UNIVERSITÉ DE NANTES FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORAT VEGETAL ENVIRONNEMENT NUTRITION AGROALIMENTAIRE MER

Année 2012

Rôle des arabinoxylanes et des β-glucanes dans l'assemblage et les propriétés des parois de l'albumen des grains de céréales

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Chimie théorique, physique, chimie analytique Spécialité : AGRO ALIMENT

Présentée

et soutenue publiquement par

Ruifeng YING

Le 5 janvier 2012, devant le jury ci-dessous

RapporteursM. Frédéric DEBEAUFORT, Professeur, Université de Bourgogne
RapporteursRapporteursM. François MARIETTE, Directeur de Recherche, CEMAGREF de RennesExaminateursM. Johnny BEAUGRAND, Chargé de Recherche, INRA de ReimsExaminateursM. Philippe DELAVAULT, Professeur, Université de NantesExaminateursM. Pierre MARTRE, Chargé de Recherche, INRA de Clermont-Ferrand

Directeur de thèse : M. Luc SAULNIER, Directeur de Recherche, INRA de Nantes

Co-encadrante de thèse : Mme. Corinne RONDEAU-MOURO. Ingénieur de Recherche. INRA de Nantes

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans l'Unité « Biopolymères Interactions Assemblages (BIA) » du Centre INRA de Nantes. Je remercie l'INRA et la Région Pays de la Loire pour le financement de cette thèse. Je tiens à remercier Monsieur Jacques Guéguen, pour m'avoir accueilli au sein de son Unité Biopolymères Interactions Assemblages.

Je remercie Monsieur Luc SAULNIER et Madame Corinne RONDEAU-MOURO, de m'avoir encadré au cours de cette thèse et de leurs soutiens sans faille de tous les instants.

Je remercie Monsieur Frédéric DEBEAUFORT, Professeur, Université de Bourgogne, ainsi que Monsieur François MARIETTE, Directeur de Recherche, CEMAGREF de Rennes, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie Monsieur Johnny BEAUGRAND, Chargé de Recherche à l'INRA de Reims, Monsieur Philippe DELAVAULT, Professeur de l'Université de Nantes ainsi que Monsieur Pierre MARTRE, Chargé de Recherche à l'INRA de Clermont-Ferrand, d'avoir accepté d'être membres du jury.

Mes remerciements vont également à Madame Cécile BARRON (INRA Montpellier), qui a encadré les parties Dynamic Vapor Sorption et DMTA de mon travail de thèse. J'ai beaucoup apprécié ses grandes compétences et disponibilités.

Mes remerciements vont également à Monsieur Cedric.GAILLARD et à Madame Brigitte BOUCHET pour leurs conseils en microscopie, leurs aides et pour leurs grandes disponibilités.

1

Je tiens à exprimer mon entière reconnaissance à Fabienne GUILLON, Denis LOURDIN, Armel GUILLERMO et Xavier ROUAU pour leur soutien et les nombreux conseils qu'ils m'ont donnés lors des comités de thèse.

Mes remerciements s'adressent à toutes les personnes de l'équipe PVPP qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame Marie-Jeanne CREPEAU, pour ses conseils précieux et son aide en Biochimie (extracation des polysaccharides) et sa grande disponibilité.

Je remercie également Mesdames Jacqueline VIGOUROUX, Sylvine DURAND, Estelle BONNIN, Marie-Françoise DEVAUX, Fabienne GUILLON, Marie-Christine RALET-RENARD, Messieurs Bernard QUEMENER et Marc LAHAYE pour leurs conseils, leur aide et leurs discussions fructueuses.

Je remercie également Madame Anne-Cécile LEROUX pour son aide au quotidien pour toutes les questions administratives.

Mes remerciements sincères vont aussi aux membres de l'équipe Matériaux, création et comportement (dirigée par Denis LOURDIN) et Assemblages Nanostructurés (dirigée par Bernard CATHALA).

Mes remerciements vont également à Monsieur Paul ROBERT pour son accompagnement en Microspectroscopie InfraRouge.

Un très grand merci à Monsieur Bruno PONTOIRE pour l'acquisition des spectres de diffraction des Rayon X, à Madame Annick PERONNET pour les travaux réalisés en MEB et Mademoiselle Marion de CARVALHO pour les expériences en DSC.

Je remercie Monsieur Laurent HELARY et Monsieur Loic FOUCAT d'avoir partagé leur bureau.

Un grand merci aux personnes du laboratoire qui m'ont été d'un grand soutien : Sandrine, Fatma, Cécile, Moutadi, Hamade, Pauline, Rachelle, Evangéline, Adelin.

J'adresse mes remerciements chaleureux à toute ma famille et à tous mes amis.

INTRODUCTION1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE
1 LE GRAIN DE BLE11
1.1 Généralités11
1.2 Histologie du grain de blé11
1.2.1 Le péricarpe (le tégument du fruit)11
1.2.2 La graine
1.2.2.1 Le tégument séminal12
1.2.2.2 L'épiderme du nucelle ou bande hyaline12
1.2.2.3 L'albumen 12
1.2.2.3.1 La couche à aleurone12
1.2.2.3.2 L'albumen amylacé13
1.2.2.4 Le germe
2- LES PAROIS CELLULAIRES DU GRAIN DE BLE MATURE
2.1 Structures des polymères pariétaux du grain de blé13
2.1.1 Les arabinoxylanes (AX)13
2.1.1.1 Hétérogénéité structurale au sein du grain et variabilité variétale des
arabinoxylanes14
2.1.1.1.1 Les hétéroxylanes14
2.1.1.1.2 Les arabinoxylanes de l'albumen15
2.1.1.1.3 Hétérogénéité structurale des arabinoxylanes au sein de l'albumen17
2.1.1.1.4 Variabilité variétale des AX18
2.1.1.2 Modèle de structure des AX
2.1.1.3 Biosynthèse des AX
2.1.2 Les β-glucanes
2.1.2.1 Hétérogénéité structurale et variabilité des (1-3, 1-4)-ß-glucanes27
2.1.2.2 Biosynthèse des (1→3, 1→4)- β -glucanes
2.2 Cinétique de dépôt et distribution des polymères dans les parois
2.3 Variation spatio-temporelle du degré de substitution des AX
2.4 Propriétés Physico-chimiques et implications technologiques des AX
2.4.1 Impact de la conformation des AX
2.4.2 Solubilité des AX
2.4.3 Viscosité des AX

2.4.4 Propriétés d'hydratation des AX
2.5 Propriétés physico-chimiques et implications technologiques des $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ - β -
glucanes
2.6 Effet de l'environnement sur la composition du grain et des parois
2.6.1 Impact de la chaleur et de la sécheresse sur le développement du grain
2.6.2 Relation entre l'organisation des parois et l'état hydrique du grain
2.7 Réalisation et caractérisations de films d'hémicelluloses
2.7.1 Propriétés filmogènes des hémicelluloses
2.7.2. Caractérisation de films d'AX et de β -glucanes
MATERIELS et METHODES
1 Matériels
1.1 Extractions des arabinoxylanes
1.2 La masse molaire et la viscosité des polysaccharides53
1.3 Réalisation de films d'arabinoxylanes (AX) et β -glucanes (BG)
1.4 Mesure de l'épaisseur des films55
2 Méthodes des caractérisations des films57
2.1. La microscopie
2.1.1 Microscope confocale à balayage laser à fluorescence
2.1.2 La microscopie électronique à balayage (MEB)58
2.2 Isotherme d'adsorption de vapeur d'eau
2.3 Analyses mécaniques
2.4 La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)66
2.4.1 Généralités
2.4.2 Phénomènes de relaxation
2.4.3 L'interaction magnétique dipôle-dipôle71
2.4.4 Mesures par RMN bas-champ74
CHAPITRE I
Isothermes de sorption et diffusion de l'eau à travers les films monomoléculaires de
polysaccharides
Water mobility within arabinoxylans and β -glucans films studied by NMR and Dynamic
Vapor Sorption
Abstract
Introduction

Experimental
Materials
Film Preparation
Differential Scanning Calorimetry (DSC)
NMR spectroscopy
Dynamic Vapor Sorption
Results and discussion
Conclusions
Acknowledgments
Reference
Chapitre II
Mobilité de l'eau et des chaînes de polymères dans les films suivie par RMN à bas champ 88
Films of Arabinoxylans and β -glucans extracted from cereal grains. Molecular motions by
TD-NMR
Abstract
Introduction
Materials and Methods
Materials
Physicochemical analyses91
Film preparation
Differential scanning calorimetry (DSC)
NMR measurements
Results and discussion
Structural and physicochemical characterizations
NMR analyses
Second moment M ₂ of dipolar interactions
Water relaxation time T ₂
Conclusions
Acknowledgments
Reference
Chapitre III
Etude des propriétés d'hydratation et mécaniques des films mono-moléculaires 101
Hydration and mechanical properties of arabinoxylans and β -glucans films as models of
cell walls from cereal grains

Abstract
Introduction:
Materials and Methods
Materials105
Chemical and physicochemical analyses105
Film preparation and characterization105
Microstructure of films106
Water Sorption isotherm and effective diffusivity using DVS106
NMR Spectroscopy
Mechanical tests
Results
Polymer and film characterization110
Moisture sorption isotherms112
Effective moisture diffusivity within films114
Time-domain NMR115
Mechanical properties of AX and BG films117
Discussion
Influence of the water content
Influence of the polysaccharide structures
Impact of the polymer structure on the cell wall properties
Conclusion:
Acknowledgments
Reference
Chapitre IV
Propriétés mécaniques et interactions moléculaires dans des films composites
Arabinoxylans and ß-glucans phase separation and interactions in composite films
Abstract
Introduction:
Materials and Methods
Materials134
Chemical and physicochemical analyses
Film preparation and characterization134
Microstructure of films
Differential Scanning Calorimetry (DSC)135

Traction tests
NMR Spectroscopy
Results
Morphology of AX and BG composite films
Thermodynamical and Mechanical properties of AX and BG composite films 138
Time domain NMR141
Discussion
Phase separation and interactions between AXs and BGs
Links between the cell wall composition and the properties of composite films 145
Conclusion146
Acknowledgments146
Reference147
DISCUSSION GENERALE
CONCLUSION ET PERSPECTIVES
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
ANNEXES
(1) Time domain ¹ H-NMR of arabinoxylans and β -glucans films, models of a lamellar
organisation in endosperm cell walls of cereal grains187
(2) Structure and organization within films of arabinoxylans extracted from wheat flour as
revealed by various NMR spectroscopic methods
RESUMES

ABRÉVIATIONS

- AFM : Microscope à force atomique AMD : Analyseur mécanique dynamique
- AND . Anaryseur meeanque dyn
- AX : arabinoxylanes
- A/X : rapport arabinose/xylose
- BG : béta-glucanes mixtes
- CAZY : Carbohydrate active enzyme database
- CPG : Chromatographie en phase gazeuse
- CSL : Cellulose synthase-like
- DP3/DP4 : rapport cellotriosyles/cellotetraosyles
- DSC : Calorimétrie à balayage différentiel
- FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de fourier
- MCBL : Microscope confocale à balayage laser
- MEB : Microscopie électronique à balayage
- QTL : Quantitative trait locus
- RMN : Résonance magnétique nucléaire
- WE-AX : AX hydro-solubles (water extractable)
- Xyld : xylp disubstitué en O-2/ et O-3
- Xylm : xylp monosubstitué en O-2 ou O-3
- Xyln : xylp non-substitué

INTRODUCTION

Les xylanes sont rencontrés dans les parois primaires et secondaires des graminées et les parois secondaires des dicotylédones (Darvill *et al.*, 1980; Ebringerova *et al.*, 2005). Chez les graminées, ils constituent 20 % des parois primaires. Dans l'albumen des grains de blé, de seigle ou de sorgho, ils représentent jusqu'à 70% des parois (Mares & Stone, 1973a; Fincher & Stone, 1986).

Les xylanes ont un impact sur les propriétés d'usage de la matière végétale. Ils interviennent sur la digestibilité des fourrages et sur la production de biocarburants notamment à partir de graminées. Dans le cas des grains de céréales, les xylanes ont une influence sur la transformation des grains (fractionnement) et la qualité des produits céréaliers (conservation, apport en fibres alimentaires).

Des variations importantes de la proportion, du type de chaînes latérales et de la teneur en composés phénoliques sont à l'origine de la variabilité structurale des xylanes dans les céréales. Des arabinoxylanes (AX) avec un fort degré de substitution du squelette de xylose par l'arabinose sont trouvés dans l'albumen de céréales (rapport molaire moyen Arabinose/Xylose; A/X: 0.6) (Izydorczyk & Biliaderis, 1995; Saulnier *et al.*, 2007) alors que des hétéroxylanes avec un degré de substitution plus élevé et des chaînes latérales plus complexes sont observées dans le péricarpe des grains de céréales (Saulnier *et al.*, 2007). Les $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucanes sont exclusivement constitués par des résidus D-glucopyranose arrangés en blocs de résidus β -D glucose liés des liaisons $(1\rightarrow4)$ séparés par une simple liaison $(1\rightarrow3)$. La structure résultante est un polysaccharide majoritairement composé de cellotriosyl (58-72%) et de cellotetraosyl (30-34%) liés par des liaisons β - $(1\rightarrow3)$. La distribution des liaisons β - $(1\rightarrow3)$ n'est pas aléatoire ce qui ne semble pas être le cas des blocs cellotriosyl et cellotetraosyl au sein du polysaccharide (Staudte *et al.*, 1983).

Des variations du degré de substitution des arabinoxylanes et de la proportion relative d'arabinoxylanes et de ß-glucanes sont également décrites en fonction du stade de développement de l'organe. Les arabinoxylanes apparaîssent plus fortement substitués dans les stades jeunes de développement du grain (Philippe *et al.*, 2006b; Philippe *et al.*, 2006c)

1. Objectifs de la thèse :

L'ensemble de ces données amène un certain nombre de questionnements sur le rôle de la substitution des arabinoxylanes et de la présence des β -glucanes dans la construction de l'édifice pariétal et sur les propriétés de plasticité, de résistance mécanique et d'hydratation des parois.

En effet, ces propriétés résultent des interactions entre polymères (dépendant de leur

3

structure) et de la structuration de ces derniers au sein de la paroi. Le rôle des arabinoxylanes dans l'assemblage pariétal est mal compris. Par ailleurs dans le cas des parois de l'albumen des grains de céréales, la cellulose est absente, par contre des β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)-glucanes ou β -glucanes mixtes (BG) sont présents. En raison de la présence de liaisons de type (1 \rightarrow 3) ces polymères ne s'associent pas sous forme de microfibrilles comme la cellulose et peuvent être partiellement hydro-solubles. De fait, les modèles classiques de parois ne peuvent s'appliquer au cas des parois de l'albumen des grains de céréales.

L'observation en microscopie (MET et AFM) des parois d'aleurone révèle une structure lamellaire que l'on peut attribuer à une distribution alternée des β -glucanes mixtes et des AX tandis que dans l'albumen amylacé les AX sont uniformément distribués sur l'épaisseur de la paroi et les β -glucanes (BG) sont concentrés du côté du lumen cellulaire. Les parois de l'albumen des grains de céréales apparaissent donc comme des systèmes essentiellement bicomposites (AX/BG). Leur organisation plus simple que celle des parois lignocellulosiques rencontrées dans les graminées peut être en première approche assimilée à des films multicouches ou des sandwichs de polymères. La réalisation de films multicouches comme systèmes modèles de la paroi peut être utile pour mieux comprendre l'impact de la structure des polymères et de leur organisation sur les propriétés physiques et physicochimiques des parois. De plus, certaines de ces propriétés peuvent être confrontées avec celles des parois isolées.

Dans ce contexte l'objectif de ce travail de thèse a été **d'explorer les propriétés d'hydratation, de porosité et mécaniques de films mimant la structuration et la diversité structurale des polymères des parois de l'albumen du grain de blé.** Ce travail devrait aider à comprendre l'impact de la structure des polymères sur les propriétés des parois et s'inscrit à plus long terme dans une stratégie de maîtrise des variations naturelles de la biosynthèse des polymères de la paroi de l'albumen.

Ce manuscrit est organisé en cinq parties: Synthèse bibliographique

Cette partie résume les connaissances acquises jusqu'à aujourd'hui sur le grain de blé et son développement, et sur la structure et la biosynthèse des principaux polysaccharides des parois qui le composent. Un bilan des différentes techniques utilisées pour la caractérisation des films de polysaccharides est également réalisé.

4

Matériels et méthodes

Cette partie rassemble les protocoles utilisés pour extraire, fractionner et purifier les polymères. La réalisation des films et la caractérisation de leurs propriétés y sont également décrites. Un point particulier est effectué pour expliquer le principe de la RMN et son utilisation dans le cadre de cette thèse.

Résultats

Les résultats obtenus au cours de cette thèse sont regroupés en deux parties constituées chacune de deux chapitres.

La partie I porte sur le « développement méthodologique générique pour mesurer les propriétés d'hydratation de films de polysaccharides » et comporte les deux chapitres suivants :

- Chapitre I: Isothermes de sorption et diffusion de l'eau à travers les films monomoléculaires de polysaccharides
- Chapitre II : Mobilité de l'eau et des chaînes de polymères dans les films suivie par RMN à bas champ.

La partie II porte sur l'« impact de la structure des polymères et de leur organisation sur les propriétés des films. Liens avec les propriétés des parois » et comporte les deux chapitres suivants :

- Chapitre III : Etude des propriétés d'hydratation et mécaniques des films monomoléculaires
- Chapitre IV : Propriétés mécaniques et interactions moléculaires dans des films composites

Les résultats présentés dans les différents chapitres correspondent à des publications scientifiques, publiées ou en cours de publication dans des revues internationales à comité de lecture.

Discussion générale et conclusions

Les principaux résultats obtenus au cours de ce travail sont synthétisés et discutés dans cette partie. Les faits marquants sont resitués dans le contexte général de l'étude et des pistes de recherche sont proposées pour la suite de ce travail.

Les références bibliographiques sont rassemblées à la fin du document.

Publications :

Ce travail a fait l'objet des publications suivantes qui sont exposés dans la partie Résultats de ce mémoire :

Water mobility within arabinoxylans and ß-glucans films studied by NMR and Dynamic Vapor Sorption (Chapitre I)

R. Ying, C. Barron, L. Saulnier, C. Rondeau-Mouro, Journal of the Science of Food and Agriculture 91(14), 2601-2605

Films of Arabinoxylans and β -glucans Extracted from Cereal Grains: Molecular Motions by TD-NMR (Chapitre II)

R. Ying, L. Saulnier, C. Rondeau-Mouro, Carbohydrate Polymers 86(2), 812-822

Time-domain ¹H-NMR of arabinoxylans and β -glucans films, models of a lamellar organisation in endosperm cell walls of cereal grains (Annexes)

R. Ying, J. Ruellet, C. Rondeau-Mouro Dans Magnetic Resonance in Food Science – An exciting future, 2011, J-P Renou, P.S. Belton, G.A. Webb eds. The Royal Society of Chemistry, Cambridge (UK), pp: 105-113.

Structure and organization within films of arabinoxylans extracted from wheat flour as revealed by various NMR spectroscopic methods (Annexes)

C. Rondeau-Mouro , **R. Ying**, J. Ruellet, L. Saulnier, accepté dans Magnetic Resonance in Chemistry (numéro spécial : Magnetic Resonance in Food - Dealing with Complex Systems" edited by Francesco Capozzi and Peter Belton).

Hydration and mechanical properties of Arabinoxylans and β -glucans films as models of cell walls from cereal grains (Chapitre III)

R. Ying, C. Rondeau-Mouro, A. Perronet, C. Barron, L. Saulnier. Soumis dans Biomacromolecules

Arabinoxylans and ß-glucans phase separation and interactions in composite films

R. Ying, C. Rondeau-Mouro, Brigitte Bouchet. F. Guilloux, C. Barron, L. Saulnier. Soumis dans *Biomacromolecules* (**Chapitre IV**)

En complément de ces publications, ces travaux ont donné lieu aux communications suivantes:

Communications orales:

Role des Arabinoxylanes et Beta-glucanes dans l'assemblage et les proprietes des parois de l'albumen des grains de cereales.

Journée des Jeunes Chercheurs BIA, Maison de l'Agriculture Nantes, 21 Juin 2011

Time-domain ¹H-NMR of arabinoxylans and β -glucans films, models of a lamellar organisation in endosperm cell walls of cereal grains

The 10th International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science "Challenges in a changing world" Clermont-Ferrand, France September 13th - 15th 2010 (will be published in Magnetic Resonance in Food Science - Challenges in a changing world, 2010, P. Belton, G. Webb eds., Royal Society of Chemistry)

Communications par affiches :

Nanostructure and mechanical properties of arabinoxylan and β -glucan films as revealed by NMR and DMTA

R. Ying, C. Barron, L. Saulnier, C. Rondeau-Mouro. Cinquièmes Rencontres de Biologie-Physique du Grand Ouest Rennes, France, les 9 & 10 juin 2011

Water mobility within arabinoxylans and β -glucans films. Influence of polysaccharide structure and water content.

R. Ying, C. Rondeau-Mouro, C. Barron, L. Saulnier. Colloque Biopolymères. Matrices alimentaires. 1-3 décembre 2010, Le Croisic

Analyses chimiométriques de spectres RMN du solide ¹³C de polysaccharides. Application à la classification des arabinoxylanes extraits de grains de blé en fonction de leur taux de substitution.

P. Jacquet, **R. Ying**, A.-M Brossard, L. Saulnier, D. Bertrand, C. Rondeau-Mouro. 11-12 Mai 2009, Colloque BIA-GDEC, INRA Nantes

Hydration properties and nano-structure of endosperm cell walls in cereal grains.

R. Ying, C. Rondeau-Mouro, F. Guillon, L. Saulnier 25-30 Juillet 2010, Cell Wall meeting, Porto Portugal

Water mobility within arabinoxylans and β -glucans films. Influence of polysaccharide structure and water content.

R. Ying, C. Rondeau-Mouro, C. Barron, L. Saulnier 5-11 Septembre 2010, 11th Symposium on the Properties of Water (ISOPOW XI), Querétaro, Mexique.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



Figure 1 : Constitution histologique d'un grain de blé (Surget & Barron, 2005).



Figure 2 : Organisation cellulaire des composants histologiques du grain de blé (Surget & Barron, 2005).

1 LE GRAIN DE BLE

1.1 Généralités

« Blé » est un terme générique qui désigne plusieurs céréales appartenant au genre Triticum. Ces céréales sont des plantes annuelles de la famille des Graminées ou Poacées, cultivées dans de très nombreux pays. Le terme « blé » désigne également le grain (caryopse) produit par ces plantes.

Le blé fait partie des trois grandes céréales avec le maïs et le riz. Avec environ 600 millions de tonnes annuelles, le blé se position en troisième place de la récolte mondiale et, avec le riz, c'est la céréale la plus consommée par l'homme. Le blé dans la civilisation occidentale et au Moyen-Orient, a toujours été un composant central de l'alimentation humaine. Il a été domestiqué au Proche-Orient à partir d'une graminée sauvage (égilopse). Sa consommation remonte à la plus haute Antiquité. Les premières cultures apparaissent au VIIIe millénaire av. J.-C., en Mésopotamie et dans les vallées du Tigre et de l'Euphrate (aujourd'hui l'Irak), dans la région du Croissant fertile.

La longueur d'un grain de blé mature (plus grande dimension) est comprise entre 5 et 8 mm. Sa largeur se situe entre 2 et 4 mm, son épaisseur entre 2,5 et 3,5 mm, sa section longitudinale entre 10 et 16 mm² et sa section transversale entre 4 et 7,5 mm². Son poids varie entre 20 et 50 mg et sa densité entre 1,3 et 1,4. Le grain de blé possède un sillon résultant d'une invagination des téguments vers l'intérieur du grain sur toute sa longueur ; les faisceaux nourriciers de la graine au cours de son développement sont localisés au fond de ce sillon. Un grain de blé mature est formé de trois régions (Figure 1) (Philippe, 2006):

- les enveloppes du fruit et de la graine, formées de six tissus différents (13-17% en poids du grain)
- l'albumen constitué de l'albumen amylacé et de la couche à aleurone (80-85%)
- le germe composé d'un embryon et du scutellum (~3%).

1.2 Histologie du grain de blé

1.2.1 Le péricarpe (le tégument du fruit)

Le péricarpe (Figure 2) est majoritairement constitué de matériel pariétal (30-40% d'hétéroxylanes, 25-30% de cellulose, ~10% de lignine) et 5-7% de protéines (Pomeranz,

1982; Fincher & Stone, 1986). Il se compose de deux parties distinctes : le péricarpe externe ou épicarpe et le péricarpe interne.

1.2.2 La graine

1.2.2.1 Le tégument séminal

Le tégument séminal (ou enveloppes de la graine) est constitué de deux tissus recouvrant complètement la surface de la graine : la testa et le film pigmentaire. L'ensemble très hydrophobe est constitué d'une couche tissulaire riche en catéchine intercalée entre deux fines cuticules riches en cutine et subérine (Brown, 1932; Miyamoto & Everson, 1958).

1.2.2.2 L'épiderme du nucelle ou bande hyaline

L'épiderme du nucelle fortement adhérent au tégument séminal enveloppe toute la graine à l'exception de l'embryon où il est partiellement dégradé. Au niveau de sa face interne, l'épiderme est séparé de la couche à aleurone par une couche tissulaire hydrophobe s'opposant à la pénétration de l'eau dans l'albumen (Evers & Reed, 1988).

1.2.2.3 L'albumen

D'un point de vue histologique, l'albumen est constitué de deux populations de cellules : la couche à aleurone (~5% en poids de la matière sèche du grain) et l'albumen amylacé (~80%).

1.2.2.3.1 La couche à aleurone

La couche à aleurone est une couche histologique localisée à la périphérie du grain entre l'albumen amylacé et les enveloppes. C'est un tissu complexe qui renferme des concentrations importantes de molécules d'intérêt nutritionnel. Elle est, avec l'embryon, l'unique tissu vivant du grain à maturité et permet son développement au cours de la germination. Elle assure à la fois un rôle nourricier via le stockage de métabolites et la synthèse d'enzymes d'hydrolyse des réserves, et un rôle de protection grâce à sa structure pariétale résistante. Les polysaccharides pariétaux représentent près de 40% du poids de la couche à aleurone. Les parois des cellules à aleurone sont épaisses (6 à 8 μ m). Occupant près de 35 % du volume cellulaire, ces parois

présentent une structure bi-couche (Fulcher *et al.*, 1972). La paroi de l'aleurone est très riche en arabinoxylanes (~60%) et en $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ -ß-glucanes (~25%) (Fincher & Stone, 1986) mais contient peu de cellulose.

1.2.2.3.2 L'albumen amylacé

L'albumen amylacé, tissu de réserve du grain, est composé majoritairement de granules d'amidon enchâssés dans une matrice protéique dense et continue. La teneur en amidon varie en fonction de la position de la cellule dans l'albumen. Le rapport protéine / amidon s'accroît progressivement du centre de l'albumen amylacé vers sa périphérie (Evers, 1970). L'albumen est cloisonné par de fines parois cellulaires qui représentent 2 à 3% de sa masse sèche. L'épaisseur moyenne des parois est d'environ 2 μ m, mais elles apparaissent plus épaisses au niveau des cellules sub-aleuroniques. Les parois cellulaires de l'albumen amylacé sont composées essentiellement d'arabinoxylanes (65-70%) et (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)-ß-glucanes (20-30%) (Fincher & Stone, 1986), contenant très peu de celluloses (2-4%) et de glucomannanes.

Trois types de cellules ont été classés selon leur localisation au sein du grain et leurs caractéristiques morphologiques (taille et forme de cellules)(Greer *et al.*, 1951). De taille comparable aux cellules à aleurones auxquelles elles sont adjacentes, les cellules subaleuroniques ont une forme généralement cubique de 60 μ m de diamètre. Puis les cellules prismatiques sont de forme allongée (~150 μ m sur 50 μ m). Les cellules centrales de l'albumen amylacé se distinguent des autres par une très forte hétérogénéité de forme et de taille (72-144 μ m sur 69-120 μ m).

1.2.2.4 Le germe

Partie vivante du grain, il donnera naissance à une future plante. Le germe se compose de deux parties distinctes : le scutellum et l'axe embryonnaire.

2- LES PAROIS CELLULAIRES DU GRAIN DE BLE MATURE

2.1 Structures des polymères pariétaux du grain de blé

2.1.1 Les arabinoxylanes (AX)

2.1.1.1 Hétérogénéité structurale au sein du grain et variabilité variétale des arabinoxylanes

2.1.1.1.1 Les hétéroxylanes

La famille des xylanes possède une structure de base commune sous la forme d'un squelette de résidus D-xylopyranoses liés entre eux par des liaisons β -(1 \rightarrow 4). Le xylose représente généralement plus de 50 % des oses constitutifs du polymère. Une grande diversité de substituants existe sur cette chaîne principale, parmi lesquels, les plus fréquents sont le α -L-arabinofuranose ainsi que l'acide α -L-glucuronique. De courtes chaînes latérales composées de résidus xylose, arabinose et galactose peuvent substituer également la chaîne principale. Des substituants non osidiques sont aussi rencontrés tels que les acides féruliques et *p*-coumariques.

Le terme générique « hétéroxylanes » désigne les xylanes substitués par différents résidus osidiques (tandis que le terme arabinoxylanes concerne spécifiquement les xylanes ayant pour unique substituant osidique l'arabinose). Les hétéroxylanes se retrouvent dans tous les tissus du blé: la tige, les feuilles, ou les glumes.

Les hétéroxylanes des enveloppes externes du grain de blé ont un squelette de xylose moyennement à fortement substitué par des chaînes latérales (30 à 80%). En plus des substituants classiques des glucurono-arabino-xylanes, ces hétéroxylanes se distinguent par la présence de chaînes latérales plus complexes. L'arabinose reste néanmoins le substituant majeur ; il peut être trouvé en position O-2 ou O-3 du xylose. Les hétéroxylanes extraits de sons de blé ont un taux de substitution très élevé (70-80 %). Ils se distinguent aussi par la présence de galactose, d'une quantité non négligeable (20 %) de résidus xylose en position terminale de chaînes latérales ainsi que d'un fort taux de di-substitutions (25-35%) des résidus xylose du squelette principal (Brillouet & Joseleau, 1987).

Après hydrolyse l'acide ménagée ou par voie enzymatique, des fragments d'hétéroxylanes estérifiés par l'acide férulique ou l'acide *p*-coumarique ont été isolés (Ishii, 1997). Ces acides phénoliques sont liés en position 5 de l'arabinose (Smith & Hartley, 1983; Kato *et al.*, 1982).

Différents types de liaisons covalentes relieraient les hétéroxylanes avec la lignine pour former un complexe ligno-polysaccharidique dans les parois cellulaires secondaires. Des liaisons esters pourraient exister entre un acide glucuronique d'une chaîne latérale d'un hétéroxylane et la lignine (Hatfield, 1993) ou une autre chaîne d'hétéroxylanes (Iiyama *et al.*, 1994). Des liaisons éthers pourraient également exister entre un hexose (position 6) ou un

résidu de xylose (position et 3) et la lignine (Watanabe *et al.*, 1989; Joseleau *et al.*, 1992). D'autre part, la lignine et les hétéroxylanes pourraient être reliés par l'intermédiaire d'acides féruliques. Ces derniers constitueraient des ponts covalents entre lignine et hétéroxylanes par l'intermédiaire de liaisons éthers (Iiyama *et al.*, 1994; Ralph & Helm, 1993). De plus, les acides déhydrodiféruliques formés par oxydation d'acides féruliques par une peroxydase et H_2O_2 , tous deux présents dans les parois végétales, ou par irradiation ultraviolette, serviraient aussi de pont interchaînes (Lam *et al.*, 1996). De tels dimères ont été isolés dans les parois cellulaires de blé (Markwalder & Neukom, 1976; Bartolome *et al.*, 1997), mais jamais sous leur forme liée au polymère.

2.1.1.1.2 Les arabinoxylanes de l'albumen

L'albumen amylacé des grains contient entre 2 et 3 % de polysaccharides pariétaux. Les parois végétales de l'albumen sont des parois primaires, non lignifiées. Dans le blé, les AX constituent de 70 à 80% des parois de l'albumen (Mares et Stone, 1973a. Mares & Stone, 1973b; Fincher & Stone, 1986).

Les AX (Figure 3) sont constitués d'un squelette linéaire de résidus xylopyranose liés en β -(1 \rightarrow 4) sur lequel sont greffés des résidus α -L-arabinofuranosyl au niveau des O-2 et/ou O-3 (Perlin, 1951; Fincher & Stone, 1986): on parle de mono-substitutions en O-2, de monosubstitutions en O-3 et de di-substitutions en O-2/O-3.

Des acides phénoliques peuvent estérifier les AX au niveau de la position O-5 de certains résidus d'arabinose (Figure 4) (Smith & Hartley, 1983; Ahluwalia & Fry, 1986). Mueller-Harvey et al. (1986), Hartley et al. (1990) ont montré que les acides féruliques étaient portés par les résidus arabinose mono-substitués en O-3 sur le squelette de xylose (Mueller-Harvey *et al.*, 1986; Hartley *et al.*, 1990). Les acides phénoliques ont un rôle structural important par leur capacité à se dimériser, par couplage oxydatif, et ainsi établir des ponts entre les chaînes d'AX.

20 à 35 % des AX sont hydro-solubles (water extractable AX ou WE-AX). Les teneurs en AX de l'albumen ainsi que la répartition solubles /insolubles sont assez variables d'une variété à l'autre et sont également influencées par les facteurs agro-culturaux, les climats chauds et secs



Figure 3 : Structure de base des arabinoxylanes et types de liaisons rencontrées (Ara*f*: arabinofuranose, Xyl*p* ; xylopyranose, A.Fé : acide férulique)



Figure 4 : Structure chimique d'arabinoxylanes (Smith & Hartley, 1983).

favorisant une teneur plus élevée en AX (Henry, 1986; Andersson *et al.*, 1994; Andersson *et al.*, 1993; Lempereur *et al.*, 1997). Les AX hydro-solubles des grains de céréales ne proviennent que de l'albumen amylacé (Voragen *et al.*, 1992). Pour le blé, la farine blanche est essentiellement constituée par l'albumen amylacé et représente de 70 à 75 % du poids du grain, les arabinoxylanes hydro-solubles représentent 0,3 à 0,8 % du poids de la farine.

2.1.1.1.3 Hétérogénéité structurale des arabinoxylanes au sein de l'albumen

Les principales différences de structure des AX portent sur le degré de substitution de la chaîne de xylose par les résidus arabinose (exprimé par le rapport Ara/Xyl), les proportions relatives de mono- et di-substitutions, et la teneur en acide férulique.

L'hétérogénéité de composition et de structure des AX hydrosolubles a été démontrée par différentes techniques de fractionnement : précipitation sélective par le sulfate d'ammonium ou par l'éthanol, chromatographie d'échange d'anions ou d'exclusion stérique (Izydorczyk & Biliaderis, 1995; Vinkx *et al.*, 1993; Dervilly *et al.*, 2000). En moyenne, un rapport Ara/Xyl de 0,6 est trouvé pour les AX hydrosolubles d'albumen de blé (Izydorczyk & Biliaderis, 1995), mais en combinant fractionnement par précipitation à l'éthanol et chromatographie d'exclusion stérique, Dervilly et al ont isolé des populations d'AX avec des rapports A/X variant de 0,4 à 1,1 à partir d'une population initiale présentant un rapport A/X de 0,56 (Dervilly *et al.*, 2000; Dervilly-Pinel *et al.*, 2001b). Cleemput et al. (1995a) et Hoffmann et al. (1991) ont montré, par précipitation fractionnée par l'éthanol, que le rapport Ara/Xyl augmente (0,43 à 0,82) quand la teneur en éthanol à laquelle les fractions ont été obtenues augmente de 20 à 60% (Cleemput *et al.*, 1995a; Hoffmann *et al.*, 1991). Ces mêmes auteurs ont montré que l'augmentation de la teneur en éthanol s'accompagne d'une diminution de la teneur en résidus xylose non substitués (Xyln) ou mono-substitués en O-3 (Xylm), alors que celle en résidus xylose di-substitués (Xyld) augmente.

Des conclusions identiques ont été obtenues après fractionnement par précipitation par le sulfate d'ammonium. Les AX hydro-solubles de blé (Mares & Stone, 1973b; Izydorczyk & Biliaderis, 1992) obtenus ont un degré de substitution qui augmente avec le degré de saturation en $(NH_4)_2SO_4$. Le rapport Ara/Xyl des AX de blé varie de 0,58 à 0,88 quand le pourcentage de saturation en $(NH_4)_2SO_4$ varie de 55 à 100%. Les proportions relatives de chaque type de substitution des résidus xylose varient dans le même sens qu'après précipitation fractionnée à l'éthanol. Il apparaît aussi que la teneur en résidus xylose

terminaux augmente avec la teneur en $(NH_4)_2SO_4$, alors que les teneurs en acides féruliques diminuent.

L'ensemble de ces travaux démontre que des populations d'AX de structure différentes coexistent au sein des extraits aqueux d'albumen ou de farine de blé. Ces études ont été réalisées sur farine entière, rendant impossible la détermination de l'origine de ces différentes populations au sein de l'albumen. Delcour et al. (1999) ont montré en étudiant différentes fractions de mouture du grain de céréale que le rapport Ara/Xyl des AX hydrosolubles, augmentait de l'extérieur vers le centre du grain (Delcour *et al.*, 1999). Ce phénomène s'accompagnant de la diminution de la teneur en résidus Xyln et l'augmentation de celle en Xyld, la teneur en Xylm restant constante.

Il semble donc que l'hétérogénéité de structure et de composition des AX isolés à partir de farine reflète un gradient de structures entre le centre et les couches externes de l'albumen du grain de blé.

L'hétérogénéité structurale des AX a été abondamment décrite dans le cas des fractions hydrosolubles, mais les données sont plus rares pour les fractions hydro-insolubles qui représentent 75% des AX dans les parois de l'albumen. Ces AX hydro-insolubles ont été étudiés après solubilisation alcaline (Gruppen *et al.*, 1992a; Gruppen *et al.*, 1992b; Gruppen *et al.*, 1993b; Gruppen *et al.*, 1993a) ou enzymatique (Ordaz-Ortiz *et al.*, 2005). Globalement, la structure des AX hydro-insolubles est proche de celle des hydro-solubles et une forte hétérogénéité de la structure de ces fractions est également observée. Toutefois les AX hydro-insolubles ont un rapport A/X légèrement plus élévé, qui se traduit par une proportion de résidus mono-substitués (Xylm) plus forte et de non-substitués (Xylu) plus faible, tandis que la proportion de résidus di-substitués (Xyld) est comparable dans les deux fractions(Ordaz-Ortiz *et al.*, 2005).

Il existe également une variation spatio-temporelle du degré de substitution des AX en lien avec le stade de développement du grain (cf paragraphe 2.3, page 37).

2.1.1.1.4 Variabilité variétale des AX

Rattan et al. (1994) ont étudié des AX hydro-solubles provenant de 10 farines de blé différentes. Les résultats montrent d'importantes variations de composition, surtout dans les teneurs en protéines et en acides féruliques (Rattan *et al.*, 1994). Andersson et al. (1994) ont également étudié la variabilité structurale entre des AX hydrosolubles provenant de 20 farines

différentes (Andersson *et al.*, 1994). Leurs résultats montrent de forts coefficients de variation en ce qui concerne les différents types de substitution des résidus xylose. Saulnier et al. (1995) ont montré sur 22 farines de blé différentes que les teneurs en arabinoxylanes hydrosolubles ainsi que les viscosités des extraits aqueux variaient d'une farine à l'autre (Saulnier *et al.*, 1995). Ces résultats indiquent qu'il existe une forte variabilité entre variétés de la structure des AX hydrosolubles de l'albumen de blé. Les études sur 20 variétés de blé français (Ordaz-Ortiz *et al.*, 2005; Ordaz-Ortiz & Saulnier, 2005) ont montré que cette variabilité est également observée pour l'ensemble des AX de l'albumen (solubles et insolubles). Pritchard et al., 2011 ont étudié des AX provenant des blés différents. Les résultats (Tableau 1) montrent d'importantes variations des structures des AX (Pritchard *et al.*, 2011).

Le contrôle génétique des variations de la structure des AX hydrosolubles et de la viscosité des extraits aqueux de blé a été démontré par les travaux de Martinant et al. (1998, 1999). (Martinant *et al.*, 1999; Martinant *et al.*, 1998)La viscosité relative des extraits aqueux est essentiellement contrôlée par la teneur en AX hydrosolubles. Un locus à effets quantitatifs ou QTL (quantitative trait locus) associé aux variations de la viscosité relative et au rapport A/X a été établi sur le chromosome 1BL du croisement entre les variétés Synthetic et Opata. Ce QTL explique 32-37% des variations de teneur en AX et de viscosité relative et 35-42% des variations du rapport A/X (Martinant *et al.*, 1999; Martinant *et al.*, 1999).



Figure 5 : Les éléments structurels présents dans arabinoxylanes: (a) Xylp non-substitué, (b) Xylp monosubstitués en O-2 (c) Xylp monosubstitués en O-3 avec des résidus d'acide férulique estérifié à Araf et (d) Xylp disubstitué en O-2/O-3 (Izydorczyk & Dexter, 2008)

Group variety description	Starch (g kg ⁻¹)	AX (g kg ⁻¹)	NSP (g kg ⁻¹)	Ara/Xyl ratio	Average Ara/Xyl	No. of lines tested	MBG (g kg ⁻¹)	No. of lines tested	Grain weight (mg)
NWMMP lines	418.0-754.5	23.7-65.8	31.8-91.4	0.6-1.0	0.7	12	2.0-14.3	12	26.3-53.0
Tetraploid lines	524.5-837.5	33.6-69.2	31.7-93.4	0.5-0.9	0.7	24	3.0-6.8	88	20.1-74.6
Chinese elite lines	379.3-518.6	43.4-107.4	61.4-136.7	0.4-1.3	0.7	27	1.8-6.5	27	32.9-53.4
Primitive wheat	318.9-700.0	33.6-69.2	45.5-86.0	0.5-1.0	0.6	24	3.2-18.0	35	3.7-64.6
Triticale hexaploids	504.0-734.0	52.9-88.1	70.3-112.3	0.9-1.1	1.0	22	3.5-9.6	22	27.4-62.1
Wheat-barley addition lines	-	-	-	-	-	-	9.0-11.3	6	-
Hexaploid wheat varieties	43.6-70.7	37.5-83.0	42.5-94.9	0.5-1.2	1.0	96	2.2-11.8	338	16.2-59.1
CIMMYT synthetics	-	-	-	-	-	-	5.0-10.1	22	62.2-78.3
Total range	318.9-837.5	23.7-107.5	31.7-136.7	0.4-1.3	-	211	1.8-18.0	551	3.7-78.3

Tableau 1 : Composition d'arabinoxylanes et β -glucanes de blé provenant de blé différentes.

MBG : β -glucanes ; AX : arabinoxylanes (Pritchard *et al.*, 2011)

NSP : Non starch polysaccharides

MBG : Mixed link β -glucan

2.1.1.2 Modèle de structure des AX

Plusieurs modèles de structure pour les AX hydro-solubles et insolubles de l'albumen de blé ont été proposés (Figure 5, 6).

D'après les premières études menées à ce sujet (Ewald & Perlin, 1959; Goldschmid & Perlin, 1963), les AX hydro-solubles de blé sont principalement constitués de régions fortement substituées où des résidus xylose mono- ou di-substitués sont séparés par un seul résidu xylose non substitué. A intervalle de 20 à 25 xyloses, des régions plus « lisses » de 2 à 5 résidus xylose non substitués apparaissent.

Le modèle structural proposé par Izydorczyk et Biliaderis (1994) (Izydorczyk & Biliaderis, 1994) pour les AX hydro-solubles du blé diffère de celui proposé par Gruppen et al. (1993b) (Gruppen *et al.*, 1993b) pour les arabinoxylanes hydro-insolubles isolés de farine de blé par traitement alcalin et hydrolysés par une (1-4)-β-D-endo xylanase d'*Aspergillus*. Ces auteurs suggèrent que le polymère est constitué de deux régions distinctes : l'une, de structure constante, est très fortement disubstituée et riche en mono-substitutions en O-2, l'autre est une région moins dense en substitutions pouvant comporter des séquences non substituées de 7 résidus xylose. Ces deux régions alterneraient sur le polymère et les différences de rapports Ara/Xyl rapportées dans la littérature pour les AX hydro-insolubles seraient liées à des variations de proportions entre ces régions ainsi qu'à la composition de la région la moins substituée. De plus, les polymères hydro-insolubles contiennent moins de résidus xyloses substitués contigus que les hydro-solubles (Gruppen *et al.*, 1993b).

Par ailleurs, les études de modélisation de la distribution des résidus arabinose sur la chaîne de xylose indiquent que dans les AX hydro-solubles la di-substitution des résidus xylose est favorisée (Dervilly-Pinel *et al.*, 2004). Par contre, la distribution des zones substituées (indépendamment du type de substitution) semble correspondre à un modèle aléatoire. L'application d'un tel modèle à des AX présentant un fort taux de substitution (A/X = 1) ou un faible taux de substitution (A/X = 0.4) permet en effet de construire des polymères comportant des « clusters » de zones non substituées ou fortement substituées, et répondant aux résultats observés pour leur dégradation enzymatique ou leur oxydation périodique (Dervilly-Pinel *et al.*, 2004).

2.1.1.3 Biosynthèse des AX



Figure 6 : Modèles structuraux proposés pour les arabinoxylanes (a) hydro-solubles d'albumen de blé (Izydorczyk & Biliaderis, 1994), (b) hydro-insolubles d'albumen de blé (Gruppen *et al.*, 1993b), (c) hydro-insolubles d'orge (Vietor *et al.*, 1992) et (d) de seigle (Philippe, 2006)

- o et X : xylopyranose (m: monosubstitué, n: non-substitué)
- ♦ et A : arabinofuranose

La biosynthèse des polysaccharides pariétaux est un processus sous contrôle génétique secondaire, complexe et mal connu. L'élaboration des polysaccharides ne résulte pas, à l'image de la synthèse des protéines, de la simple transcription du code génétique, mais est contrôlée par la spécificité des différentes enzymes impliquées dans la polymérisation. Les précurseurs des polysaccharides pariétaux sont des nucléotides glycosylés qui sont synthétisés dans le cytoplasme de la cellule. Parmi ces oses activés, l'UDP-glucose est primordial car à partir de lui sont formés d'autres oses-nucléotides par isomérisation, déshydrogénation, décarboxylation. Ensuite, la polymérisation des macromolécules pariétales est assurée par des glycanes-synthases et des glycosyltransférases au niveau de deux sites : le plasmalemme et le système endomembranaire (réticulum endoplasmique et appareil de Golgi) (Figure 7). Comme pour les autres polysaccharides non cellulosiques, la biosynthèse des AX se déroule dans l'appareil de Golgi et ces derniers sont ensuite exportés vers la paroi par des vésicules de sécrétion (McCann *et al.*, 2000).

Différents types de molécules, en particulier des protéines, ont été proposés comme initiateurs de polymérisation, mais les mécanismes ne sont pas clairement établis (York & O'Neill, 2008).

Une grande variété de liaisons coexiste dans les AX, suggérant qu'au moins six activités enzymatiques différentes sont nécessaires. Elles sont divisées en trois classes d'enzymes pour l'assemblage des AX : glycosyltransferases (pour les liaisons glycosidiques), feruloyltransferases et enzymes oxidatives (dimérisation de l'acide férulique).

Chez les plantes, les glycosyltransferases représentent une grande famille multigénique avec plusieurs centaines de membres chez les mono- et dicotylédones. La présence et la conservation de ces gènes permettent une classification en sous familles. Seuls, quelques unes ont été particulièrement étudiées. La plupart des glyscosyltransferases ont été identifiées par homologie de séquences ou de motifs et insérées dans la base de données CAZY et peu d'entre elles ont été caractérisées du point de vue de leur fonction. Les activités glycosyltransférases requises pour la formation des trois liaisons glycosidiques majeures rencontrées dans les AX sont les liaisons β -(1→4) entre résidus xylose, β (1→2) et β (1→3) entre la xylose et l'arabinose.

La biosynthèse de la chaîne principale est catalysée par UDP-D-xylose: $(1\rightarrow 4)$ - β -D xylane 4- β -D-xylosyltransferase ou xylane-synthase, utilisant l'uridine 5'-diphosphoxylose (UDP-Xyl) comme substrat donneur. La preuve que le squelette de xylose est formé en premier (Porchia *et al.*, 2002) est apportée par le fait que l'activité arabinosyltransferase est dépendante de la



Figure 7 : Les sites de synthèse des polysaccharides et des protéines pariétales.

synthèse d'un squelette non substitué de xylose comme molécule acceptrice. La taille de la molécule acceptrice n'est pas connue. L'activité enzymatique pour la biosynthèse de xylanes a été détectée dans des tissus comportant des parois en voie de secondarisation (Gregory *et al.*, 2002) mais aussi dans des jeunes plants de blé (Porchia & Scheller, 2000; Kuroyama & Tsumuraya, 2001) et également dans l'albumen de grain d'orge (Urahara *et al.*, 2004).

Dans l'albumen du grain d'orge, l'activité maximale pour une β -(1 \rightarrow 4) xylosyltransferase intervient entre 13 et 14 jours après anthèse. Toutefois, le dépôt des AX se poursuit alors que l'activité de cette enzyme a chuté (25 jours après anthèse), suggérant la présence d'autres β -(1 \rightarrow 4) xylosyltransferases.

Des activités xylane-synthases (Gregory *et al.*, 2002; Porchia & Scheller, 2000; Bolwell & Northcote, 1983) et arabinosyltransferases(Porchia *et al.*, 2002) ont été détectées au niveau de l'appareil de Golgi.

Les enzymes impliquées dans la féruloylation des AX et leurs gènes restent à identifier. Cependant, des études réalisées sur des cultures de cellules en suspension de maïs (Obel *et al.*, 2003) et de blé (Fry *et al.*, 2000) avec de l'arabinose marqué ³H et de l'acide férulique marqué ¹⁴C suggèrent une féruloylation intracellulaire des AX. La dimérisation de l'acide férulique intervient probablement principalement dans la paroi cellulaire, toutefois différents travaux (Obel *et al.*, 2003; Fry *et al.*, 2000) indiquent que cette dimérisation peut également se dérouler intracellulairement, au moins pour le dimère 8-5'.

L'une des difficultés rencontrée pour l'étude de la biosynthèse des AX provient du fait que les AX isolés à partir du matériel pariétal résultent également de modifications/remodelages survenant dans la paroi. Nous pouvons mentionner

- la réticulation de l'acide férulique sous l'action de laccase ou peroxidases.

- l'élimination de résidus arabinose par une arabinofuranosidase.

Une arabinofuranohydrolase a été isolée à partir de jeunes plantules d'orge (Lee *et al.*, 2001). Le remodelage des AX a également été décrit lors de la croissance et le développement du coléoptile d'orge (Gibeaut *et al.*, 2005). Selon Gibeaut et Carpita (1991) (Gibeaut & Carpita, 1991), les AX nouvellement synthétisés seraient fortement substitués. La substitution serait garant de la solubilité de ces AX et faciliterait leur transport par le système endomembranaire. Lors de la maturation des cellules, l'élimination de résidus arabinose pourrait conduire à une perte de la solubilité des AX et un renforcement de la paroi à travers des interactions impliquant des liaisons hydrogène entre les AX et les $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ - β -glucanes (Izydorczyk & MacGregor, 2000). La présence dans l'appareil de Golgi ou dans la paroi de glycosylhydrolases impliquées dans la biosynthèse des AX n'est pas exclue. Dans le cas de la cellulose par exemple, une endoglucanase a été identifiée comme étant impliquée dans sa biosynthèse au même titre que des glyscosyltransférases connues comme cellulose-synthase (CesaA) de la famille GT2.
2.1.2 Les β-glucanes

Le terme de β -glucanes désigne une vaste famille de polysaccharides composés par des monomères de D-glucose en configuration β et assemblés par différents types de liaisons glycosidiques. Le type de ces liaisons $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4, 1\rightarrow6)$ et leur répartition affecte fortement la conformation des chaînes de β -glucanes et les propriétés d'association et de solubilité qui en découlent. Les parois de l'albumen des céréales contiennent des proportions importantes de $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucanes ou β -glucanes mixtes et sont pratiquement dépourvues de cellulose. Le taux de β -glucanes dans les grains de céréales est influencé par des facteurs génétiques et/ou d'environnement. Les teneurs en β -glucanes dans les grains d'orge (2,5 à 11,3%), d'avoine (2,2 à 7,8%), de seigle (1,2-2,0%), et de blé (0,4 à 1.4%) varient considérablement (Andersson *et al.*, 1999; Fleury *et al.*, 1997; Han *et al.*, 1995).

2.1.2.1 Hétérogénéité structurale et variabilité des (1-3, 1-4)-ß-glucanes

Les $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ -ß-glucanes sont exclusivement constitués par des résidus D glucopyranose arrangés en blocs de résidus ß-D glucose liés par les liaisons $(1\rightarrow4)$ séparés par une simple liaison $(1\rightarrow3)$. La structure résultante est un polysaccharide majoritairement composé de cellotriosyles (58-72%) et de cellotetraosyles (30-34%) liés par des liaisons ß- $(1\rightarrow3)$ (Figure 8). Il peut néanmoins comporter en quantité mineure des séquences composées de 5 - 10, jusqu'à 14 résidus glycosyles consécutifs liés par des liaisons $(1\rightarrow4)$ (Cui *et al.*, 2000). Selon la littérature, bien que la distribution des liaisons β - $(1\rightarrow3)$ ne soit pas aléatoire, les blocs cellotriosyles et cellotetraosyles seraient distribués de façon aléatoire au sein du polysaccharide (Staudte *et al.*, 1983).

Les travaux de caractérisation ont surtout été réalisés sur les $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ -ß-glucanes de grains d'orge, où ils constituent le composant majoritaire des parois des cellules de l'albumen (Forrest & Wainwright, 1977). Les $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ -ß-glucanes ont été isolés à partir d'autres céréales et quelques variations de structure entre l'orge, l'avoine, le blé et le seigle ont été mises en évidence (Cui *et al.*, 2000; Wood, 2004; Lazaridou & Biliaderis, 2004; Tosh *et al.*, 2004).

Ces variations de structure chimique peuvent être appréhendées à travers le rapport des unités cellotriosyles et cellotetraosyles produites lors de l'hydrolyse par une enzyme spécifique : la



Figure 8 : (A) Distribution des liaisons des $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ -ß-glucanes d'orge (B) conformation putative des chaones de $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ -ß-glucanes (Izydorczyk & Dexter, 2008)



 $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ - β -D-glucan,-4-glucane-hydrolase. Le rapport trisaccharide/tétrasaccharide varie entre 3,7 et 4,5 pour le grain de blé, 2,8 et 3,3 pour le grain d'orge et entre 2,0 et 2,4 pour le grain d'avoine (Cui *et al.*, 2000; Lazaridou & Biliaderis, 2004; Tosh *et al.*, 2004).

2.1.2.2 Biosynthèse des (1→3, 1→4)-β-glucanes

L'étude *in vitro* de la synthèse des $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucanes à partir de membranes golgiennes isolées a permis de comprendre les étapes de polymérisation de ce polysaccharide. L'activité de la $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucane-synthase *in vitro* produit un polymère contenant une distribution d'unités cellotriosyles et cellotetraosyles identique à celle d'un $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucane natif. Cette activité est localisée au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi (Gibeaut & Carpita, 1991) et nécessite notamment la présence de Mg²⁺ (ou Mn²⁺). L'activité *in vitro* de la $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucane-synthase requiert, comme pour la synthèse de la cellulose, une membrane intacte afin de maintenir un gradient de pH (Gibeaut & Carpita, 1991) et un potentiel de membrane (Carpita & Demer, 1980). Ceci indique une orientation topologique semblable dans la membrane pour la $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucane-synthase et la cellulosesynthase, avec le site actif faisant face au côté cytosolique de la membrane et l'extrusion du polymère de la membrane vers l'extérieur de la cellule pour la cellulose ou dans le lumen du Golgi pour le $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucane.

Si la $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucane-synthase dérive d'une cellulose-synthase ancestrale et possède un mécanisme de synthèse similaire, une partie de ce mécanisme doit inclure l'association d'une sucrose-synthase pour l'approvisionnement en UDP-Glc au site actif de la $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucane synthase. Le complexe de la $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucane-synthase comprendrait alors une partie cellulose-synthase-like (CSL) produisant des unités cellobiosyles et les unités paires de cellodextrines, et une glycosyltransferase distincte ajoutant un troisième résidu glycosyl pour former les unités cellotriosyles et les unités impaires plus longues.

Ce modèle proposé pour la $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ -ß-glucane synthase a été confirmé par les travaux d'Urbanowicz et al. (2002 ; 2004) (Urbanowicz *et al.*, 2004; Urbanowicz *et al.*, 2002) qui ont montré que la synthèse des unités impaires procède par un mécanisme différent de celui des unités paires. Une glycosyltransférase sensible aux protéases a pu être dissociée de la partie du complexe responsable de la synthèse des unités paires.

Le complexe de la $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ - β -glucanes-synthase comprend donc une partie cellulosesynthase-like qui produit les unités cellobiosyles et les unités paires de cellodextrines, et une glycosyltransferase distincte qui ajoute un troisième résidu glycosyle pour former les unités cellotriosyles et les unités impaires plus longues.

