

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xii
Liste des abréviations	xiii
Dédicace.....	xiv
Remerciement	xv
Introduction	1
Chapitre 1 : Revue de la littérature	3
1 Valorisation des résidus agricoles et alimentaires.....	4
2 Présentation de la plante étudiée : Asperge : <i>Asparagus officinalis</i> L.....	4
2.1 Définition	4
2.2 Description.....	5
2.3 Production mondiale d'asperge	7
2.4 Production canadienne d'asperge	9
2.5 Coproduits d'asperge	10
2.6 Effet sur la santé et composés majeurs d'asperge.....	11
3 Les polyphénols	12
3.1 Définition des polyphénols	12
3.2 Classification des polyphénols.....	13
3.2.1 Les acides phénoliques	13
3.2.2 Les flavonoïdes.....	14
3.2.2.1 Flavonols.....	15
3.2.2.2 Flavones	15
3.2.2.3 Flavanones	16
3.2.2.4 Isoflavones	16
3.2.2.5 Flavan-3-ols	17
3.2.2.6 Les anthocyanes	17
3.2.3 Alcools phénoliques	18
3.2.4 Stilbènes	19
3.2.5 Lignanes	20
3.3 Propriétés biologiques et thérapeutiques des polyphénols.....	20

4	Les saponines	21
4.1	Définition	21
4.2	Classification des saponines	22
4.3	Distribution des saponines dans le règne végétal	23
4.4	Propriétés biologiques et pharmacologiques des saponines	25
5	Les techniques d'extraction des molécules bioactives.....	25
5.1	Les techniques conventionnelles d'extraction des molécules bioactives	26
5.1.1	Macération	26
5.1.2	Extraction par reflux et par soxhlet	26
5.1.3	Extraction par méthodes d'extraction conventionnelles successives	27
5.2	Les techniques vertes d'extraction des molécules bioactives	27
5.2.1	Extraction assistée par ultrasons (UAE)	27
5.2.2	Extraction assistée par micro-ondes (MAE).....	27
5.2.3	Extraction accélérée par solvant (ASE).....	27
5.2.4	Extraction par fluide supercritique (EFS).....	28
6	Sélection du solvant de l'étude selon les principes de la chimie verte	28
7	Valorisation des coproduits d'asperge dans la littérature.....	29
	Problématique, hypothèse de recherche, objectif principal et objectifs spécifiques	31
1	Problématique.....	32
2	Hypothèse.....	32
3	Objectif principal	32
4	Objectifs spécifiques.....	32
	Chapitre 2 : Études des polyphénols et des flavonoïdes dans l'asperge et ses coproduits	33
1	Études des polyphénols et des flavonoïdes dans deux segments de la tige d'asperge	34
1.1	Matériel	34
1.2	Réactifs et solutions	34
1.3	Extraction et quantification des polyphénols totaux dans deux segments de la tige d'asperge	35
1.3.1	Méthode	35
1.3.2	Résultats et Discussion	36

1.4	Extraction et quantification des flavonoïdes totaux dans deux segments de la tige d'asperge	38
1.4.1	Méthode	38
1.4.2	Résultats et Discussion	39
1.5	Caractérisation par UPLC des polyphénols totaux dans deux segments de la tige d'asperge	40
1.5.1	Méthode	40
1.5.2	Résultats et Discussion	42
2	Études des polyphénols et des flavonoïdes dans différentes variétés d'asperge	44
2.1	Matériel	44
2.2	Réactifs et solutions	45
2.3	Extraction et quantification des polyphénols et des flavonoïdes dans différentes variétés d'asperge	45
2.3.1	Méthode	45
2.3.2	Résultats et Discussion	46
2.4	Caractérisation des polyphénols par UPLC dans la variété d'asperge Guelph Millenium.....	47
2.4.1	Méthode	47
2.4.2	Résultats et Discussion	48
3	Études des polyphénols et des flavonoïdes dans les coproduits d'asperge.....	49
3.1	Matériel	49
3.2	Réactifs et solutions	50
3.3	Extraction et quantification des polyphénols et des flavonoïdes dans les coproduits d'asperge	50
3.3.1	Méthode	50
3.3.2	Résultats et Discussion	51
3.4	Caractérisation des polyphénols par UPLC dans les coproduits d'asperge.....	51
3.4.1	Méthode	51
3.4.2	Résultats et Discussion	52
4	Optimisation de l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes dans les coproduits d'asperge	53
4.1	Matériel	53
4.2	Réactifs et solutions	53
4.3	Méthode	54
4.4	Résultats et Discussion	55

Chapitre 4 : Études des saponines dans l'asperge et ses coproduits.....	60
1 Mise au point d'un protocole d'extraction et de dosage des saponines totales.....	61
1.1 Mise au point et comparaison de différents protocoles d'extraction et de dosage des saponines totales	61
1.1.1 Matériel.....	61
1.1.2 Réactifs et solutions.....	61
1.1.3 Méthode.....	62
1.1.3.1 Protocole 1 : Méthode gravimétrique avec pesage direct	62
1.1.3.2 Protocole 2 : Méthode gravimétrique avec pesage après lyophilisation.....	63
1.1.3.3 Protocole 3 : Méthode spectrophotométrique	64
1.1.4 Résultats et Discussion	66
1.2 Mise au point d'un protocole d'extraction et de dosage des saponines totales à partir des coproduits d'asperge.....	67
1.2.1 Matériel.....	67
1.2.2 Réactifs et solutions.....	68
1.2.3 Méthode.....	68
1.2.3.1 Extraction des saponines totales	68
1.2.3.2 Purification des saponines totales	68
1.2.3.3 Quantification des saponines totales	69
1.2.3.4 Étude de l'effet de dégraissage sur la quantification des saponines totales	70
1.2.4 Résultats et Discussion	70
2 Extraction et quantification des saponines dans l'asperge et ses coproduits	71
2.1 Matériel	71
2.2 Méthode	71
2.2.1 Purification des saponines totales.....	72
2.2.2 Quantification des saponines totales.....	72
2.3 Résultats et Discussion	73
Chapitre 5 : Discussion générale, conclusion et perspectives	74
1 Discussion générale.....	75
2 Conclusion et perspectives	77
Bibliographie.....	78

Liste des figures

Figure 1 : Turions d’asperge : Verte (a), Blanche (b), Violette (c).....	5
Figure 2 : Morphologie de la plante d’asperge	6
Figure 3 : Production d’asperge par pays.....	7
Figure 4 : Répartition mondiale de la production d’asperge	7
Figure 5 : Production/Superficie d’asperge dans le monde.....	8
Figure 6 : Production/Superficie Canadienne d’asperge.....	9
Figure 7 : Superficie de la culture des asperges au Québec, Ontario et Canada de 2003 à 2015.....	10
Figure 8 : Turions d’asperge de calibre inférieur.....	11
Figure 9 : Parties coupées des turions d’asperge.....	11
Figure 10 : Structure des acides phénoliques	13
Figure 11 : Structure de base d’un flavonoïde.	14
Figure 12 : Structures chimiques des sous-groupes des flavonoïdes.	14
Figure 13 : Structures chimiques des flavonols	15
Figure 14 : Structures chimiques des flavones.....	15
Figure 15 : Structure chimique des flavanones.	16
Figure 16 : Structures chimiques des isoflavones.	16
Figure 17 : Structures chimiques de certains flavan-3-ols.	17
Figure 18 : Structures chimiques des anthocyanidines les plus courants.....	18
Figure 19 : Structures chimiques des principaux alcools phénoliques.....	19
Figure 20 : Structure chimique du resvératrol.....	19
Figure 21 : Structure chimique des lignanes.	20
Figure 22 : Propriétés biologiques et thérapeutiques des polyphénols.	21
Figure 23 : Squelettes de spirostane stéroïdien (A), furostane stéroïdien (B).....	22

