

EXTRACTION ET PURIFICATION DES GALACTOMANNANES A PARTIR DES GRAINES DE *Gleditsia triacanthos* L.

LEBOUKH Mourad*, AOUADI Saoudi

Faculté des sciences de la nature, Département de biochimie,
laboratoire de biochimie appliquée, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie
*E-mail: lebmourad@yahoo.fr/ aouadis2000@yahoo.fr

(Received 09 May 2017– Accepted 21 October 2017)

Résumé.- L'albumen du fruit de *Gleditsia triacanthos*, plante originaire de l'est et du centre des Etats Unis, renferme un galactomannane hydrosoluble. Il a été suggéré que ce polysaccharide constitue un moyen de substitution de la gomme du guar dans les applications alimentaires ou comme agent thérapeutique dans les applications médicales pour la réduction de la toxicité d'agents anticancéreux. Des extraits purs sont obtenus à partir des graines de fruits récoltées dans la région d'Annaba (Algérie). Cette purification a été réalisée par la liqueur de Fehling qui permet le fractionnement des polysaccharides par précipitation du complexe insoluble Cu^{2+} -galactomannane. Ce précipité est régénéré par traitement avec une solution HCl 5 % dans l'éthanol 96%. La composition en oses du polysaccharide a été déterminée, après hydrolyse acide, par chromatographie sur couche mince dans le solvant: acétate d'éthyle / isopropanol / eau (65:23:12). Les techniques de modification chimique des polymères ont permis l'accès à une nouvelle classe de dérivés homogènes aux propriétés très prometteuses. Aux cotés des techniques de sulfatation à l'aide des complexes diméthylsulfoxyde: trioxyde de soufre (DMSO: SO_3) ou diméthylformamide: trioxyde de soufre (DMF: SO_3), il est envisagé l'utilisation de méthodes de catalyse en phase hétérogène qui pourraient permettre d'obtenir un galactomannane sulfaté de degré de polymérisation contrôlé.

Mots clés: Valorisation; *Gleditsia triacanthos*, galactomannane, sulfatation.

EXTRACTION AND PURIFICATION OF GALACTMANNANS FROM *Gleditsia triacanthos* L. SEEDS

Abstract.- The albumen of *Gleditsia triacanthos* fruit, a plant native to eastern and central United States, contains a water-soluble galactomannan. It has been suggested that this polysaccharide is a substitute for guar gum in food applications or as a therapeutic agent in medical applications for reducing the toxicity of anticancer agents. Pure extracts are obtained from the fruit seeds harvested in the region of Annaba (Algeria). This purification was carried out by the Fehling liquor which allows the fractionation of the polysaccharides by precipitation of the insoluble Cu^{2+} -galactomannan complex. This precipitate is regenerated by treatment with a solution containing HCl 5% in ethanol 96%. The oses composition of the polysaccharide was determined, after acid hydrolysis, by thin layer chromatography in the solvent: ethyl acetate / isopropanol / water (65:23:12). The polymers chemical modification techniques have allowed access to a new class of homogeneous derivatives with very promising properties. In addition to sulfation techniques using dimethylsulfoxide complexes: sulfur trioxide (DMSO: SO_3) or dimethylformamide: sulfur trioxide (DMF: SO_3), it is envisaged to use the heterogeneous phase catalysis methods which could allow to obtain a sulfated galactomannan of controlled degree of polymerization.

Key words: Valorisation; *Gleditsia triacanthos*, galactomannan, sulfatation.

Introduction

De nombreuses graines de légumineuses contiennent dans leurs endospermes des galactomannanes de structures apparentées [1], notamment les féviers à trois épines (*Gleditsia triacanthos* L.). Ces arbres se trouvent sous une gamme importante de conditions édaphiques et climatiques et appartiennent à la famille des Fabacées, ou légumineuses [2]. *Gleditsia triacanthos* est utilisé dans la médecine humaine pour soigner la cholécystite, les ulcères d'estomac et l'asthme bronchique [3]. Parmi les constituants polysaccharidiques de ce févier, il se distingue les galactomannanes qui sont considérés comme réserve polysaccharidiques pour la plante [4]. L'une des propriétés fonctionnelles les plus intéressantes est leur capacité de donner des solutions de forte viscosité à faible concentration [5]. Pour satisfaire les besoins spécifiques des industriels, un certain nombre de polyosides ont été modifiés par méthodes chimiques [6].

La sulfatation de l'amidon, l'amylose, l'amylopectine, et cellulose par le complexe diméthylfor-mamide-trioxyde de Soufre (DMF-SO₃) [7], et la sulfatation de l'amidon, l'agarose, et le polysaccharide de guar, et caroubier à l'aide du complexe diméthylsulfoxyde-trioxyde de Soufre [8] ont conduit à des dérivés de degrés de sulfatation contrôlés. Bien que ces méthodes sont assez dégradatives toutefois elles ont permis d'élargir la gamme des agents stabilisants, épaississants ou gélifiants ou encore d'agents thérapeutiques [4].