Compte tenu de la similarité chimique entre la cellulose et les $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucanes, il apparaît logique que les gènes codant pour les $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucane-synthase appartiennent à la famille des cellulose synthase like (CSL). De nombreuses sous familles des gènes CSL ont été identifiées chez les plantes et désignées de CSLA à CSLH (Richmond & Somerville, 2000; Dhugga, 2001). Deux classes (CSLF et CSLH) sont spécifiques des graminées. Burton et al. (2006) (Burton *et al.*, 2006) ont démontré que des membres de la sous famille CSLF étaient de bons gènes candidats pour la synthèse des $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucanes et la suppression de l'expression de ce gène par des techniques d'ARN interférence (RNAi), diminent la quantité de β -glucanes dans l'albumen de blé (Nemeth *et al.*, 2010).

2.2 Cinétique de dépôt et distribution des polymères dans les parois

La cinétique de dépôt et la distribution des AX et des $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ -ß-glucanes des parois de l'albumen du grain de blé au cours de son développement ont été étudiées *in situ* par Philipe et al. (Philippe *et al.*, 2006a; Philippe *et al.*, 2006c).

Les (1,3)-ß-glucanes ont été détectés dans les parois des cellules de l'albumen en formation au stade 45°JAA (somme de la température accumulée par jour après anthèse ; JAA). Ils sont présents de façon transitoire : dès que l'albumen est cellularisé (72°JAA), les (1,3)-ß-glucanes ne sont plus détectés dans la paroi. Ces résultats sont en accord avec les observations rapportées par Morrison et O'Brien (1976) et Brown et al. (1994; 1997) (Brown et al., 1994; Brown et al., 1997) sur l'albumen des grains en développement de blé, d'orge et de riz. Les (1,3,-1,4)-ß-glucanes sont absents à 45°JAA et détectés à 72°JAA (Morrison & O'Brien, 1976). Ils sont ensuite présents tout au cours du développement du grain et dans le grain mature. En microspectroscopie FT-IR, au delà de 245°JAA, ils ne sont plus détectés dans les parois de l'albumen amylacé car masqués par le spectre d'absorption des AX. L'immunocytochimie révèle qu'au stade 72°JAA, les (1,3-1,4)-ß-glucanes sont distribués de façon homogène dans les parois minces de l'albumen encore indifférencié. Au début du stade de différentiation (245°JAA), la couche la plus externe se différencie en couche à aleurone et un important dépôt de (1-3, 1-4)-B-glucanes est observé sur la face intérieure des parois de ces cellules ; dans les cellules de l'albumen amylacé le dépôt est moins important. À la fin du stade d'accumulation des produits de réserve (445°JAA), l'importance et la distribution des

(1,3,-1,4)-ß-glucanes dans les parois des cellules à aleurone sont proches de celles observées dans le grain mature (Guillon *et al.*, 2004). Dans l'albumen amylacé, la distribution des (1,3,-1,4)-ß-glucanes varient selon la position des cellules, les parois des cellules centrales étant plus intensément marquées que les cellules prismatiques (Figure 9). En outre, les (1,3-1,4)-ß-glucanes sont distribués sur toute la largeur des parois, à l'exception de la lamelle moyenne. Dans l'albumen amylacé de grain de blé mature, les (1,3 - 1,4)-ß-glucanes sont confinés sur la face intérieure des parois (Figure 10, Guillon *et al.*, 2004).



Figure 9 : Hétérogénéité de structure des AX (A/X) et de compositions (AX/BG) des parois dans les parois de l'albumen.



Figure 10 : Immunomarquage des BG dans les parois d'aleurone. ACW parois d'aleurone; J : jonction cellulaire; Bars: 0,5 μm (Guillon *et al.*, 2004).

Les divergences de distribution des (1,3-1,4)-ß-glucanes au sein des parois de l'albumen amylacé des grains à 445°JAA et des grains matures suggère que les (1,3-1,4)-ß-glucanes peuvent subir des modifications supplémentaires après 445°JAA, comme une hydrolyse. Une autre possibilité est que l'épitope (1,3,-1,4)-ß-glucanes dans le grain mature soit masqué par le dépôt d'autres polymères.



Organisation lamellaire

Figure 11 : Localisation et organisation des AX et des BG dans la paroi de la couche aleurone du grain de blé.

MET: Microscopie électronique à transition, AFM: Microscope à force atomique

Dans le grain mature les AX sont les constituants majeurs des parois de l'abumen. Ils sont distribués sur toute l'épaisseur de la paroi et abondants dans les zones de jonctions et en particulier à l'interface nucelle-couche à aleurone. Les AX ne sont pas présents lors des premiers stades de développement du grain et s'accumulent lors de la différenciation cellulaire (245°JAA). À ce stade la longueur finale du grain est presque atteinte et les AX contribuent vraisemblablement au renforcement du réseau de polymères au sein de la paroi. Une hétérogénéité dans la distribution des $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ -ß-glucanes et des AX en fonction des types cellulaires de l'albumen amylacé est observée à partir du stade de différenciation. L'observation en microscopie (MET et AFM) des parois d'aleurone révèle une structure lamellaire avec une distribution alternée des β -glucanes mixtes et des AX tandis que dans l'albumen amylacé les AX sont uniformément distribués sur l'épaisseur de la paroi et les β glucanes sont concentrés du côté du lumen cellulaire (Figure 11). Les parois des cellules des régions périphériques de l'albumen amylacé sur la base de l'intensité de marquage semblent contenir moins de $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ - β -glucanes et d'AX. Ces différences d'immunomarquage peuvent résulter d'artéfacts associés à la préparation des échantillons ou dans le cas des AX, de variations spatiales de leur degré de substitution.

2.3 Variation spatio-temporelle du degré de substitution des AX

Des observations menées en microspectrocopie FT-IR et Raman indiquent que les AX sont plus substitués au stade 245°JAA qu'aux stades ultérieurs (Robert *et al.*, 2011, Figure 12). De plus les AX dans la région périphérique de l'albumen amylacé sont plus substitués que ceux des cellules centrales (Saulnier *et al.*, 2009). Les AX des cellules à aleurone sont caractérisés par un faible degré de substitution comparé aux AX des cellules de l'albumen amylacé (Antoine *et al.*, 2003). D'une manière surprenante, en terme de substitution des AX, les parois des cellules à aleurone modifiées semblent être plus proches des parois des cellules centrales que des parois des cellules à aleurone. Les AX des parois des cellules prismatiques sont les plus substitués (Philippe *et al.*, 2006a).

La diminution de la substitution des AX au cours du développement du grain pourrait résulter soit d'une modification des AX natifs fortement substitués *in muro*, sous l'action d'une arabinofuranohydrolase, soit de l'incorporation d'AX plus faiblement substitués en fin de la période d'accumulation rapide des réserves. Une arabinofuranohydrolase spécifique des AX a été purifiée dans de jeunes plants d'orge (Lee *et al.*, 2001). Des modifications des AX ont également été observées pendant le développement et la croissance de coléoptile d'orge

(Gibeaut *et al.*, 2005). Des hypothèses ont été formulées pour expliquer cette évolution. Ainsi le fort taux de substitution des AX nouvellement synthétisés favoriserait leur solubilité et leur transport par le système endomembranaire (Gibeaut & Carpita, 1991). Par ailleurs l'élimination des résidus arabinose pourrait ensuite favoriser les interactions de type hydrogène avec les $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ - β -glucanes (Izydorczyk *et al.*, 2000) et renforcer l'architecture pariétale.



Figure 12 : Evolution des parois cellulaires au cours du développement du grain de blé (Philippe, 2006).

2.4 Propriétés Physico-chimiques et implications technologiques des AX

Bien qu'ils ne représentent que 2 à 3% du poids de la farine (0,3 à 0,7% pour les AX hydrosolubles), les AX jouent un rôle important dans la consistance des pâtes boulangères et biscuitières, dans la qualité et la conservation des produits de cuisson ainsi que dans la viscosité du moût en malterie/brasserie, (Courtin & Delcour, 2002; Saulnier *et al.*, 2007). En alimentation animale dans le cas du blé et du seigle, un effet antinutritionnel est attribué aux AX hydrosolubles (Annison & Choct, 1991; Choct & Annison, 1992; Austin *et al.*, 1999). L'augmentation de la viscosité des digesta, liée à la présence des AX ou des beta-glucanes mixtes, est un des mécanismes impliqués dans la mauvaise digestibilité de ces céréales par les volailles. Cette viscosité élevée perturberait le transport des nutriments et des solutés à travers la lumière intestinale et entraînerait une malabsorption de l'amidon, des protéines, des lipides et des vitamines liposolubles.

Le rôle technologique des AX est donc lié essentiellement aux propriétés d'interaction avec l'eau et aux propriétés de solubilité, viscosité et gélification de ces polymères. Toutefois, Les données bibliographiques concernant le rôle technologique des AX sont parfois contradictoires en raison du degré de pureté et de la composition des extraits d'AX, mais aussi des méthodes d'isolement qui conduisent parfois à des altérations de structure et de propriétés physico-chimiques.

2.4.1 Impact de la conformation des AX

Les propriétés physico-chimiques (solubilité, viscosité, gélification...) des AX sont fortement régulées par les interactions avec les autres molécules (polymères ou solvant), interactions qui dépendent de la conformation structurale des AX.

La conformation des AX, et plus généralement celle des xylanes, est décrite dans la littérature comme étant une chaîne étendue formant un ruban torsadé ou hélice ayant trois résidus xylose par pas d'hélice (Settineri & Marchessault 1965; Marchessault & Settineri 1964) (Figure 13). Ce pas est de 1,49 nm ce qui donne une longueur de 0,5 nm pour un monomère de xylose projeté sur l'axe de la molécule de xylane (Atkins 1992). La conformation étendue des xylanes est souvent comparée à celle des polysaccharides liés en β -(1 \rightarrow 4) tels que la cellulose ou les mannanes (Atkins 1992). Cette conformation étendue est expliquée par le fait que les carbones 1 et 4 sont aux extrémités opposées du cycle pyranosique.



Figure 13 : Conformation d'une chaîne de xylane. Représentation des liaisons hydrogènes entre les atomes O3 et O5 de résidus consécutifs (Fincher &Stone, 1986).

Les termes « étendu » et « linéaire » étant souvent associés, par ces auteurs, à la rigidité du polymère. Ces molécules sont alors décrites comme des polymères « rigides ». Cependant, les xylanes sont plus flexibles qu'une hélice de cellulose, qui contient deux résidus glucose par tour d'hélice. En effet, il n'existe qu'une seule liaison hydrogène stabilisatrice entre deux résidus xylose adjacents (Marchessault & Settineri 1964) alors qu'il y en a deux entre les résidus glycosyles adjacents de la cellulose (Gardner & Blackwell, 1974; Fincher & Stone, 1986). Cette liaison s'établit entre l'hydrogène du groupement hydroxyle en position d'un résidu xylose et l'oxygène en position 5 du résidu suivant (Figure 13) (Marchessault & Liang, 1962). Ainsi, la simple substitution par un hydrogène chez les xylanes induit des modifications importantes au niveau de l'établissement de liaisons hydrogène intra- et inter-chaînes.

A partir de la détermination de la masse molaire et de la viscosité intrinsèque d'AX hydrosolubles en solution, Andrewartha et al. (1979) ont conclu que les AX adoptaient une conformation de type ruban torsadé rigide étendu. D'après ces auteurs (Andrewartha *et al.*, 1979; Kacurakova *et al.*, 1994) la présence sur la chaîne de xylose de substituant monomérique d'arabinose modifierait la conformation des AX. Les résidus arabinose stabiliseraient le squelette de xylose dans une conformation étendue, asymétrique et globalement plus rigide. Le caractère asymétrique de la molécule a été suggéré par la forte valeur du « rapport axial » (longueur/largeur du polymère) = 140 pour les arabinoxylanes de l'albumen de blé (Andrewartha *et al.*, 1979).

Toutefois, l'étude cristallographique et la modélisation moléculaire de xylanes fortement substitués en O-2 et O-3 par des résidus de α -L-arabinofuranose indiquent que la structure de base de l'hélice à trois résidus par tour est conservée (Atkins 1992; Yui *et al.*, 1995). Cela laisse supposer que les substitutions affectent peu la conformation des xylanes qui reste globalement la même pour les AX.

Plus récemment, la conformation des AX de blé a été étudiée par HPSEC-MALLS et viscosimétrie par Dervilly-Pinel et al. (2001) (Dervilly-Pinel *et al.*, 2001b). Ces études montrent que les AX sont des polysaccharides semi-flexibles adoptant une conformation de type pelote statistique en solution quel que soit leur degré de substitution. La rigidité de la chaîne (évaluée par la longueur de persistence : Lp = 8nm) est comparable à celle des galactomannanes (Lp = 4.5-9 nm) qui ont également un comportement de pelote statistique et sont utilisés comme épaississants dans l'industrie agro-alimentaire. Cette rigidité est très inférieure aux systèmes assimilés à des « batônnets rigides » comme les xanthanes ou les schizophyllanes (Lp = 100-150 nm). Ces résultats sur les AX, confirmés par l'étude de Picout

et Ross-Murphy (2002) (Picout & Ross-Murphy, 2002), sont en contradiction avec la conformation régulièrement reprise dans la littérature et erronée de type « bâtonnet rigide », proposée par Andrewartha et al. (1979). En effet, ces auteurs ont fortement sous estimé la masse molaire de leurs AX (65 000 g/Mole), ce qui a conduit à déterminer un rapport axial anormalement élevé. À partir de la viscosité intrinsèque des AX utilisés par ces auteurs [ŋ]=620 mL/g, la masse molaire moyenne de leurs AX peut être calculée en utilisant l'équation de Mark-Houwink établie par Dervilly-Pinel et al. (2001) ; cette valeur est de 380 000 g/Mole, soit six fois plus forte que la valeur rapportée par Andrewartha et al. (1979).

2.4.2 Solubilité des AX

La solubilité des AX hydro-solubles ainsi que celle des AX issus d'extractions alcalines, dans l'eau ou dans des mélanges eau/éthanol, ne doit pas être confondue avec leur extractabilité naturelle qui distingue les AX hydro-solubles et insolubles dans l'eau. Plusieurs facteurs sont à prendre en compte dans l'explication de la solubilité des AX. Parmi ces facteurs, la masse molaire, le nombre et la distribution des substituants ainsi que l'enchevêtrement des macromolécules semblent les plus importants.

Il a été montré que la solubilité des AX dépend essentiellement de leur degré de substitution A/X (Neukom *et al.*, 1967; Andrewartha *et al.*, 1979). L'absence de résidus arabinose diminuerait leur caractère hydro-soluble. La distribution des substituants aurait également une influence sur les interactions avec le solvant. Ainsi, l'existence de zones non substituées favoriserait la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires aboutissant à des associations chaîne-chaîne qui diminueraient l'hydro-solubilité (Andrewartha *et al.*, 1979).

L'influence de l'arabinose sur la solubilité est confirmée par les expériences de précipitation fractionnée à l'éthanol. Ainsi aux basses concentrations d'éthanol, les fractions de faibles A/X précipitent, tandis que l'augmentation de la concentration en éthanol induit la précipitation des fractions les plus substituées ou avec des rapports A/X plus élevés (Cleemput *et al.*, 1995b; Dervilly *et al.*, 2000).

Enfin, la présence d'acide férulique, de par la formation de ponts diféruliques entre deux chaînes d'arabinoxylanes, peut diminuer également l'hydro-solubilité (Mares & Stone, 1973b; Ribka *et al.*, 1993). La masse molaire des AX est également un paramètre important, récemment rapportée pour être en moyenne de 300 000 à 400 000 g/mol. Les faibles masses molaires favorisent la solubilité dans les mélanges eau/éthanol (Dervilly *et al.*, 2000; Courtin & Delcour, 1998).

2.4.3 Viscosité des AX

La viscosité des solutions de polymères est directement reliée à leurs propriétés moléculaires fondamentales (conformation moléculaire, masse molaire, et distribution des masses) et à la concentration du polymère. Les AX hydro-solubles ainsi que les AX obtenus après extraction alcaline forment des solutions visqueuses dans l'eau. La viscosité intrinsèque ([η]) est utilisée pour comparer les comportements des polymères en solution diluée. Les valeurs rapportées pour la viscosité intrinsèque des AX hydro-solubles de l'albumen de blé varient entre 80 et 620 mL/g (Andrewartha *et al.*, 1979; Izydorczyk & Biliaderis, 1992; Rattan *et al.*, 1994; Saulnier *et al.*, 1995). Ces variations de viscosité reflètent essentiellement des différences de masse molaire des AX (degré de polymérisation du squelette de xylose). Ainsi ces variations pourraient être liées à une moindre polymérisation pendant la biosynthèse ou à la présence d'endoxylanases endogènes modulant les masses molaires *in situ* ou pendant l'isolement des polymères (artefacts d'extraction). La viscosité d'un extrait aqueux de farine de blé est essentiellement contrôlée par la concentration en AX (Udy, 1956; Izydorczyk *et al.*, 1991), les protéines contribuant peu à cette viscosité.

Le couplage par ponts diféruliques entre molécules d'AX pourrait augmenter la viscosité en raison de l'accroissement de la masse moléculaire du polymère (Dervilly *et al.*, 2000). Des interactions entre AX hydro-solubles et protéines dans les extraits aqueux pourraient également produire des solutions plus visqueuses que des solutions contenant uniquement des AX hydro-solubles (Udy, 1957).

2.4.4 Propriétés d'hydratation des AX

Les propriétés d'hydratation (c'est à dire l'absorption d'eau ou la capacité de rétention d'eau) des AX insolubles ont un impact fort sur les propriétés techno-fonctionnelles des AX. En effet, les AX insolubles peuvent modifier la distribution de l'eau parmi les différents composants des aliments. La présence et la répartition de l'eau sont des paramètres très critiques lors de la transformation des produits céréaliers (meunerie, panification, biscuiterie). Les AX hydro-insolubles ont la propriété d'absorber de 7 à 10 fois leur poids d'eau (Jelaca & Hlynca, 1971; Kim & Dappolonia, 1977). Ces valeurs indiquent une très forte affinité des AX pour l'eau. Toutefois ces déterminations ont été réalisées après l'addition d'AX à de la farine de blé et la mesure d'absorption a été effectuée dans un

farinographe. Ces auteurs préfèrent plutôt interpréter leurs résultats en terme de comportement d'absorption d'eau des AX dans le farinogramme. De la même façon, Bushuk (1966) (Bushuk, 1966) estime que 23 % de l'eau d'une pâte boulangère, est associée aux AX. Des études plus récentes indiquent un pourcentage d'eau associée plus faible, compris entre 15 et 20 % (Meuser & Suckow, 1986).

La capacité de liaison de l'eau par les AX hydro-insolubles a été déterminée comme étant la quantité d'eau non-congelable mesurable par DSC (Girhammar & Nair, 1992a) ou RMN (Andrewartha *et al.*, 1979). Une valeur d'environ 0.4 g/g a été obtenue, indépendamment de l'origine des AX (Seigle ou blé) ou de leur taux de substitution.

2.5 Propriétés physico-chimiques et implications technologiques des $(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)$ - β -glucanes

Peu d'informations sont disponibles sur l'impact des β -glucanes de l'albumen de blé sur les propriétés d'usage des produits dérivés. En conséquence, les propriétés physicochimiques des $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ - β -glucanes seront brièvement décrites.

Diverses études ont été menées sur les $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucanes d'orge et d'avoine pour leurs implications nutritionnelles et techno-fonctionelles (Wood, 2004). Chez les animaux monogastriques, ces polymères, en générant une forte viscosité des chymes, limitent la biodisponibilité des nutriments et la performance de croissance des animaux. Le pouvoir viscosifiant des $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucanes est regardé favorablement en nutrition humaine car il est impliqué dans l'action bénéfique des $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucanes sur la glycémie postprandiale et la cholestérolémie (Wood, 2004). En forte concentration les $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β glucanes d'orge produisent des solutions visqueuses qui perturbent les opérations de postmaltage de l'industrie brassicole.

La masse molaire apparente des $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ - β -glucanes est relativement élevée. Elle varie de 1,26 à 2,39 x 10⁶ Da, de 0,065 à 3,015 x 10⁶ Da, de 0,25 à 0,7 x 10⁶ Da pour respectivement l'orge (Papageorgiou *et al.*, 2005), l'avoine (Cui *et al.*, 2000; Cui & Wood, 2000) et le blé (Cui *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006). Ces variations peuvent refléter des variations dues à des facteurs génétiques mais également résulter des conditions de solubilisation des $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ - β -glucanes. Ainsi, Mac Cleary (1988) (MacCleary, 1988) mentionne que la masse molaire des $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ - β -glucanes augmente lorsque la température d'extraction est augmentée: les $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ - β -glucanes extrait à 90°C ont une masse molaire jusqu'à 30% supérieure à celle de ceux isolés à 37°C. Le choix des solvants pour mesurer la masse molaire est également un facteur important. Selon Li et al. (2006) (Li *et al.*, 2006), l'utilisation de solution NaOH 0,5 M permettrait d'éviter l'agrégation des $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucanes sans dégradation notable de ces derniers. Dans ces conditions, la valeur de masse molaire déterminée par HPSEC-MALLS qu'ils rapportent (0,33 x 10⁶ Da pour les $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucanes de blé) se situent dans la gamme des valeurs mentionnées ci-dessus. Ces auteurs ont également confirmé qu'en solution diluée, les $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - β -glucanes se comportaient comme des polysaccharides linaires adoptant une conformation en pelote statistique.

La présence de liaisons $(1\rightarrow 3)$ évite l'association forte des segments de type cellulosique et serait responsable de la solubilité apparente des $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ - β -glucanes dans l'eau. La solubilité des β-glucanes est apparemment corrélée avec le rapport des unités cellotriosyles / cellotetraosyles (DP3/DP4) et est décroissante de l'orge (ratio DP3/DP4 ~ 3) vers le blé (ratio DP3/DP4 ~ 4,5) (Cui et al., 2000). Dans l'eau, les β -glucanes forment des solutions visqueuses et sont également capables de gélifier. Ces propriétés rhéologiques comme pour les AX dépendent de la concentration du polymère, de sa masse molaire et de sa structure chimique. Le mécanisme de gélification n'est pas clairement établi. Deux modes d'interactions ont été proposés pour la nature des zones de jonction dans le gel. Le premier implique la formation de liaisons hydrogène entre les séquences de monomères liés en $\beta(1\rightarrow 4)$ comme décrit pour la cellulose. Une autre hypothèse est l'implication des unités cellotriosyles. Des études par diffraction des rayons X des $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ - β -glucanes d'orge montrent clairement que des unités consécutives de cellotriosyles sur deux polymères sont capables de former des complexes stables, antiparallèles, via des liaisons hydrogène (Tvaroska et al., 1983). La vitesse de développement du gel augmente avec la diminution de la masse molaire et l'augmentation du rapport DP3/DP4. La température de fusion du gel augmente avec la masse molaire et le rapport DP3/DP4. Ce comportement est associé à une plus grande extension des zones de jonction/ou une meilleure organisation des domaines ordonnés dans le gel. Les propriétés des gels sont affectées par la structure chimique des $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ - β -glucanes: leur élasticité augmente linéairement et le caractère cassant diminue avec la teneur en unités cellotriosyles (Lazaridou & Biliaderis, 2004).

2.6 Effet de l'environnement sur la composition du grain et des parois

2.6.1 Impact de la chaleur et de la sécheresse sur le développement du grain

Les contraintes environnementales sont les facteurs principaux limitant la productivité des cultures dans de nombreuses régions du monde (Shah & Paulsen, 2003). La température élevée et la sécheresse limitent fréquemment la croissance et la productivité des cultures, notamment du blé (Wigley & Raper, 2001; Bai *et al.*, 2004).

La température agit sur de nombreux processus: le développement, la production d'assimilats carbonés et azotés, la croissance des organes, etc... (Lawlor, 1994). La sécheresse est souvent combinée à des températures élevées et l'effet négatif de la combinaison sécheresse/température sur la croissance et la productivité des cultures est plus important que la sécheresse ou la chaleur seule (Savin & Nicolas, 1996; Wang & Huang, 2004).

La circulation de l'eau dans la plante se fait sur des gradients physiques. La plante ne dispose d'aucune pompe hydraulique. A l'échelle de la plante entière, l'eau circule dans la plante depuis le sol où elle est peu liée (potentiel hydrique proche de 0) jusqu'aux feuilles où elle est très liée (potentiel hydrique fortement négatif) et où elle est transpirée. Chaque organe de la plante peut être caractérisé par plusieurs grandeurs physiques, essentiellement le potentiel hydrique (énergie de liaison de l'eau) et la turgescence (pression interne des cellules). A l'échelle de chaque organe et de chaque cellule, le transfert s'opère exclusivement selon des lois physiques, mais la traversée des tissus se fait par un "modèle composite" (Steudle et al., 2001) comprenant soit des trajets qui contournent les cellules, indépendants des contrôles de la plante, soit en traversant les cellules, avec des contrôles possibles de la conductivité hydraulique des tissus.

L'ouverture et la fermeture des stomates se fait en fonction des conditions climatiques (chaleur, humidité, luminosité). Si la chaleur est combinée avec la sécheresse (manque d'eau), les plantes gardent leurs stomates fermés afin de réduire les pertes d'eau et ainsi la température des feuilles reste élevée (Rizhsky *et al.*, 2002).

Une augmentation de la température pendant la période post-floraison induit une diminution du poids d'un grain plus importante que la réduction de l'accumulation de l'azote (Stone & Nicolas, 1995; Zhang *et al.*). En effet, une augmentation de la température post-floraison se traduit par des modifications des vitesses (ou flux) et de la durée d'accumulation de la matière sèche du grain. La vitesse de croissance du grain dépend d'une part du nombre de cellules de

l'albumen (Singh & Jenner, 1984) qui assure un potentiel de synthèse et d'autre part de la disponibilité en assimilats azotés et carbonés. Les températures élevées activent la multiplication cellulaire mais diminuent la durée de la phase de formation cellulaire.

Ces contraintes combinées ont souvent des effets négatifs sur le rendement en grain. Pour les quantifier, on peut estimer l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) de la plante. C'est un paramètre physiologique important, qui indique l'adaptation des plantes au stress hydrique (Ray et al., 1999). WUE est le rapport entre le rendement en biomasse et la consommation en eau. Depuis que Farquhar et al. (1989) (Farquhar et al., 1989) ont montré qu'il y avait une forte corrélation entre le taux en isotope ¹³C et WUE des tissus de la plante, la technique de discrimination isotopique du carbone (Δ^{13} C) est beaucoup utilisée pour estimer le WUE. Alors que Hong et al (1989) montrent que la concentration en AX dans le blé augmente avec la sécheresse et la température pendant la floraison (Hong et al., 1989), Coles et al (1997) suggère qu'une sécheresse modérée augmente la concentration en AX du blé après la floraison (Coles et al., 1997). Ces travaux ont été contredits en 2003 par Laurentin et Douglas (2003) (Laurentin & Douglas, 2003) qui montrent que, la concentration en AX du blé après la floraison diminue en cas de sécheresse et d'augmentation de la température. L'incohérence de ces résultats doit être mis en relation avec la variabilité des lieux et des variétés testés. Ainsi la variation en composition des AX du grain en lien avec des génotypes et/ou un environnement différent n'est pas pleinement compris (Li et al., 2009). Les derniers travaux sur ce sujet datent de 2010. Zhang et al. (2010) ont étudié les effets de la sécheresse et des températures élevées sur le paramètre WUE et la concentration en AX du grain de blé, dans un environnement contrôlé (Zhang et al., 2010). L'étude indique que les facteurs environnementaux tels que l'eau disponible du sol et la température affectent à la fois les caractères physiologiques et la qualité du grain. La concentration en AX dans les céréales et le WUE des plantes augmentent à des températures élevées et dans le cas d'un déficit en eau (Tableau 2, 3). La relation entre le WUE et la concentration en AX est positive (Zhang et al., 2010).

Wheat Variety	Water regime	Temperature regime (°C)	Pn (μmol m ⁻² s ⁻¹)	Tr (mmol m ⁻² s ⁻¹)	Cond (mol m ⁻² s ⁻¹)	Ci (µmol mol ⁻¹)	WUEi (mol m ⁻² s ⁻¹)
Superb	Water-deficit	22/12	7.35 ^c	1.90 ^b	0.06 ^b	163.38 ^b	4.03 ^{ab}
	Well-watered	22/12 32/22	20.49 ^a 11.46 ^{bc}	10.39 ^a 3.68 ^b	0.68 ^a 0.12 ^b	309.28 ^a 207.97 ^b	1.99 ^b 3.19 ^{ab}
AC Crystal	Water-deficit	22/12 32/22	10.12 ^{bc} 8.87 ^{bc}	2.86 ^b 1.88 ^b	0.11 ^b 0.05 ^b	182.31 ^b 183.47 ^b	3.93 ^{ab} 6.31 ^a
	Well-watered	22/12 32/22	18.34 ^{ab} 13.27 ^b	10.29 ^a 4.50 ^b	0.69ª 0.17 ^b	302.92 ^a 216.78 ^b	1.99 ^b 3.33 ^{ab}
Analysis of varian	ce (F values and their	significance)					
Variable	Variety (V) Temperature Water (W) $V \times T$ $V \times W$ $T \times W$ $V \times T \times W$	(7)	2.07 ^{ns} 22.61** 80.68** 1.15 ^{ns} 2.67 ^{ns} 11.94** 1.52 ^{ns}	0.77 ^{ns} 45.01** 101.88** 0.00 ^{ns} 0.03 ^{ns} 31.69** 0.78 ^{ns}	0.26 ^{ns} 32.71** 48.29** 0.00 ^{ns} 0.00 ^{ns} 26.55** 0.20 ^{ns}	0.36 ^{ns} 13.75** 50.46** 0.00 ^{ns} 0.24 ^{ns} 18.87** 0.35 ^{ns}	1.17 ^{ns} 3.22 ^{ns} 8.62** 1.34 ^{ns} 0.93 ^{ns} 0.05 ^{ns} 1.08 ^{ns}

Tableau 2: Echanges gazeux dans les deux blés printemps dans différentes conditions(Zhang et al., 2010).

* p <0,05 ; ** P <0,01 ; ns : non significatif ; Pn: photosynthèse foliaire ; Tr: transpiration foliaire ; Cond: conductance stomatique ; Ci: concentration interne en CO_2 ; WUEi: efficience instantanée de l'utilisation de l'eau.

Wheat variety	Water regime	Temperature regime (°C)	TAX (%)	WEAX (%)	WUAX (%)	Yield (g/plants)	Kernel weight (g)
Superb	Water-deficit	22/12	7.08 ^{ab}	1.06 ^c	6.02 ^a	9.98 ^b	0.0350 ^b
		32/22	8.10 ^a	1.58 ^a	6.52ª	1.75 ^{cd}	0.01 00 ^e
	Well-watered	22/12	6.45 ^b	0.90°	5.55°	13.79ª	0.0433ª
		32/22	7.19 ^{ab}	1.15 ^{bc}	6.04 ^a	3.24 ^c	0.0223 ^d
AC Crystal	Water-deficit	22/12	7.55 ^{ab}	1.17 ^{bc}	6.38*	10.64 ^b	0.0364 ^b
		32/22	7.29 ^{ab}	1.13 ^c	6.16 ^a	0.55 ^d	0.0157°
	Well-watered	22/12	6.49 ^b	0.96 ^c	5.52ª	14.80 ^a	0.0456ª
		32/22	7.95ª	1.55 ^{ab}	6.40ª	1.90 ^{cd}	0.0292°
Analysis of va	riance (F values and their sign	nificance)					
Variable	Variety (V)		0.34 ^{ns}	0.20 ^{ns}	0.22 ^{ns}	0.53 ^{ns}	0.65 ^{ns}
	Temperature (T)		14.50**	26.65**	5.21*	1202.00**	61.70**
	Water (W)		6.28*	2.01 ^{ns}	4.79*	80.27**	10.86**
	$V \times T$		0.51 ^{ns}	0.77 ^{ns}	0.21 ^{ns}	12.19**	7.05*
	$V \times W$		2.14 ^{ns}	9.84**	0.22 ^{ns}	0.03 ^{ns}	0.33 ^{ns}
	$T \times W$		3.41 ^{ns}	1.84 ^{ns}	2.28 ^{ns}	18.20**	6.38*
	$V \times T \times W$		6.66*	12.42**	2.36 ^{ns}	0.17 ^{ns}	0.01 ^{ns}

Tableau 3 : Rendement, poids du grain et concentration en arabinoxylane de deux blés

 printemps dans différentes conditions (Zhang *et al.*, 2010).

p <0,05 ; ** P <0,01 ; ns : non significatif ; TAX: arabinoxylanes totales. WEAX : Waterextractable arabinoxylans ; WUAX : Water-unextractable arabinoxylans.

2.6.2 Relation entre l'organisation des parois et l'état hydrique du grain

L'eau influence tous les processus de croissance et de développement (taille des cellules, flux des nutriments, arrêt de la croissance) du grain. Cependant, les transferts de l'eau au sein du grain dépendent de l'organisation des parois, de leur composition et de la structure de ses constituants principaux, paramètres qui varient fortement au cours du développement du grain.

Le grain croît très rapidement au cours des dix premiers jours après la fécondation. Entre 4 et 10 jours après la floraison, le grain est parfois appelé «eau-mûre» ou «pré-lait». Le grain augmente en taille d'environ trois fois au cours des quatre jours après la fécondation. Il y a un gonflement rapide des tissus du carpelle, à la fois le péricarpe et le sac embryonnaire; ces tissus entourant l'embryon fécondé. Cette croissance est réalisée par l'expansion des cellules, plutôt que la multiplication des cellules, dans les couches de cellules qui entourent le sac embryonnaire. Le remplissage du grain dure une vingtaine de jours au total. Les grains de 11 à 16 jours après la floraison présentent des changements dynamiques dans leur structure microscopique qui se produisent pendant la première étape du remplissage du grain (Figure 14) (Philippe *et al.*, 2006a).



Figure 14 : Coupes transversales de l'albumen du grain de blé (Triticum aestivum) à différents stades de développement. (Philippe *et al.*, 2006a)

° D: température cumulée quotidiennement par le grain après l'anthèse.

De façon très générale, la croissance du grain suit une courbe sigmoïde avec une phase de faible accumulation de matière sèche, une phase linéaire et enfin un plateau (Triboi, 1990) (Figure 15). Durant la phase initiale se détermine le nombre des cellules de l'albumen. L'importance de cette phase trouve son explication dans la relation étroite entre le poids sec final du grain et le nombre de cellules de l'endosperme (Macleod & Duffus, 1988). Durant la phase linéaire, la matière sèche s'accumule dans les cellules de l'albumen (Singh et Jenner, 1982). Cette phase se caractérise par deux variables déterminantes pour le poids du grain : la durée et la vitesse de remplissage. La quantité d'eau dans le grain reste relativement constante durant cette période (Singh & Jenner, 1982) (Geslin & Jonard, 1948). La phase de maturation du grain est marquée par un arrêt de l'accumulation de la matière sèche et une chute de la teneur en eau du grain. Cette étape s'accompagne de l'évolution des structures du grain conduisant à l'agrégation des protéines et à la création de la matrice protéique entourant les graines d'amidon dans l'albumen (Figure 16) (Foucat, 1999).

Foucat (1999) a étudié les évolutions de la distribution et de l'état de l'eau dans le grain de blé au cours de sa croissance par Résonance Magnétique Nucléaire (Foucat, 1999). L'acquisition des images RMN a été réalisée à l'aide d'une séquence « multi-échos ». Cette séquence permet d'obtenir, après traitement des données expérimentales, les cartographies des temps de relaxation T_2 et de la densité de protons. Les contrastes des images ainsi calculées rendent compte de la mobilité et de la concentration des molécules d'eau dans l'échantillon. La résolution de pixel est de 30 μ m² avec une épaisseur de tranche de 1 mm. Le temps d'acquisition est de l'ordre de 2 heures.

Les résultats montrent :

-Vers la fin de la période de croissance, l'eau dans le grain présente une activité hétérogène ; deux zones avec une activité intense ont été mises en évidence, une dans la région de vascularisation, et l'autre dans la couche interne du péricarpe (Figure16).

-Pour un même stade de développement l'activité de la couche interne est augmentée pour des températures élevées. Ce résultat nous interroge sur la relation fonctionnelle entre cette dynamique particulière de l'eau dans cette couche et les zones atypiques dans la couche sous –aleuronique.



Figure 15 : Croissance du grain chez le blé d'après Himi et al. (Himi et al., 2002).



Figure 16 : Image en densité de protons (coupes transversales). Echantillons prélevés à différentes dates (Foucat, 1999).

2.7 Réalisation et caractérisations de films d'hémicelluloses

2.7.1 Propriétés filmogènes des hémicelluloses

Les films et les revêtements à partir de matériaux renouvelables ont un potentiel pour de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire et médicale, dans le domaine des emballages alimentaires actifs, des pansements, ou encore des capsules de principes actifs (Guilbert *et al.*, 1997; Lin & Zhao, 2007; Malafaya *et al.*, 2007; Petersen *et al.*, 1999; Tharanathan, 2003). Les propriétés filmogènes de substances naturelles telles que hydrocolloïdes et/ou lipides, utilisés seuls ou en combinaison, permettent de créer des matériaux filmogènes. Les hydrocolloïdes naturels couramment utilisés sont :

- Des polyosides : dérivés de cellulose (propriétés thermoplastiques), amidon, pectines (issues de pommes), alginates et carraghénanes (issus d'algues), xanthanes (issus de micro-organismes), gommes (exsudats végétaux), chitosanes (issus de carapaces de crustacés) et hémicelluloses (issus des parois de céréales).
- Des protéines : protéines animales (gélatine, collagène, protéines de lait, kératine, protéines de poisson, protéines d'albumen d'oeuf), protéines végétales (gluten de blé, zéine de maïs, protéines de soja).

Les hémicelluloses étant des molécules hydrophiles, les films produits à partir de ces extraits sont généralement hygroscopiques, ce qui entraîne des propriétés mécaniques médiocres dans des environnements à forte humidité. Par ailleurs, l'utilisation d'un plastifiant est souvent nécessaire pour assurer la flexibilité de ces matériaux. Les plastifiants utilisés plus couramment pour les films d'hémicellulose sont le sorbitol, le glycérol et le xylitol (Hansen & Plackett, 2008).

L'abondance des groupes hydroxyles libres distribués sur les squelettes longs et les chaînes latérales des hémicelluloses les définit comme candidat idéal pour la fonctionnalisation chimique (Lindblad & Albertsson, 2005). Les propriétés telles que la cristallinité, la solubilité et l'hydrophilie peuvent être modifiées par la fonctionnalisation des groupes hydroxyles des hémicelluloses, par voie d'estérification, d'éthérification, ou via des méthodes de greffage (Lindblad & Albertsson, 2005). L'acétylation des hémicelluloses peut être effectuée afin d'augmenter leur hydrophobicité. La sulfatation a été utilisée pour améliorer l'activité

biologique. Les réactions d'éthérification, y compris carboxyméthylation, l'alkylation, et benzylation ont également été explorées (Lindblad *et al.*, 2005; Hansen & Plackett, 2008; Lindblad & Albertsson, 2005).

2.7.2. Caractérisation de films d'AX et de β -glucanes

Les AX et les beta-glucanes d'albumen de céréales bien que ne pouvant pas être considérés comme des sources « industrielles» d'hémicelluloses pour la réalisation de matériaux filmogènes à l'échelle industrielle ont été utilisés pour former des films et leurs propriétés mécaniques et barrières ont été étudiées. La méthode de casting qui consiste à étaler sur un support une solution ou un gel de polymère, puis à évaporer le solvant (Gu *et al.*, 2002) a été utilisée par Höije et al. (Höije *et al.*, 2005) pour réaliser des films d'AX (M_w: 35 000-45 000 g mol⁻¹). Avec une concentration en polysaccharides de 29 mg/mL, des films clairs et flexibles d'une épaisseur de 49µm sont obtenus. La contrainte à la rupture de ces films est de 50 MPa, et la déformation à la rupture de 2,5%. Les propriétés d'absorption et de diffusion de l'eau sont des facteurs cruciaux dans les films de polysaccharides (Hansen & Plackett, 2008). Pour des humidités relatives de 50% et 100% ces films AX sont très hygroscopiques et contiennent respectivement: 11% - 13% et 41% - 55% d'eau. Les mesures de perméabilité à l'oxygène des films d'AX ont montré de faibles valeurs comprises entre 1,1 et 2,0 (cm³ µmm)/(m² jour kPa) (Höije *et al.*, 2005).

La structure des AX (arabinoxylanes de haute viscosité extraits de la farine de seigle, Megazyme) a été modifiée par l'utilisation d'arabinofuranosidase afin de diminuer le rapport A/X (Hoije *et al.*, 2008). Les films obtenus par casting d'une épaisseur de 20-25 µm sont semi-cristallins. Le degré de cristallinité des films augmente avec la diminution de rapport A/X. Les propriétés mécaniques des films AX ont été déterminées par des essais de traction : elles indiquent que la contrainte à la rupture varie avec le rapport A/X (Hoije *et al.*, 2008).

Des films de BG extraits d'orge, et d'avoine ont été réalisés par Tejinder (Tejinder, 2003). Le glycérol a été utilisé comme plastifiant. Les films étaient translucides et homogènes. Les taux de transmission de la vapeur d'eau de ces films ont été mesurés et se situent dans une gamme de 0,47 à 0.60 g m⁻² h⁻¹ pour toutes les sources de BG. Les propriétés mécaniques de ces films de BG ont été explorées en traction et indiquent une forte dépendance de la source de BG. Contrairement aux valeurs de déformation, la résistance à la traction des films de BG d'orge. (Tejinder, 2003).

Des résistances à la traction de 20-80 MPa ont été observées pour des films de BG (extrait d'avoine) de faible M_w (71 000 g mol⁻¹) par Skendi et al. (2003). L'épaisseur des films était de 20-100 µm. Ces études montrent que la teneur en eau et le sorbitol (15% en poids) augmentent l'allongement et diminuent la résistance à la rupture de ces films. L'élongation des films de BG de M_w 18000 g mol⁻¹ varie de 1 à 22% (Skendi *et al.*, 2003).

MATERIELS et METHODES

MATERIELS et METHODES

1 Matériels

1.1 Extractions des arabinoxylanes

Les arabinoxylanes hydrosolubles ont été extraits à partir de farine de blé selon le protocole décrit par G. Dervilly-Pinel lors de sa thèse à l'INRA en 2001. Les AX ont ensuite été fractionnés par précipitation à l'éthanol comme précédemment décrit (Dervilly-Pinel *et al.*, 2001a). Des β -glucanes solubles d'orge (viscosité moyenne, pureté > 97%) ont été obtenus chez Megazyme.

1.2 La masse molaire et la viscosité des polysaccharides

Les polysaccharides présentent naturellement une grande hétérogénéité de masse molaire. En outre, les valeurs rapportées dans la littérature varient énormément selon les méthodes utilisées. La diffusion de la lumière est la technique la plus utilisée pour déterminer les masses molaires moyennes en poids des polysaccharides (Girhammar & Nair, 1992b; Saulnier *et al.*, 1993; Knuckles *et al.*, 1997). Des détecteurs à diffusion de la lumière couplés à des systèmes de chromatographies d'exclusion stérique haute performance ont été développés ce qui permet d'obtenir la masse molaire en poids de chaque fraction chromatographique (Schooneveld-Bergmans *et al.*, 1999; Nilsson *et al.*, 2000). Toutefois, les mesures de diffusion de la lumière sont extrêmement sensibles à la présence d'agrégats dont l'élimination peut être difficile. Ces agrégats de forte masse peuvent conduire à une forte surestimation des valeurs de masse molaire. La viscosité intrinsèque ([η]) est utilisée pour comparer les comportements des polymères en solution diluée.

Un couplage SEC-MALLS-Viscosimètre a été utilisé pour déterminer la masse moléculaire et la viscosité intrinsèque des AX et des BG utilisés pour la réalisation des films. Le système est constitué d'un montage en série d'un système haute performance de Chromatographie d'Exclusion Stérique (colonnes Shodex-OHpak KB-805 et 804), d'un détecteur de diffusion de la lumière à angles multiples (Multi Angle Laser Light Scattering MALLS, MiniDawn Wyatt Technology, USA), d'un détecteur viscosimétrique (Viscotek T50A, Viscotek, USA).et d'un réfractomètre différentiel (ERMA, ERC 7517A, Japon). Les données sont traitées par les logiciels ASTRA 1.4 (Wyatt Technology, USA) et TRISEC (Viscotek, USA).

Les échantillons analysés ont été dissous à une concentration de 5 mg/mL dans le NaNO₃ 50 mM contenant 0,02% de NaN₃ (30 min, 40 °C), puis filtrés sur des membranes de porosité 0,1 μ m (ANOTOP, Whatman). 50 μ L d'échantillon ont été injectés sur le système chromatographique constitué de 2 colonnes Shodex-OHpak (KB-805 et 804) éluées à un débit de 0,7 mL/min par du NaNO3 50 mM contenant du NaN₃ 0,02% à une température de 25 °C.

1.3 Réalisation de films d'arabinoxylanes (AX) et β -glucanes (BG)

La réalisation de films à base de polysaccharides peut se faire selon deux techniques de moulage, par casting et par spin-coating.

(1) La méthode de Casting.

Le « casting » est fréquemment utilisé pour préparer des films de polymères (Gu *et al.*, 2002) plutôt grossiers et de plusieurs microns d'épaisseurs. Dans notre étude, les polymères sont dissous dans l'eau à une concentration de 20 mg/mL. La solution est ensuite filtrée puis placée à 60°C, puis un volume connu de cette solution (2,5 à 5 mL) est transféré dans une boîte de Pétri en polystyrène (122, Sterilin UK, diamètre de boite: 50mm). Ces boîtes de Pétri sont ensuite introduites dans une étuve à atmosphère contrôlée à 40°C et 40 % d'humidité relative pendant 1 à 3 jours. Afin d'assurer l'horizontalité et la stabilité des boîtes de Pétri, ces dernières sont placées sur un banc horizontal et stable lui-même introduit dans une étuve à atmosphère contrôlée (Figure 17).



Figure 17 : Boites de pétri placées sur un plateau à niveau ajustable à l'intérieur de l'étuve

(2) La méthode de Spin-coating

Cette méthode développée par Middleman & Hochberg (Middleman & Hochberg, 1993; Schubert & Dunkel, 2003) consiste à déposer quelques gouttes de solution (environ 0,5 ml) sur une tournette chauffante. La vitesse de rotation est de 500 à 4000 rpm. Cette méthode permet d'obtenir des films d'une épaisseur de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Elle présente l'inconvénient majeur de ne pas permettre de contrôler l'horizontalité du film qui montre alors des épaisseurs variables sur toute la surface.

Dans notre étude, seuls les films réalisés par casting ont été étudiés. En effet, la méthode de spin-coating a été plus difficile à mettre en œuvre notamment pour décoller les films du support en silicium disposés sur la tournette. De plus étant donné les méthodes de caractérisation choisies, il fallait produire une quantité importante de films suffisamment épais et homogènes pour pouvoir les manipuler et les étudier.

1.4 Mesure de l'épaisseur des films

La méthode de « casting » utilisée a permis de produire des films de polymères ayant une épaisseur comprise entre 10 et 70 μ m. L'épaisseur du film dépend du volume et de la concentration de solution introduite dans la boîte de pétri au départ. Dans notre étude, l'épaisseur des films a été mesurée par spectrométrie UV-Visible.

Le spectrophotomètre UV-Vis SPECORD S 600 a été utilisé en mode réflexion. On obtient ainsi des spectres d'interférence par la réflexion de la lumière des différentes couches de polysaccharides. Les spectres d'interférences sont dépendants de l'épaisseur géométrique des couches et de leur indice de réfraction. Pour déterminer l'épaisseur d d'un échantillon, on utilise l'équation suivante :

$$d = \frac{m \cdot \frac{\lambda_2 \cdot \lambda_1}{2(\lambda_2 - \lambda_1)}}{\sqrt{n^2 - \sin^2 \theta}}$$
 équation 1

 $\lambda_2>\lambda_1$

d : épaisseur de l'échantillon

- m : nombre de maximum d'interférence après le maximum zéro-ème
- n : indice de réfraction de l'échantillon

- Θ : angle de réflexion appliqué
- $\lambda_{1\,:}$ longueur d'onde du maximum d'interférence zéro-ème
- λ_{2} : longueur d'onde du maximum d'interférence m-ème

En générale, l'indice de réfraction n d'un échantillon de biopolymère est fixé à 1,51 (Goodman, 1978). C'est la valeur que nous avons utilisée pour nos mesures même si elle n'est pas caractéristique des AX ou des BG.

On peut également mesurer l'épaisseur des films par microscopie confocale (MCBL Nikon A1) (Figure 18). Cette méthode est plus difficile à mettre en œuvre et requiert la présence d'une molécule fluorescente dans l'échantillon, ce qui est le cas pour les arabinoxylanes qui contiennent de l'acide férulique auto-fluorescent.



Figure 18 : Clichés obtenus par microscopie confocale (MCBL Nikon A1) autofluorescence des films d'arabinoxylanes (RH=11%), Mesure d'épaisseur de film

Le film est alors positionné de façon verticale entre deux lames de verre et plusieurs points de la tranche du film sont observés. Nous avons effectué ces mesures au laboratoire et les clichés montrent que l'épaisseur des films est homogène et proche de la valeur mesurée par spectrophotométrie. Cependant il faut souligner le fait que par cette méthode le film est comprimé entre les deux lames de verre ce qui peut être un inconvénient pour des films fortement hydratés.

Nous avons utilisé la méthode spectrophotomètrique comme méthode de mesure systématique, car elle nous est apparue plus pratique, plus précise et plus rapide que la méthode par microscopie confocale.

2 Méthodes des caractérisations des films

2.1. La microscopie

2.1.1 Microscope confocale à balayage laser à fluorescence

La microscopie de fluorescence est basée sur la constatation que certains corps violemment éclairés par des radiations de courtes longueurs d'onde, l'absorbent en réémettant des radiations de longueurs d'onde plus longues dites de fluorescence, c'est l'effet de Stockes (Lakowicz, 1983; Strasburg & Ludescher, 1995). Un rayonnement incident de courte longueur d'onde excite un électron dans le nuage électronique qui entoure le noyau de l'atome; l'énergie absorbée par l'électron le propulse dans les couches périphériques du nuage d'où il retombe par sauts quantiques, émettant à chaque fois un rayonnement de fluorescence de plus grande longueur d'onde.

La fluorescence est dite primaire, ou autofluorescence, quand les produits fluorescent naturellement. L'autofluorescence est favorisée par la présence d'électrons π (électrons des doubles liaisons), qui sont facilement excités. Les composés capables d'autofluorescence possèdent des noyaux aromatiques ou pyrroliques (systèmes de doubles liaisons conjuguées). C'est le cas de l'acide férulique présent dans les extraits d'AX. De nombreuses molécules présentant un grand intérêt d'un point de vue biologique, ne possèdent pas de propriétés de fluorescence naturelle (comme les β -glucanes dans notre cas). Il est alors possible d'utiliser des fluorochromes se fixant de manière sélective sur les structures d'intérêt ou des sondes d'affinité (lectines, enzymes, anticorps) couplées à des marqueurs fluorescents. La fluorescence est alors dite secondaire ou induite. Pour bien mettre en évidence ces fluorescences, il faut délimiter clairement avec un premier filtre coloré la bande excitatrice, qui est en général dans le domaine de l'UV ou UV-bleu et ensuite disposer, après l'objet, un second filtre coupant ce qui reste de la lumière excitatrice pour ne laisser passer que la lumière fluorescente.

L'inconvénient majeur de la microscopie à fluorescence conventionnelle est sa perte de résolution axiale due à la superposition d'informations issues des plans adjacents. La microscopie confocale permet de pallier à cet inconvénient puisque son principe est de pratiquer des coupes optiques virtuelles dans l'objet observé et de n'enregistrer que l'image de fluorescence émise dans ce plan. Une représentation 3D du spécimen est obtenue par construction d'une pile de coupes sériées 2D, se référant à des sections optiques dans des plans confocaux. Le rayon laser excitateur pénètre dans l'échantillon et lors de l'impact optique, il y a émission de rayons lumineux provenant de différents plans de la préparation. Grâce à un diaphragme variable ("trou d'aiguille" - *pinhole*), il est possible de sélectionner les rayons réfléchis sont filtrés en fonction de leurs longueurs d'onde puis détectés par des photo-multiplicateurs. Chaque section optique est générée en déplaçant le faisceau laser sur une partie du domaine admissible de l'échantillon. La profondeur du plan focal est ensuite modifiée finement grâce à un moteur contrôlé par ordinateur pour produire la séquence de sections.

Avant observation par microscopie confocale (MCBL Nikon A1), les films ont été découpés en rondelles de 8 mm de diamètre puis hydratées (généralement pendant 3 jours) sur différents sels saturés (RH=11% (LiCl), 59% (NaBr), 75% (NaCl), et 91% (BaCl2)). Les films étaient ensuite disposés entre deux lames de verre placées en position verticale ou horizontale selon la section du film à étudier (tranche ou plat du film). Les expériences ont été réalisées à 20°C et à une humidité relative d'environ 40%. La longueur d'onde du laser était de 375 nm avec une émission supérieure à 400 nm (LP400).

2.1.2 La microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière.

La MEB consiste en un faisceau d'électrons balayant la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules. Ces particules sont analysées par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface. Le microscope est essentiellement composé d'un canon à électrons et d'une colonne électronique, dont la fonction est de produire une sonde électronique fine sur l'échantillon, d'une platine porte-objet permettant de déplacer l'échantillon dans les trois directions et de détecteurs permettant de capter et d'analyser les rayonnements émis par l'échantillon. En outre l'appareil doit nécessairement être équipé d'un système de pompes à vide.

Les films ont été observés avec un microscope (MEB-Zeiss EVO ® MA10) travaillant à 15 kV, à une pression de 30 Pa, à température ambiante (environ 20 °C), et à une humidité relative d'environ 50%.

2.2 Isotherme d'adsorption de vapeur d'eau

L'activité de l'eau (a_W) dans un produit dépend principalement de sa teneur en eau et de sa température. La courbe représentant pour une température donnée la teneur en eau d'un produit en fonction de la valeur de l'activité de l'eau a_W ou de l'humidité relative de l'air en équilibre (HR) est appelée :

-Isotherme d'adsorption si elle a été déterminée expérimentalement en partant d'un produit sec.

-Isotherme de désorption si elle a été déterminée expérimentalement en partant d'un produit saturé en eau.

Dans cette étude, les isothermes de sorption-désorption ont été obtenus via des méthodes gravimétriques. Elles sont basées sur la mesure de la masse de l'échantillon au cours du temps dans des conditions ambiantes fixées. Ainsi, on place l'échantillon dans des conditions de pression relative fixée et on mesure la masse de l'échantillon au cours du temps jusqu'à ce que l'on atteigne un palier dont la détermination est fonction des critères d'équilibre fixés et de la précision de mesure de masse de l'échantillon.

Plusieurs méthodes gravimétriques existent comme la méthode statique des solutions salines pour des mesures d'adsorption de vapeur d'eau, ou la méthode dynamique, utilisée sur l'appareillage DVS (Dynamic Vapor Sorption), pour des mesures d'isothermes d'adsorption de vapeur d'eau ou de vapeur organique.

Dans la méthode des solutions salines, on place une solution saturée d'un sel dans un bocal hermétique. Cette méthode a été standardisée selon la procédure COST 90 (Jowitt, 1989).



Figure 19 : Mesure du différentiel de masse entre la coupelle vide et la coupelle portant le film (en bleu).

L'humidité relative de l'atmosphère au-dessus de la solution va s'équilibrer à une valeur qui est fonction du sel utilisé. L'échantillon est alors placé dans le bocal et des pesées seront faites à intervalles de temps réguliers ou non, jusqu'à ce que la variation de masse soit considérée comme négligeable. On estimera alors avoir atteint la masse d'échantillon en équilibre avec l'atmosphère environnante.

L'isotherme de sorption d'eau des films a été déterminée à 20 °C en utilisant la méthode des sels saturés. Les films sont équilibrés dans les dessiccateurs contenant des solutions salines saturée à une humidité relative (HR) de 11% (LiCl), 59% (NaBr)) , 75% (NaCl), et de 91% (BaCl2). L'équilibre de l'échantillon est atteint généralement en 15 jours.

L'appareillage de mesure dynamique DVS est constitué d'une microbalance de type Cahn placée dans une enceinte régulée thermiquement (Figure 19). Sur un côté de la balance, on place une référence, de l'autre on place l'échantillon à analyser. Les deux côtés de la balance sont balayés par un flux de gaz constitué par le mélange d'un flux de gaz sec et d'un flux de gaz saturé en vapeur dans les proportions souhaitées, obtenues et régulées à l'aide de fluxmètres de précision. Des sondes combinées d'humidité et de température sont situées juste en dessous des nacelles contenant l'échantillon et la référence, afin de permettre une vérification de l'humidité relative et de la température. Enfin la tête de la microbalance est balayée par un flux constant de gaz sec afin d'éviter les problèmes de dérive ou d'instabilité de la mesure de masse générée par une accumulation d'humidité à cet endroit (Figure 20). La diffusivité de l'eau au sein de films a été déterminée à partir de la cinétique de sorption de l'eau en utilisant un modèle mathématique basé sur la 2^{ème} loi de Fick (Crank, 1975). L'appareil de DVS (Surface Measurement System Ltd, Londres, RU) a permis de déterminer la sorption de l'eau des films à une température de 20 ° C et pour une humidité relative RH comprise entre 0% et 95%.

