

Research Papers

APPROCHE DU MÉCANISME DE GÉLIFICATION DES SOLS D'AGAROSE

I. EVOLUTION DES CARACTÉRISTIQUES RHÉOLOGIQUES DES SOLS

E. BOURRET et L. BARDET * avec la collaboration technique de R. FORTUNE

*Laboratoire de Physique Industrielle Pharmaceutique, Faculté de Pharmacie, avenue Charles Flahaut,
34060 Montpellier Cedex (France)*

(Reçu 12 décembre, 1980)

(Révisé 18 mars, 1981)

(Accepté 25 mars, 1981)

SUMMARY

Thermal rheological studies describe the flow properties of A37 agarose sols. Their behavior displays plastic flow as shear strain increases. Rheological characteristics, viscosity, apparent viscosity and yield value are measured. Their variations with decreasing temperature pathway followed structural changes within the gelling process. A thixotropic flow occurred at the sol–gel transition point. The concentration of polymer in the gel is related to the absolute temperature of gelification in order to evaluate the heat of crosslinking. The high value corroborates the assumption of the crystalline nature of agarose gels.

RÉSUMÉ

Le comportement rhéologique des sols d'agarose soumis à une déformation sous l'effet de contraintes de cisaillement croissantes a été étudié en fonction de la température et de la concentration du polymère. Les constantes rhéologiques, viscosité, viscosité apparente et seuil d'écoulement, ont ainsi été déterminées et leur évolution au cours du refroidissement des sols traduit les changements structuraux se produisant dans le milieu. En outre, les propriétés thixotropes sont mises en évidence au cours de la formation du gel. Enfin, l'évaluation de l'énergie de réticulation du gel révèle l'existence de liaisons fortes caractérisant les gels microcristallins.

INTRODUCTION

Depuis les travaux d'Araki et Arai (1967), l'agarose est considéré comme le constituant chimiquement neutre de l'agar. Cependant cette distinction paraît trop schématique en

* Auteur auquel toute correspondance doit être adressée.

regard des caractères physico-chimiques que présentent les agaroses de différentes origines (Guiseley, 1970; Fuse et Goto, 1971; Guiseley et Renn, 1975; Kim et Henriquez, 1979). L'agarose possède un haut pouvoir gélifiant et les gels obtenus sont thermiquement réversibles, mais la transformation sol-gel-sol n'est pas isotherme et les courbes d'hystérésis sont très prononcées.

Afin d'expliquer les propriétés particulières de ce biogel, plusieurs auteurs ont étudié son mécanisme de gélification.

Les travaux de Arnott et al. (1974) ont montré que le processus de gélification suit la formation d'une double hélice dont toutes les caractéristiques ont été déterminées. La structure cristalline du réseau macromoléculaire a été observée au microscope électronique qui a confirmé l'association de ces doubles hélices en agrégats présentant entre eux des points de jonction (Amsterdam et al., 1975). La température de formation de l'hélice a été précisée par Hayashi et al. (1977) qui propose un "diagramme" du mécanisme de la gélification en s'appuyant sur les travaux antérieurs concernant les polysaccharides sulfatés.

Indovina et al. (1979) commente les courbes d'hystérésis en termes d'organisation moléculaire (formation de l'hélice) et d'organisation supramoléculaire (formation d'agrégats). Enfin une étude des conséquences de la gélification au niveau moléculaire a été effectuée par Aplin et al. (1979).

La destruction du réseau gélifié par élévation de la température, comme sa restauration par refroidissement du sol, ne correspond pas à un changement d'état net mais à un passage progressif de la gelée ferme à l'état fluide et vice versa. Le phénomène de gélification s'accompagne de modifications graduelles des propriétés physico-chimiques du milieu. La prise en masse de celui-ci sous l'effet du refroidissement indique la température de gélification de l'agarose, caractéristique consacrée par l'usage. Aussi, malgré la nature complexe du processus et mise à part les critères justifiant la pureté du produit, les agaroses commerciales sont couramment identifiées par leur température de gélification et la force du gel obtenu. La caractérisation d'un agarose par son point de gel nous paraît insuffisante. Aussi, nous fixant comme objectif une étude contribuant à élucider le mécanisme de gélification et à comparer par la suite les diverses agaroses commerciales, nous rapportons ici nos premiers travaux sur les propriétés rhéologiques des sols d'agarose.

