

Siège social

3600, boul Casavant Ouest
Saint-Hyacinthe, Qc, J2S 8E3
Tel : (450) 773-1105
Fax : (450) 773-8461

Bureau de Québec

1665, boul Hamel edifice 2
Local 1.06 Québec, Qc, G1N 3Y7
Tel : (418) 643-8903
Fax : (418) 643-8350

Rapport final

Identification de composés phénoliques majeurs présents dans les produits d'érable

Dr. S. Kermasha, Département des sciences
Par: de l'alimentation et de la chimie agricole



Résumé

Le sirop d'érable est un des produits d'origine végétale les plus importants au Québec. Compte tenu de l'augmentation de la production des produits de l'érable, la connaissance des qualités nutritionnelles des constituants du sirop d'érable permettrait de le valoriser et d'avoir ainsi un impact considérable sur sa commercialisation. Selon certaines études, certains composés phénoliques présentent des qualités nutritionnelles très intéressantes. Or, la concentration de l'eau d'érable passe obligatoirement par un traitement thermique.. Ceci provoque éventuellement une modification chimique des composés phénoliques considérés comme précurseurs des composés oxydés ou modifiés structurellement. La recherche de ces différents composés dans l'eau et le sirop d'érable s'avère donc commercialement nécessaire.



Table des matières

Rappel des objectifs	1
Approche expérimentale	1
Chromatographie analytique	1
Extraction	1
Séparation chromatographique.....	1
Identification	1
Purification des composés phénoliques présents dans les eaux d'érable	2
Purification	2
Inconnus purifiés.....	2
Identification	2
Résultats	3
Effet de l'entreposage.....	3
Effet du pH.....	3
Hydrolyses acides et basiques	4
Hydrolyses enzymatiques.....	4
Conclusion.....	7
Bibliographie.....	7

Identification de composés phénoliques majeurs présents dans les produits d'érable



Rappel des objectifs

Le projet a pour objectif d'identifier les principaux composés phénoliques présents dans l'eau et le sirop d'érable.



Approche expérimentale

Chromatographie analytique

L'analyse des composés phénoliques présents dans l'eau et les concentrés d'érable se fait comme suit d'après Kermasha et Coll. (1995).

Extraction

Le pH des échantillons (25 ml) est préalablement ajusté à 2,0 avec de l'acide chlorhydrique, 6N. Les composés phénoliques sont ensuite extraits dans une ampoule à décanter par addition successive de 60, 30 et 30 ml d'éthyle acétate. Les extraits sont combinés, puis évaporés à sec sous azote. Le résidu est alors redissous dans 1 ml de méthanol. Ainsi les échantillons sont concentrés 25 fois.

Séparation chromatographique

Elle consiste en une chromatographie liquide à haute-performance analytique sur phase inversée (RP-HPLC), utilisant un gradient de solvant, d'après une modification de la méthode décrite par Spanos et Wrolstad (1990). Le système HPLC est couplé à un détecteur UV, "diode Array" monté en série avec un détecteur électrochimique. La détection en UV se fait simultanément à 280 et 320 nm. Des spectres d'absorption ont aussi été enregistrés entre 190 et 390 nm pour tout le chromatogramme. La détection électrochimique se fait simultanément à 200 et 600 mV. La colonne utilisée est une colonne CSC-Inert 150A/ODS2 (250 x 4,6 mm, pore: 5µm), La phase mobile est constituée de 2% d'acétonitrile et de 98% de 0,05% d'acide trifluoroacétique. Le débit est de 0,75 ml/min. Après 5 min, un gradient linéaire (2% à 40% de A) d'une durée de 45 minutes est amorcée. Le volume d'injection utilisé est de 20 µl.

Identification

L'analyse des composés phénoliques suivants est réalisée; acide p-coumarique (AC), férulique (AP), vanillique (AV), syringique (ASY), homovanillique (AH) et sinapinique (ASI), ainsi que le coniferylaldéhyde (CA), la vanilline (V), la syringaldéhyde (S), l'alcool coniférique (COH) et le 5-hydroxyméthyl-2-furaldéhyde (HMF).

Purification des composés phénoliques présents dans les eaux d'érable

L'extraction des composés phénoliques inconnus a été réalisée par l'ajustement du pH à 2,0, avec l'acide chlorhydrique, 6N. Les inconnus ainsi que les composés phénoliques sont ensuite extraits dans une ampoule à décanter par addition successive de 400, 300 et 300 ml d'éthyle acétate. Les extraits sont combinés, puis évaporés à sec sous azote. Le résidu est alors re-dissous dans 1 ml de méthanol. Ainsi les échantillons sont concentrés 250 fois.

Purification

Elle consiste en une chromatographie liquide à haute-performance préparative sur phase inversée (RP-HPLC), utilisant un gradient de solvant. La colonne utilisée est une colonne Ultrasphere C-18 (150 x 21,2 mm, pore: 5µm). La phase mobile est constituée de 2% d'acétonitrile et de 98% de 0,05% d'acide trifluoroacétique, le débit est de 7,5 ml/min. Après 5 min, un gradient linéaire passant de 2% à 21% de A et d'une durée de 22,5 min est amorcée. Suivi d'un second gradient linéaire passant de 21% à 80% de A en 7,5 min. Le volume d'injection utilisé est de 90 µl.

Inconnus purifiés.

La vérification de la pureté des inconnus est accomplie par l'analyse chromatographique analytique tel que décrite précédemment, de chaque inconnu. Cette pureté peut aussi être confirmée par une analyse sur couche mince de chaque inconnu. Pour ce faire, le papier utilisé est constitué de cellulose MN300 (Whatman No. 1) et a comme phase mobile le η -butanol/acide acétique/eau (6: 1:2, v/v/v). La visualisation des composés présents se fait alors sans ou avec réactif sous visible et sous UV (Ribereau-Gayon, 1972). Ces réactifs sont les vapeurs d'ammoniaque, la p -nitroaniline (PNA) suivi de carbonate de sodium (PNACS), le chlorure d'aluminium (AlCl₃), la ninhydrine et l'aniline oxalate.

Identification

Afin de cerner leur composition chimique, les inconnus (100 µg) sont soumis à différents types d'hydrolyse telles que l'hydrolyse acide (Ribereau-Gayon, 1972) et basique (Krygier et al., 1982) ainsi qu'à des hydrolyses enzymatiques (Belford et al., 1992) par l' α -glucosidase, la β -glucosidase et l'héspéridinase. L'hydrolyse acide est réalisée en présence de HCl, 2N/ éthanol (1: 1, v/v) durant 250 min à 100 °C. L'hydrolyse basique est faite en présence de NaOH, 4N durant 4 heures sous azote et à température de la pièce. Les hydrolyses enzymatiques impliquent l'utilisation de différents pH de tampon par contre la même température, de 40 °C, et le même temps, de 24 heures, d'incubation est utilisés dans le cas des trois enzymes. Ainsi, la concentration d'enzyme proposée pour l' α et la β -glucosidase est de 4U/ml, alors que pour l'héspéridinase elle est de 0,5 U/ml. Le pH des tampons est de 6,8, 5,0 et 3,8, respectivement. Dans chacun des cas précédents, les produits d'hydrolyse sont extraits en réacidifiant la solution, si nécessaire, et par l'utilisation de l'éthyle acétate comme solvant. Une analyse sur couche mince des produits des hydrolyses acides et basiques est faite. Puis, une chromatographie analytique par HPLC des produits d'hydrolyse acide, basique et enzymatique ainsi que des spectres d'absorption entre 190 et 390 nm est accomplie pour chaque inconnu.



