

## LES POLYSACCHARIDES DES GRAINES DE QUELQUES LILIACEES ET IRIDACEES

NOELLY JAKIMOW-BARRAS

Institut de Biologie végétale et de Phytochimie de l'Université de Fribourg, 1700 Fribourg, Suisse

(Reçu le 21 août 1972. Accepté le 20 novembre 1972)

**Key Word Index**—*Asparagus officinalis*; Liliaceae; Iridaceae; endosperm; polysaccharide; glucomannan; mannan.

**Résumé**—Les polysaccharides bruts alcali-solubles des graines de 7 espèces de Liliaceae et de 2 espèces d'Iridaceae ont été étudiés. Ces graines semblent toutes contenir, entre autre, des galactoglucomannanes ou/et des glucomannanes. La structure d'un polysaccharide de réserve hydrosoluble contenu dans l'endosperme (albumen) de l'*Asparagus officinalis* a été étudiée d'une manière approfondie par hydrolyse partielle et méthylation. Il s'agit d'une galactoglucomannane, dont les oses constitutifs se trouvent dans un rapport de glc-man-gal = 43:49:7. Ce polysaccharide est formé d'une chaîne linéaire composée d'unités D-glucosyl et D-mannosyl possédant des liaisons de type  $\beta(1 \rightarrow 4)$ . A ces unités viennent s'ajouter latéralement des unités de D-galactose, dont le type de liaison est de  $(1 \rightarrow 6)$ . Les groupes terminaux non-réducteurs des chaînes principales sont surtout constitués par du glucose, en plus petite proportion par du mannose.

**Abstract**—The alkali-soluble polysaccharides have been surveyed in the seeds of 7 species of the Liliaceae and 2 species of the Iridaceae. All appear to contain galactoglucomannans and/or glucomannans. The structure of the water-soluble galactoglucomannan from the endosperm of *Asparagus officinalis* has been studied in detail. It contains residues of glucose, mannose and galactose in the ratio 43:49:7. Hydrolysis of the fully methylated polysaccharide released 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-hexoses (mannose and glucose), 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-galactose, 2,3,6-tri-O-methyl-D-mannose, 2,3,6-tri-O-methyl-D-glucose, 2,3-di-O-methyl-D-mannose and 2,3-di-O-methyl-D-glucose in the molar proportions of 1:4.5:50:41:2:1.5. The following oligosaccharides were identified on partial hydrolysis of the galactoglucomannan: mannotriose, mannotetraose, cellobiose, glucopyranosylmannose, mannopyranosylglucose and a trisaccharide composed of two mannosyl residues and one glucosyl residue. The galactoglucomannan consists of a linear chain of  $\beta(1 \rightarrow 4)$ -linked D-mannosyl and D-glucosyl residues, to which are attached single-unit galactosyl side chains. The galactose residues are linked  $1 \rightarrow 6$ , probably  $\alpha$ . The terminal, non-reducing residues of the main chain may be either glucosyl or mannosyl units but the former predominate.

### INTRODUCTION

DANS l'endosperme (albumen) de nombreuses graines de dicotylédones et de monocotylédones se trouvent des polysaccharides de réserve contenant du mannose, qui sont dégradés et utilisés lors de la germination. Ces polysaccharides sont, dans les graines de certaines monocotylédones (p. ex. des palmiers), des mannanes pures, constituées par des chaînes linéaires d'unités de mannose possédant des liaisons  $(1 \rightarrow 4)$  (Klages,<sup>1</sup> Aspinall *et al.*,<sup>2</sup> Meier<sup>3</sup>). Par contre, des glucomannanes de réserve ont été identifiées dans l'endosperme de certaines Liliacées, Iridacées et Amaryllidacées par Kooiman,<sup>4</sup> Andrews *et al.*<sup>5</sup> et Goldberg.<sup>6</sup> Ces

<sup>1</sup> KLAGES, F. (1934) *Ann.* **509**, 159; **512**, 185.

<sup>2</sup> ASPINALL, G. O., HIRST, E. L., PERCIVAL, E. G. V. et WILLIAMSON, I. R. (1953) *J. Chem. Soc.* 3184; ASPINALL, G. O., RASHBROOK, R. B. et KESSLER, G. (1958) *J. Chem. Soc.* 2151.

<sup>3</sup> MEIER, H. (1958) *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 229.

<sup>4</sup> KOOIMAN, P. et KREGER, D. R. (1960) *Koninkl. Nederl. Akad. van Wetenschappen, Amsterdam, Proceedings, Series C*, **63**(5), 634.

<sup>5</sup> ANDREWS, P., HOUGH, L. et JONES, J. K. N. (1953) *J. Chem. Soc.* 1186.