Des études rhéologiques ont été effectuées sur des agaroses puis des mélanges gélatine-agarose (Watase et Nishinari, 1980), mais ces travaux ne traitent pas des propriétés rhéologiques dont nous envisageons l'étude. Ainsi la rhéologie ne présente aucune nouveauté dans l'étude des gels, mais il semble nécessaire de préciser dans une étude préalable un certain nombre de données. Seules seront abordées dans cet exposé les variations des constantes rhéologiques au cours du refroidissement des solutions d'agarose.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Les solutions

L'agarose utilisée est l'agarose A37 fournie par l'Industrie Biologique Française. Les sols d'agarose dont la concentration varie dans nos expériences entre 2 et 20 g/l sont préparés par dissolution dans un bain marie; l'opération est prolongée quelques minutes après obtention d'une solution limpide, ce qui permet d'éviter les inconvénients dénoncés par Guiseley (1971).

Appareillage

Les mesures de viscosité ont été effectuées à l'aide d'un appareil Rotovisko Haake RV1; c'est un viscosimètre rotatif qui permet d'étudier à température constante le comportement rhéologique de la substance à diverses vitesses de cisaillement. Notre appareil, identique à celui décrit par Livet et Mathis (1977), dispose de 10 vitesses de rotation. L'élément de mesure est thermostaté par une circulation d'eau continue qui permet d'équilibrer la température à 0.5°C près.

Nous appellerons: dv/dx , le gradient de vitesse exprimé en sec^{-1} ; F , la tension de cisaillement exprimée en $\text{dynes} \cdot \text{cm}^{-2}$; η , la viscosité exprimée en centipoises.

RÉSULTATS

L'étude du comportement rhéologique de l'agarose a d'abord été réalisée au cours du refroidissement des solutions à vitesses de cisaillement croissantes. Dans un autre type d'expérience, la solution d'agarose placée à température constante est soumise aux vitesses de cisaillement successivement croissantes puis décroissantes. A ces deux types d'expériences correspondent des protocoles expérimentaux différents qui seront décrits au cours de l'exposé des résultats.

Enfin, l'évolution des constantes rhéologiques sous l'effet du refroidissement sera examinée.

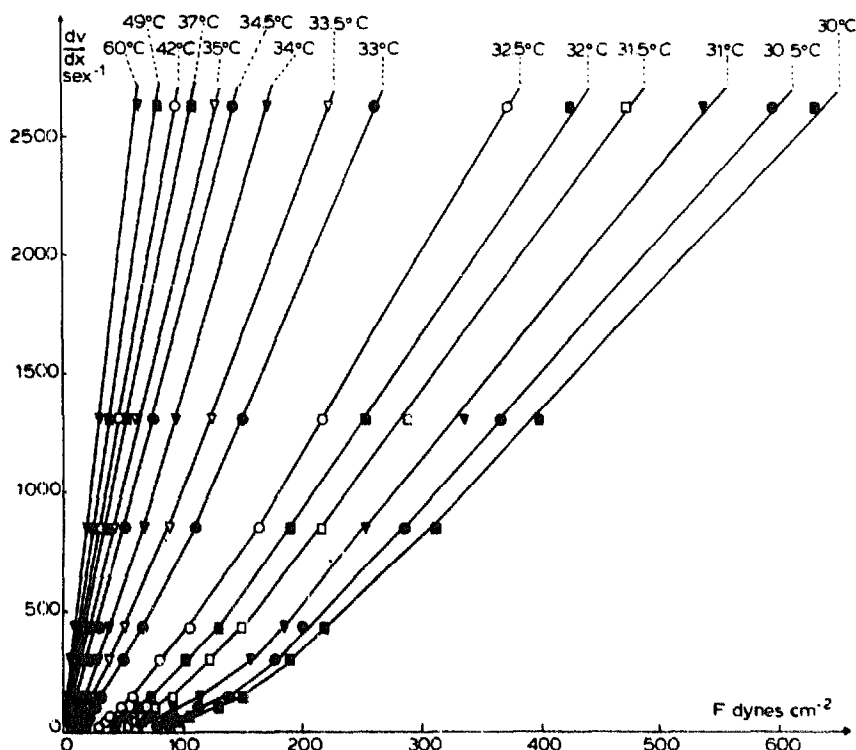


Fig. 1. Courbes d'écoulement obtenues au cours du refroidissement de la solution d'agarose IBI A37 à 12 g/l.

Comportement rhéologique

Rhéogrammes à différentes températures

Protocole expérimental. La température du sol est abaissée progressivement par palier successif de 1 à 3°C, de 60 à 30°C environ. Lorsque chaque équilibre de température est atteint, on procède aux mesures de viscosité en enclenchant la vitesse de rotation la plus faible.

