

168. Sur les phosphopeptides (ovotyrines) obtenus à partir de l'ovovitelline

par Th. Posternak et P. Waegell

(20 VI 64)

Les matières protéiques du jaune d'œuf de poule représentent un mélange complexe dont, à côté de livétines pauvres en phosphore (0,05% de P), on a retiré diverses lipovitellines contenant de 0,3 à 1,1% de P et consistant en une association de phosphoprotéides (vitellines) et de phospholipides. Ces derniers se laissent éliminer au moyen de dissolvants appropriés.

En 1900 déjà, LEVENE & ALSBERG [1]¹⁾ isolèrent de l'ovovitelline totale, par extraction à l'ammoniaque, un composé riche en phosphore qu'ils nommèrent *acide vitellinique*. En 1948 on a retiré du jaune d'œuf un composé analogue, peut-être même identique à l'acide vitellinique auquel on a donné le nom de *phosvitine* [2]; il contenait 9,7% de P et 11,9% de N. Près de 60-70% du phosphore protéinique de la vitelline se laissent obtenir sous cette forme. La phosvitine est d'ailleurs un mélange de trois [3] ou même six [4] composants.

En 1927 S. POSTERNAK & TH. POSTERNAK [5] avaient soumis l'ovovitelline à l'action successive de la pepsine et des ferments pancréatiques. Ils obtinrent des phosphopeptides qu'ils nommèrent *ovotyrines*. Leur teneur en phosphore atteignait 13,8% et le rapport atomique N/P allait de 1,75 à 3,0. Ces phosphopeptides fournirent à l'hydrolyse, à côté de quantités à peu près équimoléculaires de lysine, d'arginine et d'histidine, une proportion considérable de sérine: si l'on tient compte de la destruction de cette dernière au cours de l'hydrolyse, avec formation d'ammoniaque et d'acide pyruvique, la quantité réelle d'acide hydroxyaminé représente 40-45% des phosphopeptides. Après hydrolyse ménagée, les auteurs obtinrent des peptides de rapport N/P allant de 1,1 à 1,3 qui, à l'hydrolyse complète, ne fournirent comme acide aminé que de la sérine; ils en conclurent que l'acide phosphorique est lié à la sérine sous forme d'acide sérine-phosphorique. Cette conclusion fut confirmée par LEVENE et coll. [6] qui isolèrent de l'acide sérine-phosphorique à partir de l'acide vitellinique. La présence dans les ovotyrines de telles quantités de phosphosérine, à côté de teneurs près de 10 fois plus faibles en d'autres acides aminés basiques, rendait probable la présence de séquences de plusieurs phosphosérines consécutives [7]; ceci a été confirmé par WILLIAMS & SANGER [8] qui, après hydrolyse ménagée de la phosvitine, décelèrent par électrophorèse une série de phosphopeptides formés exclusivement de phosphosérine et contenant jusqu'à 6 restes de cette dernière.

Le but du présent travail était de reprendre par des méthodes modernes l'étude des ovotyrines, d'isoler de leur mélange des substances homogènes et d'en préciser la structure.

¹⁾ Les numéros entre crochets renvoient à la bibliographie, p. 1581.

Méthodes et résultats

Méthodes analytiques. Les dosages de P ont été effectués d'après FISKE et SUBBAROW, et aussi d'après BARTLETT [9].

Les dosages d'azote total ont été effectués par micro-KJELDAHL. L'ammoniaque formée après hydrolyse des peptides a été titrée après distillation en présence de magnésie, ou encore estimée à la ninhydrine. Comme le montrent des analyses après 24 h et 72 h d'hydrolyse par HCl 6N à 110°, c'est la sérine seule qui est détruite avec libération d'ammoniaque: cette destruction est de 25% après 24 h et de 41% après 72 h. Il est d'ailleurs bien connu que la sérine engagée dans des chaînes de phosphosérines est particulièrement altérable [5].

