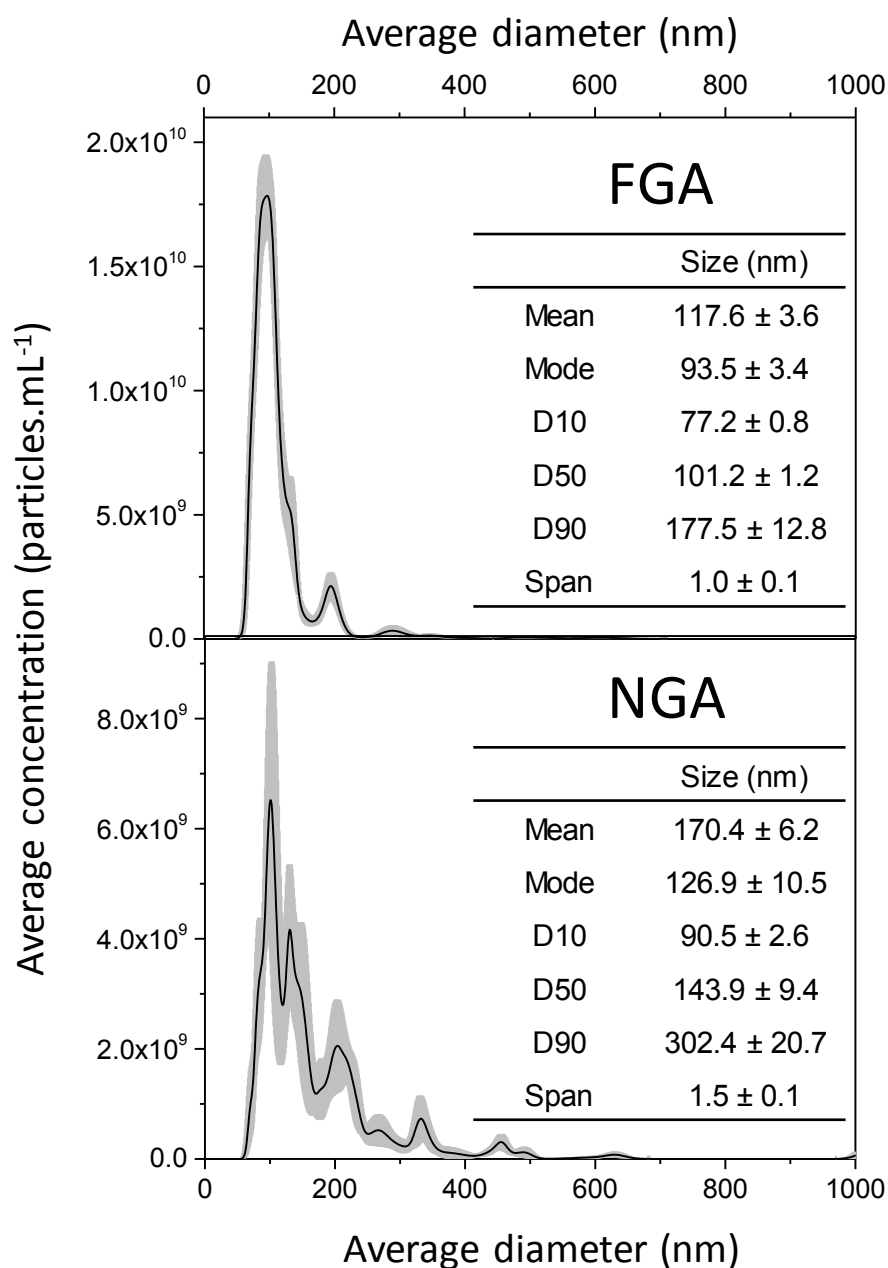


Figure 5: Size distribution of functionalized gum Arabic (FAG) and native gum Arabic (NAG) solutions in ultrapure water (1:10000 w/v) and Mean, Mode, D10, D50, D90 and span

### 3.6.3. Rheological measurements

The flow curves at increasing shear rates of NGA and FGA solutions in water at 5.00% w/v showed that the apparent viscosity ( $\eta$ , Pa.s) decreased as the shear rate ( $\dot{\gamma}$ ,  $s^{-1}$ ) increased (Figure 6). The behavior of NGA and FGA upon increasing the shear rate showed no significant



differences. A plateau was reached for  $\dot{\gamma} > 1.00 \text{ s}^{-1}$  (Figure 6) for both NGA and FGA. Similar shear-thinning flow behavior were already obtained for gum Arabic (Goycoolea, Morris, Richardson, & Bell, 1995; Mothé & Rao, 1999; Christian Sanchez, Renard, Robert, Schmitt, & Lefebvre, 2002).

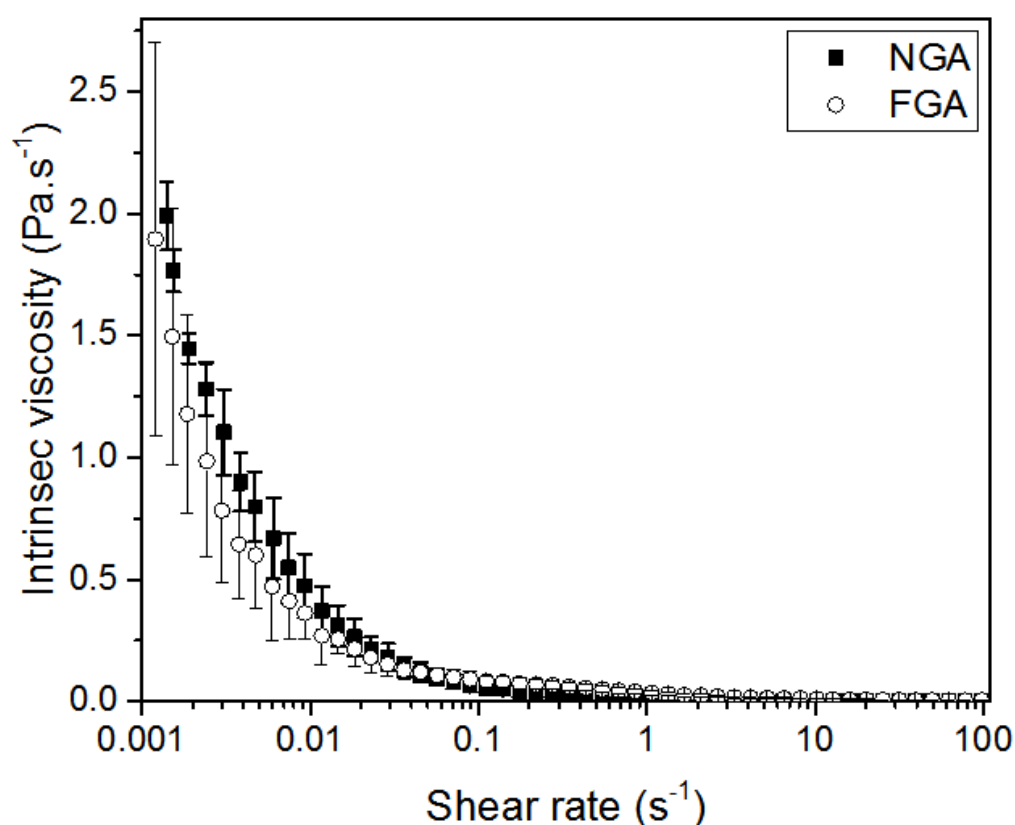


Figure 6: Flow curves of NGA (■) and FGA (○) solutions in water at 5.00% w/v at increasing shear rates from 0.0001 to 100 s<sup>-1</sup> for 10 min at 25 °C.

The functionalization did not change the flow behavior of FGA in comparison with NGA. Functionalization of pectin by using the same protocol lead to lower its intrinsic viscosity at a concentration of 1% w/v (Karaki et al., 2017). The same thing was observed with chitosan functionalization. For concentrations from 0.6 to 1.0 w/v, the viscosity of functionalized chitosan increased (Aljawish et al., 2012). At low polymer concentration (up to 0.6% w/v) no change of viscosities were observed. However, despite the grafting of phenolic compound onto gum Arabic, its rheological behavior did not change.

### 3.6.4. Surface tension measurements

The equilibrium surface tension versus concentration of FGA and NGA solutions in ultrapure water are presented Table 3. NGA is known for its use as emulsifier (Gashua, Williams, & Baldwin, 2016; Randall, Phillips, & Williams, 1988). A good emulsifier decreases significantly the interfacial tension between the aqueous phase and the oil phase. In general, the surface tension at the water/air interface is a good indicator of the emulsifier properties and is easier to measure. In those experiments, the surface tension decreased upon concentration increase from  $70.9 \pm 0.8 \text{ mN.m}^{-1}$  at 0.001% w/v to  $52.5 \pm 2.4 \text{ mN.m}^{-1}$  at 1.000% w/v for NGA. The same phenomenon was observed with FGA, from  $63.1 \pm 1.2$  at 0.001% w/v to  $31.2 \pm 0.8$  at 1.000% w/v. Moreover, for a given concentration, surface tension of FGA solution was each time lower than for NGA: the polysaccharide concentration required to decrease the water surface tension to a given value was also lower for FGA than NGA (Table 3).

Table 3: Equilibrium surface tension versus concentration of FGA and NGA solutions in ultrapure water.

Concentration % w/v	Surface tension ( $\text{mN.m}^{-1}$ )	
	NGA	FGA
1	$52.5 \pm 2.4$	$31.2 \pm 0.8$
0.1	$69.8 \pm 2.9$	$56.7 \pm 0.8$
0.01	$71.6 \pm 0.1$	$62.6 \pm 0.6$
0.001	$70.9 \pm 0.8$	$63.1 \pm 1.2$

The amphiphilic behavior of FGA seemed to be more important than the one of NGA. The grafting of phenolic compounds made the FGA more amphiphilic, which could explain why the surface tension of FGA would be lower.

### 3.6.5. Antioxidant properties of functionalized Gum Arabic

Table 4: Capacity of NGA and FGA to scavenge ABTS<sup>•+</sup>, expressed as EC<sub>50</sub> values.

	EC <sub>50</sub> ABTS test (mg.mL <sup>-1</sup> )
NGA	562.28 ± 23.23
FGA	1.33 ± 0.02

The FGA EC<sub>50</sub> was much lower than the one of NGA (1.33 ± 0.02 against 562.28 ± 23.23, respectively) (Table 4). This indicated a higher antioxidant capacity of FAG. This was related to the presence of the grafted phenolic compounds. Similar results were reported in other studies on polymers grafted with ferulic acid oxidation products (Aljawish et al., 2012; García-Zamora et al., 2015; Karaki et al., 2016). The antioxidant activity of NGA was very weak, which could be explained by its very low content of phenolic compound (too low to be measured, Table 2). The FGA antioxidant activity was really high. As a comparative, the EC<sub>50</sub> ABTS of acid ascorbic is around 0.02 and 0.13 mg.mL<sup>-1</sup> (Mammad, Mammad, Aqeil, Kribii, & Ounine, 2017; Tamuly, Hazarika, Bora, & Gajurel, 2014) and between 0.05 and 0.07 mg.mL<sup>-1</sup> for ferulic acid (Anselmi et al., 2004; Nile et al., 2016).

## 4. Conclusions

In view of these results, the functionalization of gum Arabic with phenols oxidation products appeared as a promising way to produce new functional derivatives with improved properties that are expected to broaden the scope of polysaccharides. This modification was catalyzed by the laccase of *Myceliophthora thermophyla* under soft conditions, making this process an ecofriendly way to modify gum Arabic. This process led to a colored gum Arabic powder, however it would be possible to obtain uncolored products by using ethyl ferulate instead of

ferulic acid for example (Aljawish et al., 2014). There were evidence of the grafting of phenolic compound onto gum Arabic, but due to its complex structure, it was not possible to conclude if they were linked through an amide or an ester bond. Results obtained on other polysaccharides could suggest a grafting on both amine groups and carboxyl groups. The modification of gum Arabic did not change its rheological behavior, but it lowered its solubility down to 10%. However, the change of color, the increase of the amphiphilic behavior of FGA and the huge increase of its antioxidant capacity of FGA could lead to a polymer with new functionalities and new applications.

## **Acknowledgments**

The authors acknowledge support of the LIBio by the “Impact Biomolecules” project of the “Lorraine Université d’Excellence”(Investissements d’avenir – ANR).

We would like to thank Nexira for kindly providing the Gum Arabic used in this article.

We also thank Aurélie Seiler and Blandine Simard for the technical support.

## **References**

Valiente, R., Williams, P., Nigen, M., Mejia Tamayo, V., Doco, T., & Sanchez, C. (2019). Recovery, structure and physicochemical properties of an aggregate-rich fraction from Acacia Senegal gum. *Food Hydrocolloids*, 89, 864–873. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.054>

Aberkane, L., Jasniewski, J., Gaiani, C., Hussain, R., Scher, J., & Sanchez, C. (2012). Structuration mechanism of  $\beta$ -lactoglobulin – acacia gum assemblies in presence of quercetin. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.01.010>

Ali, B., Ziada, A., & Blunden, G. (2009). Biological effects of gum Arabic: a review of some recent research. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 47(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.07.001>

Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Paris, C., Scher, J., & Muniglia, L. (2014). Laccase-catalysed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate in aqueous medium: A green procedure

for the synthesis of new compounds. *Food Chemistry*, 145, 1046–1054. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.119>

Aljawish, A., Chevalot, I., Piffaut, B., Rondeau-Mouro, C., Girardin, M., Jasniewski, J., ... Muniglia, L. (2012). Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.016>

Anselmi, C., Centini, M., Granata, P., Sega, A., Buonocore, A., Bernini, A., & Facino, R. M. (2004). Antioxidant activity of ferulic acid alkyl esters in a heterophasic system: a mechanistic insight. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21), 6425–6432. <https://doi.org/10.1021/jf049671x>

Ayaz, N. O., Ramadan, K. S., Farid, H. E. A., & Alnahdi, H. S. (2016). Protective role and antioxidant activity of Arabic gum against trichloroacetate-induced toxicity in liver of male rats. *Indian Journal Of Animal Research*, 51(2), 303–309. <https://doi.org/10.18805/ijar.10976>

Berka, R. M., Schneider, P., Golightly, E. J., Brown, S. H., Madden, M., Brown, K. M., ... Xu, F. (1997). Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3151–3157.

Boulet, J. C., Williams, P., & Doco, T. (2007). A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 69(1), 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.09.003>

Božič, M., Gorgieva, S., & Kokol, V. (2012). Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2388–2398. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.006>

Burgess, & Carless, J. E. (1984). Microelectrophoretic studies of gelatin and acacia for the prediction of complex coacervation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 98(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(84\)90472-7](https://doi.org/10.1016/0021-9797(84)90472-7)

Cozic, C., Picton, L., Garda, M.-R., Marlhoux, F., & Le Cerf, D. (2009). Analysis of Arabic gum: Study of degradation and water desorption processes. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1930–1934. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.009>

Dickinson, E., Murray, B. S., Stainsby, G., & Anderson, D. M. W. (1988). Surface activity and emulsifying behaviour of some Acacia gums. *Food Hydrocolloids*, 2(6), 477–490. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(88\)80047-X](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(88)80047-X)

Dong, Y., Sørensen, K. M., He, S., & Engelsen, S. B. (2017). Gum Arabic authentication and mixture quantification by near infrared spectroscopy. *Food Control*, 78, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.002>

Dror, Y., Cohen, Y., & Yerushalmi-Rozen, R. (2006). Structure of gum Arabic in aqueous solution. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 44(22), 3265–3271. <https://doi.org/10.1002/polb.20970>

Espinosa-Andrews, H., Sandoval-Castilla, O., Vázquez-Torres, H., Vernon-Carter, E. J., & Lobato-Calleros, C. (2010). Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier

Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers*, 79(3), 541–546. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.040>

Gamal el-din, A. M., Mostafa, A. M., Al-Shabanah, O. A., Al-Bekairi, A. M., & Nagi, M. N. (2003). Protective effect of Arabic gum against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Pharmacological Research*, 48(6), 631–635. [https://doi.org/10.1016/S1043-6618\(03\)00226-3](https://doi.org/10.1016/S1043-6618(03)00226-3)

García-Zamora, J. L., Sánchez-González, M., Lozano, J. A., Jáuregui, J., Zayas, T., Santacruz, V., ... Torres, E. (2015). Enzymatic treatment of wastewater from the corn tortilla industry using chitosan as an adsorbent reduces the chemical oxygen demand and ferulic acid content. *Process Biochemistry*, 50(1), 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.012>

Gashua, I. B., Williams, P. A., & Baldwin, T. C. (2016). Molecular characteristics, association and interfacial properties of gum Arabic harvested from both *Acacia senegal* and *Acacia seyal*. *Food Hydrocolloids*, 61, 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.005>

Gnanasambandam, R., & Proctor, A. (2000). Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 68(3), 327–332. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00191-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00191-0)

Goycoolea, F. M., Morris, E. R., Richardson, R. K., & Bell, A. E. (1995). Solution rheology of mesquite gum in comparison with gum arabic. *Carbohydrate Polymers*, 27(1), 37–45. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00031-2](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00031-2)

Hallén, A. (1972). Chromatography of acidic glycosaminoglycans on DEAE-cellulose. *Journal of Chromatography A*, 71(1), 83–91. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)85691-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)85691-0)

Ibekwe, C. A., Oyatogun, G. M., Esan, T. A., & Oluwasegun, K. M. (2017). Synthesis and Characterization of Chitosan/Gum Arabic Nanoparticles for Bone Regeneration. *American Journal of Materials Science and Engineering*, 5(1), 28–36. <https://doi.org/10.12691/ajmse-5-1-4>

Idris, O. H. M., Williams, P. A., & Phillips, G. O. (1998). Characterisation of gum from *Acacia senegal* trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. *Food Hydrocolloids*, 12(4), 379–388. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(98\)00058-7](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(98)00058-7)

Islam, A. M., Phillips, G. O., Sljivo, A., Snowden, M. J., & Williams, P. A. (1997). A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum Arabic. *Food Hydrocolloids*, 11(4), 493–505. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(97\)80048-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(97)80048-3)

Jamaludin, J., Adam, F., Abdul Rasid, R., & Hassan, Z. (2017). Thermal studies on Arabic gum – carrageenan polysaccharides film. *Chemical Engineering Research Bulletin*, 19–80. <https://doi.org/10.3329/cerb.v19i0.33800>

Jin, X., Wang, J., & Bai, J. (2009). Synthesis and antimicrobial activity of the Schiff base from chitosan and citral. *Carbohydrate Research*, 344(6), 825–829. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.01.022>

Kačuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N., & Ebringerová, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43(2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00151-X)

- Karaki, N., Aljawish, A., Muniglia, L., Bouguet-Bonnet, S., Leclerc, S., Paris, C., ... Humeau-Virot, C. (2017). Functionalization of pectin with laccase-mediated oxidation products of ferulic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 104, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.enzymtec.2017.05.001>
- Karaki, N., Aljawish, A., Muniglia, L., Humeau, C., & Jasniewski, J. (2016). Physicochemical characterization of pectin grafted with exogenous phenols. *Food Hydrocolloids*, 60, 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.004>
- Kuehni, R. G., & Marcus, R. T. (1979). An Experiment in Visual Scaling of Small Color Differences\*. *Color Research & Application*, 4(2), 83–91. <https://doi.org/10.1111/j.1520-6378.1979.tb00094.x>
- Lewis, B. A., & Smith, F. (1957). The heterogeneity of polysaccharides as revealed by electrophoresis on glass-fiber paper. *Journal of the American Chemical Society*, 79(14).
- Lopez-Torrez, L., Costalat, M., Williams, P., Doco, T., & Sanchez, C. (2015). Acacia senegal vs. Acacia seyal gums – Part 1: Composition and structure of hyperbranched plant exudates. *Food Hydrocolloids*, 51, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.019>
- Mammad, Z., Mammad, K., Aqeil, T., Kribii, A., & Ounine, K. (2017). Antibacterial and Antioxidant activity of *Nigella Sativa*. *International Journal of Innovation and Scientific Research*, pp. 167–172.
- Masuelli, M. A. (2013). Hydrodynamic Properties of Whole Arabic Gum. *American Journal of Food Science and Technology*, *American Journal of Food Science and Technology*, 1(3), 60–66. <https://doi.org/10.12691/ajfst-1-3-9>
- McNamee, B. F., O’Riorda, E. D., & O’Sullivan, M. (1998). Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11), 4551–4555. <https://doi.org/10.1021/jf9803740>
- Milani, J., Ghanbarzadeh, B., & Maleki, G. (2012). Rheological Properties of Anghouzeh Gum. *International Journal of Food Engineering*.
- Morris, G. A., Hromádková, Z., Ebringerová, A., Malovíková, A., Alföldi, J., & Harding, S. E. (2002). Modification of pectin with UV-absorbing substituents and its effect on the structural and hydrodynamic properties of the water-soluble derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 48(4), 351–359. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00268-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00268-5)
- Mothé, C. G., & Rao, M. A. (1999). Rheological behavior of aqueous dispersions of cashew gum and gum arabic: effect of concentration and blending. *Food Hydrocolloids*, 13(6), 501–506. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(99\)00035-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(99)00035-1)
- Nile, S. H., Ko, E. Y., Kim, D. H., Keum, Y.-S., Nile, S. H., Ko, E. Y., ... Keum, Y.-S. (2016). Screening of ferulic acid related compounds as inhibitors of xanthine oxidase and cyclooxygenase-2 with anti-inflammatory activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.08.013>
- Nussinovitch, A. (1997). Exudate gums. In A. Nussinovitch (Ed.), *Hydrocolloid Applications: Gum technology in the food and other industries* (pp. 125–139). Boston, MA: Springer US.

Puspendu, B. (2013). Dielectric and conductive properties of Gum Arabic-CdS nanocomposites. 4<sup>th</sup> International Conference on Recent Advances in Composite Materials.

Randall, R. C., Phillips, G. O., & Williams, P. A. (1988). The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 2(2), 131–140. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(88\)80011-0](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(88)80011-0)

Randall, R. C., Phillips, G. O., & Williams, P. A. (1989). Fractionation and characterization of gum from *Acacia senegal*. *Food Hydrocolloids*, 3(1), 65–75. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(89\)80034-7](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(89)80034-7)

Renard, D., Lavenant-Gourgeon, L., Ralet, M.-C., & Sanchez, C. (2006). *Acacia senegal* Gum: Continuum of Molecular Species Differing by Their Protein to Sugar Ratio, Molecular Weight, and Charges. *Biomacromolecules*, 7(9), 2637–2649. <https://doi.org/10.1021/bm060145j>

Sanchez, C., Renard, D., Robert, P., Schmitt, C., & Lefebvre, J. (2002). Structure and rheological properties of acacia gum dispersions. *Food Hydrocolloids*, 16(3), 257–267. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00096-0](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00096-0)

Sanchez, C., Schmitt, C., Kolodziejczyk, E., Lapp, A., Gaillard, C., & Renard, D. (2008). The *Acacia* Gum Arabinogalactan Fraction Is a Thin Oblate Ellipsoid: A New Model Based on Small-Angle Neutron Scattering and Ab Initio Calculation. *Biophysical Journal*, 94(2), 629–639. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.109124>

Sarika, P. R., James, N. R., Kumar, P. R. A., Raj, D. K., & Kumary, T. V. (2015). Gum arabic-curcumin conjugate micelles with enhanced loading for curcumin delivery to hepatocarcinoma cells. *Carbohydrate Polymers*, 134, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.068>

Sarkar, S., Gupta, S., Variyar, P. S., Sharma, A., & Singhal, R. S. (2013). Hydrophobic derivatives of guar gum hydroxyzate and gum Arabic as matrices for microencapsulation of mint oil. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.070>

Sarkar, S., & Singhal, R. S. (2011). Esterification of guar gum hydrolysate and gum Arabic with n-octenyl succinic anhydride and oleic acid and its evaluation as wall material in microencapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1723–1731. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.003>

Schmitt. (2000). Étude de la coacervation complexe entre la bêta-lactoglobuline et la gomme d'acacia en solution aqueuse. Institut National Polytechnique de Lorraine-INPL.

Seghi, R. R., Hewlett, E. R., & Kim, J. (1989). Visual and Instrumental Colorimetric Assessments of Small Color Differences on Translucent Dental Porcelain. *Journal of Dental Research*, 68(12), 1760–1764. <https://doi.org/10.1177/00220345890680120801>

Shi, Y., Li, C., Zhang, L., Huang, T., Ma, D., Tu, Z., ... Ouyang, B. (2017). Characterization and emulsifying properties of octenyl succinate anhydride modified *Acacia seyal* gum (gum arabic). *Food Hydrocolloids*, 65, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.043>

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M., Packer, L., Singleton, V. L., Orthofer, R., ... Orthofer, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. <https://doi.org/10.1016/S0076->



[6879\(99\)99017-1](#)

Tamuly, C., Hazarika, M., Bora, J., & Gajurel, P. R. (2014). Antioxidant activities and phenolic content of *Piper wallichii* (Miq.) Hand.-Mazz. *International Journal of Food Properties*, 17(2), 309–320.

Thevenet, F. (2009). Gomme d’acacia, hydrocolloïde multifonctionnel et nutritionnel.

Viscione, L. (2013). Fibre-enriched beverages. In J. A. Delcour & K. Poutanen (Eds.), *Fibre-Rich and Wholegrain Foods* (pp. 369–388). Woodhead Publishing.

Wang, H., Williams, P. A., & Senan, C. (2014). Synthesis, characterization and emulsification properties of dodecanyl succinic anhydride derivatives of gum Arabic. *Food Hydrocolloids*, 37, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.033>

Wee, A. G., Monaghan, P., & Johnston, W. M. (2002). Variation in color between intended matched shade and fabricated shade of dental porcelain. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 87(6), 657–666. <https://doi.org/10.1067/mpr.2002.125727>

Zohuriaan, M. J., & Shokrolahi, F. (2004). Thermal studies on natural and modified gums. *Polymer Testing*, 23(5), 575–579. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2003.11.001>

### 3. Contribution de l'article

L'oxydation de l'acide férulique catalysée par la laccase produit des molécules présentant une coloration orangée marquée. Lors d'études antérieures portant sur le greffage de ces produits d'oxydation sur des polysaccharides, la première observation faite était que les polymères modifiés présentaient à leur tour une coloration orange. En réalisant cette oxydation de l'acide férulique en présence de la gomme d'acacia, une gomme colorée a été obtenue. En effet, la gomme d'Acacia native avait une couleur blanche, tandis que la gomme fonctionnalisée avait une couleur orangée. **Le changement de couleur était important** ( $\Delta E$  de  $24,2 \pm 0,2$ ). Les composés phénoliques ont été dosés dans la gomme fonctionnalisée. La quantité de phénols mesurée dans la gomme fonctionnalisée après dialyse était de 9 % m/m, ce qui constitue une augmentation significative par rapport à la gomme native dans laquelle la présence de phénols n'a pas été détectée. La présence de ces phénols lui a conféré de nouvelles propriétés antioxydantes. La valeur de l'EC<sub>50</sub> de la gomme d'Acacia native était de  $562,28 \pm 23,23$  mg.mL<sup>-1</sup> tandis qu'elle était de  $1,33 \pm 0,02$  mg.mL<sup>-1</sup> pour la gomme fonctionnalisée.

La gomme d'Acacia est connue pour sa forte solubilité dans l'eau tout en présentant une faible viscosité. Ainsi, des investigations plus poussées ont été menées afin de vérifier l'impact de la fonctionnalisation sur ces deux propriétés importantes. Il a été constaté que la gomme fonctionnalisée était **moins soluble dans l'eau que la gomme native** (respectivement  $10,6 \pm 0,1$  % p/v contre  $42,5 \pm 2,6$  % p/v), ce qui pouvait être relié à la **diminution de son caractère hydrophile** probablement dû au greffage des produits d'oxydation présentant un caractère hydrophobe. Il est à noter que cette solubilité restait importante et compatible avec la gamme de concentration d'utilisation de la gomme native en phase aqueuse. Malgré cette diminution de solubilité dans l'eau, **le comportement rhéologique des solutions aqueuses de gomme d'Acacia native et fonctionnalisée n'était pas significativement différent** dans les conditions étudiées : tout comme la gomme native, la gomme modifiée présentait une viscosité faible et

avait un comportement rhéofluidifiant avec un plateau Newtonien aux fortes vitesses de cisaillement ( $>100 \text{ s}^{-1}$ ).

La gomme native est généralement utilisée pour son pouvoir émulsifiant, le greffage de composés phénoliques pourraient donc impacter cette propriété. D'après les mesures réalisées sur des solutions de la gomme modifiée, il s'avérait que la tension de surface des solutions de gomme fonctionnalisée était toujours plus faible que celle mesurées de la gomme native (par exemple  $31,2 \pm 0,8 \text{ mN.m}^{-1}$  pour la gomme fonctionnalisée contre  $52,5 \pm 2,4 \text{ mN.m}^{-1}$  pour la gomme native à 1 % p/v). Cependant, des mesures de tension interfaciale ainsi que la détermination de la capacité émulsifiante restent à déterminer.

Les propriétés structurales de la gomme d'Acacia ont également été modifiées par le greffage de composés phénoliques. Les transitions de phase induites par la température ont été mises en évidence par DSC. La température de transition vitreuse de la gomme fonctionnalisée était plus basse ( $34,0 \pm 0,4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) que celle mesurée avec la gomme native ( $41,2 \pm 1,7 \text{ }^\circ\text{C}$ ). En **augmentant l'encombrement stérique au sein de la gomme modifiée**, le greffage des produits d'oxydation semble avoir joué le rôle de plastifiant augmentant ainsi la flexibilité du polymère ce qui s'est traduit par une température de transition vitreuse plus faible. **La fonctionnalisation a également modifié la stabilité thermique** du polysaccharide. La dégradation du polymère en fonction de la température a été analysée par TGA. Une perte de masse a été observée entre 150 et 270  $^\circ\text{C}$  indiquant une potentielle décarboxylation des produits d'oxydation greffés. De plus la masse de résidu final de gomme fonctionnalisée était plus importante que celui mesurée avec la gomme native. **La modification enzymatique de la gomme avait un impact important sur son comportement thermique**. De plus, cette analyse thermogravimétrique a également permis de montrer que la quantité d'eau était moins importante sur la gomme modifiée que sur la gomme native ( $9,8 \pm 0,3 \%$  de perte pour la gomme fonctionnalisée entre 20 et 150  $^\circ\text{C}$  contre  $12,1 \pm 1,7 \%$  pour la gomme native), indiquant que **la gomme fonctionnalisée était moins**

**hydrophile** que la gomme native.

La présence de composés phénoliques, ses nouvelles propriétés antioxydantes et l'amélioration de ses propriétés d'abaissement de la tension superficielle de solutions aqueuses pourrait renforcer son utilisation en agroalimentaire. Toutefois, avant de pouvoir utiliser cette gomme modifiée en industrie alimentaire, de nombreux tests nécessiteront d'être réalisés auparavant notamment pour prouver son innocuité.

Il a été démontré que les propriétés de la gomme d'Acacia modifiée étaient liées au greffage des produits d'oxydation de l'acide férulique. L'utilisation de ce polymère modifié constitue **une approche originale pour l'étude des interactions** mise en jeu lors de la coacervation complexe entre la gomme d'Acacia modifiée et le chitosane.

---

## **IV. Publication 4 : Modification de polysaccharides par voie enzymatique pour contrôler le type d'assemblage : une approche thermodynamique**

### **1. Introduction**

Les travaux présentés dans le chapitre 1 (Publication 1) ont permis de démontrer l'impact du ratio molaire, du pH et de la température sur la taille et le nombre d'objets formés lors de l'auto-assemblage entre la gomme d'Acacia et le chitosane. Ces observations ont été corrélées avec les paramètres thermodynamiques mesurées par titration calorimétrique isotherme, en particulier l'enthalpie et la stœchiométrie. Les interactions mises en jeu (majoritairement électrostatiques) étaient maximales pour un pH de 5,5 et à une température de 45 °C. Parallèlement, les travaux présentés dans les chapitres 2 et 3 ont permis de modifier la gomme d'Acacia notamment au niveau de sa charge. Il est également nécessaire de rappeler que la modification du chitosane selon un procédé similaire est maîtrisée au laboratoire. A ce stade, 4 polymères, 2 natifs et 2 modifiés, sont donc à disposition afin d'étudier les propriétés d'autoassemblages de polysaccharides complexes et de mettre en évidence l'influence du type d'interaction sur la structure des objets formés. Il a donc été envisagé dans cette étude d'utiliser ces 4 polysaccharides dans les conditions optimales reportées précédemment (pH 5,5, 45 °C). Dans ces conditions, les paramètres thermodynamiques et l'aspect des complexes formés ont été déterminés avec l'ensemble des couples de polysaccharides possibles et en comparaison avec l'auto-assemblage entre les polymères natifs.