Le rythme des contraintes imprimées est rapide: le temps pendant lequel s'exerce chaque vitesse de cisaillement est limité à la durée nécessaire pour permettre la lecture au potentiomètre de la déviation de l'aiguille, puis, on passe à la vitesse supérieure et ainsi de suite.

Courbes d'écoulement par refroidissement. Les variations de la tension de cisaillement en fonction du gradient de vitesse d'une solution d'agarose à 12 g/l sont représentées à différentes températures comprises entre 60 et 30°C (Fig. 1). Ces courbes d'écoulement traduisent une évolution des propriétés rhéologiques de la solution: aux températures élevées, les rhéogrammes linéaires reflètent un écoulement newtonien de la solution; en abaissant la température, l'allure rectiligne des rhéogrammes s'incurve peu à peu et la viscosité des solutions diminue lorsqu'on augmente le gradient de cisaillement (Fig. 2); aux températures les plus faibles, on peut décrire sans ambiguïté les rhéogrammes obtenus: ils ne passent pas par l'origine et présentent une partie linéaire aux gradients

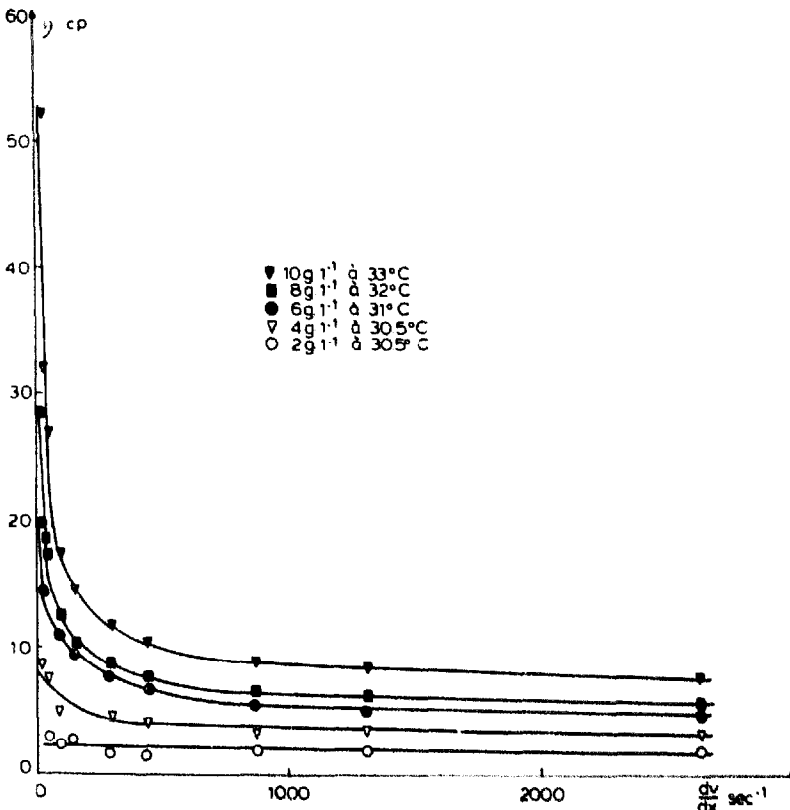


Fig. 2. Variations de la viscosité en fonction du gradient de vitesse à basses températures.

TABLEAU 1

DÉTERMINATION DU NOMBRE STRUCTURAL ET DU TYPE D'ÉCOULEMENT POUR C = 12 g/l

T (°C)	N	η_{cp}	$\eta_{pl\ cp}$	écoulement
60	0.94	2.36		
58	0.96	2.46		
55	1.09	2.57		
52	1.06	2.73		
49	1.03	2.94		
47	1.03	3.16		newtonien
45	1.01	3.37		
43.5	1.01	3.48		
42	1.00	3.59		
40	0.99	3.80		
39	0.98	3.86		
38	1.05			-----
38	1.05			?
37	1.04			?
36	1.09			?
35.5	1.13		4.36	-----
35	1.16		4.60	
34.5			5.06	
34			5.96	
33.5			7.59	
33			8.43	plastique
32.5			11.77	
32			13.40	
31.5			14.45	
31			16.00	
30.5			17.42	
30			18.12	

de cisaillement les plus élevés, c'est-à-dire au delà d'une certaine valeur de la contrainte tangentielle. Ce comportement correspond à un écoulement plastique des solutions d'agarose au dessous d'une certaine température.