Les isothermes ont une allure de type sigmoïde et sont établis à partir de données expérimentales (Figure 21). Les points expérimentaux sont généralement obtenus à partir d'échantillons à l'équilibre conditionnés sous différentes activités de l'eau. Les variations de la teneur en eau en fonction de l'activité de l'eau peuvent être décrites selon les modèles de Brunauer-Emmette-Teller (BET) et le modèle de Guggenheim-Andersson-Deboer (GAB) (Brunauer *et al.*, 1938; Chirife & Iglesias, 1978; Al-Muhtaseb *et al.*, 2002; Timmermann, 2003).

Le modèle BET exprime le rapport entre la teneur en eau m (g/g) et m_m qui représente la valeur de la monocouche. Il est défini par l'équation suivante :



Temps (h)

Figure 20 : Palier de mesure : gradient d'humidité relative de 10% en partant du film séché sous P_2O_5 (RH=0) jusqu'à 95% RH.



Figure 21 : Allure générale des isothermes de sorption et de désorption.
$$\frac{m}{m_m} = \frac{\mathrm{KA}_{\mathrm{w}}}{(1 - \mathrm{A}_{\mathrm{w}})[1 + (K - 1)A_{\mathrm{w}}]}$$
équation 2

K est une constante.

Ce modèle est couramment employé pour déterminer la valeur de la monocouche qui exprime la quantité d'eau nécessaire pour former une couche de molécules d'eau d'une épaisseur équivalente à une molécule présente sur la surface absorbante. L'application de ce modèle est limitée car il ne permet de prédire les isothermes que sur une plage réduite d'activité de l'eau variant de 0,1 à 0,5.

Le modèle de GAB est semblable au modèle BET à l'exception d'un paramètre :

$$\frac{m}{m_m} = \frac{\text{K'CA}_w}{(1 - \text{CA}_w)[1 + (K' - 1)CA_w]}$$
équation 3

Ce modèle est très utilisé car il peut être appliqué sur une large gamme d'activité de l'eau, à différentes températures. Il permet de calculer la valeur de la monocouche et il est valable pour de nombreux biopolymères.

2.3 Analyses mécaniques

Des mesures de traction uniaxiale à la rupture des films ont été réalisées.

Ces essais consistent à appliquer une déformation (étirement) à vitesse constante à un échantillon de dimension normalisée, et à mesurer la force résultante jusqu'à la rupture du matériau. À partir des courbes de force en fonction du déplacement (Figure 22), on accède à : -la contrainte exprimée : elle correspond à la force mesurée rapportée à la section de l'éprouvette.

-la déformation : elle correspond au rapport entre le déplacement et la longueur de référence.

-le module de Young E : il correspond à la pente dans la partie linéaire de la courbe contrainte-déformation pour les faibles déformations.



Figure 22 : Courbe contrainte – déformation

Les paramètres mécaniques des films sont:

 $-\sigma_{ela}$: la limite élastique, ou le stress de la limite élastique (N/mm²);

 $-\sigma_{max}$: la contrainte ultime, ou le stress à la rupture (N/mm²);

 $-\epsilon_{ela}$: la déformation élastique, ou déformation au point de rendement (%);

 $-\epsilon_{max}$: $\Delta L/L_0$: la déformation ultime, ou la déformation à la rupture (%);

-E : le module de Young (N/mm^2) .

Les mesures de traction uniaxiale à la rupture des films ont été réalisées en utilisant un analyseur thermique mécanique dynamique DMTA Mk III (Rheometrics Inc, Piscataway, États-Unis) à une température de 25 ° C et aux RH de 59%, 75% et 95%. La dimension de l'éprouvette contenant l'échantillon était 10 mm x 5 mm x 22 μ m. Après la mise en équilibre en température et en humidité de l'échantillon, un test de balayage en temps à contrainte imposée (fréquence : 10 rad s⁻¹) a été effectué. Les tests de traction uni-axiaux ont été réalisés en utilisant un taux de déformation de 0,001 s⁻¹ pour des bandes 10 mm de longueur jusqu'à ce que l'échantillon soit perturbé.

2.4 La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Dans le cadre de cette étude, la RMN a été utilisée pour caractériser les temps de relaxation de l'eau des films d'AX et de BG et tenter d'interpréter leurs propriétés en terme d'interactions moléculaires et de distances inter-chaînes. Dans ce chapitre, nous rappelons les principes de base de la Résonance Magnétique Nucléaire et l'intérêt des méthodes bas champ pour l'étude des T_2 de l'eau et des seconds moments dipolaires M_2 des polysaccharides.

2.4.1 Généralités

La résonance magnétique nucléaire (RMN) désigne la propriété de certains noyaux atomiques possédant un spin nucléaire (par exemple ¹H, ¹³C, ¹⁹F, ³¹P ...) et placés dans un champ magnétique (Abragam, 1961; Slichter, 1990) à absorber de l'énergie. Lorsqu'ils sont soumis à un rayonnement électromagnétique (radiofréquence), le plus souvent appliqué sous forme d'impulsions, les noyaux atomiques peuvent absorber l'énergie de ce rayonnement puis la libérer lors d'un phénomène appelé « la relaxation ». L'énergie mise en jeu lors de ce phénomène de résonance correspond à une fréquence très précise, dépendant du champ magnétique et d'autres facteurs moléculaires. Ce phénomène permet l'observation des propriétés quantiques magnétiques des noyaux dans les phases gaz, liquide ou solide.

Le phénomène de RMN est exploité par la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (Spectroscopie RMN), une technique non destructive et non invasive utilisée dans plusieurs disciplines : en physique et chimie (chimie organique, chimie inorganique, science des matériaux...) ou en biochimie (structure de molécules).

Une distinction peut être faite entre la RMN haute résolution (ou domaine fréquentiel) et la RMN bas-champ (ou domaine temps). La principale différence doit être faite non pas en terme de "qualité" mais plutôt en terme "d'utilisation". La RMN haute résolution est particulièrement adaptée à la détermination de la structure moléculaire de composés définis rencontrés à l'état pur ou en mélange. Cette technologie permet de présenter pour chaque noyau une raie isotrope avec une structure hyper fine s'il est couplé à d'autres noyaux.

La RMN domaine temps, convient quand à elle, parfaitement à l'examen d'une propriété globale d'un milieu dont les constituants sont les uns en phase liquide, les autres en phase solide. La mesure repose sur la différence de mobilité des noyaux entre les deux phases.

L'information est extraite à partir du signal variant dans le domaine temps et dépourvu d'information fréquence, on n'utilise donc pas la transformée de Fourier (Figure 23).

2.4.2 Phénomènes de relaxation

En RMN, le champ magnétique B_0 ne suffit pas pour observer un signal. Comme pour toute spectroscopie, il est nécessaire de perturber le système (ici le système de spin). Ceci est réalisé à l'aide d'un champ magnétique de radiofréquence B_1 qui permet de générer une impulsion α qui induit des changements d'états de spin entre le niveau d'énergie E_1 et E_2 . Quand l'impulsion cesse, l'aimantation tend à reprendre sa position d'équilibre, alignée le long de B_0 , c'est le phénomène de relaxation. La relaxation est un phénomène non radiatif (il n'y a pas d'émission de photons). Ce sont les fluctuations du champ magnétique ressenties par le noyau et induites par les mouvements moléculaires qui permettent le retour à l'équilibre.

La relaxation s'accompagne d'une émission d'énergie sous la forme d'ondes RF qui constituent le signal enregistré en RMN. Désignons par N l'écart du nombre de noyaux par rapport à la répartition de Boltzmann, celui-ci va évoluer selon une cinétique du premier ordre.

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{N}{\tau}$$
 équation 4

Cet écart va donc varier selon une loi exponentielle avec une constante de temps τ .

$$N = N_0 \exp{-\frac{t}{\tau}}$$
 équation 5

On peut séparer le système étudié en deux sous-systèmes :

- le système de spins ;
- l'environnement extérieur, appelé réseau.



Figure 23 : Représentation du signal de RMN (FID) obtenu à haut champ

Dans une première approche phénoménologique, l'évolution temporelle du système est décrite par le vecteur aimantation. Son évolution au cours du temps est donnée par les équations de Bloch.

$$\left(\frac{\mathrm{d}\boldsymbol{M}}{\mathrm{d}t}\right)_{R_0} = \boldsymbol{\gamma}\boldsymbol{M} \wedge \mathbf{B}_{\mathbf{0}} - \hat{\boldsymbol{R}}\left(\boldsymbol{M} - \boldsymbol{M}_{\mathbf{0}}\right)$$
$$\hat{\boldsymbol{R}} = \begin{bmatrix} 1/T_2 & 0 & 0\\ 0 & 1/T_2 & 0\\ 0 & 0 & 1/T_1 \end{bmatrix}$$

La matrice diagonale fait intervenir deux temps de relaxation T_1 et T_2 . Lors du retour du vecteur aimantation à l'équilibre, on distingue donc deux types de relaxation :

- le retour à l'équilibre de la composante longitudinale M_z correspond la *relaxation* longitudinale. Temps T_1 (3^{ème} ligne);
- le retour à zéro de la composante transversale M_{xy} correspond la *relaxation transversale*. Temps T_2 (1^{ère} ligne et 2^{nde} ligne).

$$M_{xy} = \sqrt{M_x^2 + M_y^2}$$
 équation 6

Les solutions des équations précédentes qui décrivent le comportement du vecteur aimantation lors du retour à l'équilibre peuvent être représentées graphiquement. Envisageons une excitation à 90° qui amène le vecteur aimantation dans le plan transversal. Après que l'excitation a cessé, l'extrémité du vecteur aimantation effectue, dans le référentiel du laboratoire, un mouvement complexe, en spirale, autour de B_0 . Le retour à l'équilibre se traduit par un déphasage rapide des protons et une décroissance de l'aimantation transversale. En revanche l'aimantation longitudinale croit, puis retrouve sa valeur initiale qui correspond à l'aimantation à l'équilibre (Figure 24).

Le retour de la composante M_z de l'aimantation à sa valeur initiale M_{0z} correspond à la *relaxation longitudinale*. Elle est due à un échange d'énergie entre les noyaux et leur environnement. Elle porte aussi le nom de relaxation *spin-réseau*. La constante de temps T_1 est d'autant plus petite que les noyaux sont liés à des molécules de plus grande masse molaire. Compte-tenu de la faiblesse des interactions entre les spins et le réseau, elle est de l'ordre de



Figure 24 : Le retour de la l'aimantation à sa valeur initiale M_{0z} correspond à la relaxation longitudinale T_1 et relaxation transversale T_2 .

quelques secondes pour un liquide mais elle peut atteindre plusieurs heures dans le cas des solides. A l'échelle macroscopique ce processus de relaxation est associé à un un transfert d'enthalpie. Après le basculement, la composante transversale de l'aimantation va diminuer puis s'annuler avec un temps de relaxation T_2 . Ce phénomène est dû à l'interaction entre les spins nucléaires qui provoque une perte de cohérence de phase des moments magnétiques dans leur mouvement autour de B₀. Cette désynchronisation des aimantations élémentaires est appelé relaxation spin-spin. ou *relaxation longitudinale*. Le temps de relaxation T_2 est toujours inférieur au temps de relaxation T_1 . La diminution exponentielle du signal de RMN due à la relaxation est le reflet de différents phénomènes dynamiques au niveau moléculaire et nucléaire. La détermination des temps de relaxation T_1 et T_2 permet d'accéder à des paramètres divers tels que la teneur en eau, le pourcentage de matière grasse ou des caractéristiques plus subtiles telles que l'authenticité d'origine de l'échantillon (Mariette *et al.*, 1997).

2.4.3 L'interaction magnétique dipôle-dipôle

L'interaction magnétique dipôle-dipôle, aussi appelée couplage dipolaire, fait référence à l'interaction directe entre deux dipôles magnétiques. L'énergie de cette interaction s'exprime selon l'hamiltonien suivant (Abragam, 1961; Levitt, 2001; Slichter, 1990) :

$$H_D = -\frac{\mu_0}{4\pi r_{jk}^3} (3(m_j \cdot e_{jk})(m_k \cdot e_{jk}) - m_j \cdot m_k)$$
 équation 7

où e_{jk} est un vecteur unité parallèle à la droite joignant les centres des deux dipôles, r_{jk} est la distance entre ces deux dipôles m_k et m_j .

Le couplage dipôle-dipôle est très utile pour les études structurales moléculaires, puisqu'il dépend seulement de constantes physiques connues et de l'inverse de la distance internucléaire au cube. L'estimation de ce couplage procure un moyen spectroscopique direct à la distance entre noyaux et donc à la forme géométrique de la molécule. Bien que les couplages dipolaires magnétiques internucléaires contiennent beaucoup d'informations structurales, dans une solution isotrope, ils sont moyennés à zéro en raison de la diffusion rotationnelle. Dans le cas d'un échantillon purement solide, les interactions dipôle-dipôle (interaction dipolaire) peuvent dépasser 10 kHz ce qui explique le net élargissement des raies observé en RMN haut-champ. Pour de tels échantillons, il est primordial d'utiliser la technique de



Figure 25 : Représentation du signal FID d'un échantillon comprenant une phase solide et une phase liquide.

rotation à l'angle magique pour réduire ces interactions qui rendent les spectres difficilement interprétables.

En revanche en RMN bas-champ, le signal d'un échantillon solide ou « mou » est caractérisé à des temps très courts (inférieurs à 100 μ s) par une sinusoïde caractéristique de la mobilité des noyaux de la fraction solide alors qu'aux temps plus longs une décroissance exponentielle du signal décrit la mobilité des noyaux de la fraction mobile (Derbyshire *et al.*, 2004; Roudaut *et al.*, 2009) (Figure 25).

Le signal enregistré est décrit par l'équation d'Abragam (Abragam, 1961; Slichter, 1990).

$$I_{FID}(t) = A \exp(-\frac{a^2 t^2}{2}) \frac{\sin bt}{bt} + B \exp(-\frac{t}{T_2^*})$$
équation 8

A et B correspondent respectivement à l'amplitude des noyaux de la phase solide et des noyaux mobiles.

 T_2^* (ms) est le temps de relaxation spin-spin des noyaux mobiles mesuré pendant le temps t en présence d'inhomogénéités du champ magnétique.

a et b sont les paramètres caractéristique de la fraction solide.

- a est caractéristique de l'énergie impliquée dans l'interaction dipolaire moyenne entre les noyaux de la phase solide.
- b dépend du nombre d'interactions dipolaires et de la distance entre les dipôles.

Le second moment dipolaire M_2 peut alors être déterminé grâce à l'équation ci-dessous. Il reflète la force des interactions impliquant les noyaux de la phase solide (van den Dries *et al.*, 1998).

$$M_2 = a^2 + \frac{1}{3}b^2 \qquad \text{équation 9}$$

2.4.4 Mesures par RMN bas-champ

Différents échantillons ont été préparés en vue de les analyser par RMN bas champ. Les premiers tests ont été réalisés à partir de poudres de polysaccharides introduites dans des tubes en verre de 10 mm de diamètre. Ensuite les échantillons ont été analysés sous forme de films de polysaccharides empilés dans les tubes de RMN (Figure 26).

Pour obtenir 1 cm de hauteur en films il est nécessaire d'introduire environ 400 rondelles superposées. La technique utilisée pour découper et empiler les films en grand nombre est basée sur l'emploi d'un emporte-pièce de 8 mm de diamètre (Figure 26). Les films sont superposés par groupe de 3 ou 4 en utilisant des gants et une pince à épiler afin de ne pas polluer les échantillons. Les échantillons de poudre ou de films ont été analysés avec une teneur en eau contrôlée. Pour se faire, les tubes ont été placés pendant deux semaines dans une enceinte contenant la solution saline saturée correspondant à une humidité relative connue.



Figure 26 : Préparation des échantillons pour leur analyse par RMN bas-champ

Les expériences de RMN ont été effectuées sur un spectromètre bas-champ de marque Bruker (minispec mq20) opérant à la fréquence des protons de 20 MHz (champ magnétique de 0,47 Tesla). L'entrefer de 33 mm permet d'accueillir des tubes de 10 mm de diamètre. Les mesures de détection directe (FID, Figure 27) et de temps de relaxation T₂ (Figure 28) ont été réalisées entre -40°C et 80°C, l'antenne de mesure étant thermostatée à l'aide d'azote liquide. La température dans la sonde RMN était régulée par un système dédié à l'appareil (BVT 3000, Bruker SA, Wissembourg, France) couplé à un thermocouple placé à la base de l'échantillon dans l'aimant. Les expériences réalisées sur ce spectromètre au laboratoire ont montré qu'il existe un gradient de température entre le thermocouple et l'échantillon dans l'aimant. Une fibre optique a donc été utilisée afin de mesurer précisément (\pm 0,1°C) la température dans le tube de RMN (à la surface de l'échantillon) pendant la mesure. Un délai de 7 min était nécessaire à la stabilisation de la température. Les échantillons occupaient 1 cm de hauteur du tube de RMN (homogènéité de la radiofréquence). Le temps mort de la sonde est de 11 µs.

Les réglages du champ magnétique, des angles de détection, du gain et des longueurs des impulsions ont été effectués avant chaque mesure. De plus, des mesures de qualité sur un tube d'huile minérale ont été réalisées chaque jour d'expériences.



Figure 27 : Représentation du signal FID



Figure 28 : Représentation de la séquence CPMG

La séquence de détection directe a permis d'enregistrer le signal de RMN brut dit FID (Figure 27), qui correspond à l'observation du retour à l'équilibre du signal de RMN après une excitation du système à l'aide d'une impulsion de radiofréquence à 90° de 2,9 μ s. Les paramètres de second moment dipolaire M₂ ont été déterminés par ajustement du signal FID selon les équations 9 et 10 (pages 5). Le temps de recyclage a été fixé à 2 secondes pour une fenêtre d'acquisition de 10 ms.

Les mesures de T_2 ont été réalisées à l'aide de la séquence Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (Meiboom & Gill, 1958) (Figure 28).

La séquence consiste en une impulsion 90° (2,9 μ s), suivie d'un délai τ (temps d'échantillonnage de 40 μ s) puis d'une série d'impulsion à 180°, elles-mêmes séparées d'un délai 2τ pendant lequel l'écho se forme.

L'ajustement des signaux de RMN est effectué à partir de l'algorithme de Levenberg-Marquardt qui permet d'obtenir une solution numérique au problème de minimisation d'une fonction en appliquant une régression par la méthode des moindres carrés.

Le signal enregistré suite à l'application de la séquence CPMG a été ajusté selon l'équation suivante.

$$I_{CPMG}(t) = \sum_{i=1}^{n} A_i \exp(-\frac{t}{T_{2i}}) \quad \text{équation 10}$$

Dans laquelle Ai correspond à l'intensité des protons caractérisés par un temps de relaxation spin-spin T_{2i} (Meiboom & Gill, 1958).

L'outil d'ajustement CONTIN (Provencher, 1982) a également été utilisé afin de valider les ajustements effectués par la méthode discrète de Levenberg-Marquardt. Chaque méthode a permis de déterminer une seule composante en T_2 pour chaque échantillon indépendamment de leur teneur en eau. La Figure 29 illustre le résultat obtenu de l'ajustement des données de RMN par CONTIN pour des films d'AX à RH=91%.



Figure 29 : Résultats de l'ajustement CONTIN sur les données de CPMG de films d'AX à RH = 91%.

Rôle des arabinoxylanes (AX) et β-glucanes (BG) dans l'assemblage pariétal et les propriétés de paroi

Les résultats sont présentés à travers les publications acceptées ou soumises au cours de cette thèse. Ils sont séparés en quatre chapitres qui correspondent à quatre approches mises en place de façon chronologique.

Les deux premiers chapitres font état de la préparation et de la caractérisation des films monomoléculaires d'AX et de BG. Ces travaux ont demandé le développement de méthodes non acquises au laboratoire ou à adapter en fonction des objets d'études (films de polysaccharides). La deuxième partie des résultats rassemble des travaux dont les objectifs étaient :

- 1. d'étudier l'impact de la structure des polymères et de leur organisation sur les propriétés des films monomoléculaires et composites.
- 2. de faire le lien entre les résultats obtenus sur les films et les propriétés de parois cellulaires de grains.







CHAPITRE I

Isothermes de sorption et diffusion de l'eau à travers les films monomoléculaires de polysaccharides

Résumé

Les premiers travaux de la thèse ont consisté à extraire et purifier des arabinoxylanes de la farine blanche puis à réaliser des films à base de ces polysaccharides ainsi que de β -glucanes commerciaux. Mais avant d'étudier leurs propriétés mécaniques et d'hydratation, il nous a semblé important d'étudier les propriétés de sorption de l'eau des poudres et des films de polysaccharides. L'étude des isothermes de sorption permet de connaitre la répartition et l'intensité des liaisons de l'eau, ainsi que sa disponibilité fonctionnelle dans les substances biochimiques et biologiques alimentaires, peu ou moyennement hydratées (teneurs en eau comprises entre 0 et 50). Deux méthodes gravimétriques ont été choisies : la méthode statique via des solutions salines et la méthode dynamique, en utilisant l'appareillage DVS (Dynamic Vapor Sorption).

La deuxième méthode est basée sur une analyse gravimétrique fine à l'aide d'une microbalance dans une enceinte régulée thermiquement. Contrairement à la première méthode, la DVS (Dynamic Vapor Sorption) est dite dynamique car elle permet de mesurer des cinétiques de sorption et ainsi d'évaluer des coefficients de diffusion effective (D_{eff}) de l'eau à travers les films.

Les mesures de diffusion apparente de l'eau à travers des films d'épaisseur de 22µm ont été effectuées par la méthode DVS en collaboration avec Cécile Barron (UMR IATE, INRA Montpellier). Le coefficient de diffusion de l'eau est déterminé par la seconde loi de Fick qui considère un gradient de teneur en eau des films. Les faibles valeurs de D_{eff} montrent que les films AX et BG sont très denses ; les molécules de l'eau y diffusent très lentement. La valeur de D_{eff} de l'eau dans les films d'AX de haut degré de substitution est plus élevée que dans les films d'AX de bas degré de substitution et que dans ceux de BG (0.05 < Teneur en eau (g/g) < 0.05 puis elles augmentent avec la teneur en eau des films (Teneur en eau < 0.15). Ces résultats sont en accord avec l'idée que la diffusion de l'eau dans les parois doit varier en fonction de la nature des tissus du grain et ce du fait de l'hétérogénéité de la répartition des AX et des BG et des rapports variables A/X dans les différents tissus du grain de blé (Ying *et al.*, 2011a).

Received: 23 November 2010

Revised: 4 May 2011

Accepted: 8 May 2011

Published online in Wiley Online Library: 14 June 2011

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.4498

Water mobility within arabinoxylan and β -glucan films studied by NMR and dynamic vapour sorption

Ruifeng Ying,^a Cécile Barron,^b Luc Saulnier^a and Corinne Rondeau-Mouro^a*

Abstract

BACKGROUND: The main purpose of this research was to determine the impact of the structure and organisation of polysaccharides on the hydration properties of the cell walls of cereal grains. In order to remodel the lamellar assembly of arabinoxylan (AX) and $(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)$ - β -D-glucan (BG) within the endosperm cell walls, films were prepared and analysed using dynamic vapour sorption and time domain nuclear magnetic resonance spectroscopy.

RESULTS: The water diffusivities within the AX and BG films were measured at 20 °C by observing the water sorption kinetics within a mathematical model based on Fick's second law. The evolution of spin – spin relaxation times of water protons measured by increasing the temperature is explained by the additional contributions of motion of the protons of polysaccharides and/or rapid chemical exchanges of protons between water and hydroxyl groups of polysaccharides.

CONCLUSION: The difference between patterns of water behaviour within the AX and BG films can be related to the difference in their nanostructures. The smaller nanopores of the BG films cause their nanostructure to be more compact. © 2011 Society of Chemical Industry

Keywords: water diffusivity; arabinoxylans; β -glucans; cereal; DVS; NMR

INTRODUCTION

Arabinoxylans (AXs) and $(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)$ - β -D-glucans (BGs) are the main components of the endosperm cell walls of cereal grains.^{1,2} AXs are characterised by a linear backbone of xylose to which arabinose substituents are attached through O-2 and/or O-3,³ whereas BGs are linear homopolymers of D-glucose with β -(1 \rightarrow 4) and β -(1 \rightarrow 3) linkages.⁴ Arabinosyl residues can also be esterified on the O-5 position, mainly with ferulic acid. 5,6 Large heterogeneity in the cell wall composition (AX/BG ratio) and AX structures (arabinose/xylose (Ara/Xyl) ratio and ferulic acid content) has been observed within tissues of wheat grain.⁷⁻⁹ In the walls of the aleurone cells the AX/BG ratio is around 60:40 for a lower level of substitution by arabinose of xylans that are highly esterified with ferulic acid. On the other hand, in the walls of prismatic cells, BGs are less abundant (\sim 250 g kg⁻¹ walls) and AXs are poorly esterified and highly substituted by arabinose.¹⁰ Moreover, during grain development the time course and pattern of arabinoxylan deposition in the wheat endosperm vary significantly: AXs are substituted more at the beginning of grain filling than in the later stages.¹¹ In addition, a lamellar organisation within the cell walls has been observed using microscopy techniques.^{8,12} This organisation possibly reflects alternating deposition and/or special assemblies of AXs and BGs. In order to study the impact of their fine structure and interactions on the hydration properties, we prepared AX and BG films as models of their lamellar distribution within the endosperm cell walls. Here we report the study of the water mobility within these films using the dynamic vapour sorption (DVS) technique and time domain nuclear magnetic resonance (TD-NMR) spectroscopy. The proton spin–spin relaxation time T_2 was measured as a function of both the water content and the temperature. Measurements of water sorption kinetics by varying the relative humidity (RH) permitted estimation of the water diffusivities through the AX and BG films based on Fick's second law.¹³

EXPERIMENTAL

Materials

Water-extractable AXs obtained from wheat flour aqueous extract were fractionated by graded ethanol precipitation as described by Dervilly-Pinel *et al.*¹⁴ A pure AX fraction exhibiting a high Ara/Xyl ratio (0.73) was obtained and studied. Water-soluble BGs from barley (medium viscosity, purity >97%) were purchased from Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Ireland. The polysaccharides were dissolved in water (2 mg mL⁻¹) for 8 h at 60 °C under magnetic stirring. The samples were injected into a

^{*} Correspondence to: Corinne Rondeau-Mouro, UR1268 Biopolymères, Interactions, Assemblages, INRA, F-44316 Nantes, France. F-mail: corinne rondeau@nantes inra fr

a UR1268 Biopolymères, Interactions, Assemblages, INRA, Rue de la Géraudière, BP 71627, F-44316 Nantes, France

b Unité Mixte de Recherches Ingénierie des Agropolymères et Technologies Emergentes, INRA-ENSAM-UMII-CIRAD, 2 Place Viala, F-34060 Montpellier, France

high-performance size exclusion chromatography (HPSEC, Showa Denko K.K. (Shodex), Kawasaki, Japan) system with two Shodex OHpack SB HQ 804 and 805 columns and eluted at 0.7 YmL min⁻¹ with 50 mmol L⁻¹ NaNO₃ containing 0.2 g L⁻¹ NaN₃. Online molar mass and intrinsic viscosity were determined at room temperature using a multi-angle laser light-scattering (MALLS) detector (mini-Dawn®, Wyatt, Santa Barbara, California, USA) operating at three angles (41, 90 and 138°), a differential refractometer (ERC, Saitama, Japan, 7517 A; $dn/dc = 0.146 \text{ mL g}^{-1}$) and a differential viscometer (T-50A, Viscotek, Houston, Texas, USA). ASTRA 1.4 software (Wyatt) was used to determine the weight-average molar mass (M_w) and the radius of gyration (R_G) , TRISEC software from Viscotek, Houston, Texas, United States was used to determine the intrinsic viscosity ([η]). The polydispersity index $I = M_w/M_n$ (where M_n is the number-average molecular weight) was calculated from the SEC/MALLS measurement.

Film preparation

AXs and BGs were dissolved in deionised water (8 h at 60 °C for AXs and 20 min at 95 °C for BGs) under magnetic stirring, and clear solutions (no precipitation at this concentration) were cast into polystyrene Petri dishes (Ø 5 cm). For each film, 2.5 mL of a 20 mg mL⁻¹ solution of polysaccharides was used. The films were dried in a climate room at 40 °C and 40% RH. Reflectance spectroscopy (SPECORD S 600, Analytik-Jena, Jena, Germany) was used to determine the film thickness (22 μ m, Ø 5 cm).¹⁵ Films of the same nature were equilibrated at various water activities in desiccators containing saturated salt solutions of known RH: 11% (LiCl), 59% (NaBr), 75% (NaCl) and 91% (BaCl₂). The sorption of water was carried out gravimetrically until equilibrium was achieved (normally within 15 days).¹⁶

Differential scanning calorimetry (DSC)

The glass transition temperatures (T_g) of the AX and BG films were measured using a DSC Q100 differential scanning calorimeter (TA Instruments, New Castle, Delaware, United States of America) previously calibrated with indium. Each sample (20 mg) with known moisture content was (1) heated from -40 to 120°C (3°C min⁻¹) and (2) heated from -40 to 150°C using an empty pan as reference. T_g of each specimen was determined from the midpoint of the heat capacity change observed in the second scan, at a heating rate of 3°C min⁻¹.

NMR spectroscopy

¹H NMR measurements were performed using a TD-NMR spectrometer (Minispec, Bruker SA, Wissembourg, France) operating at a resonance frequency of 20 MHz for ¹H (0.47 T). The NMR system was equipped with a temperature control device connected to a calibrated optical fibre (Neoptix Inc., Quebec city, Canada) allowing temperature regulation within ± 0.1 °C. The sample coil was 10 mm in diameter. In order to place samples in a homogeneous region of the NMR magnet, the tubes were filled to a height of around 10 mm and then weighed and hermetically sealed. Thermal equilibration was achieved by allowing a 7 min waiting time after each temperature step before the start of the experiment. The dead time of the ¹H NMR probe was 11 µs. Proton-free induction decays (FIDs) were acquired using the following parameters: a 90° pulse of 3.4 µs, a dwell time of 0.5 µs between two successive data points, 160 scans of 19 900 data points and a recycle delay of 2 s between each scan. The spin-spin relaxation time (T_2) was measured using the Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence.¹⁷ The delay between the 90 and 180° pulses of the CPMG sequence was 40 μ s. A total of 160 scans were performed with 800 data points; the recycle delay between each scan was 2 s.

Spin-spin relaxation data were analysed with the following model:

$$I_{\rm CPMG}(t) = \sum_{i=1}^{l} A_i \exp(-t/T_{2i})$$
(1)

The curves were then fitted with two different methods: the Marquardt discrete method¹⁸ and the CONTIN method.¹⁹ As the results obtained by both methods were consistent, only those of the Marquardt method are presented here.

Dynamic vapour sorption

A controlled atmosphere microbalance (DVS apparatus, Surface Measurement System Ltd, London, UK) was used to determine the water sorption kinetics of the AX and BG films at 20 °C in the RH range from 0 to 95%. Double sampling was used for the DVS measurement. The DVS automatic operation method was used to set both the desired RH and the equilibrium criterion. First, each sample was dried at 25 °C over phosphorus pentoxide and further equilibrated to 0% RH in the DVS apparatus for 16 h. Then the RH was increased to the target value and equilibrated using the equilibrium criterion for a change in mass over time (dm/dt) of 0.002% for five consecutive minutes. The sample mass and the chamber relative humidity were automatically collected every 60 s. Moisture sorption isotherms were determined from the equilibrium moisture contents at each RH step. Experiments were carried out in duplicate. In order to determine the effective moisture diffusivity, the sample was considered as a plane disc with a diameter of 10 mm and a homogeneous thickness of 22 μ m. Only moisture transfer in the axial direction was considered. The origin of the x axis was considered to be at the interface between the air flux and the film surface. The effective moisture diffusivity was determined using Fick's second law:¹³

$$D_{\text{eff}}[\partial^2 X(x,t)/\partial x^2)] = \partial X(x,t)/\partial t$$
(2)

where X (g g⁻¹ dry basis) is the moisture content and D_{eff} is the effective moisture diffusivity in the film for a given RH, t (s) is the time and x (m) is the distance from the interface, which corresponds to the vertical direction in our experiments. The initial and boundary conditions are

$$\partial X(L,t)/\partial x = 0 \tag{3}$$

$$X(0,t) = X_{\infty} \tag{4}$$

$$X(x,0) = X_0 \tag{5}$$

where *L* is the film thickness, X_{∞} (g g⁻¹ dry basis) is the moisture content at equilibrium and X_0 (g g⁻¹ dry basis) is the initial moisture content of the film for a given RH. The exact solution of Eqn (2) for a sheet of thickness *L* was given by Crank:¹³

$$\begin{aligned} (X^* - X_0)/(X_\infty - X_0) &= 1 - \sum_{n=0}^{\infty} [8/(2n+1)^2 \pi^2] \\ &\exp[-D_{\text{eff}}(2n+1)^2 \pi^2 t/4L^2] \end{aligned} \tag{6}$$

where n is any positive integer, even or odd.

RESULTS AND DISCUSSION

In porous materials, moisture transport can occur by different mechanisms at a microstructure scale, e.g. by capillary forces, liquid



Figure 1. Moisture sorption isotherms of arabinoxylan (AX) and β -D-glucan (BG) films (thickness 22 μ m) at 20 °C. RH, relative humidity. Standard deviation bars are within the symbols.

Table 1. Molecular characteristics of arabinoxylans (AXs) and β -D-glucans (BGs): weight-average molar mass (M_w), radius of gyration (R_G), polydispersity index (l), intrinsic viscosity ([η]) and arabinose/xylose (Ara/Xyl) ratio

Sample	$M_{ m w} imes 10^{-3}$ (g mol ⁻¹)	R _G (nm)	I	$[\eta]$ (mL g ^{-1})	Ara/Xyl
AX	233.2	34	2.4	259.64	0.73
BG	283.5	31	1.5	331.20	

diffusion due to concentration gradients, vapour diffusion in airfilled pores due to vapour pressure gradients, and liquid diffusion at the pore surface.²⁰ Determination of the relative contribution of each mechanism is difficult. However, the effective moisture diffusivity (Deff) is measurable; it is a function of water content for moisture-sensitive materials. The moisture sorption isotherms of the films were determined at 20°C using DVS apparatus as described in previous studies.²¹ Fig. 1 shows the water sorption isotherms for the AX and BG films as a function of RH from 0 to 95%. The water content measured in the AX films is in agreement with the results found in the literature.²² In the RH range from 10 to 80% the water content measured in the BG films was higher (based on the percentage of dry mass) than that in the AX films. In this part of the isotherm, water sorption is mainly due to water condensation and reflects the availability of the polysaccharides for binding water to specific sorption sites. It is clear that the hydroxyl groups of polysaccharides have the ability to exchange protons with water and form hydrogen bonds with water molecules and other hydroxyl groups.²³ BGs are composed of linear chains of hexose residues that exhibit three hydroxyl sites per residue, whereas AXs are composed of pentose residues exhibiting an average of only two hydroxyl sites per residue. This comparison is valid because AXs and BGs were characterised by similar values of M_w as well as very close values of $R_{\rm G}$ (Table 1). Above 90% RH, water sorption increases exponentially and the films exhibit reverse behaviour; AX-0.73 films show a higher water uptake than BG films. These results were confirmed by isotherm sorption carried out using the saturated salt method.¹⁶ Results of the water content of the films for four RH values are listed in Table 2; these results confirmed that the water content of the AX films is higher for an RH of 91%. The water content determined by the two methods, DVS and gravimetry over saturated salt solutions, is not exactly the same at the same RH values. This observation is explained by the

Table 2. Values of T_{2TP} , T_{TP} and T_g for arabinoxylan (AX) and β -D-glucan (BG) films at different water contents (measured at 20 °C)							
Sample	Water content (%) (RH (%))	T _{2TP} (ms)	<i>Т</i> _{ТР} (°С)	<i>Т</i> д (°С)			
AX	3.50 (11)	ND	>80	ND			
	15.24 (59)	7.80	60	82			
	17.82 (75)	8.98	50	56			
	34.17 (91)	12.05	20	-6			
BG	4.71 (11)	ND	>80	ND			
	16.43 (59)	3.62	65	102			
	19.40 (75)	3.65	55	71			
	28.86 (91)	4.47	35	29			

 $T_{\rm 2TP}$ is the maximum value of the spin-spin relaxation time T_2 at the corresponding temperature $T_{\rm TP}$. RH, relative humidity; ND, not determined.



Figure 2. Experimental (thick line) and predicted (thin line) curves for moisture sorption kinetics of arabinoxylan films measured at 20 $^{\circ}$ C with a controlled atmosphere microbalance for relative humidity ranging from 0 to 95%.

differences in the way of determining the sample mass at an RH of 0% (M_0).

 $D_{\rm eff}$ values of the films were determined at 20 °C using the transient state moisture content of the water sorption kinetics and the analytical solution of Eqn (6) for modelling moisture sorption. An example of the experimental kinetic data superimposed on the curve representing the data calculated using Eqn (6) is presented in Fig. 2.

Figure 3 shows the resulting $D_{\rm eff}$ values plotted as a function of RH (two repetitions). The low values between 2.1×10^{-14} and 2.8×10^{-13} m² s⁻¹ observed for $D_{\rm eff}$ were in a similar range to the $D_{\rm eff}$ values of insoluble pentosans published by Roman-Gutierrez *et al.*²⁴ Our results indicated that the AX and BG films are very dense materials, thus resulting in very slow diffusivity of water. For an RH between 0 and 35% the effective diffusivity increased sharply with the moisture content of the films. For an RH between 35 and 75% a maximum value of $D_{\rm eff}$ was observed, which was followed by a decrease in $D_{\rm eff}$ for an RH higher than 75%. The AX films showed higher $D_{\rm eff}$ values than the BG films. The maximum



Figure 3. Effective moisture diffusivity (D_{eff}) of arabinoxylan (AX) and β -D-glucan (BG) films as a function of relative humidity at 20 °C (analysis in duplicate).



Figure 4. Proton spin – spin relaxation time T_2 as a function of temperature for arabinoxylan (\blacksquare , 11% RH; \blacktriangle , 59% RH; \bullet , 75% RH; \blacklozenge , 91% RH) and β -D-glucan (\Box , 11% RH; \triangle , 59% RH; \bigcirc , 75% RH; \diamondsuit , 91% RH) films. RH, relative humidity.

value of D_{eff} was determined to be 2.8 \times 10⁻¹³ m² s⁻¹ for AXs, whereas it was 1.5 \times 10⁻¹³ m² s⁻¹ for BGs (Fig. 3).

NMR spectroscopy is another technique that is capable of probing water motions within porous materials. Pulsed field gradient sequences permit measurement of the self-diffusion of molecules at a micrometre scale (not the subject here), whereas the spin-spin relaxation time T_2 gives information about the chemical exchange process at a nanometre scale.²⁵ Previous studies on biopolymer materials have shown that the measurement of T_2 can be related to the nanoporosity of materials.^{26,27}

Figure 4 shows the proton spin-spin relaxation time T_2 measured as a function of temperature for the AX and BG films prepared at various RH values.

 T_2 of protons within the films increased from 0°C and attained a maximum value (T_2 on top of the peak, denoted T_{2TP}) at a temperature T_{TP} , which varies depending on the nature and hydration state of samples (Fig. 4). At higher temperatures, above T_{TP} up to 80°C, a gradual reduction in T_2 was observed.

The increase in T_2 with temperature is easily explained by the decrease in τ_c (the correlation time of the molecular rotational motions; see BPP theory in Ref. 28) concomitantly with the decrease in proton dipolar interactions as the frequency of proton exchange increases. T_2 values for the AX and BG films were similar at low water content (<5%), but at water contents between 15 and 35% the AX films showed higher T_2 values than the BG films, suggesting that the rotational mobility and water exchange were

slower in the BG films. This can be explained by the difference in the film nanostructures and the smaller nanoporosity in the BG films than in the AX films.

For water contents between 15 and 35%, $T_{\rm TP}$ values were greater for the BG films than for the AX films, even at similar water contents. These temperature transitions of T_2 are consistent with the glass–rubber transition temperatures T_g measured by DSC for each kind of film. The values listed in Table 2 clearly indicate a higher T_g for the BG films than for the AX films, irrespective of their water content. A net decrease in T_g was observed, but the water content increased owing to the plasticising effect of water.^{29,30} The higher T_g values found for the BG films must be related to the slower polysaccharide motions within the films³⁰ in response to the stronger interchain interactions. BGs are chains of glucans that do not ramify and they are supposed to assemble within a more compact structure with smaller nanopores than AXs.

Beyond $T_{\rm TP}$ the apparent T_2 values decrease significantly. This phenomenon can be attributed to either of two complementary contributions: (1) rapid motions of the polysaccharide protons and/or (2) rapid chemical exchanges of water between the free state and the bound state to hydroxyl groups of polysaccharides.^{31,32}

An increase in temperature causes an increase in the frequency of the chemical exchange; this results in an increase in the probability that more than one water molecule is bound to one hydroxyl group at a given time. As determined by Aeberhardt *et al.*,³² the maximum number of water molecules per hydroxyl group is nearly two in oligosaccharides, because both oxygen and hydrogen atoms can generate hydrogen bonds. Therefore the apparent measured T_2 values decrease owing to the motion reduction of the water molecules that exhibit a higher probability to be bound to the polysaccharide hydroxyl groups.

The gradual reduction in T_2 can also be explained by the additional contribution of motions of water and polysaccharide protons,³¹ assuming the models of relaxation under slow exchange between two sites, with two different relaxation rates $1/T_{2A}$ and $1/T_{2B}$.³¹ Increasing temperature results in preferential motion of protons from the water as well as polysaccharides, stretching of the hydrogen bond and weakening of the assembly properties of the polysaccharides. Then the mobile/immobile proton ratio increases and the contribution of the polysaccharide protons to the measured T_2 values results in an apparent diminishing.

CONCLUSIONS

This work demonstrates the complementarity of TD-NMR and DVS techniques in order to study, as a function of temperature and water content, the water motions within films made of polysaccharides of various structures. The differences in the water motions measured by DVS and NMR are in agreement and consistent with the fact that the nanostructure of BG films is different from that of AX films. BGs are smooth glucan chains that are supposed to assemble within a compact structure and have smaller nanopores than AXs. We intend to extend this work to the investigation of the impact of the arabinoxylan structure (Ara/Xyl ratio) on the hydration properties of the films. It has been found that the Ara/Xyl ratio varies from one cereal tissue to another and that these structural changes are supposed to influence the water transfer between tissues. Studies of the water dynamics in composite films containing a mixture of AXs and BGs with varying content should also facilitate development of a better model of polysaccharide assemblies within cereal cell walls.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to the Regional Council of Pays de la Loire for financial support. They also thank Marion De Carvalho for the DSC analyses at INRA Nantes and V Guillard for helpful discussions. Access to the NMR facilities of the BIBS platform of INRA Angers-Nantes is acknowledged.

REFERENCES

- 1 Ralph J, Quideau S, Grabber JH and Hatfield RD, Identification and synthesis of new ferulic dehydrodimers present in grass cell walls. J Chem Soc Perkin Trans 1 3485–3498 (1994).
- 2 Ishii T, Structure and function of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci* **127**:111–127 (1997).
- 3 Perlin AS, Structure of the soluble pentosans of wheat flours. *Cereal Chem* **28**:382–393 (1951).
- 4 MacGregor W and Fincher GB, Carbohydrates of the barley grain, in *Barley: Chemistry and Technology*, ed. by MacGregor AW and Bhatty RS. AACC, St Paul, MN, pp. 73–130 (1993).
- 5 Gruppen H, Kormelink FJM and Voragen AGJ, Water unextractable cell wall material from wheat flour. 3. A structural model for arabinoxylans. J Cereal Sci 18:111–128 (1993).
- 6 Izydorczyk MS and Biliaderis CG, Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydr Polym* **28**:33–48 (1995).
- 7 Fulcher RG, Miller SS and Ruan R, Quantitative microscopic approaches to carbohydrate characterization and distribution in cereal grains, in *Functionality of Food Phytochemicals*, ed. by Johns T and Romeo JT. Plenum, New York, NY, pp. 237–261 (1997).
- 8 Guillon F, Tranquet O, Quillien L, Utille JP, Ordaz Ortiz JJ and Saulnier L, Generation of polyclonal and monoclonal antibodies against arabinoxylans and their use for immunocytochemical location of arabinoxylans in cell walls of endosperm of wheat. J Cereal Sci 40:167–182 (2004).
- 9 Philippe S, Saulnier L and Guillon F, Arabinoxylan and (1 → 3),(1 → 4)-β-glucans deposition in cell walls during wheat endosperm development. *Planta* 224:449-461 (2006).
- 10 Philippe S, Barron C, Robert P, Devaux MF, Saulnier L and Guillon F, Characterization using Raman microspectroscopy of arabinoxylans in the walls of different cell types during the development of wheat endosperm. J Agric Food Chem 54:5113–5119 (2006).
- 11 Philippe S, Robert P, Barron C, Saulnier L and Guillon F, Deposition of cell wall polysaccharides in wheat endosperm during grain development: Fourier transform infrared microspectroscopy study. J Agric Food Chem 54:2303–2308 (2006).
- 12 Bacic A and Stone BA, Chemistry and oraganization of aleurone cell wall components from wheat and barley. Aust J Plant Physiol 8:475-495 (1981).
- 13 Crank J, The Mathematics of Diffusion (2nd edn). Clarendon, Oxford (1975).
- 14 Dervilly-Pinel G, Rimsten L, Saulnier L, Andersson R and Aman P, Water-extractable arabinoxylan from pearled flours of wheat,

barley, rye and triticale. Evidence for the presence of ferulic acid dimers and their involvement in gel formation. *J Cereal Sci* **34**:207–214 (2001).

- 15 Goodman AM, Optical interference method for the approximate determination of refractive index and thickness of a transparent layer. *Appl Opt* **17**:2779–2787 (1978).
- 16 Multon JL, Méthodes de mesure de l'activité de l'eau dans les aliments, in Techniques d'Analyse et de Contrôle dans les Industries Agro-Alimentaires, Série APRIA, Vol. 4, ed. by. Centre de Documentation des Industries Utilisatrices de Produits Agricoles, Paris, France, pp. 19–60 (1981).
- 17 Meiboom S and Gill D, Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Rev Sci Instrum* **29**:688–691 (1958).
- 18 Marquardt DW, An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. J Soc Ind Appl Math 11:431–441 (1963).
- 19 Provencher SW, CONTIN: a general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Comput Phys Commun* **27**:229–242 (1982).
- 20 Gekas V, Transport Phenomena of Foods and Biological Materials. CRC Press, London (1992).
- 21 Guillard V, Broyart B, Bonazzi C, Guilbert S and Gontard N, Moisture diffusivity in sponge-cake as related to porous structure evaluation and moisture content. J Food Sci 68:555–562 (2003).
- 22 Roman-Gutierrez AD, Guilbert S and Cuq B, Distribution of water between wheat flour components: a dynamic water vapour adsorption study. *J Cereal Sci* **36**:347–355 (2002).
- 23 Van den Dries IJ, van Dusschoten D and Hemminga MA, Mobility in maltose-water glasses studied with ¹H NMR. J Phys Chem B 102:10483-10489 (1998).
- 24 Roman-Gutierrez AD, Mabille F, Guilbert S and Cuq B, Contribution of specific flour components to water vapor adsorption properties of wheat flours. *Cereal Chem* 80:558–563 (2003).
- 25 Brownstein KR and Tarr CE, Importance of classical diffusion in NMR studies of water in biological cells. *Phys Rev A* 19:2446–2453 (1979).
- 26 Kleinberg RL and Horsfield MA, Transverse relaxation processes in porous sedimentary rock. J Magn Reson 88:9–19 (1990).
- 27 Rondeau-Mouro C, Defer D, Leboeuf E and Lahaye M, Assessment of cell wall porosity in Arabidopsis thaliana by NMR spectroscopy. Int J Biol Macromol 42:83–92 (2008).
- 28 Bloembergen N, Purcell EM and Pound RV, Relaxation effects in nuclear magnetic resonance. Phys Rev 73:679–712 (1948).
- 29 Roos Y and Karel M, Differential scanning calorimetry study of phase transition affecting the quality of dehydrated materials. *Biotechnol Prog* 6:159–163 (1990).
- 30 Mansfield ML, An overview of theories of the glass transition, in The Glassy State in Foods, ed. by Blanshard JMV and Lillford PJ. Nottingham University Press, Loughborough, pp. 103–122 (1993).
- 31 Zimmerman JR and Brittin WE, Nuclear magnetic resonance studies in multiple phase systems: lifetime of a water molecule in an adsorbing phase on silica gel. J Phys Chem 61:1328–1333 (1957).
- 32 Aeberhardt K, de Saint Laumer J-Y, Bouquerand P-E and Normand V, Ultrasonic wave spectroscopy study of sugar oligomers and polysaccharides in aqueous solutions: the hydration length concept. Int J Biol Macromol 36:275–282 (2005).

Chapitre II

Mobilité de l'eau et des chaînes de polymères dans les films suivie par RMN à bas champ

Résumé

Des films mono-moléculaires d'arabinoxylanes et de β -glucanes (commerciaux) ont été préparés. Les isothermes de sorption (en mode statique) de l'eau dans ces films ont été comparés aux isothermes dans les poudres de départ (Ying *et al.*, 2011c, voir annexe). Pour une même activité de l'eau (Aw), les films de β -glucanes adsorbent plus d'eau que les films d'AX.

Les études par RMN des films mono-moléculaires AX73 et BG ont permis de mettre en avant, via des mesures de temps de relaxation spin-spin T_2 de l'eau en fonction de la température, des cinétiques d'échanges hydriques très complexes au sein des films de polysaccharides. La mobilité de l'eau mesurée par RMN bas champ est bien associée à des phénomènes d'échanges entre de l'eau liée aux fonctions hydroxyle des polysaccharides et l'eau libre dans des micropores à l'échelle des nanomètres. En parallèle, l'analyse de la mobilité des chaines de polysaccharides a été effectuée en fonction de la température, à travers des mesures du second moment dipolaires M₂ des protons de la phase solide (Ying *et al.*, 2011b, page suivante; Ying *et al.*, 2011c en annexe).

Les résultats montrent que la préparation des échantillons (sous forme de poudre, de films hachés ou empilés en rondelles) et leur teneur en eau ont un impact très significatif sur les mesures de RMN (Ying *et al.*, 2011c, voir annexe).

Ces travaux ont également permis de montrer que le taux de substitution des AX avait un impact important sur les propriétés d'hydratation des films. La diminution des M_2 en fonction de la température est plus importante dans les films d'AX de haut degré de substitution car les interactions entre les chaines d'AX sont plus faibles (distance entre chaines plus grande et mobilité plus importante). L'augmentation du taux de substitution des AX induit un écartement des chaînes d'AX entre elles (Rondeau-Mouro *et al.*, 2011, voire annexe), arrangement qui modifierait les phénomènes d'échanges hydriques au sein des films. Finalement, les films de BG présentent une mésostructure plus compacte, ralentissant la mobilité de l'eau au sein des films.

Carbohydrate Polymers 86 (2011) 812-822



Films of arabinoxylans and β -glucans extracted from cereal grains: Molecular motions by TD-NMR

Ruifeng Ying, Luc Saulnier, Corinne Rondeau-Mouro*

UR1268 Biopolymères, Interactions, Assemblages, INRA, F-44316 Nantes, France

ARTICLE INFO

Article history: Received 31 January 2011 Received in revised form 28 April 2011 Accepted 18 May 2011 Available online 26 May 2011

Keywords: Arabinoxylans β-Glucans Cereal Cell-walls NMR Polysaccharide Water mobility

1. Introduction

The cell walls in wheat grain endosperm account only for 2-4% of the dry weight, but have a significant effect on wheat grain uses such as milling, baking, brewing and in animal feeding or human nutrition (Fincher & Stone, 1986). Arabinoxylans (AX) and mixed $(1 \rightarrow 3)$ $(1 \rightarrow 4)$ - β - ν -glucans (BG) are the main components of the endosperm cell walls of cereal grains and represent around 70 and 30% of the walls, respectively (Fincher & Stone, 1986; Saulnier, Sado, Branlard, Charmet, & Guillon, 2007). The basic structure of AXs comprises a linear backbone of $(1 \rightarrow 4)$ linked β -D-xylopyranosyl (Xylp) residues to which α -L-arabinofuranosyl (Araf) substituents are attached through O-2 and/or O-3. AXs exhibit large natural variations in their structure mainly due to the degree of substitution of the xylose residues (i.e. either mono- or di-substituted) and the arabinose to xylose global ratio (A/X) with values ranging from 0.31 to 1.06 (Dervilly, Saulnier, Roger, & Thibault, 2000; Izydorczyk & Biliaderis, 1995; Saulnier et al., 2007). Some arabinose residues are esterified on the O-5 position mainly by ferulic acid

Tel.: +33 0 2 40 67 50 50; fax: +33 0 2 40 67 50 84. E-mail addresses: corinne.rondeau@nantes.inra.fr,

corinne.rondeau@cemagref.fr (C. Rondeau-Mouro).

ABSTRACT

To mimic the lamellar organisation of polymers within cereal cell walls, films of arabinoxylan (AX) and β -glucan (BG) were prepared and characterized using Time-Domain (TD) ¹H NMR at different water contents and temperatures of measurement. The glass transition temperature (T_g) of the films was measured using differential scanning calorimetry (DSC). The investigation of M_2 , i.e. the second moment of proton dipolar interactions, and T_2 , i.e. the water spin-spin relaxation times, as a function of temperature and water content emphasized the complementary mechanisms involving the mobility of the polysaccharide chains both below and above the glass transition temperature, and the mobility of water molecules in interactions with the hydroxyl groups of the polysaccharides. In spite of the complexity of these mechanisms, we found that BG films featured higher M_2 values than AX films, which is consistent with higher proton intra- and inter-molecular dipolar interactions. These results, which are in agreement with the kinetics of the exchange between water molecules.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

(Izydorczyk & Biliaderis, 1995; Philippe, Tranquet, Utille, Saulnier, & Guillon, 2007). Mixed linkage $(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)$ - β -D-glucans, which are commonly known as β-glucans, are linear homopolymers of D-glucopyranosyl (Glcp) residues linked mostly via two or three consecutive β -(1 \rightarrow 4) linkages that are separated by a single β - $(1 \rightarrow 3)$ linkage (MacGregor & Fincher, 1993). There is currently no evidence that two or more adjacent β -(1 \rightarrow 3) linkages occur in β-glucan chains (Cui, Wood, Blackwell, & Nikiforuk, 2000; Dais & Perlin, 1982); the occurrence of large blocks of adjacent β- $(1 \rightarrow 4)$ linkages would most likely cause a tendency for inter-chain aggregation through strong hydrogen bonding along the celluloselike regions. This property would potentially make the polymers less soluble in water (Izydorczyk, Macri, & MacGregor, 1998a, 1998b). Finally, BGs can be considered as a copolymers of 3-O-β-D-cellobiosyl-D-glucose and 3-O-β-D-cellotriosyl-D-glucose, which are tri- and tetra-saccharides, respectively, although longer blocks of consecutive β -(1 \rightarrow 4) linkages are observed amongst the different sources of cereal BGs (Cui et al., 2000; Wood, Weisz, & Blackwell, 1991, 1994)

The local heterogeneity of the composition of endosperm cell walls has been investigated on samples recovered from fractionation processes (Ciacco & d'Appolonia, 1982) by the direct detection of fluorescence (Fulcher, Miller, & Ruan, 1997), coupling imaging and spectroscopic techniques (Barron, Parker, Mills, Rouau, & Wilson, 2005; Philippe, Barron, et al., 2006; Philippe, Robert, Barron, Saulnier, & Guillon, 2006), and immunolabelling techniques (Guillon et al., 2004; Philippe, Saulnier, & Guillon, 2006; Wood et al., 1994). It was concluded that BGs are present in a higher

Abbreviations: AX, Arabinoxylans; BG, β -glucans; DSC, differential scanning calorimetry; TD-NMR, Time-Domain nuclear magnetic resonance; T_g , glass transition temperature; RH, relative humidity.

^{*} Corresponding author at: UR1268 Biopolymères, Interactions, Assemblages-INRA, Rue de la Géraudière, BP 71627, 44316 Nantes Cedex 3, France.

^{0144-8617/\$ -} see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.carbpol.2011.05.033

proportion in the cell walls of the aleurone and subaleurone layers than in the starchy endosperm, which contains a higher content of AX in its central zone (Philippe, Saulnier, et al., 2006). Moreover, aleurone cell walls are characterized by a low A/X ratio in the range of 0.3–0.4 compared to 0.5–0.6 in the starchy endosperm cell walls. This chemical heterogeneity has been extensively described but little is known about the time-course and the pattern of AX and BG deposition in cell walls during endosperm development. Intermolecular interactions between the two polymers have also not been extensively explored although lzydorczyk and McGregor (2000) suggested that hydrogen bonding could occur between the two polymers if the lengths of uninterrupted β -(1 \rightarrow 4)-glucan segments in BG and unsubstituted β -(1 \rightarrow 4)-xylan in AX are sufficient.