Résultats

La chromatographie analytique par HPLC de chacun des inconnus (figure 1) montre que les différents inconnus, I1, I2, I3, I4 et I5 pré purifiés et ayant comme temps de rétention 7, 9, 17, 23 et 25 min, respectivement, contiennent d'autres composés et principalement les autres inconnus eux-mêmes. Ces résultats sont décrits dans le rapport précédent, datant du 7 février 1995. Cette analyse permet une première vérification de la pureté des inconnus obtenus par chromatographie préparative. Une deuxième vérification par chromatographie sur couche mince (tableau 1) confirme ces résultats. Des spectres d'absorption entre 190 et 390 nm ont été pris sur chacun de ces inconnus (figure 2) à des fins de comparaison. Les spectres d'absorption les plus spécifiques ont été obtenus pour les inconnus I3, I4 et I5 et ont comme absorbante (λ) max. 197-235, 200-235-280-310 et 200-215-225-305, respectivement, Alors que les inconnus I1 et I2 ont comme λ max. 200 et 220, respectivement.

Effet de l'entreposage

Les effets de l'entreposage sur les inconnus I1, I2, I3, I4 et I5 (tableau 2) semblent être différents d'un composé à l'autre.

Tableau 2: Effet de l'entreposage

ID ^a	Pics observés	
	Frais	Entreposé
I1	I1, I3	I1, I3, 4
I2	I2, I2, I3	I1, I2, I3
I3	I1, I3, 4	I1, I3, 4
I4	I1, I4	I1, I3, I4, 5, 7
I5	I1, I5	I1, I5

^a Inconnu pré purifié

^b Pics observés lors de la chromatographie analytique par HPLC.

Ainsi les effets les plus significatifs sont observés pour I1 et I4. L'observation du pic correspondant à I1 dans tous les chromatogrammes des autres inconnus, suggère la présence de produits de dégradation dans chacun des inconnus à des concentrations variées.

Effet du pH

D'un autre côté, les résultats tendent à montrer que le pH (tableau 3) du tampon utilisé lors des hydrolyses enzymatiques (blanc contenant l'inconnu seulement), a aussi un effet sur la chromatographie des inconnus.

Tableau 3: Effet du pH.

ID ^a	Pics observés ^b		
	PH 6.8	PH 5.0	PH 3.8
I1	I1, I3, 4	I1, I3, 4, 16	I1, I3, 4, 14, 16
I2	I1, I2, I3	I1, I2, I3, 13, 15	I1, I2, I3, 16
I3	I1, I3, 4, 9	I1, I3, 4, 16	I1, I3, 4, 16
I4	I1, I3, I4, 4, 5, 7	I1, I3, I4, 4, 5, 7, 10, 16	I1, I3, I4, 4, 5, 7, 10, 16
I5	I1, I5	I1, I5, 16	I1, I5, I4

^a Inconnu pré purifié.

^b Pics observés lors de la chromatographie analytique par HPLC.

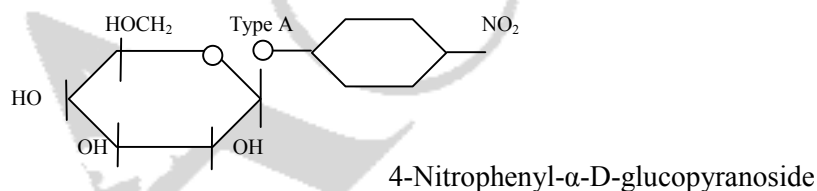
Le pic additionnel obtenu le plus fréquemment est le pic #4. Or, le pic #4 nous donne un spectre d'absorption contenant les λ max. suivant (tableau 2); 197, 204 et 281 nm. Le temps de rétention de ce pic est de 18 min et le temps de rétention du 5-hydroxyméthyl fufurale (HMF) est aussi de 18 min. Ainsi, le spectre d'absorption du HMF donne des λ max. de 197 et 283 nm. La similitude des spectres d'absorption obtenus pour le pic #4 et le HMF, nous suggère que le pic #4 est du HMF. Le HMF étant utilisé comme indicateur des altérations produit aux composés phénoliques en présence de sucre et ce parce qu'il est le produit final de la déshydratation des hexoses par catalyse acide (White, 1992), tous les pics mineurs formés durant l'entreposage ou par l'effet du pH ne seront pas considérés.

Hydrolyses acides et basiques

Les résultats obtenus par hydrolyse acide et basique des inconnus (tableau 1) suggèrent de par son profil de coloration que nous sommes en présence de composés phénoliques glycosilés. Ils semblent aussi que les inconnus I4 et I5 soient très proches. La chromatographie analytique par HPLC de ces produits d'hydrolyse montre également la production de plusieurs pics et donc de plusieurs composés phénoliques. Ces nombreux composés phénoliques proviennent-ils de l'hydrolyse des inconnus OU de leur oxydation ou de leur dégradation ou encore de la dégradation des produits d'hydrolyse eux-mêmes? Afin de mieux contrôler l'hydrolyse des inconnus, l'utilisation d'enzymes s'est avérée nécessaire (Belford et Coll., 1992). Les enzymes sélectionnés sont l' α -glucosidase, la β -glucosidase et l'héspéridinase en raison de leur activité hydrolytique spécifique.

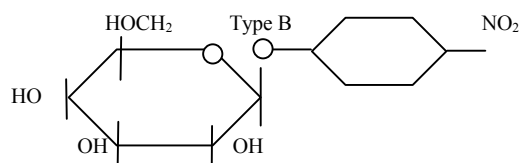
Hydrolyses enzymatiques

Théoriquement, l' α -glucosidase agit sur des lien de type A:

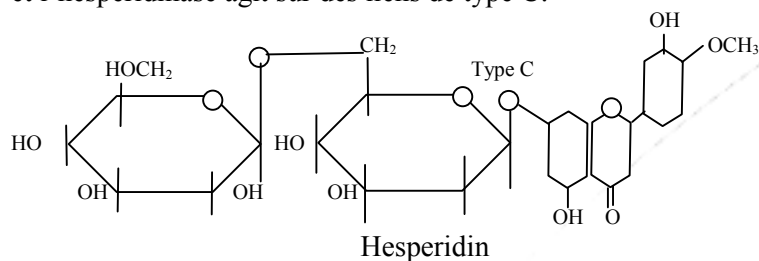


la β -glucosidase agit sur des liens de type B:

4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside



et l'hesperidinase agit sur des liens de type C:



Ainsi, les résultats du tableau 4 tendent à montrer que l' α - et la β -glucosidase ont une activité hydrolytique réduite sur les cinq inconnus. Dans le cas de l'hesperidinase, par contre, une activité hydrolytique significative est observée.