1.- Matériels et méthode

1.1.- Matériel biologique

Graines du févier appartiennent au genre (*Gleditsia triacanthos* L) de la famille Fabacée, récoltées dans la région d'Annaba (Algérie).

Les souches bactériennes ont été isolées à partir de l'hôpital de CHU de Annaba; ainsi que trois souches de références ont été utilisées: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

1. 2.- Protocole expérimental

Les graines de *Gleditsia triacanthos* sont broyées à l'aide d'un mortier. La farine (10g) obtenue est mise dans l'éthanol à 85%. Le mélange est alors placé dans un bain marie et porté à ébullition sous reflux pendant 45 minutes. Après filtration, l'insoluble éthanolique est lavé avec une solution d'éthanol à 85% puis séché à l'air libre [9]. Après séchage, l'échantillon est mis à gonfler dans 5 volumes d'eau pendant 10 heures. Le mélange ainsi obtenu est mis sous agitation magnétique pendant 9 heures à température ambiante.

Le mélange est centrifugé à 10.000g pendant 30 minutes. Le surnageant est récupéré et le culot est lavé à l'eau puis centrifugé. Cette opération est répétée 3 fois. Les fractions d'eau sont collectées et leur volume déterminé. La solution est additionnée sous agitation magnétique d'un volume équivalent d'éthanol 96%. Le mélange est mis à 4°C pendant une nuit. Le précipité est récupéré par centrifugation puis lavé 3 fois à l'éthanol 75%. Le précipité est alors séché et pesé [03].

Purification

Le polysaccharide obtenu précédemment est solubilisé dans l'eau à une concentration de 10mg/ml par chauffage à 50°C et homogénéisation. La solution est alors additionnée de liqueur de Fehling et agitée magnétiquement pour faciliter la formation d'un complexe insoluble [11]. Le précipité est laissé à température ambiante. Il est alors transféré dans un mortier en porcelaine avant d'être additionnée sous une température de 10°C d'HCl 5% dans l'éthanol à 96% (v/v). Le mélange est cisailé à l'aide d'un pilon et ainsi la solution change de coloration de même que le précipité retrouve son caractère fibreux. Ensuite 4 volumes d'éthanol à 80% sont additionnés, et le précipité résultant est isolé par centrifugation. Il est lavé avec de l'éthanol 80%, avec une centrifugation après chaque lavage. Il est enfin séché.

Hydrolyse totale

Il est introduit dans un tube scellé 0.1g de polysaccharide et il est ajouté 1ml d'acide sulfurique à 72%, le mélange réactionnel est maintenu 20 minutes à température ambiante puis il est additionné 6 volumes d'eau à 100°C pendant 6 heures. La solution est ensuite refroidie, neutralisée avec l'hydroxyde de Baryum puis filtrée sur laine de verre. Le filtrat est désionisé par passage sur célite [12]. L'identification des oses est effectuée par chromatographie sur couche mince, plaque de gel de silice, dans le solvant1: acétate d'éthyle/isopropanol /eau (65/23/12) [13], et aussi dans le solvant2: n-butanol /acide acétique /eau (4/1/5) [14]. Ils sont révélés par pulvérisation d'une solution de citrate d'aniline suivie de chauffage [13]. Du lactose activé (1g) est dessous dans l'eau (100ml) par agitation magnétique à température ambiante. La solution est versée dans 2 volumes de DMF, en agitant à l'aide d'une baguette de verre. La solution est concentrée puis séchée par chauffage à 80°C.

L'extrait sec est dans un ballon et additionnée de 10 volumes de DMF (1/10). Le solvant est évaporé par chauffage à 80°C.

Réaction de sulfatation

Le lactose activé (0.5g) est dissous dans l'eau, ajouter du trioxyde de sodium (Na_2SO_3) et du $\text{AlCl}_3/\text{SiO}_2$, ajuster le pH à 5-6 par l'addition de HCl à 0,01M. Le mélange réactionnel est ensuite chauffé à reflux à 70°C, pendant 3 heures. Après centrifugation du mélange réactionnel à 10.000g pendant 30min, le surnageant est filtré puis séché. L'extrait sec est repris dans l'isopropanol pour subir une analyse par infrarouge (Shimadzu part N°.200-91506). L'évolution de la réaction est suivie aussi par CCM.

Pour déterminer l'effet biologique de l'extrait éthanolique de *Gleditsia triacanthos* par la méthode de diffusion sur gélose, il est utilisé trois souches bactériennes de référence et trois souches bactériennes sauvages appartenant aux espèces: *E. coli*, *S. aureus* et *Ps. aerogenosa*.