Various observations using electron microscopy have shown a lamellar organisation in wheat endosperm cells walls that possibly reflects the assembly of the AX and BG polymers (Bacic & Stone, 1981; Guillon et al., 2004). In order to study the impact of their fine structures and interactions on primarily the hydration properties of cell walls, we prepared AX and BG films as models of the grain endosperm cell walls. We prepared a highly substituted AX with an A/X ratio of 0.73, which is consistent with the ratio determined for endosperm cell walls. Since BGs are present in wheat cell walls in a low amount and exhibit low water solubility possibly due to strong interchain interactions, we used commercial water-soluble BGs obtained from barley.

Herein, the Time-Domain (TD) ¹H NMR spectroscopy was chosen to investigate the mobility of the polymer chains and water in arabinoxylan and β -glucan films with different water contents as a function of temperature. In recent years, there has been an increasing interest in the use of Time-Domain ¹H NMR to study lowwater-content food and biological materials (Cornillon & Salim, 2000; Rondeau-Mouro, Defer, Leboeuf, & Lahaye, 2008; Ruan & Chen, 1998). TD-NMR provides information not only about the molecular motion and state of water but also about the 'packing' of the protons in the solid phase via the second moment, M_2 , of the dipolar interactions between protons (Aeberhardt, Bui, & Normand, 2007; Derbyshire et al., 2004; Kumagai, MacNaughtan, Farhat, & Mitchell, 2002; Partanen, Marie, MacNaughtan, Forsell, & Farhat, 2004; Van den Dries, Van Dusschoten, & Hemminga, 1998; Van den Dries, Van Dusschoten, Hemminga, & Van der Linden, 2000).

In the present study, the influence of both the water content and temperature on the mobility of water and the AX and BG chains within the films are discussed in relation to the structure of the molecules, their thermodynamic properties, and possible interactions through hydrogen bonding and the chemical exchange of protons with water molecules.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Water-extractable arabinoxylans were prepared from wheat flours. The method of Dervilly-Pinel, Rimsten, Saulnier, Andersson, and Aman (2001) was used for the isolation of homogeneous AX fractions from wheat flour. The pure AXs (A/X = 0.73) were fractionated by graded ethanol precipitation, as was previously described (Dervilly et al., 2000). An ethanol concentration of 0.5% (v:v) was used in order to avoid the coprecipitation of AX chains due to their physical entanglement (Dervilly-Pinel et al., 2001). Barley water-soluble β -glucans (medium viscosity, purity >97%) were purchased from Megazyme.

2.2. Physicochemical analyses

The method of Englyst and Cummings (1988) was used to determine the composition of the monosaccharides. The polysaccharides were hydrolyzed with 2 N sulphuric acid at 100 °C for 2 h. Individual sugars were then converted to alditol acetates and analysed using gas-liquid chromatography (OV 225 column ($30 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm}$), 0.25 µm film thickness, FID detector at *T* = 230 °C). Analyses were made in duplicate (coefficients of variation <2%). The AX content was calculated from the sum the arabinose and xylose contents.

Protein contents were determined colorimetrically (Bradford, 1976) using BSA as the standard. The phenolic acid content in AX was determined by spectrophotometry as previously described by Saulnier, Vigouroux, and Thibault (1995).

Purified polysaccharides AX and BG were dissolved in deionised water (2 mg/mL) for 8 h at 60 °C with magnetic stirring and then filtered over a 0.45 µm membrane. The samples were injected at room temperature on a high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) system comprising two Shodex OH-pack SB HO 804 and 805 columns eluted at 0.7 mL/min with 50 mM NaNO₃ containing 0.02% NaN3. On-line molar mass and intrinsic viscosity determinations were performed at room temperature using a multi-angle laser-light scattering (MALLS) detector (mini-Dawn®, Wyatt, USA; operating at three angles: 41, 90 and 138°), a differential refractometer (ERC 7517 A) (dn/dc=0.146 mL/g) and a differential viscometer (T-50A, Viscotek, USA). ASTRA 1.4 (Wyatt, USA) and TRISEC software were used to determine the weight average molar mass (M_w) , the radius of gyration (R_G) and the intrinsic viscosity $[\eta]$. The polydispersity index, $I = M_w/M_n$, was calculated from the HPSEC-MALLS results.

2.3. Film preparation

The polysaccharides were dissolved in water (20 mg/mL) and 2.5 mL of each solution was cast into polystyrene Petri dishes (PS, Ø 5 cm, film thickness 10μ m). The films were dried in a climate room at $40 \,^{\circ}$ C and 40% relative humidity (RH). Reflectance spectroscopy (SPECORD S 600) was used to determine the film thickness (Goodman, 1978).

The water sorption isotherms of the films were determined at 20 °C using the saturated salt method (Englyst & Cummings, 1988). The films were equilibrated at various water activities in desiccators containing saturated salt solutions with known RHs:LiCl (11%), NaBr (59%), NaCl (75%), and BaCl₂ (91%). The sorption of water was followed gravimetrically until equilibrium was achieved, which generally occurred within 15 days (Greenspan, 1977).

2.4. Differential scanning calorimetry (DSC)

The glass transition temperature, $T_{\rm g}$, of the AX and BG films was measured using a DSC Q100 differential scanning calorimeter (TA Instrument) previously calibrated with indium. The films (20 mg) were equilibrated at the moisture contents considered in this work and then heated from -40 to 120 °C and from -40 to 150 °C at 3 °C/min. An empty pan was used as a reference and the glass transition temperature of the specimens was determined from the midpoint of the heat capacity change observed during the second scan.

2.5. NMR measurements

¹H NMR measurements were performed using a Time-Domain spectrometer (Minispec BRUKER, GERMANY) operating at a resonance frequency of 20 MHz. The NMR system was equipped with a temperature control device connected to a calibrated optic fibre (Neoptix Inc., Canada) allowing for ± 0.1 °C temperature regulation. The AX and BG films (film thickness 10 μ m, 0 8 mm) were inserted into a 10 mm diameter glass tube. The tubes were filled to about 10 mm in height in order to place the samples within the homogeneous region of the NMR magnet then weighed and hermetically closed. A Teflon rod was used to fill the dead volume of each tube to avoid water loss. Thermal equilibration was ensured by allowing a 7 min waiting time after each temperature step before the experiment was started. The samples at various water contents were analysed at temperatures ranging from -40 to 80 °C at increment of 5 °C. The regulation of temperature was carried out using liquid nitrogen; higher temperatures would have required another regulation system, which was unavailable during testing. Two types of pulse sequences were used. Proton free induction decays (FID) were acquired using the following parameters: a 90° pulse of $3.2 \,\mu$ s, a dwell time of $0.5 \,\mu$ s between two successive data points, 160 scans of 19,900 data points, and a recycle delay of 2 s between each scan. The Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) pulse sequence was used with a delay between the 90° and 180° pulses of $40 \,\mu$ s. 160 scans were acquired with 800 data points (Meiboom & Gill, 1958).

The second moment, M_2 , values were calculated from the broad part of the FID curve that arose due to the protons of the solid fraction. As pointed out by Abragam (1961), the NMR spectrum of these protons is well represented by a combination of a sinus function and a Gaussian broadening following Eq. (1):

$$I_{FID}(t) = A \exp\left(-\frac{a^2 t^2}{2}\right) \frac{\sin bt}{bt} + B \exp\left(-\frac{t}{T_2^*}\right)$$
(1)

In this equation, parameters A and B represent the contributions of the immobile and mobile protons in the sample, respectively. The NMR spectrum of the immobile proton fraction is assumed to have a rectangular line shape with a total width of 2b, which is convoluted with a Gaussian line shape with a standard deviation given by parameter *a*. The second moment, which is a measure of the strength of the dipolar interaction of the hydrogen atoms (for details, see Section 3), is calculated from the fit parameters *a* and *b* using Eq. (2).

$$M_2 = a^2 + \frac{1}{3}b^2 \tag{2}$$

The mobile fraction (B) should display a lower limiting value of T_2^* around 1.3×10^{-6} s, which is approximately 2b and corresponds to an upper limit of the rotation correlation time, τ_c , of 5×10^{-5} s, as calculated using the Bloembergen–Purcell–Pound theory (Bloembergen, Purcell, & Pound, 1948). Protons with τ_c values higher than 5×10^{-5} s are deemed immobile and belong in the A fraction.

Transverse relaxation data were analysed with the following model:

$$I_{\text{CPMG}}(t) = \sum_{i=i}^{i} A_i \times \exp\left(-\frac{t}{T_{2i}}\right)$$
(3)

where T_{2i} are the relaxation times of the mobile populations and A_i is the intensity of the mobile populations (Meiboom & Gill, 1958). To ensure the accuracy of the data treatment, spin–spin relaxation decay curves were fitted using CONTIN (Provencher, 1982) and a discrete method (Marquardt, 1963).

For the sake of clarity, three NMR parameters must be defined: (i) T_{ZTP} is the maximum value of T_2 when varying the temperature of the measurement (T_2 on top of the peak), (ii) T_{T_2} is the transition temperature for T_2 , and (iii) T_{M_2} is the transition temperature for M_2 when is measured as a function of temperature.

Table 1

Molecular characteristics of AX and BG. Weight average molar mass (M_W) , radius of gyration (R_G) , polydispersity index (I), intrinsic viscosity $([\eta])$ and arabinose to xylose ratio (Ara/Xyl).

Samples	$M_{\rm w}\times 10({\rm gmol^{-1}})$	R _G (nm) I		[η] (mL/g)	Ara/Xyl	
AX	233.2	34	2.4	259.64	0.73	
BG	283.5	31	1.5	331.2		

3. Results and discussion

3.1. Structural and physicochemical characterizations

Table 1 shows the molar mass, the radius of gyration and the intrinsic viscosity of AX and BG. While the average molecular weights and intrinsic viscosities were similar, the polydispersity index of AX was higher than that of BG. The protein contents of AX and BG were 3.0% and 0.1%, respectively. In addition, AX contained 0.16% ferulic acid esterified to the arabinose side chains. The degree of substitution of the xylan backbone by arabinose residues (A/X ratio: 0.73) was in the upper range of that observed for wheat endosperm AX (Dervilly et al., 2000; Hoffmann, Roza, Maat, Kamerling, & Vliegenthart, 1991; Izydorczyk & Biliaderis, 1995; Rattan, Izydorczyk, & Biliaderis, 1994).

The majority of Araf residues were disubstituted xylose residues (29.3% of the xylan backbone as estimated by liquid ¹H NMR, not shown), while monosubstituted and unsubstituted xyloses represented 14.4% and 56.3%, respectively, of the xylan backbone. The relative proportion of disubstitution and monosubstitution of the xylose residues in the xylan backbone reflect a non-random process of the biosynthetic mechanisms favouring disubstitution (Dervilly-Pinel, Tran, & Saulnier, 2004). However, the random or non-random arrangement of substitution along the xylan chains is not clearly established. Tentative structural models support an irregular distribution of the arabinose substituents with possible blocks of contiguously unsubstituted Xylp (Fig. 1), and their proportions and lengths vary according to the A/X ratio (Dervilly et al., 2000; Izydorczyk & Biliaderis, 1994, 1995; Saulnier et al., 2007). It has been shown that for low-substituted AX (A/X \leq 0.3), the regions of contiguous unsubstituted xylan chains potentially interact together through hydrogen bonding and contribute to crystallization between the xylan chains (Hoije, Sternemalm, Heikkinen, Tenkanen, & Gatenholm, 2008). For highly substituted AX, the arabinose side-chains prevent molecular interactions and crystallization between the xylan chains (Hoije et al., 2008). In our AX sample (A/X=0.73), regions of contiguous unsubstituted xylose residues are not abundant which limits the hydrogen bonding between β -(1 \rightarrow 4)-xylans in agreement with the amorphous state of the films that was revealed by X-ray diffraction (results not shown)

The β -glucan chains comprised 3-O- β -D-cellobiosyl-D-glucose (trisaccharide unit, DP 3) and 3-O- β -D-cellotriosyl-D-glucose (tetrasaccharide unit, DP 4) which accounted for 90–95% of the total oligosaccharides, and longer oligosaccharides (DP5-6) which accounted for 5–10% of the total (Fig. 2) (Wood et al., 1991, 1994). Despite the non-random arrangement of the individual (1 \rightarrow 3) and (1 \rightarrow 4)- β -linkages, the cellotriosyl (G3), cellotetraosyl (G4), and longer cello-oligomers were arranged in an essentially independent



Fig. 1. Structure of arabinoxylans (Araf: arabinofuranose, Xylp: xylopyranose, FerA: ferulic acid).



Fig. 2. General molecular structure of β-glucans (Glcp: glucose).

and random fashion in the β -glucan chains (Buliga, Brant, & Fincher, 1986; Staudte, Woodward, Fincher, & Stone, 1983). The G3/G4 molar ratio is a characteristic that distinguishes β -glucans from various sources (Cui et al., 2000; Izydorczyk et al., 1998a, 1998b; Wood et al., 1991, 1994); the molar ratio of barley BG is usually between 2.8 and 3.3 (Izydorczyk et al., 1998a, 1998b; Wood et al., 1991, 1994). The X-ray diffractograms acquired for the BG films were consistent with an amorphous state (results not shown), but the G3/G4 molar ratio of around 3 suggests possible conformational regularity in BG through hydrogen bonding between long blocks of contiguous cellotriosyl fragments (Izawa, Kano, & Koshino, 1993). This inter-chain interaction could affect the solubility of BG, but did not give rise to stable crystalline structures as was supposed by Tvaroska, Ogawa, Deslandes, and Marchessault (1983).

In addition to their different molecular structures, AX and BG exhibit different physicochemical characteristics. The two first columns of Table 2 indicate the water content and the glass transition temperature of AX and BG films prepared at different relative humidities. The water content increased with increasing RH within the AX and BG films. For RHs between 11 and 75%, the BG films contained more water than the AX films; however, at an RH of 91%, the tendency was inversed. The T_g of the AX and BG films decreased as the water content increased due to the plasticising effect of water (Roos & Karel, 1990; Van den Dries et al., 1998). The Tg values of the AX and BG films were much higher than those of monosaccharides such as glucose (Van den Dries, Besseling, Van Dusschoten, Hemminga, & Van der Linden, 2000), disaccharides such as maltose (Van den Dries et al., 1998), and oligosaccharides such as maltodextrin (Kilburn, Claude, Schweizer, Alam, & Ubbink, 2005) for the same water content. However, they were similar to the value observed for polysaccharides such as starch (Roudaut, Farhat, Poirier-Brulez, & Champion, 2009). The T_g values were higher for the BG films than for the AX films when the water content was between 3 and 35%.

The molecular processes that contribute to the glass transition temperature are currently the subject of intensive research and debate. Whether the changes in thermodynamic properties (e.g. specific heat and volume) that are seen during cooling (or reheating) are due to a real thermodynamic phase transition or are of purely kinetic origin is a controversial issue, and no theory has yet been proposed which accounts for all of the observed experimental features. Several excellent reviews that describe the current thinking in this field have been published (Ediger, Angell, & Nagel, 1996; Mansfield, 1993). Models based on statistical mechanical or free-volume theories are the simplest and most widely invoked and depend on molecular motion in relation to the medium viscosity. Therefore, the difference of the glass transition temperature between the BG and AX films could be linked to the different motions of the polymer chains. We studied the molecular mobility of water and polysaccharide protons in AX and BG films as a function of water content and temperature using ¹H NMR.

3.2. NMR analyses

The study of the free-induction decay (FID) observed for these films indicated an oscillation (or a beat) of the NMR signal arising from residual local orders within the films. This short-range organisation induces strong dipolar interactions between protons which are characterized by the second moment, M_2 (Aeberhardt et al., 2007; Derbyshire et al., 2004; Kumagai et al., 2002; Partanen et al., 2004; Van den Dries et al., 1998; Van den Dries, Van Dusschoten, et al., 2000). This informs about the polysaccharide motions in relation to the dipolar interactions between chains and the nano-structure of the films.

M₂ values should originate from two contributions: one corresponds to the intramolecular dipolar interactions which are modulated by local proton mobility and their inter-distances within molecules (within polysaccharide chains), and the other is due to intermolecular dipolar interactions that are dependent on the motion of the chains and the average distance between the polysaccharide chains. These contributions were easily observed in the FID signals recorded at 20 °C for the AX and BG films (Fig. 3a and b). The oscillations were observed at short times for the dried samples (0% water). The sinusoidal pattern observed in the FIDs has already been depicted in glassy oligosaccharides such as maltose (Aeberhardt et al., 2007; Derbyshire et al., 2004; Van den Dries et al., 1998; Van den Dries, Van Dusschoten, et al., 2000) or starch (Kumagai et al., 2002; Partanen et al., 2004; Roudaut et al., 2009). The fast decay of the signal was caused by the protons of the rigid phase (polysaccharides), whereas the slow decay is related to the mobile protons of the liquid water phase (Abragam, 1961). As the water content of samples increased, the FID beat pattern was less pronounced as a consequence of a decrease in the number and/or strength of the dipolar interactions within the AX and BG films (Fig. 3). At a higher water content, the small beat of the FID signal for AX films disappeared while it remained for the highly hydrated BG films. This observation emphasizes the different hydration behaviour of AX as compared to BG films. This phenomenon could result from: (i) a reduction of the proton density, (ii) an increase of the proton distances, and/or (iii) an improvement of the anisotropic mobility of the polysaccharide chains which in

Table 2

Values of water content (%), glass transition temperature (T_g), transition temperatures from M_2 (T_{M_2}), transition temperatures from T_2 (T_{T_2}) and corresponding T_2 values (T_{2TP}) for AX and BG films prepared at different RH.

RH (%)	AX films				BG films					
	Water content (%)	$T_{g}^{a} (^{\circ}C)$	T_{M_2} (°C)	T_{T_2} (°C)	$T_{\rm 2TP}({\rm ms})$	Water content (%)	T_{g}^{a} (°C)	T_{M_2} (°C)	T_{T_2} (°C)	$T_{\rm 2TP}$ (ms)
11%	3.50%	>80	0	>80	nd	4.71%	nd	0	>80	nd
59%	15.24%	82	nd	60	7.8	16.43%	101	nd	65	3.62
75%	17.82%	56	60	50	8.98	19.40%	71	nd	55	3.65
91%	34.17%	-6	-5; 60	20	12.05	28.86%	29	50	35	4.47

^a T_g (onset) determined from the 2nd heating run (at 3 °C/min).



Fig. 3. FID signal of AX (a) and BG (b) films with different water contents at 20 °C.

the same time diffuse more rapidly. The source of this phenomenon, which seems to vary from one polysaccharide type to another, can be investigated by calculating the second moment values, M_2 , and measuring the water spin-spin relaxation times, T_2 , as a function of the water content and temperature variations.

3.3. Second moment M₂ of dipolar interactions

The fitting of Eq. (1) permitted the calculation of the second moment, M_2 , values as a function of parameters *a* and *b* following

Eq. (2) (see Section 2). The results are compiled in Fig. 4 showing the effects of both water content and temperature on M_2 within the AX and BG films. M_2 evolved linearly with temperature as already shown for the various carbohydrate materials and mixtures in their glassy state (Derbyshire et al., 2004; Kumagai et al., 2002; Van den Dries et al., 2000). At certain temperatures (referred to as T_{M_2}), breaks in M_2 were observed with a consequent change in the linear slope of M_2 versus temperature. A comparison of the slopes of the linear variation of M_2 versus temperature indicated changes which depend on the structure of the polysaccharide as well as their



Fig. 4. Effect of temperature and water content on the second moment (M_2) for AX films (a) white cross = 0% (P_2O_5); filled cubes RH = 11%; filled triangles RH = 59%; filled circles RH = 75%; filled diamonds RH = 91%; and for BG films (b) black cross = 0% (P_2O_5); open cubes RH = 11%; open triangles RH = 59%; open circles RH = 75%; open diamonds RH = 91%.

glassy–rubbery transition. This observation is consistent with published results which showed that the slope of M_2 as a function of $(T-T_g)$ evolves with the type of oligosaccharide (Aeberhardt et al., 2007). Dried films of AX and BG (0% water content) were characterized by similarly high M_2 values (>8 × 10⁺⁹ rad² s⁻²) and slopes consistent with strong dipolar interactions between polysaccharide protons potentially through hydrogen bonding without bridging water molecules. Fig. 4 indicates that lower measured M_2 values correlated with higher water content. The decrease of M_2 with an increase in water content indicated a lower proton dipolar strength or a lower proton density due to an increase in the mobility and/or average distances of the polysaccharide protons (Van den Dries, Van Dusschoten, et al., 2000). However, as the water content of the samples increased, the intensity of the FID signal (A+B from

Eq. (1)) improved which is in support of the fact that proton density was higher for water than for polysaccharides (namely 2/18 for water, compared to 8/132 and 10/162 for AX and BG respectively). Therefore, the impact of water on M_2 could not be linked to lower proton density. Moreover, at -40 °C below the T_g values of the polysaccharide films, the intra-molecular contributions in samples should remain constant regardless of the water content. Therefore, the changes in the M_2 values are related to variations of the intermolecular interactions that are modulated only by the average distances between the protons of the polysaccharides since their proton mobility was extremely reduced. Thus, at -40 °C, the decrease of M_2 as a function of water content indicated higher average distances between the polysaccharide chains (Van den Dries, Besseling, et al., 2000).



Fig. 5. Linear variation against water content of the parameters a (diamonds) and b (cubes) from Eq. (2), calculated for AX films (filled symbols) and BG films (open symbols) at 20 °C.

After increasing the water content within films to between 3 and 20%, few breaks of slope were observed below 0°C. A comparison of the slopes of M_2 versus temperature for the AX and BG films also indicated few variations within the nature of the polysaccharides. This observation indicates that below 0°C the protons of the arabinose residues were as immobile as the xylose and glucose protons. The dipolar interactions were modulated only by the water content which affected the average proton distances.

In order to more precisely investigate the variation of M_2 relative to the water content, it was possible to analyze the changes of parameters *a* and *b*, which were estimated from Eq. (2). Fig. 5 shows the changes in parameters *a* and *b* with the water content of the films at 20 °C. Parameters *a* and *b* depend on the strength of the dipolar interactions (Abragam, 1961) in solid samples and are related to one another through molecular structures and molecular assemblies (non-random molecular motions) (Derbyshire et al., 2004). The spin–spin relaxation, T_{21} , of the low-mobility phase is proportional to *a* following the relation $T_{21} = \sqrt{2/a}$ in which *a* is characteristic of the energy involved in the average interaction between protons (i.e. the protons of the OH and CH moieties of the polysaccharide molecules), whereas *b* depends on both the number of interactions and the distance between these dipoles (Abragam, 1961).

The calculation of T_{21} at 20 °C gave values varying from 25.3 to 31.6 µs, which are close to the values obtained for different oligosaccharides at various hydration levels (Aeberhardt et al., 2007). This result suggests that, under certain thermal conditions, T_{21} can be considered to be independent of the nature of the oligosaccharides. Indeed, as shown in Fig. 5, b decreased linearly as the water content increased, whereas a remained relatively constant except for AX films with a water content >35% for which a began to decrease, which was confirmed at higher temperatures (not shown). Therefore, as long as the temperature was lower than the T_{g} of the polysaccharide films, the motion of the polysaccharide protons was reduced and a remained constant regardless of the hydration level assuming no effect of water on this parameter (i.e. no 'solid water'). However, given that the addition of water increased the mobility of the solid phase protons (i.e. the protons of the CH and OH moieties of the polysaccharides) above the T_g presumably by increasing the proton exchange frequency, a higher relaxation time of these protons, i.e. a decrease in a, should have been observed as the water content was increased. The decay time, b, decreased with increasing water content and, at a very high hydration level, the damped oscillations characteristic of the solid phase disappeared, as seen in Fig. 3a and b. At a high water content, the molecular motions became so important that the intermolecular interactions average giving rise to the loss of 'non random' structures (Abragam, 1961). A comparison between the two kinds of films indicated that the values of b were higher for BG films with a less pronounced decrease when water content increased. These results were confirmed by the variations of M₂ at temperature below 50 °C, as seen in Fig. 4. For water contents between 3 and 20% (RH=11-75) and temperatures varying from 0 to 50°C (therefore, below T_g) few changes in the slopes were noted for films made using the same polysaccharide. Nevertheless, the M_2 values of the BG films were higher and the slopes weaker as compared to those of the AX films. These results are consistent with the measured T_g values which were higher for the BG films and must be connected with stronger dipolar interactions between protons due to the shorter average distances between the protons of the polysaccharide chains within the BG films. Therefore, for samples below 50 °C with low water content, changes in M₂ can be related to the differences in the motion of the polysaccharide protons and/or their average distances in relation with: (i) the chemical structure of the polysaccharides, and (ii) the assemblies of the polysaccharides within films.

In AX and BG, the xylose and glucose residues are attached through two glycosidic bonds per residue (except for the reducing ends) while the arabinose residues are attached to the linear backbone by a single linkage per residue. Therefore, the xylose and glucose residues should be less mobile than the arabinose residues, thereby inducing a larger average mobility of the ring protons of arabinose in AX films. Moreover, the interproton distance gap can be explained by the polysaccharide structure (Figs. 1 and 2). Compared to the smooth chains of BG, AX features branched polymers of xylose that contain 73% arabinose substituents of which 14.6% of them are bound to xylose residues in position O-3 and 29.3% in position O-3 and O-2 (as determined by high-field ¹H NMR). The



Fig. 6. Ratio of the mobile (B) and immobile (A) proton fractions as function of temperature for AX films (filled triangles RH=59%; filled circles RH=75%; filled diamonds RH=91%) and BG films (open triangles RH=59%; open circles RH=75%; open diamonds RH=91%).

steric hindrance of the arabinose branch points explains the larger interproton distances, which could enlarge as the temperature is increased.

Comparison of the breaks in M_2 (T_{M_2} in Table 2) indicated that, in the rubbery state, the protons of the polysaccharides (exchangeable and non-exchangeable) as well as the polysaccharide chains become very mobile which induces the melting of the hydrogenbond network and then a significant decrease in M₂. However, in the glass state, some differences in the T_{M_2} values and the transition temperatures determined by DSC were observed. A transition temperature of around 0°C was measured for the samples with low hydration (RH = 11%) while the T_g could not be determined for this hydration state and was assumed to be higher than 100 °C. This transition could originate from the ice melting which would contribute to the intermolecular dipolar interactions. This hypothesis is surprising considering that the hydration level of these films is <5%. Moreover, Fig. 6 shows the ratios of the mobile (B) and immobile (A) proton fractions, which were determined using Eq. (1), as a function of temperature within the films for water contents between 3 and 35%. There was no evidence of an increase in B/A between -40 °C and 0 °C regardless of the water content of the films. The transition temperature at 0 °C may be due to a loosening of the intra-molecular dipolar interactions between the protons of the polysaccharides above 0 °C. The measurement of this transition using low-field NMR when no such transition was detectable by DSC can be explained by the different time scale of the measurements: the rate of temperature change in DSC corresponds with a glass-transition time scale of seconds while NMR measures the motion of polysaccharides with correlation times on the microsecond scale. Other breaks in the slope of M_2 versus temperature were observed for higher water contents. A transition was estimated at around 60 °C for AX films prepared at RH=75%, which is close to the T_{σ} value of 56 °C determined by DSC. This transition was also present for AX films prepared at RH = 91% in addition to a transition at around -5 °C, which is also close to the T_g value of -6 °C determined for this film. The presence of the second transition around 60 °C, which is close to the T_g for AX films prepared at RH = 75%, may originate from a hydration heterogeneity or a dehydration of the AX films prepared at RH = 91%. The T_{M_2} of BG films with a water content of 28.9% (RH=91%) was estimated to be 50°C, which is 21 °C higher than the Tg value. As for the AX films, either the hydration of the films was not homogeneous or another phenomenon resulted in the transition at a higher temperature. Van den Dries, Besseling, et al. (2000) have explained that this additional transition is caused by an abrupt decrease in viscosity above the T_g due to collapse phenomenon. This phenomenon has been observed by DSC, light scattering, and viscosity measurements for very high molecular weight polymers at very low concentrations (Roos & Karel, 1990; Roos, 2002; Sato, Sakurai, Norisuye, & Fujita, 1983). The collapse transition is generally considered to be a rearrangement through the intramolecular hydrogen bonds of the polymer chains from an open coil to a compact ball either due to lower temperatures or deterioration in the solvent quality.

3.4. Water relaxation time T_2

Measurements of spin–spin relaxation times, T_2 , of the water protons within films were carried out as a function of temperature. As shown in Fig. 7, the T_2 values increased from -40 °C to a maximum value (on top of the peak noted T_{2TP}) at a temperature of T_{T_2} which varies depending on the composition and hydration state of the films (Table 2). For temperatures above T_{T_2} , a decrease in T_2 was observed. This decrease could be explained by Gottwald, Creamer, Hubbard, and Callaghan (2005); (i) additional molecular diffusion processes of water, (ii) averaging due to additional rapid motions of the polysaccharide protons, or (iii) averaging due to rapid chemical exchanges of water molecules between a free state and being bound to the hydroxyl groups of the polysaccharides (the so-called fluctuations of the Larmor frequencies).

The T_2 values for the AX and BG films (see Table 2) were similar at a low water content (<5%) while the AX films displayed higher T_2 values than the BG films at water contents between 15 and 35%, which suggests that the rotational mobility and exchange of water were slower in the BG films. In the present work, the systems have to be considered relative to the glassy and rubbery states of the polysaccharide-constituting films (determined by the transition temperature T_g) as well as to the frequency of the water exchanges which depend not only on the temperature but also on the microporosity of the films.

Considering the results gathered in Fig. 7 and Table 2, the first observation is that the T_2 values increased as the temperature rose up to T_{T_2} . This phenomenon is easily explained by the decrease of τc



Fig. 7. Effect of temperature on T₂ (relaxation time) for AX films (filled cubes RH=11%; filled triangles RH=59%; filled circles RH=75%; filled diamonds RH=91%) and BG films (open cubes RH=11%; open triangles RH=59%; open circles RH=75%; open diamonds RH=91%).

when the temperature increases, which occurs concomitantly with a decrease in the proton dipolar interactions since the frequency of proton exchange rises. The second result is that the T_2 values increased with the water content in the AX films (see values of $T_{\rm 2TP}$ in Table 2); however, this is dependent on the nature of the polysaccharide since few variations of T_2 were observed within the BG films. The BG films had lower T_2 values than those of the AX films, which is consistent with faster proton exchange between the bulky and solid phases of the BG films.

For water contents between 15 and 35%, the T_{T_2} values were greater for BG than for AX which is in agreement with the differences observed for T_g and T_{M_2} (Table 2). The higher temperatures of transition and lower T_2 values are consistent with the stronger dipolar interactions of the protons in the polymers of the BG films due to the smaller chain inter-distance in the BG films as opposed to the AX films which is related to the respectively linear and branched structures of the two polymers, as was previously explained (see M_2 variations).

However, for both polymers the T_{T_2} values were lower than the T_g and T_{M_2} values for water contents between 15 and 20%, while above 20%, the T_{T_2} values were higher than T_g . These observations suggest complex and concomitant phenomena influencing the T_2 values.

In order to better understand the mechanisms governing T_2 , ratios of the mobile (B) and immobile (A) proton fractions (as determined using Eq. (1)) were plotted as a function of temperature for water contents between 15 and 35% (Fig. 6). The B/A ratio was nearly constant above 0°C and up to 20°C regardless of the water content. However, for higher water contents (RH = 91%), an increase in the B/A ratio was observed at 10 °C and 40 °C for the AX and BG films, respectively, which are very close to the Tg values observed for the two polymers (Table 2). This result shows that above T_g the motion of the polysaccharide chains in the rubbery state was so high that it influenced the mobile/immobile proton ratio and the measured T_2 . This agrees with the decrease in the values of parameter a (calculated from Eq. (1)) measured for the films prepared at an RH of 91% (see M_2 determination). As a consequence, the apparent T_2 values should decrease significantly due to the combined contribution of motions from water and polysaccharide chains (Zimmerman & Brittin, 1957). This phenomenon has been proposed for models of relaxation under slow exchange between two sites with two different relaxation rates, $1/T_2$ (Zimmerman & Brittin, 1957).

However, for the samples at RH = 91%, the transition temperatures, T_{T_2} , estimated in Fig. 7 were 6–26 °C higher than the T_g , as was previously observed for T_{M_2} (see above). As already pointed out, a collapse phenomenon could induce a higher transition temperature as a consequence of intramolecular interactions that lower viscosity (Roos & Karel, 1990; Roos, 2002; Sato et al., 1983). Beyond this transition temperature, intra-molecular (or intra-chain) hydrogen bonds disrupt the induction of higher motions of the polysaccharide chains which then contribute to the mobile fraction causing B/A to increase. For samples with lower water content, the B/A increase should have occurred at temperatures exceeding 55 °C which was difficult to observe since the experiments were carried out only up to 80 °C (Figs. 6 and 7).

For samples with water contents below 20%, a transition temperature, T_{T_2} , lower than the T_g was observed (Table 2). In this case, the T₂ transition cannot be explained only by the additional contribution of motion from the polysaccharide protons. Below the T_{g} of the films, the mobile fraction that contributes to T_2 is thought to consist only of water protons with each of them being either bound to the polysaccharides through hydrogen bonds or free at high water content (Van den Dries et al., 1998). By increasing the water content within the films, the hydrogen bond stretches and the assembly properties of the polysaccharides weaken while the exchange of water molecules is favoured (Aeberhardt et al., 2007). Therefore, dipolar interactions between water and the hydroxyl groups of the polysaccharides are reduced and the rotational mobility of water is increased. As mentioned by Aeberhardt et al. (2007), the lifetime of a hydrogen bond is approximately as long as the transportation time of the water molecule from one hydrogenbond acceptor site to another due to the proximity of other free acceptor sites in the glass state (below T_g). The probability that water is in a free state is therefore reduced in samples with low water content in a glassy state and diffusion should have no impact on the T_2 evolution.

Variation of the echo time in the CPMG experiment revealed no sigmoidal dispersion of $1/T_2$ relative to echo time (results not
shown) indicating in a first approximation that diffusion or chemical exchange had no influence on the T_2 measurements at 20 MHz. However, Hills, Wright, and Belton (1989) have used model systems (Sephadex beads) to show that combined diffusive and chemical exchanges can occur simultaneously. For some exchange rate, there is a timescale separation between the slow diffusive and fast chemical exchange processes (or the contrary) and therefore $1/T_2$ becomes constant against the echo time of CPMG (see Fig. 6 in Hills et al. (1989)). Further works involving measurements at a higher field could help to discriminate these processes by highlighting an eventual Larmor frequency dispersion.

Nevertheless, as the frequency of exchange rises with temperature, the probability that more than one water molecule is bound to one hydroxyl group at a given time increases. The maximum number of water molecules per hydroxyl group is close to 2 since the oxygen and hydrogen atoms of the hydroxyl groups can generate hydrogen bonds (Aeberhardt, de Saint Laumer, Bouquerand, & Normand, 2005). This probability is independent of the molecular weight of the oligosaccharide. An estimation of the number of water molecules per hydroxyl group can be done by calculating the number of exchangeable protons in the polysaccharides (n_{OH}) and water (n_{H}) in each of the samples using the following equations (Aeberhardt et al., 2007):

$$n_{\rm H} = \frac{2}{18}\omega_{\rm W} \tag{4}$$

$$n_{\rm OH} = \frac{P_1}{P_2} (1 - \omega_{\rm W}) \tag{5}$$

where P_1/P_2 corresponds to the proton density of the polysaccharides (8/132 for AX and 10/162 for BG) and ω_w is the weight fraction of water.

The amplitude of the FID signals is proportional to the proton density according to the following equations:

$$A = k_A \cdot n_{\rm OH} \tag{6}$$

$$B = k_B \cdot n_{\rm H} \tag{7}$$

where *A* and *B* correspond to the amplitude of the signal from the solid and liquid protons, respectively (previously determined fitting equation 1), k_A and k_B are proportionality constants and n_{OH} and n_H are the number of protons in the oligosaccharides and water, respectively.

 k_A and k_B can be calculated at 20 °C if the water content is known (determined by sorption). These constants are directly linked to the energy absorbed by protons during the excitation of the solid and liquid protons and represent the average excitation state of the solid and liquid protons. If more than one water molecule binds to one hydroxyl group, there is equivalence in the bond energy and the water molecules are indistinguishable (Aeberhardt et al., 2007).

The k_B values calculated at 20 °C were 92 and 85 mA g mol⁻¹ for AX and BG, respectively. These results are in agreement with the values determined for different oligosaccharides of \overline{DP}_n between 7 and 46 (Aeberhardt et al., 2007). The k_A values were twice the values of k_B at 197 and 175 mA g mol⁻¹ for AX and BG, respectively. The high value of k_A compared to k_B probably reflects the very high proton exchangeability of the hydroxyl group of polysaccharides, which can bind two water molecules, as indicated by the k_A/k_B ratio of 2. Therefore, at room temperature the apparent T_2 decrease is due to the reduced mobility of the water molecules that exhibit a higher probability to bind to the hydroxyl groups of the polysaccharide. At 80 °C, the k_A and k_B values were similar at around 82 mA g mol⁻¹, which suggests that only one water molecule binds to a hydroxyl group at high temperatures.

4. Conclusions

Our results point out the contribution of low-field NMR spectroscopy to the study of the mobility of polymer chains and their interactions with water in polysaccharide films. The transition temperatures measured by NMR, which is sensitive to high frequency motions, correlated well with the T_g values measured by DSC. Complementary mechanisms were emphasized, involving both the mobility of the polysaccharide chains below and above the glass transition temperature and the mobility of water molecules under the control of the frequency of exchange with hydroxyl groups of the polysaccharides. The results are consistent with stronger dipolar interactions between the protons in the BG films due to the shorter average distances between the linear chains of BG compared to the highly substituted chains of AX. BG chains are supposed to form a more compact structure with smaller nanopores than AX, which induces slower water mobility and kinetics of exchange. The different hydration properties observed for AX and BG films are of major importance in the context of the desiccation process for cereal grains. In addition to the heterogeneity of composition (AX/BG ratio), various structures of AX (A/X ratio) were also observed in endosperm tissues, but the impact of this compositional and structural heterogeneity on interactions with water or BG is unknown. NMR investigations as well as mechanical studies of films formulated with various amounts of BG and AX exhibiting different structural features are in progress in order to better understand their respective role in water transport in cereal grain.

Acknowledgments

The authors are indebted to the Regional Council of Pays de la Loire for financial support. They also thank Marion De Carvalho for the DSC analyses at INRA of Nantes. Access to the NMR facilities of the BIBS platform of INRA Angers-Nantes is acknowledged.

References

- Abragam, A. (1961). The principle of nuclear magnetism. Oxford: Clarendon Press. Aeberhardt, K., Bui, Q. D., & Normand, V. R. (2007). Using low-field NMR to infer
- the physical properties of glassy oligosaccharide/water mixtures. *Biomarro-molecules*, 8, 1038-1046.
- Aeberhardt, K., de Saint Laumer, J.-Y., Bouquerand, P.-E., & Normand, V. (2005). Ultrasonic wave spectroscopy study of sugar oligomers and polysaccharides in aqueous solutions: The hydration length concept. International Journal of Biological Macromolecules, 36(5), 275–282.
- Bacic, A., & Stone, B. A. (1981). Chemistry and oraganization of aleurone cell wall components from wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology*, 8, 475–495.
- Barron, C., Parker, M. L., Mills, E. N. C., Rouau, X., & Wilson, R. H. (2005). FT-IR imaging of wheat endosperm cell walls in situ reveals compositional and architectural heterogeneity related to grain hardness. *Planta*, 220, 667–677.
- Bloembergen, N., Purcell, E. M., & Pound, R. V. (1948). Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption. *Physical Review*, 73, 679–712.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–255.
- Buliga, G. S., Brant, D. A., & Fincher, G. B. (1986). The sequence statistics and solution conformation of a barley (1-3, 1-4)-beta-D-glucan. Carbohydrate Research, 157, 139–156.
- Ciacco, C. F., & d'Appolonia, B. L. (1982). Characterization and gelling capacity of water-soluble pentosans isolated from different mill streams. *Cereal Chemistry*, 59, 163–166.
- Cornillon, P., & Salim, L. C. (2000). Characterization of water mobility and distribution in low and intermediate-moisture food systems. *Magnetic Resonance Imaging*, 18, 335–341.
- Cui, W., Wood, P. J., Blackwell, B., & Nikiforuk, J. (2000). Physicochemical properties and structural characterization by two-dimensional NMR spectroscopy of wheat beta-D-glucan comparison with other cereal beta-D-glucans. Carbohydrate Polymers, 41, 249–258.
- Dais, P., & Perlin, A. S. (1982). High-field, C-13-Nmr spectroscopy of β-D-glucans, amylopectin, and glycogen. Carbohydrate Research, 100, 103–116. Derbyshire, W., van den Bosch, M., van Dusschoten, D., MacNaughtan, W., Farhat, I. A.,
- Derbyshire, W., van den Bosch, M., van Dusschoten, D., MacNaughtan, W., Farhat, I. A., Hemminga, M. A., et al. (2004). Fitting of the beat pattern observed in NMR free-

induction decay signals of concentrated carbohydrate-water solutions. Journal of Magnetic Resonance, 168, 278-283.

- villy, G., Saulnier, L., Roger, P., & Thibault, J. F. (2000). Isolation of homogeneous fractions from wheat water-soluble arabinoxylans. Influence of the structure on their macromolecular characteristics. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48,270-278
- Dervilly-Pinel, G., Rimsten, L., Saulnier, L., Andersson, R., & Aman, P. (2001). Water-extractable arabinoxylan from pearled flours of wheat, barley, rye and triticale. Evidence for the presence of ferulic acid dimers and their involvement in gel formation. Journal of Cereal Science, 34, 207–214. Dervilly-Pinel, G., Tran, V., & Saulnier, L. (2004). Investigation of the distribution of
- arabinose residues on the xylan backbone of water-soluble arabinoxylans wheat flour. Carbohydrate Polymers, 55, 171–177.
 Ediger, M. D., Angell, C. A., & Nagel, S. R. (1996). Supercooled liquids and glasses. *Journal of Physical Chemistry*, 100, 13200–13212.
- Englyst, H. N., & Curmings, J. H. (1988). Improved method for measurement of dietary fibre as non-starch polysaccharides in plant foods. *Journal of the Associ-ation of Official Analytical Chemists*, 71, 808–814.
- Fincher, G. B., & Stone, B. A. (1986). Cell walls and their components in cereal grain technology. Advances in Cereal Science and Technology, 8, 207–295.
 Fulcher, R. G., Miller, S. S., & Ruan, R. (1997). Quantitative microscopic approaches to carbohydrate characterization and distribution in cereal grains. In T. Johns, & International Content of Content and Content of Cont J. T. Romeo (Eds.), Functionality of food phytochemicals (pp. 237-261). New York: Plenum.
- Goodman, A. M. (1978). Optical interference method for the approximate determination of refractive index and thickness of a transparent layer. Appl 17, 2779-2787.
- Gottwald, A., Creamer, L. K., Hubbard, P. L., & Callaghan, P. T. (2005). Diffusion, relaxation, and chemical exchange in casein gels: A nuclear magnetic resonance study. Journal of Chemical Physics, 122, 034506–34511. Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions.
- Journal of Research of the National Bureau of Standards Section A Physics and Chemistry, 81, 89–96.
- Guillon, F., Tranquet, O., Quillien, L., Utille, J. P., Ordaz Ortiz, J. J., & Saulnier, L. (2004). Generation of polyclonal and monoclonal antibodies against arabinoxylans and their use for immunocytochemical location of arabinoxylans in cell walls of
- endosperm of wheat. Journal of Cereal Science, 40, 167-182. Hills, B. P., Wright, K. M., & Belton, P. S. (1989). Proton NMR-studies of chemical and diffusive exchange in carbohydrates systems. Molecular Physics, 67, 1309 1326.
- Hoffmann, R. A., Roza, M., Maat, J., Kamerling, J. P., & Vliegenthart, J. F. G. (1991). Structural characterisation of the cold water-soluble arabinoxylans from the white flour of the soft wheat variety kadet. Carbohydrate Polymers, 15, 415-430.
- Hoije, A., Sternemalm, E., Heikkinen, S., Tenkanen, M., & Gatenholm, P. (2008). Material properties of films from enzymatically tailored arabinoxylans. Biomacromolecules, 9, 2042–2047.
- Izawa, M., Kano, Y., & Koshino, S. (1993). Relationship between structure and solubility of (1-3, 1-4)-beta-D-glucan from barley. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 51, 123-127.
- Izydorczyk, M. S., & Biliaderis, C. G. (1994). Studies on the structure of wheat endosperm arabinoxylans, Carbohydrate Polymers, 24, 61-71
- Izydorczyk, M. S., & Biliaderis, C. G. (1995). Cereal arabinoxylans: Advances in struc-ture and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 28, 33–48.
- Izydorczyk, M. S., Macri, L. J., & MacGregor, A. W. (1998a). Structure and physico-chemical properties of barley non-starch polysaccharides I. Water-extractable beta-glucans and arabinoxylans. Carbohydrate Polymers, 35, 249–258. Izydorczyk, M. S., Macri, L. J., & MacGregor, A. W. (1998b). Structure and physico
- chemical properties of barley non-starch polysaccharides II. Alkali-extractable
- beta-glucans and arabinoxylans. Carbohydrate Polymers, 35, 259–269.
 Izydorczyk, M. S., & McGregor, A. W. (2000). Evidence of intermolecular interactions of β-glucans and arabinoxylans. Carbohydrate Polymers, 41, 417–420.
 Kilburn, D., Claude, J., Schweizer, T., Alam, A., & Ubbink, J. (2005). Carbohydrate poly-
- mers in amorphous states: An integrated thermodynamic and nanostructural investigation. *Biomacromolecules*, 6, 864–879.
- Kumagai, H., MacNaughtan, W., Farhat, I. A., & Mitchell, J. R. (2002). The influence of carrageenan on molecular mobility in low moisture amorphous sugars. Carb hydrate Polymers, 48, 341–349.
- GGregor, A. W., & Fincher, G. B. (1993). Carbohydrates of the barley grain. In A. W. MacGregor, & R. S. Bhatty (Eds.), Barley: Chemistry and technology (pp. 73–130). St. Paul, MN: AACC. Mansfield, M. L. (1993). In J. M. V. Blanshard, & P. J. Lillford (Eds.), The glassy state in
- foods (pp. 103–122). Loughborough: Nottingham University Press. Marquardt, D. W. (1963). An algorithm for least-squares estimation of nonlinear
- parameters. SIAM Journal on Applied Mathematics, 11, 431–441. Meiboom, S., & Gill, D. (1958). Modified spin-echo method for measuring nuclear
- relaxation times. Review of Scientific Instruments, 29, 688-691.

- Partanen, R., Marie, V., MacNaughtan, W., Forssell, P., & Farhat, I. (2004). H-1 NMR study of amylose films plasticised by glycerol and water. Carbohydrate Polymers, 56.147-155
- Philippe, S., Barron, C., Robert, P., Devaux, M. F., Saulnier, L., & Guillon, F. (2006). Characterization using Raman microspectroscopy of arabinoxylans in the walls of different cell types during the development of wheat endosperm. *Journal of*
- Agricultural and Food Chemistry, 54, 5113–5119.
 Philippe, S., Robert, P., Barron, C., Saulnier, I., & Guillon, F. (2006). Deposition of cell wall polysaccharides in wheat endosperm during grain development: Fourier transform-infrared microspectroscopy study. Journal of Agricultural and Food Chemiers 14, 2302, 3200 Chemistry, 54, 2303-2308.
- Philippe, S., Saulnier, L., & Guillon, F. (2006). Arabinoxylan and $(1 \rightarrow 3)$, $(1 \rightarrow 4)$ - β -glucans deposition in cell walls during wheat endosperm development. *Planta*, 224, 449-461.
- Philippe, S., Tranquet, O., Utille, J. P., Saulnier, L., & Guillon, F. (2007). Investigation
- Primipe, S., Haluer, G., Pitt, Samier, E., & Samier, E., & Gamon, F. (2007). Investigation
 of ferulate deposition in endosperm cell walls of mature and developing wheat
 grains by using a polyclonal antibody. *Planta*, 225, 1287–1299.
 Provencher, S. W. (1982). CONTIN: A general purpose constrained regularization
 program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Computer
 Physics Communications*, 27, 229–242.
- Rattan, O., Izydorczyk, M. S., & Biliaderis, C. G. (1994). Structure and rheological behaviour of arabinoxylans from Canadian bread wheat flours. *Lebensmittel*-
- Wissenschaft and Technologie, 27, 550–555. Rondeau-Mouro, C., Defer, D., Leboeuf, E., & Lahaye, M. (2008). Assessment of cell wall porosity in Arabidopsis thaliana by NMR spectroscopy. International Journal of Diological Macromolecules, 42, 83–92.Roos, Y., & Karel, M. (1990). Differential scanning calorimetry atudy of phase-
- transitions affecting the quality of dehydrated materials. Biotechnology Progress, 6, 159-163.
- Roos, Y. H. (2002). Importance of glass transition and water activity to spray and stability of dairy powders. *Lait*, 82, 475–484.
- Roudaut, G., Farhat, I., Poirier-Brulez, F., & Champion, D. (2009). Influence of water.
- temperature and sucrose on dynamics in glassy starch-based products studied by low field H-1 NMR. Carbohydrate Polymers, 77, 489–495. an, R. R., & Chen, P. L. (1998). Water in foods and biological materials. A nuclear magnetic resonance approach. Lancaster, PA: Technomic Publishing.
- , p. 298. Sato, T., Sakurai, K., Norisuye, T., & Fujita, H. (1983). Triple helix of schizophyllum-commune polysaccharide in dilute-solution.6. Collapse of randomly coiled schizophyllan in mixtures of water and dimethylsulfoxide. *Polymer Journal*, 15, 87 - 96
- Saulnier, L., Vigouroux, J., & Thibault, J.-F. (1995). Isolation and characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran. Carbohydrate Research, 272, 241-253
- Saulnier, L., Sado, P.-E., Branlard, G., Charmet, G., & Guillon, F. (2007). Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. Journal of Cereal Science, 46, 261–281.
- Varieties, Journal of Certar Steiner, 40, 201–201.
 Staudte, R. G., Woodward, J. R., Fincher, C. B., & Stone, B. A. (1983). Water-soluble (1–3), (1–4)-β-p-glucans from barley (Hordeum vulgare) endosperm. III: Distribution of cellotriosyl and cellotetraosyl residues. Carbohydrate Polymers, 3, 299-312
- Tvaroska, I., Ogawa, K., Deslandes, Y., & Marchessault, R. H. (1983). Crystalline con-formation and structure of lichenan and barley beta-glucan. *Canadian Journal of Chemistry*, 61, 1608–1616.
- Van den Dries, I.J., Besseling, N. A. M., Van Dusschoten, D., Hemminga, M. A., & Van der Linden, E. (2000). Relation between a transition in molecular mobility and collapse phenomena in glucose-water systems. The Journal of Physical Chemistry B, 104, 9260-9266
- Van den Dries, I. J., Van Dusschoten, D., Hemminga, M. A., & Van der Linden, E. (2000).
- Effects of water content and molecular weight on spin probe and water mobility in malto-oligomer glasses. *Journal of Physical Chemistry B*, 104, 10126–10132.
 Van den Dries, I. J., Van Dusschoten, D., & Hemminga, M. A. (1998). Mobility in maltose-water glasses studied with H-1 NMR. *The Journal of Physical Chemistry* B. 102, 10483-10489.
- Wood, P. J., Weisz, J., & Blackwell, B. A. (1991). Molecular characterization of cereal beta-D-glucans structural-analysis of oat beta-D-glucan and rapid structural evaluation of beta-D-glucans from different sources by high-performance liquid chromatography of oligosaccharides released by lichenase. Cereal Chemistry, 68, 31-39.
- Wood, P. J., Weisz, J., & Blackwell, B. A. (1994). Structural studies of (1-3), (1-4)-beta-D-glucans by C(13)-nuclear magnetic-resonance spectroscopy and by rapid analysis of cellulose-like regions using high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides released by lichenase. Cereal Chemistry, 71, 301-307
- Zimmerman, J. R., & Brittin, W. E. (1957). Nuclear magnetic resonance studies in multiple phase systems: Lifetime of a water molecule in an adsorbing phase on silica gel. Journal of Physical Chemistry, 61, 1328–1333.

Chapitre III

Etude des propriétés d'hydratation et mécaniques des films mono-moléculaires

Résumé

Les films mono-moléculaires réalisés avec des AX de différents taux de substitution et des BG, ont été caractérisés à différentes teneurs en eau, en utilisant et comparant quatre méthodes : la RMN bas champ, les isothermes de sorption et de diffusion (Diffusion Vapor Sorption), la microscopie (MEB) et des mesures de propriétés mécaniques (Analyseur Mécanique Dynamique Thermique).

Les observations par microscopie électronique à balayage (MEB) permettent de confirmer que les films d'AX et de BG ne présentent pas de macrostructure (à l'échelle des microns) permettant une diffusion de l'eau dans des macropores. La mobilité de l'eau mesurée par RMN bas champ est liée à des phénomènes d'échanges entre de l'eau associée aux fonctions hydroxyle des polysaccharides et l'eau libre dans des micropores à l'échelle des nanomètres. Les propriétés mécaniques des films d'AX et de BG ont été mesurées. Elles varient en fonction de la structure des polysaccharides, de leurs interactions et de la nanostructure des films en lien avec les résultats des mesures de M₂ par RMN.

Les films de BG présentent une extensibilité beaucoup plus élevée (déformation ultime) que les films d'AX. La résistance (stress ultime) et l'extensibilité des films d'AX diminuent avec l'augmentation du taux A/X. La résistance et l'extensibilité des films d'AX de bas degré de substitution sont plus importantes que celles des films d'AX de haut degré de substitution en lien avec une interaction plus importante entre les chaînes d'AX (mesurée par RMN). Les films d'AX de bas degré de substitution et ceux de BG présentent une résistance similaire, alors que l'extensibilité des films d'AX et de BG.

Hydration and mechanical properties of arabinoxylans and β -glucans films as models of cell walls from cereal grains

Ruifeng YING¹, Corinne RONDEAU-MOURO^{1,2}, Annick PERRONNET³, Cécile BARRON⁴, Frédéric MABILLE⁴ and Luc SAULNIER^{1*}.

¹ UR1268 Biopolymères, Interactions, Assemblages, INRA, F-44316 Nantes, France

² Irstea, UR-TERE, IRM-Food, CS 64427, 17 avenue de Cucillé, 35044 Rennes Cedex, France

³ Université de Nantes, CRTT, UMR GEPEA, CNRS 6144, UNAM, 37 Bd de l'Université, BP 406, 44602 St-Nazaire Cedex, France

⁴ UMR 1208 "Ingénierie des Agropolymères et Technologies Emergentes", INRA – CIRAD – UMII - Supagro, F-34000 Montpellier, France

Soumis dans Biomacromolecules

Abstract

Arabinoxylans (AXs) and $(1\rightarrow 3)(1\rightarrow 4)$ - β -D-glucans (BGs) are the main components of the cell walls in wheat endosperm but the relative occurrence of these two polysaccharides constituents and the fine structure of the AXs is highly variable during the grain development. The impact of the polymer structure and organization on the cell wall properties, in particular hydration properties are not clearly understood. However, cells walls act as barrier for water diffusion and contribute to regulate the water content of the grain. Effective moisture diffusivities (D_{eff}) of AX and BG films were determined from 0 to 95% relative humidity (RH) at 20°C. D_{eff} was influenced by the water content, and the polysaccharide composition and structure. Higher D_{eff} were obtained for films made with highly substituted AXs compared to values obtained for films made with BGs or lowly substituted AXs. In agreement with dipolar interactions and water T₂ relaxation times measured by TD-NMR, the highly branched AX films were supposed to be organized such as the nano-porosity of films were higher, favoring the water diffusivity within films. Results from traction tests showed significant different mechanical properties between the AX and BG films. BG films exhibit much higher extensibility (ultimate strain) than AX films. Strength (ultimate stress) and

extensibility of AX films decrease with increasing arabinose to xylose ratio. Our results show that the water diffusion and the mechanical properties of AX and BG films can be linked to the polysaccharide chains interactions which modulate the nanostructure of films.

Keywords: Arabinoxylans ; β -glucans ; polysaccharide films ; effective moisture diffusivity ; Cell walls ; NMR ; mechanical properties.