Tableau 5. Effet des hydrolyses enzymatiques

ID ^a	Pics observés ^b		
	α - glucosidase	β - glucosidase	hesperidinase
I1	I1, I3	I1, I3	I1, I3, 5, 11
I2	I1, I2, I3	I1, I2, I3	I1, I2, I3, 5, 11, 15
I3	I1, I3	I1, I3	I1, I3, 5, 11
I4	I1, I4	I1, I4	I1, I4, 5, 10
I5	I1, I5	I1, I5	I1, I5, 5, 10

a Inconnu pré purifié

b Pics observés lors de la chromatographie analytique par HPLC.

La figure 1 montre la chromatographie analytique par HPLC des cinq inconnus purifiés sans puis avec hydrolyse par l'hesperidinase. La présence des inconnus I1 et I3 dans presque tous les chromatogrammes non hydrolysés nous pose un problème. Le problème étant d'assigner un ou plusieurs des pics produits à un ou des inconnus. Première observation, quatre pics sont produits par l'hydrolyse, deuxièmement, certains pics ne sont présents que pour un chromatogramme, par exemple 12, 14, 15. Par contre certains autres pics sont présents dans tous les chromatogrammes. Suite à ces observations, nous pouvons supposer que le pic produit par I1 est #5 (H1), I2 est #15 (H4), I3 est #11 (H3) puis I4-I5 est #10 (H2). Le tableau 6 donne les λ max. spécifiques des différentes classes de composés phénoliques ainsi que ceux obtenus pour les inconnus et leur produits d'hydrolyse par l'hesperidinase.

Tableau 6a: Absorbante (λ) max. d'après Macheix CI Coll. (1990)

Classes	λ (nm)
Acides benzoïques	270-280
Acides hydroxycinnamiques	290-300, 305-330
Anthocyaniques (pigment)	270-280, 315-325, 500-550
Flavonols	250-270, 300, 350-380
Flavan-3-ols	270-280
Coumarins	220-230, 310-350
Flavones	250-270, 330-350
Flavanones, flavanonols	270-295, 300-330
Chalcones	220-271, 300, 340-390
Aurones	240-270, 370-430
Isoflavones	245-270, 300-340

Tableau 6b: λ max. des inconnus et des produits d'hydrolyse de l'hespéridinase.

ID ^a	λ (nm)
I1	260
I2	260
I3	235
I4	235, 280, 310
I5	225, 305
H1 ^b	225, 283
H2 ^c	226, 280
H3 ^d	279
H4 ^e	282, 323

a Inconnu pré purifié.

b Produit d'hydrolyse par Phespéridinase de I1.

c Produit d'hydrolyse par l'hespéridinase de 14 et 15.

d Produit d'hydrolyse par l'hespéridinase de 13.

e Produit d'hydrolyse par l'hespéridinase de 12.

Le temps de rétention du pic #15 et de l'acide o-coumarique est de 42 et 43 min, respectivement. Le spectre d'absorption du pic #15 donne des λ max. de 210, 282 et 323 nm alors que l'acide o-coumarique donne des λ max. de 226, 277 et 327 nm. La similitude des spectres d'absorption obtenus pour le pic #15 et l'acide o-coumarique nous suggère que le pic #15 pourrait être l'acide o-coumarique. Les résultats indiquent que l'hydrolyse des inconnus par l'hespéridinase supporte l'hypothèse voulant que ces cinq inconnus sont des composés phénoliques glycosilés. Le temps de rétention des pics #5, #10 et #11 ne correspond à aucun des 49 standards présents dans le laboratoire. Nous pouvons, cependant, comparer les spectres d'absorption obtenus pour chacun des produits d'hydrolyse à ceux obtenus pour les différentes classes de composé phénolique. Ainsi, la comparaison des spectres d'absorption obtenus pour les pics #5, #10 et #11 aux spectres d'absorption spécifiques décrits ci-dessus, nous suggère que les pics #5, #10 et #11. sont des acides benzoïques.



Conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent que les pics inconnus I1, I2, I3, I4 et I5 présentent des caractéristiques spécifiques. Ces composés sont en particulier hydrolysables par l'héspéridinase, enzyme spécifique des composés phénoliques glycosylés. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GUMS) des inconnus et des produits de l'hydrolyse enzymatique est nécessaire afin de permettre l'identification finale de ces composés de l'eau d'érable.



Bibliographie

- Belford, A.L. et Lindsay, R.C. (1992). Bound vanillin in maple sap. *Food Chem.* 7, 9-13
- Kermasha, S., Goetghebeur, M. et Dumont, J. (1995). Determination of phenolic compound profiles in maple products by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 43, 708-716.
- Ktygier, K., Sosulski, F. et Hogge, L. (1982). Free, Esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *J. Agric. Food Chem.* 30, 330-334.
- Ribereau-Gayon, P. (1972). Dans "*Plant Phenolics*", Hafner Publishing Company, NY, pp.54-105.
- White, J.W. (1992). Quality evaluation of honey: Role of HMF and diastase assays. *Am Bee J.* 132, 792-794.

Tableau 1a : Hydrolyse acide et basique de l'inconnu I1.

Révélateur	Hydrolyse	Non				Acide		Basique
	Visualisation	Tache # 1	Tache # 2	Tache # 3	Tache # 4	Tache #1	Tache # 2	Tache # 1
Sans réactif	Ultraviolet	Pas de tache	Ombre verte	Vert jaune	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache
Ammoniaque	Ultraviolet	Pas de tache	Vert clair	Vert clair	Pas de tache	Ombre verte	Pas de tache	Jaune
PNA	Visible	Pas de tache	Orange	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache
PNA	Ultraviolet	Pas de tache	Jaune	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache
PNACS	Ultraviolet	Pas de tache	Jaune	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache
AlCl	Ultraviolet	Vert clair	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache
Ninhydrin	Ultraviolet	Pas de tache	Vert clair	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache
Aniline	Ultraviolet	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Jaune	Pas de tache	Jaune	Pas de tache
	Rf	0.71	0.60	0.45	0.15	0.60	0.15	0.60

Tableau 1b : Hydrolyse acide et basique de l'inconnu I2.

Révélateur	Hydrolyse	Non		Acide			Basique	
	Visualisation	Tache # 1	Tache # 2	Tache # 1	Tache # 2	Tache #3	Tache # 1	Tache # 2
Sans réactif	Ultraviolet	Ombre verte	Ombre verte	Pas de tache	Ombre verte	Pas de tache	Ombre verte	Pas de tache
Ammoniaque	Ultraviolet	Vert clair	Vert clair	Vert clair	Pas de tache	Pas de tache	Vert jaune	Pas de tache
PNA	Visible	Pas de tache	Orange	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache
PNA	Ultraviolet	Ombre verte	Jaune	Pas de tache	Ombre verte	Pas de tache	Ombre verte	Pas de tache
PNACS	Ultraviolet	Ombre verte	Jaune	Pas de tache	Ombre verte	Pas de tache	Ombre verte	Pas de tache
AlCl	Ultraviolet	Ombre verte	Ombre verte	Vert clair	Pas de tache	Pas de tache	Ombre verte	Pas de tache
Ninhydrin	Ultraviolet	Pas de tache	Vert clair	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Vert clair
Aniline	Ultraviolet	Ombre verte	Pas de tache	Jaune	Ombre verte	Jaune	Pas de tache	Pas de tache
	Rf	0.76	0.60	0.85	0.74	0.15	0.74	0.24

Tableau 1c : Hydrolyse acide et basique de l'inconnu I3.