2.- Résultats et discussion

Dans leur revue générale très complète DEA et MORRISSON [16] indiquent que les galactomannanes ont été isolées d'au moins 70 espèces de graines. Une forte proportion relève de la famille des Césalpiniacées, si l'on admet que les légumineuses représentent

une «super famille» divisée en trois familles, les Mimosacées ne contiennent que peu d'espèces à galactomannane. La majeure partie des galactomannanes a été décelée dans les multiples sous-familles des Papilionacées. Les plantes cultivées pour la production de galactomannanes d'usage alimentaire ou industriel sont le Caroubier (*Cératonia siliqua*), le guar (*Cyamopsis tétragonolobus*), le *Caesalpinia spinosa* et il commence de s'y adjoindre le févier épineux (*Gleditsia triacanthos*). Des graines de *Gleditsia triacanthos* récoltées dans la région d'Annaba ont été réduites en farine très fine (8g) par traitement mécanique à l'aide d'un mortier, en vue d'une valorisation possible de ces fruits.

L'objectif poursuivi dans l'isolement d'un polysaccharide est d'obtenir le polymère avec un degré de purification élevé et aussi le plus homogène possible. Les méthodes d'isolement et de fractionnement de polysaccharides sont très nombreuses.

Après délipidation et purification par la méthode à la liqueur de Fehling [11], il est obtenu 0.8g d'un polysaccharide hydrosoluble.

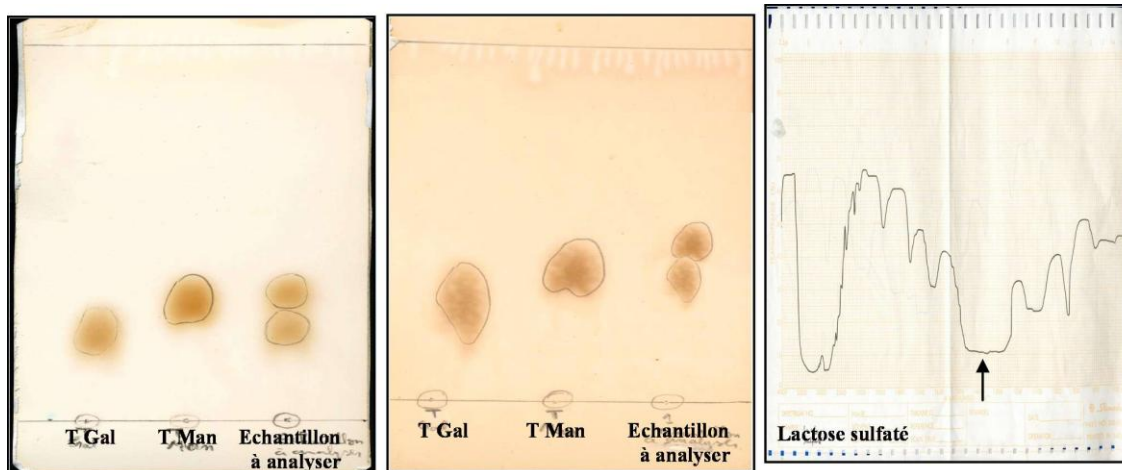


Fig1. CCM de l'hydrolysat du galactomannane de *Gleditsia triacanthos* dans le solvant 2.

Fig2. CCM de l'hydrolysat du galactomannane de *Gleditsia triacanthos* dans le solvant 1.

Fig3. Spectre infrarouge du lactose sulfaté (Shimadzu part N°.200-91506).

L'analyse de la composition en oses du polysaccharide met en jeu des méthodes d'hydrolyse totale. Cette hydrolyse peut être réalisée à l'aide de différents acides minéraux ou organiques. L'hydrolyse à l'aide de l'acide sulfurique 72% [12], suivie de chromatographie sur couche mince dans les deux solvants. La révélation au citrate d'aniline, indique deux tâches correspondant au D-galactose ($R_f = 0.19$) et au D-mannose ($R_f = 0.24$) dans le solvant 1 (fig1) [13], ou D-galactose ($R_f = 0.16$) et D-mannose ($R_f = 0.20$) dans le solvant 2 (fig2) [14]. Les galactomannanes sont employés principalement dans les sauces type mayonnaise et dans les crèmes glacées. La graine de caroube décortiquée renferme environ 48% de galactomannane et celle de guar 42%. Ces taux sont notablement supérieurs à celle de *Gleditsia triacanthos*. L'utilisation du polysaccharide de *Gleditsia triacanthos*, dans le domaine alimentaire, conduit bien évidemment à un prix de revient élevé à moins qu'il présente des propriétés rhéologiques meilleures voire originales [17]. Son principal débouché reste les domaines pharmaceutique et cosmétique, qui offrent les applications à plus grande valeur ajoutée. La modification des propriétés chimiques d'un polymère naturel peut conduire à des dérivés ayant des propriétés tout à fait spécifiques leur conférant une valeur d'usage irremplaçable. La littérature fait état de

nombreux exemples concernant les amidons et la cellulose [18]. Les techniques de modifications peuvent être enzymatiques et/ou chimiques. Elles sont aussi considérées comme dégradatives ou non dégradatives. La mise au point d'une technique de sulfatation du lactose, comme en témoigne le spectre infrarouge, permet d'envisager son application aux polysaccharides. En effet les bandes à 1370 cm^{-1} représentent les liaisons ester sulfates (fig3).