Figure 24 : Squelette de saponine triterpénoïde	23
Figure 25 : Représentation schématique d'un extracteur Soxhlet	26
Figure 26 : Turions coupés d'asperge : partie supérieure et partie inférieure.	34
Figure 27 : Extraction des polyphénols totaux dans les parties supérieure et inférieure de la tige d'asperge	35
Figure 28 : Quantification des polyphénols totaux dans les parties supérieure et inférieure de la tige d'asperge.	37
Figure 29 : Quantification des flavonoïdes totaux dans les parties supérieure et inférieure de la tige d'asperge.	39
Figure 30 : Proportion des polyphénols contenus dans la partie inférieure de tige d'asperge.	43
Figure 31 : Proportion des polyphénols contenus dans la partie supérieure de tige d'asperge.	43
Figure 32 : Asperge de calibre inférieur.....	49
Figure 33 : Bases d'asperge	49
Figure 34 : Optimisation de l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes à partir des coproduits l'asperge.	54
Figure 35 : Optimisation de l'extraction des polyphénols à partir des coproduits d'asperge en fonction de la température.....	55
Figure 36 : Optimisation de l'extraction des flavonoïdes à partir des coproduits d'asperge en fonction de la température.....	55
Figure 37 : Optimisation de l'extraction des polyphénols à partir des coproduits d'asperge en fonction de la concentration d'éthanol.	56
Figure 38 : Optimisation de l'extraction des flavonoïdes à partir des coproduits d'asperge en fonction de la concentration d'éthanol.	56
Figure 39 : Optimisation de l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes à partir des coproduits d'asperge en fonction du ratio soluté/solvant.	57

Figure 40 : Coproduits d'asperge : bases d'asperge.....	61
Figure 41 : Extraction des saponines totales à partir des coproduits d'asperge (Protocole 1)	62
Figure 42 : Récupération des saponines totales par décantation à partir des coproduits d'asperge (Protocole 1).....	63
Figure 43 : Récupération des saponines totales par décantation à partir des coproduits d'asperge (Protocole 2).....	64
Figure 44 : Extraction des saponines totales à partir des coproduits d'asperges (Protocole 3).....	65
Figure 45 : Récupération des saponines totales par décantation à partir des coproduits d'asperge (Protocole 3).....	65
Figure 46 : Formation du complexe coloré pour l'analyse par spectrophotomètre des saponines totales des coproduits d'asperge.....	66
Figure 47 : Quantification des saponines totales dans l'asperge et ses coproduits.	73

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les sources les plus connues de saponines	24
Tableau 2 : Quantification des polyphénols totaux dans deux segments de la tige d'asperge.....	36
Tableau 3 : Quantification des flavonoïdes totaux dans deux segments de la tige d'asperge.....	39
Tableau 4 : Concentration en polyphénols contenus dans les parties supérieure et inférieure de la tige d'asperge	42
Tableau 5 : Quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux dans différentes variétés d'asperge	46
Tableau 6 : Profil des polyphénols contenus dans la variété d'asperge Guelph Millenium	48
Tableau 7 : Quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux dans les coproduits d'asperge	51
Tableau 8 : Profil des polyphénols contenus dans les coproduits d'asperge.	52
Tableau 9 : Quantification des saponines totales dans les coproduits d'asperge selon différents protocoles d'extraction et de dosage	66
Tableau 10 : Effet de la méthode de purification sur la quantification des saponines totales dans les coproduits d'asperge.	70
Tableau 11 : Effet du dégraissage sur la quantification des saponines totales dans les coproduits d'asperge.	71

Liste des abréviations

>	Supérieur à
<	Inférieur à
≥	Supérieur ou égal
W/V	Masse par volume
V/V	Volume par volume
%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
mg	Milligrammes
Kg	Kilogrammes
MS	Matière sèche
MF	Matière fraîche
µm	Micromètre
µl	Microlitre
ha	Hectare
Cm	Centimètre
g	Gramme
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
ACS	American Chemical Society
nm	Nanomètre
ppm	Partie par million
EAG	Équivalent Acide Gallique
KV	Kilovolts
h	Heure
UPLC	Chromatographe en phase liquide à ultra-haute performance
MS	Spectrométrie de masse

Dédicace

À l'âme de mes parents 'Hedi & Khadhria'

Merci de m'avoir encouragé et soutenu tout au long de ma vie.

« Une personne chère ne nous quitte jamais. Elle vit au plus profond de notre cœur
et pour la voir, il suffit de fermer les yeux »

À Mon frère Dr. Moez

Cette réalisation est en grande partie possible grâce à toi.

Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, M. Paul Angers, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet et de le mener à bien. Je suis très reconnaissant non seulement pour sa confiance en moi mais aussi pour sa patience et sa motivation. Son encadrement et sa disponibilité m'ont permis d'explorer de nouveaux domaines de la science et d'acquérir beaucoup d'autonomie. Je tiens également à remercier M. André Gosselin, mon co-directeur de recherche pour son aide précieuse, ses bons conseils et ses qualités scientifiques et humaines. Je remercie aussi M. Yves Desjardins pour son soutien et ses conseils tout au long de ce projet.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde et sincère gratitude envers les partenaires industriels du projet, Diana Food Canada (anciennement Nutra Canada) et la Ferme du Domaine. Je tiens aussi à remercier M. David Wolin, professeur à l'université de Guelph, pour nous avoir fourni les différents cultivars d'asperge étudiés dans ce projet.

J'aimerais remercier les organismes subventionnaires, le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) et le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG).

Mes vives reconnaissances vont également à Ashraf Badr, qui m'a accompagné avec ses précieux conseils tout au long de ce projet. Merci également à toute l'équipe de la plateforme analytique Pascal Dubé, Véronique Richard, Perrine Feutry et mes collègues de laboratoire, Lemia, Minty, Maëlle, Ines, Ichrak pour les moments passés ensemble.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde et sincère gratitude envers mes parents, ma famille et mon épouse pour m'avoir encouragé et soutenu tout au long de mes études.

Introduction

Les plantes représentent une source de principes actifs dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis longtemps (Liu et al., 2015). Elles sont capables de produire une grande diversité de métabolites ne participant pas à leur métabolisme de base, mais représentant des produits du métabolisme secondaire, par exemple les polyphénols, les flavonoïdes, les saponines etc. (Shashirekha et al., 2015).

L'utilisation de ces substances naturelles dans de nombreux produits de consommation connaît une augmentation croissante en raison de la demande pour des produits naturels, d'autant plus lorsqu'ils possèdent des propriétés santé (activité antioxydante, activité antimicrobienne, lutte contre les maladies etc.) (Li et al., 2014, Sparg et al., 2004).

Dans le monde, environ un tiers de la part comestible des aliments destinés à la consommation humaine est perdu ou gaspillé, ce qui équivaut à environ 1,3 milliards de tonnes par an. Les denrées sont gaspillées tout au long de la chaîne alimentaire, de la production initiale à la consommation finale (FAO, 2012). Les végétaux forment une grande partie de ces pertes non valorisées.