La détection des acides aminés après hydrolyse a été effectuée par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de silice G (système *n*-butanol-ac. acét.-H₂O (80:20:20) et phénol-eau (75:25) [10]. Les dosages ont été exécutés au moyen d'un analyseur automatique. Pour obtenir la teneur réelle en sérine, la quantité trouvée après hydrolyse a été corrigée par celle d'ammoniac formé (1 Ser → 1 NH₃).

L'azote-amine libre total a été dosé d'après VAN SLYKE [11], en laissant les prises 30 min en contact avec la solution d'acide nitreux. Une autre méthode partait du dérivé N-dinitrophénylé du peptide, dont la teneur en groupes dinitrophényle (DNP) correspondant, comme indiqué plus bas, à celle en groupes aminés libres du peptide primitif, était déterminée dans NaHCO₃ à 1% au spectrophotomètre à 350 m μ [12], en employant comme substance de référence de la DNP-sérine. La validité de cette méthode repose sur le fait que les coefficients d'extinction ϵ des DNP-amino-acides entrant en ligne de compte, y compris celui de la ϵ -DNP-lysine, sont tous voisins de 16000. De la teneur en P du dérivé dinitrophénylé on déduit le rapport DNP/P; connaissant d'autre part le rapport N/P du phosphopeptide primitif, on peut alors déduire pour ce dernier la teneur en N-amine en % du N total. Les deux méthodes (VAN SLYKE et spectrophotométrie des dérivés DNP) ont donné des résultats d'une concordance satisfaisante, ce qui indique qu'on peut négliger les groupes DNP fixés aux noyaux imidazoliques des restes d'histidine non N-terminaux, groupes dont les ϵ sont semble-t-il peu élevés²⁾; dans les DNP-dérivés de nos phosphopeptides, les noyaux d'imidazole sont d'ailleurs restés en partie tout au moins inaltérés, à en juger par la réaction de PAULY. Le nombre d'acides aminés de la chaîne a été calculé de la manière suivante, en tenant compte du contenu en lysine, et par conséquent en groupes ϵ -aminés du peptide: Désignons par *a* le nombre de μ at. de N, par *b* celui des μ moles de lysine et par *c* le nombre total de μ moles d'acides aminés, contenus dans 10 mg de peptide; désignons d'autre part par *x* le nombre d'acides aminés par chaîne peptidique, et enfin par *d* la teneur en N-amine libre en % de N total. On a:

$$\frac{d}{100} = \left(\frac{bx}{c} + 1 \right) / \frac{ax}{c} \quad x = \frac{100c}{ad - 100b}$$

L'identification des acides N-terminaux a été effectuée, après hydrolyse des peptides dinitrophénylés, par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince [15]. Les déterminations d'acides C-terminaux ont été essayées par le procédé de l'hydrazinolyse [16], qui comporte 10 h de chauffe du peptide à 100° avec de l'hydrazine anhydre et une séparation des acides C-terminaux ainsi libérés par chromatographie sur couche mince sous forme de DNP-dérivés [15].

Préparation des phosphopeptides (ovotyrimines). La préparation des ovotyrimines n'avait été décrite autrefois [5] que très succinctement. Nous l'indiquons donc ici avec quelques détails [17].

L'ovovitelline brute avait été obtenue par épuisement de jaune d'œuf au moyen d'alcool à 95% bouillant: l'insoluble est séché à l'air. 100 g de cette vitelline (contenant 0,90% de P) sont suspendus dans 5 l de HCl à 0,2% à 40°. On introduit 2 g de pepsine FAIRSCHILD ou PARKE-DAVIS, et maintient à 38°. Si l'on agite fréquemment, la vitelline se dissout presque complètement au bout de 2 h. Après 24 h, il s'est déposé un précipité floconneux qui contient près de 70% du P de la vitelline. Il est filtré, lavé et malaxé avec de l'eau; la bouillie d'un vol. de 300 ml est additionnée de 4 g de carbonate et de 12 g d'hydrogénocarbonate de sodium anhydres. On complète à 550 ml au moyen d'eau chaude (température finale 40°) et introduit 4-5 g de bouillie pancréatique obtenue en