Le greffage de composés phénoliques sur les polysaccharides modifie le nombre et la nature des charges disponibles tout en changeant l'hydrophilie et donc leur affinité au solvant polaire. De plus, il est décrit dans la littérature l'établissement potentiel de nouvelles interactions en présence de noyaux phénoliques notamment de type  $\pi$ - $\pi$  stacking,  $\pi$ -anion et  $\pi$ -cation. **Quel est l'impact du greffage des produits d'oxydation sur l'auto-assemblage tant d'un point de vue de la nature des complexes formés que d'un point de vue thermodynamique ?**

La détermination des paramètres thermodynamiques a été réalisée par titration calorimétrique isotherme (ITC). Les modifications attendues concernant le nombre et la nature des interactions mises en jeu devraient se traduire par un ratio optimal. Pour le vérifier, une étude du potentiel Zêta et de la turbidité des différents auto-assemblages à différents ratios molaires a également été mise en œuvre. Parallèlement à ces mesures, les objets formés aux différents ratios molaires ont été observés par microscopie optique.

L'étude de ce système, en parallèle des informations structurales obtenues sur les polymères modifiés dans les études précédentes, devrait permettre d'avoir une meilleure compréhension de la relation entre la structure, les propriétés des polymères en solution et leur capacité à former des objets.

## 2. Article: Polysaccharides enzymatic modification to control of the coacervation or aggregation formation: a thermodynamic approach

Sera soumis dans *Journal of Colloid and Interface Science*

Marie E. Vuillemin, Florentin Michaux, Lionel Muniglia, Aurélie Seiler, Michel Linder and  
Jordane Jasniewski \*

\*Corresponding author: [jordane.jasniewski@univ-lorraine.fr](mailto:jordane.jasniewski@univ-lorraine.fr)  
Université de Lorraine, LIBio, F-54000 Nancy, France

### Abstract

#### Hypothesis

The effect of experimental conditions on polymers complex coacervation has already been widely studied but the thermodynamic pathways that drive this phenomenon and its mechanism are obscure. In order to get a better understanding of the interactions between polymers during coacervation, gum Arabic and chitosan were modified by covalent grafting of ferulic acid oxidation products so that they could undergo different types of interactions.

#### Experiments

The charge optimal ratio between the polymers was determined by Zeta potential measurements. The stoichiometry of the interaction was determined by ITC measurements, along with the strength of the interaction and the thermodynamic parameters related to it. Turbidity measurements were performed to indicate when complexes were formed. Finally, to identify the type of objects that were formed, optical microscopy measurements were performed.

#### Findings

The grafting of phenolic compounds onto the polymers probably increased their ability to exhibit  $\pi$ - $\pi$  stacking and  $\pi$ -cation interactions. The polymers could have exhibited new interactions, which led to the formation of different objects. Weak interactions (only electrostatic interactions) led to complex coacervation, whereas strong interactions (more numerous electrostatic interactions,  $\pi$ - $\pi$  stacking and  $\pi$ -cation interactions) led to aggregation.

**Keywords:** Complex coacervation; Isothermal titration calorimetry; gum Arabic; chitosan; modified polymers; functionalization; aggregation; self-assembly

## **1. Introduction**

Polymers self-assembly by complex coacervation is the subject of numerous investigations in some biological and food applications [1–4] but also in pharmacological and medical research [5,6], mainly because of their protective properties and the vectorization of biomolecules of interest to cellular targets. They are also used for protein purification [3,7,8]. Complex coacervation is a phenomenon in which polyelectrolytes interact to form a liquid phase rich in polymer called coacervate and an equilibrium phase poor in polymer called the diluted phase [9]. The influence of environmental parameters over complex coacervation has already been studied by several authors. They showed that the construction of the coacervates depends mainly on the selected polymers, and for a given system, on pH, ionic strength, temperature and concentration, charges, chain flexibility of polyelectrolytes [10–15]... Though the effect of experimental conditions on polymers complex coacervation has already been widely studied for several systems, the question of the thermodynamic pathways that drive this phenomenon and of its mechanism is rarely handled and remains an issue to be dealt with. Previous studies have already begun to study this subject [16–20].

Gum Arabic and chitosan are good candidates to study complex coacervation, because both of



them can be charged in solution. Chitosan is a polymer of glucosamine and N-acetylglucosamine bound to  $\beta$  (1-4) with a high density of positive charges when ionized [24]. Chitosan is charged below its pKa, which is between 6.3 to 7.0 [21], because of its amine groups. It has an extended conformation in acetic acid solution, so its charges are accessible [22,23]. It is a property that few polysaccharides present and it is the main reason that led to the choice of chitosan. The main source of chitosan comes from the deacetylation under alkaline conditions of the chitin of crustaceans shells. This biopolymer is film-forming, biodegradable and biocompatible. It exhibits antimicrobial and antioxidant activities [24–26]. Chitosan was chosen as the polycation for this study and gum Arabic was chosen as polyanion. It is a sticky exudate of air-solidified tree sap from the stems or branches of the Acacia trees [30,31]. There are several species of Acacia, however the two most exploited species are *Acacia senegal* and *Acacia seyal*, which gives essentially friable gum [32]. Gum Arabic contains three different fractions: 85-90 wt. % of arabinogalactan, 10 wt. % of arabinogalactan-protein complex and 2 wt. % of one or two glycoproteins [33]. These fractions confers several different groups to Arabic gum. It possesses amine groups due to its protein content. It also contains carboxylic groups present on its glucuronic acid residues [27], which are responsible for gum Arabic charge in aqueous solution above its pKa of 3.6. Gum Arabic is a very hydrophilic polysaccharide highly soluble in water. It has a globular structure in aqueous solution [28,29]. Nevertheless, its protein fraction composed of hydrophobic groups induce an amphiphilic character to the polysaccharide that allows its use to increase emulsions stability [27,28]. Then, it is used in various industrial applications as an additive in food formulation (E414) or for encapsulation [29], for vectorization in the pharmaceutical industry [30–32], as an adhesive in the cosmetic industry and for various other applications [33].

Several authors have already studied the complex coacervation of gum Arabic and chitosan [22,34–37]. The influence of several parameters such as pH, ionic strength, temperature, or

polyelectrolytes concentration on gum Arabic and chitosan coacervation has been well characterized. However, only in recent studies were the formation of coacervates mechanism and the thermodynamic parameters behind the complex formation investigated [20]. It was shown that pH and temperature affected the thermodynamics of gum Arabic-chitosan interactions (especially at 45 °C and at pH 5.5) and that the coacervation was enthalpy driven.

Furthermore, in order to get a better understanding of the mechanism behind the complex formation, it was considered to modify the polymers structure. This method could lead to a better understanding of the relation between polymer structure and complex coacervation.

Some authors already tried to modify chitosan by chemical methods in order to shed some light on the impact of modification on the coacervate formation with gum Arabic [47–51]. They showed that modifying chitosan by N, O-carboxymethylation or by O-carboxymethylation reduced electrostatic interactions while maintaining high coacervation yields. Other driving forces such as hydrophobic interaction could be considered for chitosan and gum Arabic to form coacervates, especially at high temperatures. This could initially allow a better understanding of the mechanisms and forces that direct the formation of complexes. The modification of polymers could lead to complexes formation conditions that are different from the optimal conditions obtained with native polymers and to the formation of different objects (particles, aggregates, coacervates...).

Gum Arabic and chitosan could be good candidates for enzymatic modification. Indeed, in a study from Aljawish [41], chitosan was functionalized by grafting ferulic acid (AF) oxidation products using the *Myceliophthora thermophyla* laccase. The authors showed that the functionalization of chitosan was carried out on the C2 by forming a Schiff base (the formation of a C=N link was proved by FTIR analyses). The grafting of these phenolic oxidation products onto carboxyl group was also studied by Karaki [42]. Previous studies showed by FTIR and

---

NMR analyses that they would be grafted onto the C6 carbons in galacturonic units, probably by forming an ester bound. Gum Arabic was a good candidate for this functionalization since it possess both amine and carboxyl groups. In previous studies, it was shown that gum Arabic was grafted with oxidation products, probably on both sites.

In order to have a better understanding of the interactions that occurred between the two polymers, modifying their structure would help to shed some light on how their structure impacts the thermodynamic parameters of the interactions and to get a better understanding of the interactions mechanism.

This study aimed to better understand the influence of polymer modification on the thermodynamic parameters of the interaction (stoichiometry, entropy and enthalpy) at pH 5.5 and at 45 °C, conditions for which the impact on the enthalpy and entropy is the strongest with native polymers [20], using Isothermal Titration Calorimetry. It also aimed to use these structure-modified polymers to contribute to the knowledge of complex coacervate formation mechanism.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

Chitosan (CN) MMW (medium molecular weight, Mw 390 kDa determined by SEC-MALS experiments, deacetylation degree of 75%) was purchased from Sigma-Aldrich (France). Gum Arabic (GA) Instantgum AA from *Acacia senegal* (Mw 412 kDa determined by SEC-MALS experiments) was a gift from Nexira (France). Ferulic acid >99% (FA) was purchased from Sigma-Aldrich (France). Acetone, methanol and ethanol were purchased from Carlo Erba (France). Acetic acid, NaOH and ultrapure water were of analytical grade. The enzyme used for the modification of the polymers was commercialized as “Novozym® 51003” from

Novozym (Bagsvaerd, Denmark). It is a fungal laccase from *Myceliophthora thermophila*, a polyphenol oxidase. The laccase stock activity was  $32\,038 \pm 1\,322$  LAMU.g<sup>-1</sup>.

## 2.2. Methods

### 2.2.1. Polymers modification

The method used to functionalize gum Arabic was adapted from Aljawish *et al.* and Karaki *et al.* [38,39]. 1 g of polysaccharide was dispersed into 45 mL of phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) and stirred at 4 °C overnight. The polysaccharides were not soluble in this buffer so the functionalization was performed under heterogeneous conditions. The dispersion was stirred at 450 rpm for 1 h at 30 °C. 5 mL of ferulic acid dissolved in methanol (50 mM) was added to the batch. Once the temperature was stable, 13.5 UI.mL<sup>-1</sup> of Novozym® 51003 was added to trigger the reaction. The batch was then stirred at 30 °C for 50 min.

For chitosan (CN), the method was the same used by Aljawish *et al.* [38]. The enzymatic reaction was stopped after 50 min, by filtering with Ministar-RC membranes (Sartorius, porosity 0.2 µm) the reaction medium under vacuum. The functionalized chitosan (FCN) recovered was washed with phosphate buffer pH 7.5, ultrapure water, methanol, ethanol and then acetone to remove all traces of substrates and enzyme on the chitosan derivative.

For gum Arabic (GA), the method was adapted from Karaki *et al.* [39]. The enzymatic reaction was also stopped after 50 min, by adding 150 mL of cold ethanol. The non-functionalized GA precipitated. The obtained mixture of functionalized GA (FGA) and non-grafted FA oxidation products (OXP) soluble in the phosphate buffer/ethanol mixture and non-functionalized insoluble GA was then centrifuged for 20 min at 12000 g with a Beckmann centrifuge (Beckman Coulter Inc., Villepinte, France). The precipitate contained non-functionalized GA (verified by FTIR measurements) and a part of phosphate buffer salts, whereas the supernatant contained the functionalized GA and the ferulic acid oxidation products not grafted on GA. The

---

ethanol was then eliminated with a rotary evaporator BUCHI R144 (BUCHI SARL, Rungis, France) at a boiling point of 40 °C at 175 mbar. Some amount of water from the buffer solution was also evaporated by decreasing the pressure until 72 mbar.

### 2.2.2. Polymers purification

Native chitosan (NCN) and functionalized chitosan (FCN), and native gum Arabic (NGA) and functionalized gum Arabic (FGA) were dialyzed against acetic acid (1% v/v) and water, respectively, with a high grade regenerated membrane (MWCO 10 000 Da from Membrane Filtration Products Inc.) to eliminate excess salts and eventually non-grafted FA oxidation products (OXP) for functionalized polymers. Dialysis were stopped when the conductivity outside the membrane was equal to the one of acetic acid (1% v/v) or ultrapure water, respectively. Samples were centrifuged then for 30 min at 12 000 g to remove insoluble material and air bubbles and then freeze-dried and stored at 4 °C. The molecular weights of both polysaccharides were verified by SEC-MALS measurement post-dialysis. The grafting of oxidation products onto the polymers did not significantly change their molecular weight.

### 2.2.3. Polymers stock solutions preparation

NCN and FCN 0.02% w/v ( $5.13 \times 10^{-4}$  mM) and NGA and FGA 0.50% w/v ( $1.21 \times 10^{-2}$  mM) stock solutions were prepared by dissolving purified NCN and FCN or NGA and FGA in acetic acid (1% v/v in ultrapure water). The solutions were stirred on a magnetic plate at 400 rpm overnight at 4 °C to make sure the polymers were completely dissolved. The NCN and FCN solutions were prepared at 0.02% w/v ( $5.13 \times 10^{-4}$  mM), concentration for which its viscosity was low and adapted to ITC experiments. The NGA and FGA concentration were adjusted to 0.50% w/v ( $1.21 \times 10^{-2}$  mM) based on preliminary measurements to optimize concentrations in order to have complete titrations without signal saturation.

#### 2.2.4. Polymers mixtures preparation

Polymers mixtures were prepared at 45 °C, at pH 5.5 by adding either acetic acid (1 N) or NaOH (5 N) as required, and different polymers molar ratio. The required amount of polymer solutions were placed 15 min in a thermostatic degassing chamber (TA instruments, Waters SAS, France) to reach the targeted temperature and remove bubbles. NGA or FGA solutions were then added to NCN or FCN solutions.

#### 2.2.5. Isothermal titration calorimetry (ITC)

ITC measurements were carried out with an Affinity ITC equipped with a standard volume (965  $\mu\text{L}$ ) gold cell (TA instruments, Waters SAS, France) to measure the dissociation constant ( $K_d$ ) and the enthalpic variation due to interaction between CN and GA. The entropy and the Gibbs free energy were obtained from the following equations:

$$\Delta G = - R.T.\ln(1/K_d) \quad (\text{Eq. 1})$$

$$T.\Delta S = \Delta H - \Delta G \quad (\text{Eq. 2})$$

With  $\Delta G$ : Gibbs free energy variation ( $\text{kJ.mol}^{-1}$ ),  $\Delta H$ : enthalpy variation ( $\text{kJ.mol}^{-1}$ ),  $\Delta S$ : entropy variation ( $\text{kJ.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ),  $T$ : temperature (K) and  $R$  is the specific gas constant ( $8.3144598 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ).

Ultrapure water was used in the reference cell. All solutions were degassed under vacuum for 15 min using the associated degassing station (TA instruments, Waters SAS, France) at the temperature of titration (45 °C). The injector microsyringe (320  $\mu\text{L}$ ), was loaded with stock solution of NGA or FGA (0.50% w/v NGA or FGA ( $1.21 \times 10^{-2} \text{ mM}$ ) in 1.00% v/v acid acetic solution). 5  $\mu\text{L}$  were sequentially injected 50 times each 300 s to the titration cell filled with NCN or FCN solution (0.02% w/v NCN or FCN ( $5.13 \times 10^{-4} \text{ mM}$ ) in 1.00% v/v acid acetic solution). At the end of the experiment, the molar ratio of the mixture in the cell was 7:1. The polymers concentrations were chosen based on preliminary measurements to optimize

concentrations in order to have complete titrations without signal saturation. For each measurement, the pH, the temperature and the acetic acid solvent were the same in the cell and in the syringe to limit the dilution effect. The heat of dilution from the blank titration was subtracted from the raw data in all experiments. Data acquisition was performed using the ITC Run software and data were analyzed with the NanoAnalyse software (TA instruments, Waters SAS, France). The “Independent” model was chosen as the best model from the plot residual values to fit the obtained isotherms. All measurements were made in triplicate.

#### 2.2.6. Approximate Zeta potential

The approximate Zeta potential of the polymers alone (0.02 w/v for NCN and FCN ( $5.13 \times 10^{-4}$  mM) and 0.50% w/v for NGA and FGA ( $1.21 \times 10^{-2}$  mM)) and of the mixtures were calculated from measurement of the electrophoretic mobility at controlled temperature (45 °C) using a Zetasizer Nano-ZS instrument (Malvern Panalytical, United Kingdom) equipped with a He/Ne ion laser ( $\lambda = 532$  nm). Measurements were collected on a detector at 173°. The instrument determined the Zeta potential with the Smoluchowski equation [40]. All measurements were made in triplicate.

#### 2.2.7. Turbidity measurements

Turbidities of the mixtures were measured with a UV-visible spectrophotometer (Shimadzu 1280, Japan) at 660 nm. The transmittance (T) of the spectrophotometer was calibrated with 0.1 N acetic acid to 100% and the turbidity of the samples was reported as 100-T%. The relative turbidity ( $\tau$ ) was calculated from the equation 3:

$$\tau = -\frac{1}{L} \cdot \ln \frac{I_t}{I_0} \quad (\text{Eq. 3})$$

Where L was the optical path length (1 cm) and  $I_t$  and  $I_0$  were the transmitted light intensity and the incident light intensity, respectively. All measurements were made in triplicate.

### 2.2.8. Optical microscopy

The mixtures were observed by optical microscopy (Olympus BH2, Japan) at x40 magnification. The images were recorded with a CMOS 5 Mpixel camera (Olympus) under the control of ToupView software. The micrographs presented are representative of the samples.

### 2.2.9. Statistical analysis

The values were expressed in mean  $\pm$  standard deviation. Differences between mean values were assessed using the one-way analysis of variance (ANOVA) which was performed using Excel for Statistical Analysis and XLSTAT. Differences were considered statistically significant when  $p_{\text{value}}$  was below 0.05.

## 3. Results and discussion

### 3.1. pH influence over the approximate Zeta potentials of NGA, FGA, NCN and FCN

Since coacervation is supposed to be mostly driven by electrostatic interactions, the influence of the pH on the polymers behavior was first investigated.

Table 1: Approximate Zeta potential of native chitosan and modified chitosan (0.02% w/v) and native gum Arabic and modified gum Arabic (0.50% w/v) solutions in acetic acid 1.00% v/v at pH 5.5, 45 °C. “a, b, and c” mean that the statistical analysis showed no significant differences between the results.

---

Approximate Zeta Potential (mV)

---

Native chitosan (NCN) 0.02% w/v in acetic acid	Functionalized chitosan (FCN) 0.02% w/v in acetic acid	Native gum Arabic (NGA) 0.50% w/v in acetic acid	Functionalized gum Arabic (FGA) 0.50% w/v in acetic acid
17.4 0.7 <sup>a</sup>	18.1 0.2 <sup>a</sup>	-9.7 0.7 <sup>b</sup>	-21.7 1.1 <sup>c</sup>

---



From Table 1, the native and modified polysaccharides were charged at a pH value 5.5 and temperature of 45 °C. The grafting of oxidation products did not change the approximate Zeta potential of CN in acetic acid solution ( $17.4 \pm 0.7$  mV for NCN and  $18.1 \pm 0.2$  mV for FCN). It was shown previously that the grafting of oxidation products onto chitosan decreased its charges (from  $67.6 \pm 0.7$  mV for NCN to  $52.5 \pm 1.0$  mV for FCN at 25 °C) however the experiments were performed at pH 3.0 [38]. Indeed, the grafted oxidation products were mostly ferulic acid dimers grafted onto the amine groups of chitosan, so it would be expected that the polymer charge decrease, because the positive charges of the amine groups would be masked. The same results were obtained with this samples at pH 3.0 ( $71.3 \pm 2.8$  mV for NCN and  $62.5 \pm 0.4$  mV for FCN at 25 °C) confirming the grafting. Nevertheless, at this pH nor NGA neither FGA were charged. Then, it was chosen to work at pH 5.5 so that every polymers would be charged. The difference of Zeta potential observed between NCN and FCN at pH 3.0 was already low (12 %). Since at pH 5.5 the charge of NCN and FCN were lower, due to the pH being close to their pKa (6.3), the influence of the grafting on the polymer charge was less marked and may enter the instrumental errors, explaining why no significant difference were observed. Furthermore, at the chosen temperature and pH (45 °C, pH 5.5), the hydrodynamic radius of chitosan in solution was higher than in standard conditions (room temperature) and the flexibility of the chains increased [41,42]. So, in the studied conditions (pH close to chitosan pKa and temperature of 45 °C), the absence of difference of charge between NCN and FCN could also be attributed the flexibility of the chains.

From Table 1, FGA charge was twice higher than the one of NGA. Indeed, the oxidation products were mostly composed of ferulic acid dimers and trimers which were potentially negatively charged leading to an increase of the negative charge of the polysaccharide after grafting.

For NGA and NCN mixtures, many authors already reported that the stoichiometry (when all

NCN charges were neutralized by all NGA charges) was reached for a composition of five times more NGA than NCN [20,34,36,43]. The results from Table 1 suggested that since the modification did not change the surface charge of chitosan, the introduction of FCN instead of NCN in the mixture should not change the stoichiometry. However, since the surface charge of FGA was two times higher than the one of NGA, it seemed that twice the amount of FGA compared to NGA would be needed to neutralize chitosan charges and reach the stoichiometry.

In order to confirm that more FGA than NGA was needed to achieve the stoichiometry and to shed some light on the thermodynamic pathways of the complexes formation whether the polymer were modified or not, ITC measurements were performed.

### **3.2. Influence of the polymers modification on the thermodynamic parameters involved in the complexation process**

The influence of the modification of gum Arabic and chitosan structures over the thermodynamic parameters involved in the interaction process was studied using ITC at pH 5.5 and at 45 °C.

Corrected heat rates recorded after each gum Arabic injection were mostly negative in all cases (Figure 1A). This meant that the interaction major contribution was mostly exothermic and that the interactions were spontaneous. Each peak corresponded to the energy released by the interaction between chitosan and gum Arabic after each injection. Initially, typical titration curves were observed. The exothermic peaks intensities decreased upon molar ratio until it stabilized. This stabilized sequence, related to a dilution phenomenon, corresponded to exothermic peaks. Furthermore, endothermic peaks were also observed at the end of titration just after each exothermic peak. These phenomenon were observed for all mixtures except for the FGA/FCN mixture, for which no exothermic peaks were observed at the end of titration,

only relatively high endothermic peaks.

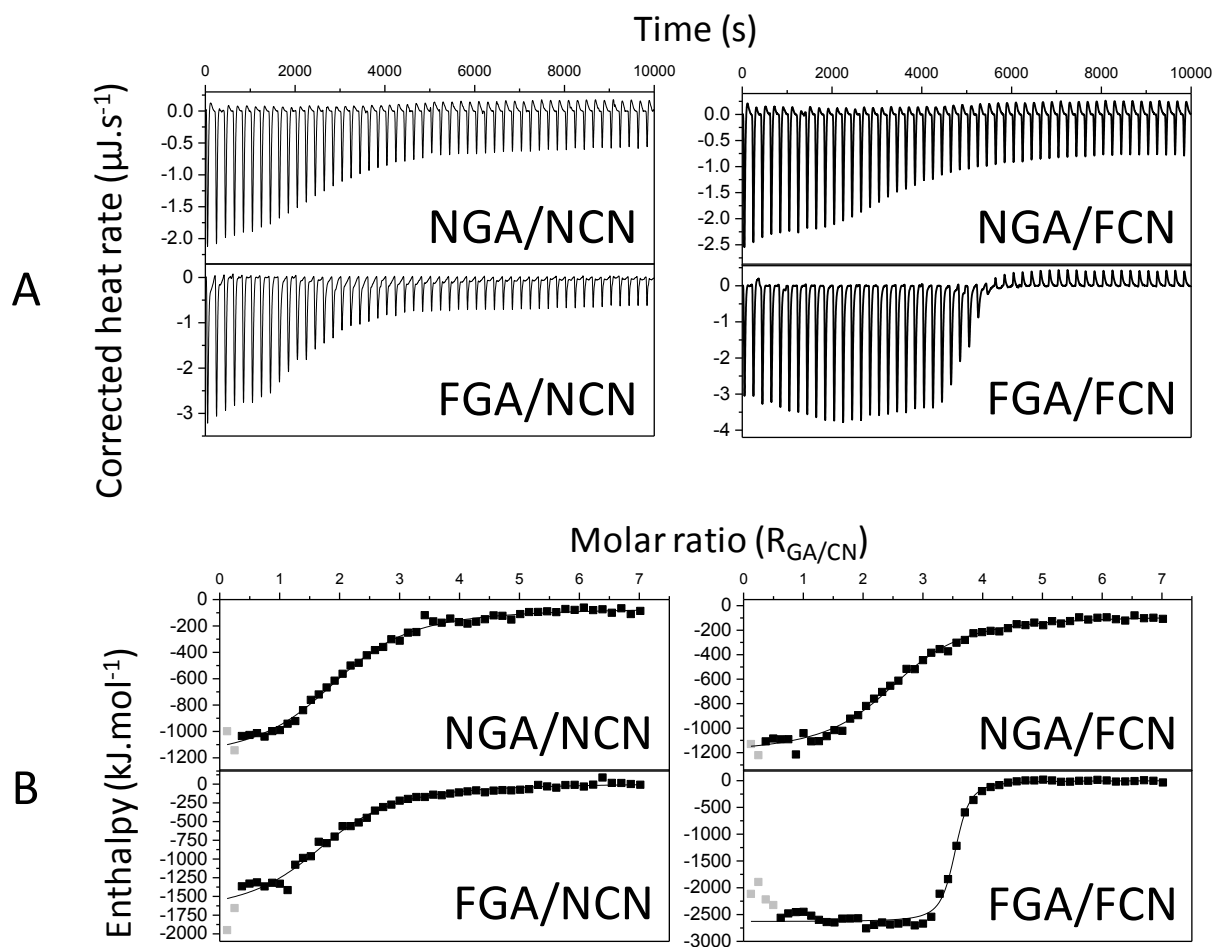


Figure 1: (A) Corrected heat rate upon time and GA injections of mixtures between native gum Arabic (NGA) or functionalized gum Arabic (FGA) and native chitosan (NCN) or functionalized chitosan (FCN) at pH 5.5 at 45 °C. (B) Enthalpy and fit upon gum Arabic/chitosan molar ratio of mixtures between native gum Arabic or functionalized gum Arabic and native chitosan or functionalized chitosan at pH 5.5 at 45 °C. Grey points recorded at the beginning of the titration were excluded from the fit.

The exothermic peaks are obviously mostly related to electrostatic interaction between the polymers [19,44,20]. Solvent reorganization also accounts for a large part of the exothermic signal, extended hydrogen-bond networks at the complex interface making the enthalpy change more favorable, even if counterbalanced by an entropic penalty (endothermic peaks) [15]. Complexes were formed until the charges were neutralized.

The endothermic peaks at the end of titration could be related either to aggregation,

reorganization within the system or to hydrophobic interactions [17,45]. Indeed, the endothermic peaks with the higher intensities were observed when FCN was present in the mixtures. Both NGA and FGA possessed hydrophobic parts coming from the protein fraction or the grafted parts, while NCN did not. The grafting of phenolic compounds onto chitosan brought hydrophobic parts able to exhibit new interactions with NGA and FGA.

Finally, the successive appearance of exothermic and endothermic signal is typical on ITC measurements on complexes formation for many systems [15]. It was shown to be induced either by aggregation of complexes or to coacervation [46–48]. The absence of exothermic peaks at the end of FGA/FCN titration could mean that these phenomenon did not occur in this system when gum Arabic was in excess, or be related to a reorganization phenomenon in the system.

The binding isotherms were fitted using an “Independent” model (Figure 1B). This model was used to determine the thermodynamic parameters involved in the interactions as the dissociation constant, the interaction enthalpy and the stoichiometry. The enthalpy upon molar ratio followed a typical titration curve. The stoichiometry ( $n$ ) of the interaction correspond to the inflexion point of the sigmoid. Since it changed upon mixture, the stoichiometry was obviously not the same. The enthalpy was also different upon mixture, meaning that the thermodynamic parameters were also different for the studied conditions. Free energy and thermo-entropic contribution were calculated from Eq. 1 and Eq. 2. The obtained results are given in Table 2.

For all conditions,  $\Delta G$  was always negative, meaning that the self-assembly was always spontaneous, whether the polysaccharides were functionalized or not. The  $K_d$  values were always small (from  $0.2 \times 10^{-8}$  to  $10.6 \times 10^{-8}$ ) corresponding to strong interactions (an interaction is considered to be strong when the  $K_d$  value is lower than  $10^{-6}$  [49]).  $K_d$  values were always smaller when FGA was involved instead of NGA. This could mean that the strength of the

interaction was bigger with functionalized gum Arabic. This could potentially be related to the raise of FGA charge in comparison with NGA and to the grafting of oxidation product onto gum Arabic chains, which could create new interactions with chitosan.

*Table 2: Thermodynamic parameters (dissociation constant (Kd), stoichiometry (n), enthalpic contribution ( $\Delta H$ ), thermo-entropic contribution (T $\Delta S$ ) and Gibbs free energy ( $\Delta G$ )) of binding between native gum Arabic or functionalized gum Arabic and native chitosan or functionalized chitosan. “a, b and c” mean that the statistical analysis showed no significant differences between the results, for each column. Results with the same letter means there were no significant difference between them.*

Mixtures	Kd.10 <sup>-08</sup> M		n		$\Delta H$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )		T $\Delta S$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )		$\Delta G$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	
NGA NCN	10.6	1.1 <sup>a</sup>	2.2	0.1 <sup>a</sup>	-1 146.0	15.6 <sup>a</sup>	-1 103.3	16.2 <sup>a</sup>	-42.7	0.6 <sup>a</sup>
NGA FCN	9.5	3.2 <sup>a</sup>	2.5	0.1 <sup>a</sup>	-1 074.5	78.5 <sup>a</sup>	-1 031.6	77.6 <sup>a</sup>	-42.9	0.9 <sup>a</sup>
FGA NCN	6.5	3.9 <sup>a</sup>	1.8	0.1 <sup>b</sup>	-1 653.5	21.9 <sup>b</sup>	-1 609.5	20.2 <sup>b</sup>	-44.0	1.7 <sup>a</sup>
FGA FCN	0.2	0.0 <sup>b</sup>	3.3	0.3 <sup>c</sup>	-2 592.0	53.7 <sup>c</sup>	-2 539.5	53.5 <sup>c</sup>	-52.5	0.2 <sup>b</sup>

The  $\Delta H$  values were negative in all cases, along with the T $\Delta S$  values.  $\Delta H$  values, mainly related to electrostatic interactions [16,17,20], are considered to be favorable to the interactions when they are negative (negative contribution to  $\Delta G$ , see Eq.1). On the contrary, T $\Delta S$  values, related to hydrophobic interactions [17,45], are favorable to the interactions when they are positive. In the given cases,  $\Delta H$  values were always favorable to the interactions (from  $-1146.0 \pm 15.6$  kJ.mol<sup>-1</sup> to  $-2 592.0 \pm 53.7$  kJ.mol<sup>-1</sup>) and T $\Delta S$  values were always unfavorable to the interactions (from  $-1103.3 \pm 16.2$  kJ.mol<sup>-1</sup> to  $-2 539.5 \pm 53.5$  kJ.mol<sup>-1</sup>).

Regarding the stoichiometry values (Table 2), the involvement of NGA might have led to a change in the stoichiometry. For the mixtures containing NGA, the stoichiometry was the same ( $2.2 \pm 0.1$  for NGA/NCN mixtures and  $2.5 \pm 0.1$  for NGA/FCN mixtures). However, for mixtures containing FGA, the stoichiometries were different ( $1.8 \pm 0.1$  for FGA/NCN mixtures and  $3.3 \pm 0.3$  for FGA/FCN mixtures). The difference between mixtures containing NGA and FGA was expected from the change of the approximate Zeta potential of gum Arabic after

functionalization (Table 1). However, the difference of stoichiometry observed between FGA/NCN and FGA/FCN mixtures ( $1.8 \pm 0.1$  and  $3.3 \pm 0.3$ , respectively) was surprising, because the approximate Zeta potential of chitosan was the same at pH 5.5 after functionalization. This results suggested that electrostatic interactions were not the only kind of interactions between the two modified polymers. The lower stoichiometry obtained for FGA/NCN mixture could be explained by the fact that FGA was more charged than NGA, so less FGA would be needed to neutralize the chitosan positive charges. However, the stoichiometry of the FGA/FCN mixture was higher than the ones obtained with NGA. This could mean that when both polymers were modified, potential hydrophobic interactions,  $\pi$ - $\pi$  stacking, cation- $\pi$  and anion- $\pi$  induced by the grafting of phenolic compounds could lead to a change of the stoichiometry of the complexation and an increase of the polymers content. However, hydrophobic interactions would mostly lead to aggregation, as already studied by Kaibara, 2000, on the elastin/water system [50]. If the  $\Delta G$  was almost the same for all studied conditions, it was significantly more negative for FGA/FCN mixture ( $-52.5 \pm 0.2 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ). Furthermore, this mixture had the lowest  $K_d$  ( $0.2 \cdot 10^{-8} \pm 0.1 \cdot 10^{-8}$ ), meaning in these conditions the interaction between modified gum Arabic and modified chitosan was the most favorable.