Révélateur	Hydrolyse	Non		Acide	Basique
	Visualisation	Tache # 1	Tache # 2	Tache # 1	Tache # 1
Sans réactif	Ultraviolet	Pas de tache	Ombre verte	Pas de tache	Vert
Ammoniaque	Ultraviolet	Vert clair	Vert clair	Pas de tache	Ombre verte
PNA	Visible	Pas de tache	Orange	Pas de tache	Pas de tache
PNA	Ultraviolet	Pas de tache	Jaune	Pas de tache	Pas de tache
PNACS	Ultraviolet	Pas de tache	Jaune	Pas de tache	Pas de tache
AlCl	Ultraviolet	Pas de tache	Ombre verte	Pas de tache	Ombre verte
Ninhydrin	Ultraviolet	Pas de tache	Vert clair	Pas de tache	Pas de tache
Aniline	Ultraviolet	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Jaune
	Rf	0.71	0.65	0.00	0.10

Tableau 1d : Hydrolyse acide et basique de l'inconnu I4.

Révélateur	Hydrolyse	Non	Acide				Basique			
	Visualisation	Tache 1	Tache 1	Tache 2	Tache 3	Tache 1	Tache 2	Tache 3	Tache 4	
Sans réactif	UV	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Ombre verte	Vert clair	Ombre verte	Jaune	Ombre verte	
Ammoniaque	Visible	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Jaune	Pas de tache	Pas de tache	Ombre verte	Jaune	
Ammoniaque	UV	Pas de tache	Vert clair	Vert	Ombre verte	Vert clair	Ombre verte	Vert clair	Ombre verte	
PNA	Visible	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Blanc	
PNA	UV	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Ombre verte	Jaune	Ombre verte	Pas de tache	Ombre verte	
PNACS	UV	Vert fluo	Vert clair	Pas de tache	Ombre verte	Jaune	Ombre verte	Pas de tache	Ombre verte	
AlCl	UV	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Vert clair	Vert clair	Ombre verte	Pas de tache	Ombre verte	
Ninhydrin	UV	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Ombre verte	Fluo	Ombre verte	Pas de tache	Ombre verte	
Aniline	UV	Pas de tache	Jaune	Pas de tache	Jaune	Ombre verte	Pas de tache	Pas de tache	Ombre verte	
	Rf	0.64	0.83	0.56	0.12	0.45	0.32	0.12	0.05	

Tableau 1e : Hydrolyse acide et basique de l'inconnu I5.

Révélateur	Hydrolyse	Non		Acide		Basique
	Visualisation	Tache # 1	Tache # 2	Tache # 1	Tache # 2	Tache #1
Sans réactif	Ultraviolet	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Vert	Ombre verte
Ammoniaque	Ultraviolet	Vert clair	Pas de tache	Pas de tache	Vert	Ombre verte
PNA	Ultraviolet	Pas de tache	Pas de tache	Vert clair	Vert clair	Pas de tache
PNACS	Ultraviolet	Pas de tache	Pas de tache	Vert clair	Vert clair	Pas de tache
AlCl	Ultraviolet	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache	Vert clair	Pas de tache
Ninhydrin	Ultraviolet	Pas de tache	Vert clair	Pas de tache	Pas de tache	Pas de tache
Aniline	Ultraviolet	Pas de tache	Pas de tache	Jaune	Jaune	Pas de tache
	Rf	0.60	0.08	0.80	0.08	0.05

Tableau 4a Hydrolyse enzymatique de l'inconnu II.

		TR ^c	UV ^a			EC ^b	
ID	Pic #		Hauteur (µm)		Absorbance (nm)	Hauteur (µm)	
			280 nm	320 nm		200 mV	600 mV
II	1	6	2.9	4.2	200, 260	18.3	116.2
Entreposé	1	7	NP ^d	NP ^d	199	16.3	56.5
	3	17	NP ^d	NP ^d	199, 234	NP ^d	OS ^e
	4	18	7.4	NP ^d	197, 204, 281	NP ^d	NP ^d
PH 6.8	1	7	NP ^d	NP ^d	213	11.2	56.7
	3	16	NP ^d	NP ^d	197, 207, 231	NP ^d	OS ^e
	4	17	2.3	NP ^d	197, 277	NP ^d	NP ^d
α- glucosidase	1	7	NP ^d	NP ^d		12.0	56.3
	3	17	NP ^d	NP ^d		NP ^d	OS ^e
	4	18	5.7	NP ^d		NP ^d	NP ^d
	14	42	2.6	4.0		98.0	21.0
PH 5.0	1	7	NP ^d	NP ^d	216	14.1	56.5
	3	17	NP ^d	NP ^d	197, 208, 233	NP ^d	OS ^e
	4	18	7.1	NP ^d	195, 278	NP ^d	NP ^d
	16	43	3.7	NP ^d	201, 231, 273	NP ^d	NP ^d
β-glucosidase	1	7	NP ^d	NP ^d	214	12.4	56.5
	3	16	NP ^d	NP ^d	197, 232	NP ^d	OS ^e
	4	17	7.2	NP ^d	197, 278	NP ^d	NP ^d
PH 3.8	1	7	NP ^d	NP ^d	195	4.7	28.2
	3	18	NP ^d	NP ^d	195, 209, 234	NP ^d	OS ^e
	4	19	7.2	NP ^d	195, 209, 280	NP ^d	NP ^d
	14	42	5.5	6.7	197, 253	188.4	35.2
	16	45	3.4	1.0	197, 226, 267	NP ^d	49.3
Hespéridinase	1	7	NP ^d	NP ^d	195	7.0	23.1
	3	18	NP ^d	NP ^d	195, 206	NP ^d	261.5
	4	19	16.4	NP ^d	195, 207, 278	NP ^d	NP ^d
	5	20	337.1	15.9	195, 225, 283	NP ^d	NP ^d
	11	32	283.0	5.8	197, 226, 280	10.8	NP ^d
	15	42	13.8	2.7	197, 279	11.4	174.4
^a UV : Détection en ultraviolet				^d NP : Pic absent			
^b EC : Détection en électrochimie				^e OS : Pic au dessus des limites			
^c TR : Temps de rétention (min)				^f NR : Non retrouvable			

Tableau 4b Hydrolyse enzymatique de l'inconnu I2.