<sup>6</sup> GOLDBERG, R. (1969) *Phytochemistry* **8**, 1783.

glucomannanes contiennent également du galactose en petites quantités; pour la plupart d'entre elles, il n'a pas été procédé à une étude de structure approfondie. Le but du présent travail a été d'analyser les polysaccharides hydrosolubles et alcali-solubles des graines de quelques liliacées et iridacées non encore examinées. La galactoglucomannane hydrosoluble de l'*Asparagus officinalis* a été étudiée d'une façon plus approfondie.

## RESULTATS

### *Etude des Polysaccharides Alcali-solubles des Graines de 7 Liliacées et de 2 Iridacées*

Des graines intégrales de chacune des 9 espèces de Liliiflorae figurant au Tableau 1 ont été broyées et, après élimination des lipides, traitées au KOH à 10%. Les polysaccharides bruts ainsi extraits ont été isolés, hydrolysés et analysés par chromatographie. Les oses constitutifs ont été identifiés au moyen de substances témoins. Le Tableau 1 mentionne les

TABLEAU 1. LES POLYSACCHARIDES ALCALI-SOLUBLES DES GRAINES DE 7 LILIACEES ET DE 2 IRIDACEES: RENDEMENT ET OSES CONSTITUTIFS

Familles et sous-familles (d'après Engler <sup>7</sup> )	Rendement* en % de la farine dégraissée	Oses constitutifs†				
		gal	glc	man	ara	xyl
Famille des Liliaceae						
Scilloideae-Scilleae						
<i>Ornithogalum pyrenaicum</i> L.	3	++	++++	++++	++	Traces
Asparagoideae-Asparageae						
<i>Asparagus officinalis</i> L.	11	+++	++++	+++++	+	Traces
Alloioideae-Allieae						
<i>Allium sativum</i> L.	7	++++	++++	++	++	+++++
Wurmbracoideae-Colchiceae						
<i>Colchicum autumnale</i> L.	18	+++	++++	+++++	Traces	Traces
Lilioideae-Lilieae						
<i>Lilium martagon</i> L.	14	+++	++++	++++	+++	+++++
<i>Fritillaria imperialis</i> L.	20	++++	++++	++	+	++
Lilioideae-Tulipeae						
<i>Tulipa gesneriana</i> L.	11	+++	+++	+++	+++	+++
Famille des Iridaceae						
Irideae						
<i>Iris versicolor</i> L.	23	++	+++++	+++	+++	Traces
<i>I. mandschurica</i> Meissn.	16	+++	+++	+++	+++	++++

\* Total des polysaccharides extraits des graines broyées et dégraissées par 2 traitements au KOH à 10%.

† + = 1-5%, ++ = 5-10%, +++ = 10-20%, ++++ = 20-40%, +++++ = > 40%.

Dans tous les polysaccharides, nous avons aussi trouvé des traces de rhamnose et de composés acides.

quantités de polysaccharides obtenues et donne un aperçu sur leur composition. L'estimation des quantités relatives des sucres est basée sur un examen visuel de chromatogrammes traités à l'anisidine-HCl et portant des quantités connues de substances témoins.

Pour voir s'il existe une corrélation entre l'épaisseur des parois de l'endosperme des différentes espèces et la quantité des polysaccharides entraînés au KOH à 10 %, une étude microscopique des graines a été faite. Des coupes de chacune des graines gonflées des 9 espèces faisant l'objet de cette étude ont été examinées au microscope polarisant. Dans aucun cas, la présence d'amidon n'a pu être décelée dans les cellules de l'endosperme. Les parois de ces dernières sont très épaissies chez les 2 espèces d'*Iris*, de même que chez l'*Asparagus officinalis* et le *Colchicum autumnale*, dont les graines contiennent de 10–23 % de polysaccharides entraînés au KOH à 10 %. Ces mêmes parois ont un aspect collenchymatique (épaississement irrégulier) chez les 3 Lilioideae examinées, dont la teneur des graines en polysaccharides varie également entre 11 et 20 %. L'*Ornithogalum pyrenaicum* présente un cas assez spécial. Bien que les parois de l'endosperme de ses graines soient seulement un peu plus minces que celles du *Colchicum autumnale*, 3 % à peine de polysaccharides ont pu être extraits. Quant aux graines de l'*Allium sativum*, leur endosperme possède, au moins dans sa partie extérieure, des parois extrêmement minces.

TABLEAU 2. RENDEMENT ET COMPOSITION DES EXTRAITS ET RESIDUS DES GRAINES D'*Asparagus officinalis*. FRACTIONNEMENT A LA LIQUEUR DE FEHLING DES POLYSACCHARIDES BRUTS HYDROSOLUBLES

	[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>22</sup>	Rendement en %†	Oses constitutifs				
			gal %	glc %	man %	ara %	xyl %
Polysaccharides bruts extraits à l'H <sub>2</sub> O	–30°	6,9	10,5	40,5	44,5	4,5	Traces
Sucres libres extraits à l'H <sub>2</sub> O		2,9					
Farine résiduelle après les extractions à l'H <sub>2</sub> O			2,5	44,5	53	Traces	Traces
Polysaccharides bruts extraits au KOH à 2 %	–30°	2,9	10	40	48	2	Traces
Polysaccharides bruts extraits au KOH à 10 %	–40°	1,7	7	40	45	2	6
Farine résiduelle après les extractions à l'H <sub>2</sub> O et à l'alcali			2	45	53	Traces	—
Fraction 1 des polysaccharides hydrosolubles (galactoglucomannane)	–20°	31,5	7	42	50	1	—
Fraction 2 des polysaccharides hydrosolubles* (riche en arabinogalactane?)	–50°	23,5	63	Traces	Traces	34,5	2,5

\* L'hydrolysate contenait une quantité considérable d'acides aminés.