The enthalpic and entropic parameters did not change whether chitosan was functionalized or not (Table 2). However, the functionalization of gum Arabic had an impact on them.  $\Delta H$  varied from  $-1\ 146.0 \pm 15.6 \text{ kJ.mol}^{-1}$  for NGA/NCN mixtures to  $-1\ 653.5 \pm 21.9 \text{ kJ.mol}^{-1}$  for FGA/NCN mixture while  $T\Delta S$  varied from  $-1\ 103.3 \pm 16.2 \text{ kJ.mol}^{-1}$  to  $-1\ 609.5 \pm 20.2 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , respectively. This meant that the enthalpy contribution became more favorable to the interaction while the one of entropy became less favorable when gum Arabic was modified. This made sense, because the functionalization of gum Arabic, though increasing its hydrophobia and/or the possibility for it to undergo  $\pi$ - $\pi$  stacking, cation- $\pi$  and anion- $\pi$  interactions, did increase its negative charges, leading to more electrostatic interaction.

A surprising result was obtained from the comparison of FGA/NCN and FGA/FCN enthalpic and entropic contributions. Since the charges of chitosan were the same whether functionalized or not, the observed difference could not be explained by an increase of electrostatic interaction. However, though the thermodynamic parameters did not indicate a major role of the hydrophobic interactions in the complexation process, the isotherms (Figure 1A) did show an endothermic contribution at the end of titration. This could mean that in the case of FGA/FCN mixtures, there could be a competition between electrostatic interactions, strong at the beginning of titration, until the stoichiometry was reached, and the hydrophobic interactions, predominant at the end of titration.

In order to get a better understanding of the phenomenon leading to such differences in the thermodynamic parameters, all the mixtures were studied at 45 °C. By measuring the approximate Zeta potential upon polymers molar ratio, the turbidity of the samples after mixing and with the support of optical microscopy, a better understanding of the type of interactions that were occurring should be gained in order to elucidate the complexation mechanism.

### **3.3. Characteristics of polymers mixtures upon molar ratio**

The influence of the molar ratio over the approximate Zeta potential and the turbidity of the samples was investigated for every potential mixtures (Figure 2). The experiments were performed at pH 5.5, 45 °C. The measurements and observations were made 5 min after mixing the polymers solutions.

When mixing gum Arabic and chitosan, the approximate Zeta potential decreased upon gum Arabic addition (Figure 2A). Indeed, the charges of chitosan (NCN or FCN) were progressively neutralized when FGA or NGA was added to the mixtures.

The molar ratio for which the mixture approximate Zeta potential was null was not exactly the same as the stoichiometry obtained by ITC measurements (Table 2), but similar tendencies

were reported for all mixtures except for the FGA/FCN mixture. The optimal molar ratio (for which the charged were neutralized) was lower by Zeta potential measurements than by ITC measurements for FGA/FCN mixtures ( $1.54 \pm 0.05$  against  $3.3 \pm 0.3$ , respectively). This meant that the optimal molar ratio obtained by ITC for FGA/FCN interaction was not only due to electrostatic interactions. This confirmed that other kind interactions such as  $\pi$ - $\pi$  stacking, cation- $\pi$  and anion- $\pi$  were at work for this mixture at 45 °C.

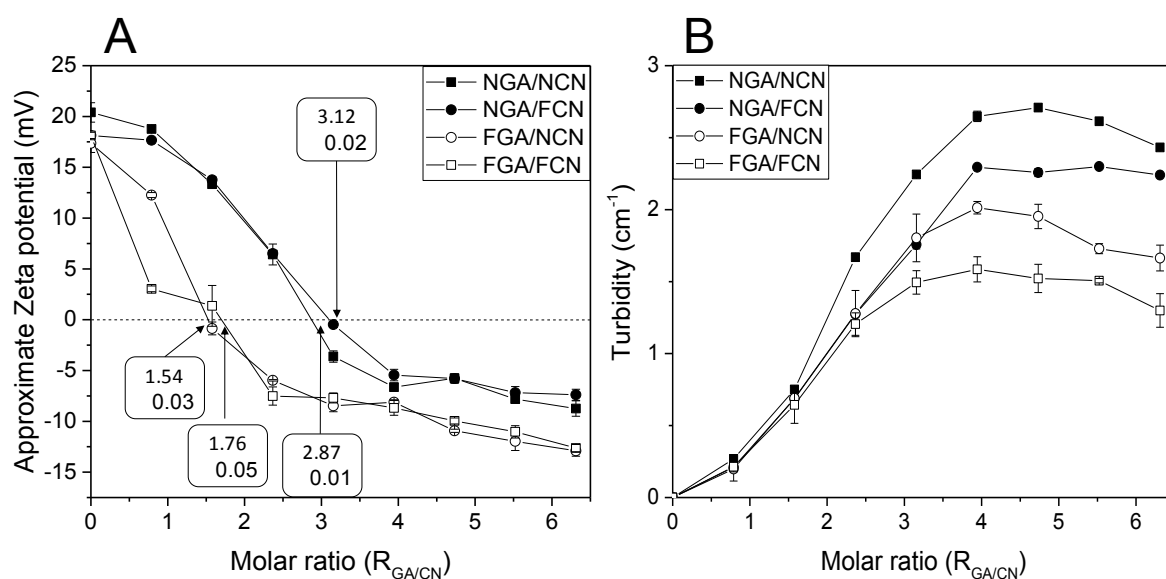


Figure 2: (A) Approximate Zeta potential ( $mV$ ) and (B) turbidity ( $cm^{-1}$ ), of mixtures between native gum Arabic or functionalized gum Arabic and native chitosan or functionalized chitosan upon gum Arabic/chitosan molar ratio at pH 5.5 and 45 °C, 5 min after mixing.

Upon molar ratio, the turbidity of the mixtures raised until molar ratio 4:1 for all systems, then slightly decreased (Figure 2B). For molar ratio above 2.5, the turbidities were different for the different mixtures, indicating the formation of different objects (coacervates, aggregates or complexes with different size and shapes). For a molar ratio of 3.9, the turbidity varied from  $2.26 \pm 0.03 \text{ cm}^{-1}$  for NGA/FCN to  $2.71 \pm 0.02 \text{ cm}^{-1}$  for NGA/NCN. At this ratio, the turbidities were lower for mixtures with FGA ( $1.52 \pm 0.10 \text{ cm}^{-1}$  for FGA/FCN and  $1.95 \pm 0.08 \text{ cm}^{-1}$  for FGA/NCN). These differences may have been related to the shape of the samples formed, as can be seen on Figure 3.



NGA/NCN



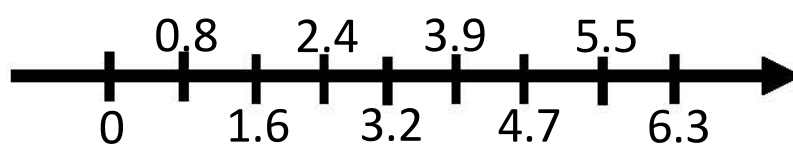
NGA/FCN



FGA/NCN



FGA/FCN



Molar ratio gum Arabic/chitosan

Figure 3: Macroscopic observations of mixtures between native gum Arabic or functionalized gum Arabic and native chitosan or functionalized chitosan mixtures upon molar ratio at 45 °C, 5 min after mixing.

From the macroscopic observation (Figure 3), the mixtures exhibited different behavior depending on the polymers involved. Some samples appeared “homogeneously” turbid while aggregates were observed on others. Mixtures containing NGA were turbid while the presence of FGA seemed to lead to aggregation at some molar ratio. On the photographs of the mixtures (Figure 3), NGA/NCN and NGA/FNC mixtures seemed more turbid upon molar ratios. However, for mixtures containing FGA, the mixtures became turbid upon FGA addition until a molar ratio was reached when aggregation occurred (for ratio 1.6 for FGA/FCN mixtures and for ratio 3.2 for FGA/NCN mixtures). To confirm the presence of coacervates and aggregates in the samples, the mixtures were observed by optical microscopy (Figure 4). For molar ratio below 0.8, no object was observed for all mixtures. When NGA was added to NCN or FCN until molar ratio 2.4, some coacervates appeared. They became more numerous for a molar ratio of 3.9. Upon NGA addition, the coacervates tended to disappear (molar ratio 6.3). For FGA/NCN mixtures, no objects were observed under a molar ratio of 3.9. For a molar ratio of 3.9, a coexistence of two kinds of objects was observed: there were both coacervates and aggregates. Above a molar ratio of 4.7, no more coacervates were observed, but the aggregates became bigger and more numerous. For FGA/FCN mixtures, no coacervate was observed whatever the molar ratio. However, aggregates started to appear for a molar ratio of 2.4. They became bigger until the molar ratio of 4.7 was reached. For a molar ratio of 6.3, it seemed that the aggregates density decreased. This last result was correlated to the turbidities and the macroscopic aspect of the mixtures (Figure 2 and Figure 3). There could be a reorganization within the different systems that would be correlated with endothermic events observed on ITC measurements above a molar ratio of 4 (Figure 1A). Linking the ITC measurements, the thermodynamic parameters obtained from fitting the raw data, to macroscopic observations, Zeta potential measurements, turbidity measurements and optical micrographs, a mechanism was proposed to explain what happened within the different systems.

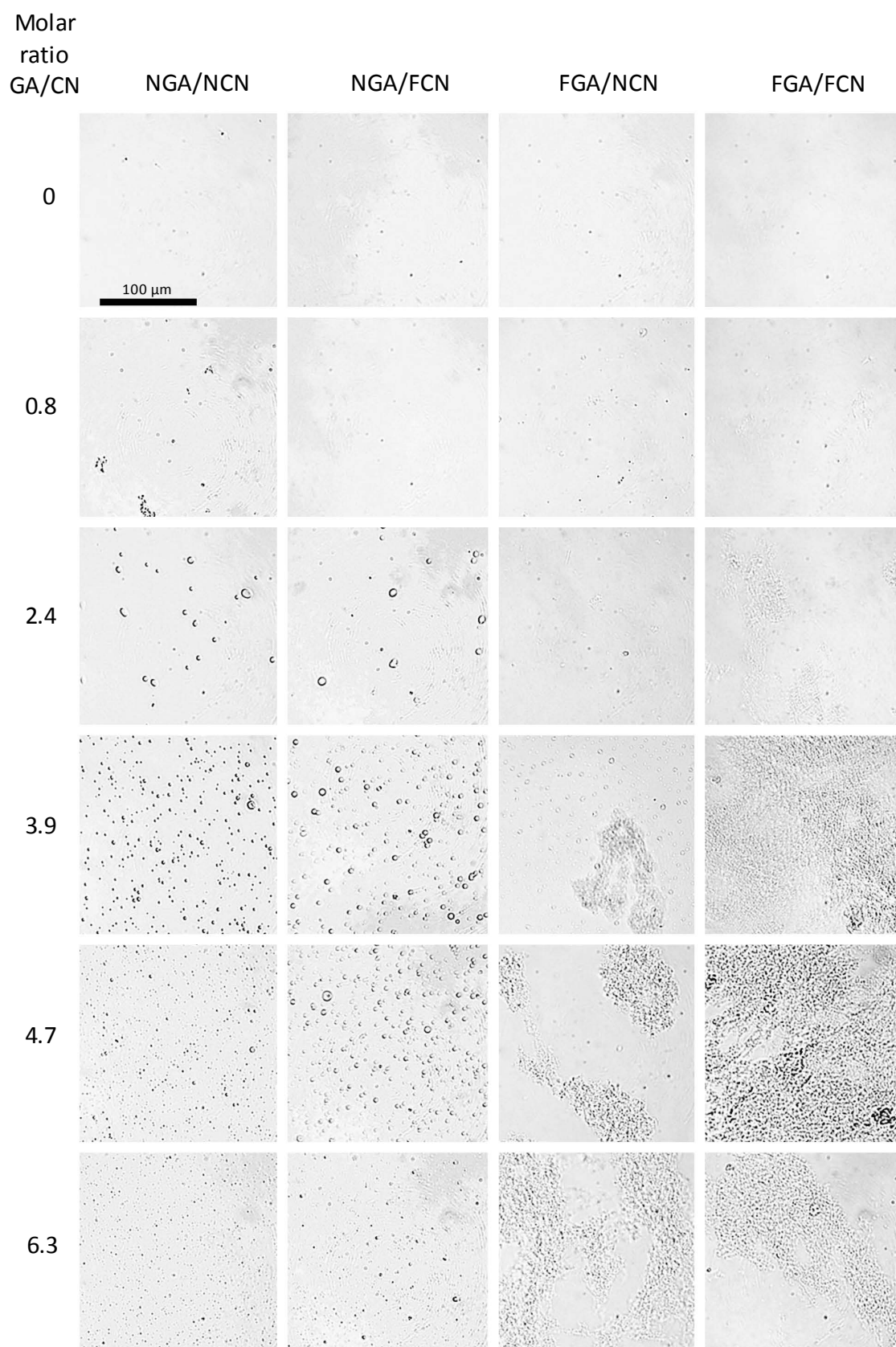


Figure 4: Optical micrographs of mixture between native gum Arabic or functionalized gum Arabic and native chitosan or functionalized chitosan mixtures upon different GA/CN molar ratios 5 min after mixing at 45 °C, pH 5.5.

### 3.4. Possible mechanism of the interaction between gum Arabic and chitosan

Interactions between NGA and NCN were electrostatic interactions between the carboxyl groups of gum Arabic and the amine groups of chitosan [20,22,34,43]. Both polymers attracted each other because of their opposite charges, followed by the release of water and counter-ions. Then, upon addition of gum Arabic, the charges of both polymers were compensated. When adding gum Arabic above the stoichiometry, a reorganization of the complexes occurred until the complexes were disintegrated in order to reach an equilibrium in the systems (observed in previous studies on NCN and NGA [20]).

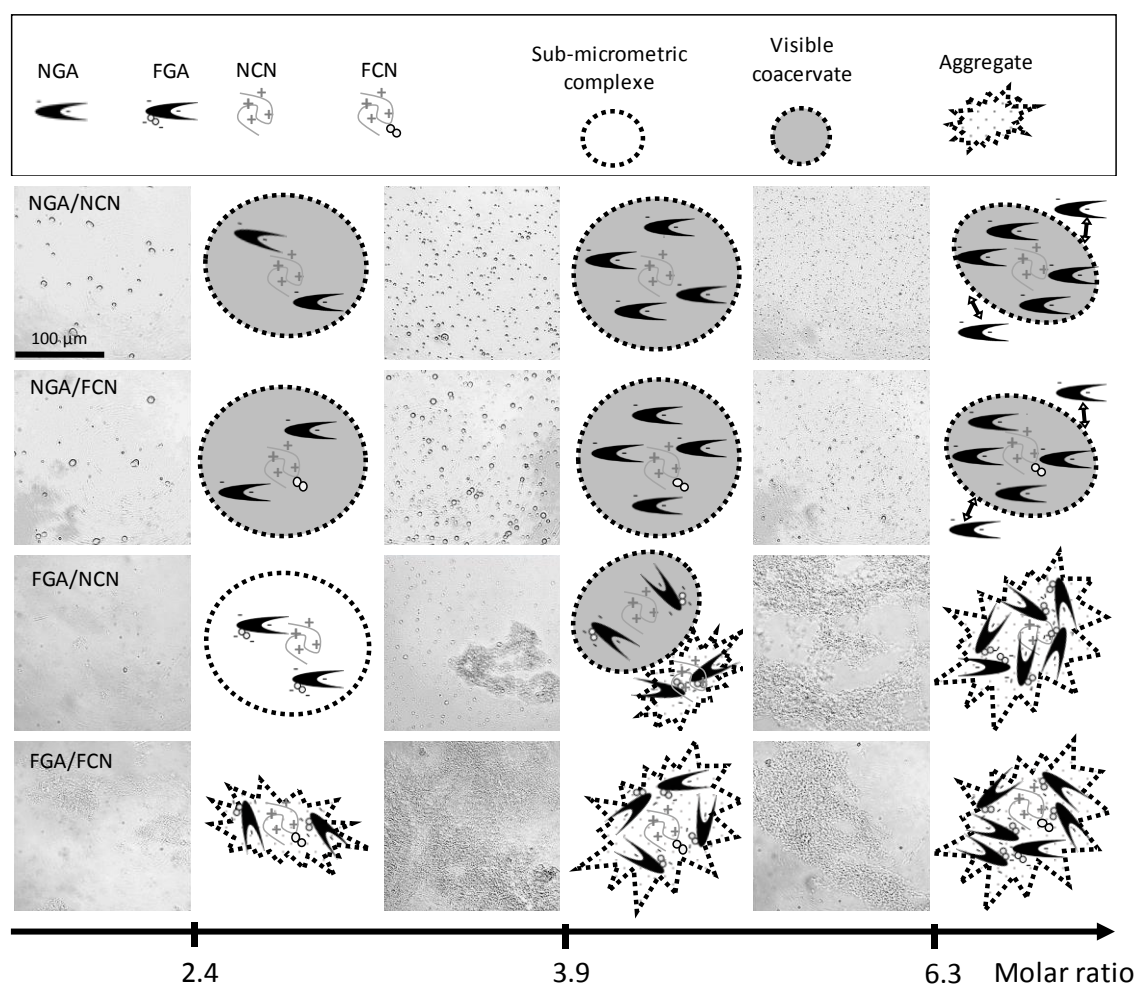


Figure 5: Optical micrographs and schematic representation of the influence of the nature of the polymers (NGA, FGA, NCN and FCN) upon molar ratio at pH 5.5 at 45 °C on the self-assembly between gum Arabic and chitosan

- 
- Studies often agree there is a first stage of formation of soluble complexes before the actual coacervation stage. Recent studies have focused on these complexes formed between oppositely charged polyelectrolytes as precursors to coacervates and multilayers [51]. It was reported that the presence of these small precursors increased the turbidity of the samples, and it was suggested that this would be related to an increase in the size or number of complexes or soluble aggregates. On the optical micrographs, for the first molar ratios, even though no objects were visible, it could be assumed soluble complexes or soluble aggregates were formed, due to the raise of the turbidities of the samples (Figure 2 and Figure 3).
  - For the NGA/NCN system, until a molar ratio of 0.8, no complex was visible (Figure 5). However, it was possible that objects were formed, but they were too small to be seen by optical microscopy. This was confirmed by the turbidity of the mixtures (Figure 2) raising before the first coacervates could be observed by optical microscopy (Figure 4). When mixed above a ratio of 2.4, those two oppositely charged polysaccharides started to form coacervates (Figure 5). When more NGA was added to NCN, more charges of the polymers interacted. The stoichiometry value determined by ITC (2.2) was confirmed by optical microscopy (first objects at 2.4), macroscopic observations (first turbid sample at 1.6) and Zeta potential (optimal ZP at 2.8). At a ratio 6.3, when NGA was in excess, the complexes got smaller. In order to reach an equilibrium in the system, the GA could desorb and the coacervates could change. This hypothesis was consistent with the endothermic event at the end of titration (Figure 1). This could be explained by this reorganization within the system.
  - For the NGA/FCN system, the same phenomenon were observed (Figure 5). The ITC results, the macroscopic and microscopic observations and the Zeta potential and turbidities indicated no change by replacing NCN by FCN. This meant that the coacervation process was probably the same. Since the charges of FCN and NCN were the same at the chosen pH and temperature, the interactions between FCN and NGA were probably mostly

electrostatic interactions. If another phenomenon occurred, such as hydrophobic interactions or  $\pi$ -anion interactions between NGA and the grafted oxidation products of FCN, the experiments did not showed them.

- For the FGA/FCN system, no coacervation phenomenon was clearly observed on the photographs of the sample or on the micrographs (Figure 5). Until a molar ratio of 1.6, the aspect of the sample became turbid but no object was visible by optical microscopy. This meant that before this ratio, soluble complexes were formed. After a ratio of 3.9, aggregates appeared (Figure 5). The optimal molar ratio determined by Zeta potential measurements was consistent with the appearance of the turbidity (1.54) and the appearance of the aggregates was consistence with the optimal molar ratio determined by ITC (3.3). This meant the formation of soluble complexes was mostly driven by electrostatic interactions but the formation of the aggregates would be driven by other forces. The ITC parameters confirmed that the presence of FGA and FCN increased the contribution of the enthalpic parameter. This could be due to both polymers were grafted with oxidation products, leading to more  $\pi$ -  $\pi$  stacking,  $\pi$ - cation and  $\pi$ - anion interactions increasing the enthalpic contribution. The presence of exothermic hydrophobic interactions could not be excluded, but their effect on the titration isotherms would probably be hidden by all the others interactions involved in the aggregation phenomenon. However, at the end of titration, the hydrophobic interactions between FGA and FCN would be predominant (Figure 1).

The increased charge of FGA in comparison to NGA could increase the strength of its interactions with chitosan. It is generally accepted that strong attractive properties favor aggregation [52]. The structure of the polyelectrolyte also modulates the type of phase separation observed. Indeed, the structure of the modified polymers changed their steric hindrance, thus modifying the polysaccharides accessibility to one another. It was shown in previous studies that the glass transition temperature of gum Arabic decreased upon

---

functionalization, meaning that the grafting of phenolic compound would have added to the steric hindrance of the FGA and made its chains more flexible, allowing it to undergo more interactions [53]. The raise of FGA charge, leading to stronger electrostatic interactions, combined with the raise of the steric hindrance and the increase of the polymers flexibility would be responsible for the aggregation phenomenon observed for the FGA/FCN mixtures.

- For the FGA/NCN system, the sample turbidity raised after adding FGA (Figure 2). A slight difference was observed for a molar ratio of 0.8 (Figure 5), but the turbidity was higher for a ratio of 2.4. At a molar ratio of 3.2, aggregates appeared (Figure 3). The optimal molar ratio obtained by Zeta potential measurements (1.54) and by ITC measurements (1.8) were almost the same, but no object was visible by optical microscopy until a molar ratio of 3.9. This meant that before this ratio, soluble complexes were formed. However, at a ratio of 3.9, two distinct phenomenon were observed by macroscopic observations. Both coacervates and aggregates were present in the mixture. In the literature, the differentiation between the two mechanisms is often obscured by the common use of turbidity to detect such transitions [52]. Both mechanisms induce an increase in turbidity but microscopy is needed to know whether the turbidity arises from small soluble complexes, coacervation or aggregation. When more FGA was added to the mixture, only aggregates were visible on the optical micrographs.

The first difference between NGA/NCN and FGA/NCN systems was the charge of FGA and the increase of the strength of its interactions with chitosan. Indeed, the optimal molar ratio decreased in comparison with the NGA/NCN system. A lower amount of NGA was needed to neutralize the charges of chitosan, since FGA was more charged (Table 1). The enthalpy became more favorable to the interaction (-1146 for NGA/NCN system against -1653 kJ.mol<sup>-1</sup>) for the FGA/NCN system), meaning more electrostatic interactions were involved. The fact



the optimal molar ratio obtained by Zeta potential measurements (1.54) and by ITC measurements (1.8) were close also indicated that the complexation phenomenon was mostly driven by electrostatic interactions. The optimal charge molar ratio and the optimal molar ratio determined by ITC measurements being close, it could explain why the two phenomenon coexist for a molar ratio of 3.9 on the optical micrographs.

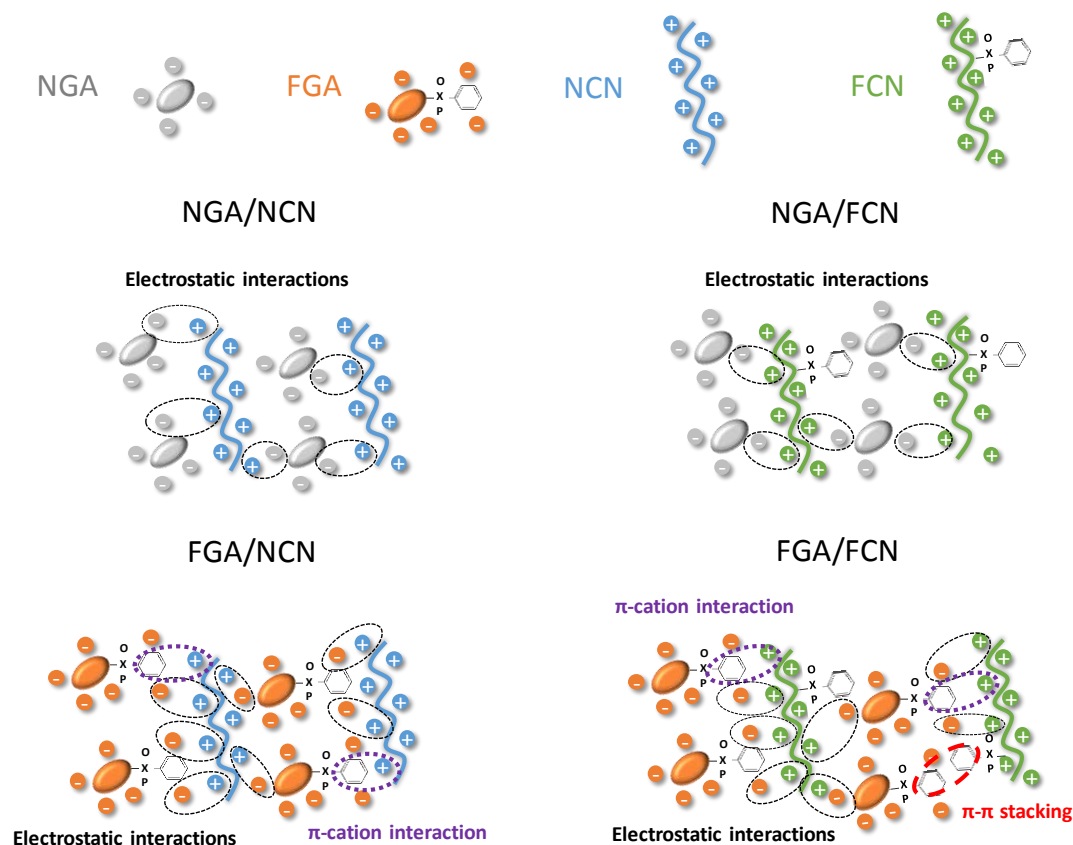


Figure 6: Schematic representation of the possible interactions between native gum Arabic or functionalized gum Arabic and native chitosan or functionalized chitosan

At the chosen pH and temperature, due to their charges at these conditions, NGA/NCN and NGA/FCN exhibited typical « weakly charged polyelectrolytes » coacervation behavior and steps, mainly driven by electrostatic interactions (negative enthalpy), with the counterion release entropy playing only a minor role [15]. The fact that these mixtures exhibited the very same behavior lead to advance that mainly electrostatic interactions occurred between NGA and NCN and NGA and FCN (Figure 6).



In the FGA/NCN system, several phenomenon were observed. First, soluble complexes were formed. Then, coacervates appeared along with aggregates (Figure 5). Then, coacervates disappeared and only aggregates remained, meaning stronger interactions were present [52]. These were probably mainly more electrostatic interactions, due to the higher charge of FGA, but they could also be due to  $\pi$ -cation interaction between the amine groups of NCN and the phenol groups of the oxidation products grafted onto FGA (Figure 6). Based on the fact that coacervation usually happens when the interactions are weak and on the contrary, that aggregation is a consequence of strong interactions, it could be surprising that coacervation happened prior to aggregation or at the same time. However, the strength of the interactions should not be regarded as the sole strength of electrostatic and  $\pi$ -cation interactions between one FGA and one NCN but has the amount of interactions in the system. Though some interactions are individually weak they can become collectively important [54,55]. One explanation to the coexistence of coacervation and aggregation would be that the “collective importance” of the  $\pi$ -cation interactions between FGA and NCN was weak at a given molar ratio, leading to coacervation, and that when the molar ratio increased, this “collective importance” increased with the amount of FGA aromatic rings, leading for the coacervates to disappear in favor of aggregates. One other explanation could rely on chitosan opening the FGA structure when they interact. This would lead to an exposure of FGA phenol groups from the grafted oxidation products to the solvent, which would decrease the polymers affinity to the aqueous solvent. This could lead to an aggregation phenomenon.

For the FGA/FCN system, soluble complexes seemed to have been formed at the beginning of titration, but then only aggregates were visible. The strength of the interaction was higher than for other systems (Table 2) and the enthalpy was the most favorable in this system. These stronger interactions could be due to FGA, as described for the FGA/NCN system, but other interactions were involved since the results for FGA/FCN system were different than the ones

for FGA/NCN systems. These interactions were not involved in the mixtures containing NCN or NGA/NCN systems, meaning they were due to the modification of both FGA and FCN. These strong and numerous interactions would lead to aggregation instead of coacervation. The aggregation phenomenon could be related to both polymers were grafted with oxidation products, leading to more  $\pi$ - $\pi$  stacking and  $\pi$ -cation interaction, thus increasing the enthalpic contribution (Figure 6). The raise of FGA charge probably also contributed to strengthen electrostatic interactions. Also, the raise of the steric hindrance and the increase of the polymers flexibility induced by the grafting of phenolic compounds onto the polymer is known to enhance the aggregation phenomenon.

#### **4. Conclusions**

The effect of experimental conditions on polymers complex coacervation has already been widely studied but the thermodynamic pathways that drive this phenomenon and of its mechanism were obscure. In order to get a better understand of the interactions between polymers during coacervation, it was chosen to change the interactions between two polymers (gum Arabic and chitosan) and thus the conditions of self-assembly, by modifying the polysaccharides by covalent grafting of ferulic acid oxidation products. The grafting of these groups indeed increased the polymers capacity to exhibit  $\pi$ - $\pi$  stacking and  $\pi$ -cation interactions. It was shown that the introduction of new functional groups driving to new interactions also led to the formation of different objects. When the interaction was considered “weak”, the polymers tended to undergo complex coacervation. When the interaction became stronger, e.g. when enough modified polymer was in the sample, the polymers tended to undergo aggregation. This study provided a better understanding of the mechanisms and interactions that drive the formation of complexes. In the short term, it would be interesting to modify the mixtures ionic strength or the polarity of the solvent, to control the interactions

between modified polymers in order to choose whether they coacerve or aggregate. In the long term, the modification of polymers could lead to coacervation in experimental conditions that are different from the optimal conditions obtained with native polymers. Ultimately, this could lead to polymers being modified so that coacervates could release molecules encapsulated under conditions of pH, temperature, ionic force or targeted concentrations.

## Acknowledgments

The authors acknowledge support of the LIBio by the "Impact Biomolecules" project of the "Lorraine Université d'Excellence"(Investissements d'avenir – ANR).

The authors acknowledge support of the CPER Agrovalor.

We would like to thank Nexira for kindly providing the gum Arabic used in this article.

We also thank Blandine Simard for the technical support.

## References

- [1] D. Eratte, S. McKnight, T.R. Gengenbach, K. Dowling, C.J. Barrow, B.P. Adhikari, Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate–gum Arabic complex coacervates, *J. Funct. Foods*. 19 (2015) 882–892. doi:10.1016/j.jff.2015.01.037.
- [2] H.-C. Lau, S. Jeong, A. Kim, Gelatin-alginate coacervates for circumventing proteolysis and probing intermolecular interactions by SPR, *Int. J. Biol. Macromol.* 117 (2018) 427–434. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.093.
- [3] T. Moschakis, C.G. Biliaderis, Biopolymer-based coacervates: Structures, functionality and applications in food products, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 28 (2017) 96–109. doi:10.1016/j.cocis.2017.03.006.
- [4] B. Muhoza, S. Xia, J. Cai, X. Zhang, E. Duhoranimana, J. Su, Gelatin and pectin complex coacervates as carriers for cinnamaldehyde: Effect of pectin esterification degree on coacervate formation, and enhanced thermal stability, *Food Hydrocoll.* 87 (2019) 712–722. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.08.051.
- [5] J.M. Horn, R.A. Kapelner, A.C. Obermeyer, Macro- and Microphase Separated Protein-Polyelectrolyte Complexes: Design Parameters and Current Progress, *Polymers*. 11 (2019). doi:10.3390/polym11040578.
- [6] Z.W. Lim, Y. Ping, A. Miserez, Glucose-Responsive Peptide Coacervates with High Encapsulation Efficiency for Controlled Release of Insulin, *Bioconjug. Chem.* 29 (2018) 2176–2180. doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00369.
- [7] P.L. Dubin, J. Gao, K. Mattison, Protein Purification by Selective Phase Separation with Polyelectrolytes, *Sep. Purif. Methods*. 23 (1994) 1–16.