L'asperge, cultivée dans plus de 60 pays avec une production mondiale de plus de 8,7 millions de tonnes en 2016, génère 1,3 millions de tonnes de coproduits tout au long de la chaîne alimentaire de la récolte à la consommation (FAOSTAT, 2016). La production canadienne d'asperge en 2016 est de l'ordre de 8 723 tonnes avec 1 691 ha de surface récoltée. Québec possède 20 % de la superficie nationale de la culture d'asperge (Agriculture et Agroalimentaire Canada « Profil de la culture de l'asperge au Canada », 2015). Les coproduits issus de la culture d'asperge sont de l'ordre de 15 %, représentant pour le Canada seul, en 2016, 1 305 tonnes (Statistique Canada « Profil sectoriel de l'industrie horticole au Québec », 2016). Il existe donc un besoin de valoriser ces grandes quantités de coproduits d'asperge qui représentent un matériau de valeur à faible coût. Parmi les techniques développées pour valoriser les coproduits végétaux se trouve le domaine de l'extraction des substances bioactives sous forme isolées, concentrées et purifiées, pour une utilisation dans un large champ d'application (additifs alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques et nutritionnels).

La valorisation des coproduits de l'asperge (*Asparagus officinalis* L.), par l'extraction des molécules bioactives, représente une solution prometteuse, car l'asperge est riche en molécules bioactives telles que des polyphénols, des flavonoïdes et des saponines (Huang and Kong, 2006). Les polyphénols dans l'asperge sont principalement des flavonoïdes avec une concentration allant de 25,9 à 76,3 mg/100 g à base de matière fraîche (MF). La rutine représente le flavonoïde le plus dominant dans l'asperge avec une concentration ≥ 70 % des flavonoïdes totaux (Fuentes-Alventosa et al., 2008). Les saponines dans l'asperge sont des glycosides stéroïdiens avec une dominance de la protodioscine avec une concentration allant de 14 à 80 mg/100 g à base de matière fraîche (MF) (Schwarzbach et al., 2006).

Les méthodes utilisées pour l'extraction des molécules bioactives des coproduits d'asperge sont soit des méthodes conventionnelles qui se résument en extraction par macération, soxhlet, reflux et la combinaison de ces techniques, soit des méthodes vertes « greens technologies » qui se résument en extraction assistée par ultrasons, extraction assistée par micro-ondes et/ou extraction accélérée par solvant.

Dans le but de valoriser les coproduits d'asperge (*Asparagus officinalis* L.), ce projet vise à développer une méthode d'extraction et de caractérisation des molécules bioactives dans les coproduits de la production d'asperge en utilisant une technologie verte.

Chapitre 1 : Revue de la littérature

1 Valorisation des résidus agricoles et alimentaires

La grande quantité des résidus produits par l'industrie alimentaire, en plus d'être une grande perte de matériaux de valeur, soulève également de sérieux problèmes de gestion du point de vue économique et écologique (Lin et al., 2013). Pour répondre à ces problèmes économiques et écologique, la valorisation des résidus représente une solution prometteuse pour absorber des millions de tonnes de résidus. La valorisation des coproduits de l'industrie alimentaire permette de donner une deuxième vie aux coproduits et permet de limiter l'utilisation des sources énergétiques conventionnelles.

Selon la nature des coproduits à valoriser, plusieurs techniques de valorisation ont été développées. La transformation de coproduits en biocarburants et en biosolvants représente une valorisation très prometteuse sur le plan économique ainsi qu'écologique. L'intégration des coproduits dans le marché de l'alimentation animale représente aussi une technique prometteuse de valorisation (Mirabella et al., 2014). Les coproduits de fruits et légumes ont été valorisé dans le domaine des aliments fonctionnels vu que leurs intérêts santé (Maurya et al., 2015).

Ce projet se concentrait sur la valorisation phytochimique des coproduits d'asperge en partenariat avec deux entreprises Québécoise : Diana Food Canada Inc et Ferme du Domaine.

2 Présentation de la plante étudiée : Asperge : *Asparagus officinalis* L.

2.1 Définition

L'asperge (*Asparagus officinalis* L.) est une espèce monocotylédone de la famille des *Asparagaceae* originaire de l'est du bassin méditerranéen. L'asperge est une plante vivace dioïque avec des plantes mâles et femelles. L'asperge est cultivée pour ses jeunes tiges, connues sous le nom de turions, émergent du sol chaque printemps et collectés quotidiennement sur une période d'environ deux mois. La plante a une période de repos en hiver, sauf dans les climats chauds où elle pousse toute l'année (Doré, 1990).

La culture des asperges a été pratiquée pour la première fois par les Grecs 200 av. J.-C et ensuite par les Romains (Elena, 2007) . Il existe plus de 300 espèces d'asperge mais une vingtaine seulement sont comestibles.

Trois types d'asperge sont cultivés, identifiés par leur couleur de turions : verte, blanche ou violette (Figure 1). Les asperges blanches sont favorisées en Europe, alors que les consommateurs nord-américains préfèrent les asperges vertes, et un marché émerge actuellement pour les asperges violettes.

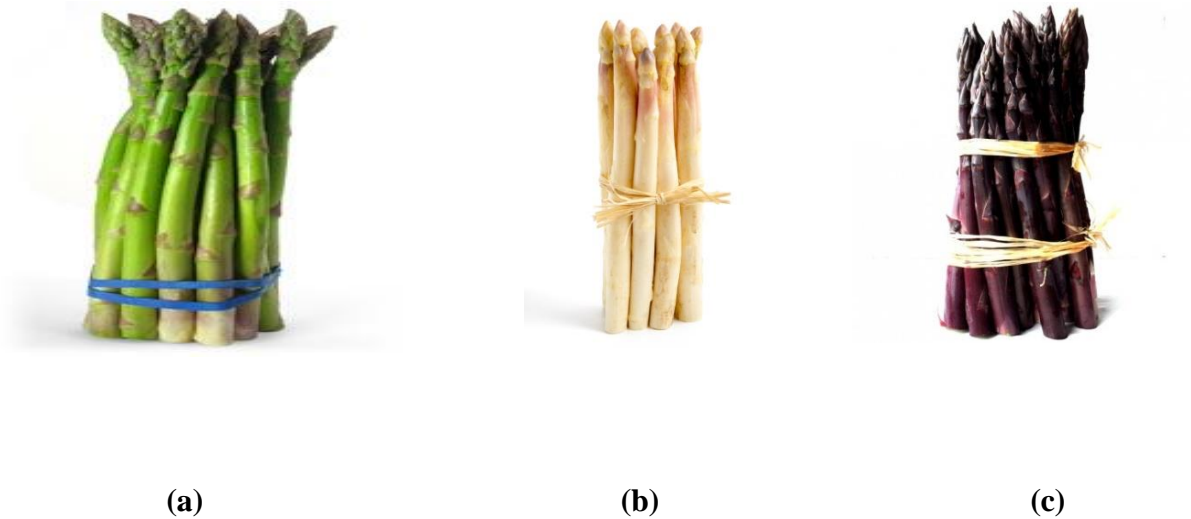


Figure 1 : Turions d'asperge : Verte (a), Blanche (b), Violette (c)

2.2 Description

L'asperge est formée d'une partie pérenne appelée « couronne » qui a une structure de type rhizome, des tiges droites appelées « turions », des feuilles fines ramifiées et des fruits sous forme de baie rouge contenant des graines noires (Doré, 1990). (Figure 2)



1. Turion d'asperge ; 2. Feuille d'asperge ; 3. Couronne d'asperge avec bourgeons et racines charnues ; 4. Fleur d'asperge ; 5. Coupe verticale de la fleur d'asperge ; 6. Coupe verticale d'une graine d'asperge ; 7. Ovaire ; 8. Coupe verticale de l'ovaire ; 9. Fruits d'asperge.