Cette étude n'a montré aucune zone d'inhibition autour des différents disques, c'est-à-dire ces résultats révèlent que l'extrait éthanolique de galactomannane avant et après modification chimiques (sulfatation) ne possède aucune activité inhibitrice pour des bactéries étudiées.

Conclusion

Un galactomannane très homogène et hydrosoluble est extrait des fruits de *Gleditsia triacanthos* à un taux de 10%. Ce biopolymère à l'état natif ou modifié est envisagé pour des applications biomédicales. Par ailleurs, les fruits de cette plante renferment un taux important de polysaccharides non hydrosolubles qu'il est possible de valoriser par modifications chimiques.

Références bibliographiques

- [1].- Merce A. L. R., Fernandes E., 2000.- Evaluation of the complexes of galactomannan of *leucaena leucocephala* and CO^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} and Zn^{+2} , J.Braz. Chem. Soc., 11(3): 224-231.
- [2].- Wake C.N., Schaefer P. R., Jost L. K., Evenson D. P., 1995.- Aalysis of intraspecific nuclear DNA content variation in *Gleditsia triacanthos* by flow cytometry, Can. J. For. Res., 25: 440-445.
- [3].- Rakhmanberdyeva R. K., Talipova M., Gazizov F., Rakhimov D. A., 2002.- Carbohydrates and lipids of *Gleditsia triacanthos* seeds., Chemistry of natural compounds, 38: 24-26.
- [4].- Voragen A. G. J., 1998.- Technological aspects of functional food-related carbohydrates, Food science and technology, 9: 328-335.
- [5].- Adrian J., 1975.- Les additifs alimentaires à caractère épaississant et gélifiant., Ann. Hyg. Méd. Et nutr, 11: 203-206.
- [6].- Brode G. L., Stauly J. P., Partain E. M and Kreeger L., 1987.- Glycol modified polysaccharides. In: Genetic engeneering, structure/ property relations and applications (M. Yalpani,ed), Elsevier Amesterdam, Pp 129-138.
- [7].- Kenneth B. G., 1978.- Some novel methods and results. In: the sulfatation of polysaccharides. In: Carbohydrates sulfates, ACS symposium series, 77: 148-162.
- [8].- Whistler R. L., 1975.- Sulfatation of polysaccharides. In: Method in carbohydrate chemistry and biochemistry, Pp 426-429.

- [9].- Josleau P., 1980.- Les hémicelluloses. dans: les polymères végétaux. Gauthier villars, Paris, Pp 87-102.
- [10].- Klysov, Anatole., Delivery of therapeutic agent. In: A formulation for reduced toxicity. U.S., Patent N^o.6, 2004: 645-656.
- [11].- Jones J. K. N., Stoodley R. J., 1965- Fractionation using copper complexe. Methods in carbohydrates chemistry, 5: 36-38.
- [12].- Adams G. A., 1965.- Complete acid hydrolysis. Methods in carbohydrates chemistry, 5: 275-296.
- [13].- Randerth. K., 1971.- Sucres dans: Chromatographie sur couche mince. Ed. Gauthier villars, Paris, Pp 238-243.
- [14].- Munier R. L., 1963.- Micro chromatographie sur papier. Technique de laboratoire, chimie physique, chimie biologique. Ed. Lavoisier, Pp 689-692.
- [15].- Mentreuil J. S, Spik G, Konarska A., 1967.- Microdosage des glucides: méthodes chromatographies de dosage des oses neutres. Ed. Lile, 3, Pp 5-63.
- [16].- Dea I. C. M., Morrisson A., 1975.- Chemistry interactions of seed galactomannans, In: Adv. Carbohydrate. Chem. and biochem., vol 31: 249-312.
- [17].- Gaset A., 1995.- La fonctionnalisation des agroalimentaires. In: valorisation non-alimentaires des grandes productions agricoles, INRA, Paris, 342-360.
- [18].- Allinger N. L., Gava M., Deyogh D. C., Lebel N. A., and Stevens C. L., 1983.- Hydrates de carbone. In: Chimie organique, applications, vol 3, Mc Graw Hill., Paris, 650-682.