Il nous a paru alors intéressant de définir précisément à quelle température, dite température critique, apparaît le caractère plastique des solutions d'agarose.

Recherche d'une température critique. L'équation traduisant la loi d'Ostwald-De Waele (Eirich, 1956, 1960):

$$F^N = \eta'(dv/dx)$$

où η' est le coefficient de viscosité, s'applique parfaitement à l'écoulement des composés à caractère pseudo-plastique. Si cette équation ne peut décrire valablement nos rhéogrammes, elle peut cependant nous aider à définir l'intervalle de température dans lequel les solutions d'agarose se comportent comme un fluide newtonien.

Les coefficients de régression des droites (Tableau 1), calculés par la méthode des moindres carrés pour chacune des températures envisagées, montrent qu'il est difficile

de préciser jusqu'à quelle température les solutions ont un écoulement purement newtonien. La valeur du nombre structural voisine de 1 aux températures élevées, évolue ensuite de façon irrégulière; ce résultat est dû à l'importance des erreurs relatives pour les faibles valeurs des viscosités correspondantes mesurées. Il s'en suit que seule une zone d'apparition du comportement plastique peut être fixée; cette zone incluant la température critique se situe entre 36 et 39°C pour l'agarose A37 à 12 g/l (Tableau 1).

Il demeure que les solutions d'agarose A37 seront caractérisées en toute rigueur par leurs constantes rhéologiques: viscosité η aux hautes températures, viscosité plastique η_{pl} pour les autres.

Influence de la concentration

Les mesures ont été renouvelées pour différentes solutions d'agarose dont la concentration varie de 2 à 20 g/l.

Les rhéogrammes des solutions d'agarose dont les concentrations sont égales à 4, 6, 8, 10, 15, 18 et 20 g/l présentent les mêmes caractéristiques que les rhéogrammes précédents. La température à laquelle s'incurvent les rhéogrammes dépend naturellement de la concentration.

Les valeurs du coefficient N confirment la difficulté à conclure, au voisinage de 32 à 39°C selon la concentration, sur le caractère plastique des solutions. Il faut noter que la précision des coefficients de régression permet de considérer que les plus faibles valeurs trouvées pour N ne sont pas significativement différentes de 1.

La solution à 2 g/l montre un comportement plus particulier: elle donne, quelle que soit la température; un écoulement quasi-newtonien, ce qui est bien visible sur la Fig. 2 tracée à faible température.

Ainsi, le refroidissement provoque une modification des structures internes du soluté qui s'accompagne d'une anomalie d'écoulement. Lorsque sous l'influence de la température les molécules initialement sous forme de pelotes se déroulent et forment les hélices, il faut que celles-ci s'orientent sous l'action du cisaillement avant que le fluide puisse s'écouler librement; ce phénomène explique l'apparition d'un seuil d'écoulement. Cependant, la solution à 2 g/l possède une concentration trop faible pour offrir une résistance marquée à l'écoulement; la tension de cisaillement ne varie pas de façon suffisante pour être significative d'une anomalie d'écoulement même aux températures les plus faibles.

Etude de la thixotropie

Protocole expérimental. Après avoir obtenu la température désirée de la solution d'agarose, on imprime des vitesses de cisaillement croissantes puis immédiatement décroissantes. Chaque mesure est effectuée dans des conditions strictement identiques: avant chaque lecture et pour chaque vitesse de rotation, la substance est soumise à l'effet du cisaillement pendant 10 sec.

Toutes les expériences ont eu lieu avec une concentration en agarose de 10 g/l, la solution étant renouvelée à chaque nouvelle température. Les essais sont répétés à 3 reprises: immédiatement après la mise en température de la solution, puis après un temps de repos de 10 min, puis 20 min.

Evolution des tensions de cisaillement. L'allure des représentations graphiques obtenus dépend de la température considérée.

Aux températures supérieures à 33°C, les tracés ascendant et descendant des courbes d'écoulement sont superposables et on n'observe aucune évolution au cours du temps en comparant les graphes obtenus au temps 0, 10 min et 20 min.

A la température de 33°C, les tracés ascendant et descendant révèlent les propriétés thixotropes de l'agarose et il apparaît une évolution des propriétés rhéologiques au cours du temps: au temps 0, l'aire d'hystérésis dénote un caractère thixotrope naissant; après un temps de repos de 10 min, la thixotropie du milieu est confirmée; au troisième essai pratiqué après 20 min de repos, le degré de thixotropie s'est accentué et la partie ascendante de la courbe présente aux faibles cisaillements une cassure qui correspond à la destruction de la structure interne de la substance (Fig. 4).