Figure 2 : Morphologie de la plante d'asperge

(Source www.asparagus-friends.com/the-asparagus-plant consulté le 15 mars 2017)

2.3 Production mondiale d'asperge

L'asperge est cultivée dans plus de 60 pays avec une dominance pour l'hémisphère nord avec 77 % de la production mondiale contre 23 % pour l'hémisphère sud (figure 3).

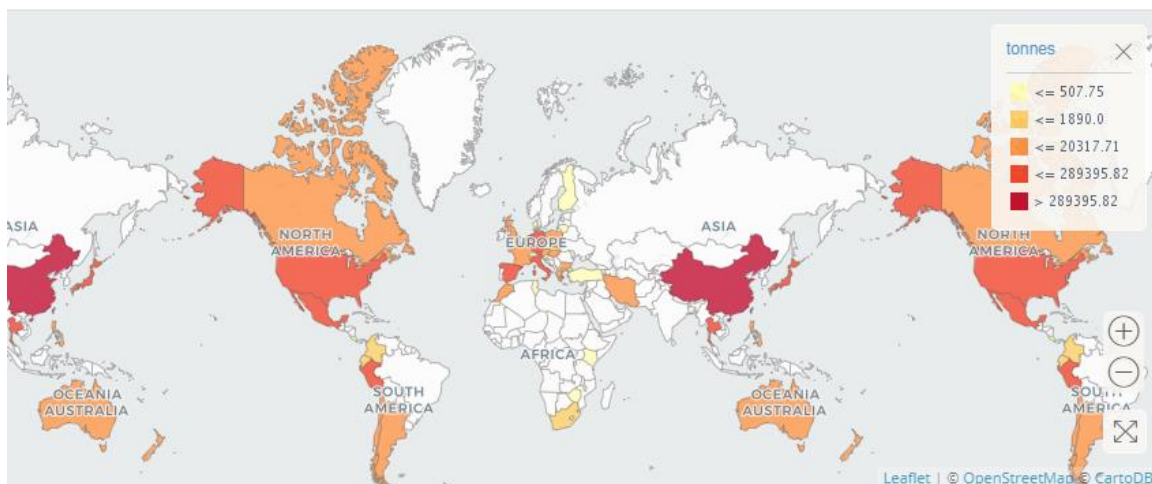


Figure 3 : Production d'asperge par pays

(Source : FAOSTAT <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC/visualize> consulté le 15 mars 2018).

L'Asie possède la plus grande production d'asperge avec 89,3 % de la production mondiale d'asperge. (Figure 4)

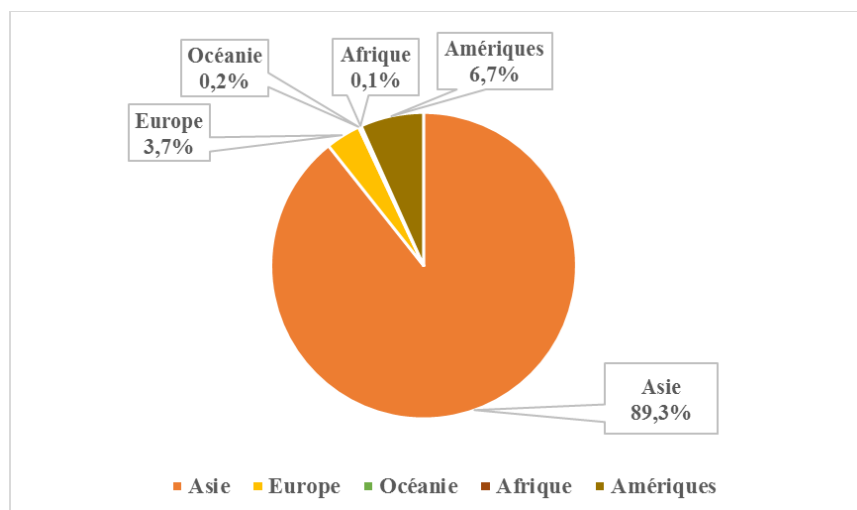


Figure 4 : Répartition mondiale de la production d'asperge

(Source : FAOSTAT <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC/visualize> consulté le 15 mars 2018).

La production mondiale d'asperge en 2016 était de plus de 8,7 millions de tonnes avec une surface récoltée de 1 530 567 ha (Figure 5).

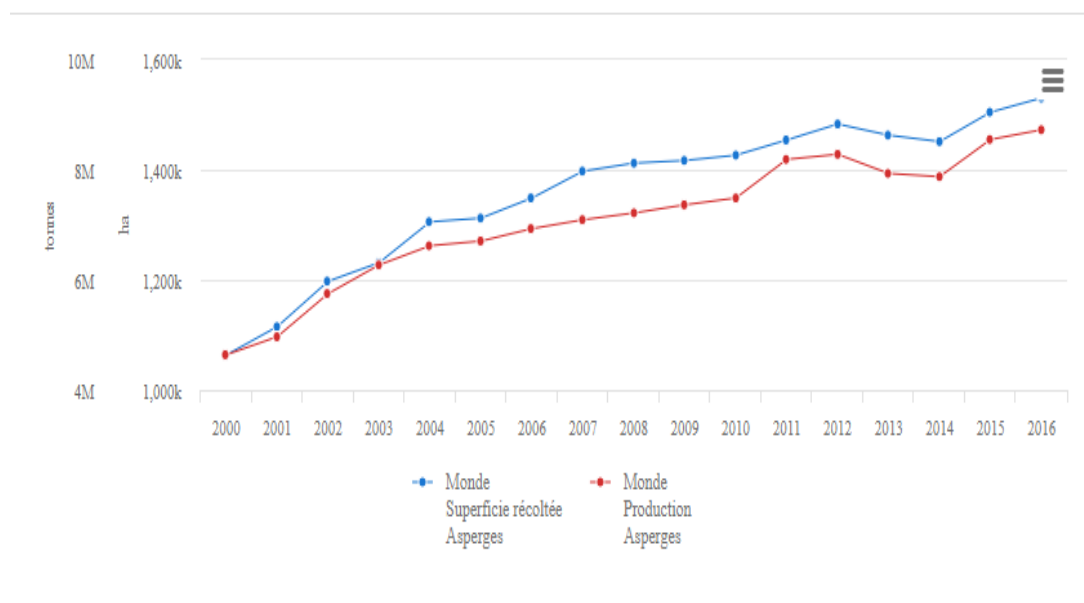


Figure 5 : Production/Superficie d'asperge dans le monde

(Source : FAOSTAT <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC/visualize> consulté le 15 mars 2018).

Les grands producteurs mondiaux d'asperge sont la Chine avec 6,2 millions de tonnes, le Pérou avec 289 395 tonnes, le Mexique avec 96 480 tonnes, l'Allemagne avec 88 066 tonnes et les États-Unis d'Amérique avec 56 573 tonnes.

Les autres pays producteurs importants sont le Thaïlande (56 549 tonnes), l'Espagne (53 597 tonnes), l'Italie (40 353 tonnes), le Japon (29 266 tonnes) et la France (20 317 tonnes). (Source : FAOSTAT <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC/visualize> consulté le 15 mars 2018).