- doi:10.1080/03602549408001288.
- [8] J. Pathak, K. Rawat, V. K. Aswal, H. B. Bohidar, Interactions in globular proteins with polyampholyte: coacervation route for protein separation, *RSC Adv.* 5 (2015) 13579–13589. doi:10.1039/C4RA13133A.
- [9] E. Kizilay, A.B. Kayitmazer, P.L. Dubin, Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids, *Adv. Colloid Interface Sci.* 167 (2011) 24–37. doi:10.1016/j.cis.2011.06.006.
- [10] C.G. de Kruif, F. Weinbreck, R. de Vries, Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 9 (2004) 340–349. doi:10.1016/j.cocis.2004.09.006.
- [11] H.J. Kim, B. Yang, T.Y. Park, S. Lim, H.J. Cha, Complex coacervates based on recombinant mussel adhesive proteins: their characterization and applications, *Soft Matter.* 13 (2017) 7704–7716. doi:10.1039/C7SM01735A.
- [12] C. Sanchez, G. Mekhloufi, D. Renard, Complex coacervation between  $\beta$ -lactoglobulin and Acacia gum: A nucleation and growth mechanism, *J. Colloid Interface Sci.* 299 (2006) 867–873. doi:10.1016/j.jcis.2006.02.031.
- [13] C. Schmitt, C. Sanchez, S. Desobry-Banon, J. Hardy, Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes: A Review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38 (1998) 689–753. doi:10.1080/10408699891274354.
- [14] M.A.C. Stuart, Supramolecular perspectives in colloid science, *Colloid Polym. Sci.* 286 (2008) 855–864. doi:10.1007/s00396-008-1861-7.
- [15] S.L. Turgeon, C. Schmitt, C. Sanchez, Protein-polysaccharide complexes and coacervates, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 12 (2007) 166–178. doi:10.1016/j.cocis.2007.07.007.
- [16] L. Aberkane, J. Jasniewski, C. Gaiani, J. Scher, C. Sanchez, Thermodynamic characterization of acacia gum-beta-lactoglobulin complex coacervation, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids.* 26 (2010) 12523–12533. doi:10.1021/la100705d.
- [17] A.B. Kayitmazer, Thermodynamics of complex coacervation, *Adv. Colloid Interface Sci.* 239 (2017) 169–177. doi:10.1016/j.cis.2016.07.006.
- [18] M. Nigen, T. Croguennec, D. Renard, S. Bouhallab, Temperature Affects the Supramolecular Structures Resulting from  $\alpha$ -Lactalbumin-Lysozyme Interaction, *Biochemistry (Mosc.).* 46 (2007) 1248–1255. doi:10.1021/bi062129c.
- [19] D. Priftis, N. Laugel, M. Tirrell, Thermodynamic Characterization of Polypeptide Complex Coacervation, *Langmuir.* 28 (2012) 15947–15957. doi:10.1021/la302729r.
- [20] M.E. Vuillemin, F. Michaux, L. Muniglia, M. Linder, J. Jasniewski, Gum Arabic and chitosan self-assembly: Thermodynamic and mechanism aspects, *Food Hydrocoll.* 96 (2019) 463–474. doi:10.1016/j.foodhyd.2019.05.048.
- [21] M.M. Beppu, C.C. Santana, Influence of Calcification Solution on in vitro Chitosan Mineralization, *Mater. Res.* 5 (2002) 47–50. doi:10.1590/S1516-14392002000100008.
- [22] H. Espinosa-Andrews, J.G. Báez-González, F. Cruz-Sosa, E.J. Vernon-Carter, Gum Arabic-Chitosan Complex Coacervation, *Biomacromolecules.* 8 (2007) 1313–1318. doi:10.1021/bm0611634.
- [23] C. Schatz, J.-M. Lucas, C. Viton, A. Domard, C. Pichot, T. Delair, Formation and Properties of Positively Charged Colloids Based on Polyelectrolyte Complexes of Biopolymers, *Langmuir.* 20 (2004) 7766–7778. doi:10.1021/la049460m.
- [24] B. Soni, B. Mahmoud, S. Chang, E.M. El-Giar, E.B. Hassan, Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan/TEMPO biocomposite packaging films, *Food Packag. Shelf Life.* 17 (2018) 73–79. doi:10.1016/j.fpsl.2018.06.001.
- [25] T.A. Sonia, C.P. Sharma, An overview of natural polymers for oral insulin delivery, *Drug Discov. Today.* 17 (2012) 784–792. doi:10.1016/j.drudis.2012.03.019.

- [26] M. Fathi, Á. Martín, D.J. McClements, Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems, *Trends Food Sci. Technol.* 39 (2014) 18–39. doi:10.1016/j.tifs.2014.06.007.
- [27] E.A. Makri, G.I. Doxastakis, Study of emulsions stabilized with *Phaseolus vulgaris* or *Phaseolus coccineus* with the addition of Arabic gum, locust bean gum and xanthan gum, *Food Hydrocoll.* 20 (2006) 1141–1152. doi:10.1016/j.foodhyd.2005.12.008.
- [28] C. Sanchez, M. Nigen, V. Mejia Tamayo, T. Doco, P. Williams, C. Amine, D. Renard, Acacia gum: History of the future, *Food Hydrocoll.* (2017). doi:10.1016/j.foodhyd.2017.04.008.
- [29] L.H. Mosquera, G. Moraga, N. Martínez-Navarrete, Critical water activity and critical water content of freeze-dried strawberry powder as affected by maltodextrin and arabic gum, *Food Res. Int.* 47 (2012) 201–206. doi:10.1016/j.foodres.2011.05.019.
- [30] M.R. Avadi, A.M.M. Sadeghi, N. Mohammadpour, S. Abedin, F. Atyabi, R. Dinarvand, M. Rafiee-Tehrani, Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 6 (2010) 58–63. doi:10.1016/j.nano.2009.04.007.
- [31] L. Bosnea, T. Moschakis, C. Biliaderis, Complex Coacervation as a Novel Microencapsulation Technique to Improve Viability of Probiotics Under Different Stresses, *Food Bioprocess Technol.* 7 (2014) 2767–2781. doi:10.1007/s11947-014-1317-7.
- [32] L. Bosnea, T. Moschakis, C.G. Biliaderis, Microencapsulated cells of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in biopolymer complex coacervates and their function in a yogurt matrix, *Food Funct.* 8 (2017) 554–562. doi:10.1039/c6fo01019a.
- [33] D. Verbeken, S. Dierckx, K. Dewettinck, Exudate gums: occurrence, production, and applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63 (2003) 10–21. doi:10.1007/s00253-003-1354-z.
- [34] C. Butstraen, F. Salaün, Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum Arabic and chitosan, *Carbohydr. Polym.* 99 (2014) 608–616. doi:10.1016/j.carbpol.2013.09.006.
- [35] S. Coelho, S. Moreno-Flores, J.L. Toca-Herrera, M.A.N. Coelho, M. Carmo Pereira, S. Rocha, Nanostructure of polysaccharide complexes, *J. Colloid Interface Sci.* 363 (2011) 450–455. doi:10.1016/j.jcis.2011.07.098.
- [36] H. Espinosa-Andrews, K.E. Enríquez-Ramírez, E. García-Márquez, C. Ramírez-Santiago, C. Lobato-Calleros, J. Vernon-Carter, Interrelationship between the zeta potential and viscoelastic properties in coacervates complexes, *Carbohydr. Polym.* 95 (2013) 161–166. doi:10.1016/j.carbpol.2013.02.053.
- [37] C. Tan, J. Xie, X. Zhang, J. Cai, S. Xia, Polysaccharide-based nanoparticles by chitosan and gum arabic polyelectrolyte complexation as carriers for curcumin, *Food Hydrocoll.* 57 (2016) 236–245. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.01.021.
- [38] Aljawish, I. Chevalot, B. Piffaut, C. Rondeau-Mouro, M. Girardin, J. Jasniewski, J. Scher, L. Muniglia, Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 537–544. doi:10.1016/j.carbpol.2011.08.016.
- [39] N. Karaki, A. Aljawish, L. Muniglia, S. Bouguet-Bonnet, S. Leclerc, C. Paris, J. Jasniewski, C. Humeau-Virot, Functionalization of pectin with laccase-mediated oxidation products of ferulic acid, *Enzyme Microb. Technol.* 104 (2017) 1–8. doi:10.1016/j.enzmictec.2017.05.001.
- [40] M.L. Jayme, D.E. Dunstan, M.L. Gee, Zeta potentials of gum arabic stabilised oil in water emulsions, *Food Hydrocoll.* 13 (1999) 459–465. doi:10.1016/S0268-005X(99)00029-6.

- [41] W. Fan, W. Yan, Z. Xu, H. Ni, Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 90 (2012) 21–27. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.09.042.
- [42] R.H. Chen, M.L. Tsaih, Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosans in dilute HCl solution, *Int. J. Biol. Macromol.* 23 (1998) 135–141. doi:10.1016/S0141-8130(98)00036-1.
- [43] H. Espinosa-Andrews, O. Sandoval-Castilla, H. Vázquez-Torres, E.J. Vernon-Carter, C. Lobato-Calleros, Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates, *Carbohydr. Polym.* 79 (2010) 541–546. doi:10.1016/j.carbpol.2009.08.040.
- [44] E. Duhoranimana, J. Yu, O. Mukeshimana, I. Habinshuti, E. Karangwa, X. Xu, B. Muhoza, S. Xia, X. Zhang, Thermodynamic characterization of Gelatin–Sodium carboxymethyl cellulose complex coacervation encapsulating Conjugated Linoleic Acid (CLA), *Food Hydrocoll.* 80 (2018) 149–159. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.02.011.
- [45] Weinbreck, H. Nieuwenhuijse, G.W. Robijn, C.G. de Kruif, Complexation of Whey Proteins with Carrageenan, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 3550–3555. doi:10.1021/jf034969t.
- [46] E. Gonçalves, E. Kitas, J. Seelig, Binding of Oligoarginine to Membrane Lipids and Heparan Sulfate: Structural and Thermodynamic Characterization of a Cell-Penetrating Peptide, *Biochemistry (Mosc.)*. 44 (2005) 2692–2702. doi:10.1021/bi048046i.
- [47] T. Harnsilawat, R. Pongsawatmanit, D.J. McClements, Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study, *Food Hydrocoll.* 20 (2006) 577–585. doi:10.1016/j.foodhyd.2005.05.005.
- [48] A. Ziegler, J. Seelig, Interaction of the Protein Transduction Domain of HIV-1 TAT with Heparan Sulfate: Binding Mechanism and Thermodynamic Parameters, *Biophys. J.* 86 (2004) 254–263. doi:10.1016/S0006-3495(04)74101-6.
- [49] J. Qin, A.M. Gronenborn, Weak protein complexes: challenging to study but essential for life, *FEBS J.* (2014) 1948–1949. doi:https://doi.org/10.1111/febs.12744.
- [50] K. Kaibara, T. Watanabe, K. Miyakawa, Characterizations of critical processes in liquid–liquid phase separation of the elastomeric protein–water system: Microscopic observations and light scattering measurements, *Biopolymers*. 53 (2000) 369–379. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(20000415)53:5<369::AID-BIP2>3.0.CO;2-5.
- [51] F. Comert, A.Y. Xu, S.P. Madro, V. Liadinskaia, P.L. Dubin, The so-called critical condition for polyelectrolyte–colloid complex formation, *J. Chem. Phys.* 149 (2018) 163321. doi:10.1063/1.5029296.
- [52] F. Comert, P.L. Dubin, Liquid–liquid and liquid–solid phase separation in protein–polyelectrolyte systems, *Adv. Colloid Interface Sci.* 239 (2017) 213–217. doi:10.1016/j.cis.2016.08.005.
- [53] N. Karaki, A. Aljawish, L. Muniglia, C. Humeau, J. Jasniewski, Physicochemical characterization of pectin grafted with exogenous phenols, *Food Hydrocoll.* 60 (2016) 486–493. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.04.004.
- [54] A.J. Neel, M.J. Hilton, M.S. Sigman, F.D. Toste, Exploiting non-covalent  $\pi$  interactions for catalyst design, *Nature*. 543 (2017) 637–646. doi:10.1038/nature21701.
- [55] F. Biedermann, H.-J. Schneider, Experimental Binding Energies in Supramolecular Complexes, *Chem. Rev.* 116 (2016) 5216–5300. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00583.

### 3. Contribution de l'article

Ce travail a porté sur l'étude des interactions et des objets formés entre la gomme d'Acacia, native et modifiée et le chitosane, natif et modifié, à pH 5,5 et à 45 °C. Les paramètres thermodynamiques associés aux interactions ont été déterminés par titration calorimétrique isotherme (ITC). Des mesures de potentiel Zêta ont permis de différencier l'impact des interactions électrostatiques et des autres types d'interactions sur l'assemblage. Enfin, des mesures de turbidité et des observations microscopiques ont permis de déterminer le type d'objets formés, afin de proposer un mécanisme reliant le type d'interactions mises en jeu aux objets finalement formés.

Le premier constat était que, que les polymères soient ou non modifiés, **l'interaction était toujours spontanée ( $\Delta G < 0$ ), forte ( $K_d < 10^{-6}$ ) et majoritairement exothermique**. De plus, dans tous les cas, la turbidité des mélanges augmentait avant que des objets ne soient visibles par microscopie optique ou macroscopiquement, indiquant que quels que soient les objets formés au ratio optimal, **de petits complexes ou agrégats solubles étaient systématiquement formés dans un premier temps**.

Le système gomme d'Acacia native et chitosane natif avait un comportement typique de coacervation complexe, avec dans un premier temps formation de complexes solubles et augmentation de la turbidité du mélange, puis neutralisation des charges des polymères et formation de coacervats neutres (avec une stœchiométrie en ITC de 2,2 corrélée à celle obtenue par mesure de potentiel Zeta, de 2,8 et des coacervats qui apparaissaient en microscopie optique pour un ratio molaire de 2,4). La proximité de la stœchiométrie obtenue par mesure de potentiel Zeta et par ITC a conduit à la conclusion que les interactions entre la gomme d'Acacia et le chitosane natifs étaient bien de nature exclusivement électrostatiques. Lorsque le ratio molaire était augmenté au-delà de la stœchiométrie, les coacervats disparaissaient. Ce phénomène était corrélé à des événements endothermiques en fin de titration, ce qui confirmait que le système

se réorganisait afin d'atteindre un nouvel équilibre thermodynamique.

L'hypothèse formulée ensuite était que **la modification des polymères par greffage de composés phénoliques** comportant des cycles aromatiques **pourrait leur conférer la capacité de présenter des interactions de type  $\pi$ - $\pi$  stacking,  $\pi$ -anion,  $\pi$ -cation voire des interactions hydrophobes.**

L'étude du mélange gomme d'Acacia native et chitosane fonctionnalisé ne présentait **pas de différence significative** avec celle du mélange gomme d'Acacia et chitosane natifs, que ce soit en termes d'observation macro ou microscopiques ou en termes de stœchiométrie obtenues par mesure de potentiel Zeta ou par ITC. Les paramètres thermodynamiques mesurés ne présentaient aucune différence significative avec ceux obtenus sur le système natif-natif. Les conclusions portées sur ce système étaient donc **les mêmes que pour le système natif-natif**, c'est-à-dire que les interactions entre les deux polymères étaient **de nature exclusivement électrostatique**. Si nouvelles interactions il y avait (**interactions  $\pi$ -anion**, par exemple, entre les groupements carboxyles de la gomme d'Acacia et les groupements phénoliques greffés sur le chitosane), ces dernières étaient **trop faibles pour être détectées et pour avoir un impact** sur la formation d'objets.

Les systèmes gomme d'Acacia native/chitosane natif et chitosane fonctionnalisé ne présentant que des interactions électrostatiques (considérée comme « faibles »), ont conduit à la formation de **coacervats** dans la gamme de ratios molaires autour de la stœchiométrie. Par contre, le système gomme d'Acacia fonctionnalisée/chitosane fonctionnalisé a conduit à la formation **d'agrégats** et le système gomme d'Acacia fonctionnalisée/chitosane natif a conduit à la **coexistence de coacervats et d'agrégats**, signifiant que dans les deux cas, **les interactions étaient plus fortes ou/et plus nombreuses** que dans les autres systèmes. En effet, la force des interactions mesurée en ITC ( $K_d$ ) était plus forte dans les systèmes contenant de la gomme d'Acacia fonctionnalisée, en particulier dans le système gomme fonctionnalisée et chitosane



---

fonctionnalisé (**la constante de dissociation mesurée était 30 fois plus forte** pour ce système). De plus, la présence de gomme fonctionnalisée renforçait l'impact du facteur enthalpique sur la variation d'énergie libre, **confirmant la présence de nouvelles interactions**. Cette conclusion conduisait à s'interroger sur le nouveau type d'interactions possibles apportées par la gomme modifiée.

Plusieurs hypothèses ont pu être proposées. L'augmentation de la force d'interaction pouvait potentiellement être reliée à **l'augmentation de la charge de la gomme d'Acacia après fonctionnalisation, à l'augmentation de la flexibilité des polymères après fonctionnalisation et à la formation de  $\pi$ - $\pi$  stacking et d'interactions  $\pi$ -cation** entre les cycles aromatiques greffés sur les polymères et les groupements amines chargés du chitosane. Il est probable que l'explication des phénomènes observés repose sur le cumul de ces différentes hypothèses. L'augmentation de **la « quantité » d'interactions électrostatiques seule ne saurait expliquer entièrement le phénomène**, étant donné que le ratio optimal obtenu en potentiel Zeta (1.54) était très différent de la stœchiométrie obtenue en ITC (3.3). La stœchiométrie de l'interaction ne s'expliquait donc pas exclusivement en termes de charges. Cette différence de stœchiométrie s'expliquait probablement par la présence **d'interaction  $\pi$ -cation et de  $\pi$ - $\pi$  stacking**. De plus, l'augmentation de la flexibilité des chaînes de la gomme d'Acacia après fonctionnalisation et l'augmentation de son encombrement stérique pourrait modifier l'accessibilité entre polymères. En effet, les chaînes de la gomme d'acacia modifiée étant plus mobiles, il est possible que lors de son interaction avec le chitosane, sa chaîne s'ouvre, exposant ainsi les groupements phénoliques des produits d'oxydation greffés et provoquant la précipitation de la gomme d'Acacia. Ce phénomène de réorganisation de la matière serait corrélé à la séquence de pics endothermiques présents en fin de titration par ITC. Des différences ont été observées avec le système gomme d'Acacia fonctionnalisée et chitosane natif. Dans ce système, la coexistence de coacervats et d'agrégats a été observée. D'après la

littérature, les agrégats résultent d'interactions fortes tandis que les coacervats résultent d'interactions plus faibles. La force des interactions était donc plus faible initialement, ce qui pourrait s'expliquer par **la seule présence d'interaction  $\pi$ -cation et l'absence de  $\pi$ - $\pi$  stacking** (dans la mesure où le chitosane ne possédait pas de groupements phénoliques dû aux produits d'oxydation) ou par une moins bonne affinité de la gomme modifiée pour le solvant. Lorsque la quantité de gomme d'Acacia était augmentée, **le nombre d'interactions électrostatiques devenant plus important**, la force de l'interaction en serait augmentée, conduisant à **la formation préférentielle d'agrégats**.

Cette étude a permis de mieux comprendre les mécanismes et les interactions qui entraînent la formation de complexes (coacervats et agrégats). La force des interactions en présence de gomme d'Acacia modifiée était visiblement également liée à l'augmentation de sa charge et à sa flexibilité. L'impact du paramètre enthalpique sur la formation d'assemblage a donc été renforcé par la modification de la gomme d'Acacia et l'était encore davantage en mélangeant les deux polymères modifiés. **La présence de nouveaux groupements sur les polymères a donc permis de modifier la force des interactions et les objets formés**. À court terme, il serait intéressant de modifier la force ionique des mélanges pour contrôler la force des interactions entre les polymères modifiés afin de **contrôler la nature des objets formés** (coacervats et agrégats). En fin de compte, la modification des polymères pourrait être un nouveau « paramètre à contrôler », en plus de la température, du pH et du ratio étudiés dans le chapitre 1. En jouant sur ces conditions et sur le greffage des polysaccharides, il devrait être possible de **contrôler les objets formés** dans des conditions données afin d'encapsuler et de libérer des molécules d'intérêt dans des conditions ciblées.

# Conclusion générale et perspectives

---



## Conclusion générale et perspectives

Depuis quelques années, l'étude des auto-assemblages entre polymères attise la curiosité des chercheurs. Bien que très sensibles aux conditions du milieu, ces complexes sont omniprésents dans la nature notamment dans l'organisation du cytoplasme cellulaire. Quelle(s) force(s) dirige(nt) leur assemblage et leur désassemblage ? Bien que caractérisés sur divers systèmes et dans des conditions variées, il subsiste des zones d'ombre dans les mécanismes mis en jeu au cours de la formation des auto-assemblages.

L'objectif de ce travail de thèse était de parvenir à **mieux comprendre les interactions entre deux polymères** (la gomme d'Acacia et le chitosane), de modifier les interactions mises en jeu entre ces polysaccharides par greffage enzymatique de composés phénoliques, afin de **relier ces nouvelles interactions aux paramètres thermodynamiques qui dirigent ces auto-assemblages** ainsi qu'au mécanisme de la formation de ces objets.

Le travail réalisé peut se scinder en plusieurs questions distinctes (Figure 39) :

- Quelle est l'influence du pH et de la température sur l'auto-assemblage des polymères natifs et sur les paramètres thermodynamiques de l'interaction ?
- Est-il possible de modifier la gomme d'Acacia avec des produits d'oxydation de l'acide férulique en utilisant une oxydoréductase (laccase) et, si oui, quelle est la structure des produits d'oxydation greffés ? Quelles sont les différences de propriétés physico-chimiques (couleur, comportement thermique et rhéologique, pouvoir antioxydant, taille...) entre la gomme d'Acacia native et la gomme d'Acacia fonctionnalisée ?
- Quel est l'impact de cette modification sur la structure des objets formés et sur les paramètres thermodynamiques de l'auto-assemblage entre le chitosane et la gomme d'Acacia modifiés?

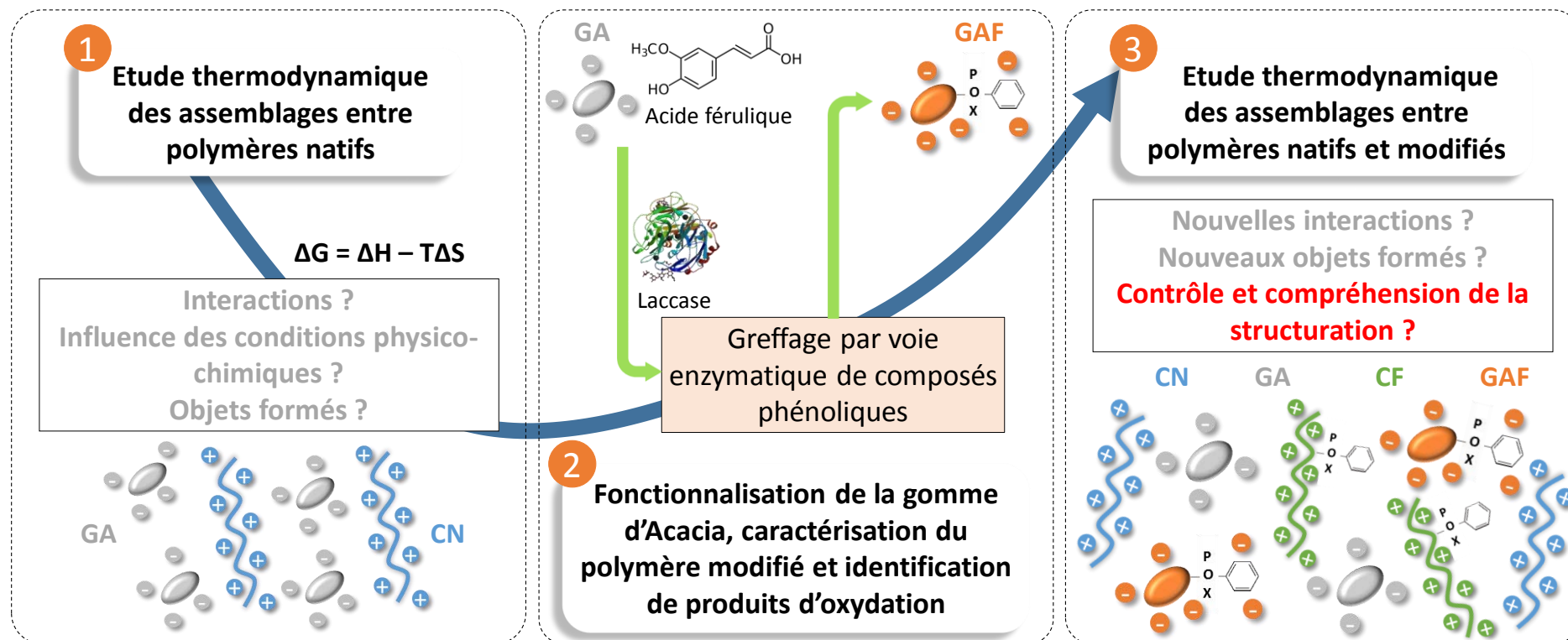


Figure 39 : Résumé des objectifs de la thèse

Ce travail a permis de mettre en évidence que **la température et le pH avaient une influence sur l'assemblage** de la gomme d'Acacia et du chitosane qui à l'état natif forment exclusivement des coacervats (et non des agrégats). La formation de ces coacervats reposait toujours dans un premier temps sur la formation de complexes solubles, puis sur la coacervation à proprement parler. Dans toutes les conditions étudiées, l'interaction était toujours majoritairement exothermique, l'enthalpie dirigeait toujours les interactions et l'un des résultats surprenant de ces travaux était que **l'entropie devenait moins favorable lorsque la température augmentait**. Ce résultat était **majoritairement expliqué par la structure et la charge du chitosane** en solution, qui étaient plus impactées par le pH et la température que celles de la gomme d'Acacia. A pH 5,5 et à 45 °C, **sa structure était plus compactée, son rayon hydrodynamique et sa charge étaient diminués**, augmentant ainsi la notion d'ordre dans le système. Enfin, il a été observé qu'il y avait une synergie entre le pH et la température et qu'en contrôlant ce couple, il était possible de **former des coacervats dans toutes les conditions étudiées** à différents ratio molaires.

Cependant, les différences observées étaient visiblement dues à la modification de la charge du chitosane en solution et donc à des modifications au niveau des **interactions électrostatiques**. Pour changer le nombre et la nature des interactions entre les polysaccharides, ces derniers ont été modifiés par voie enzymatique. Le chitosane avait déjà été modifié dans des travaux précédents au laboratoire [14]. Il a donc été envisagé d'en faire de même avec la gomme d'Acacia afin de lui conférer également la capacité **d'établir d'autres types d'interactions** avec le chitosane.

La gomme d'Acacia a donc été modifiée par voie enzymatique, en y greffant les produits d'oxydation de l'acide férulique obtenus grâce à l'action de la Laccase de *Myceliophthora*

*thermophila*. La **modification de la structure** de la gomme d'Acacia a été observée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et par résonance magnétique nucléaire (RMN). **Les produits d'oxydation étaient présents** sur la gomme d'Acacia modifiée, **probablement proches du carbone C5 de l'acide glucuronique ou des CH<sub>2</sub> des galactoses (C6)**. L'étude n'a pas exclu la possibilité d'un faible greffage sur les groupements amines de la gomme d'Acacia (partie protéique).

L'identification des masses respectives des produits d'oxydation a permis de mettre en évidence que **la plupart d'entre eux représentent deux molécules d'acide férulique**. De plus, leur étude préliminaire par RMN a permis de montrer qu'ils étaient pour la plupart composés de **deux cycles aromatiques** qui garderaient leurs groupements O-CH<sub>3</sub> (motif présent sur l'acide férulique). Une étude plus poussée a permis de **déterminer la structure d'un des produits d'oxydation** de l'acide férulique.

Les **modifications induites par le greffage** observées sur la gomme d'Acacia en termes de propriétés étaient multiples (couleur, solubilité, résistance thermique, transition de phase, tension de surface ...). Si ces propriétés sont **prometteuses pour faire de la gomme d'Acacia un ingrédient fonctionnel**, elles permettent également d'entrevoir son utilité dans la compréhension de l'auto-assemblage gomme d'Acacia/chitosane. En effet, **la charge négative de la gomme d'Acacia a été augmentée** par le greffage, ce qui devait renforcer les interactions électrostatiques. Parallèlement, **son hydrophobie a été modifiée, ainsi que la flexibilité de ses chaînes**. Les produits greffés étant majoritairement des dimères d'acide férulique possédant deux cycles aromatiques, il était envisagé que la gomme d'Acacia modifiée puisse interagir avec le chitosane par des **interactions de type  $\pi$ -stacking**.

Des mélanges ont ensuite été réalisés avec les deux polymères natifs et modifiés. Le premier



constat était **qu'il était possible de former différents objets : des coacervats et des agrégats.**

Dans certaines conditions, les deux pouvaient même coexister au sein du mélange.

La formation de coacervat ou d'agrégat a été reliée à la force des interactions : **plus les interactions étaient fortes** et nombreuses (faible  $K_d$ ), plus les polymères avaient tendance à **former des agrégats**. Lorsque l'interaction était plus **faible** ( $K_d$  plus grand), **la coacervation** prédominait. Les assemblages de polymères natifs ou de la gomme d'Acacia native avec le chitosane fonctionnalisé ne menaient **qu'à des interactions électrostatiques** et donnaient exclusivement des coacervats. **La gomme d'Acacia modifiée et le chitosane natif pouvaient en plus interagir par liaison  $\pi$ -cation**, donnant lieu à la coexistence d'agrégats et de coacervats. Enfin, lorsque les **deux polymères étaient modifiés**, leurs produits d'oxydation greffés pouvaient interagir *via*  **$\pi$ - $\pi$  stacking**, en plus des interactions électrostatiques et  $\pi$ -cation, donnant lieu exclusivement à la formation d'**agrégats**. La force des interactions en présence de gomme d'Acacia modifiée était visiblement liée à **l'augmentation de sa charge et à sa flexibilité**. L'impact du paramètre enthalpique sur la formation d'assemblage a donc été renforcé par la modification de la gomme d'Acacia. Ce phénomène est d'autant plus marqué lorsque les deux polymères modifiés étaient mélangés. **La présence de nouveaux groupements sur les polymères a donc permis de modifier la force des interactions et les objets formés** (Figure 40).