²⁾ L'im-mono-DNP-histidine a été décrite comme incolore [13]. Un mode de préparation de ce composé vient d'être publié [14]; l'extinction indiquée pour ce corps dans HCl 0,01N est très faible à 350 m μ .

passant à la machine à hâcher du pancréas de bœuf frais débarrassé mécaniquement de ses parties grasses. Dans certaines expériences, la bouillie pancréatique a été remplacée par du *Pancreatinum absolutum* MERCK, ce qui ne présente aucun avantage. Après introduction de 20 ml de toluène, on laisse 48 h à 40°. Le pH est ajusté à 4,5 au moyen d'acide acétique glacial. On filtre, ajuste le pH à 8 au moyen d'ammoniaque et ajoute 30 ml d'acétate de plomb à 20%. Le précipité est essoré, lavé et malaxé dans un mortier avec 50 ml d'eau. On ajoute peu à peu, en agitant continuellement, du carbonate de sodium à 10% jusqu'à persistance d'une réaction faiblement alcaline au papier de phénolphtaléine. Dans ces conditions, seuls les sels phospho-organiques sont décomposés, alors que les petites quantités d'orthophosphate de plomb présentes restent inaltérées et sont éliminées par filtration en même temps que le carbonate de plomb. La solution de sels sodiques est acidifiée à l'acide acétique après dilution à 400 ml. On ajoute de l'acétate de calcium à 10% en excès. Le précipité des sels de calcium des phosphopeptides est malaxé avec de l'eau; on ajoute, en agitant continuellement, HCl 6N: à un pH suffisamment bas, les phosphopeptides se séparent en un précipité volumineux qu'on essore et malaxe encore deux fois avec de l'acide chlorhydrique à 2%. On suspend le précipité dans 35 ml d'eau et ajoute du NaHCO₃ solide en quantité suffisante pour obtenir sa dissolution. Le produit est reprécipité par addition de HCl 6N en léger excès par rapport au NaHCO₃. La suspension est additionnée d'un vol. d'alcool. On recueille le produit par centrifugation et on le lave à l'alcool à 50% puis à l'alcool absolu jusqu'à disparition de la réaction des ions Cl. On sèche enfin dans le vide. Obtenu 3,0–3,5 g. Le produit représente un mélange de ce qui

Tableau I. *Caractéristiques analytiques des substances I, II et III*

Subst.	% P	% N	N/P	N-amine en % de N tot.		Nbr moyen d'ac. aminés par chaîne	Acides terminaux	
				Méthode VAN SLYKE	Méthode DNP		N-	C- (par hydrazinolyse)
I	12,71	10,33	1,80	10,6	–	–	–	–
II	12,90	10,70	1,83	8,2	8,3	31	Ser <i>F</i> ³⁾ ; Asp <i>f</i> ; Lys <i>f</i>	Lys <i>F</i> ; Ser <i>f</i> ; Arg ⁴⁾ <i>ff</i>
III	12,4	10,8	1,93	6,0	5,9	100	Ser <i>F</i> ; Asp <i>ff</i>	Lys <i>F</i> ; Ser <i>f</i> ; Arg <i>ff</i>

Composants	Substance III		Mol. (resp. At.) sur 100 ac. aminés
	Substance II Mol.-g dans 10 ⁴ g	Mol.-g dans 10 ⁴ g	
P	39,7	33,8	67,0
Ser	44,0	40,4	80,0
Lys	4,2	3,4	6,8
His	2,1	1,7	3,4
Arg	3,1	2,8	5,5
Asp	2,1	1,6	3,1
Gly	0,3	0,3	0,6
Ala	0,3	0,2	0,4
Thr	0,1	0	0
Val	0,1	0	0
Ile + Leu	0,1	0	0
Glu	0,15	0	0

³⁾ *F* = fort; *f* = faible; *ff* = très faible.