† Le rendement est indiqué pour les polysaccharides bruts et les résidus en % de la farine dégraissée, pour les fractions en % des polysaccharides hydrosolubles.

### Polysaccharides des Graines d'*Asparagus officinalis*

Des graines d'*Asparagus officinalis*, grossièrement dépouillées de leurs téguments et finement broyées, ont été, après élimination des lipides, soumises à des extractions à l'H<sub>2</sub>O et au KOH à 2 et 10 %. Les polysaccharides hydrosolubles ont été fractionnés à la liqueur de Fehling, pour donner une galactoglucomannane (fraction 1) et une fraction contenant probablement des arabinogalactanes (fraction 2). Le Tableau 2 est un sommaire des rendements et de la composition des polysaccharides bruts révélée par l'analyse quantitative des oses constitutifs. Le mélange de sucres libres entraîné avec les polysaccharides hydrosolubles était surtout composé de saccharose, d'un peu de glucose et de fructose, avec des traces de

galactose et d'un ou plusieurs oligosaccharides qui n'ont pas été caractérisés. Dans les hydrolysats des polysaccharides bruts, des acides aminés en quantité considérable ont pu être décelés. Le Tableau 2 indique également les quantités des produits du fractionnement et la composition des fractions obtenues à partir des polysaccharides hydrosolubles. Le pourcentage de 31,5% de galactoglucomannane (fraction 1) a été identique lors de deux fractionnements effectués, et la composition de cette fraction est restée la même après deux essais de fractionnement au  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  consécutifs à la précipitation par la liqueur de Fehling.

### Structure de la Galactoglucomannane (Fraction 1)

Un échantillon de la galactoglucomannane, contenant du mannose, du glucose, du galactose dans un rapport de 7:6:1 env., ainsi que des traces d'arabinose, a été soumis à une hydrolyse partielle à l' $\text{H}_2\text{SO}_4$  dilué, qui a permis d'isoler une série d'oligosaccharides, dont 7 ont pu être partiellement caractérisés sur la base de leur  $R_{\text{glc}}$ <sup>8</sup> et de leurs oses constitutifs obtenus par hydrolyse totale avant et après réduction au  $\text{NaBH}_4$  (Tableau 3).

TABLEAU 3. OLIGOSACCHARIDES OBTENUS A L'HYDROLYSE PARTIELLE DE LA GALACTOGLUCOMANNANE DES GRAINES D'*Asparagus officinalis*

Oligosaccharides*	$R_{\text{glc}}$ †	Rapport glc:man	Alditols identifiés après réduction au $\text{NaBH}_4$ et hydrolyse
Glc → Man	0,87	1:1	Mannitol
Glc → Glc	0,78		Sorbitol
Man → Man	0,76		Mannitol
Man → Glc	0,64	1:1	Sorbitol
Man → Man → Man	0,47		Mannitol
Man → Man → Glc	0,25	1:2	Sorbitol
Man → Man → Man → Man	0,15		Mannitol

\* Les liaisons glycosidiques sont probablement toutes de type (1 → 4).

† Dans le solvant (a).

Un autre échantillon de la galactoglucomannane a été méthylé d'abord selon la méthode de Haworth,<sup>9</sup> puis deux fois selon Hakomori.<sup>10</sup> Le produit méthylé a été méthanolysé, et les méthylglycosides des dérivés partiellement méthylés des oses ont été identifiés par GLC.<sup>11</sup> Les 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-mannose et -glucose, qui n'ont pas été séparés par GLC, l'ont été par chromatographie sur papier, puis ils ont été élués, déméthylés<sup>12</sup> et identifiés par une analyse chromatographique sur papier,<sup>13</sup> qui a révélé la présence de glucose et de mannose dans une proportion de 4:1. Pour l'analyse quantitative des oses partiellement méthylés, le polysaccharide méthylé a été formolysé et hydrolysé à l' $\text{H}_2\text{SO}_4$ , puis réduit et acétylé.<sup>14</sup> L'analyse quantitative a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse

<sup>7</sup> MELCHIOR, H. (1954-1964) *A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien*, Vol. II, Gebr. Borntraeger, Berlin.

<sup>8</sup> MEIER, H. (1960) *Acta Chem. Scand.* **14**, 749.