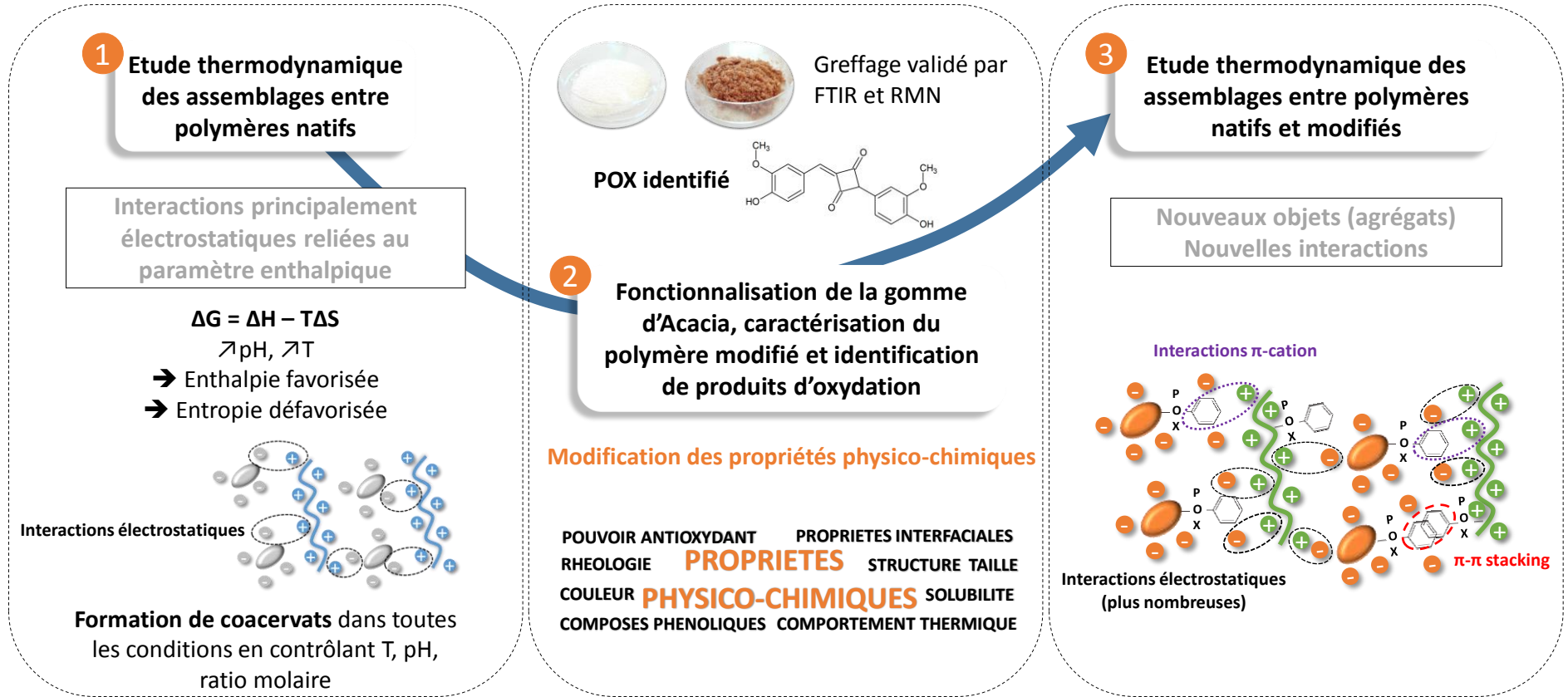


Figure 40 : Principales conclusions du travail de thèse

En ce qui concerne les perspectives de ce travail, elles sont multiples (Figure 41) :

1. Dans un premier temps, serait-il possible de contrôler les modifications de structure des polysaccharides pour maîtriser leur auto-assemblage ?

- La première étape reposerait sur la modification des polymères de manière contrôlée. Serait-il possible de **contrôler la structure des produits greffés sur les polymères en contrôlant la durée de la réaction enzymatique ?**

L'étude sur l'apparition des produits d'oxydation en fonction du temps a permis d'observer que la quantité de chaque produit d'oxydation était **tributaire du temps de réaction**. Si chaque produit d'oxydation était **caractérisé** individuellement, il serait possible de **prévoir**, en fonction des propriétés désirées, **à quel moment arrêter la réaction**. Le produit identifié pendant cette étude, par exemple, n'est a priori pas chargé. Pourtant, la majorité des produits greffés semblent augmenter la charge de la gomme d'Acacia. Il serait possible, en choisissant le temps d'arrêt de la réaction, de sélectionner des produits chargés ou non, colorés ou non, etc.

- Sachant que les produits d'oxydation de l'acide férulique greffés sur la gomme d'Acacia lui ont conféré de nouvelles possibilités d'interactions avec le chitosane (interaction  $\pi$ -cation), que se passe-t-il lorsque la gomme est modifiée **avec un autre phénol ou une quantité différente d'acide férulique ?**

Certains travaux préliminaires réalisés en fin de thèse ont montré qu'en la **modifiant avec des quantités différentes d'acide férulique ou avec d'autres phénols**, la gomme d'Acacia serait capable de **former des objets seule en solution**. La gomme d'Acacia fonctionnalisée avec une quantité 4 fois supérieure en acide férulique formait des particules peu polydisperses (PdI de  $0,26 \pm 0,07$ ) mesurant environ  $3,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$ .

- Serait-il possible de **transposer les résultats de l'étude à d'autres systèmes** ?

La complexité de cette étude réside en grande partie dans la **complexité inhérente aux polymères** eux-mêmes. Leur grande masse molaire, leur polydispersité, la composition de la gomme d'Acacia en trois fractions en rend l'étude difficile. L'utilisation de molécules plus petites et plus simples **faciliterait sans aucun doute la localisation des greffons et la compréhension des mécanismes** autour des assemblages. De la même manière, leur modification par **voie chimique** permettrait de produire des dérivés moins nombreux et simplifier et de mieux contrôler le système étudié. Cependant, le laboratoire focalise ses recherches autour des agro-ressources. Les thématiques sociétales actuelles poussent les laboratoires à s'orienter vers des procédés « verts » et peu coûteux en énergie, ce qui justifie de travailler avec ces systèmes malgré les verrous liés à leur complexité. De plus, si les études étaient initialement menées sur des molécules simples, il ne serait sans doute pas possible de transposer les résultats obtenus à des molécules complexes.

Ainsi, pour modifier le système, il serait intéressant **d'étudier d'autres polysaccharides ayant d'autres structures**. La pectine, par exemple, a déjà été modifiée par voie enzymatique au laboratoire. Dans la littérature, quelques études portent sur des assemblages pectine/chitosane en fonction du degré d'estérification de la pectine, du pH et du ratio [435–438]. Des études plus rares existent sur les assemblages gomme d'Acacia/pectine méthylée [439] ou sur les mélanges gomme d'Acacia/pectine/chitosane [440]. Des études préliminaires menées pendant la thèse permettent déjà d'entrevoir la formation d'objets différents en fonction des polymères utilisés. *In fine*, une **caractérisation systématique** des produits d'oxydation formés à différents temps de réaction, à différentes concentrations, avec différents phénols et sur différents polymères pourrait permettre de **contrôler la structure des polymères** pour **maîtriser** l'assemblage de polysaccharides.

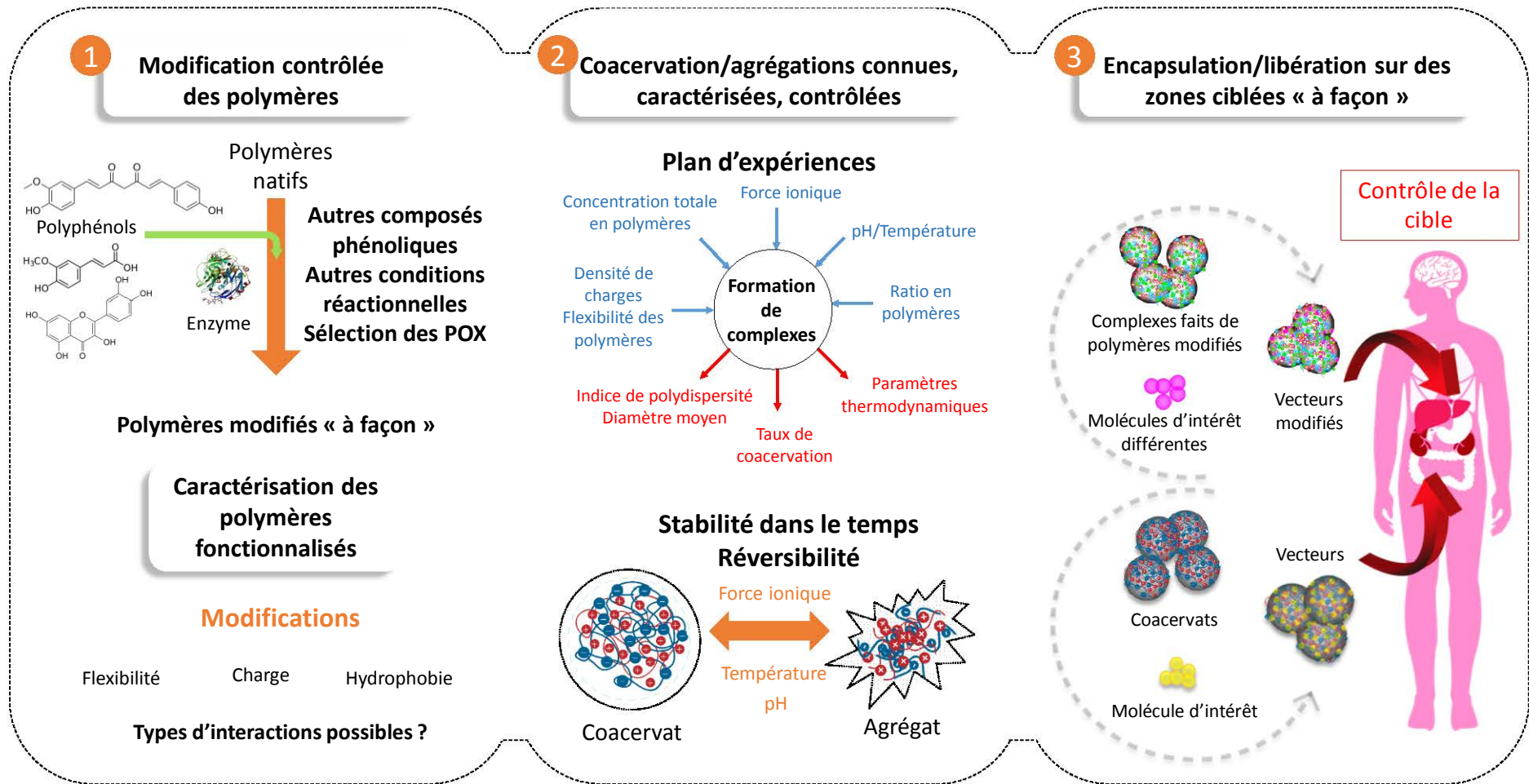


Figure 41 : Perspectives du travail de thèse

2. Après avoir vu comment mieux contrôler la modification des polysaccharides, comment pourrait-on **prévoir la nature des objets formés** en fonction des paramètres du milieu ou mieux encore, **contrôler les objets formés** ?

- L'auto-assemblage pourrait être **caractérisé de manière systématique** en fonction des interactions entre polymères.

Un plan de mélanges pourrait être réalisé avec les polymères natifs, ou en mélangeant des polymères natifs et fonctionnalisés dans différentes proportions. Il serait intéressant de coupler ce plan de mélanges à un plan d'expériences, afin de faire interagir les constituants dans différentes conditions (température, pH, force ionique, ratio molaire, concentration ...) et d'obtenir en sortie des taux de coacervation, la taille des objets formés (par microscopie ou par diffusion dynamique de la lumière), la polydispersité des objets formés et les paramètres thermodynamiques qui régissent ces interactions (stœchiométrie, enthalpie, entropie, variation d'énergie libre et constante d'association). De plus, il a été montré dans ce travail qu'il y avait une influence du couple pH/température sur les interactions entre les polysaccharides. L'utilisation d'un plan d'expériences permettrait de connaître plus finement les synergies et les antagonismes entre les différents paramètres physicochimiques. **Une caractérisation plus poussée du système pourrait amener à une compréhension plus fine des événements.**

La compréhension des systèmes, combinée à la connaissance précise des structures des polymères (**nombre de charge, hydrophobie ...**) pourrait *in fine* permettre de caractériser finement la quantité d'interactions que le polymère peut établir afin de **modéliser les interactions et de prévoir les objets formés**. Par exemple, en déterminant **quelle « quantité » d'interaction est critique** pour la formation de coacervats, il serait possible de déterminer pour quel couple « quantité de phénol/charge » l'interaction serait trop forte pour former des coacervats.

- Une fois ces objets formés de manière contrôlée, **la structuration de la matière est-**

**elle réversible ?**

Il pourrait également être intéressant d'étudier **l'impact des conditions du milieu sur les objets déjà formés**, en modifiant les conditions de température ou de force ionique. Si la formation de coacervats ou d'agrégats est régie par la force des interactions, serait-il possible, en augmentant la force ionique, de diminuer la force d'interaction dans un système et de **passer d'objets de type agrégats à des coacervats, et inversement ?**

- Serait-il possible de **contrôler les chemins thermodynamiques** dirigeant les interactions ?

En greffant majoritairement des produits d'oxydation semblables à celui identifié dans la **Publication n° 2**, qui *a priori* n'augmenteraient pas la charge du polymère mais seulement son **hydrophobie**, il pourrait être envisageable **d'obtenir des interactions spontanées mais majoritairement dirigées par l'entropie**.

3. Finalement, une fois ces systèmes bien **caractérisés et contrôlés**, serait-il possible d'y **encapsuler des molécules d'intérêt** et de **les libérer** dans des conditions cibles ?

- Dans un premier temps, **la compréhension des systèmes** et des interactions mises en jeu pourrait permettre de **cibler le système et les paramètres souhaités** en fonction de la molécule à encapsuler (hydrophile, hydrophobe, molécules de différentes tailles ...).

En effet, des études préliminaires ont permis de déterminer qu'à des concentrations molaires plus élevées (1 % p/v pour la gomme d'Acacia et le chitosane), il était possible de **former des objets plus petits**. Par exemple, dans certaines conditions de pH et de température, des objets monodisperses ont été obtenus (PdI de 0,10) ayant une taille nanométrique. Dans les études précédentes, pour une concentration en chitosane plus faible (0,02 % p/v), les objets obtenus étaient micrométriques. Il serait donc possible, **en contrôlant certains paramètres** tels que la concentration totale en polymère, **de contrôler les objets formés et de cibler**

**ces objets** en fonction des molécules à encapsuler.

- **L'étude de la réversibilité** de la formation des objets devrait permettre **de libérer les molécules dans des conditions elles aussi ciblées**.

Si une molécule est encapsulée dans un coacervat et que le système est modifié, les coacervats disparaissant au profit d'agrégats, qu'est-ce que cela signifie pour les molécules encapsulées ? **Dans le cas d'une transition coacervats/agrégats, les molécules encapsulées sont-elles encore présentes au sein de la structure ?** La parfaite maîtrise de l'encapsulation et de la libération demanderait de trouver des conditions permettant au système, en fonction des conditions, de bien encapsuler tout en libérant correctement la molécule d'intérêt.

*In fine*, ce travail de thèse a permis de mieux comprendre l'impact des interactions entre polysaccharides sur la nature des objets formés. Il a été prouvé qu'il était possible de modifier ces interactions en modifiant la structure des polymères par voie enzymatique. Cependant, les réponses apportées par ce travail soulèvent un nombre tout aussi important de questions et de perspectives. Si la compréhension du système a été améliorée, le chemin à parcourir reste encore long avant de pouvoir contrôler parfaitement la modification des polymères ainsi que les objets formés. Malgré les verrous rencontrés, ce contrôle sera nécessaire à l'utilisation de ces objets pour encapsuler et libérer des molécules d'intérêt dans des conditions ciblées. Plus important encore, la maîtrise de ces systèmes devrait conduire à une meilleure compréhension du comportement de ces objets dans la nature et du rôle indispensable qu'ils jouent dans la régulation de la biochimie intracellulaire.



# Références bibliographiques

---



---

## Références bibliographiques

- [1] E. Kizilay, A.B. Kayitmazer, P.L. Dubin, Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids, *Adv. Colloid Interface Sci.* 167 (2011) 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.06.006>.
- [2] Schmitt, Étude de la coacervation complexe entre la bêta-lactoglobuline et la gomme d'acacia en solution aqueuse, Institut National Polytechnique de Lorraine-INPL, 2000.
- [3] S.R. Bhatia, S.F. Khattak, S.C. Roberts, Polyelectrolytes for cell encapsulation, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 10 (2005) 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.05.004>.
- [4] S. Lankalapalli, V.R.M. Kolapalli, Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology, *Indian J. Pharm. Sci.* 71 (2009) 481–487. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.58165>.
- [5] B. Wu, B. Degner, D.J. McClements, Soft matter strategies for controlling food texture: formation of hydrogel particles by biopolymer complex coacervation, *J. Phys. Condens. Matter.* 26 (2014) 464104. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/26/46/464104>.
- [6] E. Hasanvand, A. Rafe, Rheological and structural properties of rice bran protein-flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) gum complex coacervates, *Food Hydrocoll.* 83 (2018) 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.019>.
- [7] M.R. Avadi, A.M.M. Sadeghi, N. Mohammadpour, S. Abedin, F. Atyabi, R. Dinarvand, M. Rafiee-Tehrani, Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 6 (2010) 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.007>.
- [8] C. Butstraen, F. Salauen, Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum Arabic and chitosan, *Carbohydr. Polym.* 99 (2014) 608–616. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.006>.
- [9] S. Coelho, S. Moreno-Flores, J.L. Toca-Herrera, M.A.N. Coelho, M. Carmo Pereira, S. Rocha, Nanostructure of polysaccharide complexes, *J. Colloid Interface Sci.* 363 (2011) 450–455. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.098>.
- [10] H. Espinosa-Andrews, J.G. Báez-González, F. Cruz-Sosa, E.J. Vernon-Carter, Gum Arabic–Chitosan Complex Coacervation, *Biomacromolecules.* 8 (2007) 1313–1318. <https://doi.org/10.1021/bm0611634>.
- [11] H. Espinosa-Andrews, O. Sandoval-Castilla, H. Vázquez-Torres, E.J. Vernon-Carter, C. Lobato-Calleros, Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates, *Carbohydr. Polym.* 79 (2010) 541–546. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.040>.
- [12] I.J. Joye, D.J. McClements, Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 19 (2014) 417–427. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2014.07.002>.
- [13] D. Sakloetsakun, D. Preechagoon, A. Bernkop-Schnürch, T. Pongjanyakul, Chitosan–gum arabic polyelectrolyte complex films: physicochemical, mechanical and mucoadhesive properties, *Pharm. Dev. Technol.* (2015) 1–10. <https://doi.org/10.3109/10837450.2015.1035727>.
- [14] A. Aljawish, Fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques : évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères, Université de Lorraine, 2013. [http://docnum.univ-lorraine.fr/public/DDOC\\_T\\_2013\\_0089\\_ALJAWISH.pdf](http://docnum.univ-lorraine.fr/public/DDOC_T_2013_0089_ALJAWISH.pdf) (accessed October 17, 2016).
- [15] N. Karaki, Impact de la fonctionnalisation enzymatique de la pectine par des composés

- phénoliques sur la structure et les propriétés physicochimiques du polymère, Université de Lorraine, 2015. <http://www.theses.fr/2015LORR0205> (accessed October 17, 2016).
- [16] P.-Å. Albertsson, Partition of Cell Particles and Macromolecules in Polymer Two-Phase Systems, in: C.B. Anfinsen, J.T. Edsall, F.M. Richards (Eds.), *Adv. Protein Chem.*, Academic Press, 1970: pp. 309–341. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065323308602442>.
- [17] V. Tolstoguzov, Some thermodynamic considerations in food formulation, *Food Hydrocoll.* 17 (2003) 1–23. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00111-4](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00111-4).
- [18] S.L. Turgeon, C. Schmitt, C. Sanchez, Protein–polysaccharide complexes and coacervates, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 12 (2007) 166–178. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.07.007>.
- [19] D.W. Krause, Polymer-polymer miscibility, in: 1986. <https://doi.org/10.1351/pac198658121553>.
- [20] S. Aid, a Eddhahak, Z. Ortega, D. Froelich, A. Tcharkhtchi, Experimental study of the miscibility of ABS/PC polymer blends and investigation of the processing effect, *J. Appl. Polym. Sci.* 134 (2017) 44975. <https://doi.org/10.1002/app.44975>.
- [21] P.J. Flory, *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press, Ithaca, NY, 1953.
- [22] K. Bergfeldt, L. Piculell, P. Linse, Segregation and Association in Mixed Polymer Solutions from Flory–Huggins Model Calculations, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 3680–3687. <https://doi.org/10.1021/jp952349s>.
- [23] L. Piculell, B. Lindman, Association and segregation in aqueous polymer/polymer, polymer/surfactant, and surfactant/surfactant mixtures: similarities and differences, *Adv. Colloid Interface Sci.* 41 (1992) 149–178. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(92\)80011-L](https://doi.org/10.1016/0001-8686(92)80011-L).
- [24] N.A. Campbell, J.B. Reece, *Biology*, 7th ed., Pearson, 2004 7th Edition, 2004.
- [25] A.J. Neel, M.J. Hilton, M.S. Sigman, F.D. Toste, Exploiting non-covalent  $\pi$  interactions for catalyst design, *Nature.* 543 (2017) 637–646. <https://doi.org/10.1038/nature21701>.
- [26] V. Tolstoguzov, Functional properties of Food Proteins and role of Protein-Polysaccharide interaction, *ResearchGate.* (1997) 171–198.
- [27] F.W. Tiebackx, Gleichzeitige Ausflockung zweier Kolloide, *Z Chem Ind Kolloide.* (1911) 198–201.
- [28] H.G. Bungenberg de Jong, Crystallisation-coacervation-flocculation, 2 (1949) 232–258.
- [29] V.Y. Borue, I.Y. Erukhimovich, A statistical theory of globular polyelectrolyte complexes, *Macromolecules.* 23 (1990) 3625–3632. <https://doi.org/10.1021/ma00217a015>.
- [30] N.V. Pogodina, N.V. Tsvetkov, Structure and Dynamics of the Polyelectrolyte Complex Formation, *Macromolecules.* 30 (1997) 4897–4904. <https://doi.org/10.1021/ma9617983>.
- [31] C.Y. Kong, M. Muthukumar, Monte Carlo study of adsorption of a polyelectrolyte onto charged surfaces, *J. Chem. Phys.* 109 (1998) 1522–1527. <https://doi.org/10.1063/1.476703>.
- [32] R.R. Netz, J.-F. Joanny, Adsorption of Semiflexible Polyelectrolytes on Charged Planar Surfaces: Charge Compensation, Charge Reversal, and Multilayer Formation, *Macromolecules.* 32 (1999) 9013–9025. <https://doi.org/10.1021/ma990263h>.
- [33] Q. Wang, J.B. Schlenoff, The Polyelectrolyte Complex/Coacervate Continuum, *Macromolecules.* 47 (2014) 3108–3116. <https://doi.org/10.1021/ma500500q>.
- [34] J. Fu, H.M. Fares, J.B. Schlenoff, Ion-Pairing Strength in Polyelectrolyte Complexes, *Macromolecules.* 50 (2017) 1066–1074. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.6b02445>.
- [35] M. Tirrell, Polyelectrolyte Complexes: Fluid or Solid?, *ACS Cent. Sci.* 4 (2018) 532–533. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00284>.
- [36] G.G. Cameron, Polyelectrolytes: formation, characterization and application. H.

- Dautzenberg, W. Jaeger, J. Kötz, B. Philipp, Ch. Seidel and D. Stscherbina. Carl Hanser Verlag, Munich, 1994. pp. xiv + 343, price DM168.00. ISBN 1-56990-127-9. ISBN 3-446-17127-4, Polym. Int. 38 (1995) 106–106. <https://doi.org/10.1002/pi.1995.210380118>.
- [37] J. Fu, J.B. Schlenoff, Driving Forces for Oppositely Charged Polyion Association in Aqueous Solutions: Enthalpic, Entropic, but Not Electrostatic, *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016) 980–990. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b11878>.
- [38] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Chemical Bonds in Biochemistry*, Biochem. 5th Ed. (2002). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bases-doc.univ-lorraine.fr/books/NBK22567/> (accessed May 27, 2019).
- [39] Y. Zhang, P. Batys, J.T. O’Neal, F. Li, M. Sammalkorpi, J.L. Lutkenhaus, Molecular Origin of the Glass Transition in Polyelectrolyte Assemblies, *ACS Cent. Sci.* 4 (2018) 638–644. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00137>.
- [40] V. Tolstoguzov, Structure—Property Relationships in Foods, in: *Macromol. Interact. Food Technol.*, American Chemical Society, 1996: pp. 2–14. <https://doi.org/10.1021/bk-1996-0650.ch001>.
- [41] L. Aberkane, Etude des mécanismes de structuration d’assemblages  $\beta$ -lactoglobuline-gomme d’Acacia en présence d’un flavonoïde, la quercétine, Université de Lorraine, 2010.
- [42] C. Sanchez, M. Pouliot, S.F. Gauthier, P. Paquin, Thermal Aggregation of Whey Protein Isolate Containing Microparticulated or Hydrolyzed Whey Proteins, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 2384–2392. <https://doi.org/10.1021/jf970061p>.
- [43] K. Kaibara, T. Watanabe, K. Miyakawa, Characterizations of critical processes in liquid–liquid phase separation of the elastomeric protein–water system: Microscopic observations and light scattering measurements, *Biopolymers.* 53 (2000) 369–379. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(20000415\)53:5<369::AID-BIP2>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(20000415)53:5<369::AID-BIP2>3.0.CO;2-5).
- [44] M. Tsianou, P. Alexandridis, Control of the rheological properties in solutions of a polyelectrolyte and an oppositely charged surfactant by the addition of cyclodextrins, *Langmuir.* 15 (1999) 8105–8112.
- [45] W.-R. Zhuang, Y. Wang, P.-F. Cui, L. Xing, J. Lee, D. Kim, H.-L. Jiang, Y.-K. Oh, Applications of  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions in the design of drug-delivery systems, *J. Controlled Release.* 294 (2019) 311–326. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.014>.
- [46] D.A. Dougherty, The Cation- $\pi$  Interaction, *Acc. Chem. Res.* 46 (2013) 885–893. <https://doi.org/10.1021/ar300265y>.
- [47] B. Schottel, H. Chifotides, K. Dunbar, Anion- $\pi$  interactions, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 68–83. <https://doi.org/10.1039/B614208G>.
- [48] S. Tsuzuki, K. Honda, T. Uchamaru, M. Mikami, A. Fujii, Magnitude and Directionality of the Interaction Energy of the Aliphatic CH/ $\pi$  Interaction: Significant Difference from Hydrogen Bond, *J. Phys. Chem. A.* 110 (2006) 10163–10168. <https://doi.org/10.1021/jp064206j>.
- [49] Atkins, Jones, Laverman, *Principes de chimie*, E, 2017. <https://www.deboecksuperieur.com/ouvrage/9782807306387-principes-de-chimie> (accessed May 28, 2019).
- [50] F.S. Bates, Polymer-polymer phase behavior, *Science.* 251 (1991) 898–905. <https://doi.org/10.1126/science.251.4996.898>.
- [51] V. Tolstoguzov, Thermodynamic considerations on polysaccharide functions. Polysaccharides came first, *Carbohydr. Polym.* 54 (2003) 371–380. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00210-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00210-8).
- [52] J. Gummel, F. Cousin, F. Boué, Counterions release from electrostatic complexes of polyelectrolytes and proteins of opposite charge : a direct measurement, *J. Am. Chem.*

- Soc. 129 (2007) 5806–5807.
- [53] A.B. Kayitmazer, Thermodynamics of complex coacervation, *Adv. Colloid Interface Sci.* 239 (2017) 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.07.006>.
- [54] Weinbreck, H. Nieuwenhuijse, G.W. Robijn, C.G. de Kruif, Complexation of Whey Proteins with Carrageenan, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 3550–3555. <https://doi.org/10.1021/jf034969t>.
- [55] D. Priftis, N. Laugel, M. Tirrell, Thermodynamic Characterization of Polypeptide Complex Coacervation, *Langmuir.* 28 (2012) 15947–15957. <https://doi.org/10.1021/la302729r>.
- [56] E. Duhoranimana, J. Yu, O. Mukeshimana, I. Habinshuti, E. Karangwa, X. Xu, B. Muhoza, S. Xia, X. Zhang, Thermodynamic characterization of Gelatin–Sodium carboxymethyl cellulose complex coacervation encapsulating Conjugated Linoleic Acid (CLA), *Food Hydrocoll.* 80 (2018) 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.011>.
- [57] E. Gonçalves, E. Kitas, J. Seelig, Binding of Oligoarginine to Membrane Lipids and Heparan Sulfate: Structural and Thermodynamic Characterization of a Cell-Penetrating Peptide, *Biochemistry (Mosc.)* 44 (2005) 2692–2702. <https://doi.org/10.1021/bi048046i>.
- [58] T. Harnsilawat, R. Pongsawatmanit, D.J. McClements, Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study, *Food Hydrocoll.* 20 (2006) 577–585. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.05.005>.
- [59] A. Ziegler, J. Seelig, Interaction of the Protein Transduction Domain of HIV-1 TAT with Heparan Sulfate: Binding Mechanism and Thermodynamic Parameters, *Biophys. J.* 86 (2004) 254–263. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74101-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74101-6).
- [60] F. Comert, P.L. Dubin, Liquid-liquid and liquid-solid phase separation in protein-polyelectrolyte systems, *Adv. Colloid Interface Sci.* 239 (2017) 213–217. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.08.005>.
- [61] F. Biedermann, H.-J. Schneider, Experimental Binding Energies in Supramolecular Complexes, *Chem. Rev.* 116 (2016) 5216–5300. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00583>.
- [62] M. Girard, S.L. Turgeon, S.F. Gauthier, Interbiopolymer complexing between  $\beta$ -lactoglobulin and low- and high-methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration, *Food Hydrocoll.* 16 (2002) 585–591. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(02\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(02)00020-6).
- [63] S. Liu, Y.-L. Cao, S. Ghosh, D. Rousseau, N.H. Low, M.T. Nickerson, Intermolecular Interactions during Complex Coacervation of Pea Protein Isolate and Gum Arabic, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 552–556. <https://doi.org/10.1021/jf902768v>.
- [64] M. Hadian, S.M.H. Hosseini, A. Farahnaky, G.R. Mesbahi, G.H. Yousefi, A.A. Saboury, Isothermal titration calorimetric and spectroscopic studies of  $\beta$ -lactoglobulin-water-soluble fraction of Persian gum interaction in aqueous solution, *Food Hydrocoll.* 55 (2016) 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.006>.
- [65] M. Nigen, T. Croguennec, D. Renard, S. Bouhallab, Temperature Affects the Supramolecular Structures Resulting from  $\alpha$ -Lactalbumin–Lysozyme Interaction, *Biochemistry (Mosc.)* 46 (2007) 1248–1255. <https://doi.org/10.1021/bi062129c>.
- [66] F. Niu, Y. Su, Y. Liu, G. Wang, Y. Zhang, Y. Yang, Ovalbumin–gum arabic interactions: Effect of pH, temperature, salt, biopolymers ratio and total concentration, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 113 (2014) 477–482. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.012>.
- [67] Burgess, Practical analysis of complex coacervate systems, *J. Colloid Interface Sci.* 140 (1990) 227–238. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(90\)90338-O](https://doi.org/10.1016/0021-9797(90)90338-O).