⁴⁾ L'arginine est décelée sous forme de son produit d'hydrazinolyse, l'ornithine.

avait été désigné autrefois comme ovotyrines α et β . Il contient, après dessiccation à 110° sur P_2O_5 , de 12,6 à 12,9% de P et de 1,3 à 2,5% de Fe; N/P = 1,80–2,0. Le fer peut être éliminé complètement par 6 dialyses de 24 h, à 4° de la solution à 10% (pH 6) du sel sodique du phosphopeptide contre du Complexon III 0,1M, ajusté à pH 6,0.

Dinitrophénylation. La dinitrophénylation complète de ces phosphopeptides est difficile et exige des traitements répétés par le dinitrofluorobenzène (DNFB). 100 mg de phosphopeptide, suspendus dans 0,5 ml d'eau, sont dissous par addition de 0,75 ml de triméthylamine 0,5M. On ajoute 0,3 ml d'une solution alcoolique à 4% de DNFB. En l'espace de 4 jours on introduit encore à 6 reprises 0,25 ml de la solution de DNFB en ajustant chaque fois le pH à 8,0 au moyen de la triméthylamine. Pour finir, on ajoute un volume d'alcool et acidifie à l'acide chlorhydrique. Le DNP-phosphopeptide précipité est lavé à fond à l'alcool. Des mesures colorimétriques ont montré que la réaction n'est complète qu'après le sixième traitement au DNFB.

Essais de fractionnement. Tous les essais ont été effectués à partir d'un produit I obtenu comme indiqué plus haut par l'intermédiaire du sel calcique. Des séparations ont d'abord été tentées par précipitations fractionnées du produit I. On le dissout dans 10 parties d'eau et 0,4 partie de $NaHCO_3$. La substance est précipitée par acidification (pH 2) au moyen de HCl 6N et addition d'un volume d'alcool. La précipitation est répétée une fois, ce qui fournit une substance II. D'autre part, la substance I a été reprécipitée 10 fois dans les conditions indiquées, mais sans addition d'alcool, ce qui conduit avec un rendement de 20% à une substance III. La substance III se distingue des produits I et II par la haute viscosité des solutions de son sel sodique, ce qui est en accord avec une longueur de chaîne plus grande.

La présence de plusieurs acides aminés N-terminaux indique l'hétérogénéité de la substance II. On a alors essayé de la fractionner sur une colonne d'*Ecteola*-cellulose WHATMAN ET 30, avec élution par NaCl aqueux de concentrations déterminées croissantes (stepwise elution). L'adsorbant avait été préalablement lavé avec NaOH 0,5N suivant PETERSON & SOBER [18], puis il avait été équilibré avec le tampon triéthylamine 0,1M-acide acétique 0,1M, de pH 6,0, contenant NaCl 0,1M. La colonne est chargée de 20 g d'*Ecteola*-cellulose (14 × 480 mm). Pour l'introduction dans la colonne, le produit à fractionner (150–200 mg) est dissous dans la quantité minimum de triéthylamine à 1%, et la solution est ajustée à pH 6,0 au moyen d'acide acétique. On élue ensuite avec les volumes suivants de solutions de NaCl dans le tampon triéthylamine-ac. acétique 0,1M de pH 6,0: 400 ml 0,2M; 400 ml 0,3M; 300 ml 0,325M; 300 ml 0,35M; 400 ml 0,4M; 400 ml 0,5M et 400 ml 1M. Le P des éluats est dosé selon BARTLETT [9]. Dans le domaine de concentrations NaCl 0,3M–0,5M, on recueille des fractions de 6,2–6,4 ml.

Les fractions éluées resp. par NaCl 0,3M, 0,325M, 0,35M et 0,4M correspondent sur le graphique (voir figure) à des pics peu prononcés, alors que celle éluee au moyen de NaCl 0,5M représente un pic très accentué⁵⁾. Les diverses solutions sont concentrées à 25–50 ml dans le vide à 25°, le pH étant maintenu à 6,0. On dialyse ensuite (saucisse VISKING) à deux reprises durant 24 h à 4° contre