<sup>9</sup> HAWORTH, W. N. (1915) *J. Chem. Soc.* **107**, 8.

<sup>10</sup> HAKOMORI, S. (1964) *J. Biochem. (Tokyo)* **55**, 205.

<sup>11</sup> ASPINALL, G. O. (1963) *J. Chem. Soc.* 1676.

<sup>12</sup> HOUGH, L. et THEOBALD, R. S. (1963) dans *Methods in Carbohydr. Chem.* (WHISTLER, R. L. et WOLFROM, M., eds.), Vol. II, p. 205, Academic Press, New York.

<sup>13</sup> SIMSON, B. W. et TIMELL, T. E. (1967) *Tappi* **50**, 473

<sup>14</sup> BJORNDAAL, H. B., LINDBERG, B. et SVENSSON, S. (1967) *Acta Chem. Scand.* **21**, 1801.

(Tableau 4). Si l'on compare les quantités relatives des composants de la galactoglucomannane non-méthylée (glc 43 %, man 49 %, gal 7 %) avec celles des composants du produit méthylé, il semble que des unités galactosyl aient été perdues lors de la méthylation.

TABLEAU 4. SEPARATION PAR GLC DES DERIVES METHYLES, REDUITS ET ACETYLES DES OSES CONSTITUTIFS DE LA GALACTOGLUCOMANNANE HYDROSOLUBLE DES GRAINES D'*Asparagus officinalis*

Pic	Dérivés méthylés des oses réduits et acétylés	Mol %†	T*
1	2,3,4,6-tétra- <i>O</i> -méthyl-D-hexoses‡	1,25§	1
2	2,3,4,6-tétra- <i>O</i> -méthyl-D-galactose	4,75	1,25
3	2,3,6-tri- <i>O</i> -méthyl-D-mannose	50	2,46
4	2,3,6-tri- <i>O</i> -méthyl-D-glucose‡	40,75	2,84
5	2,3-di- <i>O</i> -méthyl-D-mannose‡	1,75	5,8
6	2,3-di- <i>O</i> -méthyl-D-glucose‡	1,5	6,5

\* Temps de rétention relatifs au pic 1 sur colonne contenant 3 % ECNSS-M sur AW DMCS Chromosorb W.

† Valeurs calculées sur la base de la surface des pics.

‡ Identifiés par substances témoins (pics augmentés et temps de rétention relatifs).

§ Ce chiffre représente 1 % de 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-glucose et 0,25 % de 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-mannose.

|| Identifié par la concordance des temps de rétention relatifs avec les valeurs indiquées par Björndal.<sup>14</sup>

Le degré de polymérisation  $\overline{DP}_n$  de la galactoglucomannane a été déterminé avec un osmomètre à tension de vapeur. Des valeurs de 75 ont été obtenues pour un échantillon de la galactoglucomannane acétylée et de 60 pour un échantillon méthylé.

## DISCUSSION

### *Les Polysaccharides Alkali-solubles des Graines de 7 Liliacées et de 2 Iridacées*

Sept des espèces étudiées appartiennent à cinq sous-familles différentes des Liliacées, les deux autres, à la famille des Iridacées (Tableau 1). En accord avec ce que mentionne Hegnauer<sup>15</sup> pour ces familles, les graines examinées microscopiquement ne contiennent pas d'amidon.

L'estimation semi-quantitative des oses constitutifs des polysaccharides entraînables à l'alcali à 10 % à partir de graines intégrales laisse présumer, en analogie avec nos propres résultats et ceux de Goldberg<sup>6</sup> pour l'*Asparagus officinalis*, de même qu'avec les résultats de Andrews *et al.*<sup>5</sup> pour les *Iris ochroleuca* et *I. sibirica*, la présence de galactoglucomannane ou/et de glucomannane dans toutes les espèces faisant l'objet de cette étude. Mais il semble que la quantité ou/et la solubilité de ces polysaccharides de réserve varient fortement. Ce qui est étonnant, ce sont les pourcentages importants de résidus de xylose détectés dans les polysaccharides de 5 des espèces examinées. Pour le moment, nous n'avons aucune indication sur le type de polysaccharides contenus dans ces graines et possédant des résidus de

<sup>15</sup> HEGNAUER, R. (1963) *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Vol, 2, pp. 253, 283, Birkhäuser, Basel und Stuttgart.

xylose. L'arabinose, qui se trouve dans presque toutes les espèces étudiées en quantités relativement petites, provient peut-être d'arabinogalactanes, comme cela semble être le cas chez l'*Asparagus officinalis* (Tableau 2).