Introduction:

The cell walls of cereal endosperm account for 0.02 - 0.04 g/g dry weight basis (d.b) of this tissue and have a significant effect on wheat grain uses (milling, bread-making, and brewing), in animal feeding or in human nutrition. ¹ In wheat endosperm, arabinoxylans (AXs) and $(1\rightarrow 3)(1\rightarrow 4)$ - β -D-glucans (BGs) are the main components of the cell walls. ²

The structure of AXs is a linear backbone of $(1\rightarrow 4)$ -linked β -D-xylopyranosyl (Xylp) residues to which β -L-arabinofuranosyl (Araf) substituents are attached through O-3 (monosubstitution and / or O-2 in addition ferulic acid is esterified to few arabinosyl substituents via O-5. Variations in the structure of AXs that affects the overall arabinose substitution and the proportion of mono- and di-substitution levels are observed. These structural variations are roughly described by the arabinose to xylose ratio (A/X) that may varies from 0.3 up to 1.²

 $(1\rightarrow 3)(1\rightarrow 4)$ - β -D-glucans extracted from wheat or barley, commonly known as β -glucans, are linear homopolymers of D-glucopyranosyl residues linked mostly via two or three consecutive β -(1-4) linkages that are separated by a single β -(1 \rightarrow 3) linkage. ^{3, 4} Longer segments of consecutively β -(1 \rightarrow 4) linked Glcp residues represent less than 10% of the molecule and are mainly constituted by oligomers with a degree of polymerization (DP) of 5 and 6. There is no current evidence that two or more adjacent β -(1-3) linkages occur in the BG chains. ⁵

Dramatic changes occur in endosperm cell wall composition with respect to both the relative occurrence of individual constituents (AXs and BGs) and the fine structure of the AXs according to grain development and localization of cell walls within grain. ⁶⁻¹² The relationships between structural variation of polymers such as the level of substitution of AXs by arabinose side and cell wall properties are not explained and the biological significance of this structural diversity is not understood.

During its development wheat grain undergoes dramatic changes in water content. Cell walls act as barrier for water diffusion and during desiccation, the grain's water content decreases

from 0.40 g/g d.b down to 0.12 - 0.14 g/g d.b. Therefore, the changes in cell wall polymer structure observed during the grain development and within the grain tissue could possibly modulate the cell wall hydration properties that contribute to regulate the water content of the grain. In this context, we have prepared films of AXs or BGs and used them as a rough model of endosperm cell walls in order to study the possible impact of the fine structure of the polymers on the hydration properties of cell walls.

Water-extractable AXs with high, middle and low level of substitution by arabinose were isolated to prepare AX and BG films in controlled conditions. The impact of the polymer structure on water diffusivity and mobility in the films were then studied using dynamic vapor sorption (DVS) and TD-NMR spectroscopy. The mechanical properties of AX and BG films were also determined using traction tests at relative humidity values ranging from 59% to 91% at 25 °C.

Materials and Methods

Materials

Water-extractable arabinoxylans were prepared by graded ethanol precipitation from wheat flour water extract, as described by Dervilly-Pinel et al. (2000). ¹³ Three pure AX fractions exhibiting contrasted arabinose to xylose ratios (A/X: 0.33, 0.53 and 0.73) were isolated at three graded ethanol (30%, 50%, 60%; v/v) and used for further experiments. For clarity, these samples were encoded AX33, AX53 and AX73. Water soluble β -glucans from barley (medium viscosity, Purity > 97%) were purchased from Megazyme and are named BG thereafter.

Chemical and physicochemical analyses

The method of Englyst and Cummings was used to determine the monosaccharide composition. ^{14, 15} Ferulic acid content in AXs was determined by UV spectroscopy as described by Saulnier et al. (1999) ¹⁶. Weight average molecular weight (M_w), and intrinsic viscosity ([η]) were determined using high-performance size exclusion chromatography (HPSEC) as described by Ying et al. (2011). ¹⁵

Film preparation and characterization

AXs and BGs were dissolved in water (20 mg/mL) and 5mL of polysaccharide solution was poured into polystyrene Petri dishes (\emptyset 5 cm). Then, Petri dishes were put in a climate room at 40 °C and 40% relative humidity (RH) for 3 days, as described by Ying et al. (2011)¹⁷.

Reflectance spectroscopy (SPECORD S600) was used to determine film thickness at 20°C and 40% RH. 18

Microstructure of films

Films were observed at room temperature (around 20 °C) and around 40% RH using an scanning electron microscope (SEM-Zeiss EVO[®]MA10) working at 15 kV, 30 Pa for examination of film surface or 5 kV, 4.63×10^{-4} Pa for examination of transverse section of film. The film surface were also investigated by atomic force microscopy (AFM) using an Autoprobe CP Park Scientific Instrument (Sunnyvale, CA). AFM images were recorded in the intermittent contact mode using beam-shaped phosphorous-doped silicium cantilevers (Veeco Probes, CA) with a quoted spring less than 50 N/m and that were excited at a frequency proximate to a resonant frequency of around 280 KHz. Sample surfaces were scanned with the probe at a scanning frequency of 1 Hz. Each sample was investigated at least in five different areas with different magnifications. Samples were observed at room temperature (around 20°C) and around 40% RH. The root mean square (RMS) roughness (R) was defined as follows:

$$R = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^{N} (z_n - \overline{z})^2}{N - 1}} \quad \text{(Equation 1)}$$

where \bar{z} is the average of the z values (height) within the given area, z_n is the current z value, and N is the number of data points within the given area.

Water Sorption isotherm and effective diffusivity using DVS

A controlled atmosphere microbalance DVS apparatus (Surface Measurement System Ltd., London, UK) was used to determine the water sorption kinetic of AX and BG films at 20 $^{\circ}$ C in RH ranging from 10% to 95%. Duplicate experiments were carried out for all samples, as described by Ying et al. (2011). ¹⁷

Sorption isotherms were fitted by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) and the Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) models. The BET model (Equation2) is commonly used to model sorption isotherms up to 50% RH while GAB (Equation 3) has been used for the modelling up to 80% RH. The parameters used in both models, such as m_{0BET} , m_{0GAB} , C_{BET} , C_{GAB} and K_{GAB} , provide information related to the monolayer value and the sorption energies involved during the sorption process.¹⁹⁻²²

$$M = \frac{m_{0BET} C_{BET} \frac{p}{p_0}}{(1 - \frac{p}{p_0})(1 - \frac{p}{p_0} + C_{BET} \frac{p}{p_0})} \quad (\text{Equation 2})$$

M in BET model (equation 2) is the moisture content (% dry weight basis, d.b), m_{0BET} monolayer value (% d.b), C_{BET} , a temperature dependent constant (related to the net heat of sorption at the monolayer), and p/p_0 the water vapor partial pressure or relative humidity at thermodynamic equilibrium.

$$M = \frac{m_{0GAB} C_{GAB} K_{GAB} \frac{p}{p_0}}{(1 - \frac{p}{p_0})(1 - K \frac{p}{p_0} + C_{GAB} K \frac{p}{p_0})} \quad \text{(Equation 3)}$$

M in GAB model (equation 3) is the moisture content (% d.b), m_{0GAB} monolayer value (% d.b), C_{GAB} a constant related to the energy associated to the binding of the sorbant molecules at the monolayer, K_{GAB} related to the heat of sorption at the multilayer, and p/p_0 the water vapor partial pressure or relative humidity at thermodynamic equilibrium.

Models for moisture transport and for sorption isotherm were simulated using MATLAB software (The Mathworks Inc, Natick, Mass., U.S.A.). The GAB and BET equations parameters and the moisture diffusivity values were identified using Levenberg Marquardt method from experimental sorption kinetics by minimizing the root mean square of the deviations between simulated and experimental results as follows: ²³

$$RMSE = \sqrt{\frac{(\hat{y} - y)^2}{(N - p)}}$$
 (Equation 4)

where \hat{y} is the vector of the predicted values (g/g d.b.), y is the vector of the experimental values (g/g d.b.), N is the number of terms in the predicted or experimental vector, and p the number of estimated parameters.

Effective water diffusitivity D_{eff} was determined according to the Fick's second law and samples were considered as a plane sheet of homogeneous thickness with a diameter of 10 mm as described by Ying et al. (2011). ¹⁷ Thus moisture transfer was only considered in the axial direction. The origin of the x-axis is considered at the interface between the air flux and the film surface. The thickness of the film at different RH was corrected according to moisture content of the films using Equation 5.

$$L = L_d + \frac{MX}{\rho S} \quad \text{(Equation 5)}$$

Where *L* is the thickness at given RH, L_d the thickness of the film at RH=0%, *X* the moisture content (g/g dry basis), *M* is the mass of the film, ρ the intrinsic water density, *S* the surface of the film.

The effective moisture diffusivity was determined using Fick's second law:

$$D_{eff}\left(\frac{\partial^2 X(x,t)}{\partial x^2}\right) = \frac{\partial X(x,t)}{\partial t} \quad \text{(Equation 6)}$$

Where X is the moisture content (g/g d.b), D_{eff} is the effective moisture diffusivity in the film for a given relative humidity. t is time (s), and x is distance from the interface, that corresponds to the vertical direction in our experiments as described by Ying et al. (2011).¹⁷

NMR Spectroscopy.

¹H NMR measurements were performed using a low-field spectrometer (Minispec BRUKER, GERMANY) operating at a resonance frequency of 20 MHz. Two types of pulse sequences were used. Proton free induction decays (FID) and the Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) pulse sequence, ²⁴ as described by Ying et al. (2011). ¹⁷

The second moment M_2 values were calculated from the broad part of the FID curve that arose from protons of the solid fraction. As pointed out by Abragam (1961), ²⁵ the NMR spectrum of these protons is well represented by a combination of a sinus function and a Gaussian broadening following the equation 7 :

$$I_{FID}(t) = A \exp\left(-\frac{a^2 \cdot t^2}{2}\right) \frac{\sin bt}{bt} + B \exp\left(-\frac{t}{T_2^*}\right) \quad \text{(Equation 7)}$$

In this equation, the parameters A and B represent the contributions of the immobile and mobile protons in the sample, respectively. The NMR spectrum of the immobile proton fraction is assumed to be a rectangular line shape with a total width 2b, convoluted with a Gaussian line shape with a standard deviation given by parameter a. The second moment, which is a measure of the strength of the hydrogen's dipolar interactions, is calculated from the fit parameters a and b by the following equation 8:

$$M_2 = a^2 + \frac{1}{3}b^2$$
 (Equation 8)

Transverse relaxation time T_2 were determined using the following models ²⁶ as described in Ying et al (2011) ¹⁵:

$$I_{CPMG}(t) = \sum_{i=1}^{n} A_i \times \exp(-\frac{t}{T_{2i}}) \quad \text{(Equation 9)}$$

Where T_{2i} is the relaxation times of the mobile populations and A_i is the intensity of the mobile populations.²⁴

Mechanical tests

Mechanical tests were performed on AX and BG films using a Dynamic Mechanical Thermal Analyser DMTA Mk III (Rheometrics Inc., Piscataway, USA). Humidity control was achieved according to the principle of water vapor saturation at different temperatures. The humidity of samples was controlled with air that was bubbled through water at controlled temperature and that was flushed on the furnace. The temperature of the sample chamber was set at 25 \pm 1°C. Films samples were cut at the desired dimensions (L = 20mm, 1 = 2.5mm) in the circular film from the petri dishes taking into account the geometry in order to avoid any orientation. Then there were stored for 3 days at 25 °C at constant relative humidity using saturated salt solutions (NaBr (59%), NaCl (75%), and BaCl₂ (91%)). Their thickness (22 µm) was measured by reflectance spectroscopy and thickness homogeneity within a series was checked by sample weight. Samples were fixed in claws with a gap of 10 mm using a torque wrench (10 cNm). Sample equilibration was followed by a time sweep test at imposed strain (0.1%), (frequency = 10 rad s⁻¹). The sample equilibration was assessed by the stability of elastic modulus (E). Uniaxial tensile tests were performed at a strain rate of 0.001 s^{-1} until rupture. Stress-strain curves were calculated from force-displacement measurements and several rheological parameters were determined:

 σ_{ela} : maximum value of the stress in the elastic behaviour, (N/mm²);

 σ_{max} : the ultimate stress, or stress to fracture (N/mm²);

 ε_{ela} : the elastic strain corresponding to σ_{ela} ;

 \mathcal{E}_{max} =: the ultimate strain, or strain to fracture;

E =: the Young modulus, i.e. the slope of the elastic part of the curve (N/mm²);

W: the total mechanical energy needed to break the sample (J/mm^3) .

The energy to fracture (W) was determined from the stress–strain curves, and corresponds to the area under the curves.

The tests in which the samples broke close to the clamps were rejected, to exclude data from samples that might have been damaged during clamping. Results were taken as the average of at least 6 tests. ^{27, 28}

In order to clearly assess the elastic vs plastic behavior, we used also another mechanical test of loading, unloading cycles at constant strain rate (0.001 s⁻¹).

Results

Polymer and film characterization

AXs and BGs were characterized for their neutral sugar composition, molar mass and intrinsic viscosity (Table 1). Depending on the degree of substitution and monomer composition the molar mass of the polymer varied between 180 and 280 kD but the intrinsic viscosities of the four polymers were in a similar range (260-330 mL·g⁻¹). AX and BG films obtained by casting had homogeneous thickness (22 μ m) as revealed by scanning electron microscopy (SEM) (Figure 1a and 1b) and AFM (Figure 2) observations revealing a flat and homogeneous surface with very low roughness values (Root mean square < 20 nm). Films were very compact, micropores or phase separation could not be detected.

		AX33	AX53	AX73	BG
Structural features	A/X ^a	0.33	0.53	0.73	
	Ferulic acid % ^b	0.23%	0.07%	0.16%	0.00%
	Xylu/Xylm/Xyld %	76/15/9	68/11/21	56/15/29	
Physico-chemical	M_w^{c} (g/mol) x 10 ⁻³	177.0	196.9	233.2	283.5
features	$\left[\eta\right]^{c}$ (mL/g)	295.6	284.8	259.6	331.2

Table 1. Molecular characteristics of arabinoxylans (AX) and \beta-glucans (BG). Arabinose to xylose ratios (A/X); Weight average molar mass (M_W); Intrinsic viscosity ([η]). AX33: arabinoxylan (arabinose to xylose ratio: 0.33); AX53: arabinoxylan (arabinose to xylose ratio: 0.53); AX73: arabinoxylan (arabinose to xylose ratio: 0.73).

Results obtained from duplicates : a: coefficients of variation < 4%; b: coefficients of variation < 2%; c: coefficients of variation < 5%.

Xylu: Un-substituted xylopyranose residue ;Xylm: Xylose residue mono-substituted via O-3 with arabinose;Xyld: Xylose residue di-substituted via O-3 and O-2 with arabinose residues.



Figure 1. SEM images of an AX53 (arabinose to xylose ratio: 0.53) film (thickness = 22 μ m) at 20 °C.

a: Image of the surface of the film (RH = 40%)

b: Image of the transverse section of the film

2D image of a film of arabinoxylan

3D image of a film of arabinoxylan



Figure 2. AFM Images of an AX53 film (arabinose to xylose ratio: 0.53; thickness = $22 \mu m$) at 20 °C, RH = 40%.

Moisture sorption isotherms

The moisture sorption isotherms of the films were determined at 20 °C using a DVS apparatus with RH ranging from 0 to 95% (Figure 3). The water content (based on the percentage of dry mass) measured in AX films according to RH was in agreement with the results found in literature ²⁹⁻³¹. Moisture sorption isotherms of these films made from polysaccharides have a classical sigmoidal shape that can be described in term of three-step moisture adsorption process (Figure 3). In the RH range of 10 % to 80%, the BG film adsorbed more water than the AX film. The behavior of the three AX films was very close but the AX33 adsorbed slightly more water than AX53 and AX73. Above RH 90%, there was an exponential increase in water sorption and an inversion in the behavior of the different films, AX53 and AX73 exhibiting a higher water uptake than AX33 and BG films. Zhang et al (2011) have reported the same trend with AX hydration, however the water content of AX films above RH 80% (around 0.6 - 0.7 g/g d.b at RH = 90%) were much higher compared to our results. ³¹ The GAB and BET model were used to fit the sorption isotherms and results are given in Table 2. The *RMSE* values obtained on applying the two models were < 0.003, showing accurate fits. The monolayer values given by GAB model (m_{0GAB}) were 0.08 - 0.10 g/g d.b for the AX and BG films. Similar values are reported in the literature for films made of starch. ³² Monolaver (m_{0BET}) values calculated from the BET model were lower with values from 0.065 g/g d.b to 0.074 g/g d.b (Table 2). Regardless of the fitting procedure, the samples are classified in the same way with higher monolayer values for BG and AX33 films compared to AX53 and AX73 films. The values of C_{GAB} et C_{BET} were higher within BG films.³³



Figure 3. Moisture sorption isotherm at 20 °C of arabinoxylan and β -glucan films (thickness = 22 µm) : experimental data [filled cubes: β -glucan film, open cubes: AX33 film (arabinose to xylose ratio: 0.33); open diamonds: AX53 film (arabinose to xylose ratio: 0.53); open triangles: AX73 film (arabinose to xylose ratio: 0.73)]. (vertical bars standing for the experimental error are too weak to be visible on the graph).

	GAB (modelled up to 80% RH)				BET (modelled up to 50%RH)		
	Monolayer	C _{GAB}	K _{GAB}	RMSE	Monolayer (m ₀	C_{BET}	RMSE
	$(m_{0 GAB})$ (% d.b)				_{BET}) (%db)		
AX33	10.2 ± 0.8	5.2 ± 1.1	0.76 ± 0.02	0.001	7.2 ± 0.2	6.9 ± 1.4	0.002
AX53	8.1 ± 0.1	5.8 ± 0.2	0.81 ± 0.00	0.002	6.5 ± 0.1	6.6 ± 0.1	0.002
AX73	8.5 ± 0.2	6.9 ± 0.8	0.79 ± 0.00	0.001	6.5 ± 0.1	8.9 ± 1.1	0.002
BG	10.0 ± 0.3	7.6 ± 0.6	0.76 ± 0.01	0.001	7.4 ± 0.1	10.6 ± 0.9	0.002

Table.2 GAB and BET values for arabinoxylan (AX) and β -glucan (BG) films and the root mean square error (RMSE). RH: relative humidity. AX33: arabinoxylan (arabinose to xylose ratio: 0.33); AX53: arabinoxylan (arabinose to xylose ratio: 0.53); AX73: arabinoxylan (arabinose to xylose ratio: 0.73).

Effective moisture diffusivity within films

Effective moisture diffusivity values (D_{eff}) within films were determined at 20°C using transient-state moisture content of the water sorption kinetics and analytical solution of equation 6 for modeling moisture sorption. The diffusivity was assumed to be constant for each RH level and could change from one stage to another.³⁴ An example of experimental kinetic data and calculated ones for water adsorption in an AX film is presented in Figure 4. Similar good fitting of experimental data was observed for each film. The resulting D_{eff} values were plotted in Figure 5 relative to the corresponding moisture content. Regardless of the polymer, D_{eff} values decreased at very low and very high water content. Two types of curves are obtained according to polymer structure. For AX53 and AX73, the D_{eff} increased sharply as the moisture content of the film increased from 0 g/g d.b to 0.12 g/g d.b within the AX53 and AX73 film, then D_{eff} varied slightly at water content from around 0.12 g/g d.b to around 0.30 g/g d.b. However the effective diffusivity increased slowly as the moisture content of the film increased from 0 g/g d.b to around 0.30 g/g d.b for the AX33 and BG films compared to the D_{eff} within AX53 and AX73, then D_{eff} decreased. The change of D_{eff} as a function of water content is typical of polysaccharides, ³⁵⁻³⁷ and is also observed for other hydrophilic materials such as cereal-based products $^{34, 38}$. The AX53 and AX73 film exhibited similar D_{eff} values, but higher D_{eff} values compared to the AX33 and BG films, regardless of moisture content.



Figure 4. Experimental (dotted lines) and predicted (continuous lines) moisture sorption kinetic of AX53 (arabinose to xylose ratio: 0.53) films at 20 °C measured with a controlled atmosphere microbalance for relative humidity from 10% to 95%. RH: relative humidity.



Figure 5. Effective moisture diffusivity of arabinoxylan and β -glucan films as a function of water content at 20 °C: experimental data [filled cubes: β -glucan film, open cubes: AX33 film (arabinose to xylose ratio: 0.33); open diamonds: AX53 film (arabinose to xylose ratio: 0.53); open triangles: AX73 film (arabinose to xylose ratio: 0.73)].

Time-domain NMR

Figure 6a shows the effects of the water content on M_2 values within AX and BG films. As described by Ying et al. (2011) ¹⁵, M_2 values of films originate from two contributions: one corresponds to intramolecular dipolar interactions, modulated by local proton mobility and their inter-distances within molecules (within polysaccharide chains), the other is due to intermolecular dipolar interactions dependent on the chains motion and the average distance between polysaccharide chains. As shown in Figure 6a, AX (whatever the substitution ratio) and BG films at water content below 0.05 g/g d.b were characterized by very high and similar M_2 values (> 7. 10⁺⁹ rad².s⁻²). M_2 decreased with increasing the water content at 20°C. AXs and BGs are large polysaccharides chains, and their mobility are very slow below water content of 0.30 d.b at 20°C (< the glass transition temperature T_g). However, at higher water content (> water content 0.30 d.b), the molecular motions of polysaccharide chains become important averaging any intermolecular interactions and giving rise to the loss of "non random" structures.²⁵ The high and similar values of M_2 for AX and BG films at very low water content indicate that the motion of the polysaccharide chains is reduced.



Figures 6 Effect of the water content on the second moment M_2 (a) and on the water relaxation time T_2 (b) for arabinoxylan (AX) and β -glucan (BG) films: experimental data [filled cubes: β -glucan film, open cubes: AX33 film (arabinose to xylose ratio: 0.33); open diamonds: AX53 film (arabinose to xylose ratio: 0.53); open triangles: AX73 film (arabinose to xylose ratio: 0.73)]. (vertical bars standing for the experimental error are too weak to be visible on the graph)

The decrease of M_2 as a function of the water content, reflects the decreasing of the dipolar interaction strength, in relation with higher chain mobility and higher average distances between chains at higher water content³⁹. The values of M_2 of AX53 and AX73 are lower than AX33 and BGs for the same water content above 0.05 g/g d.b. This result indicates higher proton dipolar interactions within AX33 and BG films in relation with shorter inter-proton distances between polysaccharide chains. Figure 6b shows the increase of water proton relaxation times T_2 of AX and BG films as a function of the water content. At water content below 0.15 g/g d.b, T_2 values for water in AX and BG films were similar (0.82 - 0.89 ms) and low, then increased sharply at water content above 0.15 g/g d.b. As already discussed by Ying et al 2011 ¹⁵, AX films displayed higher T₂ values than BG films at water content above 0.15 g/g d.b suggesting that the rotational mobility and exchange of water were slower in BG films.

Mechanical properties of AX and BG films

Figure 7 indicates that AX and BG films showed an elastoplastic behavior as commonly observed for plant tissue. ⁴⁰ Indeed as observed in cyclic test, in the first linear phase there is no residual strain between cycles, and then, when the stress became higher than the elastic limit, we observed an additional non-reversible strain (Figure 8). Table 3 compiles the main mechanical parameters of the films at different moisture content corresponding to different relative humidity. Ultimate strain and stress were higher than those observed by Höije et al (2008) ⁴¹, but the A/X ranges was quite different implying film crystallization that was not observed in our case. ¹⁵



Figure. 7 Typical stress-strain curves obtained during a tensile test with arabinoxylan and β -glucan films. Experimental data at relative humidity 59% [cross: β -glucan films, diamonds: AX33 films (arabinose to xylose ratio: 0.33); cubes: AX53 films (arabinose to xylose ratio: 0.73); triangles: AX73 films (arabinose to xylose ratio: 0.73)].

	Water conten	t T _g (°C)	Elastic strain	Stress at elastic	Young modulus	Ultimate strain	Ultimate stress	Rupture energy
	(d.b)		(%)	limit (N/mm ²)	(N/mm ²)	(%)	(N/mm ²)	(J/mm ³)
BG	0.1643	101.6	1.6 ± 0.4	52.7 ± 3.8	3340 ± 363	62.5 ± 8.0	124.5 ± 10.3	54.0 ± 9.8
	0.1940	70.9	2.4 ± 0.6	32.7 ± 2.2	1410 ± 260	65.4 ± 12.0	73.8 ± 9.0	36.4 ± 11.3
	0.2886	29.1	-	-	712±226	15.8 ± 2.8	19.5 ± 2.6	2.9 ± 0.7
AX33	0.1524	82.9	1.8 ± 0.3	54.5 ± 8.5	2926 ± 717	45.6 ± 8.0	131.4 ± 24.7	39.3 ± 9.5
	0.1832	58.7	2.2 ± 0.1	31.8 ± 7.8	1403 ± 355	38.9 ± 10.3	77.7 ± 24.1	20.6 ± 10.5
	0.2911	7.5	-	-	461±136	8.3 ± 2.3	12.6 ± 1.5	1.1 ± 0.4
AX53	0.1439	84.9	1.8 ± 0.2	45 ± 4.0	2475 ± 255	38.6 ± 9.1	97.6 ± 16.2	25.9 ± 8.4
	0.1802	57.9	2.3 ± 0.5	28.1 ± 2.6	1175 ± 323	37.2 ± 7.6	59.2 ± 8.8	15.1 ± 4.4
	0.3169	11.9	-	-	325±133	7.2 ± 3.3	8.1 ± 4.5	0.7 ± 0.4
AX73	0.1396	81.6	2.2 ± 0.2	46.6 ± 8.9	2111 ± 359	21.7 ± 9.2	61.0 ± 8.5	11.1 ± 5.4
	0.1782	56.1	2.3 ± 0.4	26.6 ± 5.4	1155 ± 253	9.5 ± 4.2	26.7 ± 12.1	2.4 ± 1.3
	0.3417	-6.0	-	-	263±119	11.9 ± 5.6	6.5 ± 3.8	0.7 ± 0.6

Table 3. Influence of the water content of arabinoxylan (AX) and β -glucan (BG) films on their mechanical properties. Transition temperatures is T_g. AX33: arabinoxylan (arabinose to xylose ratio: 0.33); AX53: arabinoxylan (arabinose to xylose ratio: 0.53); AX73: arabinoxylan (arabinose to xylose ratio: 0.73).



Figures 8 β -glucan (a) and AX33 (b) film stress-strain histories generated using the model of unloading and reloading in tensile at relative humidity 75%, experimental data [filled cycles: loading, unloading and reloading cycles in tensile of β -glucan films, open cubes: continue loading in tensile of β -glucan films].

Regardless of polymer structure, mechanical properties were modified with the water content within films, as usually observed for hydrophilic polymer ²⁸ where water acts as a plasticizer. The Young modules decreased significantly when the water content within film increased from around 0.15 g/g d.b to around 0.30 g/g d.b, as well as the ultimate stress and fracture energy. Indeed the ultimate stress is divided by 10 when the water content is increasing from around 0.15 g/g d.b to 0.30 g/g d.b, whereas the rupture energy is divided approximately by 30 in the same water content range. The plastic strain of AX and BG films did not change significantly, when the water content is increasing from around 0.15 g/g d.b to around 0.18 g/g d.b to 0.30 g/g d.b, but at higher water content (from 0.18 g/g d.b to 0.30 g/g d.b), the plastic strain of AX and BG films decreased sharply. The ultimate stress was divided by 10 between around 0.15 g/g d.b and around 0.30 g/g d.b water content and in the same time the ultimate strain is only divided by 5. So the slope of the plastic part of the curve decreased when the water content of the films increased. The break is more due to the stress effect than the strain.

Regardless of the water content, mechanical properties are highly modified according to polymer structure as observed by Hoije et al 2008.⁴¹ Such differences are more pronounced at lower water content (around 0.15 g/g d.b - around 0.18 g/g d.b), whereas at water content around 0.30 g/g d.b differences remain significant only between BGs and AXs. BG films displayed higher stiffness (Young modulus) and extensibility than AXs. The ultimate stress of BG films was similar to the lowly substituted AX's one (about 125 - 130 N.mm⁻² at water content around 0.15 g/g d.b), but significantly higher to highly substituted AXs'ones (about 60-98 N.mm⁻² at water content around 0.15 g/g d.b). Moreover, within AXs, changes in mechanical properties were observed according to the arabinose substitution ratio value: the higher the A/X, the lower the ultimate stress and the lower the ultimate strain, as observed by Hoije but in a slightly different A/X range (0.2 - 0.5). AX33 and BG films were characterized by similar ultimate stress, while a higher ultimate strain described the BG films. Höije et al 2008 have determined the mechanical properties of the cast films (thickness = $20 - 25 \mu m$) of enzymatic treatment of arabinoxylan (A/X = 0.2 - 0.5) using an Instron 4465 universal testing machine at 23°C and 50% RH. The ultimate stress were around 35-60 N/mm²; ultimate strains ware 0.05-0.10; the Young modulus were around 600-1800 N·mm⁻². ⁴¹

The curves of plastic part were not linear for AX33 and AX53 films: a slight increase of the slope could be observed from 20 - 30% strain to rupture (Figure 7). For AX73, as the rupture occurred at about 21% (water content around 0.15 g/g d.b), this increase could not be observed. However, this phenomenon was not so evident for BG films event if the rupture occurred at 60% strain (water content around 0.15 g/g d.b). Until 25% strain, similar slopes of

the irreversible part of the curve were observed for all films 120-130 N·mm⁻² at water content around 0.15 g/g d.b. Above 25% strain, the slopes of the AX33 and AX53 films (about 200-270 N·mm⁻² at water content around 0.15 g/g d.b) were significantly higher than the slope observed for BG film (130 N·mm⁻² at water content around 0.15 g/g d.b).

Figures 8 shows BG and AX33 film's stress-strain histories generated using unloading and reloading test. The shape of the stress-strain curve of BG film is similar to continuous loading test but the cyclic test gave higher ultimate strain (1.45 ± 0.16) at water content around 0.18 g/g d.b) BG films exhibited similar ultimate stress with the two methods, thus the slop of the non-reversible part of the curve decrease during strain. Between one cycle and the next one, the curve obtained during loading presented three slopes: the first one was the Young modulus, the last one was comparable to plastic phase, and the second one had an intermediate value and reflected a possible polymer rearrangement. Cycle after cycle the first part became smaller, supplanted by the second part. At the opposite, cyclic test on AX33 films exhibited no significant differences in ultimate strain and stress compared to continuous test.

Discussion

Influence of the water content

The increase of the water content highly decreased the strength, stiffness and the glass transition temperatures (Table 3) of the AX and BG films and impacted the mobility of the polysaccharide chains and increased the average distance between polysaccharides within films (determined by NMR). These results confirm that water is a highly efficient plasticizer of amorphous carbohydrates thanks to its ability to interfere with the hydrogen bonding between the carbohydrate chains. Consequently, water can strongly modify the nanostructure of the carbohydrate matrix ⁴². At rubber state (water content around 0.30 g/g d.b at 25°C), AX and BG films exhibited very low stiffness, strength and extensibility. Clearly, increasing the water content reduced the molecular interactions between the polysaccharide chains.

AX and BG films are very dense materials (density =1500 kg·m⁻³) without macropores (> 0.1 μ m) and exhibit a very low moisture diffusitivity. At water content below 0.05 g/g d.b, D_{eff} value was very low because of closed meso- or nanopores (< 50 nm) within films. Then D_{eff} value increased as a function of the water content. This result can be related to the opening of closed pores as a consequence of the plasticizing effect of water. The TD-NMR results also indicated that the variation of D_{eff} could be related to a plasticizing effect of water. ¹⁷ At low

water content (below 0.05 g/g d.b) NMR results indicated a short average distance between the few mobile polysaccharide chains that should lead to low effective moisture diffusivities. For higher water content, sorption of water by the carbohydrate matrices increased the polysaccharide mobility and the average distances between chains that should lead to a strong increase in the matrix free volume in both the glassy and rubbery states. ⁴² This modification of the film nanostructure favors water diffusion through films.

In addition, the mobility of water molecules has also an influence on the D_{eff} values in AX and BG films. At water content below 0.15 g/g d.b, T_2 of water protons in AX and BG films were very low (< 1ms), suggesting that the water strongly bound to polysaccharide chains (on hydroxyl groups). At water content above 0.15 g/g d.b, T_2 increased sharply up to 3.5 ms indicating a higher mobility of water. The increase of mobility (not only rotational mobility but also translational mobility ⁴³) of water induced a higher frequency of the water exchanges and an improvement of the desorption of water molecule within films. Thus, at high water content, the weak interaction between water and the carbohydrate hydroxyls and the high mobility of water lead to the decrease of D_{eff} .

Influence of the polysaccharide structures

The structure of the different polymers influences the interaction with water at the molecular level and impacts the diffusion of water and mechanical properties of the films.

The value of the monolayer water content (m_0) is of particular interest as it indicated the amount of water that was strongly adsorbed to specific sites. ⁴⁴ The higher m_0 value obtained for the AX33 and BG films was consistent with more sites which adsorb water in both polymers, compared to the more highly substituted AXs (AX53, AX73). Higher M₂ values for BG and AX33 films by comparison with highly substituted AXs indicated higher proton dipolar interactions within AX33 and BG films and shorter inter-proton distances between polysaccharide chains. The higher distance between polysaccharide chains for AX53 and AX73 films caused larger free volume available for water in films and should explain the higher moisture effective diffusivity. The interactions between AX chains are decreased by the presence of arabinose side chains leading to higher nano-porosity. ⁴¹ Compared to AX33, AX53 and AX73 are more highly branched polymers containing 53-73% of arabinose substituents, and a higher proportion of di-substituted residues (21-29% compared to 9% for AX33). The sterical hindrance of disubstituted xylose residues has possibly more impact than mono-substitution on the inter-chain distances.

The results of the tensile tests on films also suggest that mechanical properties of the films could be related to the fine structure of polysaccharides and in particular to the presence of

arabinose substituents and especially a high proportion of disubstituted Xyl residues. Lowly substituted AX and BG films exhibited similar and higher strength, than highly substituted AX films, in agreement with NMR results and with different intensity of interaction between chains depending on the structure of polysaccharides. However, while similar M_2 values and film strength were observed for lowly substituted AX and BG films, BG films exhibited a higher extensibility.

As the AX33 and AX53 film stiffen during the deformation, the presence of arabinose residues blocked the slippage between the chains. The blocks gradually lead to an increase in the slope of the plastic part within AX33 and AX53 films. BG chains are smooth chains, thus we have not observed this phenomenon for BG films. Cyclic rheological tests also confirmed a different behavior of AX33 and BG films. BG films showed significantly higher extensibility and lower slope pf plastic part with this method, however AX33 exhibited a similar elastoplastic behavior with a continuous loading of stress. These results are in agreement with the smoothness of the t BG chains that can rearrange during loading. In AX films, the arabinose residues distributed on the xylan backbone can block AX chain's mobility.

Impact of the polymer structure on the cell wall properties

Up to now, the relationships between structural variation of polymers such as the level of substitution of AXs by arabinose side chains and cell wall properties are not understood. The present work brings new lightning on the possible impact of the polysaccharide structure on the cell wall properties in endosperm. Higher effective diffusion of water was obtained for films made with highly substituted AXs compared to films made with BGs or lowly substituted AXs. In this respect, the different proportions of AXs and BGs and the variation of the structure of AXs within grain endosperm cell walls are well correlated with the water properties required for the different cell types in endosperm and their evolution during grain development. AXs are more substituted at the beginning of grain filling than at the later stages, suggesting that water diffusion is faster, favoring grain development. Similarly, substitution of AXs is higher in the cell walls of the transfer cells that are supposed to play an active role in solute uptake for grain filling. Conversely, moisture diffusivity shall be slower in aleurone cell walls due to its highest thickness, a higher proportion of BGs and a lower substitution of AXs. During its development wheat grain undergoes dramatic changes in water content. Cell walls act as barrier for water diffusion and during desiccation the water content decreases from 40% down to 12-14%. Thus, the changes in cell wall polymers structure observed during grain development and within grain tissue could possibly modulate the hydration properties of the cell walls that contribute to regulate the water content of the grain. In addition mechanical properties of AX and BG films indicated that BGs could play an important role on the mechanical and physico-chemical properties of these walls. BG layers are supposed to have a higher extensibility in order to favor the development of cell wall at early stage during the grain development. Compared to the starchy endosperm cell walls at the mature stage of wheat grain development, ^{12, 45, 46} the high content of BGs and lowly substituted AXs (around A/X=0.3) observed in the aleurone cell walls is in line with a higher extensibility and strength of aleurone cell walls.

Conclusion:

This work confirms that the study of polysaccharide films used as models of the polymer lamellar organization in cell walls is a well-adapted tool to better understand the impact of the polymer structure and their interaction in plant tissues. We have demonstrated that the water content and polymer structure within films can strongly influence interactions between polysaccharides as well as the nanostructure of films. These changes should significantly impact the moisture diffusion through films as well as their mechanical properties. Our results suggest that the different composition and localisation of AXs and BGs might affect the properties of cell walls in mature grain but also during grain development. Further studies on composite films should confirm and complement these results.

Acknowledgments

The authors are indebted to the Regional Council of Pays de la Loire for financial support. V. Guillard and C. Gaillard are greatly acknowledged for helpful discussions. Access to the microscopy and NMR facilities of the BIBS platform of INRA Angers-Nantes is acknowledged.

Reference

1. Fincher, G. B.; Stone, B. A., Cell walls and their components in cereal grain technology. *Advances in Cereal Science and Technology* **1986**, 8, 8, 207-295.

2. Saulnier, L.; Sado, P. E.; Branlard, G.; Charmet, G.; Guillon, F., Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. *Journal of Cereal Science* **2007**, 46, (3), 261-281.

3. Cui, W.; Wood, P. J.; Blackwell, B.; Nikiforuk, J., Physicochemical properties and structural characterization by two-dimensional NMR spectroscopy of wheat [beta]-D-glucan--comparison with other cereal β -D-glucans. *Carbohydrate Polymers* **2000**, 41, (3), 249-258.

4. Dais, P.; Perlin, A. S., High-field, 13C-N.M.R. spectroscopy of [beta]-d-glucans, amylopectin, and glycogen. *Carbohydrate Research* **1982**, 100, (1), 103-116.

5. Burton, R. A.; Fincher, G. B., (1,3;1,4)- β -D-Glucans in Cell Walls of the Poaceae, Lower Plants, and Fungi: A Tale of Two Linkages. *Mol Plant* **2009**, *2*, (5), 873-882.

6. Robert, P.; Jamme, F.; Barron, C.; Bouchet, B.; Saulnier, L.; Dumas, P.; Guillon, F., Change in wall composition of transfer and aleurone cells during wheat grain development. *Planta* **2011**, 233, (2), 393-406.

7. Jamme, F.; Robert, P.; Bouchet, B.; Saulnier, L.; Dumas, P.; Guillon, F., Aleurone Cell Walls of Wheat Grain: High Spatial Resolution Investigation Using Synchrotron Infrared Microspectroscopy. *Applied Spectroscopy* **2008**, 62, 895-900.

8. Toole, G. A.; Wilson, R. H.; Parker, M. L.; Wellner, N. K.; Wheeler, T. R.; Shewry, P. R.; Mills, E. N. C., The effect of environment on endosperm cell-wall development in Triticum aestivum during grain filling: an infrared spectroscopic imaging study. *Planta* **2007**, 225, (6), 1393-1403.

9. Toole, G.; Le Gall, G.; Colquhoun, I.; Nemeth, C.; Saulnier, L.; Lovegrove, A.; Pellny, T.; Wilkinson, M.; Freeman, J.; Mitchell, R.; Mills, E.; Shewry, P., Temporal and spatial changes in cell wall composition in developing grains of wheat cv. Hereward. *Planta* **2010**, 232, (3), 677-689.

10. Saulnier, L.; Robert, P.; Grintchenko, M.; Jamme, F.; Bouchet, B.; Guillon, F., Wheat endosperm cell walls: Spatial heterogeneity of polysaccharide structure and composition using micro-scale enzymatic fingerprinting and FT-IR microspectroscopy. *Journal of Cereal Science* **2009**, 50, 312-317.

11. Philippe, S.; Tranquet, O.; Utille, J. P.; Saulnier, L.; Guillon, F., Investigation of ferulate deposition in endosperm cell walls of mature and developing wheat grains by using a polyclonal antibody. *Planta* **2007**, 225, (5), 1287-1299.

12. Philippe, S.; Robert, P.; Barron, C.; Saulnier, L.; Guillon, F., Deposition of Cell Wall Polysaccharides in Wheat Endosperm during Grain Development: Fourier Transform-Infrared Microspectroscopy Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, 54, (6), 2303-2308.

13. Dervilly, G.; Saulnier, L.; Roger, P.; Thibault, J. F., Isolation of homogeneous fractions from wheat water-soluble arabinoxylans. Influence of the structure on their macromolecular characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 48, (2), 270-278.

14. Englyst, H. N.; Cummings, J. H., Improved Method for Measurement of Dietary Fiber as Non-Starch Polysaccharides in Plant Foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **1988**, 71, (4), 808-814.

15. Ying, R.; Saulnier, L.; Rondeau-Mouro, C., Films of arabinoxylans and beta-glucans extracted from cereal grains: Molecular motions by TD-NMR. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 86, (2), 812-822.

16. Saulnier, L.; Crépeau, M.-J.; Lahaye, M.; Thibault, J.-F.; Garcia-Conesa, M. T.; Kroon, P. A.; Williamson, G., Isolation and structural determination of two 5,5'-diferuloyl oligosaccharides indicate that maize heteroxylans are covalently cross-linked by oxidatively coupled ferulates. *Carbohydrate Research* **1999**, 320, (1-2), 82-92.

17. Ying, R.; Barron, C.; Saulnier, L.; Rondeau-Mouro, C., Water mobility within arabinoxylan and β -glucan films studied by NMR and dynamic vapour sorption. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2011**, In Press, Corrected Proof.

18. Goodman, A. M., Optical Interference Method for Approximate Determination of Refractive-Index and Thickness of a Transparent Layer. *Applied Optics* **1978**, 17, (17), 2779-2787.

19. Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E., Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society* **1938**, 60, (2), 309-319.

20. Chirife, J.; Iglesias, H. A., Equations for fitting water sorption isotherms of foods: Part 1 — a review. *International Journal of Food Science & Technology* **1978**, 13, (3), 159-174.

21. Al-Muhtaseb, A. H.; McMinn, W. A. M.; Magee, T. R. A., Moisture Sorption Isotherm Characteristics of Food Products: A Review. *Food and Bioproducts Processing* **2002**, 80, (2), 118-128.

22. Timmermann, E. O., Multilayer sorption parameters: BET or GAB values? *Colloids* and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **2003**, 220, (1-3), 235-260.

23. Williams, R.; Mittal, G. S., Low-fat fried foods with edible coatings: Modeling and simulation. *Journal of Food Science* **1999**, 64, (2), 317-322.

24. Meiboom, S.; Gill, D., Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Review of Scientific Instruments* **1958**, 29, (8), 688-691.

25. Abragam, A., *The principle of Nuclear Magnetism* **1961**, Clarendon Press:Oxford.

26. LeBotlan, D. J.; Ouguerram, L., Spin-spin relaxation time determination of intermediate states in heterogeneous products from free induction decay NMR signals. *Analytica Chimica Acta* **1997**, 349, (1-3), 339-347.

27. Antoine, C.; Peyron, S.; Mabille, F.; Lapierre, C.; Bouchet, B.; Abecassis, J.; Rouau, X., Individual contribution of grain outer layers and their cell wall structure to the mechanical properties of wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *5*1, (7), 2026-2033.

28. Hemery, Y. M.; Mabille, F.; Martelli, M. R.; Rouau, X., Influence of water content and negative temperatures on the mechanical properties of wheat bran and its constitutive layers. *Journal of Food Engineering* **2010**, *98*, (3), 360-369.

29. Dural, N. H.; Hines, A. L., Adsorption of water on cereal-bread type dietary-fibers *Journal of Food Engineering* **1993**, 20, (1), 17-43.

30. Roman-Gutierrez, A. D.; Mabille, F.; Guilbert, S.; Cuq, B., Contribution of specific flour components to water vapor adsorption properties of wheat flours. *Cereal Chemistry* **2003**, 80, (5), 558-563.

31. Zhang, Y.; Pitkanen, L.; Douglade, J.; Tenkanen, M.; Remond, C.; Joly, C., Wheat bran arabinoxylans: Chemical structure and film properties of three isolated fractions. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 86, (2), 852-859.

32. Zografi, G.; Kontny, M. J., The interactions of water with cellulose- and starchderived pharmaceutical excipients. *Pharmaceutical Research* **1986**, 3, (4), 187-194.

33. Enrione, J. I.; Hill, S. E.; Mitchell, J. R., Sorption and Diffusional Studies of Extruded Waxy Maize Starch-Glycerol Systems. In WILEY-VCH Verlag: 2007; Vol. 59, pp 1-9.

34. Guillard, V.; Broyart, B.; Bonazzi, C.; Guilbert, S.; Gontard, N., Moisture Diffusivity in Sponge Cake as Related to Porous Structure Evaluation and Moisture Content. *J. Food Sci.*2003, 68, (2), 555-562.

35. Yu, X.; Schmidt, A. R.; Bello-Perez, L. A.; Schmidt, S. J., Determination of the Bulk Moisture Diffusion Coefficient for Corn Starch Using an Automated Water Sorption Instrument. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *56*, (1), 50-58.

36. Enrione, J. I.; Hill, S. E.; Mitchell, J. R., Sorption Behavior of Mixtures of Glycerol and Starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, 55, (8), 2956-2963.

37. Chivrac, F.; Angellier-Coussy, H.; Guillard, V.; Pollet, E.; Averous, L., How does water diffuse in starch/montmorillonite nano-biocomposite materials? *Carbohydrate Polymers* **2010**, 82, (1), 128-135.

38. Roca, E.; Broyart, B.; Guillard, V.; Guilbert, S.; Gontard, N., Controlling moisture transport in a cereal porous product by modification of structural or formulation parameters. *Food Research International* **2007**, 40, (4), 461-469.

39. Van den Dries, I. J.; Besseling, N. A. M.; van Dusschoten, D.; Hemminga, M. A.; van der Linden, E., Relation between a Transition in Molecular Mobility and Collapse Phenomena in Glucoseâ[^]Water Systems. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, 104, (39), 9260-9266.

40. Köhler, L., Biphasic mechanical behaviour of plant tissues. *Materials Science and Engineering: C* 2000, 11, (1), 51-56.

41. Hoije, A.; Sternemalm, E.; Heikkinen, S.; Tenkanen, M.; Gatenholm, P., Material properties of films from enzymatically tailored arabinoxylans. *Biomacromolecules* **2008**, 9, (7), 2042-2047.

42. Kilburn, D.; Claude, J.; Schweizer, T.; Alam, A.; Ubbink, J., Carbohydrate polymers in amorphous states: An integrated thermodynamic and nanostructural investigation. *Biomacromolecules* **2005**, 6, (2), 864-879.

43. van den Dries, I. J.; van Dusschoten, D.; Hemminga, M. A., Mobility in Maltose - Water Glasses Studied with 1H NMR. *The Journal of Physical Chemistry B* **1998**, 102, (51), 10483-10489.

44. Karel M, Water activity and food preservation. *In: M. Karel, O.R. Fennema and D.B. Lund, Editors, Physical Principles of Food Preservation.* **1975,** Principles of Food Science, Part 2, pp. 237-263.

45. Philippe, S.; Barron, C.; Robert, P.; Devaux, M. F.; Saulnier, L.; Guillon, F., Characterization using Raman microspectroscopy of arabinoxylans in the walls of different cell types during the development of wheat endosperm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, 54, (14), 5113-5119.

46. Philippe, S.; Saulnier, L.; Guillon, F., Arabinoxylan and $(1 \rightarrow 3)$, $(1 \rightarrow 4)$ -beta-glucan deposition in cell walls during wheat endosperm development. *Planta* **2006**, 224, (2), 449-461.

Chapitre IV

Propriétés mécaniques et interactions moléculaires dans des films composites

Résumé

Des films composites constitués d'un mélange d'AX (60%) et de BG (40%) ont été réalisés en grande quantité, ce qui n'est pas encore le cas pour les films multi-couches alternant AX et BG (voir Conclusions-Perspectives). Trois types de films composites ont été préparés en conservant une proportion fixe en AX et BG (60/40) mais en faisant varier le taux de substitution des AX : AX33(A/X=0.33)+BG, AX53(A/X=0.53)+BG et AX73(A/X=0.73)+BG.

La structure de ces films composites a été étudiée par microscopie confocale de fluorescence (MCBL) et par microscopie électronique à balayage (MEB). En microscopie confocale, l'autofluorescence de l'acide férulique a permis de distinguer les AX des BG en MCBL : Sur les images les AX apparaissent sous forme de tâches claires tandis que les BG qui ne fluorescent pas forment des tâches foncées. Les différentes observations indiquent que plus le taux de substitution des AX augmente plus le film est hétérogène. Pour le plus fort taux de substitution des AX (A/X : 0.73) une séparation de phase est observée entre des zones riches en AX73 et d'autres riches en BG. Les observations en MEB permettent de confirmer l'hétérogénéité des films AX73BG.

Les propriétés mécaniques de ces films ont été étudiées par DMTA (Analyseur Mécanique Dynamique Thermique) et montrent des différences significatives entre les trois composites. Les composites réalisés à partir des AX les plus substitués présentent des propriétés fortement dégradées en lien avec le phénomène de séparation de phase. Le second moment dipolaire M_2 des protons des polysaccharides a été mesuré sur les films composites pour des RH de 59% et 75% entre -40°C et +80°C. En dessous de Tg (62°C) et à RH 75%, une diminution significative des M_2 a été mesurée sur les films composites AX53BG et AX73BG comparé à la valeur moyenne estimée à partir des films purs AX et BG. Ces résultats, en accord avec les tests mécaniques, montrent que les interactions entre les chaînes d'AX hautement substitués et les chaines de BG sont faibles dans les films composites. Plus la teneur en eau des films est élevée, plus le phénomène est amplifié ce qui peut expliquer la séparation de phase observée en microscopie. Une analogie est présentée entre ces résultats physico-chimiques sur des films composite et ce qui est observé dans les parois cellulaires.

Arabinoxylans and ß-glucans phase separation and interactions in composite films

Ruifeng YING¹, Corinne RONDEAU-MOURO^{1,2}, Brigitte BOUCHET¹, Florian GUILLOUX¹, Cécile BARRON³, Luc SAULNIER^{1*}.

¹ UR1268 Biopolymères, Interactions, Assemblages, INRA, F-44316 Nantes, France

 2 Irstea, UR TERE, IRM-Food, CS 64427 , 17 avenue de Cucillé, 35044 Rennes Cedex, France

³ Unité mixte de Recherches Ingénierie des Agropolymères et Technologies Emergentes, INRA-ENSAM-UMII-CIRAD, 2 place Viala, 34060 Montpellier, France

Soumis dans Biomacromolecules

Abstract

Composite films made with Arabinoxylans (AXs) (with high, middle and low level of substitution by arabinose) and $(1\rightarrow 3)(1\rightarrow 4)$ - β -D-glucans (BGs) extracted from cereal cell walls have been prepared and analysed using microscopy (SEM and LSCFM), DSC, mechanical tests and TD-NMR. The objectives were to correlate physico-chemical properties of films with mechanical and hydration properties of cereal cell walls. A phase separation phenomenon was observed for films made with highly substituted AX and BG at a ratio AX/BG of 60/40. This phase separation correlated with lower dipolar interactions between polysaccharide chains and a decrease of ultimate strain and stress of films. Highly substituted AX and BG composite films exhibited very weak mechanical properties in agreement with weaker interactions between the polymer chains. These results are consistent with properties observed in cereal cell walls. The transfer cell walls are composed of highly substituted AXs and BGs which are incompatible macromolecules, with weak interactions but in favour of the transfer of water and nutrients between developing tissues. In opposite, the stronger interactions between the lowly substituted AXs and BGs in the aleurone cell walls should favour stronger mechanical properties of cell walls and slower water diffusivity.

Keywords: Arabinoxylans; β -glucans; phase separation; composite film; cell walls; endosperm

Introduction:

Environmental constraints factors such as high temperature and drought limit the growth and productivity of major crop species, including wheat ¹. Many studies have indicated also that the environment play a role in the variation of cell wall composition and polysaccharides concentration of grain ^{2, 3}. Zhang et al (2010) indicated that the arabinoxylan (AX) concentration in grain and plant water use efficiency (WUE) increased under water-deficit and high temperature conditions. A positive correlation was observed between WUE and AX concentration in grain.⁴ It has been shown that water influences all the processes during growth and development of the grain (cell size, flux of nutrients, stunting) ⁵. The composition and polysaccharides organization in the cell walls may have an effect on water transfer and on the growth and productivity of the cereal grain.

In wheat endosperm, arabinoxylans and $(1\rightarrow 3)(1\rightarrow 4)$ - β -D-glucans (BG) are the main components of cell walls ⁶. The structure of AX is a linear backbone of $(1\rightarrow 4)$ -linked β -Dxylopyranosyl (Xylp) residues to which α -L-arabinofuranosyl (Araf) substituents are attached through O-3 (mono-substitution and/or O-3, in addition ferulic acid is esterified to few arabinosyl substituents via O-5 ⁶. Variation in the structure of AX that affects the overall arabinose substitution level and the proportion of mono- and di-substitution levels is observed. This structural variations are roughly described by the arabinose to xylose ratio (A/X) that may vary from 0.3 up to 1 ^{6,7}. $(1\rightarrow 3)(1\rightarrow 4)$ - β -D-glucans, commonly known as β glucans, are linear homopolymers of D-glucopyranosyl (Glcp) residues linked mostly via two or three consecutive β -(1-4) linkages that are separated by a single β -(1,3) linkage ^{8,9}. Longer segments of consecutively β -(1 \rightarrow 4) linked Glcp residues represent less than 10% of the molecule and are mainly constituted by oligomers with a degree of polymerization (DP) of 5 and 6. There is no current evidence that two or more adjacent β -(1 \rightarrow 3) linkages occur in the BG chains ⁹.

During the grain development and depending on the cell wall localization within grain tissues, dramatic changes occur in cell wall composition with respect to both the relative occurrence of individual constituents (AXs and BGs) and the fine structure of AXs¹⁰⁻¹⁶. In addition, for a same tissue (wheat starchy endosperm), positional variations were observed in composition of cell wall polysaccharides and structure of AXs¹⁷. However molecular interactions between

the two polymers as well as their impact on cell wall properties and the biological significance of this structural diversity were not extensively explored.

Indirect evidence for hydrogen bonding between AXs and BGs and the role of arabinose substitution in controlling interactions with BGs were reported in barley ^{18, 19}. Previous studies on films made with AXs and BGs have shown higher water diffusivity within films of highly substituted AX compared to BG films in relation with various nanostructures. More compact nanostructures of the BG films were assigned to stronger interactions between the BG chains ^{20, 21}. This work deals with composite films prepared by mixing AXs of various fine structure (A/X ratio) and BGs in proportion (60/40 w/w) that corresponds to the aleurone layer composition. The mechanical and water transport properties of these films were studied in order to better understand interactions between AXs and BGs, and the possible impact of their fine structure on the mechanical and hydration properties of grain cell walls.

Materials and Methods

Materials

Water-extractable arabinoxylans were prepared by graded ethanol precipitation from wheat flour water extract, as described by Dervilly-Pinel et al. (2000).²² Three pure AX fractions exhibiting contrasted arabinose to xylose ratios: 0.33, 0.53 and 0.73 were isolated and encoded AX33, AX53 and AX73, respectively. Water soluble β -glucans from barley (medium viscosity, Purity > 97%) were purchased from Megazyme.

Chemical and physicochemical analyses

The method of Englyst and Cummings was used to determine the monosaccharide composition ^{14, 15}. Ferulic acid content in AX was determined by UV spectroscopy as described by Saulnier et al., (1999) ²³. Weight average molecular weight (M_w), radius of gyration (R_G) and intrinsic viscosity ([η]) were determined using high-performance size exclusion chromatography (HPSEC), as described by Ying et al. (2011) ²⁴.

Film preparation and characterization

Films containing AX and BG were prepared by casting. AX and BG solutions were prepared in water (20 mg/mL), and mixed together, in a AX/BG ratio of 60/40 (v/v). Then, 5 mL of polysaccharide solution was poured into polystyrene Petri dishes (Ø 5 cm). Petri dishes were placed in a climate room at 40 °C and 40% relative humidity (RH) for 3 days. Three kinds of composite films were prepared: AX with an A/X ratio of 0.33 and BG composite films (AX33BG), AX with an A/X ratio of 0.53 and BG composite films (AX53BG), AX with an
A/X ratio of 0.73 and BG composite films (AX73BG). Reflectance spectroscopy (SPECORDS 600) was used to determine film thickness 25 .

Microstructure of films

Laser Scanning Confocal Fluorescence Microscopy (LSCFM)

Films were observed on a LSCFM (Nikon A1) at room temperature (~ 20°C) and 0% RH. Films were fixed to glass slides (sealed with a pouch) and then placed on the sample stage. The microscope was focused on the surface in reflection mode and laser light of a suitable wavelength (375 nm) was used to excite fluorescence of ferulic acid.

Scanning Electron Microscope (SEM)

Films were observed at room temperature (20 $^{\circ}$ C) and 50% RH with an scanning electron microscope (SEM-Zeiss EVO[®]MA10) working at 15 kV and 30 Pa for examination of film surface.

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The glass transition temperatures (T_g) of the AX and BG composite films were measured with a DSC Q100 differential scanning calorimeter (TA Instruments), previously calibrated with Indium. Each sample (20 mg) of known moisture content was first heated from -40 °C to 120 °C (3 °C/min) then cooled to -40 °C and finally heated from -40 °C to 150 °C (3 °C/min) using an empty pan as reference. T_g of the specimens was determined from the midpoint of the heat capacity change observed in the second scan, as previously described ²⁴.

Traction tests

The tensile strength and elongation at break of the films were determined using a Dynamic Mechanical Thermal Analyser (DMTA Mk III; Rheometrics Inc., Piscataway, USA) as previously described (Ying et al, Biomacromolecules, submitted). The tests in which the samples broke close to the clamps were rejected, to exclude samples that might have been damaged during clamping. Results were taken as the average of at least 6 tests ^{24, 25}.