Tableau II. Caractéristiques analytiques du produit IV

N/P	N-amine en % de N tot. (méthode DNP)	Nombre d'ac. aminés par chaîne	Acides terminaux				
			N-	C- (par hydrazinolyse)			
1,48	6,35	51	Ser	Lys F; Ser f			
Composants pour 51 mol. d'acides aminés							
	P	Ser	Lys	Arg	Asp	His	(Ala, Glu, Gly)
Trouvé	42,0	43,1	3,1	2,8	1,9	0,3	~ 0,1–0,2
Arrondi	42	43	3	3	2	0	0

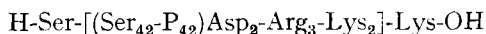
⁵⁾ Une substance II privée de fer par traitement au C complexon a donné sur *Ecteola*-cellulose les mêmes fractions que la substance II primitive.

2 l d'eau bidistillée, puis on évapore le contenu de la saucisse à sec dans le vide en maintenant le pH à 6,0. Le résidu est dissous dans la quantité minimum d'hydrogencarbonate de sodium aqueux; après filtration, on précipite le produit par acidification et on le recueille de la manière habituelle. Refractionnés sur *Ecteola*-cellulose dans les mêmes conditions, ces produits fournissent chacun encore des proportions plus petites des autres fractions. Un produit IV, représentant une fraction NaCl 0,5M refractionnée deux fois, possède les caractères suivants:

Discussion

Les phosphopeptides se distinguent par une grande résistance à l'action des ferments protéolytiques. Ceci est dû à la protection exercée par les groupes phosphorylé sur les liaisons peptidiques voisines [19]. Or, le but de ce travail était d'obtenir des substances d'un rapport P/N aussi élevé que possible, ceci afin de faciliter l'étude de leur structure. Nous avons donc recouru à une attaque enzymatique énergique de la vitelline, en employant notamment un mélange de ferments pancréatiques, et non de la trypsine purifiée dont la spécificité est trop étroite.

Le produit II et, à un moindre degré, le produit III, obtenus tous deux par précipitation fractionnée, sont certainement hétérogènes, en raison de la présence dans chacun d'eux de plusieurs acides aminés N-terminaux; parmi ces derniers, c'est toutefois la sérine qui prédomine. Le produit IV (fraction NaCl 0,5M de la séparation sur *Ecteola*-cellulose) ne contient comme acide N-terminal que de la sérine et apparaît à ce point de vue comme homogène. En ce qui concerne les acides C-terminaux, la méthode d'hydrazinolyse [16] appliquée à des phosphopeptides présente des complications: le traitement qu'elle comporte provoque une minéralisation quasi totale du P, et il n'est pas exclu que les petites quantités de sérine libre toujours présentes soient dues à une dégradation anormale. L'acide aminé principal décelé après hydrazinolyse comme DNP-dérivé est toujours la lysine, ce qui s'explique par la spécificité d'action de la trypsine présente dans le mélange de ferments employé; dans la cas de la substance IV, la lysine est d'ailleurs le seul acide C-terminal décelable, si l'on fait abstraction de la sérine mentionnée plus haut. La structure globale de la substance IV peut alors s'écrire:



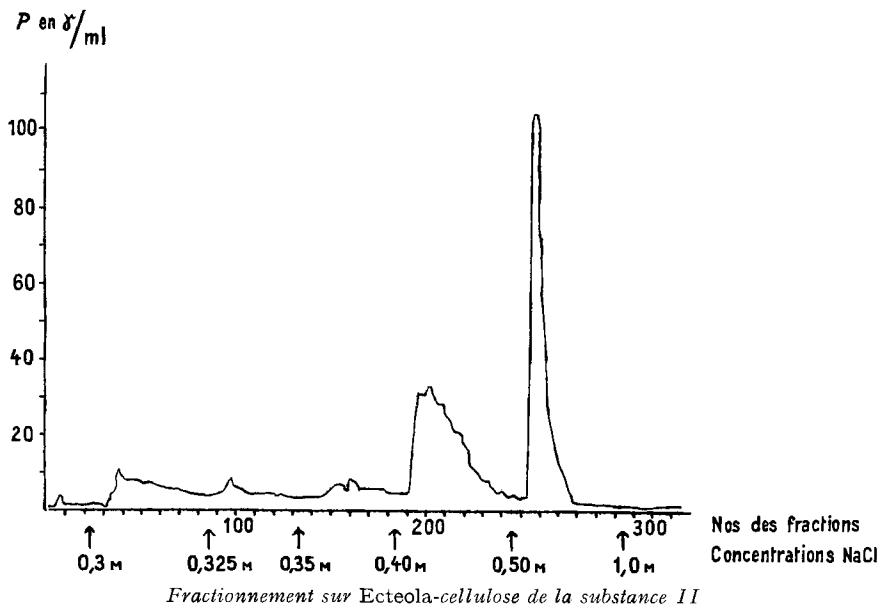
Nous ne pouvons dire si le reste de sérine N-terminal est phosphorylé ou non. D'autre part, il est vraisemblable que les séquences de phosphosérines sont interrompues par les trois autres espèces d'acides aminés présents: arginine, lysine et ac. aspartique. WILLIAMS & SANGER [8] ont obtenu, par hydrolyse ménagée de la phosvitine, des peptides ne contenant au maximum que 6 phosphosérines, mais rien ne prouve toutefois qu'il ne s'agit pas déjà de produits de dégradation et que des séquences d'un nombre plus élevé de phosphosérines n'existent pas aussi bien dans la phosvitine que dans nos produits.

La substance III, de longueur de chaîne nettement plus grande, donne peut-être naissance à la substance IV par scission enzymatique, en perdant la presque totalité de son histidine et une partie de ses autres acides aminés.

Notre produit de départ était l'ovovitelline dont 70% du P sont représentés, comme nous l'avons mentionné, par la phosvitine; il est probable d'autre part que les α - et β -vitellines, qui contiennent les 30% restants, sont elles-mêmes des mélanges renfermant de la phosvitine [20]. Cette dernière paraît ainsi représenter la presque

totalité du P de la vitelline: les conclusions de notre travail s'appliquent ainsi en réalité aux noyaux phosphorés de la phosvitine.

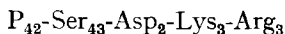
Le présent travail touchait à sa fin lorsque parut un article de BELITZ [21]. Après avoir soumis la phosvitine successivement à l'action de la pepsine et de la trypsine, cet auteur a fractionné sur DEAE-Sephadex les phosphopeptides formés et en a indiqué la composition brute en acides aminés. Si leurs rapports P/N étaient voisins de ceux de nos substances I, II, III, les peptides de BELITZ différaient de celles-ci par leur teneur en sérine, lysine, arginine, histidine et ac. aspartique et par la présence de quantités notables d'autres acides aminés. Un peptide de rapport P/N aussi élevé et de composition aussi simple que notre substance IV n'avait pas été isolé des produits de dégradation enzymatique.



Ce travail a bénéficié d'une subvention du FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, auquel nous exprimons notre gratitude. — Nous remercions d'autre part Mmes TH. DEMOLE et R. MARTI, et M. le Dr. J.-G. FALBRIARD de l'aide qu'ils nous ont apportée. Les dosages d'acides aminés au moyen d'un analyseur automatique ont été effectués dans le laboratoire de M. le Prof. M. BRENNER, Bâle.

RÉSUMÉ

L'ovovitelline de poule fournit, par dégradations successives au moyen de la pepsine et des ferments pancréatiques, des phosphopeptides (ovotyrimés) qu'on a cherché à séparer. Par fractionnements sur *Ecteola*-cellulose avec élution au moyen de concentrations croissantes en NaCl, on a obtenu un peptide apparemment homogène, de composition



contenant à l'extrémité N-terminale de la sérine et à l'extrémité C-terminale probablement de la lysine.