#### *Polysaccharides des Graines d'Asparagus officinalis*

En comparant les quantités relatives des oses constitutifs des polysaccharides bruts extraits à l'H<sub>2</sub>O et au KOH à 2 % et à 10 % (Tableau 2), nous constatons qu'il s'agit là de produits semblables. La quantité obtenue par l'extraction à l'H<sub>2</sub>O est supérieure à celle mentionnée par Tookey et Jones<sup>16</sup> pour les graines de l'*Asparagus officinalis*. L'hydrolyse de la farine résiduelle après les extractions à l'H<sub>2</sub>O et à l'alcali à 2 % et à 10 % donne 45 % de glucose, 53 % de mannose et 2 % de galactose (Tableau 2), ce qui démontre que les polysaccharides à mannose n'ont pas pu être extraits intégralement. Il semble que les polysaccharides extraits à l'H<sub>2</sub>O et au KOH à 2 % et à 10 % soient des galactoglucomannanes avec un pourcentage relativement élevé en galactose, tandis que la farine résiduelle contient encore des glucomannanes avec une faible teneur en galactose.

Notons encore que nos rapports mannose : glucose ont été, contrairement à ceux de Goldberg,<sup>6</sup> supérieurs à 1 pour les produits de toutes les extractions.

Le fait qu'un essai de fractionnement au Ba(OH)<sub>2</sub> ultérieur à la précipitation par la liqueur de Fehling n'ait apporté aucun changement dans les quantités relatives des oses constitutifs de la galactoglucomannane (fraction 1) est un indice de l'homogénéité de ce polysaccharide.

#### *Structure de la Galactoglucomannane des Graines d'Asparagus officinalis*

L'analyse des oses après la méthylation, l'hydrolyse partielle du polymère, de même que le pouvoir rotatoire laissent conclure que la galactoglucomannane des graines d'*Asparagus officinalis* est formée d'une chaîne linéaire composée d'unités glucosyl et mannosyl reliées entre elles par des liaisons  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4). Quant à la distribution des oses constitutifs, l'hydrolyse partielle démontre qu'au moins 4 unités mannosyl et 2 unités glucosyl peuvent être liées entre elles. Les restes galactosyl sont attachés par des liaisons (1  $\rightarrow$  6) aux restes glucosyl et mannosyl dans une même proportion (rapport quantitatif 2,3-di-*O*-méthyl-D-glucose-2,3-di-*O*-méthyl-D-mannose  $\approx$  1:1). Le fait que les quantités des 2,3-di-*O*-méthyl-D-hexoses correspondent à peu près à celles du 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-galactose, témoigne d'une méthylation quasi-complète du polymère et démontre que les résidus de galactose constituent des groupes latéraux branchés sur des restes glucosyl et mannosyl de la chaîne.

Pour les polysaccharides bruts, le pouvoir rotatoire devient plus négatif, plus le contenu en galactose diminue (Tableau 2), ce qui suggère que les liaisons des unités galactosyl sont de type  $\alpha$ . En effet, les galactomannanes, constituant des polysaccharides de réserve dans les semences de nombreuses dicotylédones, et dont les liaisons galactosyl sont de type  $\alpha$ , présentent un pouvoir rotatoire d'autant plus positif que le pourcentage de galactose augmente.<sup>17</sup> L'absence de tri-*O*-méthyl-D-galactose démontre qu'une seule unité galactosyl est liée chaque fois à une unité mannosyl ou glucosyl de la chaîne linéaire. Quant aux groupes terminaux non-réducteurs de la chaîne principale, ils sont constitués surtout par du glucose, en plus faible proportion par du mannose (rapport quantitatif glc-man = 4:1).

Le nombre des oses constitutifs par molécule de polysaccharide a été calculé après méthylation sur la base de la proportion des tétra-*O*-méthyl-D-glucose et -mannose: il est

<sup>16</sup> TOOKEY, H. L et JONES, Q. (1965) *Econ. Botany* **19**, 165.

<sup>17</sup> SMITH, F. et MONTGOMERY, R. (1959) *Chemistry of Plant Gums and Mucil.*, p. 324, Reinhold, New York.

d'environ 75, ce qui est donc un peu plus élevé que le  $\overline{DP}_n$  de 60 obtenu pour le produit méthylé par osmométrie à tension de vapeur. Ces valeurs sont en désaccord avec le  $\overline{DP}_n$  de 800 indiqué par Goldberg<sup>6</sup> sur la base de tamisages moléculaires sur gel Sephadex.