Enfin il faut noter que les tensions de cisaillement initiales et finales à la vitesse de rotation la plus basse sont pratiquement inchangées au temps 0 et 10 min, mais l'écart important enregistré au bout de 20 min prouve que les propriétés primitives du milieu ne sont pas retrouvées.

Variations des constantes rhéologiques

Les solutions d'agarose pourront être caractérisées par deux autres constantes rhéologiques: viscosité apparente à un gradient de vitesse donné, et seuil d'écoulement pour les solutions présentant un écoulement de type plastique.

Courbes de viscosité en fonction de la température

La viscosité apparente des sols aux différentes températures et aux différentes concentrations a été examinée sous une vitesse de cisaillement élevée (Fig. 5). La viscosité évolue d'abord lentement, puis augmente brusquement: un accroissement de 50% de la valeur est alors observé dans un intervalle de 4–6°C excepté pour la solution de plus basse concentration (2 g/l); pour celle-ci, l'élévation de la viscosité est peu sensible même à 25°C.

Comme l'indique Guiseley (1971), on peut relever sur ces courbes deux températures caractéristiques situées aux points où la courbe de viscosité dévie de ses deux trajectoires linéaires, horizontale et verticale. Selon cet auteur, ces températures sont respec-

TABLEAU 2
TEMPÉRATURES DE GÉLIFICATION

C (g/l)	t° gel selon $F_0 = f(t^{\circ}\text{C})$	t° dyn selon $\eta_{\text{app}} = f(t^{\circ}\text{C})$	t° isoth. selon $\eta_{\text{app}} = f(t^{\circ}\text{C})$
4	30.5	30.5	35
6	31.5	31	36
8	32.5	32	37
10	33	33	38
12	33.5	33.5	39
15	35	34.5	40
18	35	35	41
20	35.5	35	41.5

tivement égales, la plus haute à la température de gélification isothermique, la seconde à la température de gélification dynamique déterminée sous la même vitesse de refroidissement. Leurs valeurs figurent dans le Tableau 2.

La détermination de ces températures est entachée d'erreurs car il est difficile de fixer le point à partir duquel la courbe dévie de sa linéarité, notamment pour la température de gélification isothermique.

Seuils d'écoulement

Le seuil d'écoulement F est déterminé graphiquement sur le rhéogramme et sa valeur est égale à la tension de cisaillement lue par extrapolation de la partie linéaire sur l'axe des abscisses. Les variations en fonction de la température (Fig. 3) d'abord très faibles, s'amplifient brusquement dans un intervalle de température de 1–2°C maximum. L'évolution est d'autant plus accentuée que la concentration en agarose est élevée.

Ces températures relevées dans le Tableau 2 concordent précisément avec les températures de gélification dynamiques notées précédemment à l'aide des courbes de viscosité; elles marquent donc la gélification du milieu.