NMR Spectroscopy

¹H NMR measurements were performed using a TD-NMR spectrometer (Minispec BRUKER, GERMANY) operating at a resonance frequency of 20 MHz. Proton free induction decays (FID) pulse sequence was used as described by Ying et al. (2011) ²⁴. After a first scan by TD-NMR from -40 °C to 80 °C at RH = 59%, the same samples were scanned secondly by TD-NMR -40°C to 80°C at RH 75%.

The second moment M_2 values were calculated from the broad part of the FID curve that arose from protons of the solid fraction as previously described Abragam (1961), ²⁶

$$H_{FID}(t) = A \exp\left(-\frac{a^2 \cdot t^2}{2}\right) \frac{\sin bt}{bt} + B \exp(-\frac{t}{T_2^*}) \quad (Equation 1)$$

$$M_2 = a^2 + \frac{1}{3}b^2 \quad (Equation 2)$$

$$M_2 = a^2 + \frac{1}{3}b^2 \quad (Equation 2)$$

Figure 1. Laser scanning confocal fluorescence microscopy (a, b, c) and Scanning electron microscopy (d, e, f) images of composite films (thickness = 22μ m)

a and d LSCFM and SEM AX33BG film

b and e LSCFM and SEM AX53BG film

c and f LSCFM and SEM AX73BG film

AX33: arabinoxylans (arabinose/xylose = 0.33); AX53: arabinoxylans (arabinose/xylose = 0.53); AX73: arabinoxylans (arabinose/xylose = 0.73); BG: β -glucans; AX33BG: blend of AX33 and BG (60/40 w/w); AX53BG: blend of AX53 and BG (60/40 w/w); AX33BG: blend of AX73 and BG (60/40 w/w).

Results

Morphology of AX and BG composite films

Figures 1a to 1c shows LSCFM images of various composite films made with AX and BG. AX are esterified with 0.07-0.23 % ferulic acid (Table 1) that is a natural fluorescent dye, whereas BG do not contain fluorophore. The white regions in images of Figure 1a to 1c correspond to the fluorescence due to ferulic acids attached to AX, while "dark" regions are attributed to BG. Ferulic acid has already been observed by LSCFM in cell walls²⁷ as well as in pure (monomolecular) AX films (not shown). These films were very homogeneous, containing esterified and unesterified AXs which blend well due to their similar physicochemical properties. The composite films in Figure 1a to 1c seem to exhibit different morphology depending on the structure of AX. The homogeneity of films varies depending on the AX structure: the AX33BG film seems more homogeneous than the AX53BG and AX73BG films. This last showed two phases, a continuous fluorescent phase made of AXs and a discontinuous dark phase made of BG and non-esterified AX. The heterogeneity of AX/BG blend increased with the A/X ratio of AX. ESEM observations revealed that the three types of film were compact, AX33BG and AX53BG showing a flat and homogenous surface whereas AX73BG film surface was more heterogeneous with hollows and watersheds (Figures 1d to 1f).

		AX33	AX53	AX73	BG
Structural features	A/X ^a	0.33	0.53	0.73	
	Ferulic acid % ^b	0.23%	0.07%	0.16%	0.00%
	Xylu/Xylm/Xyld %	76/15/9	68/11/21	56/15/29	
Physico-chemical	$M_w^{c} \ge 10^{-3} (g/mol)$	177.0	196.9	233.2	283.5
features	$\left[\eta\right]^{c}(mL/g)$	295.6	284.8	259.6	331.2

Table	1.	Molecular	characteristics	of	arabinoxylans	(AX)	and	β-glucans	(BG).
Arabinose/Xylose ratio (A/X), weight average molar mass (M_W), intrinsic viscosity ([η]).									

a: results obtained from duplicates, coefficients of variation < 4%; b: results obtained from duplicates, coefficients of variation < 2%; c: results obtained from duplicates, coefficients of variation < 5%.

Thermodynamical and Mechanical properties of AX and BG composite films

The DSC experiments indicated that AX33BG and AX53BG composite films exhibited a unique T_g , at 83 °C for AX33BG and at 85 °C for AX53BG films (Figure 2). These transition temperatures are very close to T_g values determined for pure AX films at 81 °C (Table 2). Due to the absence of a clear change in heat capacity for AX73BG films, it was not possible to determine their T_g (Figure 2). However the change in heat capacity of the glass transition within AX53BG was lower than for AX33BG films. Significant different mechanical properties were determined for the different AX/BG films (see Table 2). As previously observed for pure AX and BG films ²⁸, strength (ultimate stress) and total energy to rupture of the films decreased when water content increased.





AX33: arabinoxylans (arabinose/xylose = 0.33); AX53: arabinoxylans (arabinose/xylose = 0.53); AX73: arabinoxylans (arabinose/xylose = 0.73); BG: β -glucans. AX33BG: blend of AX33 and BG (60/40 w/w); AX53BG: blend of AX53 and BG (60/40 w/w); AX33BG: blend of AX73 and BG (60/40 w/w).

		Pure films				Composite films			Calculated composite films*		
RH		AX33	AX53	AX73	BG	AX33BG	AX53BG	AX73BG	AX0,33+BG	AX0,53+BG	AX0,73+BG
59%	Water content										
	(d,b)	0,152	0,144	0,140	0,164	0,165	0,165	0,166	0,157	0,152	0,150
	T _g (°C)	83	85	82	102	81	81	ND			
	Ultimate strain										
	(%)	46 ± 8	39 ± 9	22 ± 9	62 ± 8	55 ± 4	51 ± 9	32 ± 6	52 ± 8	48 ± 9	38 ± 9
	Ultimate stress										
	(N/mm^2)	131 ± 25	98 ± 16	61 ± 8	124 ± 10	137 ± 13	116 ± 20	80 ± 17	128 ± 18	108 ± 13	86 ± 9
	Rupture energy										
	(J/mm ³)	39 ± 9	26 ± 8	11 ± 5	54 ± 10	47 ± 6	39 ± 10	11 ± 5	45 ± 10	37 ± 9	28 ± 8
	Water content										
	(d,b)	0,183	0,180	0,178	0,194	0,198	0,202	0,206	0,188	0,186	0,185
	T _g (°C)	59	58	56	71	62	56	ND			
75%	Ultimate strain										
	(%)	39 ± 10	37 ± 8	9 ± 4	65 ± 12	52 ± 6	44 ± 9	14 ± 7	49 ± 11	48 ± 10	31 ± 8
	Ultimate stress										
	(N/mm^2)	78 ± 24	59 ± 9	27 ± 12	74 ± 9	86 ± 11	63 ± 8	33 ± 7	76 ± 17	65 ± 9	46 ± 11
	Rupture energy										
	(J/mm ³)	21 ± 10	15 ± 4	$2{,}4\pm1{,}2$	36 ± 11	29 ± 7	20 ± 6	4 ± 3	27 ± 11	23 ± 8	16 ± 6

Table 2. Mechanical properties of arabinoxylan (AX), β -glucans (BG) and blend of AX and BG films at 59% and 75% of relative humidity.

* Calculated using the values of pure AX and BG films and the proportion of each component in the blend (60/40)

RH: Relative humidity; Tg: Glass transition temperatures.

AX33: arabinoxylans (arabinose/xylose=0.33); AX53: arabinoxylans (arabinose/xylose=0.53); AX73: arabinoxylans (arabinose/xylose=0.73); BG: β -glucans. AX33BG: blend of AX33 and BG (60.40 w/w); AX53BG: blend of AX53 and BG (60.40 w/w); AX33BG: blend of AX73 and BG (60.40 w/w).

The extensibility (ultimate strain) of AX33BG and AX53BG films did not change much when water content increased from 0.16 g/g d.b to 0.20 g/g d.b, while extensibility of AX73BG was much lower and more impacted by changes in water content; it changes from 32% to 14%. Ultimate strain (AX33BG = 55 ± 4 %; AX53BG = 51 ± 9 %; AX73BG = 32 ± 6 % at RH = 59%), ultimate stress (AX33BG = 137 ± 13 N/mm²; AX33BG = 116 ± 20 N/mm²; AX33BG = 80 ± 17 N/mm² at RH = 59%) and the total energy to rupture of composite films decreased when the A/X ratio of AX increased. Values for AX33BG and AX53BG films were close to the average values calculated from the contribution of pure AX and BG films, while for AX73BG films weaker mechanical properties were observed compared to calculated contributions of pure AX and BG components (Table 2, Figure 3).



Figure 3. Mechanical behaviour of pure films and arabinoxylans/ β -glucans composite films (experimental values in Table 2) experimental data at relative humidity 75%. Continuous lines: experimental; Dotted lines: the average values calculated by arabinoxylans and β -glucans pure films.

AX33: arabinoxylans (arabinose/xylose = 0.33); AX53: arabinoxylans (arabinose/xylose = 0.53); AX73: arabinoxylans (arabinose/xylose = 0.73); BG: β -glucans. AX33BG: blend of AX33 and BG (60/40 w/w); AX53BG: blend of AX53 and BG (60/40 w/w); AX33BG: blend of AX73 and BG (60/40 w/w).

Time domain NMR

The second moment, M₂, was determined as a function of temperature for the different AX/BG composite films at two different relative humidities (59% and 75%, Figure 4a). M₂ decreased when temperature increased indicating a lower proton dipolar strength or a lower proton density due to an increase in the mobility and/or higher average distances of the polysaccharide chains, as described by Ying et al. $(2011)^{30}$. At RH = 59% (open symbols in Figure 4a), change in the linear slope of M₂ versus temperature were observed for AX53BG films (transition T_{M2} at 70°C) and AX73BG films (transition T_{M2} around 60 °C). These transition temperatures were lower than Tg values (81 °C) determined by DSC. No temperature of transition was observed for AX33BG films at RH = 59%. However, a transition in M₂ ($T_{M2} = 70$ °C) was distinguishable for AX33BG films at RH = 75%, higher than the T_g value (62 °C) (filled symbols in Figure 4a). At this RH, slight breaks in M₂ were observed for AX53BG and AX73BG films (T_{M2} around 60°C), close to their T_g (62 °C). However the main result of these studies is that the M₂ values at RH 59% were very close whatever the film composition while at RH 75% the M_2 values of AX33BG (5.9·10⁹ rad²s⁻² at 20 °C) was significantly higher than for AX53BG (4.8·10⁹ rad² s⁻² at 20°C) and AX73BG films (4.7·10⁹ rad²s⁻² at 20 °C) (filled symbols in Figure 4a). Figure 4b shows the ratios of the mobile (B) and immobile (A) proton fractions (determined in equation 1, see "Material and Methods" section) as a function of temperature at two RH (59% and 75%). At RH 59%, breaks in the slope of B/A ratio versus temperature (referred to as $T_{B/A}$) were observed for AX53BG and AX73BG at 70°C and 60°C respectively, but not for AX33BG films. A transition was estimated at 70°C for AX33BG composite films at RH = 75%. The B/A ratio of the three composite films were very close at RH = 59%, however, at RH = 75% the B/A ratio of AX33BG (0.37 at 20°C) was lower than for AX53BG (0.45 at 20°C) and AX73BG (0.45 at 20 °C) films although the three composite films had similar water content.

The M₂ and B/A values_acalculated for composite films at RH = 59% were approximately the average values determined for pure AX and BG films (monomolecular) at the same RH. At RH = 75%, we observed that, below T_g, the M₂ values of AX33BG films (7.2 - $5.3 \cdot 10^9 \text{ rad}^2 \text{s}^{-2}$) were close to the intermediate M₂ values calculated from pure AX33 films (7.1 - $4.9 \cdot 10^9 \text{ rad}^2 \text{s}^{-2}$) and pure BG films (7.3 - $5.5 \cdot 10^9 \text{ rad}^2 \text{s}^{-2}$).³¹ However the M₂ values of AX53BG films ($6.5 - 4.1 \cdot 10^9 \text{ rad}^2 \text{s}^{-2}$) and AX73BG films ($6.4 - 3.9 \cdot 10^9 \text{ rad}^2 \text{s}^{-2}$) were significantly lower than M₂ values of pure AX53 films ($7.1 - 4.1 \cdot 10^9 \text{ rad}^2 \text{s}^{-2}$), pure AX73 films ($7.3 - 4.1 \cdot 10^9 \text{ rad}^2 \text{s}^{-2}$) or pure BG films. We also observed that the B/A values of AX33BG films (0.32 - 0.38) below T_g were slightly lower than B/A values of pure AX33 films (0.35 - 0.43) or pure BG films.



Figure 4. M_2 (a) and B/A (b) as a function of temperature for arabinoxylans/ β -glucans composite films. Triangles: AX33BG film; Diamonds: AX53BG film; Cubes: AX73BG film. Open symbol: Relative humidity=59%; Filled symbol: Relative humidity=75%.

AX33: arabinoxylans (arabinose/xylose = 0.33); AX53: arabinoxylans (arabinose/xylose = 0.53); AX73: arabinoxylans (arabinose/xylose = 0.73); BG: β -glucans. AX33BG: blend of AX33 and BG (60/40 w/w); AX53BG: blend of AX53 and BG (60/40 w/w); AX33BG: blend of AX73 and BG (60/40 w/w).

We also observed that the B/A values of AX33BG films (0.32 - 0.38) below T_g were slightly lower than B/A values of pure AX33 films (0.35 - 0.43) or pure BG films (0.32 - 0.41), while the B/A values of AX53BG film (0.38 – 0.46) and AX73BG films (0.37 – 0.47) films below T_g were significantly higher than B/A values of pure AX53 films (0.34-0.43), AX73 films (0.27-0.41) or pure BG films.

Discussion

Phase separation and interactions between AXs and BGs

The different composite films were prepared in similar conditions, casting in occurrence, and although the three blend polysaccharide solutions were clear and homogeneous, different morphologies of composite films were generated during the evaporation of water. Microscopy images show that the three composite films have different morphologies and a clear phase separation was observed for highly substituted AX73BG film. For AX33BG and AX53BG, the blend of AX and BG did not give rise to a phase separation and the good mixing of the two polymers was confirmed by a single glass transition of the films. ^{32, 33} This was not observed for AX73BG film in which the two glass transitions characteristics of each polymer were observed (Figure 2). The presence of one or two phases in the films was further confirmed by the mechanical properties observed for the different blends.

The mechanical properties observed for AX33BG were slightly higher than the average properties calculated from the contribution of each polymer (Table 2) suggesting strong interactions between the two polymers within the film. The mechanical properties of AX53BG was very close to the calculated average properties but AX73BG film exhibited significantly weaker mechanical characteristics than expected from the contribution of each

polymer. The results obtained for AX73BG films are in agreement with their heterogeneous morphology and further should indicate weak interactions between the different phases.

While numerous composite films made with polysaccharides and proteins have shown homogeneous structures with a single-phase of polymeric complexes, ^{29, 34-41} heterogeneous structures with a phase separation have been observed in some cases⁴² and in particular for the agar–arabinoxylan blend ²⁹. The phase separation is observed when blending two different and incompatible hydrocolloids or macromolecules. It depends on their molecular weight, chemical structures, conformations and hydration behaviors and induce changes of both the physical and the rheological properties of mixed solutions or gels. Phan The et al. ²⁹ have

prepared agar/arabinoxylan and cassava starch/arabinoxylan composite films with 15% glycerin. Range of thickness of the films was 35-60 μ m. Mechanical properties of these two composite films were measured at RH =57%. Ultimate strain (agar/arabinoxylan = 4.51 \pm

 $0.30 \% - 5.53 \pm 1.14 \%$; cassava starch/arabinoxylan = $2.86 \pm 0.42 \% - 3.10 \pm 0.31 \%$), and ultimate stress (agar/arabinoxylan = $22.21 \pm 3.89 \text{ N/mm}^2 - 29.47 \pm 1.29 \text{ N/mm}^2$; cassava starch/arabinoxyaln = $17.27 \pm 3.41 \text{ N/mm}^2 - 20.86 \pm 2.78 \text{ N/mm}^2 \%$) were largely lower than for the present AX/BG composite films. Phan The et al. ²⁹ have suggested that polymer interactions should affect the phase morphology and the mechanical properties of composite films.

In our case, the two-phase separation phenomenon observed in highly substituted AX and BG composite films is clearly correlated with unfavourable interactions between the polysaccharide chains, while interactions between lowly substituted AX and BG seem stronger and amplified while the water content increased.

In concentrated aqueous solutions, mixtures of two polysaccharides may exhibit thermodynamic incompatibility of mixing and as a result undergo phase separation ⁴². The thermodynamic incompatibility between the two polymers AX and BG arises from energetically unfavourable interactions between them ⁴².

Low field NMR permits to measure proton dipolar second moments M_2 which give indications of mobility of polymer chains as well as distance between the polymeric protons. Changes in mobility of the polymer chains induce the variation of the B/A ratio characteristics of the ratio between mobile (B) and immobile (A) proton fractions. Below T_g , changes in M_2 values are mainly related to variations of the average distances between the protons of polysaccharides ³⁰. This statement is confirmed by the stability of the B/A ratio below T_g (Figure 4b).

The higher values of M_2 in AX33BG film at RH = 75% indicate that the average distance between the polysaccharides chains in AX33BG films are shorter compared to AX53BG and AX73BG films. The shorter average distance between chains can be related to the stronger dipolar interaction between AX33 and BGs at RH = 75%. The significantly lower M_2 values within AX53BG and AX73BG composite films compared with pure AX or BG films indicate that the distance between highly substituted AXs and BGs are larger in composite films due to very weak interactions between highly substituted AXs and BGs at RH = 75%. The larger distance between highly substituted AXs and BGs can induce a higher mobility of polysaccharide chains and then higher values of the B/A ratio within AX53BG and AX73BG films. The significant difference in behavior of AX33BG compared to the other composite films at RH = 75%, clearly argues for stronger interactions between AXs and BGs in composite films. The significant lower values of M₂ and higher values of B/A for AX53BG and AX73BG films compared to AX33BG composite film and pure AX and BG films at RH = 75% indicate that the hydrogen bonds between polymers in composite films are weaker, may be in relation with the phase separation.

Links between the cell wall composition and the properties of composite films

Wheat grain cell walls are essentially formed of AXs and BGs, but the proportion of the two polymers varies depending on the cell type. In addition the AX structure varies from one cell type to another: aleurone cell walls are characterised by a low A/X ratio in the range 0.3-0.4, while it attains 0.5 - 0.6 in the starchy endosperm cell walls and 0.7 in the transfer cells 7 . These cells located at the ventral region of the grain are involved in nutrient transfer from the maternal tissues to the developing endosperm. In this work, the AXs/BGs blend ratio was choosen at 60/40 (v/v) to correspond with the AXs/BGs ratio in the aleurone cell walls but was also close to the average AXs/BGs ratio (65/35) of wheat grain. $^{27, 43}$

Previous results of Ying et al. (2011)²⁴ indicated that in monomolecular AX films, highly substituted arabinoxylans displayed a lower entanglement, larger distances between the polysaccharide chains and a higher water diffusivity compared with lowly substituted arabinoxylans. In BG films, stronger dipolar interactions were measured between protons of BG due to shorter proton average distances between polysaccharide chains compared to the highly substituted AX. BG chains were supposed to assembly within a compact structure with smaller nanopores than in AX films, inducing slower water mobility and kinetic of exchange. ²¹ In this study we show that in composite films, interactions between BGs and AXs decrease when the A/X ratio increases. Moreover, higher was the water content, stronger were the interactions between BGs and AX33, the lowly substituted AXs. The water content in films has definitely a significant role in the organisation of AXs and BGs in films. The phase separation observed for films made with highly substituted AXs agrees with the layer formation during the polysaccharide deposit in cell walls. Moreover, the water content as well as the fine structure of AXs influences this layer formation. In the transfer cell walls composed of highly substituted AXs with an AX/BG ratio around 50/50, the interactions between AXs and BGs are supposed to be weak, that possibly impacts the microporosity of cell walls to favour the transfer of water or nutrients from the maternal tissues to the developing endosperm. As a consequence of larger micropores, the mechanical properties of transfer cell walls should be weaker. Conversely, in the aleurone cell walls characterised with lowly substituted AXs and a AXs/BGs ratio around 60/40, the interactions between AXs and BGs should be much stronger favouring stronger mechanical properties of cell walls and a lower water diffusivity as demonstrated for pure BG films by Ying et al. ²⁸

Conclusion

The interaction between AXs and BGs were investigated for composite films prepared with an AX/BG ratio of 60/40 in order to mimic the proportion known in aleurone cell walls of cereals. The high A/X ratio of AXs affects the interaction between AXs and BGs and seems to induce a phase separation of AX and BG in composite film. This fundamental result is consistent with several observations in cereal grains. While the aleurone cell walls, constituted with lowly substituted AXs, are characterized by stronger interactions between AXs and BGs which favour stronger mechanical properties of cell walls and a slower water diffusivity, the high degree of arabinose substitution in the transfer cell walls may be adapted to improve the cell wall hydration and to be characterized by a porosity compatible with the water diffusion while during desiccation cell walls should help to expulse water from cells since grain's water content decreases from 40% down to 12-14%. AXs are more substituted at the beginning of grain filling than at the later stages¹⁶. This statement agrees with our findings that interactions between the AXs and BGs are weaker at the beginning of grain filling, in favor of faster water diffusion and the grain development.

Whatever the stage of grain development, AXs are more feruloylated in the aleurone than in the transfer cell walls. ¹⁰. Thus, further studies on composite films with variation of ferulic acid content should confirm and complement these results. Moreover, as mentioned above and observed by microscopy ⁴⁴ the organisation of AXs and BGs in cell walls is more compatible with a superposition of layers. Preparation and studies of multilayer films should reinforce our approach to help our understanding of the polymer role in cell walls.

Acknowledgments

The authors are indebted to the Regional Council of Pays de la Loire for financial support. Annick PERRONNET is greatly acknowledged for helpful discussions.

Reference

1. Shah, N. H.; Paulsen, G. M., Interaction of drought and high temperature on photosynthesis and grain-filling of wheat. *Plant and Soil* **2003**, 257, (1), 219-226.

 Finnie, S. M.; Bettge, A. D.; Morris, C. F., Influence of Cultivar and Environment on Water-Soluble and Water-Insoluble Arabinoxylans in Soft Wheat. *Cereal Chemistry* 2006, 83, (6), 617-623.

3. Li, S.; Morris, C. F.; Bettge, A. D., Genotype and Environment Variation for Arabinoxylans in Hard Winter and Spring Wheats of the U.S. Pacific Northwest. *Cereal Chemistry* **2009**, 86, (1), 88-95.

4. Zhang, B.; Liu, W.; Chang, S. X.; Anyia, A. O., Water-deficit and high temperature affected water use efficiency and arabinoxylan concentration in spring wheat. *Journal of Cereal Science* **2010**, 52, (2), 263-269.

5. Singh, B. K.; Jenner, C. F., Association between concentrations of organic. Nutrients in the grain, Endosperm cell number and grain dry weight within the ear of wheat. *Australian Journal of Plant Physiology* **1982**, 9, (1), 83-95.

6. Saulnier, L.; Sado, P.-E.; Branlard, G.; Charmet, G.; Guillon, F., Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. *Journal of Cereal Science*.

The Contribution of Cereals to a Healthy Diet **2007**, 46, (3), 261-281.

7. Robert, P.; Jamme, F.; Barron, C.; Bouchet, B.; Saulnier, L.; Dumas, P.; Guillon, F., Change in wall composition of transfer and aleurone cells during wheat grain development. *Planta* 233, (2), 393-406.

8. Wood, P. J., Cereal [beta]-glucans in diet and health. *Journal of Cereal Science The Contribution of Cereals to a Healthy Diet* **2007**, 46, (3), 230-238.

9. Burton, R. A.; Fincher, G. B., (1,3;1,4)-{beta}-D-Glucans in Cell Walls of the Poaceae, Lower Plants, and Fungi: A Tale of Two Linkages. *Mol Plant* **2009**, 2, (5), 873-882.

10. Robert, P.; Jamme, F.; Barron, C.; Bouchet, B.; Saulnier, L.; Dumas, P.; Guillon, F., Change in wall composition of transfer and aleurone cells during wheat grain development. *Planta* **2011**, 233, (2), 393-406.

11. Jamme, F.; Robert, P.; Bouchet, B.; Saulnier, L.; Dumas, P.; Guillon, F., Aleurone Cell Walls of Wheat Grain: High Spatial Resolution Investigation Using Synchrotron Infrared Microspectroscopy. *Applied Spectroscopy* **2008**, 62, 895-900.

12. Toole, G. A.; Wilson, R. H.; Parker, M. L.; Wellner, N. K.; Wheeler, T. R.; Shewry, P. R.; Mills, E. N. C., The effect of environment on endosperm cell-wall development in Triticum aestivum during grain filling: an infrared spectroscopic imaging study. *Planta* **2007**, 225, (6), 1393-1403.

13. Toole, G.; Le Gall, G.; Colquhoun, I.; Nemeth, C.; Saulnier, L.; Lovegrove, A.; Pellny, T.; Wilkinson, M.; Freeman, J.; Mitchell, R.; Mills, E.; Shewry, P., Temporal and spatial changes in cell wall composition in developing grains of wheat cv. Hereward. *Planta* **2010**, 232, (3), 677-689.

14. Saulnier, L.; Robert, P.; Grintchenko, M.; Jamme, F.; Bouchet, B.; Guillon, F., Wheat endosperm cell walls: Spatial heterogeneity of polysaccharide structure and composition using micro-scale enzymatic fingerprinting and FT-IR microspectroscopy. *Journal of Cereal Science* **2009**, 50, 312-317.

15. Philippe, S.; Tranquet, O.; Utille, J. P.; Saulnier, L.; Guillon, F., Investigation of ferulate deposition in endosperm cell walls of mature and developing wheat grains by using a polyclonal antibody. *Planta* **2007**, 225, (5), 1287-1299.

16. Philippe, S.; Robert, P.; Barron, C.; Saulnier, L.; Guillon, F., Deposition of Cell Wall Polysaccharides in Wheat Endosperm during Grain Development: Fourier Transform-Infrared Microspectroscopy Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, 54, (6), 2303-2308.

17. Saulnier, L.; Robert, P.; Grintchenko, M.; Jamme, F.; Bouchet, B.; Guillon, F., Wheat endosperm cell walls: Spatial heterogeneity of polysaccharide structure and composition using micro-scale enzymatic fingerprinting and FT-IR microspectroscopy. *Journal of Cereal Science* **2009**, 50, (3), 312-317.

18. Izydorczyk, M. S.; MacGregor, A. W., Evidence of intermolecular interactions of beta-glucans and arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers* **2000**, 41, (4), 417-420.

19. Izydorczyk, M. S.; Macri, L. J.; MacGregor, A. W., Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides--II. Alkali-extractable [beta]-glucans and arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers* **1998**, 35, (3-4), 259-269.

20. Ying, R.; Barron, C.; Saulnier, L.; Rondeau-Mouro, C., Water mobility within arabinoxylan and β -glucan films studied by NMR and dynamic vapour sorption. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2011**, 91, (14), 2601-2605.

21. Ying, R.; Saulnier, L.; Rondeau-Mouro, C., Films of arabinoxylans and beta-glucans extracted from cereal grains: Molecular motions by TD-NMR. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 86, (2), 812-822.

22. Dervilly, G.; Saulnier, L.; Roger, P.; Thibault, J. F., Isolation of homogeneous fractions from wheat water-soluble arabinoxylans. Influence of the structure on their macromolecular characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 48, (2), 270-278.

23. Saulnier, L.; Crépeau, M.-J.; Lahaye, M.; Thibault, J.-F.; Garcia-Conesa, M. T.; Kroon, P. A.; Williamson, G., Isolation and structural determination of two 5,5'-diferuloyl oligosaccharides indicate that maize heteroxylans are covalently cross-linked by oxidatively coupled ferulates. *Carbohydrate Research* **1999**, 320, (1-2), 82-92.

24. Ying, R.; Barron, C.; Saulnier, L.; Rondeau-Mouro, C., Water mobility within arabinoxylan and β -glucan films studied by NMR and dynamic vapour sorption. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2011**.

25. Goodman, A. M., Optical Interference Method for Approximate Determination of Refractive-Index and Thickness of a Transparent Layer. *Applied Optics* **1978**, 17, (17), 2779-2787.

26. Abragam, A., *The principle of Nuclear Magnetism* **1961**, Clarendon Press:Oxford.

27. Lempereur, I.; Rouau, X.; Abecassis, J., Genetic and Agronomic Variation in Arabinoxylan and Ferulic Acid Contents of Durum Wheat (Triticum durumL.) Grain and Its Milling Fractions. *Journal of Cereal Science* **1997**, 25, (2), 103-110.

28. Ying, R.; Rondeau-mouro, C.; Perronnet, A.; Barron, C.; Mabille, F.; Saulnier, L., Hydration and mechanical properties of arabinoxylans and β -glucans films as models of cell walls from cereal grains **2011**.

29. Phan The, D.; Debeaufort, F.; Voilley, A.; Luu, D., Biopolymer interactions affect the functional properties of edible films based on agar, cassava starch and arabinoxylan blends. *Journal of Food Engineering* **2009**, 90, (4), 548-558.

30. Ying, R.; Saulnier, L.; Rondeau-Mouro, C., Films of arabinoxylans and [beta]-glucans extracted from cereal grains: Molecular motions by TD-NMR. *Carbohydrate Polymers* **2011**, In Press, Corrected Proof.

31. Rondeau-Mouro, C.; Ying, R.; Ruellet, J.; Saulnier, L., Structure and organization within films of arabinoxylans extracted from wheat flour as revealed by various NMR spectroscopic methods. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2011**.

32. Lim, J. C.; Park, J. K.; Song, H. Y., FTIR investigation of ion-dipole interaction in styrene ionomer poly(ethylene oxide) blends. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* **1994**, 32, (1), 29-35.

33. Xie, R.; Yang, B. X.; Jiang, B. Z., Phase-behavior in mixtures of a homopolymer and a block-copolymer .1. ftir and dsc studies. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* **1995**, 33, (1), 25-32.

34. Debeaufort, F.; Verschueren, K.; Martin-Polo, M. O.; Voilley, A., Water vapor permeability of edible barriers. In: Proceedings of the International Symposium on the Properties of Water ISOPOW. Puebla, Mexico. **1994**, 53-56.

35. Arvanitoyannis, I.; Psomiadou, E.; Nakayama, A.; Aiba, S.; Yamamoto, N., Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols, Part 3. *Food Chemistry* **1997**, 60, (4), 593-604.

36. Arvanitoyannis, I.; Nakayama, A.; Aiba, S.-i., Edible films made from hydroxypropyl starch and gelatin and plasticized by polyols and water. *Carbohydrate Polymers* **1998**, 36, (2-3), 105-119.

37. Arvanitoyannis, I.; Biliaderis, C. G., Physical properties of polyol-plasticized edible films made from sodium caseinate and soluble starch blends. *Food Chemistry* **1998**, 62, (3), 333-342.

38. Arvanitoyannis, I.; Biliaderis, C. G., Physical properties of polyol-plasticized edible blends made of methyl cellulose and soluble starch. *Carbohydrate Polymers* **1999**, 38, (1), 47-58.

39. Biliaderis, C. G.; Lazaridou, A.; Arvanitoyannis, I., Glass transition and physical properties of polyol-plasticised pullulan–starch blends at low moisture. *Carbohydrate Polymers* **1999**, 40, (1), 29-47.

40. Lazaridou, A.; Biliaderis, C. G., Thermophysical properties of chitosan, chitosanstarch and chitosan-pullulan films near the glass transition. *Carbohydrate Polymers* **2002**, 48, (2), 179-190.

41. Bourtoom, T.; Chinnan, M. S., Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. *LWT-Food Sci. Technol.* **2008**, 41, (9), 1633-1641.

42. Doublier, J. L.; Garnier, C.; Renard, D.; Sanchez, C., Protein-polysaccharide interactions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2000**, *5*, (3-4), 202-214.

43. Fincher, G. B.; Stone, B. A., Cell walls and their components in cereal grain technology. *Advances in Cereal Science and Technology* **1986**, 8, 8, 207-295.

44. Guillon, F.; Tranquet, O.; Quillien, L.; Utille, J. P.; Ortiz, J. J. O.; Saulnier, L., Generation of polyclonal and monoclonal antibodies against arabinoxylans and their use for immunocytochemical location of arabinoxylans in cell walls of endosperm of wheat. *Journal of Cereal Science* **2004**, 40, (2), 167-182.

DISCUSSION GENERALE

Afin de mieux comprendre le rôle des xylanes et des β -glucanes dans l'assemblage pariétal et l'impact de leur structure et de leurs interactions sur les propriétés physiques et physicochimiques des parois, des systèmes modèles mimant la structuration des parois ont été réalisés. Une organisation lamellaire des polymères dans les parois d'aleurone du blé ayant été observée en microscopie, des films d'AX et de BG ont été utilisés comme « modèle » de la paroi. Ces modèles se sont révélés très utiles pour mieux comprendre l'impact de la structure des polymères et de leur organisation sur les propriétés d'hydratation et mécaniques des parois. Certaines de ces propriétés peuvent être confrontées avec celles des parois du grain.

La caractérisation de films mono-moléculaires ainsi que de films composites préparés à partir d'AX à différents taux de substitution et de β -glucanes, a été réalisée à différent taux d'hydratation, et différentes températures. Quatre méthodes de caractérisation ont été utilisées:

- les isothermes de sorption et de diffusion par DVS (Diffusion Vapor Sorption) ont permis d'appréhender la répartition et l'intensité des liaisons de l'eau dans les poudres et films de polysaccharides. L'analyse gravimétrique fine à l'aide d'une microbalance en mode dynamique a permis de mesurer des cinétiques de sorption et ainsi d'évaluer des coefficients de diffusion effective de l'eau à travers les films.
- la RMN bas champ, méthode spectroscopique non invasive a mis en évidence des phénomènes d'échanges entre de l'eau associée aux fonctions hydroxyle des polysaccharides et de l'eau libre dans des pores à l'échelle des nanomètres. En parallèle, l'analyse de la mobilité des chaînes de polysaccharides a été effectuée en fonction de la température, à travers des mesures du second moment dipolaires M₂ des protons.
- la microscopie (confocale et électronique à balayage) a été utilisée pour observer la structure et l'homogénéité des films à l'échelle des microns.
- les tests en mécanique par DMTA (Analyseur Mécanique Dynamique Thermique) ont permis de différencier les films sur la base de leur extensibilité (déformation ultime) et de leur résistance (stress ultime).



Figure 30 : Impact de l'épaisseur des films sur la diffusion effective de l'eau (D_{eff}) à travers les films d'arabinoxylanes AX33, AX53 et AX73.

Un certain nombre de résultats qui n'ont pas été inclus dans les publications des chapitres I à IV sont discutés ci-après avec un rappel des principaux résultats publiés:

Les mesures de diffusion effective de l'eau à travers des films mono-moléculaires d'épaisseur variant de 20 à 70 µm indiquent que, selon la teneur en eau des films, la diffusion de l'eau peut dépendre de l'épaisseur des films (Figure 30). Les valeurs de D_{eff} augmentent avec l'épaisseur des films à haute teneur en eau (> 0.05 g/g). Par contre pour des teneurs en eau plus faibles (< 0.05 g/g), aucune dépendance à l'épaisseur des films n'a été observée. Les faibles valeurs de D_{eff} indiquent que les films d'AX et de BG sont très denses avec des mésopores qui ralentissent fortement la diffusion des molécules d'eau (< $5x10-13 \text{ m}^2\text{s}^{-1}$). Les valeurs de D_{eff} augmentent avec la teneur en eau dans les films entre 0.1 g/g et 0.15 g/g en raison du changement de cette porosité. On suppose que les mesopores fermés deviennent continus par modification de la structure des films et l'effet plastifiant de l'eau qui interagit avec les polysaccharides qui composent les films. Pour une teneur en eau comprise entre 0.1 g/g et 0.4 g/g, la diffusion D_{eff} de l'eau dans les films d'AX de haut degré de substitution est plus élevée que dans les films d'AX de bas degré de substitution et de BG. Ces résultats sont en accord avec l'idée que la diffusion de l'eau dans les parois peut varier en fonction de la nature des tissus du grain en raison de l'hétérogénéité de la répartition des AX et des BG et des rapports variables A/X dans les différents tissus du grain de blé.

Les mesures par RMN des temps de relaxation spin-spin T_2 de l'eau en fonction de la température ont mis en évidence des cinétiques d'échanges hydriques très complexes au sein des films de polysaccharides. Les résultats montrent que la préparation des échantillons (sous forme de poudre, de films hachés ou empilés en rondelles) et leur teneur en eau ont un impact très significatif sur les mesures de RMN (Ying *et al.*, 2011c). Ces travaux ont également permis de montrer que le taux de substitution des AX avait un impact important sur les propriétés d'hydratation des films. L'augmentation du taux de substitution des AX induit un écartement des chaînes d'AX entre elles, arrangement qui modifierait les phénomènes d'échanges hydriques au sein des films. Finalement les films de BG présentent une mésostructure plus compacte, ralentissant la mobilité de l'eau au sein des films.

Les mesures réalisées sur les trois films composites (AX33BG, AX53BG, AX73BG), indiquent clairement que plus les chaînes d'AX sont substituées, plus les valeurs des M_2 et les températures de transition des T_2 de l'eau sont faibles (Figure 31 et 32). Ces résultats, en accord avec les tests mécaniques, montrent que plus les AX sont substitués, plus les interactions entre les chaînes d'AX et les chaines de BG sont faibles dans les films composites. Plus la teneur en eau des films est élevée, plus le phénomène est amplifié ce qui est en lien avec la séparation de phase observée en microscopie pour les films AX73BG.



Figure 31 : T₂ (ms) de l'eau dans les films composites d'arabinoxylanes + β -glucanes, RH : Humidité relative; AX/BG = 60/40.



Figure 32. M₂ en fonction de la température pour les films composites d'arabinoxylanes + β -glucanes: Δ AX33BG, \circ AX53BG et \Box AX73BG. Symboles blancs : Humidité relative (RH) = 59%; symboles noirs : Humidité relative = 75% ; AX/BG = 60/40.

Deux méthodes de microscopie ont été utilisées pour observer la structure des films monomoléculaires et composites: la microscopie confocale de fluorescence et la microscopie électronique à balayage (MEB). Les clichés enregistrés en MEB ont permis de confirmer que les films monomoléculaires et composites d'AX et de BG ne présentent pas de macrostructure (à l'échelle des microns) permettant une diffusion de l'eau dans des macropores. Les clichés obtenus pour les films composites AX33BG et AX53BG montrent que leur surface est plate et homogène ce qui n'est pas le cas pour la surface des films composites AX73BG qui semble plus hétérogène, résultat en accord avec les observations en microscopie confocale. On observe que plus le taux de substitution de 73%, des agrégats de BG semblent s'être formés pendant le séchage des films, induisant une séparation de phase entre des zones riches en AX et d'autres en BG.

Les tests mécaniques réalisés sur les films mono-moléculaires d'AX présentant différents taux de substitutions et de BG à différents taux d'hydratation ont montré des différences significatives de propriétés mécaniques entre les films. Les films de BG présentent une extensibilité beaucoup plus élevée (déformation ultime) que les films d'AX. La résistance (stress ultime) et l'extensibilité des films d'AX diminuent avec l'augmentation du taux A/X. Les résultats indiquent que les propriétés mécaniques des films d'AX et de BG varient dans le même sens que les mobilités mesurées par RMN et sont donc modulées par les interactions entre polysaccharides et la nanostructure des films. La résistance et l'extensibilité des films d'AX de bas degré de substitution sont plus importantes que celles des films d'AX.

Les propriétés mécaniques des trois films composites ont été déterminées en DMTA. Contrairement aux films composites AX73BG, les films composites AX33BG et AX53BG présentent des propriétés mécaniques similaires de la moyenne des propriétés mécaniques calculée pour les films mono-moléculaires d'AX et de BG. Les propriétés mécaniques des films AX73BG sont très faibles en lien avec l'hétérogénéité de ces films également observés en microscopie confocale et en MEB et en accord avec les données de RMN qui montrent que les interactions entre AX73 et BG sont plus faibles.

L'ensemble de ces résultats permet de dégager un certain nombre de questionnements non seulement sur leurs interprétations en terme de propriétés des parois du grain mais aussi sur le choix des polymères étudiés et leur mode de préparation, sur le choix du modèle « film » de

polysaccharides et enfin sur la pertinence des différentes techniques de caractérisation utilisées au cours de cette thèse. L'analyse des avantages, des inconvénients et des limites de chacun de ces choix met en lumière plusieurs perspectives à envisager dans l'objectif d'aller plus loin dans la compréhension des liens entre structure/organisation des polymères et propriétés des parois de grain.

Choix des polymères

Les AX ont été extraits de la farine de blé selon le protocole mis en place par Gaud Dervilly-Pinel lors de sa thèse en 2001. Cette opération d'extraction a été optimisée et a permis d'extraire en quantité suffisante six fractions dont 4,2 g. d'AX33, 2.1 g. d'AX53 et 2.9 g. d'AX73. Sachant qu'il faut environ 50 à 100 mg de polysaccharides pour effectuer un film d'épaisseur 10 à 22 μ m (de 5cm de diamètre), environ 300 films ont pu être préparés durant cette thèse.

Trois fractions d'AX purs présentant des rapports A/X de 0,33, 0,53 et 0,73 ont été utilisées pour leur représentativité respective dans les parois cellulaires d'aleurones, les parois cellulaires de l'albumen, et les parois cellulaires des cellules de transfert (ou les parois cellulaires centrales proche du germe). En dehors du rapport A/X qui varie de 0,3 à 1 en fonction du stade de développement du grain et de la localisation des AX dans les parois cellulaires du grain, la structure fine des AX est également modulée par le taux de féruloylation (cf synthèse bibliographique). La teneur en acide férulique dans les trois fractions d'AX est très faible, entre 0,07 et 0,23%, et en l'absence d'un système d'oxydoréduction conduisant à un couplage des chaînes, ce paramètre n'a pas d'effet sur les propriétés physico-chimiques des AX. Par ailleurs, une faible quantité de protéines est détectée dans les échantillons (0,9 à 3%), L'influence de ces protéines sur les propriétés des films a été considérée comme négligeable.

Il est très difficile d'extraire des BG du grain blé en raison des faibles quantités de ce polymère présentes dans les parois. Nous avons utilisé des BG disponibles commercialement et extraits à partir de l'orge dont les parois de l'albumen sont riches en BG (2,5 -11,3%) (Izydorczyk & Dexter, 2008). La structure de ces BG est comparable à ceux que l'on trouve dans le blé. Par ailleurs les BG ont été choisis avec une masse molaire en poids M_w d'environ 283 500 g.mol⁻¹ (I = 1,5) et une viscosité intrinsèque [ŋ] proche des AX que nous avons isolé.

La RMN bas-champ

La RMN est une méthode de choix pour décrire la perméabilité des milieux de diffusion (liée à la porosité), les phénomènes d'interaction et les mécanismes de transfert de molécules. La mobilité moléculaire et la porosité d'un système peuvent être étudiées par RMN à travers des mesures de temps de relaxation et de coefficients d'auto-diffusion de l'eau ou de sondes moléculaires (de taille connue) dans le système.

Différents travaux font références à des mesures de temps de relaxation spin-spin T₂ afin d'étudier les phénomènes d'hydratation des systèmes biologiques (Hills & Remigereau, 1997; Mateus et al., 2007; Roudaut et al., 2009; Kumagai et al., 2002). Le comportement multiexponentiel des T₂ de l'eau est relié à différentes mobilités de l'eau pouvant interagir avec une phase solide, en échange avec des molécules d'eau dans divers compartiments de tailles variées (eau intracellulaire, eau extracellulaire, eau vacuolaire etc...). Dans le cas des films étudiés durant cette thèse, l'eau est supposée interagir avec les chaînes polysaccharides qui sont des molécules fortement hydroxylées. Des échanges chimiques rapides (de l'ordre de la picoseconde) ont lieu entre de l'eau dite « libre » se trouvant à la surface des films et/ou à l'intérieur des films dans des nanos ou macropores et de l'eau plus ou moins « liée ». Pour compléter ces études, nous avions envisagé de mesurer l'auto-diffusion de l'eau dans les films. Les séquences d'impulsion mises en jeu reposent sur l'application de gradients de champ statique B₀. L'exploitation de leurs résultats aurait apporté une information de première importance sur la vitesse et le type de déplacements observés, sur le mécanisme de pénétration ou de relargage de l'eau (dans notre cas) et sur la géométrie du matériau (film de polysaccharides de plusieurs microns d'épaisseur). Malheureusement les teneurs en eau des films étaient relativement faibles pour des mesures de diffusion à bas champ. De plus l'intensité des gradients nécessaires pour observer les déplacements de l'eau dans les films était trop faible sur le spectromètre bas champ (200 ou 400 G/cm). Des mesures ont été tentées sur le spectromètre de RMN 400 MHz équipé d'une sonde de diffusion dédiée (DIFF30L) avec une intensité de gradients de champ un axe (selon B₀) maximum de 1200 G/cm. Malgré la faible intensité du signal de l'eau, des coefficients de diffusion de l'eau ont été mesurés sur des échantillons de films empilés. Les résultats ont indiqué une atténuation du signal de l'eau non linéaire en fonction du délai de diffusion appliqué durant la séquence de RMN (paramètre Δ). Or ces films étaient caractérisés par une épaisseur correspondant à l'échelle de mesure du phénomène. Il est donc fort probable que les coefficients mesurés correspondaient à une moyenne de plusieurs phénomènes de diffusion anisotrope. Etant données la durée des expériences (faible rapport signal/bruit), la forme des échantillons (qui requérait des mesures à l'aide de gradients multi-axe) et la difficulté d'interprétation, ces études ont été abandonnées aux profits de mesures par DVS, plus faciles à mettre en œuvre.

Les méthodes de microscopie

Les travaux de la thèse présentés dans ce manuscrit mettent en avant la caractérisation des films par deux techniques principales de microscopie :

- 1. la microscopie électronique à balayage qui permet d'observer des échantillons entre quelques nanomètres à plusieurs centaines de nanomètres.
- et la microscopie confocale à balayage laser, nécessitant la présence dans le matériau de molécules fluorescentes et permettant d'observer les échantillons de quelques dizaines de microns à quelques dizaines de millimètres.

La microscopie à force atomique (AFM) a également été mise à profit pour caractériser les différents films en utilisant les modes topographiques ou de contraste de phase. Cette technique sert à visualiser la topographie de la surface d'un échantillon. Le principe se base sur les interactions entre l'échantillon et une pointe montée sur un microlevier. La pointe balaie (scanne) la surface à représenter, et l'on agit sur sa hauteur selon un paramètre de rétroaction. Un ordinateur enregistre cette hauteur et peut ainsi reconstituer une image de la surface. La résolution de l'appareil correspond essentiellement à la dimension du sommet de la pointe (le rayon de courbure). La résolution latérale est de l'ordre de la dizaine de nanomètres, mais la résolution verticale est par contre de l'ordre de l'angström. Cette méthode a été utilisée pour étudier la surface des films mono-moléculaires d'AX et de BG. La rugosité de la surface des films a été déterminée. Les faibles de valeurs de rugosité (RMS: ≤ 11 nm) ont montré que la surface des films d'AX et BG est très lisse (Figure 33). Les valeurs de rugosité des films d'AX33 et BG sont similaires (RMS : environ de 11 nm) et plus le degré de substitution des AX augmente plus la rugosité des films diminue. Cette observation semble indiquer que plus les interactions entre chaînes polysaccharidiques sont fortes, plus les films sont rugueux.

Comme mentionné plus haut, nous avons utilisé la microscopie électronique à balayage (MEB) disponible à l'Institut de Recherche en Génie Civil et Mécanique (UMR CNRS 6183).



Figure 33 : Clichés des films d'arabinoxylanes obtenus par AFM (Température : 20 °C ; Humidité relative : 40%).

Cette méthode permet d'observer la surface des films à une échelle plus élevée que l'AFM. Elle utilise un faisceau d'électrons balayant la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules. Ces particules sont analysées par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface. À la différence du MET, où le faisceau d'électrons à haute tension porte l'image de l'intérieur de l'échantillon, le faisceau d'électrons à basse tension du MEB peut analyser la surface des films de polysaccharides avec une très simple préparation de l'échantillon qui ne nécessite pas de marquage spécifique.

Analyse thermomécanique dynamique (DMTA)

L'analyse thermomécanique dynamique (DMTA) d'un matériau polymère a pour but l'étude de sa réponse à une sollicitation mécanique dynamique de forme sinusoïdale en fonction du temps et de la température. Les variations du module d'Young complexe (composantes de conservation et de perte) et du facteur d'amortissement permettent de déterminer les différentes transitions que subit un polymère en fonction de la température comme par exemple la transition vitreuse.

Nous avons utilisé le DMTA pour mesurer les paramètres de traction uniaxiale à la rupture des films. Ces essais consistent à appliquer une déformation (étirement) à vitesse constante et à mesurer la force résultante jusqu'à la rupture du matériau. Cette expérience a été menée dans notre cas sans variation de la température, bien que ce type d'expériences aurait été intéressante à comparer avec les résultats de DSC et de RMN.

Choix du modèle « film »

Le choix du modèle « film » a été orienté par l'observation en microscopie (MET et AFM) des parois d'aleurone qui révélait une structure lamellaire avec une distribution alternée supposée des polymères pariétaux (Guillon *et al.*, 2004). La préparation et la caractérisation des films mono-moléculaires étaient une étape nécessaire à la compréhension du système. Toutefois, la préparation de films multicouches (ou sandwich) est indispensable pour simuler une organisation lamellaire des AX et BG.

Des films multicouches ont été préparés par une méthode « sol-gel » (Figure 34) basée sur le casting (Rhim *et al.*, 2006). Dans un premier temps un film d'AX ou de BG est réalisé par casting (Température = 40 °C, Rh = 40%) puis isolé. Ensuite, une solution d'AX ou de BG est évaporée par la même méthode de casting (Température = 40°C, Rh = 40%) jusqu'à l'obtention d'un état « gel ». Le premier film est alors déposé sur le gel et l'ensemble est laissé à sécher (Température = 40°C, Rh = 40%). Après séchage, les deux couches sont collées et il suffit de répéter le mode opératoire en fonction du nombre de couches désiré.

Cette méthode est très coûteuse en temps et une trop faible quantité de films multicouches a été obtenue, c'est pourquoi aucune caractérisation n'a pu être effectuée au cours de cette thèse. La réalisation de films composites dont la préparation par casting est identique à celle des films mono-moléculaires a permis de mettre en évidence des propriétés intéressantes (séparation de phase, impact de la structure des AX...) qui pouvaient différer des films mono-moléculaires. Le choix du modèle film s'est donc avéré très utile pour comprendre les assemblages des AX et des BG mais ces travaux ne sont qu'une première étape dans le processus de compréhension. La caractérisation de films multicouches devrait apporter de nouvelles réponses à nos questions relatives aux propriétés des parois cellulaires des couches aleurone du grain.

Le deuxième point critique de ce modèle « film » concerne l'épaisseur des objets étudiés comparé à l'épaisseur des parois de la couche à aleurone estimée autour de 10 µm ou encore à celle de l'albumen amylacé entre 200 et 400 nm (Guillon et al., 2004; Philippe et al., 2006c). Sur la base d'observations microscopiques (Figure 35), on peut estimer l'épaisseur des couches lamellaires d'AX ou de BG aux alentours de 40 nm. L'épaisseur des films que nous avons fabriqué varie entre 10 et 70 µm (Figure 35), soit environ 1000 fois plus épais qu'une couche lamellaire d'AX ou de BG dans les parois mais très proche de l'épaisseur des parois de l'aleurone elles-mêmes. Comme cela a été souligné plus haut, l'obtention de films épais (plusieurs microns) est inhérente aux méthodes de caractérisation utilisées. Malgré l'écart d'échelle entre les films et les parois cellulaires, il faut souligner que toutes les études menées lors de cette thèse consistaient à comparer des films de même épaisseur et de vérifier que les propriétés mesurées à l'échelle des films pouvaient être extrapolées aux propriétés des parois. Par ailleurs, la paroi de l'albumen contient d'autres polymères que les AX et les BG, notamment des protéines structurales et d'autres polysaccharides en quantité plus faible, dont il serait intéressant d'étudier l'effet de l'incorporation sur les propriétés de films composites. Le choix et l'isolement de ces composants restent toutefois un obstacle majeur à la réalisation de ce type d'étude.



Figure 34 Schématisation du la méthode de «voie gel» pour réalisation des films multicouches



Figure 35 : (a, b) Images de microscopie du grain de blé à 350 °D (a) les cellules d'aleurone (b) Les cellules centrales (Philippe *et al.*, 2006a)(c) l'étiquetage immunofluorescence et immunomarquage de β -glucanes dans les sections transversales du grain de blé à 446 °D. Les parois cellulaires dans la région centrale de l'albumen (Philippe *et al.*, 2006c).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les parois des cellules sont des acteurs importants de la transformation des grains de céréales. Elles influencent également les propriétés technologiques et nutritionnelles des produits céréaliers. D'un point de vue biologique, les parois du grain assurent un certain nombre de fonctions comme la différentiation cellulaire, la compartimentation et la cohésion des tissus, le contrôle des échanges hydriques au sein du grain. Dans l'albumen des grains de blé, les parois sont majoritairement constituées d'arabinoxylanes et de (1-3)(1-4)- β -D-glucanes, avec des quantités mineures de cellulose, de glucomannanes et de protéines.

L'examen de la littérature et les travaux réalisés au sein de l'équipe paroi végétale de l'INRA de Nantes montrent qu'il existe des variations de la structure chimique des arabinoxylanes en fonction du stade de développement et de la localisation dans le grain. Ainsi, au début de la différentiation cellulaire, le taux de substitution des AX est plus fort dans les parois des cellules prismatiques que dans les cellules centrales, ces différences s'estompent ensuite et les AX sont moins substitués dans le grain à maturité (Thèse Sully Philippe, 2006). Les parois de l'albumen amylacé sont fines, hydrophiles et montrent des variations spatiales de composition en terme de rapport AX/BG. Les parois de la couche à aleurone sont épaisses et présentent une structure lamellaire.

Bien que les variations de la composition et de la structure chimique des parois aient été étudiées en détail, l'impact de ces variations sur les propriétés de la paroi en particulier sur les propriétés d'hydratation, propriétés importantes intervenant lors de la déshydratation/ réhydratation et la germination du grain mais aussi sur les propriétés d'usage des grains de céréales reste inconnu.

L'objectif des travaux de cette thèse était, sur la base d'analyses sur un modèle simplifié des parois cellulaires, d'apporter une base physicochimique pour interpréter des variations de structures autant tissulaires que moléculaires observées au cours du développement et de la dessication du grain de blé.

Dans ce contexte, les travaux ont consisté à explorer les propriétés d'hydratation, de porosité et mécaniques de films d'arabinoxylanes et de $(1\rightarrow 3)(1\rightarrow 4)$ - β -D-glucanes. La réalisation de films monomoléculaires puis composites devait 1) permettre de mettre en place et de développer un certain nombre de techniques de caractérisation des structures à différentes

échelles 2) mimer l'organisation lamellaire et la diversité structurale des polymères des parois de l'albumen du grain de blé.

Le choix du modèle « film » et des méthodes utilisées ont permis d'obtenir des résultats originaux sur l'impact de la structure et de la composition des polymères de la paroi. En premier lieu, nos résultats montrent que la diffusion de l'eau à travers les films mono-moléculaires varie selon la structure des polysaccharides et l'épaisseur des films (teneur en eau > 0.05 g/g). Les interactions entre les chaînes de BG sont plus fortes ce qui se traduit par une microporosité des films plus faible et ainsi une plus grande résistance à la rupture des films. Plus les chaînes d'AX sont substituées, plus les interactions entre arabinoxylanes sont faibles. On retrouve cette tendance dans les films composites constitués d'AX et de BG. Plus le taux de substitution des AX augmente moins les films composite sont homogènes et moins ils sont extensibles et résistants en lien avec une diminution des interactions entre les AXs et les BGs.

Au delà des propriétés d'hydratation et mécaniques, les films composites ont permis de mieux explorer les interactions entre les chaînes d'AX et de BG et de montrer que ces polymères n'étaient pas forcément très compatibles en solution.

Les travaux de Phan The et al (2009) sur des films composite AX-agar et films composites AX-amidon de manioc ont montré que la caractérisation des films composites dépend de la structure chimique des chaînes de polysaccharides. (Phan The *et al.*, 2009) Les travaux de Kabel et al. (2007) (Kabel *et al.*, 2007) sur des films composite AX-cellulose ont montés que plus le taux de substitution des AX augmente, plus les interactions entre les AXs et les fibres de celluloses sont faibles. La cellulose est un homopolymère linéaire constitué d'unités D-glucopyranose liés par des liaisons glycosidiques en β -(1-4), structure très proche de celle des BGs. Nos résultats sont donc en accord avec les travaux de Kabel et al. (Kabel *et al.*, 2007).

Ces travaux démontrent l'impact significatif du degré de substitution des AX sur les propriétés d'hydratation des films et sont à mettre en regard avec les événements qui caractérisent le développement du grain en matière d'état hydrique et d'évolution de la structure des polymères dans les parois.



Figure 36: Croissance du grain chez le blé d'après Himi et al. (Himi et al., 2002).