ID	Pic #	TR ^c	UV ^a		EC ^b		
			Hauteur (µm)		Absorbance (nm)		
			280 nm	320 nm	Hauteur (µm)		
					200 mV	600 mV	
I2	2	10	21.9	1.1	220	NP ^d	NP ^d
Entreposé	1	7	NP ^d	NP ^d	214	10.5	44.2
	2	9	15.5	NP ^d	211	NP ^d	NP ^d
	3	17	NP ^d	NP ^d	195, 231	NP ^d	OS ^e
PH 6.8	1	7	NP ^d	NP ^d	213	11.9	54.9
	2	9	7.1	NP ^d	209	NP ^d	NP ^d
	3	17	NP ^d	NP ^d	197, 235	NP ^d	104.6
α- glucosidase	1	7	NP ^d	NP ^d	214	13.2	66.2
	2	9	10.0	NP ^d	211	NP ^d	NP ^d
	3	17	NP ^d	NP ^d	197, 243	NP ^d	71.3
PH 5.0	1	7	NP ^d	NP ^d	195, 207	10.5	59.6
	2	9	10.3	NP ^d	209	NP ^d	NP ^d
	3	17	NP ^d	NP ^d	197, 237	NP ^d	1137.6
	13	40	4.8	1.0	201, 275	NP ^d	73.4
	15	42	2.2	NP ^d	201, 264	NP ^d	NP ^d
β-glucosidase	1	7	NP ^d	NP ^d	NR ^f	14.0	61.5
	2	9	7.9	NP ^d	NR ^f	NP ^d	NP ^d
	3	17	NP ^d	NP ^d	NR ^f	NP ^d	654.5
	15	43	3.4	0.6	NR ^f	NP ^d	47.6
PH 3.8	1	7	NP ^d	NP ^d	195	8.6	33.9
	2	11	8.9	NP ^d	209	NP ^d	NP ^d
	3	18	NP ^d	NP ^d	193, 209, 238	NP ^d	833.9
	16	44	8.0	1.0	197, 227, 271	NP ^d	13.6
Hespéridinase	1	7	NP ^d	NP ^d	195	9.1	25.4
	3	18	NP ^d	NP ^d	194, 208	NP ^d	76.3
	5	19	378.6	12.9	195, 226, 283	NP ^d	NP ^d
	11	32	119.8	3.7	195, 225, 280	5.5	NP ^d
	12	38	21.4	3.7	197, 284	137.0	67.8
	13	40	25.7	6.0	197, 223, 280	NP ^d	355.9
	15	42	577.5	106.9	210, 282, 323	38.4	OS ^e
	17	48	12.8	2.3	197, 276	NP ^d	NP ^d
	19	51	4.3	6.0	197, 252, 366	158.9	220.3
^a UV : Détection en ultraviolet					^d NP : Pic absent		
^b EC : Détection en électrochimie					^e OS : Pic au dessus des limites		
^c TR : Temps de rétention (min)					^f NR : Non retrouvable		

Tableau 4c Hydrolyse enzymatique de l'inconnu I3.

ID	Pic #	TR ^c	UV ^a		EC ^b	
			Hauteur (µm)		Hauteur (µm)	
			280 nm	320 nm	200 mV	600 mV
I3	3	17	NP ^d	NP ^d	197, 235	NP ^d 738.6
Entreposé	1	7	NP ^d	NP ^d	195, 208	7.9 28.2
	3	16	NP ^d	NP ^d	197, 232	NP ^d OS ^e
	4	17	1.5	NP ^d	197, 271	NP ^d NP ^d
PH 6.8	1	7	NP ^d	NP ^d	195, 207	8.8 40.5
	3	16	NP ^d	NP ^d	197, 237	NP ^d 1450.9
	4	17	1.8	NP ^d	197, 279	NP ^d NP ^d
	9	26	2.5	5.4	199, 251, 310	NP ^d NP ^d
α- glucosidase	1	7	NP ^d	NP ^d	216	13.0 50.0
	3	16	NP ^d	NP ^d	197, 232	NP ^d 1543.8
	4	17	1.9	NP ^d	197, 277	NP ^d NP ^d
	14	40	4.4	6.7	201, 253	161.6 43.8
PH 5.0	1	7	NP ^d	NP ^d	227	14.4 69.8
	3	17	NP ^d	NP ^d	234	NP ^d 1430.2
	4	18	2.1	NP ^d	231, 272	NP ^d NP ^d
	16	43	1.7	1.0	201, 268	NP ^d 23.3
β-glucosidase	1	7	NP ^d	NP ^d	225	10.6 48.6
	3	17	NP ^d	NP ^d	229	8.3 OS ^e
	4	18	2.2	NP ^d	224, 276	NP ^d NP ^d
	13	41	7.2	1.3	201, 272	NP ^d 97.2
PH 3.8	1	7	NP ^d	NP ^d	193, 209	NR ^f 32.4
	3	17	NP ^d	NP ^d	193, 211	NR ^f 673.0
	4	18	2.4	NP ^d	278	NR ^f NP ^d
	16	44	5.2	1.0	197, 227, 270	NR ^f 5.4
Hespéridinase	1	7	NP ^d	NP ^d	193, 207	11.5 28.9
	3	17	NP ^d	NP ^d	193, 209	NP ^d 220.2
	4	18	5.3	0.6	193, 211, 274	NP ^d NP ^d
	5	19	160.0	7.8	193, 223, 283	NP ^d NP ^d
	11	32	99.0	2.4	195, 280	15.4 NP ^d
	16	44	8.0	NP ^d	197, 227, 268	NP ^d 4.4
	18	48	2.0	2.9	197, 246	NP ^d NP ^d
^a UV : Détection en ultraviolet				^d NP : Pic absent		
^b EC : Détection en électrochimie				^e OS : Pic au dessus des limites		
^c TR : Temps de rétention (min)				^f NR : Non retrouvable		

Tableau 4d Hydrolyse enzymatique de l'inconnu I4.

ID	Pic #	TR ^c	UV ^a		EC ^b		
			Hauteur (µm)		Hauteur (µm)		
			280 nm	320 nm	Absorbance (nm)		
						200 mV	600 mV
I4	6	23	12.9	11.9	200, 235, 280, 310	NP ^d	431.5
Entreposé	1	7	NP ^d	NP ^d	195, 211	9.1	41.0
	3	17	NP ^d	NP ^d	197	NP ^d	84.6
	4	18	24.7	0.5	197, 282	NP ^d	NP ^d
	6	23	16.7	11.0	199, 229, 276, 307	8.0	635.9
	7	25	2.4	NP ^d	199, 279	NP ^d	NP ^d
PH 6.8	1	7	NP ^d	NP ^d	191, 215	12.0	54.3
	3	16	NP ^d	NP ^d	197	NP ^d	382.7
	4	17	2.0	NP ^d	197, 270	NP ^d	NP ^d
	5	18	13.5	0.6	197, 281	NP ^d	NP ^d
	6	23	14.6	10.3	199, 229, 275, 306	NP ^d	614.8
	7	25	2.2	NP ^d	199, 281	NP ^d	NP ^d
α- glucosidase	1	7	NP ^d	NP ^d	216	7.3	24.4
	3	16	NP ^d	NP ^d	197	NP ^d	319.5
	4	17	2.3	NP ^d	197, 277	NP ^d	NP ^d
	5	18	10.9	NP ^d	197, 281	NP ^d	NP ^d
	6	24	14.9	8.1	199, 232, 274, 305	NP ^d	604.8
	7	25	1.9	NP ^d	199, 279	NP ^d	NP ^d
PH 5.0	1	7	NP ^d	NP ^d	220	12.2	53.7
	3	17	NP ^d	NP ^d	193, 211	NP ^d	611.2
	4	18	2.7	NP ^d	193, 210, 272	NP ^d	NP ^d
	5	19	13.8	NP ^d	195, 207, 282	NP ^d	NP ^d
	6	24	15.1	11.2	197, 225, 274, 304	NP ^d	137.0
	7	25	1.6	NP ^d	197, 272	NP ^d	NP ^d
	10	30	2.1	NP ^d	197, 270	NP ^d	NP ^d
	16	43	4.3	NP ^d	197, 225, 272	NP ^d	NP ^d
β-glucosidase	1	7	NP ^d	NP ^d	NR ^f	7.1	54.1
	3	17	NP ^d	NP ^d	NR ^f	NP ^d	221.6
	4	18	3.0	NP ^d	NR ^f	NP ^d	NP ^d
	5	19	13.3	NP ^d	NR ^f	NP ^d	NP ^d
	6	24	16.1	12.2	NR ^f	NP ^d	678.4
	7	25	2.2	NP ^d	NR ^f	NP ^d	NP ^d
	10	30	2.1	NP ^d	NR ^f	NP ^d	NP ^d
	16	43	4.1	NP ^d	NR ^f	NP ^d	NP ^d
PH 3.8	1	7	NP ^d	NP ^d	215	11.2	32.0
	3	17	NP ^d	NP ^d	193, 212	NP ^d	170.7
	4	18	3.2	NP ^d	193, 214, 279	NP ^d	NP ^d
	5	19	10.0	NP ^d	193, 214, 281	NP ^d	666.7
	6	24	16.8	12.8	195, 208, 227, 276, 305	NP ^d	NP ^d
	7	25	1.9	NP ^d	195, 207, 280	NP ^d	NP ^d
	10	30	4.5	NP ^d	197, 280	NP ^d	NP ^d
	16	44	1.8	NP ^d	197, 226, 272	NP ^d	NP ^d
Hespéridinase	1	7	NP ^d	NP ^d	191, 215	11.3	25.0
	5	19	376.9	12.5	195, 227, 283	NP ^d	NP ^d
	6	24	17.9	9.3	195, 207, 226, 277	NP ^d	561.4
	10	30	700	15.5	197, 228, 280	NP ^d	NP ^d
^a UV : Détection en ultraviolet					^d NP : Pic absent		
^b EC : Détection en électrochimie					^e OS : Pic au dessus des limites		
^c TR : Temps de rétention (min)					^f NR : Non retrouvable		