- [68] C. Schmitt, C. Sanchez, F. Thomas, J. Hardy, Complex coacervation between  $\beta$ -lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium, *Food Hydrocoll.* 13 (1999) 483–496. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(99\)00032-6](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(99)00032-6).
- [69] J. Xia, P.L. Dubin, Protein-Polyelectrolyte Complexes, in: P. Dubin, J. Bock, R. Davis, D.N. Schulz, C. Thies (Eds.), *Macromol. Complexes Chem. Biol.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1994: pp. 247–271. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-78469-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-642-78469-9_15).
- [70] Burgess, Complex Coacervation: Microcapsule Formation, in: P. Dubin, J. Bock, R. Davis, D.N. Schulz, C. Thies (Eds.), *Macromol. Complexes Chem. Biol.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1994: pp. 285–300. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-78469-9\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-642-78469-9_17).
- [71] Burgess, J.E. Carless, Microelectrophoretic studies of gelatin and acacia for the prediction of complex coacervation, *J. Colloid Interface Sci.* 98 (1984) 1–8. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(84\)90472-7](https://doi.org/10.1016/0021-9797(84)90472-7).
- [72] E. Merisko-Liversidge, G.G. Liversidge, E.R. Cooper, Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds, *Eur. J. Pharm. Sci.* 18 (2003) 113–120. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(02\)00251-8](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(02)00251-8).
- [73] T. Panagiotou, R. Fisher, Producing micron- and nano-size formulations for functional foods applications, *Funct. Foods Health Dis.* (2013) 274–289.
- [74] C.G. de Kruif, F. Weinbreck, R. de Vries, Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 9 (2004) 340–349. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.09.006>.
- [75] J. van der Gucht, E. Spruijt, M. Lemmers, M.A. Cohen Stuart, Polyelectrolyte complexes: Bulk phases and colloidal systems, *J. Colloid Interface Sci.* 361 (2011) 407–422. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.05.080>.
- [76] R.J. Stewart, C.S. Wang, I.T. Song, J.P. Jones, The role of coacervation and phase transitions in the sandcastle worm adhesive system, *Adv. Colloid Interface Sci.* 239 (2017) 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.06.008>.
- [77] J.T.G. Overbeek, M.J. Voorn, Phase separation in polyelectrolyte solutions. Theory of complex coacervation, *J. Cell. Comp. Physiol.* 49 (1957) 7–26. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030490404>.
- [78] R. de Vries, DNA condensation in bacteria: Interplay between macromolecular crowding and nucleoid proteins, *Biochimie.* 92 (2010) 1715–1721. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.06.024>.
- [79] J. Widom, Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27 (1998) 285–327. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.27.1.285>.
- [80] E. Spruijt, F.A.M. Leermakers, R. Fokink, R. Schweins, A.A. Van Well, M.A.C. Stuart, J. van der Gucht, Structure and dynamics of polyelectrolyte complex coacervates studied by scattering of Neutrons, X-rays, and Light, *Macromolecules.* (2013). <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ma400132s> (accessed May 28, 2019).
- [81] E. Spruijt, A.H. Westphal, J.W. Borst, M.A. Cohen Stuart, J. van der Gucht, Binodal Compositions of Polyelectrolyte Complexes, *Macromolecules.* 43 (2010) 6476–6484. <https://doi.org/10.1021/ma101031t>.
- [82] E. Spruijt, J. Sprakel, M. Lemmers, M.A.C. Stuart, J. van der Gucht, Relaxation Dynamics at Different Time Scales in Electrostatic Complexes: Time-Salt Superposition, *Phys. Rev. Lett.* 105 (2010) 208301. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.105.208301>.
- [83] H.J. Kim, B. Yang, T.Y. Park, S. Lim, H.J. Cha, Complex coacervates based on recombinant mussel adhesive proteins: their characterization and applications, *Soft Matter.* 13 (2017) 7704–7716. <https://doi.org/10.1039/C7SM01735A>.
- [84] C. Sanchez, G. Mekhloufi, D. Renard, Complex coacervation between  $\beta$ -lactoglobulin

- and Acacia gum: A nucleation and growth mechanism, *J. Colloid Interface Sci.* 299 (2006) 867–873. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.02.031>.
- [85] C. Schmitt, C. Sanchez, S. Desobry-Banon, J. Hardy, Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes: A Review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38 (1998) 689–753. <https://doi.org/10.1080/10408699891274354>.
- [86] M.A.C. Stuart, Supramolecular perspectives in colloid science, *Colloid Polym. Sci.* 286 (2008) 855–864. <https://doi.org/10.1007/s00396-008-1861-7>.
- [87] C. Schmitt, S.L. Turgeon, Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems, *Adv. Colloid Interface Sci.* 167 (2011) 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.10.001>.
- [88] C.E. Sing, Development of the modern theory of polymeric complex coacervation, *Adv. Colloid Interface Sci.* 239 (2017) 2–16. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.04.004>.
- [89] Liu, X. Ji, Z. Xu, Modified Poisson-Nernst-Planck model with accurate Coulomb correlation in variable media, *ArXiv161106486 Phys.* (2016). <http://arxiv.org/abs/1611.06486>.
- [90] R.R. Netz, H. Orland, Beyond Poisson-Boltzmann: Fluctuation effects and correlation functions, *Eur. Phys. J. E.* 1 (2000) 203–214. <https://doi.org/10.1007/s101890050023>.
- [91] L.A.C. Zuanon, C.R. Malacrida, V.R.N. Telis, Production of Turmeric Oleoresin Microcapsules by Complex Coacervation with Gelatin–Gum Arabic, *J. Food Process Eng.* 36 (2013) 364–373. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12003>.
- [92] F. Weinbreck, R. de Vries, P. Schrooyen, C.G. de Kruif, Complex Coacervation of Whey Proteins and Gum Arabic, *Biomacromolecules.* 4 (2003) 293–303. <https://doi.org/10.1021/bm025667n>.
- [93] D. Ach, S. Briançon, V. Dugas, J. Pelletier, G. Broze, Y. Chevalier, Influence of main whey protein components on the mechanism of complex coacervation with Acacia gum, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 481 (2015) 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.06.006>.
- [94] X. Jun-xia, Y. Hai-yan, Y. Jian, Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic, *Food Chem.* 125 (2011) 1267–1272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.063>.
- [95] C. Lii, P. Tomasik, H. Zaleska, S. Liaw, V.M.-F. Lai, Carboxymethyl cellulose–gelatin complexes, *Carbohydr. Polym.* 50 (2002) 19–26. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00372-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00372-1).
- [96] M.R. Hussain, T.K. Maji, Preparation of genipin cross-linked chitosan-gelatin microcapsules for encapsulation of Zanthoxylum limonella oil (ZLO) using salting-out method, *J. Microencapsul.* 25 (2008) 414–420. <https://doi.org/10.1080/02652040802025901>.
- [97] W. Tiyaboonchai, G.C. Ritthidej, Development of indomethacin sustained release microcapsules using chitosan-carboxymethyl-cellulose complex coacervation, in: 2003.
- [98] D.V. Mendanha, S.E. Molina Ortiz, C.S. Favaro-Trindade, A. Mauri, E.S. Monterrey-Quintero, M. Thomazini, Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin, *Food Res. Int.* 42 (2009) 1099–1104. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.007>.
- [99] F.N.A. Aryee, M.T. Nickerson, Formation of electrostatic complexes involving mixtures of lentil protein isolates and gum Arabic polysaccharides, *Food Res. Int.* 48 (2012) 520–527. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.012>.
- [100] S. Liu, C. Elmer, N.H. Low, M.T. Nickerson, Effect of pH on the functional behaviour of pea protein isolate–gum Arabic complexes, *Food Res. Int.* 43 (2010) 489–495. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.022>.
- [101] S. Liu, N.H. Low, M.T. Nickerson, Effect of pH, Salt, and Biopolymer Ratio on the



- Formation of Pea Protein Isolate–Gum Arabic Complexes, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 1521–1526. <https://doi.org/10.1021/jf802643n>.
- [102] C. Elmer, A.C. Karaca, N.H. Low, M.T. Nickerson, Complex coacervation in pea protein isolate–chitosan mixtures, *Food Res. Int.* 44 (2011) 1441–1446. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.011>.
- [103] K.J. Klemmer, L. Waldner, A. Stone, N.H. Low, M.T. Nickerson, Complex coacervation of pea protein isolate and alginate polysaccharides, *Food Chem.* 130 (2012) 710–715. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.114>.
- [104] V. Ducel, J. Richard, P. Saulnier, Y. Popineau, F. Boury, Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 232 (2004) 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2003.11.001>.
- [105] Q. Ru, Y. Wang, J. Lee, Y. Ding, Q. Huang, Turbidity and rheological properties of bovine serum albumin/pectin coacervates: Effect of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio, *Carbohydr. Polym.* 88 (2012) 838–846. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.019>.
- [106] N. Devi, D. Hazarika, C. Deka, D.K. Kakati, Study of Complex Coacervation of Gelatin A and Sodium Alginate for Microencapsulation of Olive Oil, *J. Macromol. Sci.* (2012). <https://www-tandfonline-com.bases-doc.univ-lorraine.fr/doi/full/10.1080/10601325.2012.722854> (accessed May 28, 2019).
- [107] H. Espinosa-Andrews, K.E. Enríquez-Ramírez, E. García-Márquez, C. Ramírez-Santiago, C. Lobato-Calleros, J. Vernon-Carter, Interrelationship between the zeta potential and viscoelastic properties in coacervates complexes, *Carbohydr. Polym.* 95 (2013) 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.053>.
- [108] A.K. Stone, L. Cheung, C. Chang, M.T. Nickerson, Formation and functionality of soluble and insoluble electrostatic complexes within mixtures of canola protein isolate and ( $\kappa$ -,  $\iota$ - and  $\lambda$ -type) carrageenan, *Food Res. Int.* 54 (2013) 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.009>.
- [109] S.M.H. Hosseini, Z. Emam-Djomeh, S.H. Razavi, A.A. Moosavi-Movahedi, A.A. Saboury, M.A. Mohammadifar, A. Farahnaky, M.S. Atri, P. Van der Meeren, Complex coacervation of  $\beta$ -lactoglobulin –  $\kappa$ -Carrageenan aqueous mixtures as affected by polysaccharide sonication, *Food Chem.* 141 (2013) 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.090>.
- [110] M.S.M. Wee, S. Nurhazwani, K.W.J. Tan, K.K.T. Goh, I.M. Sims, L. Matia-Merino, Complex coacervation of an arabinogalactan-protein extracted from the *Meryta sinclairii* tree (puka gum) and whey protein isolate, *Food Hydrocoll.* 42 (2014) 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.03.005>.
- [111] P. Kaushik, K. Dowling, C.J. Barrow, B. Adhikari, Complex coacervation between flaxseed protein isolate and flaxseed gum, *Food Res. Int.* 72 (2015) 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.046>.
- [112] F. Niu, Y. Dong, F. Shen, J. Wang, Y. Liu, Y. Su, R. Xu, J. Wang, Y. Yang, Phase separation behavior and structural analysis of ovalbumin–gum arabic complex coacervation, *Food Hydrocoll.* 43 (2015) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.009>.
- [113] E. da S. Gulao, C.J.F. de Souza, C.T. Andrade, E.E. Garcia-Rojas, Complex coacervates obtained from peptide leucine and gum arabic: Formation and characterization, *Food Chem.* 194 (2016) 680–686. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.062>.
- [114] P.G. Chang, R. Gupta, Y.P. Timilsena, B. Adhikari, Optimisation of the complex coacervation between canola protein isolate and chitosan, *J. Food Eng.* 191 (2016) 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.07.008>.

- [115] Y.-L. Du, G.-Q. Huang, H.-O. Wang, J.-X. Xiao, Effect of high coacervation temperature on the physicochemical properties of resultant microcapsules through induction of Maillard reaction between soybean protein isolate and chitosan, *J. Food Eng.* 234 (2018) 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.020>.
- [116] O. Karabiyik Acar, A.B. Kayitmazer, G. Torun Kose, Hyaluronic Acid/Chitosan Coacervate-Based Scaffolds, *Biomacromolecules*. 19 (2018) 1198–1211. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00047>.
- [117] Y. Li, X. Zhang, N. Sun, Y. Wang, S. Lin, Formation and evaluation of casein-gum arabic coacervates via pH-dependent complexation using fast acidification, *Int. J. Biol. Macromol.* 120 (2018) 783–788. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.145>.
- [118] L. Stounbjerg, C. Vestergaard, B. Andreasen, R. Ipsen, Associative phase separation of potato protein and anionic polysaccharides, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 566 (2019) 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.01.012>.
- [119] T. Moschakis, C.G. Biliaderis, Biopolymer-based coacervates: Structures, functionality and applications in food products, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 28 (2017) 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.03.006>.
- [120] D. Priftis, K. Megley, N. Laugel, M. Tirrell, Complex coacervation of poly(ethyleneimine)/polypeptide aqueous solutions: Thermodynamic and rheological characterization, *J. Colloid Interface Sci.* 398 (2013) 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.01.055>.
- [121] Weinbreck, R.H.W. Wientjes, H. Nieuwenhuijse, G.W. Robijn, C.G. de Kruif, Rheological properties of whey protein/gum arabic coacervates, *J. Rheol.* 48 (2004) 1215–1228. <https://doi.org/10.1122/1.1795191>.
- [122] A. Momeni, M.J. Filiaggi, Rheology of polyphosphate coacervates, *J. Rheol.* 60 (2015) 25–34. <https://doi.org/10.1122/1.4935127>.
- [123] L. Bosnea, T. Moschakis, C. Biliaderis, Complex Coacervation as a Novel Microencapsulation Technique to Improve Viability of Probiotics Under Different Stresses, *Food Bioprocess Technol.* 7 (2014) 2767–2781. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1317-7>.
- [124] M.A. Augustin, L. Sanguansri, O. Bode, Maillard Reaction Products as Encapsulants for Fish Oil Powders, *J. Food Sci.* 71 (2006) E25–E32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb08893.x>.
- [125] Huang, X.-N. Han, J.-X. Xiao, L.-Y. Cheng, Effects of coacervation acidity on the genipin crosslinking action and intestine-targeted delivery potency of the O-carboxymethyl chitosan–gum arabic coacervates, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 66 (2017) 89–96. <https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1190924>.
- [126] W.M. Aumiller, C.D. Keating, Experimental models for dynamic compartmentalization of biomolecules in liquid organelles: Reversible formation and partitioning in aqueous biphasic systems, *Adv. Colloid Interface Sci.* 239 (2017) 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.06.011>.
- [127] N. Eghbal, R. Choudhary, Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems, *LWT*. 90 (2018) 254–264. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.036>.
- [128] Li, Y. Wang, Y. Pei, W. Xiong, C. Zhang, W. Xu, S. Liu, B. Li, Curcumin encapsulated in the complex of lysozyme/carboxymethylcellulose and implications for the antioxidant activity of curcumin, *Food Res. Int.* 75 (2015) 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.058>.
- [129] D. Eratte, K. Dowling, C.J. Barrow, B.P. Adhikari, In-vitro digestion of probiotic bacteria and omega-3 oil co-microencapsulated in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates, *Food Chem.* 227 (2017) 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.080>.

- [130] J.M. Horn, R.A. Kapelner, A.C. Obermeyer, Macro- and Microphase Separated Protein-Polyelectrolyte Complexes: Design Parameters and Current Progress, *Polymers*. 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/polym11040578>.
- [131] T. Moschakis, B.S. Murray, C.G. Biliaderis, Modifications in stability and structure of whey protein-coated o/w emulsions by interacting chitosan and gum arabic mixed dispersions, *Food Hydrocoll.* 24 (2010) 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.07.001>.
- [132] Z.W. Lim, Y. Ping, A. Miserez, Glucose-Responsive Peptide Coacervates with High Encapsulation Efficiency for Controlled Release of Insulin, *Bioconjug. Chem.* 29 (2018) 2176–2180. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00369>.
- [133] D. Priftis, R. Farina, M. Tirrell, Interfacial Energy of Polypeptide Complex Coacervates Measured via Capillary Adhesion, *Langmuir*. 28 (2012) 8721–8729. <https://doi.org/10.1021/la300769d>.
- [134] K.A. Black, D. Priftis, S.L. Perry, J. Yip, W.Y. Byun, M. Tirrell, Protein Encapsulation via Polypeptide Complex Coacervation, *ACS Macro Lett.* 3 (2014) 1088–1091. <https://doi.org/10.1021/mz500529v>.
- [135] Y. Li, D.J. McClements, Controlling lipid digestion by encapsulation of protein-stabilized lipid droplets within alginate–chitosan complex coacervates, *Food Hydrocoll.* 25 (2011) 1025–1033. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.09.024>.
- [136] T. Wang, N. He, Preparation, characterization and applications of low-molecular-weight alginate –oligochitosan nanocapsules, *Nanoscale*. 2 (2010) 230–239. <https://doi.org/10.1039/B9NR00125E>.
- [137] A.M. Alsharabasy, S.A. Moghannem, W.N. El-Mazny, Physical preparation of alginate/chitosan polyelectrolyte complexes for biomedical applications, *J. Biomater. Appl.* 30 (2016) 1071–1079. <https://doi.org/10.1177/0885328215613886>.
- [138] V.E. Bosio, S. Basu, F. Abdullha, M. Elizabeth Chacon Villalba, J.A. Güida, A. Mukherjee, G.R. Castro, Encapsulation of Congo Red in carboxymethyl guar gum–alginate gel microspheres, *React. Funct. Polym.* 82 (2014) 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2014.06.006>.
- [139] A.-L. Chapeau, G.M. Tavares, P. Hamon, T. Croguennec, D. Poncelet, S. Bouhallab, Spontaneous co-assembly of lactoferrin and  $\beta$ -lactoglobulin as a promising biocarrier for vitamin B9, *Food Hydrocoll.* 57 (2016) 280–290. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.003>.
- [140] S.G. Anema, C.G. (Kees) de Kruif, Complex coacervates of lactotransferrin and  $\beta$ -lactoglobulin, *J. Colloid Interface Sci.* 430 (2014) 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.05.036>.
- [141] M. Anvari, C.-H. Pan, W.-B. Yoon, D. Chung, Characterization of fish gelatin–gum arabic complex coacervates as influenced by phase separation temperature, *Int. J. Biol. Macromol.* 79 (2015) 894–902. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.004>.
- [142] M. Anvari, D. Chung, Dynamic rheological and structural characterization of fish gelatin – Gum arabic coacervate gels cross-linked by tannic acid, *Food Hydrocoll.* 60 (2016) 516–524. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.028>.
- [143] E.A. Ifeduba, C.C. Akoh, Microencapsulation of stearidonic acid soybean oil in Maillard reaction-modified complex coacervates, *Food Chem.* 199 (2016) 524–532. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.011>.
- [144] E. Piacentini, L. Giorno, M.M. Dragosavac, G.T. Vladislavljević, R.G. Holdich, Microencapsulation of oil droplets using cold water fish gelatine/gum arabic complex coacervation by membrane emulsification, *Food Res. Int.* 53 (2013) 362–372. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.012>.
- [145] Z.-Q. Zhang, C.-H. Pan, D. Chung, Tannic acid cross-linked gelatin–gum arabic

- coacervate microspheres for sustained release of allyl isothiocyanate: Characterization and in vitro release study, *Food Res. Int.* 44 (2011) 1000–1007. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.044>.
- [146] J. Quan, S.-M. Kim, C.-H. Pan, D. Chung, Characterization of fucoxanthin-loaded microspheres composed of cetyl palmitate-based solid lipid core and fish gelatin–gum arabic coacervate shell, *Food Res. Int.* 50 (2013) 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.040>.
- [147] G.A. Rocha-Selmi, A.C. Theodoro, M. Thomazini, H.M.A. Bolini, C.S. Favaro-Trindade, Double emulsion stage prior to complex coacervation process for microencapsulation of sweetener sucralose, *J. Food Eng.* 119 (2013) 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.002>.
- [148] Y. Yang, M. Anvari, C.-H. Pan, D. Chung, Characterisation of interactions between fish gelatin and gum arabic in aqueous solutions, *Food Chem.* 135 (2012) 555–561. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.018>.
- [149] Y. Lv, X. Zhang, S. Abbas, E. Karangwa, Simplified optimization for microcapsule preparation by complex coacervation based on the correlation between coacervates and the corresponding microcapsule, *J. Food Eng.* 111 (2012) 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.030>.
- [150] E.A. Ifeduba, C.C. Akoh, Microencapsulation of stearidonic acid soybean oil in complex coacervates modified for enhanced stability, *Food Hydrocoll.* 51 (2015) 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.008>.
- [151] Y. Lv, X. Zhang, H. Zhang, S. Abbas, E. Karangwa, The study of pH-dependent complexation between gelatin and gum arabic by morphology evolution and conformational transition, *Food Hydrocoll.* 30 (2013) 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.06.007>.
- [152] O. Jeon, D.W. Wolfson, E. Alsberg, In-Situ Formation of Growth-Factor-Loaded Coacervate Microparticle-Embedded Hydrogels for Directing Encapsulated Stem Cell Fate, *Adv. Mater.* 27 (2015) 2216–2223. <https://doi.org/10.1002/adma.201405337>.
- [153] N. Devi, T.K. Maji, Genipin crosslinked microcapsules of gelatin A and  $\kappa$ -carrageenan polyelectrolyte complex for encapsulation of Neem (*Azadirachta Indica* A.Juss.) seed oil, *Polym. Bull.* 65 (2010) 347–362. <https://doi.org/10.1007/s00289-010-0246-5>.
- [154] N. Devi, T.K. Maji, Study of Complex Coacervation of Gelatin A with Sodium Carboxymethyl Cellulose: Microencapsulation of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) Seed Oil (NSO), *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 60 (2011) 1091–1105. <https://doi.org/10.1080/00914037.2011.553851>.
- [155] M.Á. Pérez-Limiñana, F.J. Payá-Nohales, F. Arán-Ais, C. Orgilés-Barceló, Effect of the shell-forming polymer ratio on the encapsulation of tea tree oil by complex coacervation as a natural biocide, *J. Microencapsul.* 31 (2014) 176–183. <https://doi.org/10.3109/02652048.2013.824512>.
- [156] H.G.O. Sze, S. Muniyandy, T. Sathasivam, A.K. Veeramachineni, P. Janarthanan, Iron cross-linked carboxymethyl cellulose–gelatin complex coacervate beads for sustained drug delivery, *Chem. Pap.* 70 (2016) 243–252. <https://doi.org/10.1515/chempap-2015-0197>.
- [157] D. Eratte, B. Wang, K. Dowling, C.J. Barrow, B. Adhikari, Survival and fermentation activity of probiotic bacteria and oxidative stability of omega-3 oil in co-microcapsules during storage, *J. Funct. Foods.* 23 (2016) 485–496. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.03.005>.
- [158] D. Eratte, B. Wang, K. Dowling, C. J. Barrow, B. P. Adhikari, Complex coacervation with whey protein isolate and gum arabic for the microencapsulation of omega-3 rich tuna oil, *Food Funct.* 5 (2014) 2743–2750. <https://doi.org/10.1039/C4FO00296B>.

- [159] B. Zeeb, L. Grossmann, J. Weiss, Accessibility of Transglutaminase to Induce Protein Crosslinking in Gelled Food Matrices - Impact of Membrane Structure, *Food Biophys.* 11 (2016) 176–183. <https://doi.org/10.1007/s11483-016-9428-5>.
- [160] G.A. Islan, I.P. de Verti, S.G. Marchetti, G.R. Castro, Studies of Ciprofloxacin Encapsulation on Alginate/Pectin Matrixes and Its Relationship with Biodisponibility, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167 (2012) 1408–1420. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9610-2>.
- [161] A. Jain, D. Thakur, G. Ghoshal, O.P. Katare, U.S. Shivhare, Characterization of microcapsulated  $\beta$ -carotene formed by complex coacervation using casein and gum tragacanth, *Int. J. Biol. Macromol.* 87 (2016) 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.117>.
- [162] T. Koupantsis, E. Pavlidou, A. Paraskevopoulou, Flavour encapsulation in milk proteins – CMC coacervate-type complexes, *Food Hydrocoll.* 37 (2014) 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.031>.
- [163] D. Kurukji, I. Norton, F. Spyropoulos, Fabrication of sub-micron protein-chitosan electrostatic complexes for encapsulation and pH-Modulated delivery of model hydrophilic active compounds, *Food Hydrocoll.* 53 (2016) 249–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.021>.
- [164] C.-C. Chen, S.-T. Chen, J.-F. Hsieh, Proteomic Analysis of Polysaccharide-Milk Protein Interactions Induced by Chitosan, *Molecules.* 20 (2015) 7737–7749. <https://doi.org/10.3390/molecules20057737>.
- [165] F. Tamjidi, A. Nasirpour, M. Shahedi, Mixture Design Approach for Evaluation of Fish Oil Microencapsulation in Gelatin-Acacia Gum Coacervates, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 62 (2013) 444–449. <https://doi.org/10.1080/00914037.2012.719138>.
- [166] F. Tamjidi, A. Nasirpour, M. Shahedi, Rheological Characteristics of Yogurt Enriched with Microencapsulated Fish Oil, *J. Agric. Sci. Technol.* 16 (2014) 1073–1082.
- [167] F. Tamjidi, A. Nasirpour, M. Shahedi, Physicochemical and sensory properties of yogurt enriched with microencapsulated fish oil, *Food Sci. Technol. Int. Cienc. Tecnol. Los Aliment. Int.* 18 (2012) 381–390. <https://doi.org/10.1177/1082013211428212>.
- [168] A. Naik, V. Meda, S.S. Lele, Freeze drying for microencapsulation of  $\alpha$ -linolenic acid rich oil: A functional ingredient from *Lepidium sativum* seeds, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116 (2014) 837–846. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300305>.
- [169] D. Sarkar, Fabrication of an optimized fluorescer encapsulated polymer coated gelatin nanoparticle and study of its retarded release properties, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 252 (2013) 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2012.11.010>.
- [170] N. Shahgholian, G. Rajabzadeh, Fabrication and characterization of curcumin-loaded albumin/gum arabic coacervate, *Food Hydrocoll.* 59 (2016) 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.031>.
- [171] R.T. Thimma, S. Tammishetti, Study of complex coacervation of gelatin with sodium carboxymethyl guar gum: Microencapsulation of clove oil and sulphamethoxazole, *J. Microencapsul.* 20 (2003) 203–210. <https://doi.org/10.3109/02652040309178062>.
- [172] B. Wang, J. Vongsvivut, B. Adhikari, C.J. Barrow, Microencapsulation of tuna oil fortified with the multiple lipophilic ingredients vitamins A, D3, E, K2, curcumin and coenzyme Q10, *J. Funct. Foods.* 19 (2015) 893–901. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.027>.
- [173] B. Wang, B. Adhikari, C.J. Barrow, Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin–sodium hexametaphosphate using complex coacervation, *Food Chem.* 158 (2014) 358–365. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.135>.
- [174] Y.T. Yu, L.N. Liu, X.L. Zhu, X.Z. Kong, Microencapsulation of dodecyl acetate by complex coacervation of whey protein with acacia gum and its release behavior, *Chin.*

- Chem. Lett. 23 (2012) 847–850. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2012.05.006>.
- [175] L. Aberkane, J. Jasniewski, C. Gaiani, R. Hussain, J. Scher, C. Sanchez, Structuration mechanism of  $\beta$ -lactoglobulin – acacia gum assemblies in presence of quercetin, *Food Hydrocoll.* 29 (2012) 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.01.010>.
- [176] G.-Q. Huang, Y.-T. Sun, J.-X. Xiao, J. Yang, Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan, *Food Chem.* 135 (2012) 534–539. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.140>.
- [177] G.Q. Huang, J.X. Xiao, H.W. Qiu, J. Yang, Cross-linking of soybean protein isolate–chitosan coacervate with transglutaminase utilizing capsanthin as the model core, *J. Microencapsul.* 31 (2014) 708–715. <https://doi.org/10.3109/02652048.2014.918665>.
- [178] J.C. Spada, L.D.F. Marczak, I.C. Tessaro, N.S.M. Cardozo, Interactions between soy protein from water-soluble soy extract and polysaccharides in solutions with polydextrose, *Carbohydr. Polym.* 134 (2015) 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.075>.
- [179] C. Thongkaew, M. Gibis, J. Hinrichs, J. Weiss, Polyphenol interactions with whey protein isolate and whey protein isolate–pectin coacervates, *Food Hydrocoll.* 41 (2014) 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.006>.
- [180] C. Thongkaew, M. Gibis, J. Hinrichs, J. Weiss, Shear-induced morphological changes in associative and segregative phase-separated biopolymer systems, *Food Hydrocoll.* 51 (2015) 414–423. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.040>.
- [181] H. Jiang, M. Zhang, S. McKnight, B. Adhikari, Microencapsulation of  $\alpha$ -Amylase by Carrying Out Complex Coacervation and Drying in a Single Step Using a Novel Three-Fluid Nozzle Spray Drying, *Dry. Technol.* 31 (2013) 1901–1910. <https://doi.org/10.1080/07373937.2013.771365>.
- [182] D. Dong, Z. Qi, Y. Hua, Y. Chen, X. Kong, C. Zhang, Microencapsulation of flaxseed oil by soya proteins–gum arabic complex coacervation, *Int. J. Food Sci. Technol.* 50 (2015) 1785–1791. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12812>.
- [183] R.S.H. Lam, M.T. Nickerson, The properties of whey protein–carrageenan mixtures during the formation of electrostatic coupled biopolymer and emulsion gels, *Food Res. Int.* 66 (2014) 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.006>.
- [184] L. Hernández-Rodríguez, C. Lobato-Calleros, D.J. Pimentel-González, E.J. Vernon-Carter, *Lactobacillus plantarum* protection by entrapment in whey protein isolate:  $\kappa$ -carrageenan complex coacervates, *Food Hydrocoll.* 36 (2014) 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.09.018>.
- [185] M.K. Kang, J. Dai, J.-C. Kim, Ethylcellulose microparticles containing chitosan and gelatin: pH-dependent release caused by complex coacervation, *J. Ind. Eng. Chem.* 18 (2012) 355–359. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2011.11.099>.
- [186] V. Lauth, M. Maas, K. Rezwani, Coacervate-directed synthesis of CaCO<sub>3</sub> microcarriers for pH-responsive delivery of biomolecules, *J. Mater. Chem. B.* 2 (2014) 7725–7731. <https://doi.org/10.1039/C4TB01213E>.
- [187] D. Vehlow, R. Schmidt, A. Gebert, M. Siebert, K.S. Lips, M. Müller, Polyelectrolyte Complex Based Interfacial Drug Delivery System with Controlled Loading and Improved Release Performance for Bone Therapeutics, *Nanomaterials.* 6 (2016) 53. <https://doi.org/10.3390/nano6030053>.
- [188] J. Gomez-Estaca, T.A. Comunian, P. Montero, R. Ferro-Furtado, C.S. Favaro-Trindade, Encapsulation of an astaxanthin-containing lipid extract from shrimp waste by complex coacervation using a novel gelatin-cashew gum complex, *FOOD Hydrocoll.* 61 (2016) 155.
- [189] M. Calderón-Oliver, R. Pedroza-Islas, H.B. Escalona-Buendía, J. Pedraza-Chaverri, E. Ponce-Alquicira, Comparative study of the microencapsulation by complex coacervation

- of nisin in combination with an avocado antioxidant extract, *Food Hydrocoll.* 62 (2017) 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.028>.
- [190] G.-Q. Huang, L.-N. Liu, X.-N. Han, J.-X. Xiao, Intestine-targeted delivery potency of the O-carboxymethyl chitosan–gum Arabic coacervate: Effects of coacervation acidity and possible mechanism, *Mater. Sci. Eng. C* 79 (2017) 423–429. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.074>.
- [191] L. Tavares, C.P. Zapata Noreña, Encapsulation of garlic extract using complex coacervation with whey protein isolate and chitosan as wall materials followed by spray drying, *Food Hydrocoll.* 89 (2019) 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.052>.
- [192] B. Muhoza, S. Xia, J. Cai, X. Zhang, E. Duhoranimana, J. Su, Gelatin and pectin complex coacervates as carriers for cinnamaldehyde: Effect of pectin esterification degree on coacervate formation, and enhanced thermal stability, *Food Hydrocoll.* 87 (2019) 712–722. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.051>.
- [193] H.-C. Lau, S. Jeong, A. Kim, Gelatin-alginate coacervates for circumventing proteolysis and probing intermolecular interactions by SPR, *Int. J. Biol. Macromol.* 117 (2018) 427–434. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.093>.
- [194] P.L. Dubin, J. Gao, K. Mattison, Protein Purification by Selective Phase Separation with Polyelectrolytes, *Sep. Purif. Methods* 23 (1994) 1–16. <https://doi.org/10.1080/03602549408001288>.
- [195] Y. Xu, M. Mazzawi, K. Chen, L. Sun, P.L. Dubin, Protein purification by polyelectrolyte coacervation: influence of protein charge anisotropy on selectivity, *Biomacromolecules* 12 (2011) 1512–1522. <https://doi.org/10.1021/bm101465y>.
- [196] V. Boeris, D. Romanini, B. Farruggia, G. Picó, Purification of chymotrypsin from bovine pancreas using precipitation with a strong anionic polyelectrolyte, *Process Biochem.* 44 (2009) 588–592. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.02.009>.
- [197] J. Pathak, K. Rawat, V. K. Aswal, H. B. Bohidar, Interactions in globular proteins with polyampholyte: coacervation route for protein separation, *RSC Adv.* 5 (2015) 13579–13589. <https://doi.org/10.1039/C4RA13133A>.
- [198] A.I. Oparin, K.L. Gladilin, Evolution of self-assembly of probiotics, *Biosystems* 12 (1980) 133–145. [https://doi.org/10.1016/0303-2647\(80\)90011-8](https://doi.org/10.1016/0303-2647(80)90011-8).
- [199] V.J.A. Novak, Present state of the coacervate-in-coacervate theory; Origin and evolution of cell structure, *Orig. Life* 14 (1984) 513–522. <https://doi.org/10.1007/BF00933699>.
- [200] L. Bosnea, T. Moschakis, C.G. Biliaderis, Microencapsulated cells of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in biopolymer complex coacervates and their function in a yogurt matrix, *Food Funct.* 8 (2017) 554–562. <https://doi.org/10.1039/c6fo01019a>.
- [201] C.J.F. Souza, E.E. Garcia-Rojas, Effects of salt and protein concentrations on the association and dissociation of ovalbumin-pectin complexes, *Food Hydrocoll.* 47 (2015) 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.010>.
- [202] T.J. Nott, T.D. Craggs, A.J. Baldwin, Membraneless organelles can melt nucleic acid duplexes and act as biomolecular filters, *Nat. Chem.* 8 (2016) 569–575. <https://doi.org/10.1038/nchem.2519>.
- [203] M. Fathi, Á. Martín, D.J. McClements, Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems, *Trends Food Sci. Technol.* 39 (2014) 18–39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.06.007>.
- [204] C. Shi, Y. Zhu, X. Ran, M. Wang, Y. Su, T. Cheng, Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine<sup>1</sup> This work was supported by “973” programs on severe trauma (NO. 1999054205 and NO. 2005CB522605) from the Ministry of Science and Technology of China., *J. Surg. Res.* 133 (2006) 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2005.12.013>.