Dans les parois cellulaires des cellules de transfert, les AX sont hautement substitués. On peut donc s'attendre à de faibles interactions entre ces AXs et les BG ce qui devrait impacter la microporosité de ces parois et favoriser le transfert de l'eau et des nutriments dans les tissus maternels jusqu'à l'endosperme au cours du développement du grain. Inversement, dans les parois cellulaires d'aleurone caractérisée par des AXs faiblement substitués par l'arabinose, les interactions entre les AXs et les BGs semblent être beaucoup plus fortes. Ainsi les propriétés mécaniques des parois cellulaires d'aleurone seraient améliorées et réduiraient la diffusion de l'eau à travers le tissu.

La figure 36, tirée des travaux de Himi et al. (2002), montre les variations de la teneur en eau du grain au cours de son développement. Le conditionnement des films à une humidité relative de 91% correspond à la teneur en eau du grain en début de croissance. L'humidité relative de 75%, correspond à la teneur en eau du grain en cours de la dessication et pour unehumidité relative de 59% le grain est en fin de dessication et contient autour de 15% d'eau. Les conditions de mesure des propriétés des films correspondent à des situations physiologiques rencontrées par les parois au cours du développement du grain et les différences observées sur les films sont vraisemblablement transposables aux parois.

Des observations menées en microspectrocopie FT-IR et Raman indiquent que les AX sont plus substitués au stade 245°JAA (soit environ 15 jours après pollinisation) (Figure 12, Page 40) qu'aux stades ultérieurs (Robert et al., 2011). Le taux de substitution diminue ensuite globalement mais reste hétérogène dans le grain à maturité, certaines zones étant plus fortement substituées, par exemple les parois cellulaires des cellules de transfert (ou les parois cellulaires centrales proche du germe). Cette évolution du taux de substitution des AX est conforme à un épisode de développement ou une situation dans le grain qui nécessite un transfert de l'eau plus intense qui est alors facilité par la physicochimie des parois et des AX. Au contraire, la couche aleurone présente des parois avec une interaction plus forte entre AX et BG et une plus faible diffusion de l'eau. Au niveau de ce tissu qui reste vivant tout au long du développement du grain (contrairement à l'albumen) les transferts d'eau sont probablement contrôlés par des phénomènes actifs comme la fermeture-ouverture des plasmodesmes (qui sont nombreux dans ce tissu) que par des phénomènes de diffusion passifs à travers la paroi. Nos résultats permettent de formuler de nouvelles hypothèses sur le rôle de la substitution des AX dans l'albumen des céréales en accord avec le contexte de la dessiccation du grain. Cette hypothèse complète les explications formulées sur l'évolution de
la structure des AX. Ainsi le fort taux de substitution des AX nouvellement synthétisés favoriserait leur solubilité et leur transport par le système endomembranaire et l'élimination des résidus arabinose pourrait favoriser les interactions de type hydrogène avec les $(1\rightarrow 3, 1\rightarrow 4)$ - β -glucanes (Izydorczyk *et al.*, 2000) et renforcer l'architecture pariétale.

Parmi les facteurs structuraux des AX nous n'avons pas exploré le rôle potentiel de l'acide férulique ou plutôt de sa réticulation sur les propriétés des films d'AX et de BG. La teneur en acide férulique est beaucoup plus importante (environ 3%) dans les AX de la couche aleurone que ceux de l'albumen amylacé (0.1 à 0.2%). L'acide férulique serait impliqué par l'intermédiaire de la formation de dimères sous l'action de systèmes oxydants (comme le couple H₂O₂/peroxydase) dans le renforcement des parois quand celles-ci ont, par exemple, à résister à la déformation des cellules pendant le développement du grain de blé (Jarvis et al., 2003). Ces déhydrodimères pourraient également contribuer à la cohésion tissulaire aux interfaces aleurone-péricarpe, comme le suggère la localisation intense de l'epitope 5-O-Fer-Ara dans ces régions. (Philippe et al., 2007) Les déhydrodimères ne représentent que 12-16% des acides phénoliques des parois des cellules à aleurone (Antoine et al., 2003; Parker et al., 2005), mais peu de liaisons sont suffisantes pour créer un réseau et pour modifier de façon importante les propriétés mécaniques comme le suggère les résultats obtenus sur des gels d'AX hydro-solubles (Carvajal-Millan et al., 2005). La réalisation de films incluant la réticulation de l'acide férulique pendant le casting est facilement envisageable, par l'utilisation de peroxydases ou de laccases. Leur effet sur les propriétés de diffusion de l'eau dans les films devrait vraisemblablement être réduit mais probablement très important sur les propriétés mécaniques des films.

Il est également envisageable d'améliorer notre modèle de films soit en réalisant des films multicouches plus proches de la structuration observée au niveau de la couche à aleurone soit comme évoqué précédemment en intégrant d'autres polymères notamment des protéines structurales et d'autres polysaccharides présents en quantité plus faible dans la paroi. Le choix et l'isolement de ces composants restent toutefois un obstacle majeur à la réalisation de ce type d'étude. La confrontation de notre système modèle film composites AX/BG ou multicouches permettrait de valider expérimentalement l'approche réalisée sur film. Cette étude qui n'a pas pu être entreprise dans le cadre de cette thèse est une perspective réaliste au moins avec la couche à aleurone dont on peut obtenir des quantités importantes et très pures à

partir desquelles il est facile d'isoler du matériel pariétal. Les protocoles développés en RMN pourraient être appliqués à ce matériel et les mesures comparées à celle des films AX/BG.

Pour compléter ce travail il reste également à tenter de mieux explorer les variations de teneur en eau au sein du grain (par exemple en utilisant des techniques d'imagerie par RMN ou des pointes AFM fonctionnalisées) afin de valider la présence de gradient d'eau au sein de l'albumen et éventuellement des différences de teneur en eau entre les parois et la matrice protéo-amylacée. A plus long terme, l'utilisation de variétés présentant des AXs de structure contrastée au sein de l'albumen et cultivées dans un environnement contrôlé (température, hygrométrie) devrait permettre de mieux comprendre l'impact des parois sur les propriétés du grain et éventuellement d'orienter le développement de nouveaux cultivars sélectionnés pour leurs parois afin de répondre aux problèmes du changement climatique et de la qualité des grains.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abragam, A. (1961) The principle of Nuclear Magnetism Clarendon Press:Oxford.

- Ahluwalia, B. & Fry, S.C. (1986) Barley endosperm cell walls contain a feruloylated arabinoxylan and a non-feruloylated [beta]-glucan. Journal of Cereal Science 4(3), 287-295.
- Al-Muhtaseb, A.H., McMinn, W.A.M. & Magee, T.R.A. (2002) Moisture Sorption Isotherm Characteristics of Food Products: A Review. Food and Bioproducts Processing 80(2), 118-128.
- Andersson, R., Westerlund, E., Tilly, A.C. & Aman, P. (1993) Natural Variations in the Chemical-Composition of White Flour. Journal of Cereal Science 17(2), 183-189.
- Andersson, R., Westerlund, E. & Aman, P. (1994) Natural Variations in the Contents of Structural Elements of Water-Extractable Nonstarch Polysaccharides in White Flour. Journal of Cereal Science 19(1), 77-82.
- Andersson, A.A.M., Elfverson, C., Andersson, R., Regner, S. & Aman, P. (1999) Chemical and physical characteristics of different barley samples. Journal of the Science of Food and Agriculture 79(7), 979-986.
- Andrewartha, K.A., Phillips, D.R. & Stone, B.A. (1979) Solution Properties of Wheat-Flour Arabinoxylans and Enzymically Modified Arabinoxylans. Carbohydrate Research 77(DEC), 191-204.
- Annison, G. & Choct, M. (1991) Antinutritive Activities of Cereal Nonstarch Polysaccharides in Broiler Diets and Strategies Minimizing Their Effects. Worlds Poultry Science Journal 47(3), 232-242.
- Antoine, C., Peyron, S., Mabille, F., Lapierre, C., Bouchet, B., Abecassis, J. & Rouau, X. (2003) Individual contribution of grain outer layers and their cell wall structure to the mechanical properties of wheat bran. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(7), 2026-2033.
- Atkins , E.D.T. (1992) Three-Dimensional structure, interactions and properties of In and Xylanases, pp. 39-50. Edited by J.V.e. al. Wageningen (NL): 1992 Elsevier Science Publishers B.V.
- Austin, S.C., Wiseman, J. & Chesson, A. (1999) Influence of non-starch polysaccharides structure on the metabolisable energy of UK wheat fed to poultry. Journal of Cereal Science 29(1), 77-88.
- Bai, Y., Han, X., Wu, J., Chen, Z. & Li, L. (2004) Ecosystem stability and compensatory effects in the Inner Mongolia grassland. Nature 431(7005), 181-184.
- Bartolome, B., Faulds, C.B. & Williamson, G. (1997) Enzymic release of ferulic acid from barley spent grain. Journal of Cereal Science 25(3), 285-288.
- Bolwell, G.P. & Northcote, D.H. (1983) Arabinan synthase and xylan activities of Phaseolous vulgaris. Biochemical Journal 210, 497-507.
- Brillouet, J.-M. & Joseleau, J.-P. (1987) Investigation of the structure of a heteroxylan from the outer pericarp (beeswing bran) of wheat kernel. Carbohydrate Research 159(1), 109-126.
- Brown, R. (1932) The absorption of the solute from aqueous solutions by the grain of wheat. Annals of Botany 46, 571-582.
- Brown, R.C., Lemmon, B.E. & Olsen, O.A. (1994) Endosperm development in barley-Microtubule involvement in the morphogenetic pathway. Plant Cell 6(9), 1241-1252.
- Brown, R.C., Lemmon, B.E., Stone, B.A. & Olsen, O.A. (1997) Cell wall (1->3)- and (1->3,1->4)-beta-glucans during early grain development in rice (Oryza sativa L). Planta 202(4), 414-426.
- Brunauer, S., Emmett, P.H. & Teller, E. (1938) Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. Journal of the American Chemical Society 60(2), 309-319.

- Burton, R.A., Wilson, S.M., Hrmova, M., Harvey, A.J., Shirley, N.J., Stone, B.A., Newbigin, E.J., Bacic, A. & Fincher, G.B. (2006) Cellulose synthase-like CslF genes mediate the synthesis of cell wall (1,3;1,4)-beta-D-glucans. Science 311(5769), 1940-1942.
- Bushuk, W. (1966) Distribution of water in dough and bread. The Bakers Digest 40, 38-40.
- Carpita, N.C. & Demer, D.P. (1980) Protection of Cellulose Synthesis in Detached Cotton Fibers by Polyethylene Glycol. Plant Physiology 66(5), 911-916.
- Carvajal-Millan, E., Landillon, V., Morel, M.H., Rouau, X., Doublier, J.L. & Micard, V. (2005) Arabinoxylan gels: Impact of the feruloylation degree on their structure and properties. Biomacromolecules 6(1), 309-317.
- Chirife, J. & Iglesias, H.A. (1978) Equations for fitting water sorption isotherms of foods: Part 1 — a review. International Journal of Food Science & Technology 13(3), 159-174.
- Choct, M. & Annison, G. (1992) Antinutritive Effect of Wheat Pentosans in Broiler-Chickens - Roles of Viscosity and Gut Microflora. British Poultry Science 33(4), 821-834.
- Cleemput, G., Bleukx, W., Vanoort, M., Hessing, M. & Delcour, J.A. (1995a) Evidence for the Presence of Arabinoxylan Hydrolyzing Enzymes in European Wheat Flours. Journal of Cereal Science 22(2), 139-145.
- Cleemput, G., Vanoort, M., Hessing, M., Bergmans, M.E.F., Gruppen, H., Grobet, P.J. & Delcour, J.A. (1995b) Variation in the Degree of D-Xylose Substitution in Arabinoxylans Extracted from a European Wheat-Flour. Journal of Cereal Science 22(1), 73-84.
- Coles, G.D., Hartunian-Sowa, S.M., Jamieson, P.D., Hay, A.J., Atwell, W.A. & Fulcher, R.G. (1997) Environmentally-Induced Variation in Starch and Non-starch Polysaccharide Content in Wheat. Journal of Cereal Science 26(1), 47-54.
- Crank, J. (1975) The Mathematics of Diffusion.
- Cui, W. & Wood, P.J. (2000) Relationships between structural features, molecular weight and rheological properties of cereal beta-D-glucans.
- Cui, W., Wood, P.J., Blackwell, B. & Nikiforuk, J. (2000) Physicochemical properties and structural characterization by two-dimensional NMR spectroscopy of wheat [beta]-Dglucan--comparison with other cereal [beta]-D-glucans. Carbohydrate Polymers 41(3), 249-258.
- Darvill, J.E., McNeil, M., Darvill, A.G. & Albersheim, P. (1980) Structure of plant-cell walls.
 11. glucuronoarabinoxylan, a 2nd hemicellulose in the primary-cell walls of suspension-cultured sycamore cells Plant Physiology 66(6), 1135-1139.
- Delcour, J.A., Rouseu, N. & Vanhaesendonck, I.P. (1999) Pilot-scale isolation of waterextractable arabinoxylans from rye. Cereal Chemistry 76(1), 1-2.
- Derbyshire, W., van den Bosch, M., van Dusschoten, D., MacNaughtan, W., Farhat, I.A., Hemminga, M.A. & Mitchell, J.R. (2004) Fitting of the beat pattern observed in NMR free-induction decay signals of concentrated carbohydrate-water solutions. Journal of Magnetic Resonance 168(2), 278-283.
- Dervilly, G., Saulnier, L., Roger, P. & Thibault, J.F. (2000) Isolation of homogeneous fractions from wheat water-soluble arabinoxylans. Influence of the structure on their macromolecular characteristics. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(2), 270-278.
- Dervilly-Pinel, G., Rimsten, L., Saulnier, L., Andersson, R. & Aman, P. (2001a) Waterextractable arabinoxylan from pearled flours of wheat, barley, rye and triticale. Evidence for the presence of ferulic acid dimers and their involvement in gel formation. Journal of Cereal Science 34(2), 207-214.
- Dervilly-Pinel, G., Thibault, J.F. & Saulnier, L. (2001b) Experimental evidence for a semiflexible conformation for arabinoxylans. Carbohydrate Research 330(3), 365-372.

- Dervilly-Pinel, G., Tran, V. & Saulnier, L. (2004) Investigation of the distribution of arabinose residues on the xylan backbone of water-soluble arabinoxylans from wheat flour. Carbohydrate Polymers 55(2), 171-177.
- Dhugga, K.S. (2001) Building the wall: genes and enzyme complexes for polysaccharide synthases. Current Opinion in Plant Biology 4, 488-493.
- Ebringerova, A., Hromadkova, Z. & Heinze, T. (2005) Hemicellulose Polysaccharides I. Vol. 186, pp. 1-67. Springer Berlin / Heidelberg.
- Evers, A.D. (1970) Development of the Endosperm of Wheat. Annals of Botany 34, 547-555.
- Evers, A.D. & Reed, M. (1988) Some novel observations by scanning electron microscopy on the seed coat and nucellus of the mature wheat grain. Cereal Chemistry 65(2).
- Ewald, C.M. & Perlin, A.S. (1959) The arrangement of branching in an arabinoxylan from wheat flour. Canadian Journal of Chemistry 37 1254-1259.
- Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R. & Hubick, K.T. (1989) Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 40(1), 503-537.
- Fincher, G.B. & Stone, B.A. (1986) Cell walls and their components in cereal grain technology. Advances in Cereal Science and Technology 8, 8, 207-295.
- Fleury, M.D., Edney, M.J., Campbell, L.D. & Crow, G.H. (1997) Total, water-soluble and acid-soluble arabinoxylans in western Canadian barleys. Canadian Journal of Plant Science 77(2), 191-196.
- Forrest, I.S. & Wainwright, T. (1977) Mode of Binding of Beta-Glucans and Pentosans in Barley Endosperm Cell-Walls. Journal of the Institute of Brewing 83(5), 279-286.
- Foucat, L. (1999) Rapport AIP Grainco Agraf.
- Fry, S.C., Willis, S.C. & Paterson, A.E.J. (2000) Intraprotoplasmic and wall-localised formation of arabinoxylan- bound diferulates and larger ferulate coupling-products in maize cell-suspension cultures. Planta 211(5), 679-692.
- Fulcher, R.G., O'Brien, T.P. & Lee, J.W. (1972) Studies on the aleurone layers. I. Conventional and fluorescence microscopy of the cell wall with emphasis on phenolic carbohydrate complexes in wheat. Australian Journal of Biological Science 25, 23-34.
- Gardner, K.H. & Blackwell, J. (1974) The structure of native cellulose. Biopolymers 13, 1975-2001.
- Geslin, H. & Jonard, J. (1948) Maturation du blé et climat. Ann Nutr Aliment 2, 361-371.
- Gibeaut, D.M. & Carpita, N.C. (1991) Tracing cell wall biogenesis in intact cells and plant: selective turnover and alteration of soluble and cell wall polysaccharides in grasses. Plant Physiology *97*, 551-561.
- Gibeaut, D.M., Pauly, M., Bacic, A. & Fincher, G.B. (2005) Changes in cell wall polysaccharides in developing barley (Hordeum vulgare) coleoptiles. Planta 221(5), 729-738.
- Girhammar, U. & Nair, B.M. (1992a) Certain Physical-Properties of Water-Soluble Nonstarch Polysaccharides from Wheat, Rye, Triticale, Barley and Oats. Food Hydrocolloids 6(4), 329-343.
- Girhammar, U. & Nair, B.M. (1992b) Isolation, Separation and Characterization of Water-Soluble Nonstarch Polysaccharides from Wheat and Rye. Food Hydrocolloids 6(3), 285-299.
- Goldschmid, H.R. & Perlin, A.S. (1963) Interbranch sequences in the wheat arabinoxylan. Selective enzymolysis studies. Canadian Journal of Chemistry 41, 2272-2277.
- Goodman, A.M. (1978) Optical Interference Method for Approximate Determination of Refractive-Index and Thickness of a Transparent Layer. Applied Optics 17(17), 2779-2787.

- Greer, E.N., Hinton, J.J.C., Jones, C.R. & Kent, N.L. (1951) The occurrence of endosperm cells in wheat flour. Cereal Chemistry 28, 58-67.
- Gregory, A.C.E., Smith, C., Kerry, M.E., Wheatley, E.R. & Bolwell, G.P. (2002) Comparative subcellular immunolocation of polypeptides associated with xylan and callose synthases in French bean (Phaseolus vulgaris) during secondary wall formation. Phytochemistry 59(3), 249-259.
- Gruppen, H., Hamer, R.J. & Voragen, A.G.J. (1992a) Water-Unextractable Cell-Wall Material from Wheat-Flour .2. Fractionation of Alkali-Extracted Polymers and Comparison with Water-Extractable Arabinoxylans. Journal of Cereal Science 16(1), 53-67.
- Gruppen, H., Hoffmann, R.A., Kormelink, F.J.M., Voragen, A.G.J., Kamerling, J.P. & Vliegenthart, J.F.G. (1992b) Characterisation by 1H NMR spectroscopy of enzymically derived oligosaccharides from alkali-extractable wheat-flour arabinoxylan. Carbohydrate Research 233, 45-64.
- Gruppen, H., Kormelink, F.J.M. & Voragen, A.G.J. (1993a) Enzymic Degradation of Waterunextractable Cell Wall Material and Arabinoxylans from Wheat Flour. Journal of Cereal Science 18(2), 129-143.
- Gruppen, H., Kormelink, F.J.M. & Voragen, A.G.J. (1993b) Water-Unextractable Cell-Wall Material from Wheat-Flour .3. A Structural Model for Arabinoxylans. Journal of Cereal Science 18(2), 111-128.
- Gu, X., Raghavan, D., Douglas, J.F. & Karim, A. (2002) Hole-growth instability in the dewetting of evaporating polymer solution films. Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics 40(24), 2825-2832.
- Guilbert, S., Cuq, B. & Gontard, N. (1997) Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. Food Additives and Contaminants 14(6-7), 741-751.
- Guillon, F., Tranquet, O., Quillien, L., Utille, J.-P., Ordaz Ortiz, J.J. & Saulnier, L. (2004) Differential localization of arabinoxylans and beta-glucans in cell walls of the wheat grain endosperm. Journal of Cereal Science (submitted for publication).
- Han, F., Ullrich, S.E., Chirat, S., Menteur, S., Jestin, L., Sarrafi, A., Hayes, P.M., Jones, B.L., Blake, T.K., Wesenberg, D.M., Kleinhofs, A. & Kilian, A. (1995) Mapping of betaglucan content and beta-glucanase activity loci in barley-grain and malt. Theoretical and Applied Genetics 91(6-7), 921-927.
- Hansen, N.M.L. & Plackett, D. (2008) Sustainable films and coatings from hemicelluloses: A review. Biomacromolecules 9(6), 1493-1505.
- Hartley, R.D., Morisson, W.H., Himmelsbach, D.S. & Borneman, W.S. (1990) Crosslinking of cell wall phenolic arabinoxylans in graminaceous plants. Phytochemistry 29, 3705-3709.
- Hatfield, R.D. (1993) Cell wall polysaccharide interactions and biodegradability. In: Forage Cell Wall Structure and Digestibility. Jung H.G., Buxton D.R., Hatfield R.D., Ralph J. (eds). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison., 285-314.
- Henry, R.J. (1986) Genetic and Environmental Variation in the Pentosan and Beta- Glucan Contents of Barley, and Their Relation to Malting Quality. Journal of Cereal Science 4(3), 269-277.
- Hills, B.P. & Remigereau, B. (1997) NMR studies of changes in subcellular water compartmentation in parenchyma apple tissue during drying and freezing. International Journal of Food Science and Technology 32(1), 51-61.
- Himi, E., Mares, D.J., Yanagisawa, A. & Noda, K. (2002) Effect of grain colour gene (R) on grain dormancy and sensitivity of the embryo to abscisic acid (ABA) in wheat. Journal of Experimental Botany 53(374), 1569-1574.

- Hoffmann, R.A., Roza, M., Maat, J., Kamerling, J.P. & Vliegenthart, J.F.G. (1991) Structural Characteristics of the Cold-Water-Soluble Arabinoxylans from the White Flour of the Soft Wheat Variety Kadet. Carbohydrate Polymers 15(4), 415-430.
- Höije, A., Gröndahl, M., Tømmeraas, K. & Gatenholm, P. (2005) Isolation and characterization of physicochemical and material properties of arabinoxylans from barley husks. Carbohydrate Polymers 61(3), 266-275.
- Hoije, A., Sternemalm, E., Heikkinen, S., Tenkanen, M. & Gatenholm, P. (2008) Material properties of films from enzymatically tailored arabinoxylans. Biomacromolecules 9(7), 2042-2047.
- Hong, B.H., Rubenthaler, G.L. & Allen, R.E. (1989) Wheat pentosans cultivate variation and relationship to kernel hardness. Cereal Chemistry 66(1989), 369-373.
- Iiyama, K., Lam, T.B.T., Kasuya, N. & Stone, B.A. (1994) Rapid and Simple Determination of O-Acetyl Groups Bound to Plant-Cell Walls by Acid-Hydrolysis and H-1-Nmr Measurement. Phytochemistry 35(4), 959-961.
- Ishii, T. (1997) Structure and functions of feruloylated polysaccharides. Plant Science 127(2), 111-127.
- Izydorczyk, M., Biliaderis, C.G. & Bushuk, W. (1991) Physical-Properties of Water-Soluble Pentosans from Different Wheat-Varieties. Cereal Chemistry 68(2), 145-150.
- Izydorczyk, M.S. & Biliaderis, C.G. (1992) Influence of Structure on the Physicochemical Properties of Wheat Arabinoxylan. Carbohydrate Polymers 17(3), 237-247.
- Izydorczyk, M.S. & Biliaderis, C.G. (1994) Studies on the Structure of Wheat-Endosperm Arabinoxylans. Carbohydrate Polymers 24(1), 61-71.
- Izydorczyk, M.S. & Biliaderis, C.G. (1995) Cereal arabinoxylans: Advances in structure and physicochemical properties. Carbohydrate Polymers 28(1), 33-48.
- Izydorczyk, M.S. & MacGregor, A.W. (2000) Evidence of intermolecular interactions of betaglucans and arabinoxylans. Carbohydrate Polymers 41(4), 417-420.
- Izydorczyk, M.S., Storsley, J., Labossiere, D., MacGregor, A.W. & Rossnagel, B.G. (2000) Variation in total and soluble beta-glucan content in hulless barley: Effects of thermal, physical, and enzymic treatments. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(4), 982-989.
- Izydorczyk, M.S. & Dexter, J.E. (2008) Barley beta-glucans and arabinoxylans: molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products a review. Food Research International 41(9).
- Jarvis, M.C., Briggs, S.P.H. & Knox, J.P. (2003) Intercellular adhesion and cell separation in plants. Plant Cell and Environment 26(7), 977-989.
- Jelaca, S.L. & Hlynca, I. (1971) Water binding capacity of wheat flour crude pentosans and their relation to mixing characteristics of dough. Cereal Chemistry 48, 211-222.
- Joseleau, J.P., Comtat, J. & Ruel, K. (1992) Chemical structures of xylans and their interaction in the plant cell walls. In: Xylans and Xylanases, Visser J., Beldman G, Kusters Van Someren M.A., Voragen A.G.J. (Eds). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands., 733-737.
- Jowitt, R. (1989) A classification of foods and physical properties.
- Kabel, M.A., van den Borne, H., Vincken, J.-P., Voragen, A.G.J. & Schols, H.A. (2007) Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. Carbohydrate Polymers 69(1), 94-105.
- Kacurakova, M., Ebringerova, A., Hirsch, J. & Hromadkova, Z. (1994) Infrared Study of Arabinoxylans. Journal of the Science of Food and Agriculture 66(3), 423-427.
- Kato, T., Okamoto, T., Tokuya, T. & Takahashi, A. (1982) Solution properties and chain flexibility of pullulan in aqueus solutions. Biopolymers 21, 1623-1633.

- Kim, S.K. & Dappolonia, B.L. (1977) Effect of Pentosans on Retrogradation of Wheat-Starch Gels. Cereal Chemistry 54(1), 150-160.
- Knuckles, B.E., Yokoyama, W.H. & Chiu, M.M. (1997) Molecular characterization of barley beta-glucans by size- exclusion chromatography with multiple-angle laser light scattering and other detectors. Cereal Chemistry 74(5), 599-604.
- Kumagai, H., MacNaughtan, W., Farhat, I.A. & Mitchell, J.R. (2002) The influence of carrageenan on molecular mobility in low moisture amorphous sugars. Carbohydrate Polymers 48(4), 341-349.
- Kuroyama, H. & Tsumuraya, Y. (2001) A xylosyltransferase that synthesizes beta-(1 -> 4)- in wheat (Triticum aestivum L.) seedlings. Planta 213(2), 231-240.
- Lakowicz, J.R. (1983) Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press, New York.
- Lam, T.B.T., Iiyama, K. & Stone, B.A. (1996) Caffeic acid: O-methyltransferases and the biosynthesis of ferulic acid in primary cell walls of wheat seedlings. Phytochemistry 41(6), 1507-1510.
- Laurentin, A.M. & Douglas, E. (2003) Dietary fibre in health and disease. Nutrition Bulletin 28 (2003), 69-73.
- Lawlor, D.W. (1994) Physiological and biochemical criteria for evaluating genotypic responses to heat and related stresses.
- Lazaridou, A. & Biliaderis, C.G. (2004) Cryogelation of cereal [beta]-glucans: structure and molecular size effects. Food Hydrocolloids 18(6), 933-947.
- Lee, R.C., Burton, R.A., Hrmova, M. & Fincher, G.B. (2001) Barley arabinoxylan arabinofuranohydrolases: purification, characterization and determination of primary structures from cDNA clones. Biochemical Journal 356, 181-189.
- Lempereur, I., Rouau, X. & Abecassis, J. (1997) Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (Triticum durum L.) grain and its milling fractions. Journal of Cereal Science 25(2), 103-110.
- Levitt, M.H. (2001) Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance. Wiley, Chichester.
- Li, S., Morris, C.F. & Bettge, A.D. (2009) Genotype and Environment Variation for Arabinoxylans in Hard Winter and Spring Wheats of the U.S. Pacific Northwest. Cereal Chemistry 86(1), 88-95.
- Li, W., Cui, S.W. & Kakuda, Y. (2006) Extraction, fractionation, structural and physical characterization of wheat beta-D-glucans. Carbohydrate polymers 63(3), 408-416
- Lin, D. & Zhao, Y.Y. (2007) Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 6(3), 60-75.
- Lindblad, M.S. & Albertsson, A.C. (2005) In Polysaccharides: Structural diversity and functional Versatility; Dumitriu, S., Ed.; Marcel Dekker: New York. 491-508.
- Lindblad, M.S., Albertsson, A.C., Ranucci, E., Laus, M. & Giani, E. (2005) Biodegradable polymers from renewable sources: Rheological characterization of hemicellulose-based hydrogels. Biomacromolecules 6(2), 684-690.
- MacCleary, B.V. (1988) Solubility properties of barley beta-glucan. in: Alternative End Uses of Barley. D. H. B. Sparrow, R.C. M. Lance, and R. J. Henry, eds. Waite Agricultural Research Institute: Glen Osmond, Australia., 117.
- Macleod, L.C. & Duffus, C.M. (1988) Reduced starch content and sucrose synthase activity in developing endosperm of barley plants grown at elevated-temperatures. Australian Journal of Plant Physiology 15(3), 367-375.
- Malafaya, P.B., Silva, G.A. & Reis, R.L. (2007) Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. Advanced Drug Delivery Reviews 59(4-5), 207-233.

- Marchessault, R.H. & Liang, C.Y. (1962) The infrared spectra of crystalline polysaccharides. Journal of Polymer Science 59, 357-378.
- Marchessault , R.H. & Settineri , W.H. (1964) Some comments on the crystallography of xylan hydrate. Polymer Letters 2, 1047-1051.
- Mares, D.J. & Stone, B.A. (1973a) Studies on wheat endosperm. 2. Properties of the wall components and studies on their organization in the wall. Australian Journal of Biological Sciences 26(4), 813-830.
- Mares, D.J. & Stone, B.A. (1973b) Studies on wheat endosperm. I. Chemical composition and ultrstructure of the cell walls. Australian Journal of Biological Science 26, 793-812.
- Mariette, F., Maignan, P. & Marchal, P. (1997) NMR relaxometry: A sensor for monitoring acidification of milk. Analusis 25(1), M24-M27.
- Markwalder, H.H. & Neukom, H. (1976) Diferulic acid as a possible cross link in hemicelluloses of wheat germ. Phytochemistry 15, 836-837.
- Martinant, J.P., Cadalen, T., Billot, A., Chartier, S., Leroy, P., Bernard, M., Saulnier, L. & Branlard, G. (1998) Genetic analysis of water extractable arabinoxylans in bread wheat endosperm. Theoretical and Applied Genetics 97(7), 1069-1075.
- Martinant, J.P., Billot, A., Bouguennec, A., Charmet, G., Saulnier, L. & Branlard, G. (1999) Genetic and environmental variations in water-extractable arabinoxylans content and flour extract viscosity. Journal of Cereal Science 30(1), 45-48.
- Mateus, M.L., Champion, D., Liardon, R. & Voilley, A. (2007) Characterization of water mobility in dry and wetted roasted coffee using low-field proton nuclear magnetic resonance. Journal of Food Engineering 81(3), 572-579.
- McCann, M.C., Milioni, D., Stacey, N.J., Carpita, N.C., Hofte, H., Reiter, W.D. & Roberts, K. (2000) Molecular architecture of the plant cell wall. Abstracts of Papers of the American Chemical Society 219, U259-U259.
- Meiboom, S. & Gill, D. (1958) Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. Review of Scientific Instruments 29(8), 688-691.
- Meuser, F. & Suckow, P. (1986) Non starch polysaccharides. In: Chemistry and Physics of Baking, Vol.4, Blanshard, J.M.V., Frazier, P.J., Galliard, T. (eds), 42-61.
- Middleman, S. & Hochberg, A.K. (1993) Process Engineering Analysis in Semiconductor Device Fabrication. McGraw-Hill 313.
- Miyamoto, T. & Everson, E. (1958) Biochemical and physiological studies of wheat seed pigmentation. Agronomical Journal 50, 733-734.
- Morrison, I. & O'Brien, T. (1976) Cytokinesis in the developing wheat grain; division with and without a phragmoplast. Planta 130, 57-67.
- Mueller-Harvey, I., Hartley, R.D., Harris, P.J. & Curzon, E.H. (1986) Linkage of pcoumaroyl and feruloyl groups to cell wall polysaccharides of barley straw. Carbohydrate Research 148, 71-85.
- Nemeth, C., Freeman, J., Jones, H.D., Sparks, C., Pellny, T.K., Wilkinson, M.D., Dunwell, J., Andersson, A.A.M., Aman, P., Guillon, F., Saulnier, L., Mitchell, R.A.C. & Shewry, P.R. (2010) Down-Regulation of the CSLF6 Gene Results in Decreased (1,3;1,4)-beta-D-Glucan in Endosperm of Wheat. Plant Physiology 152(3), 1209-1218.
- Neukom, H., Providoli, L., Gremli, H. & Hui, P.A. (1967) Recent investigations on wheat flour pentosans. Cereal Chemistry 44, 238-244.
- Nilsson, M., Andersson, R., Andersson, R.E., Autio, K. & Aman, P. (2000) Heterogeneity in a water-extractable rye arabinoxylan with a low degree of disubstitution. Carbohydrate Polymers 41(4), 397-405.
- Obel, N., Porchia, A.C. & Scheller, H.V. (2003) Intracellular feruloylation of arabinoxylan in wheat: evidence for feruloyl-glucose as precursor. Planta 216(4), 620-629.

- Ordaz-Ortiz, J.J., Devaux, M.F. & Saulnier, L. (2005) Classification of wheat varieties based on structural features of arabinoxylans as revealed by endoxylanase treatment of flour and grain. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(21), 8349-8356.
- Ordaz-Ortiz, J.J. & Saulnier, L. (2005) Structural variability of arabinoxylans from wheat flour. Comparison of water-extractable and xylanase-extractable arabinoxylans. Journal of Cereal Science 42(1), 119-125.
- Papageorgiou, M., Lakhdara, N., Lazaridou, A., Biliaderis, C.G. & Izydorczyk, M.S. (2005) Water extractable (1->3,1->4)-[beta]-d-glucans from barley and oats: An intervarietal study on their structural features and rheological behaviour. Journal of Cereal Science 42(2), 213-224.
- Parker, M.L., Ng, A. & Waldron, K.W. (2005) The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (Triticum aestivum L. cv. Avalon) grains. Journal of the Science of Food and Agriculture 85(15), 2539-2547.
- Perlin, A.S. (1951) Structure of the soluble pentosans of wheat flours. Cereal Chemistry 28, 382-393.
- Petersen, K., Nielsen, P.V., Bertelsen, G., Lawther, M., Olsen, M.B., Nilsson, N.H. & Mortensen, G. (1999) Potential of biobased materials for food packaging. Trends in Food Science & Technology 10(2), 52-68.
- Phan The, D., Debeaufort, F., Voilley, A. & Luu, D. (2009) Biopolymer interactions affect the functional properties of edible films based on agar, cassava starch and arabinoxylan blends. Journal of Food Engineering 90(4), 548-558.
- Philippe, S. (2006) Mise en place des parois dans l'albumen au cours du développement du grain de blé. Thèse.
- Philippe, S., Barron, C., Robert, P., Devaux, M.F., Saulnier, L. & Guillon, F. (2006a) Characterization using Raman microspectroscopy of arabinoxylans in the walls of different cell types during the development of wheat endosperm. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(14), 5113-5119.
- Philippe, S., Robert, P., Barron, C., Saulnier, L. & Guillon, F. (2006b) Deposition of cell wall polysaccharides in wheat endosperm during grain development: Fourier transforminfrared microspectroscopy study. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(6), 2303-2308.
- Philippe, S., Saulnier, L. & Guillon, F. (2006c) Arabinoxylan and (1 -> 3),(1 -> 4)-betaglucan deposition in cell walls during wheat endosperm development. Planta 224(2), 449-461.
- Philippe, S., Tranquet, O., Utille, J.P., Saulnier, L. & Guillon, F. (2007) Investigation of ferulate deposition in endosperm cell walls of mature and developing wheat grains by using a polyclonal antibody. Planta 225(5), 1287-1299.
- Picout, D.R. & Ross-Murphy, S.B. (2002) On the chain flexibility of arabinoxylans and other beta-(l -> 4) polysaccharides. Carbohydrate Research 337(19), 1781-1784.
- Pomeranz, Y. (1982) Chemical composition of kernel structure. In "Wheat: chemistry and technology", (Y. Pomeranz eds.) American Association of Cereal Chemist, St. Paul, MN., 97-110.
- Porchia, A.C. & Scheller, H.V. (2000) Arabinoxylan biosynthesis: Identification and partial characterization of beta-1,4-xylosyltransferase from wheat. Physiologia Plantarum 110(3), 350-356.
- Porchia, A.C., Sorensen, S.O. & Scheller, H.V. (2002) Arabinoxylan biosynthesis in wheat. Characterization of arabinosyltransferase activity in Golgi membranes. Plant Physiology 130(1), 432-441.

- Pritchard, J.R., Lawrence, G.J., Larroque, O., Li, Z., Laidlaw, H.K.C., Morell, M.K. & Rahman, S. (2011) A survey of beta-glucan and arabinoxylan content in wheat. Journal of the Science of Food and Agriculture 91(7), 1298-1303.
- Provencher, S.W. (1982) CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. Computer Physics Communications 27(1982), 229-242.
- Ralph, J. & Helm, R.F. (1993) In : Forage Cell Wall Structure and Digestibility. JUNG H.G., BUXTON D.R., HATFIELD R.D., RALPH J. (eds). 201-246. ASA-CSSA-SSSA, Madison.
- Rattan, O., Izydorczyk, M.S. & Biliaderis, C.G. (1994) Structure and Rheological Behaviour of Arabinoxylans from Canadian Bread Wheat Flours. Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie 27(6), 550-555.
- Ray, I.M., Townsend, M.S. & Muncy, C.M. (1999) Heritabilities and Interrelationships of Water-Use Efficiency and Agronomic Traits in Irrigated Alfalfa. Crop Science 39(4), 1088-1092.
- Rhim, J.-W., Mohanty, K.A., Singh, S.P. & Ng, P.K.W. (2006) Preparation and Properties of Biodegradable Multilayer Films Based on Soy Protein Isolate and Poly(lactide). Industrial & Engineering Chemistry Research 45(9), 3059-3066.
- Ribka, K., Sitarski, J. & Raczynska-Bojanowska, K. (1993) Ferulic acid in rye and wheat grain and grain dietary fiber. Cereal Chemistry 70, 55-59.
- Richmond, T.A. & Somerville, C.R. (2000) The Cellulose Synthase Superfamily. Plant Physiol. 124(2), 495-498.
- Rizhsky, L., Liang, H.J. & Mittler, R. (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. Plant Physiology 130(3), 1143-1151.
- Robert, P., Jamme, F., Barron, C., Bouchet, B., Saulnier, L., Dumas, P. & Guillon, F. (2011) Change in wall composition of transfer and aleurone cells during wheat grain development. Planta 233(2), 393-406.
- Rondeau-Mouro, C., Ying, R.F., Ruellet, J. & Saulnier, L. (2011) Structure and organization within films of arabinoxylans extracted from wheat flour as revealed by various NMR spectroscopic methods Soumis dans Magnetic Resonance in Chemistry (numéro spécial : Magnetic Resonance in Food - Dealing with Complex Systems" edited by Francesco Capozzi and Peter Belton).
- Roudaut, G., Farhat, I., Poirier-Brulez, F. & Champion, D. (2009) Influence of water, temperature and sucrose on dynamics in glassy starch-based products studied by low field H-1 NMR. Carbohydrate Polymers 77(3), 489-495.
- Saulnier, L., Mestres, C., Doublier, J.L., Roger, P. & Thibault, J.F. (1993) Studies of Polysaccharides Solubilized During Alkaline Cooking of Maize Kernels. Journal of Cereal Science 17(3), 267-276.
- Saulnier, L., Peneau, N. & Thibault, J.F. (1995) Variability in Grain Extract Viscosity and Water-Soluble Arabinoxylan Content in Wheat. Journal of Cereal Science 22(3), 259-264.
- Saulnier, L., Sado, P.E., Branlard, G., Charmet, G. & Guillon, F. (2007) Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. Journal of Cereal Science 46(3), 261-281.
- Saulnier, L., Robert, P., Grintchenko, M., Jamme, F., Bouchet, B. & Guillon, F. (2009) Wheat endosperm cell walls: Spatial heterogeneity of polysaccharide structure and composition using micro-scale enzymatic fingerprinting and FT-IR microspectroscopy. Journal of Cereal Science 50(3), 312-317.

- Savin, R. & Nicolas, M. (1996) Effects of Short Periods of Drought and High Temperature on Grain Growth and Starch Accumulation of Two Malting Barley Cultivars. Functional Plant Biology 23(2), 201-210.
- Schooneveld-Bergmans, M.E.F., Beldman, G. & Voragen, A.G.J. (1999) Structural features of (glucurono)arabinoxylans extracted from wheat bran by barium hydroxide. Journal of Cereal Science 29(1), 63-75.
- Schubert, D.W. & Dunkel, T. (2003) Spin coating from a molecular point of view: its concentration regimes, influence of molar mass and distribution. Materials Research Innovations 7, 314.
- Settineri , W.H. & Marchessault , R.H. (1965) Derivation of Possible Chain Conformations for Poly-B.1,4-anhydroxylose. Journal of Polymer Science: Part C (11), 253-264.
- Shah, N.H. & Paulsen, G.M. (2003) Interaction of drought and high temperature on photosynthesis and grain-filling of wheat. Plant and Soil 257(1), 219-226.
- Singh, B.K. & Jenner, C.F. (1982) Association between concentrations of organic. Nutrients in the grain, Endosperm cell number and grain dry weight within the ear of wheat. Australian Journal of Plant Physiology 9(1), 83-95.
- Singh, B.K. & Jenner, C.F. (1984) Factors controlling endosperm cell number and grain dry weight in wheat: Effects of shading on intact plants and of variation in nutritional supply to detached, cultured ears. Australian Journal of Plant Physiology 11(3), 151-163.
- Slichter, C.P. (1990) Principles of Magnetic Resonance. Springer, New York.
- Smith, M.M. & Hartley, R.D. (1983) Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell wall polysaccharides in graminaceuos plants. . Carbohydrates Research 118, 65-80.
- Staudte, R.G., Woodward, J.R., Fincher, G.B. & Stone, B.A. (1983) Water-soluble (1->3), (1->4)-[beta]-d-glucans from barley (Hordeum vulgare) endosperm. III. Distribution of cellotriosyl and cellotetraosyl residues. Carbohydrate Polymers 3(4), 299-312.
- Steudle, E. (2001) The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant roots. Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology 52, 847-875.
- Stone, P.J. & Nicolas, M.E. (1995) A survey of the effects of high temperature during grain filing on yield and quality of 75 wheat cultivars. Australian Journal of Agricultural Research 46(3), 475-492.
- Strasburg, G.M. & Ludescher, R.D. (1995) Theory and application of fluorescence spectroscopy in food research. Trends in Food Science & Technology 6(3), 69-75.
- Surget, A. & Barron, C. (2005) Histologie du grain de blé. Industrie des céréales 145, 3-7.
- Tejinder, S. (2003) Preparation and characterization of films using barley and oat beta-glucan extracts. Cereal Chemistry 80(6), 728-731.
- Tharanathan, R.N. (2003) Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. Trends in Food Science & Technology 14(3), 71-78.
- Timmermann, E.O. (2003) Multilayer sorption parameters: BET or GAB values? Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 220(1-3), 235-260.
- Tosh, S.M., Wood, P.J., Wang, Q. & Weisz, J. (2004) Structural characteristics and rheological properties of partially hydrolyzed oat [beta]-glucan: the effects of molecular weight and hydrolysis method. Carbohydrate Polymers 55(4), 425-436.
- Triboi, E. (1990) Modelé d'élaboration du poids du grain chez le blé tendre (Triticum aestivum) em thell. Agronomie 1, 191-200.
- Tvaroska, I., Ogawa, K., Deslandes, Y. & Marchessault, R.H. (1983) Crystalline Conformation and Structure of Lichenan and Barley β-Glucan. . Canadian Journal of Chemistry 61, 1608-1616.
- Udy, D.C. (1956) The intrinsic viscosities of the water soluble components of wheat flour. Cereal Chemistry 33, 67-74.

- Udy, D.C. (1957) Interactions between proteins and polysaccharides of wheat flour. Cereal Chemistry 34, 37-46.
- Urahara, T., Tsuchiya, K., Kotake, T., Tohno-oka, T., Komae, K., Kawada, N. & Tsumuraya, Y. (2004) A beta-(14)-xylosyltransferase involved in the synthesis of arabinoxylans in developing barley endosperms. Physiol Plant 122(2), 169-180.
- Urbanowicz, B., Rayon, C. & Carpita, N.C. (2002) Biochemical mechanisms of synthesis of (1-3),(1-4) beta-d-glucan synthase: cellulose synthase with an added twist? . In D Renard, Della Valle G, Y Popineau, eds, Plant Biopolymer Science: Food and Non-Food Applications. Royal Society London, 3-12.
- Urbanowicz, B.R., Rayon, C. & Carpita, N.C. (2004) Topology of the maize mixed linkage (1 -> 3),(1 -> 4)-beta-D-glucan synthase at the Golgi membrane. Plant Physiology 134(2), 758-768.
- Van den Dries, I.J., van Dusschoten, D. & Hemminga, M.A. (1998) Mobility in Maltose -Water Glasses Studied with 1H NMR. The Journal of Physical Chemistry B 102(51), 10483-10489.
- Vietor, R.J., Angelino, S. & Voragen, A.G.J. (1992) Structural Features of Arabinoxylans from Barley and Malt Cell-Wall Material. Journal of Cereal Science 15(3), 213-222.
- Vinkx, C.J.A., Reynaert, H.R., Grobet, P.J. & Delcour, J.A. (1993) Physicochemical and Functional-Properties of Rye Nonstarch Polysaccharides .5. Variability in the Structure of Water- Soluble Arabinoxylans. Cereal Chemistry 70(3), 311-317.
- Voragen, A.G.J., Gruppen, H., Verbruggen, M.A. & Vietor, R.J. (1992) Characterization of cereal arabinoxylans. In : Xylans and xylanases, VISSER J., BELDMAN G., KUSTERS VAN SOMEREN M.A., VORAGEN A.G.J. (eds), 51-66. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Wang, Z. & Huang, B. (2004) Physiological Recovery of Kentucky Bluegrass from Simultaneous Drought and Heat Stress. Crop Science 44(5), 1729-1736.
- Watanabe, T., Ohnishi, J., Yamasaki, Y., Kaizu, S. & Koshimijima, T. (1989) Binding-site analysis of the ether linkages between lignin and hemicelluloces in lignincarbohydrate complex by DDQ-oxydation. Agriculture, Biology and Chemistry 53, 2233-2252.
- Wigley, T.M.L. & Raper, S.C.B. (2001) Interpretation of High Projections for Global-Mean Warming. Science 293(5529), 451-454.
- Wood, P.J. (2004) Relationships between solution properties of cereal beta-glucans and physiological effects a review. Trends in food science ans technology 15(6), 313-320.
- Ying, R., Barron, C., Saulnier, L. & Rondeau-Mouro, C. (2011a) Water mobility within arabinoxylan and β -glucan films studied by NMR and dynamic vapour sorption. Journal of the Science of Food and Agriculture.
- Ying, R., Saulnier, L. & Rondeau-Mouro, C. (2011b) Films of arabinoxylans and beta-glucans extracted from cereal grains: Molecular motions by TD-NMR. Carbohydrate Polymers 86(2), 812-822.
- Ying, R.F., Ruellet, J. & Rondeau-Mouro, C. (2011c) Time-domain ¹H-NMR of arabinoxylans and β -glucans films, models of a lamellar organisation in endosperm cell walls of cereal grains Dans Magnetic Resonance in Food Science An exciting future, 2011, J-P Renou, P.S. Belton, G.A. Webb eds. The Royal Society of Chemistry, Cambridge (UK). 105-113.
- York, W.S. & O'Neill, M.A. (2008) Biochemical control of xylan biosynthesis which end is up? Current Opinion in Plant Biology 11(3), 258-265.
- Yui, T., Imada, K., Shibuya, N. & Ogawa, K. (1995) Conformation of an Arabinoxylan Isolated from the Rice Endosperm Cell-Wall by X-Ray-Diffraction and a

Conformational- Analysis. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 59(6), 965-968.

Zhang, B., Liu, W., Chang, S.X. & Anyia, A.O. (2010) Water-deficit and high temperature affected water use efficiency and arabinoxylan concentration in spring wheat. Journal of Cereal Science 52(2), 263-269.

ANNEXES

(1) Time domain ¹H-NMR of arabinoxylans and β-glucans films, models of a lamellar organisation in endosperm cell walls of cereal grains

R. Ying, J. Ruellet, C. Rondeau-Mouro[#]

INRA, UR 1268 BIA, Equipe Parois Végétales Polysaccharides Pariétaux, BP 71627, F-44316 Nantes, France

[#] INRA, UR 1268 BIA, Plateforme BIBS, BP 71627, F-44316 Nantes, France

Magnetic Resonance in Food Science – The Royal Society of Chemistry, Cambridge (UK), pp: 105-113

1. INTRODUCTION

Plant cell walls are partly responsible for the variability of plant crops in their different agroindustrial food and non-food uses. Control of this variability is essential for the improvement of plant productions quality. Endosperm cell walls have important impact on the uses of cereal grains (milling, baking, human nutrition...)¹⁻². Arabinoxylans (AX) and mixed (1-3)(1-4)- β -D-glucans (BG) are the main components of the cereal grains endosperm cell walls^{1,3-4}. They constitute respectively 70 and 30% of the walls, which represents 2-4% of the dry matter in endosperm. AX are characterized by a linear backbone of xylose to which arabinose substituents are attached while BG are linear homopolymers of D-glucose linked by β -(1-4) and β -(1-3) linkages. The arabinofuranose units are essentially found as mono- or disubstitution in position O-3 or O-3 and O-2 of xylose residues^{1,5}. AX exhibit large natural variations on their structure, which mainly differ by the arabinose to xylose ratio (A/X) with values ranging from 0.31 to 1.06⁶⁻⁷. Arabinosyl residues can also be esterified on the O-5 position mainly with ferulic acid⁹⁻¹⁰. The local composition heterogeneity of endosperm cell walls has been investigated on samples recovered from fractioning processes¹¹, by direct detection of fluorescence¹², by coupling imaging and spectroscopic techniques¹³⁻¹⁵ and by immunolabelling techniques¹⁶⁻¹⁷. It was concluded that BG are present in higher proportion in cell walls of aleurone and subaleurone layers than in the starchy endosperm, which contains in its central zone, a higher content of AX. Aleurone cell walls are characterised by a low A/X ratio in the range 0.3-0.4, while it attains 0.5-0.6 in the starch endosperm walls. This chemical heterogeneity has been extensively described but little is known about the time-course and the pattern of the AX and BG deposition in cell walls during endosperm development. Various observations using different microscopy techniques (MCBL, AFM) have indicated the lamellar organisation of wheat endosperm cells walls that possibly reflects the assemblies of AX and BG¹⁷. In order to study the impact of their fine structure and interactions on cell walls properties, in particular hydration properties, we have prepared AX and BG films as models of their lamellar distribution within endosperm cell walls. The second moment M_2 and spin-spin relaxation times T_2 were measured respectively with single pulse free induction decay (FID) and Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) sequences. The objectives of this work were to study the influence of both water and temperature on mobility and hydration of AX and BG within films, in relation to their organization in cell-walls of wheat grains.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Water-extractable arabinoxylans were prepared from wheat flours according to the method of Dervilly-Pinel et al.⁷. Their purification and characterization have followed the procedures described in Dervilly-Pinel et al.⁷ and have been applied to the Barley water soluble β -glucans (medium viscosity) purchased from Megazyme.

The A/X ratio, found to be 0.33 was conforming already published results concerning the fractionation with ethanol of arabinoxylans^{7,8}. AX-0.33 contained arabinose and xylose with 0.23% (% p/p) ferulic acid. The macromolecular characteristics of each polysaccharides were determined using the methods described in Dervilly-Pinel et al.^{7,8}. AX-0.33 and BG were characterized (respectively) by a weight-average molar mass of 177 10⁻³ g/mol and 218.4 10⁻³ g/mol, a radius of gyration of 38 nm and 14 nm, a similar polydispersity index of 1.5 and an intrinsic viscosity of 295.6 and 331.2 ml/g. The characteristics for AX are similar to values obtained by other authors^{7,8}.

2.2 Film Preparation

The AX and BG solutions were cast into polystyrene Petri dishes (PS, \emptyset 5 cm). About 20 mg of arabinoxylans was used for each film (film thickness 10 μ m, \emptyset 5 cm). The films were dried in a climate room at 40 °C and 40% RH.

2.3 Sorption isotherm

The experimental water sorption isotherm of the films was determined at 20 °C using the saturated salt method. Films were equilibrated at various water activities in desiccators containing saturated salt solutions of known relative humidity RH : 11% (LiCl), 59% (NaBr)), 75% (NaCl), and 91% (BaCl₂). The sorption of water was followed gravimetrically until equilibrium was achieved (generally within 15 days).

2.4 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The glass transition temperature T_g of AX and BG films were measured by a calorimetric DSC Q100 differential scanning calorimeter (TA Instrument), previously calibrated with Indium. An amount of 20 mg of each sample with the adjusted moisture content considered in this work was first heated from -40 to 120 °C (60 °C/min) and second heated from -40 to 150 °C using an empty pan as a reference. The glass transition temperature of the specimens was determined from the midpoint of the heat capacity change observed on the second scan, at a heating rate of 3 °C/min.

2.5 NMR spectroscopy

¹H NMR measurements were performed using a low-field NMR spectrometer (The Minispec, Bruker SA, Wissembourg, France) operating at a resonance frequency of 20 MHz for ¹H (0.47T). The NMR system was equipped with a temperature control device connected to a calibrated optic fiber (Neoptix Inc., Canada) allowing a \pm 0.1 °C temperature regulation. The sample coil was 8 mm in diameter. Tubes were filled to about 10 mm in height in order to place samples in a homogeneous region of the NMR magnet, then weighed and hermetically closed. A Teflon rod was introduced and filled the dead volume of each tube to avoid water loss. Only a hole of 1.2 mm in diameter permitted to pass the optic fiber through the cap and the teflon rod to measure temperature of the sample. Thermal equilibration was ensured by allowing a 7 min-waiting time after each temperature step before the experiment was started. The dead time of the ¹H NMR probe was 11µs. Proton free induction decays (FID) were acquired using the following parameters: a 90° pulse of 3.4 µs, a dwell time of 0.5 µs between two successive data points, 160 scans of 19900 data points and a recycle delay of 2 s between each scan.

The spin-spin relaxation (T2) was measured from Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence. The delay between the 90° and 180° pulses of the CPMG sequence was 40 μ s. 160 scans were acquired with 800 data points and a recycle delay of 2 s between each scan.

2.6 Data analyses

Spin-spin relaxation data were analysed with the following model :

$$I_{CPMG}(t) = \sum_{i=i}^{i} A_i \times exp\left(-\frac{t}{T_{2i}}\right)$$
Equation 1
The surves were then fitted with two different method

The curves were then fitted with two different methods:

the discrete method Marquardt ¹⁸ and the CONTIN method¹⁹. As the results given by both methods were consistent, only the results from the Marquardt method are presented here. The second moment M2 values were determined from the analysis of the beat or oscillation observed in FID. The FID were fitted to the following equation which is a combination of a sinc function and a Gaussian broadening²⁰:

Equation 2

$$I_{FID}(t) = A \exp\left(-\frac{a^2 \cdot t^2}{2}\right) \cdot \frac{\sin bt}{bt} + B \exp\left(-\frac{t}{T_2^*}\right)$$

In this equation, the parameters A and B represent the contributions of the immobile and mobile protons, while T_2^* denotes the spin-spin relaxation time of the mobile proton fraction in presence of the magnetic field inhomogeneities. The NMR spectrum of the immobile proton fraction is assumed to be a rectangular line shape with a total width 2b, convoluted with a Gaussian line shape with a standard deviation given by parameter a.²⁰⁻²² The second moment M_2 of the broad line shape, which is a measure of the strength of the dipolar interactions, is given by²¹⁻²² :

$$M_2 = a^2 + \frac{1}{3}b^2$$
 Equation 3

3. RESULTS AND DISCUSSION

Study of the free-induction decay (FID) observed for AX and BG films indicated an oscillation (or a beat) of the NMR signal arising from residual local order within the samples (Figure 1). This short-range organisation induces between protons strong dipolar interactions, characterized by the second moment M_2 . The sinusoidal pattern observed on FID has already been depicted in glassy oligosaccharides as maltose²¹⁻²² or starch²³⁻²⁴. As the water content or temperature of samples increased, the FID beat pattern was less pronounced as a consequence of a decrease of the number and/or strength of the dipolar interactions within AX and BG films (figure 1). This phenomenon could result from (i) a reduction of the proton density (ii) an increase of the proton distances and/or (iii) an improvement of the anisotropic mobility of the polysaccharides chains which in the same time diffuse more rapidly.