Tableau 4e Hydrolyse enzymatique de l'inconnu I5.

		TR ^c	UV ^a		EC ^b		
ID	Pic #		Hauteur (µm)		Absorbance (nm)	Hauteur (µm)	
			280 nm	320 nm		200 mV	600 mV
I5	8	25	21.5	29.9	200, 215, 225, 305	19.2	76.3
Entreposé	1	7	NP ^d	NP ^d	215	11.1	42.6
	8	25	39.5	46.1	199, 232, 303	33.3	1922.0
PH 6.8	1	7	NP ^d	NP ^d	213	12.5	53.6
	8	25	32.7	37.5	199, 232, 301	27.2	422.6
α- glucosidase	1	7	NP ^d	NP ^d	213	12.4	47.4
	8	25	29.8	37.7	199, 232, 302	25.3	1410.5
PH 5.0	1	7	NP ^d	NP ^d	193, 207	15.5	35.3
	8	25	37.0	41.1	197, 229, 302	40.0	1611.8
	16	43	3.5	NP ^d	198, 224, 276	NP ^d	NP ^d
β-glucosidase	1	7	NP ^d	NP ^d	194, 209	16.1	70.9
	8	25	40.3	48.5	197, 231, 303	42.0	1943.2
	16	43	2.9	NP ^d	197, 229, 271	NP ^d	NP ^d
PH 3.8	1	7	NP ^d	NP ^d	193	NR ^e	42.3
	8	25	34.3	40.5	197, 229, 302	31.0	1915.5
	14	41	1.7	2	197, 250	65.9	NP ^d
Hespéridinase	1	7	NP ^d	NP ^d	195	12.1	38.9
	5	19	223.7	7.4	197, 224, 283	NP ^d	NP ^d
	8	25	28.9	36.6	197, 232, 297	25.3	1500.0
	10	31	721.1	14.5	197, 227, 280	NP ^d	NP ^d
	12	37	NP ^d	2.6	197, 280	103.3	33.3
	14	41	NP ^d	2.1	197, 251	74.7	222
	19	51	NP ^d	1.7	197, 251	50.5	38.9
^a UV : Détection en ultraviolet				^d NP : Pic absent			
^b EC : Détection en électrochimie				^e OS : Pic au dessus des limites			
^c TR : Temps de rétention (min)				^f NR : Non retrouvable			



Figure 1b Chromatographie analytique par HPLC des produits d'hydrolyse de l'hésperidinase de I2. Le blanc utilisant (A) une détection ultraviolet à 280 (—) et 320 nm (----) puis (B) une détection électrochimique à 200 (—) et 600 mV (-----). L'échantillon hydrolysé utilisant (C) une détection ultraviolet à 280 (—) et 320 nm (-----) puis (D) une détection électrochimique à 200 (—) et 600 mV (-----).