- [205] Aljawish, I. Chevalot, B. Piffaut, C. Rondeau-Mouro, M. Girardin, J. Jasniewski, J. Scher, L. Muniglia, Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.016>.
- [206] A. Muxika, A. Etxabide, J. Uranga, P. Guerrero, K. de la Caba, Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 105 (2017) 1358–1368. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>.
- [207] L. Bedian, A.M. Villalba-Rodríguez, G. Hernández-Vargas, R. Parra-Saldivar, H.M.N. Iqbal, Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications – A review, *Int. J. Biol. Macromol.* 98 (2017) 837–846. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.048>.
- [208] N. Sayari, A. Sila, B.E. Abdelmalek, R.B. Abdallah, S. Ellouz-Chaabouni, A. Bougatef, R. Balti, Chitin and chitosan from the Norway lobster by-products: Antimicrobial and anti-proliferative activities, *Int. J. Biol. Macromol.* 87 (2016) 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.057>.
- [209] A. Verlee, S. Mincke, C.V. Stevens, Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives, *Carbohydr. Polym.* 164 (2017) 268–283. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>.
- [210] K.L.B. Chang, G. Tsai, J. Lee, W.-R. Fu, Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution, *Carbohydr. Res.* 303 (1997) 327–332. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)00179-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00179-1).
- [211] J. Lizardi-Mendoza, W.M. Argüelles Monal, F.M. Goycoolea Valencia, Chapter 1 - Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan, in: S. Bautista-Baños, G. Romanazzi, A. Jiménez-Aparicio (Eds.), *Chitosan Preserv. Agric. Commod.*, Academic Press, San Diego, 2016: pp. 3–31. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012802735600001X>.
- [212] P. Cazón, G. Velazquez, J.A. Ramírez, M. Vázquez, Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review, *Food Hydrocoll.* 68 (2017) 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.009>.
- [213] A. Aljawish, Fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques: évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères, Université de Lorraine, 2013. [http://docnum.univ-lorraine.fr/public/DDOC\\_T\\_2013\\_0089\\_ALJAWISH.pdf](http://docnum.univ-lorraine.fr/public/DDOC_T_2013_0089_ALJAWISH.pdf) (accessed October 17, 2016).
- [214] Q. Gan, T. Wang, Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 59 (2007) 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.04.009>.
- [215] Y. Yuan, Z.-L. Wan, X.-Q. Yang, S.-W. Yin, Associative interactions between chitosan and soy protein fractions: Effects of pH, mixing ratio, heat treatment and ionic strength, *Food Res. Int.* 55 (2014) 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.016>.
- [216] S. Al-Qadi, A. Grenha, D. Carrión-Recio, B. Seijo, C. Remuñán-López, Microencapsulated chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery: In vivo evaluation of insulin-loaded formulations, *J. Controlled Release.* 157 (2012) 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.008>.
- [217] J.-H. Pa, T.L. Yu, Light Scattering Study of Chitosan in Acetic Acid Aqueous Solutions, *Macromol. Chem. Phys.* 202 (2001) 985–991. [https://doi.org/10.1002/1521-3935\(20010401\)202:7<985::AID-MACP985>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1521-3935(20010401)202:7<985::AID-MACP985>3.0.CO;2-2).
- [218] M. Rinaudo, Chitin and chitosan: Properties and applications, *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>.
- [219] K. Ogawa, T. Yui, K. Okuyama, Three D structures of chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.* 34 (2004) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2003.11.002>.



- [220] K. Kurita, Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans, *Mar. Biotechnol.* 8 (2006) 203. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-0097-5>.
- [221] J. Kawada, T. Yui, K. Okuyama, K. Ogawa, Crystalline Behavior of Chitosan Organic Acid Salts, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (2001) 2542–2547. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.2542>.
- [222] Y. Dong, Y. Ruan, H. Wang, Y. Zhao, D. Bi, Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques, *J. Appl. Polym. Sci.* 93 (2004) 1553–1558. <https://doi.org/10.1002/app.20630>.
- [223] I. Aranaz, M. Mengibar, R. Harris, B. Miralles, N. Acosta, L. Calderon, A. Sanchez, A. Heras, Role of Physicochemical Properties of Chitin and Chitosan on their Functionality, (2014). <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/ccb/2014/00000008/00000001/art00004> (accessed June 17, 2019).
- [224] W. Pasanphan, G.R. Buettner, S. Chirachanchai, Chitosan gallate as a novel potential polysaccharide antioxidant: an EPR study, *Carbohydr. Res.* 345 (2010) 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.09.038>.
- [225] C.K.S. Pillai, W. Paul, C.P. Sharma, Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation, *Prog. Polym. Sci.* 34 (2009) 641–678. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>.
- [226] P. Sacco, F. Furlani, G. De Marzo, E. Marsich, S. Paoletti, I. Donati, Concepts for Developing Physical Gels of Chitosan and of Chitosan Derivatives, *Gels* 4 (2018) 67. <https://doi.org/10.3390/gels4030067>.
- [227] T.T. Khong, O.A. Aarstad, G. Skjåk-Bræk, K.I. Draget, K.M. Vårum, Gelling Concept Combining Chitosan and Alginate—Proof of Principle, *Biomacromolecules* 14 (2013) 2765–2771. <https://doi.org/10.1021/bm400610b>.
- [228] T. Sannan, K. Kurita, Y. Iwakura, Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility, *Makromol. Chem.* 177 (1976) 3589–3600. <https://doi.org/10.1002/macp.1976.021771210>.
- [229] K.M. Varum, M.H. Ottoy, O. Smidsrod, Water-solubility of partially N-acetylated chitosans as a function of pH: effect of chemical composition and depolymerisation, *Carbohydr. Polym.* (1994). <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301512384> (accessed September 20, 2019).
- [230] I. Leceta, P. Guerrero, I. Ibarburu, M.T. Dueñas, K. de la Caba, Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films, *J. Food Eng.* 116 (2013) 889–899. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.022>.
- [231] I. Leceta, S. Molinaro, P. Guerrero, J.P. Kerry, K. de la Caba, Quality attributes of map packaged ready-to-eat baby carrots by using chitosan-based coatings, *Postharvest Biol. Technol.* 100 (2015) 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.09.022>.
- [232] L. Rui, M. Xie, B. Hu, L. Zhou, M. Saeeduddin, X. Zeng, Enhanced solubility and antioxidant activity of chlorogenic acid-chitosan conjugates due to the conjugation of chitosan with chlorogenic acid, *Carbohydr. Polym.* 170 (2017) 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.076>.
- [233] Z. Wei, Y. Gao, Evaluation of structural and functional properties of chitosan-chlorogenic acid complexes, *Int. J. Biol. Macromol.* 86 (2016) 376–382. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.084>.
- [234] M. Yildirim-Aksoy, B.H. Beck, Antimicrobial activity of chitosan and a chitosan oligomer against bacterial pathogens of warmwater fish, *J. Appl. Microbiol.* 122 (2017) 1570–1578. <https://doi.org/10.1111/jam.13460>.
- [235] G.S. Shaw, P.M. Pandey, Y. Yogalakshmi, I. Banerjee, S.M. Al-Zahrani, A. Anis, K. Pal, Synthesis and Assessment of Novel Gelatin-Chitosan Lactate Cohydrogels for

- Controlled Delivery and Tissue Engineering Applications, *Polym.-Plast. Technol. Eng.* 56 (2017) 1457–1467. <https://doi.org/10.1080/03602559.2016.1276595>.
- [236] M. Rinaudc, G. Pavlov, J. Desbrières, Solubilization of Chitosan in Strong Acid Medium, *Int. J. Polym. Anal. Charact.* 5 (1999) 267–276. <https://doi.org/10.1080/10236669908009742>.
- [237] M. Rinaudo, G. Pavlov, J. Desbrières, Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan, *Polymer.* 40 (1999) 7029–7032. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00056-7](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00056-7).
- [238] W. Fan, W. Yan, Z. Xu, H. Ni, Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 90 (2012) 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.042>.
- [239] R.H. Chen, M.L. Tsaih, Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosans in dilute HCl solution, *Int. J. Biol. Macromol.* 23 (1998) 135–141. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(98\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00036-1).
- [240] D. Filion, M. Lavertu, M. D. Buschmann, Ionization and Solubility of Chitosan Solutions Related to Thermosensitive Chitosan/Glycerol-Phosphate Systems, *Biomacromolecules.* 8 (2007) 3224–3234. <https://doi.org/10.1021/bm700520m>.
- [241] F.P. Ramanery, A.A. Mansur, H.S. Mansur, One-step colloidal synthesis of biocompatible water-soluble ZnS quantum dot/chitosan nanoconjugates, *Nanoscale Res. Lett.* 8 (2013) 512. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-512>.
- [242] J. Desbrieres, Viscosity of Semiflexible Chitosan Solutions: Influence of Concentration, Temperature, and Role of Intermolecular Interactions, *Biomacromolecules.* 3 (2002) 342–349. <https://doi.org/10.1021/bm010151+>.
- [243] Q. Li, B. Song, Z. Yang, H. Fan, Electrolytic conductivity behaviors and solution conformations of chitosan in different acid solutions, *Carbohydr. Polym.* 63 (2006) 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.09.024>.
- [244] D. Paneva, R. Mincheva, O. Stoilova, N. Manolova, I. Rashkov, Degradation of chitosan in the presence of poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid) by a crude enzyme complex from *Trichoderma viride*, *E-Polym.* 3 (2003). <https://doi.org/10.1515/epoly.2003.3.1.240>.
- [245] E.A. El-Hefian, M.M. Nasef, A.H. Yahaya, R.A. Khan, Preparation and characterization of chitosan/agar blends: rheological and thermal studies, *J. Chil. Chem. Soc.* 55 (2010) 130–136. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072010000100031>.
- [246] M. Hamdi, R. Nasri, S. Hajji, M. Nigen, S. Li, M. Nasri, Acetylation degree, a key parameter modulating chitosan rheological, thermal and film-forming properties, *Food Hydrocoll.* 87 (2019) 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.027>.
- [247] B. Liu, D. Wang, G. Yu, X. Meng, Adsorption of heavy metal ions, dyes and proteins by chitosan composites and derivatives — A review, *J. Ocean Univ. China.* 12 (2013) 500–508. <https://doi.org/10.1007/s11802-013-2113-0>.
- [248] F. Renault, B. Sancey, P.-M. Badot, G. Crini, Chitosan for coagulation/flocculation processes – An eco-friendly approach, *Eur. Polym. J.* 45 (2009) 1337–1348. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.12.027>.
- [249] C. Shi, Y. Zhu, X. Ran, M. Wang, Y. Su, T. Cheng, Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine<sup>1</sup> This work was supported by “973” programs on severe trauma (NO. 1999054205 and NO. 2005CB522605) from the Ministry of Science and Technology of China., *J. Surg. Res.* 133 (2006) 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2005.12.013>.
- [250] F. Shahidi, R. Abuzaytoun, Chitin, Chitosan, and Co-Products: Chemistry, Production, Applications, and Health Effects, in: *Adv. Food Nutr. Res.*, Academic Press, 2005: pp. 93–135. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043452605490038>.

- [251] J. Vinsova, E. Vavrikova, Chitosan Derivatives with Antimicrobial, Antitumour and Antioxidant Activities - a Review, (2011). <https://www-ingentaconnect-com.bases-doc.univ-lorraine.fr/content/ben/cpd/2011/00000017/00000032/art00010> (accessed June 17, 2019).
- [252] A. Bacon, J. Makin, P.J. Sizer, I. Jabbal-Gill, M. Hinchcliffe, L. Illum, S. Chatfield, M. Roberts, Carbohydrate Biopolymers Enhance Antibody Responses to Mucosally Delivered Vaccine Antigens, *Infect. Immun.* 68 (2000) 5764–5770. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.10.5764-5770.2000>.
- [253] I. Kardas, M.H. Struszczyk, M. Kucharska, L.A.M. van den Broek, J.E.G. van Dam, D. Ciechańska, Chitin and Chitosan as Functional Biopolymers for Industrial Applications, in: P. Navard (Ed.), *Eur. Polysacch. Netw. Excell. EPNOE Res. Initiat. Results*, Springer Vienna, Vienna, 2012: pp. 329–373. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0421-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0421-7_11).
- [254] S. Şenel, S.J. McClure, Potential applications of chitosan in veterinary medicine, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 1467–1480. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.02.007>.
- [255] R. Jayakumar, D. Menon, K. Manzoor, S.V. Nair, H. Tamura, Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review, *Carbohydr. Polym.* 82 (2010) 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.074>.
- [256] S.-K. Kim, E. Mendis, Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review, *Food Res. Int.* 39 (2006) 383–393. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.10.010>.
- [257] H. Zhang, S.H. Neau, In vitro degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents, *Biomaterials.* 23 (2002) 2761–2766. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00011-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00011-X).
- [258] M.N.V.R. Kumar, R.A.A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa, A.J. Domb, Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives, *Chem. Rev.* 104 (2004) 6017–6084. <https://doi.org/10.1021/cr030441b>.
- [259] T. Kean, M. Thanou, Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.004>.
- [260] G. Molinaro, J.-C. Leroux, J. Damas, A. Adam, Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels: an in vivo experimental approach to injectable biomaterials, *Biomaterials.* 23 (2002) 2717–2722. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00004-2).
- [261] K.W. Kim, R.L. Thomas, Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights, *Food Chem.* 101 (2007) 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.038>.
- [262] M.A. Awad, A.D. Al-Qurashi, S.A. Mohamed, R.M. El-Shishtawy, M.A. Ali, Postharvest chitosan, gallic acid and chitosan gallate treatments effects on shelf life quality, antioxidant compounds, free radical scavenging capacity and enzymes activities of “Sukkari” bananas, *J. Food Sci. Technol.* 54 (2017) 447–457. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2481-8>.
- [263] W. Kaminski, E. Tomczak, K. Jaros, Interactions of metal ions sorbed on chitosan beads, *Desalination.* 218 (2008) 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.02.023>.
- [264] P. Wydro, B. Krajewska, K. Hąc-Wydro, Chitosan as a Lipid Binder: A Langmuir Monolayer Study of Chitosan–Lipid Interactions, *Biomacromolecules.* 8 (2007) 2611–2617. <https://doi.org/10.1021/bm700453x>.
- [265] S.R. Kanatt, R. Chander, A. Sharma, Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products, *Food Chem.* 107 (2008) 845–852. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.088>.
- [266] R.A.A. Muzzarelli, Chitosan-based dietary foods, *Carbohydr. Polym.* 29 (1996) 309–316. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(96\)00033-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(96)00033-1).
- [267] M. Kaya, P. Ravikumar, S. Ilk, M. Mujtaba, L. Akyuz, J. Labidi, A.M. Salaberria, Y.S.

- Cakmak, S.K. Erkul, Production and characterization of chitosan based edible films from *Berberis crataegina*'s fruit extract and seed oil, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 45 (2018) 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.11.013>.
- [268] L. Sun, J. Sun, L. Chen, P. Niu, X. Yang, Y. Guo, Preparation and characterization of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols as an active packaging material, *Carbohydr. Polym.* 163 (2017) 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.016>.
- [269] X. Zhang, G. Xiao, Y. Wang, Y. Zhao, H. Su, T. Tan, Preparation of chitosan-TiO<sub>2</sub> composite film with efficient antimicrobial activities under visible light for food packaging applications, *Carbohydr. Polym.* 169 (2017) 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.073>.
- [270] V. Ambrogi, D. Pietrella, M. Nocchetti, S. Casagrande, V. Moretti, S. De Marco, M. Ricci, Montmorillonite–chitosan–chlorhexidine composite films with antibiofilm activity and improved cytotoxicity for wound dressing, *J. Colloid Interface Sci.* 491 (2017) 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.12.058>.
- [271] D.D. Gallaher, C.M. Gallaher, G.J. Mahrt, T.P. Carr, C.H. Hollingshead, R.H. Jr, J. Wise, A Glucomannan and Chitosan Fiber Supplement Decreases Plasma Cholesterol and Increases Cholesterol Excretion in Overweight Normocholesterolemic Humans, *J. Am. Coll. Nutr.* 21 (2002) 428–433. <https://doi.org/10.1080/07315724.2002.10719246>.
- [272] M. Kong, X.G. Chen, K. Xing, H.J. Park, Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review, *Int. J. Food Microbiol.* 144 (2010) 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>.
- [273] A. Peña, N.S. Sánchez, M. Calahorra, Effects of Chitosan on *Candida albicans*: Conditions for Its Antifungal Activity, *BioMed Res. Int.* (2013). <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/527549/> (accessed June 18, 2019).
- [274] I. Bravo-Osuna, G. Millotti, C. Vauthier, G. Ponchel, In vitro evaluation of calcium binding capacity of chitosan and thiolated chitosan poly(isobutyl cyanoacrylate) core–shell nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 338 (2007) 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.01.039>.
- [275] F.-H. Liao, M.-J. Shieh, N.-C. Chang, Y.-W. Chien, Chitosan supplementation lowers serum lipids and maintains normal calcium, magnesium, and iron status in hyperlipidemic patients, *Nutr. Res.* 27 (2007) 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2007.01.009>.
- [276] E. Talón, K.T. Trifkovic, V.A. Nedovic, B.M. Bugarski, M. Vargas, A. Chiralt, C. González-Martínez, Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts, *Carbohydr. Polym.* 157 (2017) 1153–1161. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.080>.
- [277] J.-X. Xiao, L.-H. Wang, T.-C. Xu, G.-Q. Huang, Complex coacervation of carboxymethyl konjac glucomannan and chitosan and coacervate characterization, *Int. J. Biol. Macromol.* 123 (2019) 436–445. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.086>.
- [278] C.-Y. Chen, Y.-C. Chung, Antibacterial effect of water-soluble chitosan on representative dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli brevis*, *J. Appl. Oral Sci. Rev. FOB.* 20 (2012) 620–627. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572012000600006>.
- [279] J.H. Park, G. Saravanakumar, K. Kim, I.C. Kwon, Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.10.003>.
- [280] A. Anitha, S. Sowmya, P.T.S. Kumar, S. Deepthi, K.P. Chennazhi, H. Ehrlich, M. Tsurkan, R. Jayakumar, Chitin and chitosan in selected biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* 39 (2014) 1644–1667. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.02.008>.

- [281] L. Bugnicourt, C. Ladavière, Interests of chitosan nanoparticles ionically cross-linked with tripolyphosphate for biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* 60 (2016) 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2016.06.002>.
- [282] E. Vunain, A.K. Mishra, B.B. Mamba, 1 - Fundamentals of chitosan for biomedical applications, in: J.A. Jennings, J.D. Bumgardner (Eds.), *Chitosan Based Biomater.* Vol. 1, Woodhead Publishing, 2017: pp. 3–30. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081002308000017>.
- [283] H. Hamedi, S. Moradi, S.M. Hudson, A.E. Tonelli, Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review, *Carbohydr. Polym.* 199 (2018) 445–460. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.114>.
- [284] A.K. Azad, N. Sermsintham, S. Chandkrachang, W.F. Stevens, Chitosan membrane as a wound-healing dressing: Characterization and clinical application, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 69B (2004) 216–222. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30000>.
- [285] S. Ruiz, J.A. Tamayo, J. Delgado Ospina, D.P. Navia Porras, M.E. Valencia Zapata, J.H. Mina Hernandez, C.H. Valencia, F. Zuluaga, C.D. Grande Tovar, Antimicrobial Films Based on Nanocomposites of Chitosan/Poly(vinyl alcohol)/Graphene Oxide for Biomedical Applications, *Biomolecules.* 9 (2019) 109. <https://doi.org/10.3390/biom9030109>.
- [286] C. López-Iglesias, J. Barros, I. Ardao, F.J. Monteiro, C. Alvarez-Lorenzo, J.L. Gómez-Amoza, C.A. García-González, Vancomycin-loaded chitosan aerogel particles for chronic wound applications, *Carbohydr. Polym.* 204 (2019) 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.012>.
- [287] C.E. Orrego, N. Salgado, J.S. Valencia, G.I. Giraldo, O.H. Giraldo, C.A. Cardona, Novel chitosan membranes as support for lipases immobilization: Characterization aspects, *Carbohydr. Polym.* 79 (2010) 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.06.015>.
- [288] C. Clasen, T. Wilhelms, W.-M. Kulicke, Formation and Characterization of Chitosan Membranes, *Biomacromolecules.* 7 (2006) 3210–3222. <https://doi.org/10.1021/bm060486x>.
- [289] M.A. Badawi, N.A. Negm, M.T.H. Abou Kana, H.H. Hefni, M.M. Abdel Moneem, Adsorption of aluminum and lead from wastewater by chitosan-tannic acid modified biopolymers: Isotherms, kinetics, thermodynamics and process mechanism, *Int. J. Biol. Macromol.* 99 (2017) 465–476. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.003>.
- [290] E.-G. Lizárraga-Paulín, S.-P. Miranda-Castro, E. Moreno-Martínez, A.-V. Lara-Sagahón, I. Torres-Pacheco, Maize seed coatings and seedling sprayings with chitosan and hydrogen peroxide: their influence on some phenological and biochemical behaviors, *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 14 (2013) 87–96. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1200270>.
- [291] A. El Hadrami, L.R. Adam, I. El Hadrami, F. Daayf, Chitosan in Plant Protection, *Mar. Drugs.* 8 (2010) 968–987. <https://doi.org/10.3390/md8040968>.
- [292] E.M.S. Azzam, G. Eshaq, A.M. Rabie, A.A. Bakr, A.A. Abd-Elaal, A.E. El Metwally, S.M. Tawfik, Preparation and characterization of chitosan-clay nanocomposites for the removal of Cu(II) from aqueous solution, *Int. J. Biol. Macromol.* 89 (2016) 507–517. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.004>.
- [293] P.L. Kashyap, X. Xiang, P. Heiden, Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture, *Int. J. Biol. Macromol.* 77 (2015) 36–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.039>.
- [294] V. Dodane, V.D. Vilivalam, Pharmaceutical applications of chitosan, *Pharm. Sci. Technol. Today.* 1 (1998) 246–253. [https://doi.org/10.1016/S1461-5347\(98\)00059-5](https://doi.org/10.1016/S1461-5347(98)00059-5).
- [295] R. Morsy, S.S. Ali, M. El-Shetehy, Development of hydroxyapatite-chitosan gel sunscreen combating clinical multidrug-resistant bacteria, *J. Mol. Struct.* 1143 (2017) 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.04.090>.

- [296] C. Corinaldesi, G. Barone, F. Marcellini, A. Dell'Anno, R. Danovaro, Marine Microbial-Derived Molecules and Their Potential Use in Cosmeceutical and Cosmetic Products, *Mar. Drugs*. 15 (2017) 118. <https://doi.org/10.3390/md15040118>.
- [297] C. Chaouat, S. Balayssac, M. Malet-Martino, F. Belaubre, E. Questel, A.M. Schmitt, S. Poigny, S. Franceschi, E. Perez, Green microparticles based on a chitosan/lactobionic acid/linoleic acid association. Characterisation and evaluation as a new carrier system for cosmetics, *J. Microencapsul.* 34 (2017) 162–170. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1311956>.
- [298] K. Khwaldia, A.H. Basta, H. Aloui, H. El-Saied, Chitosan–caseinate bilayer coatings for paper packaging materials, *Carbohydr. Polym.* 99 (2014) 508–516. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.086>.
- [299] Shahid-ul-Islam, M. Shahid, F. Mohammad, Green Chemistry Approaches to Develop Antimicrobial Textiles Based on Sustainable Biopolymers—A Review, *Ind. Eng. Chem. Res.* 52 (2013) 5245–5260. <https://doi.org/10.1021/ie303627x>.
- [300] S. Chandrasekar, S. Vijayakumar, R. Rajendran, Application of chitosan and herbal nanocomposites to develop antibacterial medical textile, *Biomed. Aging Pathol.* 4 (2014) 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.biomag.2013.10.007>.
- [301] A.H.M. Resende, J.M. Farias, D.D.B. Silva, R.D. Rufino, J.M. Luna, T.C.M. Stamford, L.A. Sarubbo, Application of biosurfactants and chitosan in toothpaste formulation, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 181 (2019) 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.05.032>.
- [302] A. Nussinovitch, Exudate gums, in: A. Nussinovitch (Ed.), *Hydrocolloid Appl. Gum Technol. Food Ind.*, Springer US, Boston, MA, 1997: pp. 125–139.
- [303] O.H.M. Idris, P.A. Williams, G.O. Phillips, Characterisation of gum from Acacia senegal trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography, *Food Hydrocoll.* 12 (1998) 379–388. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(98\)00058-7](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(98)00058-7).
- [304] B.F. McNamee, E.D. O'Riorda, M. O'Sullivan, Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 4551–4555. <https://doi.org/10.1021/jf9803740>.
- [305] S.A. Buckley, K.A. Clark, R.P. Evershed, Complex organic chemical balms of Pharaonic animal mummies, *Nature*. 431 (2004) 294. <https://doi.org/10.1038/nature02849>.
- [306] V. Daniels, R. Stacey, A. Middleton, The Blackening of Paint Containing Egyptian Blue, *Stud. Conserv.* 49 (2004) 217–230. <https://doi.org/10.1179/sic.2004.49.4.217>.
- [307] R.M.A. Daoub, A.H. Elmubarak, M. Misran, E.A. Hassan, M.E. Osman, Characterization and functional properties of some natural Acacia gums, *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 17 (2018) 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.05.002>.
- [308] J.-M. Harmand, M. Ntoupka, B. Mathieu, C. Forkong Njiti, J.-M. Tapsou, J.-C. Bois, P. Thaler, R. Peltier, Gum arabic production in Acacia senegal plantations in the Sudanian zone of Cameroon: Effects of climate, soil, tapping date and tree provenance, *Bois For. Trop.* (2012). <http://agritrop.cirad.fr/564463/> (accessed June 19, 2019).
- [309] A.M. Zipkin, M. Wagner, K. McGrath, A.S. Brooks, P.W. Lucas, An Experimental Study of Hafting Adhesives and the Implications for Compound Tool Technology, *PLOS ONE*. 9 (2014) e112560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112560>.
- [310] M. Atgie, Composition and structure of gum Arabic in solution and at oil-water interfaces, Université de Toulouse, 2018.
- [311] R. Bandyopadhyaya, E. Nativ-Roth, O. Regev, R. Yerushalmi-Rozen, Stabilization of Individual Carbon Nanotubes in Aqueous Solutions, *Nano Lett.* 2 (2002) 25–28. <https://doi.org/10.1021/nl010065f>.
- [312] M.P. Yadav, J. Manuel Igartuburu, Y. Yan, E.A. Nothnagel, Chemical investigation of the structural basis of the emulsifying activity of gum arabic, *Food Hydrocoll.* 21 (2007)

- 297–308. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.05.001>.
- [313] C. Sanchez, M. Nigen, V. Mejia Tamayo, T. Doco, P. Williams, C. Amine, D. Renard, Acacia gum: History of the future, *Food Hydrocoll.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.008>.
- [314] L. Lopez-Torrez, M. Costalat, P. Williams, T. Doco, C. Sanchez, Acacia senegal vs. Acacia seyal gums – Part 1: Composition and structure of hyperbranched plant exudates, *Food Hydrocoll.* 51 (2015) 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.019>.
- [315] J.C. Boulet, P. Williams, T. Doco, A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides, *Carbohydr. Polym.* 69 (2007) 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.09.003>.
- [316] A.M. Islam, G.O. Phillips, A. Sljivo, M.J. Snowden, P.A. Williams, A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic, *Food Hydrocoll.* 11 (1997) 493–505. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(97\)80048-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(97)80048-3).
- [317] S.C. Churms, E.H. Merrifield, A.M. Stephen, Some new aspects of the molecular structure of Acacia senegal gum (gum arabic), *Carbohydr. Res.* 123 (1983) 267–279. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(83\)88483-3](https://doi.org/10.1016/0008-6215(83)88483-3).
- [318] P.A. Williams, G.O. Phillips, A.M. Stephen, Spectroscopic and molecular comparisons of three fractions from Acacia senegal gum, *Food Hydrocoll.* 4 (1990) 305–311. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80207-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80207-5).
- [319] B.A. Lewis, F. Smith, The heterogeneity of polysaccharides as revealed by electrophoresis on glass-fiber paper, *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957).
- [320] A. Hallén, Chromatography of acidic glycosaminoglycans on DEAE-cellulose, *J. Chromatogr. A.* 71 (1972) 83–91. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)85691-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)85691-0).
- [321] Y. Dror, Y. Cohen, R. Yerushalmi-Rozen, Structure of gum arabic in aqueous solution, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 44 (2006) 3265–3271. <https://doi.org/10.1002/polb.20970>.
- [322] D. Renard, C. Garnier, A. Lapp, C. Schmitt, C. Sanchez, Structure of arabinogalactan-protein from Acacia gum: from porous ellipsoids to supramolecular architectures, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.046>.
- [323] D. Renard, E. Lepvrier, C. Garnier, P. Roblin, M. Nigen, C. Sanchez, Structure of glycoproteins from Acacia gum: An assembly of ring-like glycoproteins modules, *Carbohydr. Polym.* 99 (2014) 736–747. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.090>.
- [324] F. Thevenet, Gomme d’acacia, hydrocolloïde multifonctionnel et nutritionnel, (2009).
- [325] C. Sanchez, C. Schmitt, E. Kolodziejczyk, A. Lapp, C. Gaillard, D. Renard, The Acacia Gum Arabinogalactan Fraction Is a Thin Oblate Ellipsoid: A New Model Based on Small-Angle Neutron Scattering and Ab Initio Calculation, *Biophys. J.* 94 (2008) 629–639. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.109124>.
- [326] R.J. Redgwell, C. Schmitt, M. Beaulieu, D. Curti, Hydrocolloids from coffee: physicochemical and functional properties of an arabinogalactan–protein fraction from green beans, *Food Hydrocoll.* 19 (2005) 1005–1015. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.12.010>.
- [327] C. Sanchez, D. Renard, P. Robert, C. Schmitt, J. Lefebvre, Structure and rheological properties of acacia gum dispersions, *Food Hydrocoll.* 16 (2002) 257–267. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00096-0](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00096-0).
- [328] R.C. Randall, G.O. Phillips, P.A. Williams, Fractionation and characterization of gum from Acacia senegal, *Food Hydrocoll.* 3 (1989) 65–75. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(89\)80034-7](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(89)80034-7).
- [329] W. Qi, C. Fong, D.T. Lamport, Gum arabic glycoprotein is a twisted hairy rope : a new model based on o-galactosylhydroxyproline as the polysaccharide attachment site, *Plant Physiol.* 96 (1991) 848–855. <https://doi.org/10.1104/pp.96.3.848>.