Genève, Laboratoires de chimie biologique et
organique spéciale de l'Université

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. A. LEVENE & L. C. ALSBERG, *Z. physiol. Chem.* **31**, 543 (1900).
 [2] D. K. MECHAM & H. S. OLSMOTT, *J. Amer. chem. Soc.* **71**, 3670 (1949).
 [3] C. CONNELLY & G. TABORSKY, *J. biol. Chemistry* **236**, 1364 (1961).
 [4] H. D. BELITZ, *Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch.* **77**, 346 (1963).
 [5] S. POSTERNAK & TH. POSTERNAK, *C. r. hebd. Séances Acad. Sci.* **185**, 615, 909 (1927).
 [6] F. A. LIPMANN & P. A. LEVENE, *J. biol. Chemistry* **98**, 109 (1932); P. A. LEVENE & A. SCHOR-MÜLLER, *ibid.* **103**, 537 (1933).
 [7] S. POSTERNAK & TH. POSTERNAK, *C. r. hebd. Séances Acad. Sci.* **187**, 313 (1928).
 [8] J. WILLIAMS & F. SANGER, *Biophys. biochim. Acta* **33**, 294 (1959).
 [9] G. R. BARTLETT, *J. biol. Chemistry* **234**, 466 (1958).
 [10] E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer-Verlag, 1962, p. 412.
 [11] D. D. VAN SLYKE & F. J. BIRCHARD, *J. biol. Chemistry* **16**, 539 (1914).
 [12] A. R. BATTERSBY & L. C. CTAIG, *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 1887 (1951).
 [13] R. R. PORTER, *Biochem. J.* **46**, 304 (1950).
 [14] E. SIEPMANN & H. ZAHN, *Biochim. biophys. Acta* **82**, 412 (1964).
 [15] M. BRENNER, A. NIEDERWIESER & G. PATAKI, *Experientia* **17**, 145 (1961).
 [16] C. I. NIU & H. FRAENKEL-CONRAT, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 5882 (1955).
 [17] TH. POSTERNAK, Thèse No. 841, Genève 1928.
 [18] E. A. PETERSON & H. A. SOBER, *Methods in Enzymology* **5**, 3 (1962).
 [19] TH. POSTERNAK & H. POLLACZEK, *Helv.* **24**, 921, 1190 (1941); D. THEODOROPULOS, H. BEN-NICK & O. MELANDER, *Nature* **184**, 187, 270 (1959); G. FÖLSCH & R. ÖSTERBERG, *Acta chem. Scand.* **15**, 1963 (1961).
 [20] H. D. BELITZ, *Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch.* **77**, 492 (1963).
 [21] H. D. BELITZ, *Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch.* **77**, 381 (1963).

169. Recherches sur les arômes

11^e communication [1]¹⁾

Sur l'arôme du cacao. I

par P. Dietrich, E. Lederer, M. Winter et M. Stoll

(23 VI 64)

La partie odorante de l'arôme de cacao n'est que très partiellement connue. En 1912, BAINBRIDGE & DAVIES [2a] ont effectué une première analyse portant sur 2000 kg de cacao. Plus tard, SCHMALFUSS & BARTMEYER [2b], puis STEINMANN [2c] ont identifié quelques nouveaux composants. En 1958, nous trouvons un travail de MOHR [3] qui a repris la question. Ensuite, BAILEY, MITCHELL, BAZINET & WEURMAN [4] ont analysé les produits s'échappant sous forme de vapeur lors de la torréfaction des fèves de cacao, tandis que VAN ELZAKKER & VAN ZUTPHEN [5] procédaient à l'analyse d'un cacao africain et constataient que le mélange synthétique des produits identifiés n'avait aucune goût ni odeur de cacao.

Voici la liste des produits identifiés, ou présumés probables, par ces auteurs: benzène [4], toluène [4], méthanol [4] [5], éthanol [4] [5], propanol-1 [4] [5], propanol-2 [5], butanol-1 [4], butanol-2 [3], pentanol [3] [4], géranol [4] [5], linalol [5], alcool furfurylique [3] [4] [5], acétaldéhyde [2c] [4] [5], propionaldéhyde [4], butyraldéhyde [4],

¹⁾ Les chiffres entre crochets renvoient à la bibliographie, p. 1590.