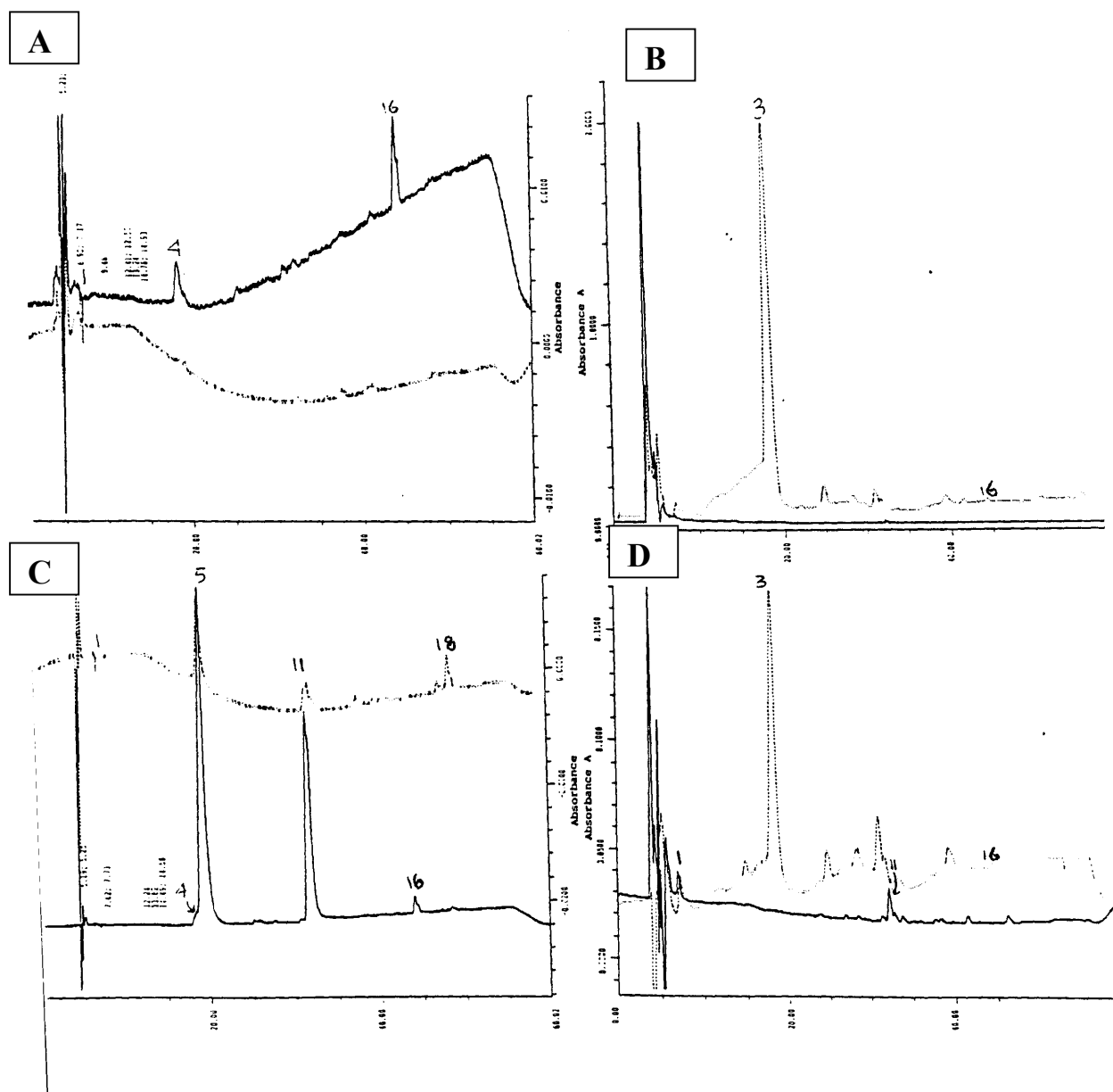


Figure 1c Chromatographie analytique par HPLC des produits d'hydrolyse de l'hespéridinase de I3. Le blanc utilisant (A) une détection ultraviolet à 280 (—) et 320 nm (----) puis (B) une détection électrochimique à 200 (—) et 600 mV (-----). L'échantillon hydrolysé utilisant (C) une détection ultraviolet à 280 (—) et 320 nm (-----) puis (D) une détection électrochimique à 200 (—) et 600 mV (-----).

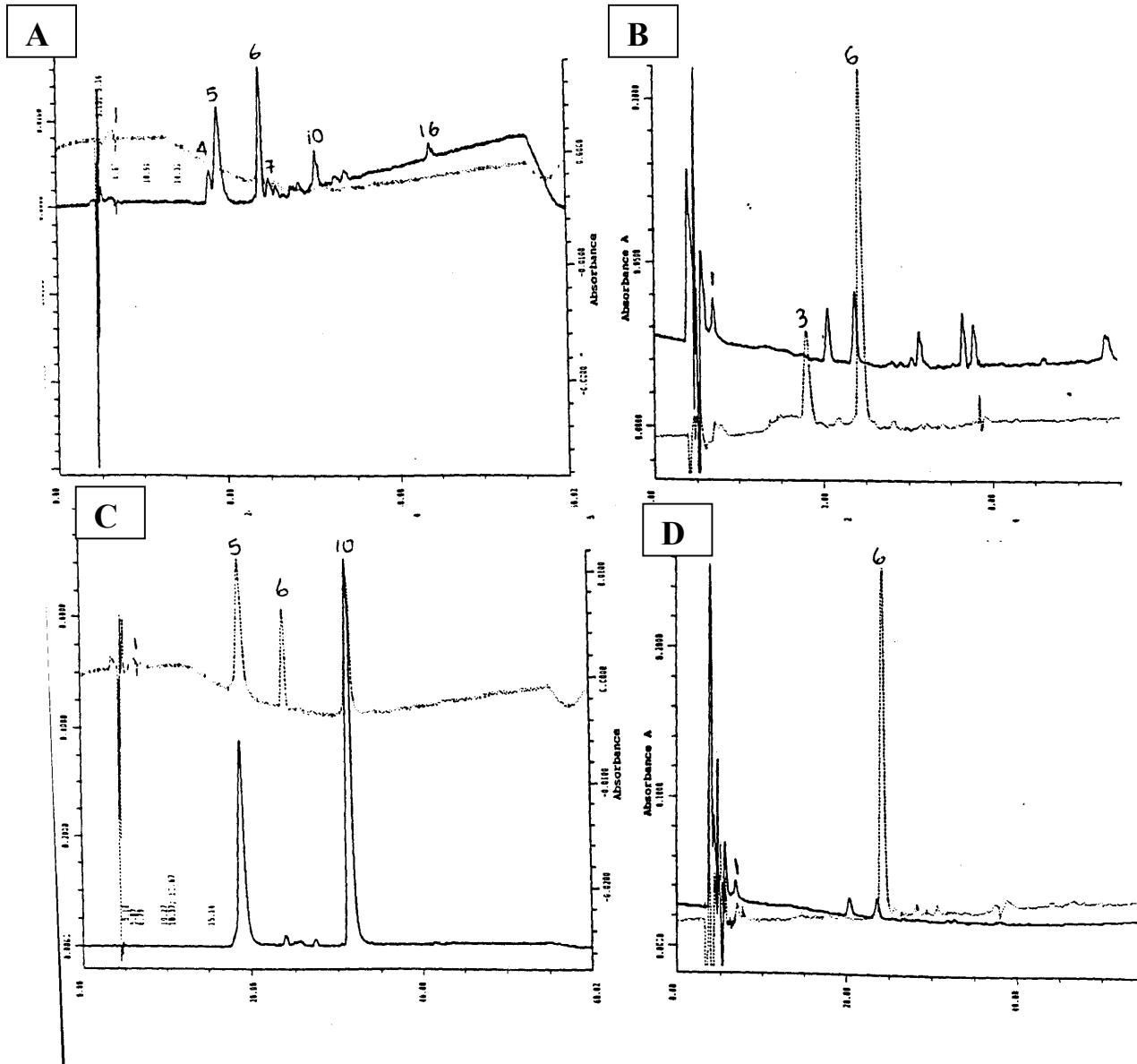


Figure 1d Chromatographie analytique par HPLC des produits d'hydrolyse de l'hespéridinase de I4. Le blanc utilisant (A) une détection ultraviolet à 280 (—) et 320 nm (---) puis (B) une détection électrochimique à 200 (—) et 600 mV (----). L'échantillon hydrolysé utilisant (C) une détection ultraviolet à 280 (—) et 320 nm (----) puis (D) une détection électrochimique à 200 (—) et 600 mV (-----).