The additional slow decaying component of the FID signal was attributed to the mobile protons of water whose content increased with the relative humidity (RH) of samples. Some

authors have determined that in presence of increasing amount of water, the signal of the mobile protons display a faster decaying in relation to higher water mobility 22,25 . In order to describe this process, spin-spin relaxation times T₂ of water have been measured within the samples using the CPMG sequence.



Figure 1 *FID signals of BG films at different water contents (see Table 1 for RH between 11 and 91%) measured at 20°C (continuous line) and 80°C at RH=11% (doted line).*

Sample ^a	% water content (RH) ^b	T_{TP} (°C)	T _{2TP} (ms)	Ea (kJ.mol ⁻¹)	$T_{g}(^{\circ}C)$	
AX DF	4,17 (11)	> 80	nd	40,4	> 150	
AX DF	15,24 (59)	75	7,80	38,2	82,9	
AX DF	17,58 (75)	60	8,98	33,9	58,7	
AX DF	28,31 (91)	32.5	12,05	30,8	nd	
BG DF	4,71 (11)	> 80	nd	34,9	> 150	
BG PW	16,43 (59)	70	6,01	30,2	nd	
BG MF	16.43 (59)	65	4,70	31,9	nd	
BG DF	16,43 (59)	65	3,62	29,4	101,55	
BG MF	19,40 (75)	45	4,93	19,6	nd	
BG DF	19,40 (75)	55	3,65	21,3	70,94	
BG DF	28,86 (91)	35	4,47	20,8	29,11	

^{*a*} *DF* refers to stacked discs of films, PW for powder, MF for minced films. T_{2TP} is maximum value of T_2 for the corresponding temperature T_{TP} . Ea is the energy of activation. ^{*b*} Water contents measured at 20°C.

Table 1 Values of T_{2TP} , T_{TP} , Ea and Tg for BG and AX films and for the BG powder at different water contents.

Three forms of samples containing BG have first been investigated in order to evaluate the impact of the polysaccharides organisation on T_2 and M_2 values. Then comparison between BG and AX (A/X=0.33) films has been carried out, aimed at investigating some eventual

hydration and mesostructure differences in relation to their organisation within endosperm cell walls.

3.1 Impact of the sample form on the NMR measurements

Various preparations of samples were analyzed in order to study the impact of their form on NMR measurements. Three preparations were tested: powder, minced films and discs of films stacked inside the tube. These measures were conducted on BG samples available in large quantities in the laboratory.

The second moment M_2 as a function of temperature showed very little variation between the three forms of samples. Indeed, for a 16.4% water content, the M_2 varied between 7921 10^6 .rad².s⁻² and 5139 10^6 rad².s⁻² for temperatures between -40 ° C and +80 ° C, with variations that did not exceed 400 10^6 . rad².s⁻² between the three samples (figure 2A).

By increasing the water content at 19.4%, not only the M_2 values decreased but also differences between minced films and discs of films are more pronounced.

Comparison of the proton spin-spin relaxation times T_2 for each of these samples was another manner to attest the importance of the sample preparation. Different previous works have referred to spin-spin T_2 relaxation time measures to study hydration phenomena in biological systems²⁶. In plants, the multi-exponential behavior of water has been connected to different mobilities of water that can interact with solid phases in exchange with water molecules in various compartments of various sizes (intracellular water, extracellular water, water in vacuole ...)²⁶. In the present work, the water was expected to interact with polysaccharides which are molecules strongly hydroxylated. Rapid chemical exchanges (of the order of the picoseconds) should take place between the so-called "free water" located at the surface of films and/or within the film mesopores and "bound water" according to this simplified reaction :

H-O-H...HO-P*
$$\leftrightarrow$$
 H₂**O** + **HO-P** (* polysaccharides hydrogen bond)



Figure 2 M_2 (A) and T_2 (B) as a function of temperature for vrious sample form of BG \Box powder RH=59%; + minced films RH=59%, \circ discs of films RH=59%, \blacksquare minced films RH=75%, \bullet discs of films RH=75%,

Plot of T_2 as a function of temperature indicated constant and low values (on the order of 0.1 to 0.8 ms entre -40°C and 0°C (figure 2B). The T_2 values increased from 0 °C to achieve a maximum value (T_2 on top of the peak noted T_{2TP}) at a temperature T_{TP} which varies depending on the nature, the form and hydration of samples. At higher temperatures, there is a gradual reduction of T_2 that can be explained by additional molecular diffusion process and/or averaging due to rapid motions of the polysaccharides motions (measurements under progress).

Evolutions of the T_2 values as a function of the temperature have permitted to assess the activation energy required to shift the chemical exchanges observed between the various phases of water. Between 5 ° C to 60 ° C, the $ln(T_2)$ showed a linear dependence on the inverse of temperature. This result was consistent with growing mobility of water according to the phenomenological law of Arrhenius, which traduces the dependence of the reaction rate with temperature. The Arrhenius plot of the relaxation time dependence with temperature $(ln(T_2) as a function of 1/T)$ allowed calculation of the energy of activation Ea (slope of the straight line $ln(T2)=f(1/T))^{27}$.

Table 1 gathers the estimated T_{2TP} , T_{TP} , Ea and T_g for BG and AX films and for the BG powder at different water contents.

Results of T_2 for the different sample forms of BG containing 16.4% of water, indicated a decreasing of the T_{2TP} values (from 6.01 ms to 3.62 ms for powder and discs of films, respectively) while few changes of T_{TP} and Ea values were observed. The activation energy values, close to 30 kJ/mol, whatever the form of sample, were in agreement with the activation energy for moisture diffusion values around 28 kJ/mol reported for various food

materials²⁸⁻³⁰. Further experiments are under progress in order to measure the water diffusion within AX and BG films.

The increase of the moisture in BG films (at 19.4%) has slightly increased the value of T_{2TP} but for lower temperatures T_{TP} of 10 or 20 ° C : 4,93 ms at 45 °C and 3,65 ms at 55 °C for the minced films and the discs of films respectively. Activation energies are little different between the two forms of sample at RH=75% (19.6 and 21.3 kJ/mol) but decreased compared to the 59% relative humidity, consistent with faster water diffusion.

These results indicate that more the sample is organized (if we consider discs of film being the most organized sample and powder the less organized), lower is the T_{2TP} value for temperature and almost equivalent values of Ea. Increasing moisture films, T_{2TP} varies little, but their temperature decreases 10-20 ° C consistent with the idea that the system needs less thermal energy to shift the water exchange equilibrium (between the "bound" and "free" states) toward "free" phases containing water diffusing more rapidly.

3.2 Dynamics of polysaccharides and water protons within films

Hydration properties within films are of major interest for the understanding of the state and the role of water against the mesostructure of AX and BG films. Eight different compositions and moisture films were analyzed : four samples of AX (A/X = 0.33) with a water content from 4.2 to 28.3 % and four samples of BG containing 4.7 to 28.9% of water (for RH = 11, 59, 75 and 91%).

3.2.1 The second moment $M_2 \mbox{ of } AX$ and BG films

The plot of the second moment M_2 values as a function of temperature (figure 3A) showed a linear decay except for high hydrated AX films (RH= 75 and 91%) and BG films at RH=91% that displayed a slope breakdown at temperatures close to the polysaccharide glass transition temperature T_g (Table 1). For the AX samples, M_2 values varied from de 10455 10^{-6} rad².s⁻² (-40°C) to 483 10^{-6} rad².s⁻² (+80°C) while for BG films M_2 data changed from 9945 10^{-6} rad².s⁻² (-40°C) to 2608 10^{-6} rad².s⁻² (+80°C). For low hydrated samples (RH=11 and 59 %), second moment M_2 of AX and BG are close and fluctuated within the same range as the temperature was raised. A higher moisture within films induced more pronounced discrepancies beyond 10° C with an important decreasing of the M_2 values for AX. The results indicate that for the two types of polysaccharides, seconds moments M_2 diminished as the temperature and

moisture were increased. As the proton density of the solid and mobile phases has been found unchanged against temperature (constant values of B/(A+B) from the fitting of equations2), two phenomena could explain a M₂ decreasing associated with weaker dipolar interactions : (i) an increase of the proton distances and/or (ii) an improvement of the anisotropic mobility of the polysaccharides chains which in the same time diffuse more rapidly. These two hypotheses are valuable in our case. In particular, an interproton distance gap can be explained regarding the polysaccharides structure. Compared to the smooth chains of BG, AX are branched polymers of xylose containing in the present work, 33% of arabinose substituents which are bound to xylose residues in position O-3 or O-3 and O-2^{1,5}. The sterical hindrance of the arabinose branch points can assess larger interproton distances which could enlarge as the anisotropic mobility of the polysaccharides increased with a rise of the temperature or moisture. Moreover, the interactions between the AX chains within films should be weaker than between BG chains. Indeed, the arabinose residues should interact strongly and preferentially with xylose residues than with other arabinose substituents of close AX chains. Stronger interactions between the BG chains were attested by the DSC measurements which indicated higher glass transition temperature Tg for BG films at RH between 11% and 91% (Table 1). The strong effects of the water content on the glass transition temperatures were also demonstrated for AX and BG films.



Figure 3 M_2 (A) and T_2 (B) as a function of temperature for discs of films made of AX (filled symbols and continuous line) and BG (empty symbols and doted line) $\Box RH=11\%; \Delta RH=59\%, \circ RH=75\%, \diamond RH=91\%$

3.2.2 The spin-spin relaxation times T_2 of water protons within AX and BG films

The spin-spin relaxation times T₂ for the water protons were plotted as a function of temperature in figure 3B. Net differences were observed between the maximum values of T_2 (T_{2TP}) for AX and BG. As mentioned in table 1, T_{2TP} values for AX varied from 7.80 ms to 12.05 ms while for BG the T_{2TP} did not exceed 4.47 ms (for stacked discs of films noted DF) depending on the water content of samples. For samples prepared in the same form, the activation energy data for BG films are lower than for AX (reduction of 3 to 10 KJ/mol- see table 1). By comparing results obtained for AX with BG, it seemed that the interactions between water molecules and the hydroxylated functions of polysaccharides were most important for the AX films (higher values of Ea and T_{SP}). However it should be noted that all the samples of AX are less moisturized than the BG samples (less "free" water within the AX films). Furthermore, chains of AX as well as water are more mobile within AX films (weaker M_2 and higher T_2 values, respectively). The differences between the activation energy calculated for AX films compared to BG films were therefore exclusively related to differences in contents of water. Nevertheless the discrepancies between the T_{2SP} values were significant and could be related to a better organization and/or more compact mesostructure of the BG films, resulting in a reduction of the water as well as polysaccharides dynamics. These hypotheses were consistent with higher second moment M₂ and glass transition temperature T_g values for hydrated BG films at temperatures beyond 10°C.

4. CONCLUSION

Various measurements carried out in this work permitted to emphasize some relations between water dynamics and the organisation and/or mesostructure of films (10 μ m of thickness) made of arabinoxylans and β -glucans, polysaccharides extracted from cereal endosperm cell walls. The water mobility has been found a very complex process whose interpretation would not have been possible without the study of its dependence on the temperature and the water content within polysaccharide films. Temperature dependence of the water spin-spin relaxation times T₂ has been described by Arrhenius-type relationship. This Arrhenius relation permitted to estimate activation energy values that varied with the polysaccharide type and the water content of films. Values of Ea around 30 kJ/mol were in the range of reported activation energy data for various foods and have been related to the moisture diffusion. Differences of water mobility within films made of AX compared to films of BG have to be connected with the local composition heterogeneity of cereals cell walls. The endosperm tissue contains a global ratio of AX/BG of 70/30 while other more external and hydrophobic tissues are enhanced in BG content. This observation agrees with a water mobility reduced within BG films, which display more compact mesostructures.

Analyses of the second moment M_2 allowed the investigation, within the polysaccharides films more and less hydrated, of the solid phase mobility. Monitoring of M_2 while temperature and the water content were increased, have emphasized the M_2 decreasing associated with weaker dipolar interactions within the polysaccharide phases. Linear chains of β -Glucans seemed to display a more organised and/or more compact mesostructure than AX within films. Secondly, higher temperatures as well as water contents resulted in the improvement of the anisotropic mobility of the polysaccharides chains which in the same time diffused more rapidly.

Significant impact of the sample preparation (in the form of powder, minced or stacked discs of films) and of their moisture content have been deduced from all these NMR measurements. This work will continue with the investigation of the impact of the arabinoxylans structure (A/X ratio) on the hydration properties of films made of these polysaccharides. Studies of the water dynamics in composite films containing mixture of AX and BG with varying content should permit to get a better model of the polysaccharide assemblies within cereal cell walls.

5. Acknowledgement

The authors are indebted to the Regional Council of Pays de la Loire for financial support (PhD grant). They also acknowledge Luc Saulnier (INRA Nantes) for fruitful discussions.

6. Reference

- **1** G.B. Fincher and B.A. Stone, in *Advances in Cereal Science and Technology*, Vol. VIII, ed. Y. Pomeranz, American Association of Cereal Chemists Inc., St Paul., 1986.
- 2 C.M. Courtin and J.A. Delcour, *Journal of Cereal Science*, 2002, **35**, 225.
- **3** G. Beresford and B.A. Stone, *Journal of Cereal Science*, 1983, **1**, 111.
- 4 W. Cui, P.J. Wood, B. Blackwell and J. Nikiforuk, *Carbohydr. Polym.*, 2000, 41, 249.
- 5 A.S. Perlin, Cereal Chemistry, 1951, 28, 382.
- 6 M.S. Izydorczyk and C.G. Biliaderis, Carbohydr. Polym., 1995, 28, 33.
- 7 G. Dervilly, L. Saulnier, P. Roger and J. F. Thibault, J. Agri. Food Chem., 2000, 48, 270.
- 8 G. Dervilly, J. F. Thibault and L. Saulnier, *Carbohydrate Research*, 2001, 330, 365.
- 9 M.M. Smith and R.D. Hartley, *Carbohydr. Res.*, 1983, **118**, 65.
- 10 B. Ahluwalia and S.C. Fry, Journal of Cereal Science, 1986, 4, 287.
- 11 C.F. Ciacco and B.L. d'Appolonia, Cereal Chemistry, 1982, 59, 163.
- 12 R.G. Fulcher, S.S. Miller and R. Ruan, in *Functionality of food phytochemicals*, eds. T. Johns and J.T. Romeo, Plenum, New York, 1997, p. 237.
- 13 C. Barron, M.L. Parker, E.N.C. Mills, X. Rouau and R.H. Wilson, Planta, 2005, 220, 667.
- 14 S. Philippe, P. Robert, C. Barron, L. Saulnier and F. Guillon J. Agri. Food Chem., 2006, 54, 2303.
- 15 S. Philippe, C. Barron, P. Robert, M. F. Devaux, L. Saulnier and F. Guillon, *J. Agri. Food Chem.*, 2006, 54, 5113.
- 16 F. Guillon, O. Tranquet, L. Quillien, J.P. Utille, J.J. Ordaz Ortiz and L. Saulnier *Journal* of Cereal Science, 2004, 40, 167.
- 17 S. Philippe, L. Saulnier and F. Guillon, *Planta*, 2006, 224, 449.
- 18 D. W. Marquardt, J. Soc. Ind. Appl. Math., 1963, 11, 431.
- 19 S.W. Provencher: Comput. Phys. Commun., 1982, 27, 229.
- 20 A. Abragam, in The principles of nuclear magnetism; Clarendon Press: Oxford, 1961.
- **21** W. Derbyshire, M. Van den Bosch, D. van Dusschoten, W. MacNaughtan, I.A. Farhat, M.A. Hemminga and J.R. Mitchell, *J. Magn. Reson.*, 2004, **168**, 278.
- 22 I. Van den Dries, D. Van Dusschoten and M. A. Hemminga, *Physical Chemistry B*, 1998, 102, 10483.
- 23 R. Partanen, V. Marie, W. Macnaughtan, P. Forssell and I. Farhat *Carbohydrate Polymers*, 2004, 56(2), 147.
- 24 G. Roudaut, I. Farhat, F. Poirier-Brulez and D. Champion, *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77, 489.
- 25 S. Ablett, A. H. Darke, M. J. Izzard and P. J. Lillford, in *The glassy state in foods*, eds. J. M. V. Blanshard and P. J. Lillford, Nottingham: Nottingham Press, 1993, p. 189–206.
- 26 B. P. Hills and B. Remigereau, Int. J. Food Sci. and Tech., 1997, 32, 51.
- 27 S. R. Logan, J. Chem. Educ., 1982, 59, 279.
- 28 M. Tolaba and C. Suarez, Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 1988, 21, 83.
- 29 J. Bon, S. Simal, C. Rossello and A. Mulet, Journal of Food Engineering, 1997, 34, 109.
- **30** I. Doymaz, Journal of Food Engineering, 2004, **61**, 359.

(2) Structure and organization within films of arabinoxylans extracted from wheat flour as revealed by various NMR spectroscopic methods

Corinne RONDEAU-MOURO*, Ruifeng YING, Julien RUELLET, Luc SAULNIER UR1268 Biopolymères, Interactions, Assemblages, INRA, F-44316 Nantes, France

Magnetic Resonance in Chemistry (numéro spécial : Magnetic Resonance in Food)

SHORT TITLE: ¹H and ¹³C NMR spectroscopy of arabinoxylan powders and films

Abstract

Arabinoxylans (AXs) extracted from wheat flour were characterized using three different techniques of NMR spectroscopy. Liquid-state ¹H NMR and solid-state ¹³C NMR allowed the investigation of the fine structure of three specific fractions of AXs representative of the structural heterogeneity of AX in wheat tissues. Three pure AX fractions exhibiting an arabinose/xylose ratio of 0.33, 0.53 and 0.73 were compared relative to their substitution feature but also to their assembly into thin films. Measurements of M₂, i.e. the second moment of proton dipolar interactions between the polysaccharide chains were achieved using Time-Domain (TD) ¹H NMR at different water contents and temperatures. Transitions of the M₂ values were observed at certain temperature close to the T_g values of AXs in films. Comparison of the different AX films containing various water contents pointed out stronger dipolar interactions for lowly-substituted AX. This indicated that, in films, contiguous unsubstituted xylan chains can interact together through hydrogen bonding resulting in a compact structure with small nanopores due to the lower chain motions and the shorter average distances between the lowly-substituted AX chains.

Keywords: Polysaccharides, arabinoxylan, TD-NMR, CPMAS, relaxation, dipolar second moment

Introduction

Flour is the product obtained by grinding wheat kernels that consist of three distinct parts: bran, the outer covering of the grain; germ, the embryo contained inside the kernel; and endosperm, the part of the kernel that makes white flour. Wheat flour is an excellent source of complex carbohydrates. Other than gluten flour, all types of wheat flour derive at least 80 percent of their calories from carbohydrates. Arabinoxylans (AXs) and $(1->3),(1->4)-\beta$ -glucans (BGs) are the major organic components of white flour ^[1-2]. In wheat grains, they are localised into cell walls of wheat tissues and in particular in endosperm used to make white flour.

Many studies have been focused on AXs because they are largely involved in the uses of wheat grain during different processes such as milling, baking, brewing but also in animal feeding and human nutrition ^[1, 3-4]. Arabinoxylans from endosperm are partly water-soluble and result in highly viscous aqueous solutions. This high viscosity of cereal grain water extract has a positive effect in some technological processes (bread-making) ^[1, 5] but is generally considered as a negative parameter for the use of cereal grains in animal feeding and brewing.^[6-7] Arabinoxylans have been shown to form films without any addition of plasticizers. These films exhibit low oxygen permeability and may be used as oxygen barrier materials in the food packaging industry.^[8]

In a molecular point of view, AXs are characterized by a linear backbone of xylose to which arabinose substituents are attached through O-2 and/or O-3 (Figure 1). Arabinosyl residues can also be esterified on the O-5 position mainly with ferulic acid.^[1, 9] A great heterogeneity of cell wall composition (AX ratio compared to other components) and AX structure (Arabinose/Xylose ratio and acid ferulic content) has been observed within tissues of wheat grain.^[10-15] AXs from cell walls of mature wheat endosperm are partly water extractable and exhibit large natural variations in their structure. This variability is depicted by the arabinose to xylose ratio (A/X) with typical average value of 0.5-0.6, but extreme values ranging from 0.31 up to 1.06 have been reported for water extractable AX sub-fractions.^[10, 12, 15] AXs originated from the aleurone layer are characterized by a low A/X ratio in the range 0.3-0.4. ^[16-18] Aleurone cell walls are heavily esterified (1.8%, w/w) compared to those of the starchy endosperm (0.04%, w/w) ^{[19].} Moreover, during grain development, the time course and pattern of arabinoxylans deposition in wheat endosperm vary significantly: AXs are more substituted at the beginning of grain filling than at the later stages.^[20]



Figure 1 : General molecular structure of arabinoxylans (Ara*f* : arabinofuranose, Xyl*p* : xylopyranose, FerA : ferulic acid)

Dervilly et al (2001)^[21] have shown that variations in A/X ratio do not influence the conformation or the behavior of AX in solution. However, the A/X ratio as well as the distribution of arabinose residues over the xylan backbone impacts on the extent to which the AX can be degraded, as well as other features, such as interaction with each other and/or with other cell wall components. ^[22-24]

Besides, a lamellar organisation within cells walls has been observed using microscopy techniques.^[18, 25] This organisation should reflect a possible alternating deposition and/or special assemblies of AXs and others minor polysaccharides. These variations in composition and structural features of cell wall components have possible impact on wheat flour quality and uses. Any methodological approach able to afford greater insights on the various structures and interaction of wheat polysaccharides would be useful to understand the flour properties in relation to its use for alimentary or non-alimentary applications.

In this context, powders and films of AX have been prepared and analyzed by various Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopic methods. Until now, high resolution NMR were used to resolve the fine structure of water extractable AXs. Few article concerns solid-state analyses of AXs and only one publication^[26] concerned TD-NMR studies of powders and films of a specific AX fraction. This paper compiles the three different NMR methods used by ourselves to characterize first the fine structure of polysaccharides and second to investigate their dipolar interactions into solid materials like films. The present work is of major importance in the context of technological uses and processes of AXs as the major component of white flours.

Experimental

Materials

Water-extractable arabinoxylans (AX) were prepared by graded ethanol precipitation from wheat flour water extracts, as described by Dervilly-Pinel et al (2001). ^[27] The monosaccharide composition was determined according to the method of Englyst and Cummings ^[28]: polysaccharides were hydrolyzed with 2 N sulfuric acid at 100 °C for 2 h. Individual sugars were then converted into alditol acetates and analyzed by gas-liquid chromatography. Analyses were made in duplicate and the A/X ratio was calculated from the ratio of arabinose and xylose content. Three pure AX fractions exhibiting A/X of 0.33, 0.53 and 0.73 were studied and coded respectively AX33, AX53 and AX73. The molecular characterisation of polysaccharides and preparation of films were realised as already published by Ying et al. (2011).^[26]

The films prepared as described in Ying et al $(2011)^{[26]}$ were equilibrated at various water activities in desiccators containing saturated salt solutions with known relative humidity (RH) : LiCl (11%), NaBr (59%), NaCl (75%), and BaCl₂ (91%).

Differential scanning calorimetry (DSC)

The glass transition temperature, T_g , of the AX films were measured using a DSC Q100 differential scanning calorimeter (TA Instrument) as described by Ying et al. $(2011)^{[26]}$.

NMR spectroscopy

High resolution ¹H NMR spectra were recorded on a Bruker ARX 400 spectrometer operating at a proton frequency of 400.13 MHz. Samples were dissolved in D_20 (99%) at a concentration of 5 mg/ml. The polysaccharide signals chemical shifts were determined by using the HDO peak at 4.79 ppm as an internal reference. The NMR proton experiments were realized using 128 scans, a 90° proton pulse of 10 µs and a 4 s recycling time for an acquisition of 1.28 s. The proportion of unsubstituted, mono- and disubstituted xylose residues were calculated by combining the ¹H NMR spectral data with the gaz chromatography results as outlined by Westerlund et al. (1990).^[29]

Solid-state 13C NMR experiments were performed on a Bruker AVIII-400 spectrometer operating at a 13 C frequency of 100.62 MHz and equipped with a double resonance H/X CP-MAS 4mm probe. The MAS rate was fixed at 7000 Hz and each

experiment was recorded at ambient temperature (293 ± 1 K). The cross polarization pulse sequence (CPMAS) used a 3.25 μ s 90° proton pulse, a 1.5 ms contact time at 74 kHz and a 3 s recycle delay for an acquisition time of 14.8 ms during which a dipolar decoupling of 74 KHz was applied. A typical number of 4096 scans were acquired for each spectrum. Chemical shifts were calibrated by using the peak at 176.03 ppm of glycine as an external standard.

Low-field ¹H NMR measurements were performed using a time-domain NMR spectrometer (The Minispec, Bruker SA, Wissembourg, France) operating at a resonance frequency of 20 MHz for ¹H (0.47T). The NMR system was equipped with a temperature control device connected to a calibrated optic fiber (Neoptix Inc., Canada) allowing a \pm 0.1 °C temperature regulation. The sample coil was 10 mm in diameter. Tubes were filled to about 10 mm in height in order to place samples in a homogeneous region of the NMR magnet, then weighed and hermetically closed. Thermal equilibration was performed by waiting 7 min after each temperature step before the experiment was started. The dead time of the ¹H NMR probe was 11µs. Proton free induction decays (FID) were acquired using the following parameters: a 90° pulse of 3.4 µs, a dwell time of 0.5 µs between two successive data points, 160 scans of 19900 data points and a recycle delay of 2 s between each scan.

The second moment M_2 values were determined from the analysis of the beat or oscillation observed in FID. The FID were fitted to the following equation which is a combination of a sinc function and a Gaussian broadening ^[30]:

$$I_{FID}(t) = A \exp\left(-\frac{a^2 \cdot t^2}{2}\right) \frac{\sin bt}{bt} + B \exp(-\frac{t}{T_2^*})$$
Equation 1

In this equation, the parameters A and B represent the contributions of the immobile and mobile protons, while T_2^* denotes the spin-spin relaxation time of the mobile proton fraction in presence of the magnetic field inhomogeneities. The mobile fraction (B) should display a lower limiting value of T_2^* around 1.3×10^{-6} s, which is about 2b and corresponds to an upper limit of the rotation correlation time τ_c of 5.10^{-5} s calculated using the Bloembergen-Purcell-Pound theory.^[31] The fraction called immobile (A fraction) is characterized by protons with τ_c values higher than 5 10^{-5} s.

The NMR spectrum of the immobile proton fraction is assumed to be a rectangular line shape with a total width 2*b*, convoluted with a Gaussian line shape with a standard deviation given by parameter *a*. ^[30, 32-33] The second moment M_2 of the broad line shape, which is a measure of the strength of the dipolar interactions, is given by ^[32-33]:

$$M_2 = a^2 + \frac{1}{3}b^2$$

Results and Discussion

Structural characterizations by liquid-state and solid-state NMR spectroscopy

The structure of AXs isolated and fractionated from wheat flour into three well defined populations with narrow distribution, was determined through liquid and solid-state NMR. The fractions, analyzed using chemical treatments (see Experimental section) were characterized by arabinose-to-xylose ratio varying from 33 to 73 % in agreement with the chemical heterogeneity of the unfractionated arabinoxylans from wheat grains ^[12, 34-36]. While the AX33 fraction is characteristic of AXs originating from the aleurone layer ^[16-18], higher substituted AXs (AX53 and AX73) are supposed to represent AXs from starchy endosperm tissues ^[16-18, 37-38]. Their macromolecular characteristics were similar with weight average molar masses in the range of 177-233 10³ g/mol, and intrinsic viscosities from 260 to 296 mL/g.

The fine structure of the various water-soluble AX fractions (Figure 1) was first studied by liquid-state ¹H-NMR. The signal assignment was performed using published data $^{[24, 34\cdot36, 39]}$ and permitted to calculate the relative proportion of disubstitution and monosubstitution of the xylose residues in the xylan backbone. These proportions estimated by integration of signals from anomeric protons (Figure 2) are listed in Table 1. The resonance at 5.38 ppm was unambigously assigned to the anomeric proton of the Araf bound to Xylp at O-3 position (monosubstitution). The anomeric protons of two Araf bound in position O-3 and O-2 on the same Xylp residue display signals at 5.22 and 5.28 ppm (disubstitution). No monosubstitution in O-2 position of Xylp has been observed, due to the overlapping of NMR signals with those of two Araf bound to the same Xylp.^[40] However, this kind of substitution is few observed for arabinoxylanes extracted from wheat.^[36]

The relative percentage of each form of xylose, ie unsubstituted (Xylu), monosubstituted (Xylm) on position O-3 and disubstituted on O-2 and O-3 (Xyld) has been calculated for each extracted fraction (Table 1). The structural differences between fractions supposed to show various A/X ratio, were confirmed. The majority of Araf residues were disubstituted xylose residues (29.3% of the xylan backbone as estimated by liquid ¹H NMR, while monosubstituted and unsubstituted xyloses represented 14.4% and 56.3%, respectively,

205

Equation 2

of the xylan backbone. The Xylu and Xylm ratio decreased at the benefit of the Xyld ratio while the ethanol percentage increased. The substituted / unsubstituted ratio as well as that of disubstituted / monosubstituted increased from 0.31 to 0.78 and from 0.6 to 2, respectively while the Ara/Xyl ratio was improved. The same evolution has been observed by Gruppen *et al.* $(1992)^{[36]}$ with a substituted / unsubstituted ratio varying between 0.58 to 0.90 and Xyld / Xylm ratio between 0.7 and 2.5. The splitting of signal of disubstituted xylose at 5.22 and 5.28 ppm indicated the presence of contiguous disubstituted residues as already observed by Gruppen *et al.* $(1992)^{[36]}$ and Vinck *et al.* (1993).^[41]



Figure 2 Liquid-state ¹H NMR spectra of AX powders diluted in D_2O at 20°C AX33 : AX powder with A/X=0.33, AX53 : AX powder with A/X=0.53, AX73 : AX powder with A/X=0.73
	A/X ^a (%)	Xylu ^b (%)	Xylm ^b (%)	Xyld ^b (%)	A/X ^c (%)
AX33	33	76.0	14.9	9.0	29.1
AX53	53	68.1	10.9	21.1	59.5
AX73	73	56.3	14.4	29.3	69.1
AX53f					67.3

Table 1 Distributions of substituted blocks of xylosyl residues in the three arabinoxylanpopulations determined by chemical analyses (a), by liquid-state 1H NMR spectroscopy (b)and CPMAS 13C NMR (c)

Xylu: unsubstituted xylose residues, Xylm : O-3 monosubstituted xylose residue, Xyld : O-2 and O-3 disubstituted xylose residues, AX33 : AX powder with A/X=0.33, AX53 : AX powder with A/X=0.53, AX73 : AX powder with A/X=0.73, AX53f : AX film with A/X=0.53

The relative proportion of disubstitution and monosubstitution of the xylose residues in the xylan backbone reflected a non-random process of the biosynthetic mechanisms favouring disubstitution.^[22] However, the random or non-random arrangement of substitution along the xylan chains is not clearly established. Tentative structural models support an irregular distribution of the arabinose substituents with possible blocks of contiguously unsubstituted Xylp, and their proportions and lengths vary according to the A/X ratio. ^[12-14, 42] It has been shown that for low-substituted AX (A/X ≤ 0.3), the regions of contiguous unsubstituted xylan chains potentially interact together through hydrogen bonding and can contribute to crystallization between the xylan chains.^[43] For highly substituted AX, the arabinose side-chains prevent molecular interactions and crystallization between the xylan chains.^[43] In order to tentatively describe these inter-chain interactions, solid-state NMR experiments should be carried out. First, ¹³C solid-state NMR spectroscopy was used to characterize AX powders and films based on the assignment of carbon signals with distinguishable chemical shifts associated with the glycosyl moieties and the overall AX structure. Figure 3 exhibits the CPMAS NMR spectra of the various AX fractions extracted from white flour and an AX film containing around 10% of water and prepared with the AX53 fraction. Based on already published spectra for xylan or arabinan chains ^[44-46], the upfield region around 63 ppm is assigned to C5 carbons. The more intense signals from 70 to 80 ppm are assigned to C2, C3 and C5 carbons and the downfield signals between 90 to 120 ppm are assigned to the C1 carbons. The large broadening of signals due to the anisotropic nature of the magnetic interactions observed by NMR attests the solid state of samples but also a severe signals overlapping. However, the different AX fractions exhibited various C1 and C5 patterns in relation to the different chemical shifts of arabinose and xylose moieties. The C1 and C5 of arabinose moieties resonate respectively at 108.4 ppm and 62.3 ppm while for xylose units, chemical shifts were respectively 101,7 ppm and 63.5 ppm.

(ppm)	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
Xylose	101,7	74,1	78,2	77,9	63,5
Arabinose	108,4	81,6	77,9	86,5	62,3

Table 2 : Assignment (average chemical shifts) of the glycosyl carbons of arabinoxylans

 CPMAS spectra



Figure 3 Solid-state 13 C NMR spectra (CPMAS at 7 KHz and 20°C) of AX powders and films of AX53

AX33 : AX powder with A/X=0.33, AX53 : AX powder with A/X=0.53, AX73 : AX powder with A/X=0.73, AX53f : AX film with A/X=0.53

Interesting is the signal intensity of the well separated lines of C1 carbons that can be related to the A/X ratio determined by chemical analyses (see Experimental section, Table 2) but that can also be estimated by integrating C1 signals of each moieties. The procedure used to assign and integrate carbons consisted in mathematically modeling of the spectrum as the sum of simple curves derived from Gaussian or Lorentzian functions. Each of these curves was characterized by its chemical shift, its amplitude (calculated by integration of the intensity) and the nature of the fitted function. A minimization algorithm was carried out in order to vary the different parameters of the model so as to minimize a mismatch criterion. Starting with an approximate solution, the fitting procedure consists in computing and adding an increment to try to converge to a local minimum (the algorithm used is a constraint gradient protocol.^[47-48] The decomposition of the AX53f C1 carbons is shown as an example under its CPMAS spectrum. This simple method is very useful to characterize the substitution ratio of the xylan backbone of AXs in solid state. As indicated in table 1, the A/X ratio determined by this method is very close to the ratio obtained by biochemical analyses. Comparison between the AX53 and AX53f samples, ie powder and film of AX53, indicated no differences in chemical shifts but a resolution improvement for the film (Figure 3). In addition, integration of the C1 signals pointed out a A/X ratio curiously high compared to the powder of AX53 (67,3 compared to 59,5), or to the biochemical determination. This result is consistent with NMR data measured on the powder and films of β -glucans from barley.^[26] These authors have shown weak increasing of M2 values within films compared to the powder in relation to a supposed higher organization of polysaccharides within films. Comparison of the dipolar interactions between protons of AX (M2 values) as a function of temperature and water contents of films is discussed into the next section.

Second moment \mathbf{M}_2 of proton dipolar interactions in AX films

As already shown in previous studies comparing AX73 films to BG films^[26], the freeinduction decay (FID) indicated an oscillation (or a beat) of the NMR signal arising from residual local order within the samples (Figure 4). This damped sinusoidal or beat pattern has also been depicted in glassy oligosaccharides as maltose ^[32-33], maltodextrins with different dextrose equivalent^[49] or starch.^[50-51] This short-range local order reflects strong dipolar interactions between the protons of the rigid component of films. The sinusoidal pattern became less pronounced as the water content and the temperature increased.



Figure 4 FID signals of AX33 films at different relative humidity RH measured at 20°C and 80°C (only at RH=11 %).

We interpreted this observation as a decrease of the strength of dipolar interactions in the arabinoxylan-water blends.^[26, 52] To go further into the impact of water and temperature on both the anisotropic mobility and the strength of dipolar interactions between the protons of powders and AX films, the FID signals have been fitted according to Eqs. (1) and (2). As observed on Figure 5, M₂ vary with temperature as already shown for the various carbohydrate materials in their glassy state.^[26, 32, 52-53] For the various AX samples measured at different RH, M₂ values varied from 10.3 $10^{-9} \text{ rad}^2 \text{.s}^{-2}$ (-40°C) to 0.37 $10^{-9} \text{ rad}^2 \text{.s}^{-2}$ (+80°C). For each structure of AX, second moments M₂ diminished as the temperature and moisture were increased which indicated lower proton dipolar strength due to an increase in the mobility and/or average distances of the polysaccharide protons. ^[26, 52] As explained by Ying et al. $(2011)^{[26]}$, two phenomena could explain a drop in M₂ associated with weaker dipolar interactions : (i) an increase of the proton distances and/or (ii) an improvement of the anisotropic mobility of the polysaccharides chains. These two hypotheses are valuable in our case. In particular, an interproton distance gap can be explained regarding the polysaccharides structure. AX are branched polymers of xylose containing in the present work, 33%, 53 or 73% of arabinose substituents which are bound to xylose residues in position O-3 or O-3 and O-2.^[1, 9] The sterical hindrance of the arabinose branch points can assess larger interproton distances as the arabinose level increased. These distances could enlarge as the anisotropic mobility of the polysaccharides increased with a rise of the temperature or moisture. Moreover, the interactions between the chains of AX73 within films should be weaker than between AX53 and AX33. Indeed, the arabinose residues should interact strongly and preferentially with xylose residues than with other arabinose substituents of close AX chains. These arguments are consistent with the work of Hoije et al. (2008)^[43] which showed that for low-substituted AX (A/X \leq 0.3), the regions of contiguous unsubstituted xylan chains potentially interact together through hydrogen bonding and can contribute to crystallization between the xylan chains. However, X-ray diffraction of the three films of AX have displayed amorphous structures (results not shown) which did not exclude interactions between polysaccharide chains. Finally, distances between chains are likely much greater than local covalently bonded neighbors into the residues, therefore the effects of motions would seem to be the main cause of the drop in M_2 .

At certain temperatures (referred to as T_{M2}), a consequent change in the linear slope of M_2 versus temperature was observed. A comparison of the slopes of the linear variation of M_2 versus temperature indicated changes which depend on the structure of AX.



Figure 5 Second moment M₂ as a function of temperature for films made of AX33 (\Box), AX53 (Δ) and AX73 (\circ) at RH=11%, 59%, 75% and 91% as indicated on figures.

The transition temperatures of M₂, T_{M2} as well as their glassy-rubbery transition (T_g determined by DSC) are compiled in Table 3 showing the effects of both water content and structure of AX relative to temperature. In the rubbery state, so for temperature higher than Tg, the protons of the polysaccharides (exchangeable and non-exchangeable) as well as the polysaccharide chains become very mobile which induces the melting of the hydrogen-bond network and then a significant decrease in M₂. However, in the glass state, some differences in the T_{M2} values and the transition temperatures determined by DSC were observed. For low hydrated samples (RH=11%), second moment M₂ of AX are close and fluctuated within the same range between 10.3 10^{-9} rad².s⁻² and 5.53 10^{-9} rad².s⁻² as the temperature was raised. A transition temperature of around 0 °C was observed for this low hydration state while the Tg (glass transition temperature determined by DSC, see Table 3) could not be determined for this hydration state and was assumed to be higher than 100 °C. As argued by Ying et al. $(2011)^{[26]}$ in case of $\beta\mbox{-glucans}$ films, this transition temperature at 0 $^\circ\mbox{C}$ may be due to a loosening of the intra-molecular dipolar interactions between the protons of the polysaccharides above 0 °C. For RH 57 and 75%, variations of M₂ are close but a net breakdown is observed above 50°C for RH=75%. This transition is close to the Tg values which varied from 56 to 59°C comparing the various structures of AXs (Table 3). A higher moisture within films (RH= 91%) induced more pronounced discrepancies beyond 10°C with an important decreasing of the M₂ values for the various AX. A net transition was estimated at around 60 °C for AX films prepared at RH=91%, which is close to the Tg value of 56-59 °C determined by DSC for RH 75%. An additional transition at around -5 °C was observed for AX73, which is also close to the T_g value of -6 °C determined for this film. The second transition of M₂ around 20°C determined for AX33 and AX53 films at RH 91% is difficult to argue relative to T_g, however the hypothesis of a hydration heterogeneity or a dehydration of films can be pointed out.^[26]

Figure 6 shows the ratios of the mobile (B) and immobile (A) proton fractions (determined in equation 1) as a function of temperature within films hydrated at 11 and 91%. There was no evidence of an increasing of B/A between -40°C and 0°C whatever the films at RH 11%. A slight increase is observed for positive temperatures. At RH=91%, the ratio B/A was nearly constant above 0°C up to 20°C for AX33 and AX53 films.



Figure 6 Ratio of the mobile (B) and immobile (A) proton fractions as a function of temperature for AX33 (triangles), AX53 (squares), AX73 (circles) films at RH=11% (open symbols) and 91% (filled symbols).

	RH (%)	water content (%)	Tg (℃)	T M₂(℃)
	11%	4.2%	nd	5
A Yaaf	59%	15.2%	83	nd
AV221	75%	18.3%	59	50
	91%	29.1%	7	20,60
	11%	4.2%	nd	5
AY53f	59%	14.4%	85	nd
AV221	75%	18.0%	58	40
	91%	31.7%	12	20,60
	11%	3.5%	nd	0
AY73f	59%	14.0%	82	nd
AA731	75%	17.8%	56	60
	91%	34.2%	-6	(-5);60

Table 3 Values of the glass transition temperature Tg and the transition temperature of M_2 (TM₂) for AX films at different relative humidity (RH) corresponding to different water contents.

AX33f : AX films with A/X=0.33, AX53f : AX films with A/X=0.53, AX73f : AX films with A/X=0.73

However, the B/A evolution for AX73 films hydrated at RH=91% indicated clearly an increase of B/A around -5° C while for the other films (AX33 and AX53) B/A rises at temperature around 20°C. These transition temperatures are close to the T_g of films in this hydration state (Table 3). This result shows that above T_g, the motion of the polysaccharides chains in rubbery state, was so high that it influenced the mobile/immobile proton ratio and then the decreasing of M₂.

Conclusions

This work points out the contribution of NMR spectroscopy for the characterization of the structure of arabinoxylans extracted from white flours. Using different methods of highfield and low-field NMR spectroscopy, we were able to precisely compare different fine structures of AXs and to study their behaviour within a solid material like films at various water contents. Interactions between polysaccharide chains were investigated through the measurement of the proton dipolar second moments M₂ at various temperatures in relation to the glass transition of films. The transition temperatures measured by NMR, which is sensitive to high frequency motions, correlated well with the T_g values measured by DSC. The results are consistent with stronger dipolar interactions between the protons in the lowly substituted AX films compared to the highly substituted chains of AX. AX33 chains are supposed to form a more compact structure with smaller nanopores than AX53 and AX73, due to lower motions of chains and/or the shorter average distances between the AX33 chains. The different interaction strength observed between polysaccharide protons within films made with AX of various structures are of major importance in the context of the understanding of cereal grains properties and uses. Heterogeneity of composition (AX ratio compared to other polysaccharide content) as well as various structures of AX (A/X ratio) were observed in endosperm tissues, but the impact of this compositional and structural heterogeneity on interactions with water or other components is unknown. Understanding of the impact of AX structures and organisation on their use into various technological processes such as milling, baking or brewing is also important for industrials. To complement these NMR investigations some mechanical studies of films formulated with various amount of AX exhibiting different structural features are in progress.

Acknowledgments

The authors are indebted to the Regional Council of Pays de la Loire for financial support. They also acknowledge INRA of Nantes for the access to the NMR facilities of the BIBS platform.

References

- 1. Fincher, G.B. and B.A. Stone, *Cell walls and their components in cereal grain technology*. Advances in Cereal Science and Technology, 1986. **8**: p. 8, 207-295.
- 2. Cui, W., et al., *Physicochemical properties and structural characterization by twodimensional NMR spectroscopy of wheat [beta]-D-glucan--comparison with other cereal [beta]-D-glucans.* Carbohydrate Polymers, 2000. **41**(3): p. 249-258.
- 3. Biliaderis, C.G., M.S. Izydorczyk, and O. Rattan, *Effect of arabinoxylans on breadmaking quality of wheat flours.* Food Chemistry, 1995. **53**(2): p. 165-171.
- 4. Courtin, C.M. and J.A. Delcour, *Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making*. Journal of Cereal Science, 2002. **35**(3): p. 225-243.
- Girhammar, U. and B.M. Nair, *Certain physical-properties of water-soluble nonstarch polysaccharides from wheat, rye, triticale, barley and oats.* Food Hydrocolloids, 1992. 6(4): p. 329-343.
- 6. Austin, S.C., J. Wiseman, and A. Chesson, *Influence of non-starch polysaccharides structure on the metabolisable energy of UK wheat fed to poultry.* Journal of Cereal Science, 1999. **29**(1): p. 77-88.
- 7. Choct, M. and G. Annison, *Antinutritive effect of wheat pentosans in broilerchickens—roles of viscosity and gut microflora.* British Poultry Science, 1992. **33**(4): p. 821–834.
- 8. Sternemalm, E., A. Hoije, and P. Gatenholm, *Effect of arabinose substitution on the material properties of arabinoxylan films*. Carbohydrate Research, 2008. **343**(4): p. 753-757.
- 9. Perlin, A.S., *Structure of the soluble pentosans of wheat flours*. Cereal Chemistry, 1951. **28**, p. 382-393.
- 10. Cleemput, G., et al., *Variation in the degree of D-xylose substitution in arabinoxylans extracted from a european wheat-flour.* Journal of Cereal Science, 1995. **22**(1): p. 73-84.
- 11. Dervilly, G., et al., *Isolation and characterization of high molar mass water-soluble arabinoxylans from barley and barley malt.* Carbohydrate Polymers, 2002. **47**(2): p. 143-149.
- 12. Dervilly, G., et al., *Isolation of homogeneous fractions from wheat water-soluble arabinoxylans. Influence of the structure on their macromolecular characteristics.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(2): p. 270-278.
- 13. Izydorczyk, M.S. and C.G. Biliaderis, *Studies on the structure of wheat endosperm arabinoxylans*. Carbohydrate Polymers, 1994. **24**(1): p. 61-71.
- 14. Izydorczyk, M.S. and C.G. Biliaderis, *Cereal arabinoxylans: Advances in structure and physicochemical properties.* Carbohydrate Polymers, 1995. **28**(1): p. 33-48.
- 15. Delcour, J.A., H. Van Win, and P.J. Grobet, *Distribution and structural variation of arabinoxylans in common wheat mill streams*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**: p. 271-275.

- 16. Antoine, C., et al., *Individual contribution of grain outer layers and their cell wall structure to the mechanical properties of wheat bran.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(7): p. 2026-2033.
- 17. Rhodes, D.I. and B.A. Stone, *Proteins in walls of wheat aleurone cells*. Journal of Cereal Science, 2002. **36**(1): p. 83-101.
- 18. Bacic, A. and B.A. Stone, *Chemistry and organisation of aleurone cell wall components from wheat and barley.* Australian Journal of Plant Physiology 1981. 8: p. 475–495.
- 19. Bacic, A. and B.A. Stone, *Isolation and ultrastructure of cell walls from wheat and barley*. Australian Journal of Plant Physiology, 1981. **8**: p. 453-474.
- 20. Philippe, S., L. Saulnier, and F. Guillon, Arabinoxylan and $(1 \rightarrow 3)$, $(1 \rightarrow 4)$ -betaglucan deposition in cell walls during wheat endosperm development. Planta, 2006. **224**(2): p. 449-461.
- 21. Dervilly-Pinel, G., J.F. Thibault, and L. Saulnier, *Experimental evidence for a semi-flexible conformation for arabinoxylans*. Carbohydrate Research, 2001. **330**(3): p. 365-372.
- 22. Dervilly-Pinel, G., V. Tran, and L. Saulnier, *Investigation of the distribution of arabinose residues on the xylan backbone of water-soluble arabinoxylans from wheat flour*. Carbohydrate Polymers, 2004. **55**(2): p. 171-177.
- 23. Viëtor, R.J., et al., *Substitution patterns of water-unextractable arabinoxylans from barley and malt.* . Carbohydrate Polymers, 1994. **24**(2): p. 113-118.
- 24. Kormelink, F.J.M., et al., *Mode of action of the xylan-degrading enzymes from Aspergillus awamori on alkali-extractable cereal arabinoxylans.* Carbohydrate Research, 1993. **249**(2): p. 355–367.
- 25. Guillon, F., et al., *Generation of polyclonal and monoclonal antibodies against arabinoxylans and their use for immunocytochemical location of arabinoxylans in cell walls of endosperm of wheat.* Journal of Cereal Science, 2004. **40**(2): p. 167-182.
- 26. Ying, R., J. Ruellet, and C. Rondeau-Mouro, *Time-domain 1H-NMR of arabinoxylans* and β -glucans films, models of a lamellar organisation in endosperm cell walls of cereal grains in Magnetic Resonance in Food Science – An exciting future, J.-P. Renou, P.S. Belton, and W. G.A., Editors. 2011, The Royal Society of Chemistry: Cambridge (UK).
- 27. Dervilly-Pinel, G., et al., *Water-extractable arabinoxylan from pearled flours of wheat, barley, rye and triticale. Evidence for the presence of ferulic acid dimers and their involvement in gel formation.* Journal of Cereal Science, 2001. **34**(2): p. 207-214.
- 28. Englyst, H.N. and J.H. Cummings, *Improved Method for Measurement of Dietary Fiber as Non-Starch Polysaccharides in Plant Foods*. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 1988. **71**(4): p. 808-814.
- 29. Westerlund, E., et al., *Effects of baking on water-soluble nonstarch polysaccharides in white bread fractions.* Journal of Cereal Science, 1990. **12**(1): p. 33-42.
- 30. Abragam, A., The principle of Nuclear Magnetism, 1961. Clarendon Press:Oxford.
- 31. Bloembergen, N., E.M. Purcell, and R.V. Pound, *Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption*. Phys. Rev., 1948. **73**: p. 679-712.
- 32. Derbyshire, W., et al., *Fitting of the beat pattern observed in NMR free-induction decay signals of concentrated carbohydrate-water solutions.* Journal of Magnetic Resonance, 2004. **168**(2): p. 278-283.
- 33. van den Dries, I.J., D. van Dusschoten, and M.A. Hemminga, *Mobility in Maltoseâ*[^]*Water Glasses Studied with 1H NMR*. The Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(51): p. 10483-10489.

- 34. Hoffmann, R.A., et al., *Structural Characteristics of the Cold-Water-Soluble Arabinoxylans from the White Flour of the Soft Wheat Variety Kadet.* Carbohydrate Polymers, 1991. **15**(4): p. 415-430.
- 35. Cleemput, G., et al., *Heterogeneity in the structure of water soluble arabinoxylans in European wheat flour of variable bread making quality.* Cereal Chem., 1993. **70**: p. 324-329.
- Gruppen, H., R.J. Hamer, and A.G.J. Voragen, Water-Unextractable Cell-Wall Material from Wheat-Flour .2. Fractionation of alkali-extracted polymers and comparison with water-extractable arabinoxylans. Journal of Cereal Science, 1992. 16(1): p. 53-67.
- 37. Ordaz-Ortiz, J.J., M.F. Devaux, and L. Saulnier, *Classification of wheat varieties* based on structural features of arabinoxylans as revealed by endoxylanase treatment of flour and grain. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(21): p. 8349-8356.
- 38. Philippe, S., et al., *Characterization using Raman microspectroscopy of arabinoxylans in the walls of different cell types during the development of wheat endosperm.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(14): p. 5113-5119.
- 39. Bengston, S., et al., *Content, structure and viscosity of soluble arabinoxylans in rye grain from several countries.* J. Sci. Food Agric., 1992. **58**,: p. 331-337.
- 40. Vietör, R.J., et al., *Structures of small oligmers liberated from barley arabinoxylans by endoxylanase from Aspergillus awamori*. Carbohydr. Res., 1994. **254**: p. 245-255.
- 41. Vinkx, C.J.A., et al., *Physicochemical and functional properties of rye non starch polysaccharides*. V. Variability in the structure of water soluble arabinoxylans. Cereal Chem., 1993. **70**: p. 311-317.
- 42. Saulnier, L., et al., *Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties.* Journal of Cereal Science, 2007. **46**(3): p. 261-281.
- 43. Hoije, A., et al., *Material properties of films from enzymatically tailored arabinoxylans*. Biomacromolecules, 2008. **9**(7): p. 2042-2047.
- 44. Jarvis, M.C., *Solid-state NMR of leaf cell-walls of oil Pailm*. Phytochemistry, 1994. **35**(2): p. 485-487.
- 45. Rondeau-Mouro, C., M.J. Crepeau, and M. Lahaye, *Application of CP-MAS and liquid-like solid-state NMR experiments for the study of the ripening-associated cell wall changes in tomato.* International Journal of Biological Macromolecules, 2003. **31**(4-5): p. 235-244.
- 46. Saito, H., Conformational characterization of polysaccharides as studied by highresolution solid-state NMR spectroscopy. Journal of Synthetic Organic Chemistry Japan, 1992. **50**(5): p. 488-497.
- 47. Massiot, D., et al., *Modelling one- and two-dimensional solid-state NMR spectra*. Magnetic Resonance in Chemistry, 2002. **40**(1): p. 70-76.
- 48. Press, W.H., et al., *Numerical Recipes in C.*, ed. C.U. Press. 1997, Cambridge
- 49. Grattard, N., et al., *Influence of physical state and molecular mobility of freeze-dried maltodextrin matrices on the oxidation rate of encapsulated lipids*. Journal of Food Science, 2002. **67**(8): p. 3002-3010.
- 50. Partanen, R., et al., *H-1 NMR study of amylose films plasticised by glycerol and water*. Carbohydrate Polymers, 2004. **56**(2): p. 147-155.
- 51. Roudaut, G., et al., *Influence of water, temperature and sucrose on dynamics in glassy starch-based products studied by low field H-1 NMR*. Carbohydrate Polymers, 2009. **77**(3): p. 489-495.

- 52. van den Dries, I.J., et al., *Effects of water content and molecular weight on spin probe and water mobility in malto-oligomer glasses.* Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(44): p. 10126-10132.
- 53. Kumagai, H., et al., *The influence of carrageenan on molecular mobility in low moisture amorphous sugars*. Carbohydrate Polymers, 2002. **48**(4): p. 341-349.

RESUMES

Rôle des arabinoxylanes et des β-glucanes dans l'assemblage et les propriétés des parois de l'albumen des grains des cécéales

Les arabinoxylanes (AX) et les $(1\rightarrow 3)(1\rightarrow 4)$ - β -D-glucanes (BG) sont les principaux composants des parois cellulaires de l'albumen amylacé du grain de blé. Des variations spatiales et temporelles de la structure de ces polymères et de leur organisation dans la paroi sont observées. Toutefois le rôle de ces différents polysaccharides et l'impact de ces variations sur l'assemblage pariétal et les propriétés des parois sont mal compris. L'objectif de ce travail a été d'explorer les propriétés d'hydratation, de porosité et mécaniques de films d'AX et de BG mimant l'organisation et la diversité structurale des polymères des parois. Quatre méthodes de caractérisation ont été utilisées dans le but de mesurer des paramètres de mobilité, de diffusion, d'interaction et de résistance à la rupture en fonction de la teneur en eau et de la composition des films en polysaccharides: des isothermes de sorption et de diffusion, la RMN bas champ, la microscopie (AFM, MEB) et des mesures en mécanique. Les résultats montrent que la diffusion de l'eau à travers les films varie selon la structure des polysaccharides et l'épaisseur des films. Les interactions entre les chaînes de BG sont plus fortes ce qui se traduit par une microporosité des films plus faible et ainsi une plus grande résistance à la rupture des films. Plus les chaînes d'AX sont substituées, plus les interactions entre AX sont faibles. On retrouve cette tendance dans les films composites constitués d'AX et de BG. Plus le taux de substitution des AX augmente, moins les films sont homogènes et moins ils sont extensibles. Ces travaux démontrent l'impact significatif du degré de substitution des AX sur les propriétés d'hydratation et mécaniques des films composites, propriétés que l'on peut mettre en lien avec les variations structurales observées au niveau des parois cellulaires de l'albumen du grain.

Mots clés: arabinoxylanes, beta-glucanes, films de polysaccharides, RMN, parois cellulaires, endosperm, diffusion de l'eau, mobilité des molécules

Role of arabinoxylans and β -glucans on the assembly and properties of endosperm cell walls of cereal grains

Arabinoxylans (AXs) and $(1\rightarrow3)(1\rightarrow4)$ - β -D-glucan (BGs) are the main components of the cell walls of the starchy endosperm of the wheat grain. Spatial and temporal variations in the structure of these polymers and their organization in the wall are observed. However, the role of these polysaccharides and the impact of these variations on the wall assembly and properties are not understood. The objective of this study was to explore the hydration, porosity and mechanical properties of AX and BG films used as models of the organization and the structural diversity of polymers of cell walls. Four methods of characterization were used to measure parameters of mobility, diffusion, interaction and tensile strength as a function of water content and the polysaccharide composition of films: sorption isotherms and diffusion, low-field NMR, microscopy (AFM, SEM) and mechanical measures. The results show that the diffusion of water through films depends on polysaccharide's structure and film's thickness. Interactions between BG chains are stronger which results in a lower microporosity of the films with a greater tensile strength. The more AX chains are substituted, the weaker are the interactions between AX chains. This trend was also found for the composite films made of AXs and BGs. Higher is the substitution degree of AXs, less homogeneous and less extensible are the composite films. This work demonstrates the significant impact of the degree of substitution of AXs on the hydration and mechanical properties of composite films, properties that can be related to the structural variations observed in the cell walls of grain endosperm.

Keywords: arabinoxylans, beta-glucans, polysaccharide films, NMR, cell walls, endosperm, water diffusion, molecule motion