2.4 Production canadienne d'asperge

La production canadienne d'asperge en 2016 est de 8 723 tonnes avec 1 691 ha de surface récoltée (Figure 6)

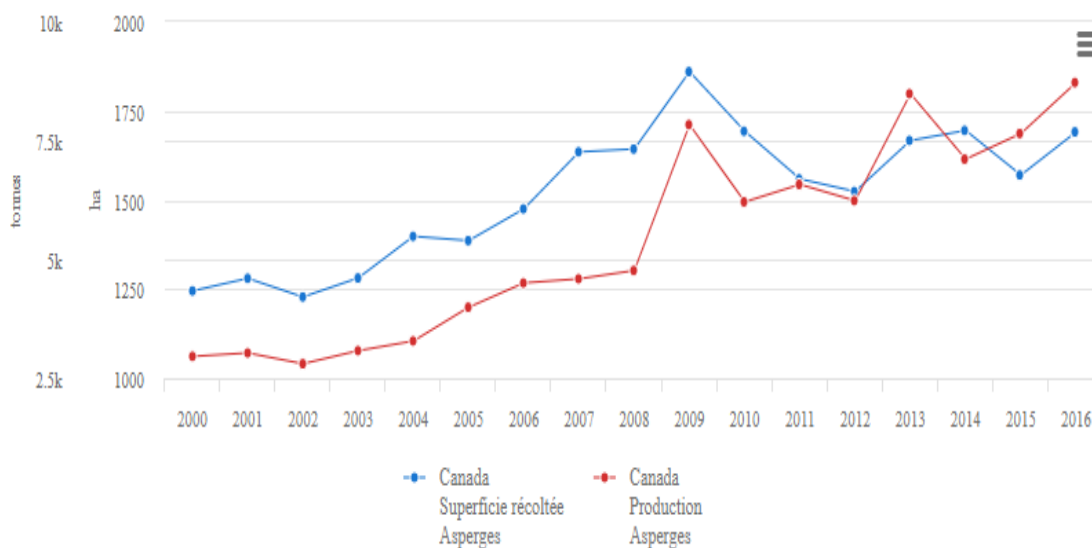


Figure 6 : Production/Superficie Canadienne d'asperge

(Source : FAOSTAT <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC/visualize> consulté le 15 mars 2018).

L'Ontario produit 70 % d'asperge cultivée au Canada. L'asperge est aussi cultivée au Québec (20 % de la superficie nationale) et en Colombie-Britannique (5 % de la superficie nationale). (Source : Agriculture et Agroalimentaire Canada « Profil de la culture d'asperge au Canada », 2015 www.agr.gc.ca/cla-profilsdeculture consulté le 15 mars 2018)

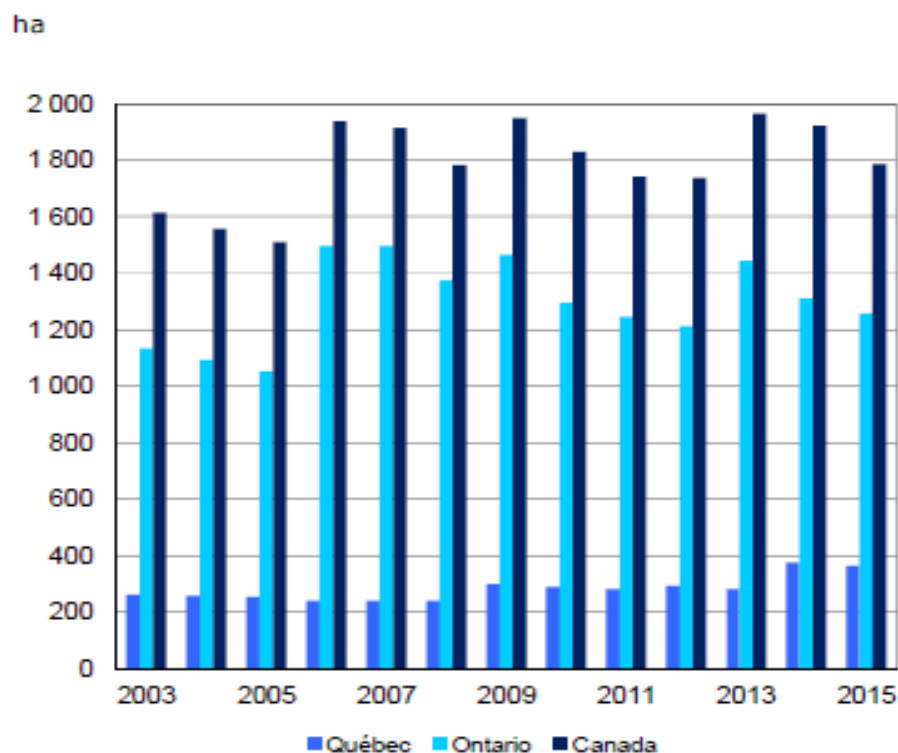


Figure 7 : Superficie de la culture des asperges au Québec, Ontario et Canada de 2003 à 2015.

(Source : Statistique Canada « Profil sectoriel de l'industrie horticole au Québec », 2016 www.stat.gouv.qc.ca consulté le 15 mars 2018).

L'asperge est surtout destinée au marché frais. La consommation annuelle d'asperge par personne au Canada est de l'ordre de 0,6 kg d'asperge fraîche et de 0,35 kg d'asperge en conserve. Les déchets issus de la culture d'asperge sont de l'ordre de 15 %, représentant pour le Canada seul, en 2016, 1 305 tonnes de déchets exploitables pour la valorisation en composés bioactifs. (Source : Statistique Canada « Profil sectoriel de l'industrie horticole au Québec », 2016 www.stat.gouv.qc.ca consulté le 15 mars 2018).

2.5 Coproduits d'asperge

La commercialisation d'asperge au Canada est régie par des normes qui précisent la taille de la tige d'asperge (turion) ainsi que le diamètre de cette tige. La taille de turion d'asperge est souvent fixée à 23 cm alors que le diamètre est de 8 à 9 mm (Source : Agence canadienne d'inspection des aliments « Asperges » <http://www.inspection.gc.ca> site consulté le 15 avril 2017).

Les tiges d'asperge qui sont de taille inférieure à 23 cm et de diamètre inférieur à 8 mm sont considérées comme des rejets et constituent des coproduits valorisables (figure 8). Les tiges de taille supérieure à 23 cm sont coupées à 23 cm et les parties éliminées sont considérées comme des coproduits (figure 9).



Figure 8 : Turions d'asperge de calibre inférieur.



Figure 9 : Parties coupées des turions d'asperge

2.6 Effet sur la santé et composés majeurs d'asperge

Les asperges (*Asparagus officinalis* L.) sont connues comme une source riche en composés phytochimiques (Maeda et al., 2005). Dans plusieurs études pharmacologiques, les asperges ont démontré plusieurs activités biologiques telles que l'atténuation de la colique ulcéreuse et la modulation du microbiote intestinal (Power et al., 2016) ainsi que les activités cytotoxiques (Shao et al., 1997), anti-inflammatoires (Jang et al., 2004), antimutagènes (Xinhui and Jing, 2001) et antifongiques (Shimoyamada et al., 1990). Les composés bioactifs présents dans les turions d'asperge et responsables de ses effets sur la santé sont principalement les polyphénols et les saponines (Motoki et al., 2012, Huang and Kong, 2006).