La structure de la galactoglucomannane de réserve de l'*Asparagus officinalis* est donc semblable à celle proposée par Andrews *et al.*<sup>5</sup> pour les polysaccharides de réserve de l'*I. ochroleuca* et de l'*I. sibirica*, et elle semble aussi être très similaire à celle des galactoglucomannanes trouvées dans les parois cellulaires du bois des gymnospermes (Timell).<sup>18</sup>

## PARTIE EXPERIMENTALE

**Méthodes générales.** Les solutions ont été séchées ou réduites à petit volume, sous vide, à la temp. de 30–40°. Les spectres IR ont été effectués en phase solide (KBr). La chromatographie unidimensionnelle descendante et ascendante a été réalisée sur du papier Scheicher et Schüll 2043 b, pour les analyses qualitatives, et Schleicher et Schüll 2043 a ou Whatman 3 MM, pour les analyses quantitatives. Les solvants suivants ont été utilisés: (a) EtOAc–pyridine–H<sub>2</sub>O (2:1:2, phase sup.), (b) EtOAc–pyridine–H<sub>2</sub>O (8:2:1), (c) EtOAc–HOAc–H<sub>2</sub>O (3:1:3, phase sup.), (d) *n*-BuOH–EtOAc–HOAc–H<sub>2</sub>O (4:3:2,5:4), (e) *n*-BuOH–EtOH–H<sub>2</sub>O (4:1:5), (f) solution de 0,55 % d'acide phénylboronique dans EtOAc–HOAc–H<sub>2</sub>O (9:2:2, phase sup.),<sup>19</sup> (g) *isooctane*–*iso*PrOH–NH<sub>4</sub>OH 10% (62:25:2) pour les dérivés méthylés des oses.<sup>20</sup> Les divers composants ont été révélés avec les réactifs suivants: AgNO<sub>3</sub> alcalin<sup>21</sup> et *p*-anisidine–HCl,<sup>22</sup> pour l'analyse qualitative des sucres réducteurs, 2-aminodiphényl–HCl,<sup>13</sup> pour l'analyse quantitative des sucres réducteurs, NaIO<sub>4</sub> et solution de benzidine dans MeOH avec adjonction d'acétone et d'HCl,<sup>23</sup> pour les sucres réduits. La détermination du pouvoir rotatoire a été effectuée avec un polarimètre Zeiss dans des solutions de KOH à 10%.

**Extraction alcaline des polysaccharides de réserve des graines de 7 Liliacées et de 2 Iridacées.** Les graines des plantes suivantes, récoltées au Jardin botanique de Fribourg, ont été utilisées: *Ornithogalum pyrenaicum* L., *Asparagus officinalis* L., *Allium sativum* L., *Colchicum autumnale* L., *Lilium martagon* L., *Tulipa gesneriana* L., *Fritillaria imperialis* L., *I. versicolor* L. et *I. mandshurica* Meissn. Les graines intégrales ont été broyées dans un moulin-batteur 'Culatti', les lipides éliminés sur Soxhlet avec de l'acétone et de l'Et<sub>2</sub>O–C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, 1:1. Après lavage à l'Et<sub>2</sub>O sur filtre, la farine a été séchée à l'air. La farine dégraissée (5 g) de chacune des graines ci-dessus a été soumise à deux extractions dans une solution de KOH à 10% (chaque fois env. 100 ml) sous N<sub>2</sub> et agitation mécanique pendant chaque fois 2 hr, à la temp. ambiante. Après filtrage, les solutions ont été neutralisées à l'HOAc, et les polysaccharides ont été précipités à l'EtOH à 96% (4 vol.). Les précipités ont été lavés à l'EtOH et à l'Et<sub>2</sub>O, puis séchés à l'air. Ces polysaccharides bruts ont été hydrolysés selon la méthode de Saeman *et al.*,<sup>24</sup> et les monosaccharides identifiés par chromatographie, en utilisant les solvants (a) et (c) (Tableau 1).

**Extraction des polysaccharides des graines d'Asparagus.** Des graines d'*Asparagus officinalis* cv. Hâtive Géante d'Argenteuil, en provenance du commerce, ont été grossièrement dépouillées de leurs téguments, puis finement broyées dans un moulin à ailettes et réfrigération à l'H<sub>2</sub>O de Janke et Kunkel, Staufen i/Breisgau. Les lipides ont été éliminés à 70°, d'abord par 3 traitements à l'acétone, puis à l'Et<sub>2</sub>O–C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, 1:1, sous agitation mécanique. La farine a été ensuite lavée à l'Et<sub>2</sub>O et séchée à l'air. La farine dégraissée (151 g) a été traitée 2 fois à l'H<sub>2</sub>O bouillante (chaque fois env. 1 l.) pendant chaque fois 14 hr, sous agitation mécanique, après quoi deux extractions au KOH à 2%, puis 2 extractions au KOH à 10% (chaque fois env. 1 l. également) ont été effectuées sous N<sub>2</sub> et agitation mécanique à la temp. ambiante. Après centrifugation et acidification du surnageant à l'HOAc, les produits extraits par chacun de ces solvants ont été précipités à l'EtOH à 96% (4 vol.). Les précipités ont été lavés à l'EtOH et à l'Et<sub>2</sub>O, puis séchés à l'air. D'autres extractions ont été faites d'une façon similaire à partir de plus grandes quantités de farine, et les polysaccharides obtenus ont été lyophilisés.