- [330] R.C. Randall, G.O. Phillips, P.A. Williams, The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic, *Food Hydrocoll.* 2 (1988) 131–140. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(88\)80011-0](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(88)80011-0).
- [331] L.J. Goodrum, A. Patel, J.F. Leykam, M.J. Kieliszewski, Gum arabic glycoprotein contains glycomodules of both extensin and arabinogalactan-glycoproteins, *Phytochemistry*. 54 (2000) 99–106. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00043-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00043-1).
- [332] T. Mahendran, P.A. Williams, G.O. Phillips, S. Al-Assaf, T.C. Baldwin, New Insights into the Structural Characteristics of the Arabinogalactan–Protein (AGP) Fraction of Gum Arabic, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 9269–9276. <https://doi.org/10.1021/jf800849a>.
- [333] R. Denis, C. Sanchez, L. Lavenant-Gourgeon, A. Lapp, C. Schmitt, Biologie structurale d’hétéropolyosides: cas des arabinogalactane-protéines de gomme d’acacia, in: Pessac, 2005.
- [334] L. Viscione, Fibre-enriched beverages, in: J.A. Delcour, K. Poutanen (Eds.), *Fibre-Rich Wholegrain Foods*, Woodhead Publishing, 2013: pp. 369–388.
- [335] S.R. Padala, P.A. Williams, G.O. Phillips, Adsorption of Gum Arabic, Egg White Protein, and Their Mixtures at the Oil–Water Interface in Limonene Oil-in-Water Emulsions, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4964–4973. <https://doi.org/10.1021/jf803794n>.
- [336] J.M.B. Fernandes Diniz, T.M. Herrington, pKa determination of weak acids over a large pH range, *J. Chem. Eng. Data*. 38 (1993) 109–111. <https://doi.org/10.1021/je00009a026>.
- [337] C.G. Mothé, M.A. Rao, Rheological behavior of aqueous dispersions of cashew gum and gum arabic: effect of concentration and blending, *Food Hydrocoll.* 13 (1999) 501–506. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(99\)00035-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(99)00035-1).
- [338] B.N. Chikamai, W.B. Banks, D.M.W. Anderson, W. Weiping, Processing of gum arabic and some new opportunities, *Food Hydrocoll.* 10 (1996) 309–316. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(96\)80006-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(96)80006-3).
- [339] X. Li, H. Zhang, Y. Fang, S. Al-Assaf, G.O. Phillips, K. Nishinari, Rheological Properties of Gum Arabic Solution: the Effect of Arabinogalactan Protein Complex (AGP), (2011) 229–238. <https://doi.org/10.1039/9781849733106-00229>.
- [340] X. Li, Y. Fang, S. Al-Assaf, G.O. Phillips, K. Nishinari, H. Zhang, Rheological study of gum arabic solutions: Interpretation based on molecular self-association, *Food Hydrocoll.* 23 (2009) 2394–2402. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.06.018>.
- [341] E. Dickinson, B.S. Murray, G. Stainsby, D.M.W. Anderson, Surface activity and emulsifying behaviour of some Acacia gums, *Food Hydrocoll.* 2 (1988) 477–490. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(88\)80047-X](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(88)80047-X).
- [342] A.A. Al-Majed, A.R.A. Abd-Allah, A.C. Al-Rikabi, O.A. Al-Shabanah, A.M. Mostafa, Effect of oral administration of arabic gum on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17 (2003) 146–153. <https://doi.org/10.1002/jbt.10072>.
- [343] H. Trommer, R.H.H. Neubert, The examination of polysaccharides as potential antioxidative compounds for topical administration using a lipid model system, *Int. J. Pharm.* 298 (2005) 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.04.024>.
- [344] B.H. Ali, Does Gum Arabic Have an Antioxidant Action in Rat Kidney?, *Ren. Fail.* 26 (2004) 1–3. <https://doi.org/10.1081/JDI-120028536>.
- [345] R. Marcuse, Antioxidative effect of amino-acids, *Nature*. 186 (1960) 886–887. <https://doi.org/10.1038/186886a0>.
- [346] E.Y. Park, H. Murakami, Y. Matsumura, Effects of the Addition of Amino Acids and Peptides on Lipid Oxidation in a Powdery Model System, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 8334–8341. <https://doi.org/10.1021/jf058063u>.
- [347] D. Verbeken, S. Dierckx, K. Dewettinck, Exudate gums: occurrence, production, and



- applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63 (2003) 10–21. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1354-z>.
- [348] A.M. Gamal el-din, A.M. Mostafa, O.A. Al-Shabanah, A.M. Al-Bekairi, M.N. Nagi, Protective effect of arabic gum against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice, *Pharmacol. Res.* 48 (2003) 631–635. [https://doi.org/10.1016/S1043-6618\(03\)00226-3](https://doi.org/10.1016/S1043-6618(03)00226-3).
- [349] K. Rehman, M.A. Wingertzahn, R.G. Harper, R.A. Wapnir, Proabsorptive Action of Gum Arabic: Regulation of Nitric Oxide Metabolism in the Basolateral Potassium Channel of the Small Intestine, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 32 (2001) 529.
- [350] A.A. Ali, K.E. Ali, A.E. Fadlalla, K.E. Khalid, The effects of gum arabic oral treatment on the metabolic profile of chronic renal failure patients under regular haemodialysis in Central Sudan, *Nat. Prod. Res.* 22 (2008) 12–21. <https://doi.org/10.1080/14786410500463544>.
- [351] E.A. Makri, G.I. Doxastakis, Study of emulsions stabilized with *Phaseolus vulgaris* or *Phaseolus coccineus* with the addition of Arabic gum, locust bean gum and xanthan gum, *Food Hydrocoll.* 20 (2006) 1141–1152. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.12.008>.
- [352] A.C. Bertolini, A.C. Siani, C.R.F. Grosso, Stability of Monoterpenes Encapsulated in Gum Arabic by Spray-Drying, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 780–785. <https://doi.org/10.1021/jf000436y>.
- [353] C.K. Pua, N.S.A. Hamid, G. Rusul, R.A. Rahman, Production of drum-dried jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) powder with different concentration of soy lecithin and gum arabic, *J. Food Eng.* 78 (2007) 630–636. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.10.041>.
- [354] J. Su, J. Flanagan, H. Singh, Improving encapsulation efficiency and stability of water-in-oil-in-water emulsions using a modified gum arabic (*Acacia (sen) SUPER GUM™*), *Food Hydrocoll.* 22 (2008) 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.03.005>.
- [355] H. Mirhosseini, C.P. Tan, N.S.A. Hamid, S. Yusof, Optimization of the contents of Arabic gum, xanthan gum and orange oil affecting turbidity, average particle size, polydispersity index and density in orange beverage emulsion, *Food Hydrocoll.* 22 (2008) 1212–1223. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.06.011>.
- [356] M. Maqbool, A. Ali, P.G. Alderson, N. Zahid, Y. Siddiqui, Effect of a Novel Edible Composite Coating Based on Gum Arabic and Chitosan on Biochemical and Physiological Responses of Banana Fruits during Cold Storage, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 5474–5482. <https://doi.org/10.1021/jf200623m>.
- [357] T. Jiang, L. Feng, X. Zheng, J. Li, Physicochemical responses and microbial characteristics of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) to gum arabic coating enriched with natamycin during storage, *Food Chem.* 138 (2013) 1992–1997. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.043>.
- [358] L.H. Mosquera, G. Moraga, N. Martínez-Navarrete, Critical water activity and critical water content of freeze-dried strawberry powder as affected by maltodextrin and arabic gum, *Food Res. Int.* 47 (2012) 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.019>.
- [359] D.A. Glover, K. Ushida, A.O. Phillips, S.G. Riley, *Acacia(sen) SUPERGUM™* (Gum arabic): An evaluation of potential health benefits in human subjects, *Food Hydrocoll.* 23 (2009) 2410–2415. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.06.020>.
- [360] O. Nasir, F. Artunc, A. Saeed, M.A. Kambal, H. Kalbacher, D. Sandulache, K.M. Boini, N. Jahovic, F. Lang, Effects of Gum Arabic (*Acacia senegal*) on Water and Electrolyte Balance in Healthy Mice, *J. Ren. Nutr.* 18 (2008) 230–238. <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2007.08.004>.
- [361] O. Nasir, A.T. Umbach, R. Rexhepaj, T.F. Ackermann, M. Bhandaru, A. Ebrahim, F. Artunc, D.S. Kempe, G. Puchchakayala, B. Siraskar, M. Föller, A. Saeed, F. Lang, Effects of Gum Arabic (*Acacia senegal*) on Renal Function in Diabetic Mice, *Kidney Blood Press. Res.* 35 (2012) 365–372. <https://doi.org/10.1159/000336359>.

- [362] T. Onishi, S. Umemura, M. Yanagawa, M. Matsumura, Y. Sasaki, T. Ogasawara, T. Ooshima, Remineralization effects of gum arabic on caries-like enamel lesions, *Arch. Oral Biol.* 53 (2008) 257–260. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.10.004>.
- [363] M. Beyer, J. Reichert, E. Heurich, K.D. Jandt, B.W. Sigusch, Pectin, alginate and gum arabic polymers reduce citric acid erosion effects on human enamel, *Dent. Mater.* 26 (2010) 831–839. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.04.008>.
- [364] W. Calame, F. Thomassen, S. Hull, C. Viebke, A.D. Siemensma, Evaluation of satiety enhancement, including compensation, by blends of gum arabic. A methodological approach, *Appetite.* 57 (2011) 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2011.06.005>.
- [365] K. Ushida, H. Hatanaka, R. Inoue, T. Tsukahara, G.O. Phillips, Effect of long term ingestion of gum arabic on the adipose tissues of female mice, *Food Hydrocoll.* 25 (2011) 1344–1349. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.010>.
- [366] K.K. Nishi, M. Antony, P.V. Mohanan, T.V. Anilkumar, P.M. Loiseau, A. Jayakrishnan, Amphotericin B-Gum Arabic Conjugates: Synthesis, Toxicity, Bioavailability, and Activities Against Leishmania and Fungi, *Pharm. Res.* 24 (2007) 971–980. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9222-z>.
- [367] A. Ballal, D. Bobbala, S.M. Qadri, M. Föller, D. Kempe, O. Nasir, A. Saeed, F. Lang, Anti-malarial effect of gum arabic, *Malar. J.* 10 (2011) 139. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-139>.
- [368] R.A. Wapnir, B. Sherry, C.N. Codipilly, L.O. Goodwin, I. Vancurova, Modulation of Rat Intestinal Nuclear Factor NF- $\kappa$ B by Gum Arabic, *Dig. Dis. Sci.* 53 (2008) 80–87. <https://doi.org/10.1007/s10620-007-9826-0>.
- [369] A.M.A. Abd El-Mawla, H.E.H. Osman, Effects of Gum acacia aqueous extract on the histology of the intestine and enzymes of both the intestine and the pancreas of albino rats treated with Meloxicam, *Pharmacogn. Res.* 3 (2011) 114–121. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.81959>.
- [370] G. Ali, C. Rihouey, D. Le Cerf, L. Picton, Effect of carboxymethyl groups on degradation of modified pullulan by pullulanase from *Klebsiella pneumoniae*, *Carbohydr. Polym.* 93 (2013) 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.039>.
- [371] A.H.A. Hadi, M.A. Elderbi, A.W.H. Mohamed, Effect of gum arabic on coagulation system of albino rats., *Int. J. PharmTech Res.* 2 (2010) 1762–1766.
- [372] V. Batra, A. Bhowmick, B.K. Behera, A.R. Ray, Sustained release of ferrous sulfate from polymer-coated gum arabica pellets, *J. Pharm. Sci.* 83 (1994) 632–635. <https://doi.org/10.1002/jps.2600830507>.
- [373] E.-X. Lu, Z.-Q. Jiang, Q.-Z. Zhang, X.-G. Jiang, A water-insoluble drug monolithic osmotic tablet system utilizing gum arabic as an osmotic, suspending and expanding agent, *J. Controlled Release.* 92 (2003) 375–382. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00371-7](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00371-7).
- [374] A.V. Reis, M.R. Guilherme, O.A. Cavalcanti, A.F. Rubira, E.C. Muniz, Synthesis and characterization of pH-responsive hydrogels based on chemically modified Arabic gum polysaccharide, *Polymer.* 47 (2006) 2023–2029. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.01.058>.
- [375] K.K. Nishi, A. Jayakrishnan, Self-Gelling Primaquine–Gum Arabic Conjugate: An Injectable Controlled Delivery System for Primaquine, *Biomacromolecules.* 8 (2007) 84–90. <https://doi.org/10.1021/bm060612x>.
- [376] M.R. Avadi, A.M.M. Sadeghi, N. Mohammadpour, S. Abedin, F. Atyabi, R. Dinarvand, M. Rafiee-Tehrani, Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 6 (2010) 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.007>.
- [377] A.T. Paulino, M.R. Guilherme, L.H.C. Mattoso, E.B. Tambourgi, Smart Hydrogels

- Based on Modified Gum Arabic as a Potential Device for Magnetic Biomaterial, *Macromol. Chem. Phys.* 211 (2010) 1196–1205. <https://doi.org/10.1002/macp.200900657>.
- [378] V.P. Padmanabhan, R. Kulandaivelu, S.N.T.S. Nellaiappan, New core-shell hydroxyapatite/Gum-Acacia nanocomposites for drug delivery and tissue engineering applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 92 (2018) 685–693. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.07.018>.
- [379] R.P. Singh, G. Sharma, Sonali, S. Singh, S. Bharti, B.L. Pandey, B. Koch, M.S. Muthu, Chitosan-folate decorated carbon nanotubes for site specific lung cancer delivery, *Mater. Sci. Eng. C.* 77 (2017) 446–458. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.225>.
- [380] A.A. Ahmed, H.H. Musa, J.S. Fedail, A.Z. Sifaldin, T.H. Musa, Gum arabic suppressed diet-induced obesity by alteration the expression of mRNA levels of genes involved in lipid metabolism in mouse liver, *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre.* 7 (2016) 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2016.01.002>.
- [381] S.T. Fardood, A. Ramazani, S. Moradi, A NOVEL GREEN SYNTHESIS OF NICKEL OXIDE NANOPARTICLES USING ARABIC GUM, (2017). <http://www.cjm.asm.md/a-novel-green-synthesis-of-nickel-oxide-nanoparticles-using-arabic-gum> (accessed June 19, 2019).
- [382] G. Sharma, A. Kumar, M. Naushad, A. García-Peñas, A.H. Al-Muhtaseb, A.A. Ghfar, V. Sharma, T. Ahamad, F.J. Stadler, Fabrication and characterization of Gum arabic-cl-poly(acrylamide) nanohydrogel for effective adsorption of crystal violet dye, *Carbohydr. Polym.* 202 (2018) 444–453. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.004>.
- [383] X. Li, H. Zhang, Q. Jin, Z. Cai, Contribution of arabinogalactan protein to the stabilization of single-walled carbon nanotubes in aqueous solution of gum arabic, *Food Hydrocoll.* 78 (2018) 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.013>.
- [384] K. Khanari, M. Finšgar, M.K. Hrnčič, U. Maver, Ž. Knez, B. Seiti, Green corrosion inhibitors for aluminium and its alloys: a review, *RSC Adv.* 7 (2017) 27299–27330. <https://doi.org/10.1039/C7RA03944A>.
- [385] H.R. de Barros, M.B. Cardoso, C.C. de Oliveira, C.R.C. Franco, D. de L. Belan, M. Vidotti, I.C. Riegel-Vidotti, Stability of gum arabic-gold nanoparticles in physiological simulated pHs and their selective effect on cell lines, *RSC Adv.* 6 (2016) 9411–9420. <https://doi.org/10.1039/C5RA24858B>.
- [386] L. Xu, H. Sitinamaluwa, H. Li, J. Qiu, Y. Wang, C. Yan, H. Li, S. Yuan, S. Zhang, Low cost and green preparation process for  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@gum arabic electrode for high performance sodium ion batteries, *J. Mater. Chem. A.* 5 (2017) 2102–2109. <https://doi.org/10.1039/C6TA08918F>.
- [387] C. Tan, J. Xie, X. Zhang, J. Cai, S. Xia, Polysaccharide-based nanoparticles by chitosan and gum arabic polyelectrolyte complexation as carriers for curcumin, *Food Hydrocoll.* 57 (2016) 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.021>.
- [388] G.-Q. Huang, Y.-L. Du, J.-X. Xiao, G.-Y. Wang, Effect of coacervation conditions on the viscoelastic properties of N,O-carboxymethyl chitosan – gum Arabic coacervates, *Food Chem.* 228 (2017) 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.147>.
- [389] J.-X. Xiao, C.-P. Zhu, L.-Y. Cheng, J. Yang, G.-Q. Huang, pH-Dependent intestine-targeted delivery potency of the O-carboxymethyl chitosan – gum Arabic coacervates, *Int. J. Biol. Macromol.* 117 (2018) 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.183>.
- [390] C. Roldan-Cruz, J. Carmona-Ascencio, E.J. Vernon-Carter, J. Alvarez-Ramirez, Electrical impedance spectroscopy for monitoring the gum Arabic–chitosan complexation process in bulk solution, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 495 (2016) 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.02.004>.

- [391] H. Espinosa-Andrews, C. Lobato-Calleros, J.M. Loeza-Corte, C.I. Beristain, M.E. Rodriguez-Huezo, E.J. Vernon-Carter, Quantification of the Composition of Gum Arabic-Chitosan Coacervates by Hplc, *Rev. Mex. Ing. Quimica.* 7 (2008) 293–298.
- [392] G. Mekhloufi, C. Sanchez, D. Renard, S. Guillemain, J. Hardy, pH-Induced Structural Transitions during Complexation and Coacervation of  $\beta$ -Lactoglobulin and Acacia Gum, *Langmuir.* 21 (2005) 386–394. <https://doi.org/10.1021/la0486786>.
- [393] P.M. Biesheuvel, M.A. Cohen Stuart, Cylindrical Cell Model for the Electrostatic Free Energy of Polyelectrolyte Complexes, *Langmuir.* 20 (2004) 4764–4770. <https://doi.org/10.1021/la0496789>.
- [394] W.M. Pasika, Polysaccharide Polyelectrolytes, in: *Extracell. Microb. Polysacch., AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1977: pp. 128–143.* <https://doi.org/10.1021/bk-1977-0045.ch010>.
- [395] F. Andrade, F. Goycoolea, D.A. Chiappetta, J. Das Neves, A.D. Sosnik, B. Sarmento, Chitosan-Grafted Copolymers and Chitosan-Ligand Conjugates as Matrices for Pulmonary Drug Delivery, (2011). <https://doi.org/10.1155/2011/865704>.
- [396] G.-Q. Huang, J.-X. Xiao, L. Jia, J. Yang, Characterization of O-Carboxymethyl Chitosan – Gum Arabic Coacervates as a Function of Degree of Substitution, *J. Dispers. Sci. Technol.* 37 (2016) 1368–1374. <https://doi.org/10.1080/01932691.2015.1101609>.
- [397] G.Q. Huang, J.X. Xiao, S.Q. Wang, H.W. Qiu, Rheological properties of O-carboxymethyl chitosan – gum Arabic coacervates as a function of coacervation pH, *Food Hydrocoll.* 43 (2015) 436–441. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.06.015>.
- [398] G.-Q. Huang, J.-X. Xiao, L. Jia, J. Yang, Complex Coacervation of O-Carboxymethylated Chitosan and Gum Arabic, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 64 (2015) 198–204. <https://doi.org/10.1080/00914037.2014.936591>.
- [399] G.-Q. Huang, X.-N. Han, J.-X. Xiao, Glutaraldehyde-crosslinked O-carboxymethyl chitosan–gum Arabic coacervates: Characteristics versus complexation acidity, *J. Dispers. Sci. Technol.* 38 (2017) 1607–1612. <https://doi.org/10.1080/01932691.2016.1265454>.
- [400] M.N.V.R. Kumar, R.A.A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa, A.J. Domb, Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives, *Chem. Rev.* 104 (2004) 6017–6084. <https://doi.org/10.1021/cr030441b>.
- [401] A. Aljawish, L. Muniglia, A. Klouj, J. Jasniewski, J. Scher, S. Desobry, Characterization of films based on enzymatically modified chitosan derivatives with phenol compounds, *Food Hydrocoll.* 60 (2016) 551–558. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.032>.
- [402] K. Kurita, Controlled functionalization of the polysaccharide chitin, *Prog. Polym. Sci.* 26 (2001) 1921–1971. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00007-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00007-7).
- [403] P.R. Sarika, N.R. James, P.R.A. Kumar, D.K. Raj, T.V. Kumary, Gum arabic-curcumin conjugate micelles with enhanced loading for curcumin delivery to hepatocarcinoma cells, *Carbohydr. Polym.* 134 (2015) 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.068>.
- [404] H. Wang, P.A. Williams, C. Senan, Synthesis, characterization and emulsification properties of dodecanyl succinic anhydride derivatives of gum Arabic, *Food Hydrocoll.* 37 (2014) 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.033>.
- [405] P.R. Sarika, N.R. James, P.R.A. Kumar, D.K. Raj, T.V. Kumary, Gum arabic-curcumin conjugate micelles with enhanced loading for curcumin delivery to hepatocarcinoma cells, *Carbohydr. Polym.* 134 (2015) 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.068>.
- [406] Y. Shi, C. Li, L. Zhang, T. Huang, D. Ma, Z. Tu, H. Wang, H. Xie, N. Zhang, B. Ouyang, Characterization and emulsifying properties of octenyl succinate anhydride modified Acacia seyal gum (gum arabic), *Food Hydrocoll.* 65 (2017) 10–16.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.043>.
- [407] N. Karaki, A. Aljawish, C. Humeau, L. Muniglia, J. Jasniewski, Enzymatic modification of polysaccharides: Mechanisms, properties, and potential applications: A review, *Enzyme Microb. Technol.* 90 (2016) 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.04.004>.
- [408] F. Xu, Dioxygen reactivity of laccase, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 95 (2001) 125. <https://doi.org/10.1385/ABAB:95:2:125>.
- [409] H. Claus, Laccases: structure, reactions, distribution, *Micron.* 35 (2004) 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2003.10.029>.
- [410] S. Witayakran, A.J. Ragauskas, Synthetic Applications of Laccase in Green Chemistry, *Adv. Synth. Catal.* 351 (2009) 1187–1209. <https://doi.org/10.1002/adsc.200800775>.
- [411] R. Mustafa, Oxydation de composés phénoliques par les laccases de *Trametes* sp. Et *Myceliophthora thermophila* en milieu hydro organique biphasique : application à la préparation des colonnes, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL, 2005. <http://www.theses.fr/2005INPL049N> (accessed June 14, 2018).
- [412] D.W.S. Wong, Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157 (2009) 174–209. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8279-z>.
- [413] N. Karaki, Impact de la fonctionnalisation enzymatique de la pectine par des composés phénoliques sur la structure et les propriétés physicochimiques du polymère, Université de Lorraine, 2015. <http://www.theses.fr/2015LORR0205> (accessed October 17, 2016).
- [414] N. Karaki, A. Aljawish, L. Muniglia, C. Humeau, J. Jasniewski, Physicochemical characterization of pectin grafted with exogenous phenols, *Food Hydrocoll.* 60 (2016) 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.004>.
- [415] T. Kudanga, G.S. Nyanhongo, G.M. Guebitz, S. Burton, Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review, *Enzyme Microb. Technol.* 48 (2011) 195–208. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.11.007>.
- [416] N.O. Ayaz, K.S. Ramadan, H.E.A. Farid, H.S. Alnahdi, Protective role and antioxidant activity of arabic gum against trichloroacetate-induced toxicity in liver of male rats, *Indian J. Anim. Res.* 51 (2016) 303–309. <https://doi.org/10.18805/ijar.10976>.
- [417] H. Kikuzaki, M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama, H. Taniguchi, Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 2161–2168. <https://doi.org/10.1021/jf011348w>.
- [418] E. Graf, Antioxidant potential of ferulic acid, *Free Radic. Biol. Med.* 13 (1992) 435–448. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90184-I](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90184-I).
- [419] A. Aljawish, I. Chevalot, J. Jasniewski, C. Paris, J. Scher, L. Muniglia, Laccase-catalysed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate in aqueous medium: A green procedure for the synthesis of new compounds, *Food Chem.* 145 (2014) 1046–1054. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.119>.
- [420] O.E. Adelakun, T. Kudanga, A. Parker, I.R. Green, M. le Roes-Hill, S.G. Burton, Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 74 (2012) 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.08.010>.
- [421] N. Karaki, A. Aljawish, L. Muniglia, S. Bouguet-Bonnet, S. Leclerc, C. Paris, J. Jasniewski, C. Humeau-Virot, Functionalization of pectin with laccase-mediated oxidation products of ferulic acid, *Enzyme Microb. Technol.* 104 (2017) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.05.001>.
- [422] A. Aljawish, I. Chevalot, B. Piffaut, C. Rondeau-Mouro, M. Girardin, J. Jasniewski, J. Scher, L. Muniglia, Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.016>.
- [423] D. Renard, L. Lavenant-Gourgeon, M.-C. Ralet, C. Sanchez, Acacia senegal Gum:

- Continuum of Molecular Species Differing by Their Protein to Sugar Ratio, Molecular Weight, and Charges, *Biomacromolecules*. 7 (2006) 2637–2649. <https://doi.org/10.1021/bm060145j>.
- [424] R.M. Berka, P. Schneider, E.J. Golightly, S.H. Brown, M. Madden, K.M. Brown, T. Halkier, K. Mondorf, F. Xu, Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*., *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 3151–3157.
- [425] J.M. Harkin, J.R. Obst, Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi, *Experientia*. 29 (1973) 381–387. <https://doi.org/10.1007/BF01926734>.
- [426] Malvern Instruments, Zetasizer nano series technical note, (2001).
- [427] T. Hocine, O. Amiri, A. Aït-Mokhtar, A. Pantet, Nouvelle approche pour l'étude de la diffusion d'ions chlorures dans le béton : Prise en compte de l'effet de la double couche électrique, (2011). <http://dSPACE.univ-tlemcen.dz/handle/112/581> (accessed January 7, 2019).
- [428] A. Michota-Kaminska, B. Wrzosek, J. Bukowska, Resonance Raman evidence of immobilization of laccase on self-assembled monolayers of thiols on Ag and Au surfaces, *Appl. Spectrosc.* 60 (2006) 752–757. <https://doi.org/10.1366/000370206777887035>.
- [429] S. Lathasree, A.N. Rao, B. SivaSankar, V. Sadasivam, K. Rengaraj, Heterogeneous photocatalytic mineralisation of phenols in aqueous solutions, *J. Mol. Catal. Chem.* 223 (2004) 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2003.08.032>.
- [430] V. Filipe, A. Hawe, W. Jiskoot, Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates, *Pharm. Res.* 27 (2010) 796–810. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>.
- [431] P. Gill, T.T. Moghadam, B. Ranjbar, Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience., *J. Biomol. Tech. JBT*. 21 (2010) 167–193.
- [432] S.W. Cui, Y. Wu, H. Ding, The range of dietary fibre ingredients and a comparison of their technical functionality, in: J.A. Delcour, K. Poutanen (Eds.), *Fibre-Rich Wholegrain Foods*, Woodhead Publishing, 2013: pp. 96–119. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978085709038650005X>.
- [433] E.J. Lien, S. Ren, H.H. Bui, R. Wang, Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 285–294.
- [434] N. Karaki, A. Aljawish, L. Muniglia, S. Bouguet-Bonnet, S. Leclerc, C. Paris, J. Jasniewski, C. Humeau-Virot, Functionalization of pectin with laccase-mediated oxidation products of ferulic acid, *Enzyme Microb. Technol.* 104 (2017) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.05.001>.
- [435] S.S. Rashidova, R.Y. Milusheva, L.N. Semenova, M.Y. Mukhamedjanova, N.L. Voropaeva, S. Vasilyeva, R. Faizieva, I.N. Ruban, Characteristics of Interactions in the Pectin-Chitosan System, *Chromatographia*. 59 (2004). <https://doi.org/10.1365/s10337-004-0289-6>.
- [436] M. Marudova, S. Lang, G.J. Brownsey, S.G. Ring, Pectin-chitosan multilayer formation, *Carbohydr. Res.* 340 (2005) 2144–2149. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.07.004>.
- [437] N.P. Birch, J.D. Schiffman, Characterization of Self-Assembled Polyelectrolyte Complex Nanoparticles Formed from Chitosan and Pectin, *Langmuir*. 30 (2014) 3441–3447. <https://doi.org/10.1021/la500491c>.
- [438] L. Pastorino, S. Erokhina, C. Ruggiero, V. Erokhin, P. Petrini, Fabrication and Characterization of Chitosan and Pectin Nanostructured Multilayers, *Macromol. Chem. Phys.* 216 (2015) 1067–1075. <https://doi.org/10.1002/macp.201400576>.
- [439] M.V. Revuelta, M.E.C. Villalba, A. S. Navarro, J. A. Güida, G.R. Castro, Development of Crystal Violet encapsulation in pectin - Arabic gum gel microspheres, *React. Funct.*

- Polym. 106 (2016) 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.07.002>.
- [440] R.-Y. Tsai, P.-W. Chen, T.-Y. Kuo, C.-M. Lin, D.-M. Wang, T.-Y. Hsien, H.-J. Hsieh, Chitosan/pectin/gum Arabic polyelectrolyte complex: Process-dependent appearance, microstructure analysis and its application, *Carbohydr. Polym.* 101 (2014) 752–759. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.008>.







## Résumé :

Les polymères en solution peuvent s'auto-assembler pour former différents types de complexes (coacervats, agrégats, etc.). Ces objets, en plus de régir l'organisation cellulaire peuvent être détournés pour encapsuler des molécules d'intérêt. Cependant, avant de pouvoir les utiliser en tant que tel, la compréhension des mécanismes d'auto-assemblage est indispensable pour pouvoir les contrôler et ainsi former des objets à façon.

Ce travail de thèse porte sur l'auto-assemblage entre la gomme d'Acacia et le chitosane. Les interactions mises en jeu lors de la séparation de phases associatives reposent principalement sur des interactions électrostatiques. Dans un premier temps, la formation de ce complexe a été analysée d'un point de vue thermodynamique par titration calorimétrique isotherme, en fonction des paramètres physico-chimiques, en particulier du pH, de la température et du ratio molaire. Il a ainsi été démontré qu'une augmentation de température ou de pH favorisait l'enthalpie au dépend de l'entropie et qu'il était possible de former des coacervats dans toutes les conditions étudiées en jouant sur le couple pH/température.

Pour changer le nombre et la nature des interactions entre les polysaccharides, ces derniers ont été modifiés par voie enzymatique. Un procédé développé au laboratoire reposant sur l'utilisation d'une laccase pour oxyder l'acide férulique a été mis en œuvre. Dans un premier temps, la modification de la gomme d'Acacia a été démontrée, notamment grâce à des outils spectroscopiques (FTIR, RMN). De plus, la structure des nombreux produits d'oxydation a été étudiée (RMN, LCMS). Les produits obtenus sont majoritairement des dimères d'acide férulique et une structure complète a été élucidée. Les produits greffés sur la gomme étant de nature phénolique, leur greffage a un impact sur les propriétés techno-fonctionnelles de cette dernière (solubilité dans l'eau, comportements thermique et rhéologique, tension de surface, propriétés antioxydantes, etc.).

Enfin, le greffage de composés phénoliques modifiant l'hydrophobie et les charges des polysaccharides, des auto-assemblages entre les différents polymères ont été réalisés pour déterminer leur impact sur les interactions mises en jeu et la nature des complexes formés. Dans des conditions données et en fonction des polysaccharides mis en présence, il est possible de former des coacervats, des agrégats voire un mélange des deux. La formation de ces objets a été corrélée avec une étude des paramètres thermodynamiques mis en jeu.

Ces résultats ouvrent de nouvelles voies dans la compréhension et le contrôle de la complexation entre polysaccharides qui, à plus long terme, déboucheront sur des applications dans le domaine de l'encapsulation.

---

**Mots-Clés :** Auto-assemblages, interactions, coacervation, agrégation, modification de polymères par voie enzymatique, composés phénoliques, chitosane, gomme d'Acacia, approche thermodynamique.

## Summary:

Polymers in solution can self-assemble to form different types of complexes (coacervates, aggregates, etc.). These objects, in addition to being part of the cellular organization, can be repurposed to encapsulate molecules of interest. However, before being able to use them as such, the understanding of the self-assembly mechanisms is essential to be able to control them and thus form targeted objects.

This thesis work focuses on the self-assembly between gum Arabic and chitosan. The interactions involved in associative phase separation are mainly based on electrostatic interactions. Initially, the formation of this complex was analyzed from a thermodynamic point of view by isothermal calorimetric titration, depending on the physicochemical parameters, in particular the pH, the temperature and the molar ratio. It was thus demonstrated that an increase in temperature or pH favored enthalpy and disfavored entropy and that it was possible to form coacervates under all studied conditions by controlling the pH/temperature combination.

To change the number and nature of the interactions between polysaccharides, they were modified by enzymatic pathway. A process developed at the laboratory, based on the use of a laccase to oxidize ferulic acid, has been implemented. First, the modification of gum Arabic was demonstrated, in particular with the support of spectroscopic tools (IR-FT, NMR). In addition, the structure of the numerous oxidation products has been studied (NMR, LCMS). The products obtained are mainly ferulic acid dimers and a complete structure has been elucidated. The products grafted on the gum are of phenolic nature so their grafting has an impact on its techno-functional properties (water solubility, thermal and rheological behavior, surface tension, antioxidant properties, etc.).

Finally, the grafting of phenolic compounds modified the polysaccharides hydrophobia and charges, so they were mixed in order to determine the impact of these new groups on the interactions involved in the self-assemblies and the nature of the complexes formed. Under given conditions and depending on the polysaccharides used, it is possible to form coacervates, aggregates or even a mixture of both. The formation of these objects was correlated with a study of the thermodynamic parameters involved.

These results paves the way for understanding and controlling complexation between polysaccharides that, in the longer term, will lead to applications in the field of encapsulation.

---

**Keywords:** Self-assemblies, interactions, coacervation, modification of polymers by enzymatic means, phenolic compound, chitosan, gum Arabic, thermodynamic approach.