Les polyphénols dans l'asperge sont principalement des flavonoïdes avec une concentration allant de 25,9 à 76,3 mg/100 g à base de matière fraîche (MF). La rutine représente le flavonoïde le plus dominant dans l'asperge avec une concentration ≥ 70 % des flavonoïdes totaux (Fuentes-Alventosa et al., 2008). L'asperge contient aussi les acides hydroxy-cinnamiques, en particulier l'acide férulique qui a un fort pouvoir antioxydant et pouvant être bénéfique dans la prévention des désordres liés au stress oxydatif, y compris la maladie d'Alzheimer, le diabète, les cancers, l'hypertension, l'athérosclérose et les maladies inflammatoires (Zhao and Moghadasian, 2008). Les saponines dans l'asperge sont des glycosides stéroïdiens avec une dominance de la protodioscine avec une concentration allant de 14 à 80 mg/100 g à base de matière fraîche (MF) (Schwarzbach et al., 2006).

3 Les polyphénols

3.1 Définition des polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés dans les plantes en réponse aux stress écologiques et physiologiques (Khoddami et al., 2013). Ils possèdent un ou plusieurs cycles aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyles allant de molécules phénoliques simples de 500 Dalton à des composés fortement polymérisés avec des poids moléculaires de plus de 30 000 Dalton (Bravo, 1998). Les polyphénols sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant la capacité de précipiter certains alcaloïdes, la gélatine et autres protéines de la solution (Haslam and Cai, 1994). Le terme ‘polyphénols’ est un terme collectif pour plusieurs sous-groupes de composés phénoliques.

Les polyphénols sont largement distribués dans le règne végétal et sont les métabolites secondaires les plus abondants des plantes, avec plus de 8 000 structures phénoliques connues, allant de simples molécules telles que les acides phénoliques jusqu’à des substances fortement polymérisées telles que les tanins (Dai and Mumper, 2010). Ils sont présents dans différentes parties des plantes selon l’espèce végétale et le composé phénolique considéré (Di Ferdinando et al., 2014, Agati et al., 2012)

Les composés phénoliques sont des constituants largement répandus des aliments végétaux (fruits, légumes, céréales, olives, légumineuses, chocolat, etc.) et des boissons (thé, café, bière, vin, etc.) et responsables de plusieurs propriétés organoleptiques des aliments végétaux (Dai and Mumper, 2010).

Comme la plupart des métabolites secondaires, les polyphénols sont synthétisés par les plantes afin d’accomplir certaines fonctions. Ils sont généralement impliqués dans :

- La croissance et la reproduction des plantes ;
- La défense contre les rayonnements ultraviolets ;
- La défense contre l’agression par les pathogènes, les parasites et les prédateurs ;
- La production des arômes et parfums et la contribution dans la pigmentation ;
- La protection des cultures contre la peste et la germination des graines avant la récolte (Dai and Mumper, 2010, Bravo, 1998).

3.2 Classification des polyphénols

Les polyphénols constituent le groupe de produits naturels le plus distribué dans le règne végétal. Cette large distribution a conduit à différentes façons de classer ces composés en se basant sur l'origine, la fonction biologique ou la structure chimique (Tsao, 2010)

En utilisant la classification selon la structure chimique, les polyphénols sont divisés en plusieurs classes selon le nombre des anneaux phénoliques qu'ils contiennent et les éléments structuraux qui lient ces anneaux entre eux.

Les principaux groupes de polyphénols sont : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les alcools phénoliques, les stilbènes et les lignanes (D Archivio et al., 2007).

3.2.1 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont subdivisés, en se basant sur les squelettes C1-C6 et C3-C6, en deux principaux types : l'acide benzoïque et les dérivés d'acide cinnamique (figure 10).

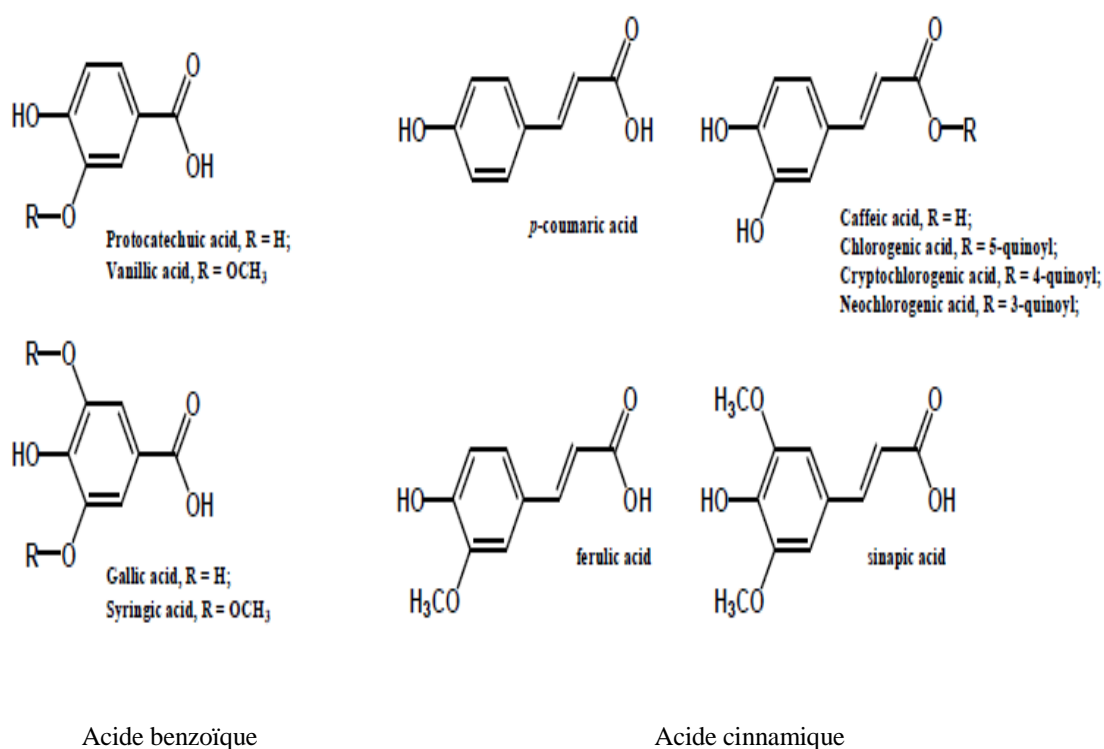


Figure 10 : Structure des acides phénoliques

(Adapté de (Tsao, 2010))

3.2.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent la classe la plus répandue des composés phénoliques dans le règne végétal. La structure de base d'un flavonoïde est formée de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 qui peut évoluer en un cycle C (hétérocycle) (Figure 11).

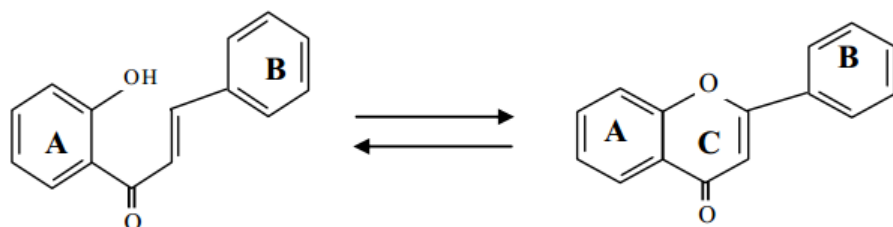


Figure 11 : Structure de base d'un flavonoïde.