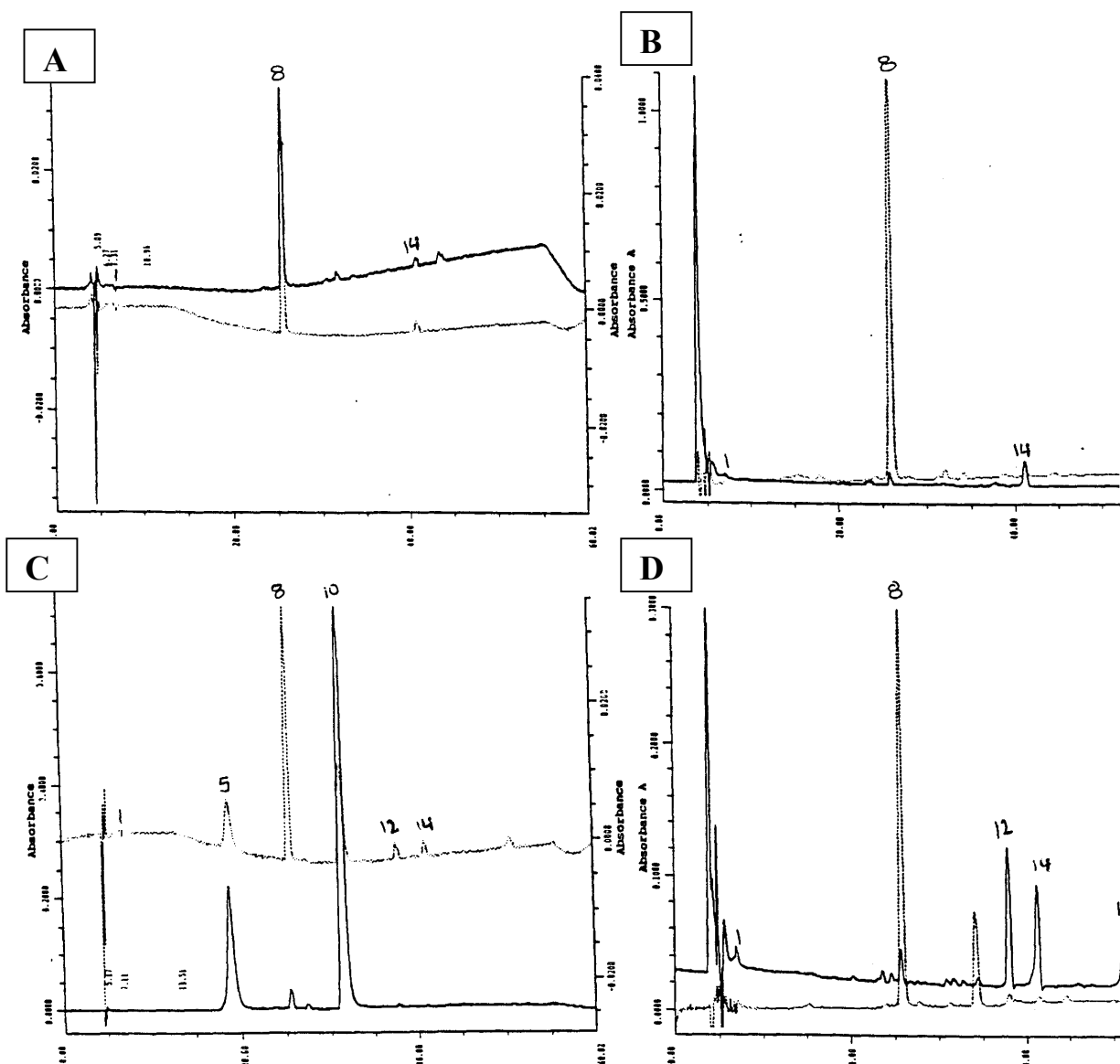


Figure 1e Chromatographie analytique par HPLC des produits d'hydrolyse de l'hespéridinase de I5. Le blanc utilisant (A) une détection ultraviolet à 280 (—) et 320 nm (---) puis (B) une détection électrochimique à 200 (—) et 600 mV (-----). L'échantillon hydrolysé utilisant (C) une détection ultraviolet à 280 (—) et 320 nm (-----) puis (D) une détection électrochimique à 200 (—) et 600 mV (-----).

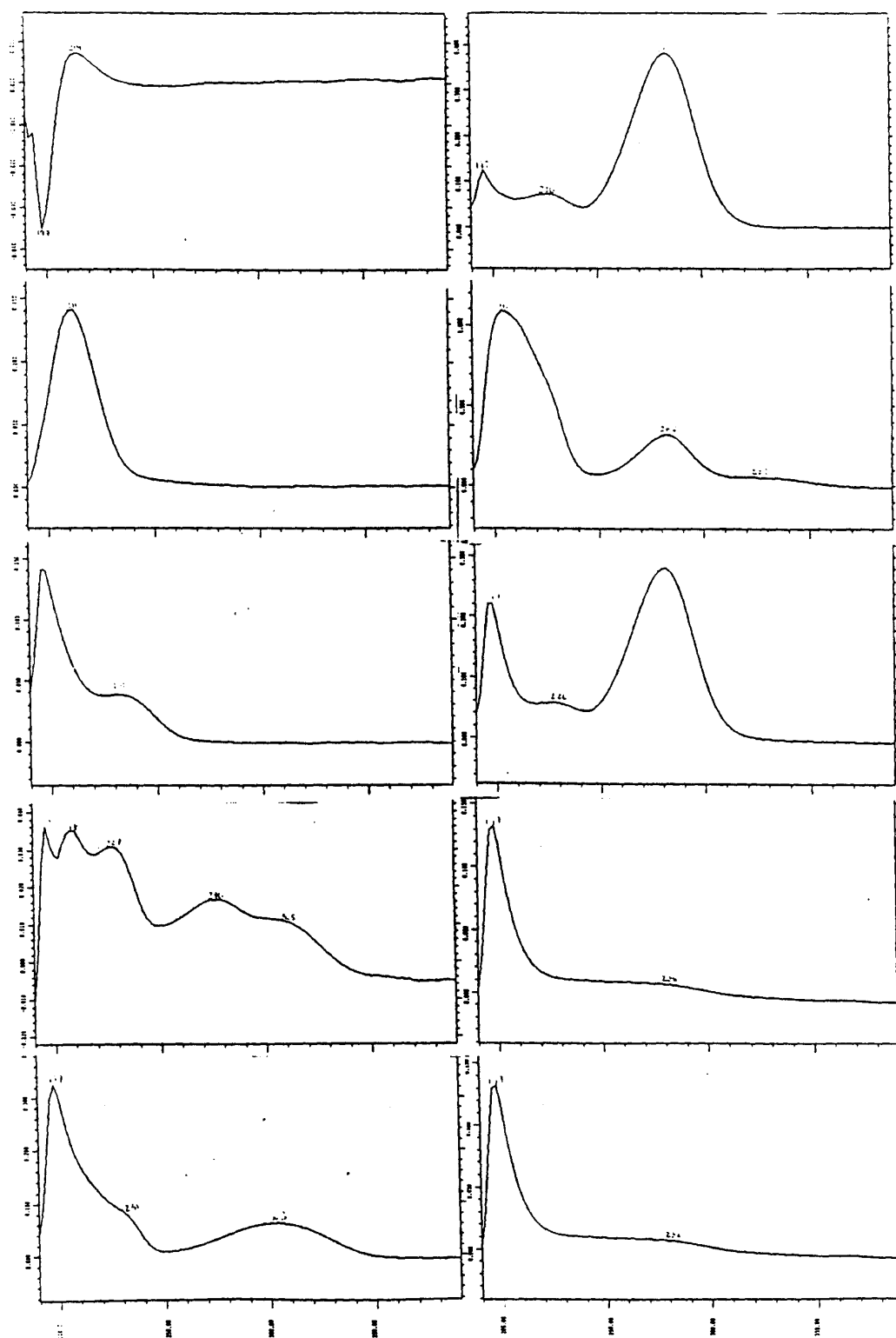


Figure 2. Spectres d'absorption des inconnus et de leur produit d'hydrolyse par l'hésperidinase, I1-pic #5 (A), I2-pic #15 (B), I3-pic #11 (C), I4-pic #10 (D) et I5-pic #10 (E).