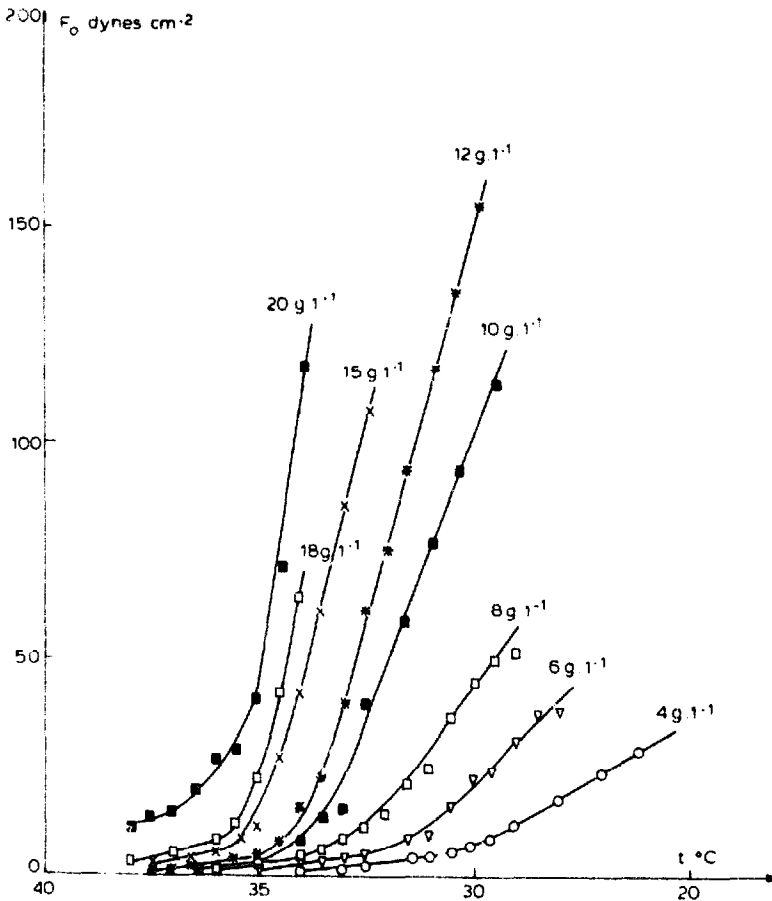


Fig. 3. Evolution du seuil d'écoulement en fonction de la température.

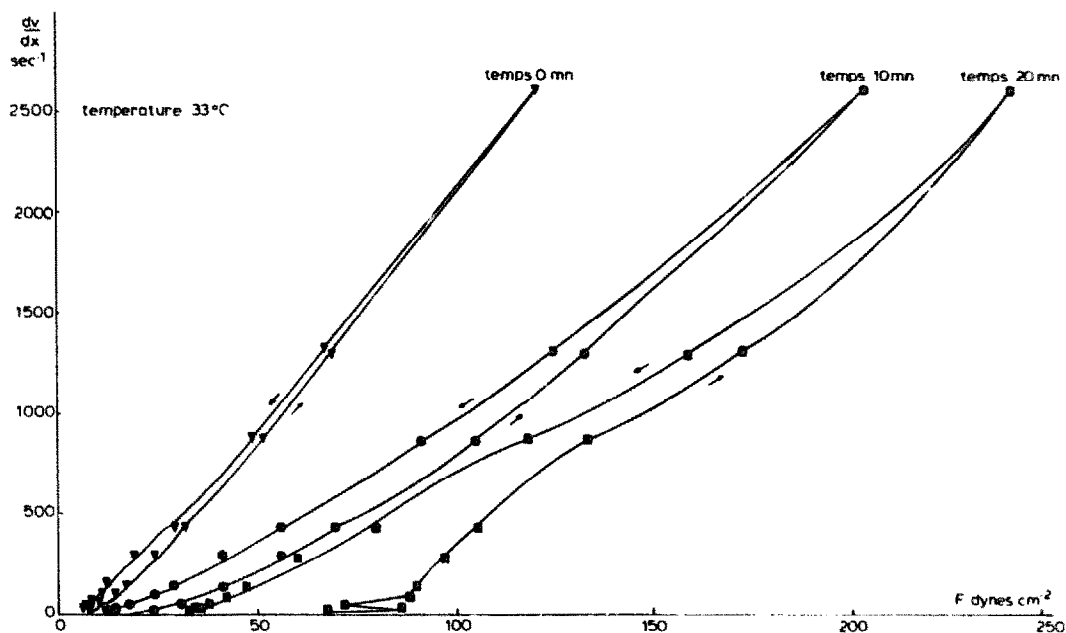


Fig. 4. Courbes d'hystérésis: concentration en agarose A 37 à 10 g/l.

Etude énergétique

En prenant comme valeur de T la température absolue de gélification déterminée pour chaque concentration C en agarose A37 (Tableau 2), l'énergie de réticulation du gel d'agarose A37 peut être évaluée conformément à la relation (Haas et al., 1970).

$$\ln C = \Delta H_C / RT + \text{constante}$$

Le test de défaut d'alignement appliqué aux valeurs expérimentales a révélé une très haute signification de la linéarité de la régression dans la zone de concentration variant de 4 à 20 g/l et l'estimation de l'énergie d'activation à partir du coefficient de régression de la droite donne:

$$-\Delta H_C = 58 \text{ kcal/mol}$$

Les travaux effectués sur plusieurs types de gel ont mis en évidence que les gels thermoréversibles peuvent être classés en gels non cristallins et en gels micro-cristallins selon la valeur trouvée pour ΔH_C . L'énergie d'activation pour le gel d'agarose A37 de 58 kcal/mol reflète la haute énergie des liaisons assurant la structure du réseau gélifié et suggère leur rangement dans la classe des gels micro-cristallins, conclusion en parfait accord avec des travaux antérieurs (Amsterdam et al., 1975; Arnott et al., 1974).