(Adapté de (Heller and Forkmann, 1994))

Les principaux sous-groupes des flavonoïdes sont : les flavones, les flavonols, les anthocyanes, les isoflavones les flavan-3-ols, et les flavanones. Il y a d'autres flavonoïdes qui se trouvent à faible concentrations dans les aliments tels que les flavane-3,4-diols, les dihydroflavonols, les coumarines, les dihydrochalcones, les chalcones, et les aurones (figure 12).

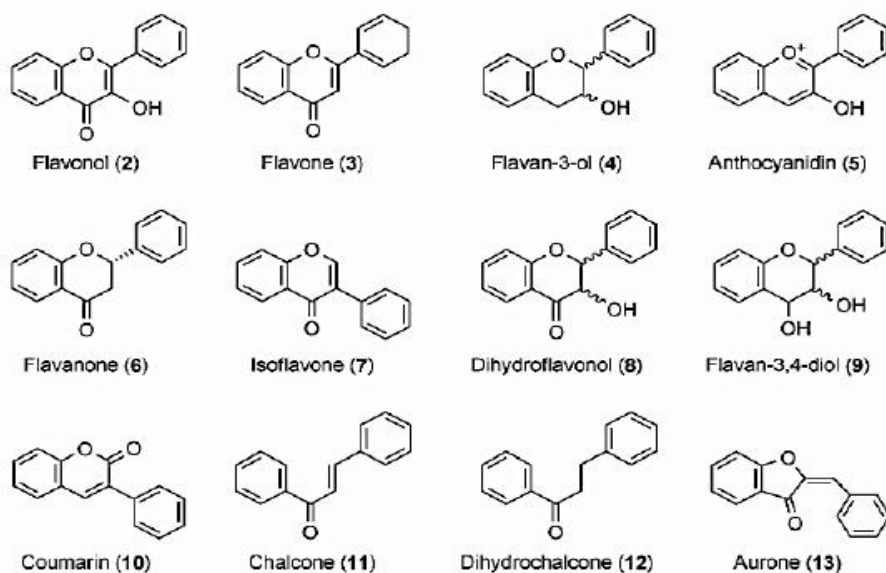


Figure 12 : Structures chimiques des sous-groupes des flavonoïdes.

(Adapté de (Crozier et al., 2009)).

3.2.2.1 Flavonols

Les flavonols ont une double liaison entre C2 et C3, avec un groupe hydroxyle en position C3 (figure 13). Ils représentent les flavonoïdes les plus omniprésents dans les aliments avec la quercétine le composé le plus représentatif. Les principales sources de flavonols sont les oignons (jusqu'à 1,2 g/kg de poids frais), le chou frisé, les poireaux et le brocoli.

Il est important de noter que la biosynthèse des flavonols est stimulée par la lumière (D Archivio et al., 2007)

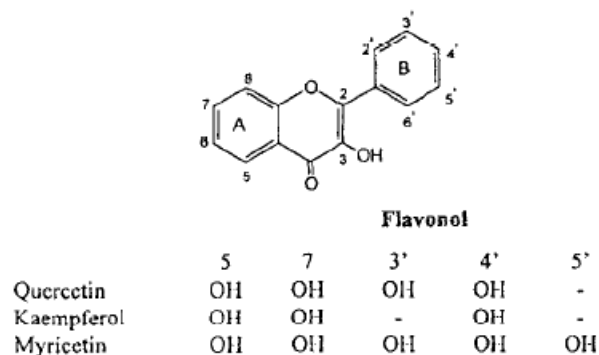


Figure 13 : Structures chimiques des flavonols

(Adapté de (Di Carlo et al., 1999)).

3.2.2.2 Flavones

Les flavones ont une double liaison entre C2 et C3 et sont les flavonoïdes les moins communs (figure 14). Les flavones se distinguent des flavonols par l'absence de OH en C3. Les flavones se trouvent essentiellement dans le céleri, le persil et quelques fines herbes (Crozier et al., 2009)

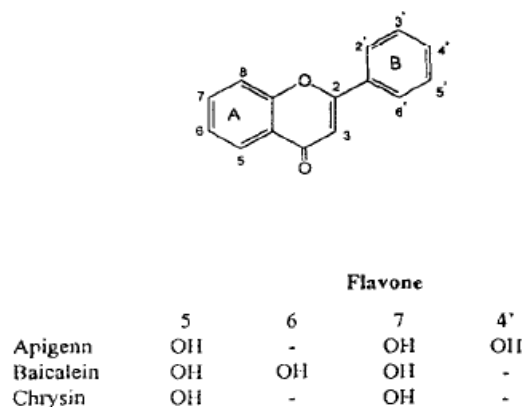


Figure 14 : Structures chimiques des flavones

(Adapté de (Di Carlo et al., 1999)).

3.2.2.3 Flavanones

Les flavanones se caractérisent par la présence d'une chaîne saturée à trois atomes de carbone et d'un atome d'oxygène dans le C4 (figure 15). Ils sont généralement glycosylés par un disaccharide dans C7. Les flavanones sont présents à haute concentration uniquement dans les agrumes, mais ils sont également trouvés dans les tomates et certaines plantes aromatiques telles que la menthe (D Archivio et al., 2007).

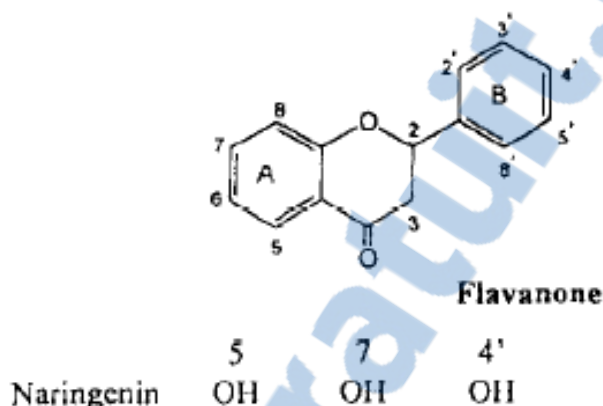


Figure 15 : Structure chimique des flavanones.

(Adapté de (Di Carlo et al., 1999))

3.2.2.4 Isoflavones

Les isoflavones diffèrent des autres flavonoïdes, par la liaison de l'anneau B à l'hétérocycle C à C3, et non pas à C2 (Crozier et al., 2009). Les isoflavones sont contenues presque exclusivement dans les légumineuses (D Archivio et al., 2007)

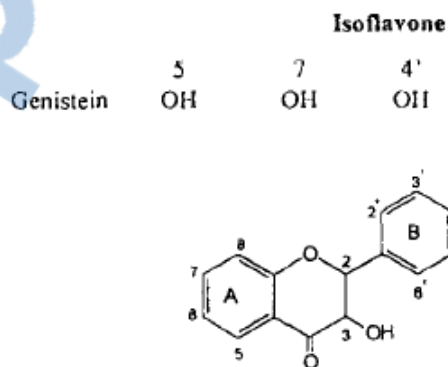


Figure 16 : Structures chimiques des isoflavones.

(Adapté de (Di Carlo et al., 1999)).

3.2.2.5 Flavan-3-ols

Les flavan-3-ols ou flavanols sont un sous-groupe de flavonoïdes avec un carbone C3 saturé dans l'hétérocycle C. Ils représentent la sous-classe de flavonoïdes la plus complexe allant des simples monomères (catéchine et épicatechine), aux polymères de proanthocyanidines qui sont connus aussi comme des tanins condensés (D Archivio et al., 2007).