**Analyse qualitative des sucres libres contenus dans l'extrait aqueux et des oses constitutifs des polysaccharides bruts d'Asparagus.** Les sucres libres obtenus par évaporation de l'EtOH surnageant après précipitation du produit de la première extraction à l'H<sub>2</sub>O ont été chromatographiés dans les solvants (a) et (c). Les polysaccharides bruts obtenus par les diverses extractions ont été hydrolysés à l'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> par la méthode de Saeman *et al.*,<sup>24</sup> et les oses constitutifs identifiés par chromatographie dans les solvants (a), (b) et (c).

<sup>18</sup> TIMELL, T. E. (1965) *Adv. Carbohydr. Chem.* **20**, 448.

<sup>19</sup> BOURNE, E. J., LEES, E. M. et WEIGL, H. (1963) *J. Chromatog.* **11**, 253.

<sup>20</sup> PETEK, F. (1965) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 263.

<sup>21</sup> TREVELYAN, W. E., PROCTOR, D. P. et HARRISON, J. S. (1950) *Nature* **166**, 444.

<sup>22</sup> HOUGH, L., JONES, J. K. N. et WADMAN, W. H. (1950) *J. Chem. Soc.* 1702.

<sup>23</sup> CIFONELLI, J. A. et SMITH, F. (1954) *Anal. Chem.* **26**, 1132.

<sup>24</sup> SAEMAN, J. F., MOORE, W. E., MITCHELL, R. L. et MILLET, M. A. (1954) *Tappi* **37**, 336.

*Fractionnement des polysaccharides bruts hydrosolubles d'Asparagus et analyse des oses constitutifs des fractions (Tableau 2).* Les polysaccharides bruts hydrosolubles (38 g) ont été suspendus dans l'H<sub>2</sub>O (env. 3 l.), puis du NaOH à 5 % a été ajouté peu à peu sous agitation mécanique jusqu'à obtention d'une solution claire. Après filtrage de quelques particules surnageantes, la solution a été soumise à 2 précipitations par la liqueur de Fehling (chaque fois env. 500 ml) et le précipité (fraction 1) a été décomplexé et lyophilisé selon la méthode de Jones et Stoodley.<sup>25</sup> Le surnageant a été dialysé sous l'eau courante, puis dans un bain d'HOAc 1 N et d'H<sub>2</sub>O dist. Il a été ensuite concentré et soumis à une précipitation à l'EtOH à 96 % acidifié à l'HOAc (fraction 2). Les fractions 1 et 2 ont été hydrolysées et chromatographiées dans le solvant (b). L'analyse quantitative des oses constitutifs des polysaccharides bruts et des fractions 1 et 2 a été effectuée selon la méthode de Simson et Timell.<sup>13</sup> La présence d'acides aminés dans les hydrolysats a été détectée qualitativement sur papier, au moyen d'une solution de ninhydrine.

*Hydrolyse partielle de la galactoglucomannane (fraction 1) d'Asparagus.* L'hydrolyse partielle de 3,5 g de galactoglucomannane (fraction 1) a été effectuée avec de l'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2 % (env. 500 ml) sur un bain-marie bouillant. Après 25 min, la suspension a été centrifugée, le surnageant neutralisé au Ba(OH)<sub>2</sub>, filtré et soumis à une précipitation à l'EtOH acidifié à l'HOAc. Le matériel insoluble et les polymères précipités à l'EtOH ont été réunis et hydrolysés encore 3 fois sous les mêmes conditions. Après la quatrième opération, un précipité apparaissait toujours à l'EtOH, et l'hydrolyse totale de ce précipité a révélé encore la présence de mannose, glucose et de galactose. Les 4 hydrolysats partiels solubles dans l'EtOH ont été réunis. Les oligosaccharides ont été séparés d'abord sur charbon activé (Norit A) selon Meier.<sup>8</sup> La partie éluee à l'EtOH à 15 % (213 mg) était surtout constituée par des oligosaccharides et par de petites quantités de monosaccharides, elle a ensuite été portée sur papier Whatman 3 MM, chromatographiée avec le solvant (a), et les oligosaccharides séparés des monosaccharides ont été élués à l'H<sub>2</sub>O et lyophilisés (total 185 mg). Ces oligosaccharides ont ensuite été chromatographiés successivement dans les solvants (a), (d) et (e), et un essai d'identification a été fait sur la base des valeurs  $R_f$  et de témoins. Ils ont ensuite été purifiés dans les solvants (a) et (d) sur papier Whatman 3 MM, élués à l'H<sub>2</sub>O et lyophilisés. Les oligosaccharides purs ont alors été, en partie, hydrolysés, et les monosaccharides chromatographiés dans le solvant (b). Les hydrolysats qui contenaient du glucose et du mannose ont, en outre, été soumis à une analyse quantitative des oses.<sup>13</sup> L'autre partie des oligosaccharides a ensuite été réduite par le NaBH<sub>4</sub> (18 hr).<sup>14</sup> La solution a été traitée au Dowex 50 W H<sup>+</sup> et distillée plusieurs fois avec du MeOH. Les oligosaccharides ont été hydrolysés et chromatographiés dans le solvant (f).