CONCLUSION ET DISCUSSION

L'emploi d'un viscosimètre rotatif a permis de suivre l'évolution des propriétés rhéo-

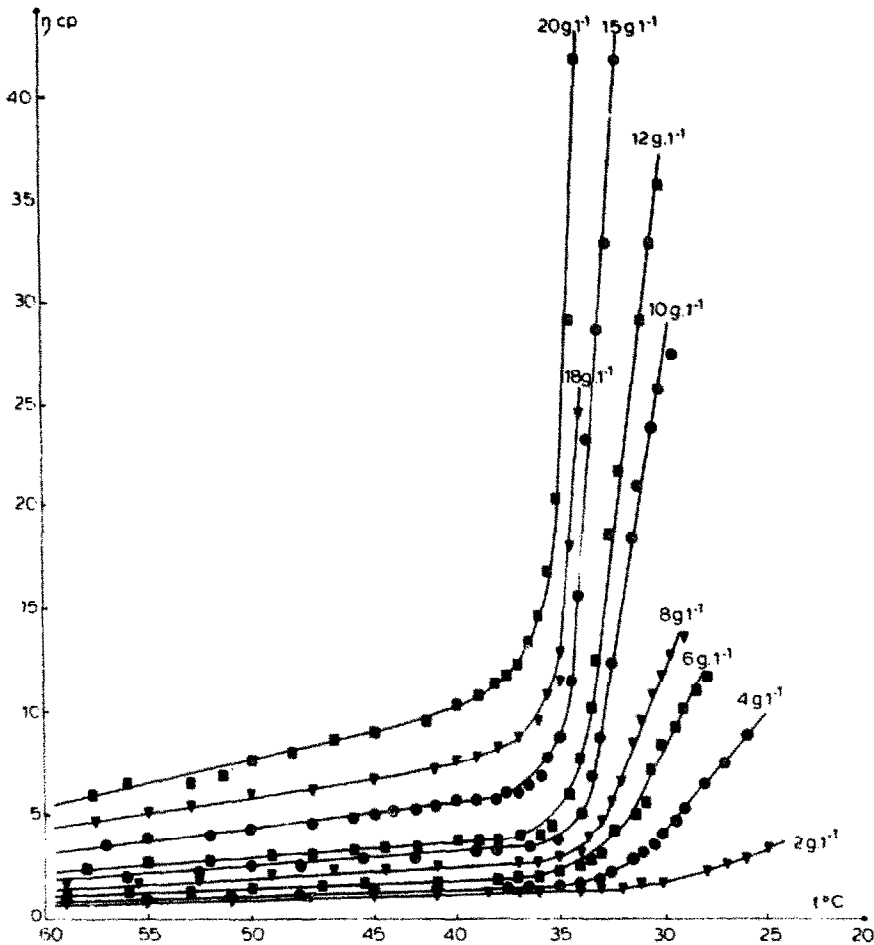


Fig. 5. Variations de la viscosité apparente en fonction de la température au gradient de vitesse 870/s.

logiques des solutions d'agarose et surtout de mettre en évidence les changements structuraux qui interviennent lors du refroidissement des sols.

La description des rhéogrammes selon le modèle d'Ostwald-De Waelde ne permet pas dans le cas présent de déterminer une température critique précise mais d'indiquer seulement la zone d'apparition de l'écoulement non newtonien.

La température de formation de l'hélice a été trouvée pour la même agarose A37 à 50°C (Hayashi et al., 1977), température à laquelle les solutions n'ont pas encore un écoulement plastique; les modifications des propriétés rhéologiques observées sont toutes relevées à des températures bien inférieures. Il apparaît donc que la quantité importante d'hélices formées et plu., certainement encore la formation d'agrégats doivent être responsables de l'apparition du caractère plastique des solutions et que la diminution de viscosité aux gradients de cisaillement élevés est due à l'orientation progressive des molécules dans le sens de l'écoulement sous l'effet de la contrainte croissante.

Au cours du refroidissement des solutions, l'augmentation relative des constantes rhéologiques, viscosité apparente et seuil d'écoulement, n'est pas régulière. Leur augmentation progressivement croissante aux températures élevées s'explique par la formation en nombre croissant des hélices dont la présence perturbe l'écoulement; par contre, le brusque accroissement des paramètres rhéologiques constaté à partir de la température critique traduit un phénomène nouveau; il semble que la résistance très importante du milieu à l'écoulement soit due à une organisation progressive des macromolécules en un réseau tridimensionnel qui constitue le gel; le seuil d'écoulement permet alors de définir la température de gélification dynamique du milieu.

