

# Fractionnement des produits de réaction de Maillard par différentes techniques et observation d'activité fermentaire de ces fractions.

## II. Fractionnement par chromatographie de partage.

Yang Hee Lee

Institut Coréen de Science et de Technologie, Séoul, Corée.

Léon Petit et Eliane Fittes

Station de Biochimie des Céréales, I.N.R.A. 91-Massy, France.

여러 가지 방법에 의한 Premelanoidin 의 分割과

그 分割物의 醱酵活性에 關한 觀察

II. 分配크로마토그래피에 의한 分割

李 陽 熙

韓國科學技術研究所

레온 뻬띠, 엘리안 뢰뜨

佛蘭西 國立農業研究院 穀類生化學研究所

(1969年 1月 20日 受理)

### 要 約

Partition chromatography 의 方法으로는 우선 cellulose powder column 을 시도해 보았으나 이는 얻어진 fraction 의 용매제거의 難點이 있으므로 結局 paper chromatography 方法만을 使用하였다.

研究結果로는 우선 갈색색소의 fraction 에 있어서 醱酵初期에 약간의 活性을 觀察할수 있었으며 glycine 이 함유된 fraction 에서는 발효초기에 벌써 상당한 活性을 보였으며 이는 또한 발효의 進行에 따라 점차 증가되었다. 그리고 N-glycoside 의 fraction 에서는 발효초기에 微弱한 活性을 관찰할수 있었다.

그러나 paper chromatography 의 方法은 本實驗에 적합하지 않다고 생각되며 그 理由는 一回에 fractionation 할수있는 試料의 量이 極히 제한되어 있다는 點과 또 fractionation 도중에 他物質의 오염으로 因해서 試料의 正確한 발효 活性을 測定할수 없다는 것이다.

Comme la technique de chromatographie de partage, nous avons essayé la chromatographie sur colonne de poudre de cellulose et la chromatographie sur papier. Mais, la première nous ayant posés des difficultés d'élimination du solvant dans les fractions destinées au test de fermentation, nous n'avons finalement utilisé que la méthode de chromatographie sur papier.

### Méthodes expérimentales.

Sur un papier Watman No. 1 de 13 cm de large, on dépose 13 taches de 10  $\mu$ l de produit 1 M, distantes de 1 cm; on procède par chromatographie descendante avec le solvant butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5). Au bout du temps voulu (24 ou 48 heures), on sort la feuille et on laisse évaporer à température ambiante. On coupe une partie de la feuille sur une largeur de 1 cm et révèle cette partie; après la localisation des substances sur ce

témoin, on découpe la feuille principale pour isoler les constituants. On les élue à l'eau distillée, on amène à sec en dessiccateur sous vide, puis on reprend dans 0,6 ml d'eau distillée ce qui correspond à une solution 0,2 M des produits initiaux.

## Résultats

### 1. Etude en chromatographie sur papier des prémélanoidines

Avant d'appliquer cette méthode au fractionnement des produits destinés au test de fermentation, nous avons effectué un essai général sur les prémélanoidines, avec les témoins de glucose et de glycolle, en vue d'examiner la séparation des produits par cette technique.

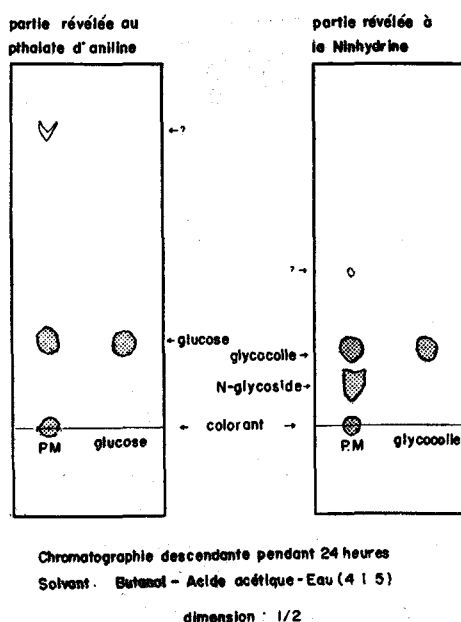


Fig. 1 Chromatogramme des prémélanoidines

La Fig. 1 montre deux chromatogrammes, l'un révéillé au phtalate d'aniline, et l'autre à la ninhydrine. On constate que le glucose, le glycolle, et le N-glycoside sont séparés par des valeurs de Rf. respectivement de 0,128, 0,114 et 0,0628; par contre, le colorant reste où on l'a déposé et ne migre pas. Nous mettons en évidence, avec chacun des réactifs, la présence de composés dont l'identité est inconnue; en ce qui concerne la tache réagissant à la ninhydrine, peut-être s'agit-il du diglycoside dont la présence dans les milieux de réaction a parfois été signalée