*Méthylation de la galactoglucomannane (fraction 1) d'Asparagus.* La galactoglucomannane (2 g) a été méthylée successivement par la méthode de Haworth<sup>9</sup> et de Hakomori.<sup>10</sup> La galactoglucomannane méthylée a été lyophilisée (1,7 g). Sur le spectre IR de la galactoglucomannane méthylée (—OMe: 42,98 %, valeur théorique: 45,58 %, sans tenir compte de l'arabinose), aucune absorption OH n'apparaissait. Une partie de la galactoglucomannane méthylée (30 mg) a été méthanolysée dans une solution de 3 % HCl dans du MeOH sec,<sup>26</sup> pendant 14 hr, à 100°, dans un tube scellé. La solution a été neutralisée au Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, et les méthylglycosides des dérivés méthylés des oses ont été analysés qualitativement par GLC, sur un appareil Perkin-Elmer 900 avec colonnes de verre (200 × 0,3 cm). La colonne employée contenait 10 % *m*-bis(*m*-phenoxyphenoxy)benzène sur AW DMCS Chromosorb W (100–120 mesh), le débit de N<sub>2</sub> était de 65 ml/min, et la temp. de 170°. Les substances témoins suivantes, préalablement traitées au MeOH-HCl, nous ont servi dans l'identification des dérivés méthylés des oses: 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-glucose, 2,3,6-tri-*O*-méthyl-D-glucose, 2,3-di-*O*-méthyl-D-glucose, 2,3-di-*O*-méthyl-D-mannose. Nous n'avons pas eu de témoins à disposition pour les 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-galactose et 2,3,6-tri-*O*-méthyl-D-mannose, mais le temps de rétention relatif pour 2 de nos pics a été identique à celui qu'Aspinall<sup>11</sup> a rapporté pour ces 2 substances respectives. Une autre partie de la galactoglucomannane méthylée (env. 100 mg) a été hydrolysée selon la méthode de Bouveng *et al.*<sup>27</sup> L'hydrolysate a été neutralisé au Ba(OH)<sub>2</sub>. Une partie de ce matériel (25 mg) a été réduite avec de NaBH<sub>4</sub> et acétylée, selon la méthode de Bjørndal *et al.*,<sup>14</sup> et soumise à une analyse quantitative par GLC, à une temp. de 150°, sur une colonne contenant 3 % ECNSS-M sur AW DMCS Chromosorb W (100–120 mesh), débit de N<sub>2</sub> 40 ml/min. Les mêmes témoins que ceux mentionnés ci-dessus, réduits et acétylés, ont été utilisés. Les 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-glucose et 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-mannose, ne formant qu'un pic à la GLC, ont pu être séparés du 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-galactose sur papier Whatman 3 MM avec le solvant (g). Ils ont été élués au CHCl<sub>3</sub>, déméthylés au B(Br)<sub>3</sub>, selon la méthode de Hough et Theobald,<sup>12</sup> et les sucres réducteurs ont été analysés quantitativement.<sup>13</sup>

*Détermination du degré de polymérisation.* La détermination du  $\overline{DP}_n$  a été effectuée au moyen d'un osmomètre à tension de vapeur Knauer, Berlin, avec des solutions dans le CHCl<sub>3</sub> du polymère méthylé, ainsi que du polymère acétylé préalablement selon la méthode de Banerjee et Timell.<sup>28</sup> Le degré d'acétylation a été

<sup>25</sup> JONES, J. K. N. et STOODLEY, R. J. (1965) *Methods in Carbohydrate Chemistry* (WHISTLER, R. L., ed.) Vol. V, p. 36, Academic Press, New York.

<sup>26</sup> GAREGG, J. et LINDBERG, B. (1960) *Acta Chem. Scand.* **14**, 871.

<sup>27</sup> BOUVENG, H. O., KIESSLING, H., LINDBERG, B. et MCKAY, J. E. (1962) *Acta Chem. Scand.* **16**, 615.

<sup>28</sup> BANERJEE, S. K. et TIMELL, T. E. (1960) *Tappi* **43**, 849.



examiné par spectre IR, et le contenu en groupes acétyl déterminé. La valeur de 56,56 % (valeur théorique: 44,8 %) obtenue était trop élevée, étant donné la présence de restes de formamide, qui ont été par la suite éliminés à l'HCl 2 % à 0°.

*Remerciements*—Ce travail a été exécuté sous la direction du Professeur Dr. H. Meier, auquel je tiens à exprimer ici mes remerciements. Qu'il me soit permis d'adresser, en outre, ma reconnaissance au Dr. J. S. G. Reid et au Dr. A. J. Buchala pour leurs précieux conseils. Mes remerciements vont également au Dr. Ch. Perriard, Chimiste cantonal, qui a aimablement mis à ma disposition le chromatographe à phase gazeuse de son laboratoire.