Les propriétés thixotropes sous l'effet d'un cisaillement prolongé ne se manifestent pas aux hautes températures et apparaissent à 33°C pour la solution d'agarose à 10 g/l. Or, le changement brutal des valeurs du seuil d'écoulement pour cette concentration intervient à 33,5°C. Ainsi, la thixotropie apparaît et s'intensifie lors de la formation du réseau gélifié; l'organisation du gel prolonge le temps de régénération du milieu, la solution ne retrouvant pas ses propriétés initiales après un temps de repos de 20 min.

Le comportement quasi-newtonien de la solution d'agarose A37 à 2 g/l montre qu'il n'y a pas de formation d'un gel proprement dit à cette concentration: cette observation est en accord avec les travaux antérieurs puisque la concentration minimale susceptible de constituer un gel est de 0.24 g/dl selon Hayashi et al. (1978). La très légère augmentation de viscosité observée pour cette solution aux températures inférieures à 30°C peut alors être expliquée par la présence de quelques agrégats, mais ces agrégats ne se trouvent pas en nombre suffisant pour former le réseau tridimensionnel du gel.

Enfin l'étude énergétique confirme la haute énergie de réticulation du gel d'agarose A37 et corrobore ainsi les observations antérieures admettant une structure microcristalline des gels d'agarose.

Une seule étude rhéologique très simple nous a permis de définir un certain nombre de caractéristiques des sols d'agarose, mais seul l'effet de la température a été examiné. Dans une prochaine étude, nous envisageons de suivre l'évolution dans le temps de la viscosité de sols d'agarose d'origines diverses, aux températures élevées et au cours de la formation du gel.

BIBLIOGRAPHIE

- Amsterdam A., Er-El Z. and Shaltiel S., Ultrastructure of Beaded agarose. *Arch. Biochem. Biophys.*, 71 (1975) 673-677.
- Aplin J.D. and Hall L.D., Spin-labelling studies of the agarose gelling system. *Carbohydr. Res.*, 75 (1979) 17-29.
- Araki C. and Arai K., Studies on the chemical constitution of agar-agar. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 40 (1967) 1452-1456.
- Arnott S., Fulmer A., Scott W.F., Dea I.C.M., Moorhouse R. and Rees D.A., The agarose double helix and its function in agarose gel structure. *J. Mol. Biol.* 90 (1974) 269-284.
- Eirich F., *Rheology: Theory and Applications*, Academic Press, New York, Vol. I, 1956, pp. 431-492; and Vol. 3, 1960, pp. 145-187.
- Fuse F. and Goto F., Some properties of agarose and agaropectin isolated from various mucilaginous substances of Red Seaweeds. *Agr. Biol. Chem.* 35 (1971) 799-804.
- Guisley K.B. The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose, *Carbohydr. Res.*, 13 (1970) 247-256.

- Guiseley K.B., Viscometric determination of agarose gelling temperature, Proc. VIIth Int. Seaweed Symp., 1971, pp. 455-459.
- Guiseley K.B. and Renn, D.W., Agarose: purification, properties and biomedical applications; marine Colloids, Inc. Rockland, Maine 04-841, 1975, pp. 1-35.
- Haas H.C., Manning M.J. and Mach M.H., Helical conformations and thermally reversible gelation. Polymer Lett., 8 (1970) 425-429.
- Hayashi A., Kinoshita K., Kuwanno M. and Nose A., Studies of the agarose gelling system by the fluorescence polarization method, Polymer J., 9 (1977) 219-225; et Polymer J., 10 (1978) 485-494.
- Indovina P.L., Tettamati E., Micciano-Giammarinaro M.S. and Palma M.U., Thermal hysteresis and reversibility of gel-sol transition in agarose-water systems. J. Chem. Phys., 70 (1979) 2841-2847.
- Kim D.H. and Henriquez P.; Yields and gel strengths of agar from cystocarpic and tetrasporic plants of *Gracilaria verrucosa*. Proc. Int. Seaweed Symp., 9, 1977 (paru 1979) pp. 257-262.
- Livet D and Mathis C., Determination des constantes de viscosité des mousses non aqueuses à l'aide d'un viscosimètre rotatif. R. Sci. Techn. Pharm.; 6 (1977) 477-484.
- Watase M. and Nishinari K., Rheological properties of agarose-gelatin gels, Rheol. Acta, 20 (1980) 220-225.