### 2. Fractionnement et test fermentaire

Pour le fractionnement des prémélanoidines destiné aux tests fermentaires, une méthode particulière que nous avons décrite plus haut. Est appliquée car, la quantité de produits dans une tache de chromatogramme n'est pas suffisante pour ce test.

#### 2-1 Fractionnement par un développement de 24 heures.

En traitant les prémélanoidines, pendant 24 heures, par chromatographie descendante, nous avons obtenu les six fractions suivantes:

- (1) La fraction qui contient le colorant
- (2) La fraction qui contient le glucose, le glycolle et le N-glycoside
- (3) La fraction qui contient la tache inconnue révélée à la ninhydrine (cf. Fig. 1)
- (4) La fraction de la tache jaune révélée au phtalate d'aniline (cf. Fig. 1)
- (5) La partie terminale du chromatogramme, où les deux réactifs utilisés ne décelent aucun

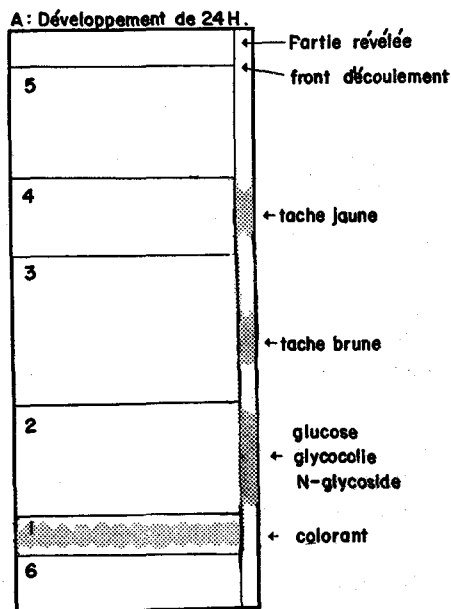


Fig. 2 Fractionnement des prémélanoidines par chromatographie sur papier

- (6) La partie du chromatogramme qui ne contient certainement aucun composé. (cf. Fig. 2)

En Examinant le tableau nous remarquons:

- Une action forte mais décroissante au cours de

**Tableau 1** Résultats du test fermentaire

Fractions	Vitesse de dégagement de CO <sub>2</sub> (μ/mn.) après un temps de fermentation de :		
	3 heures	6 heures	22 heures
témoin eau	2,90	1,93	0,90
(1)	12,23	10,75	8,00
(2)	11,30	18,73	0
(3)	7,87	5,65	2,49
(4)	7,22	5,08	2,01
(5)	7,23	5,60	2,53
(6)	7,28	4,51	1,53

la fermentation de la fraction qui contient le colorant.

- Une action forte et croissante de la fraction qui contient le glucose, le glycolle et le N-glycoside.
- Les fractions (3), (4), (5), (6), montrent une activité presque identique entre eux et elle est assez intense par rapport au témoin eau. Cependant fraction (6) ne contient aucun composé, peut-être, son activité provient d'une influence du traitement chromatographique.

#### 2-2 Fractionnement par un développement de 48 heures

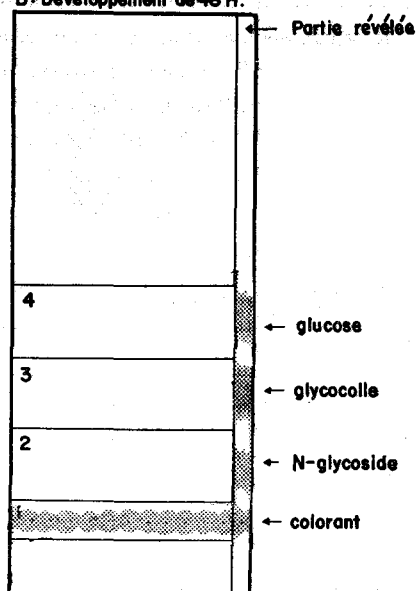
Lorsque l'on développe pendant 24 heures, la séparation entre le glucose, le glycolle et le N-glycoside n'est pas très nette. Pour obtenir une meilleure séparation de des produits, nous avons développé le chromatogramme pendant 48 heures. Ainsi, nous obtenons les fractions du colorant, du N-glycoside, du glycolle et du glucose. Les taches inconnues qui ont été décelées par un développement de 24 heures sont écoulées hors du papier.

- (1) La fraction du colorant
- (2) La fraction du N-glycoside
- (3) La fraction du glycolle
- (4) La fraction du glucose (cf. Fig 3)

Le tableau 2 nous indique:

- Une activation forte et décroissante de la fraction du colorant.
- Une faible action au début de la fermentation de la fraction contenant le N-glycoside.
- Une action croissante de la fraction contenant le glycolle.
- Une action supérieure au témoin eau de la fraction du glucose.

**B: Développement de 48 H.**



**Fig. 3** Fractionnement des prémélanoidines par chromatographie sur papier

**Tableau 2** Résultats du test fermentaire

fractions	Vitesse de dégagement de CO <sub>2</sub> (μ1/mn.) après un temps de fermentation de :		
	3 heure	6 heures	22 heures
témoin eau	2,90	1,93	0,90
(1)	9,33	5,38	1,97
(2)	6,85	5,11	1,97
(3)	5,87	6,97	12,38
(4)	5,60	5,10	1,77

### 3. Modification de l'activité fermentaire par le traitement chromatographique

Il apparaît que, dans les expériences précédentes, les produits fractionnés par chromatographie sur papier se trouvent modifiés en ce qui concerne leur activité fermentaire. En vue d'expliquer ce phénomène, nous avons effectué une comparaison de l'activité fermentaire entre les prémélanoidines et les prémélanoidines qui ont subi le traitement chromatographique.

- Préparation des échantillons: Nous avons utilisé les quatre échantillons ci-dessous:

- (1) Prémélanoidines non traitées
- (2) Les prémélanoidines sont mélangées avec le solvant et on élimine le solvant par évapola-

tion sous vide endéssicateur.

- (3) On dépose une tache de prémélanoïdines sur le papier, après avoir séché, on fait mouiller la feuille avec le solvant et après une nouvelle évaporation, on l'élue dans l'eau distillée.
- (4) On trempe un morceau de papier dans le solvant et après évaporation, on l'élue dans l'eau distillée.

**Tableau 3** Résultats du test fermentaire

fractions	Vitesse de dégagement de CO <sub>2</sub> ( $\mu$ l/mn.) après un temps de fermentation de :		
	3 heures	6 heures	22 heures
témoin eau	2,43	1,80	1,00
(1)	10,04	16,57	1,00
(2)	11,19	18,46	0,30
(3)	13,53	20,91	0
(4)	6,94	9,24	2,30

Le Tableau 3 montre clairement que l'éluat du papier et du solvant manifeste une action nettement supérieure à celle du témoin eau et que les prémélanoïdines traitées ont une action supérieure à celle des prémélanoïdines non traitées. Nous remarquons aussi que la modification provient surtout du papier.

## Discussion

En examinant les résultats précédents obtenus par la méthode de chromatographie sur papier, nous pouvons remarquer que l'action du colorant se manifeste au début de la fermentation, que celle du glyocolle est toujours croissante en fonction du temps et qu'il y a une légère action du N-glycoside au début de la fermentation.

Cependant, cette technique n'est pas satisfaisante à cause des inconvénients inhérents à la manipulation, de la quantité limitée de produits obtenus et surtout peut-être de la modification de l'action fermentaire par d'éventuelles contaminations survenant au cours des opérations.

## Références Bibliographiques

- 1) STARON. T., ALLARD C. et CHAMBRE M.M. Compt. Rend. Acad. Sci. 253 1630-1632(1961)
- 2) STOFFYN P. J. and JEANLOZ R. W. Arch. Biochem. and Biophys. 52(2) 373-379 (1954)