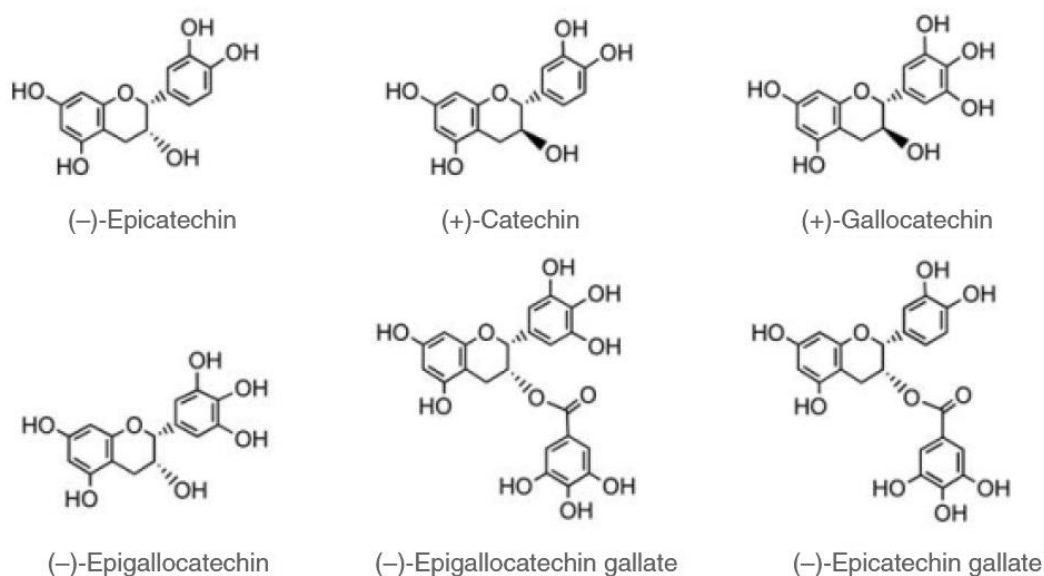


Figure 17 : Structures chimiques de certains flavan-3-ols.

(Adapté de (Crozier et al., 2009)).

3.2.2.6 Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments hydrosolubles, responsables de la plupart des couleurs rouge, bleu et violet des fruits, légumes et fleurs (Mazza et al., 2004). Les anthocyanes sont largement distribués dans l'alimentation humaine, ils se retrouvent dans le vin rouge, certaines variétés de céréales et certains légumes mais ils sont plus abondants dans les fruits (D Archivio et al., 2007).

Les anthocyanes englobent les anthocyanidines et les anthocyanosides. Les anthocyanidines sont des flavonoïdes contenant un hétérocycle pyrrole, alors que les anthocyanosides se différencient par la présence d'un sucre. La pélagonidine (couleur rouge-orange), la cyanidine (couleur rouge magenta) et la delphinidine (couleur mauve) représentent les anthocyanidines les plus courantes (Crozier et al., 2008).

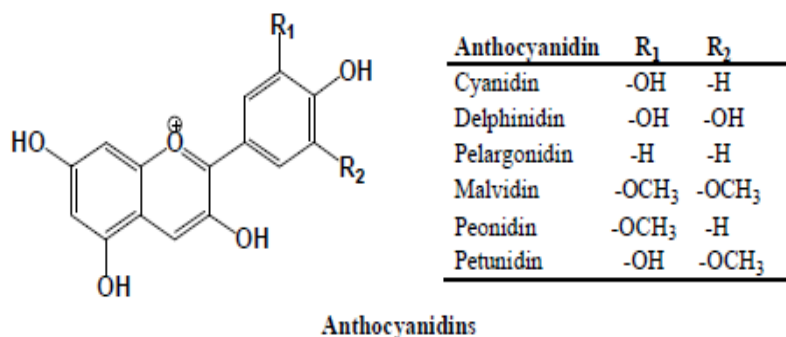


Figure 18 : Structures chimiques des anthocyanidines les plus courantes

(Adapté de (Tsao, 2010)).

3.2.3 Alcools phénoliques

Les alcools phénoliques sont des composés qui possèdent au moins une fonction alcool et une fonction phénol. Le tyrosol (4-hydroxyphényléthanol) et l'hydroxytyrosol (3,4-dihydroxyphényléthanol) sont les principaux alcools phénoliques. Ils sont contenus principalement dans de l'huile d'olive extra vierge (40,2 et 3,8 mg/kg respectivement) (D'Archivio et al., 2007, Cabrini et al., 2001).

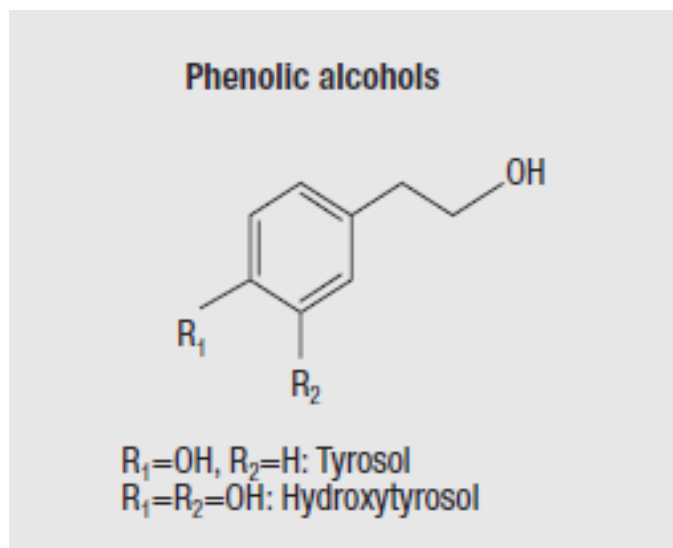


Figure 19 : Structures chimiques des principaux alcools phénoliques

(Adapté de (D Archivio et al., 2007))

3.2.4 Stilbènes

Les stilbènes sont formées de deux noyaux benzéniques liés par une molécule d'éthanol ou d'éthylène (Moreno and Peinado, 2012). Ils sont produits par les plantes en réponse à une infection par des agents pathogènes ou à une variété de conditions de stress (D Archivio et al., 2007, Delmas et al., 2006, Bavaresco, 2003). Le représentant principal des stilbènes est le resvératrol (3,5,4'-trihydroxystilbène) qui se présente sous forme d'isomère cis et trans (Figure 20).

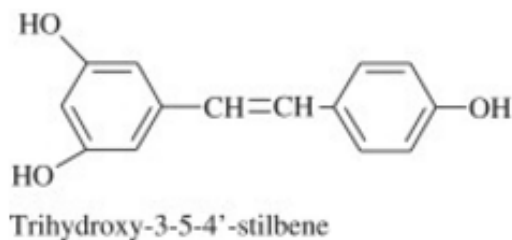


Figure 20 : Structure chimique du resvératrol

(Adapté de (Moreno and Peinado, 2012)).

3.2.5 Lignanes

Les lignanes sont produits par dimérisation oxydante de deux unités de phénylpropane (figure 21). Ils sont principalement présents dans la nature sous la forme libre, alors que leurs dérivés glycosides ne sont qu'une forme mineure. L'intérêt pour les lignanes augmente en raison des applications potentielles en chimiothérapie et divers autres effets pharmacologiques (D Archivio et al., 2007).

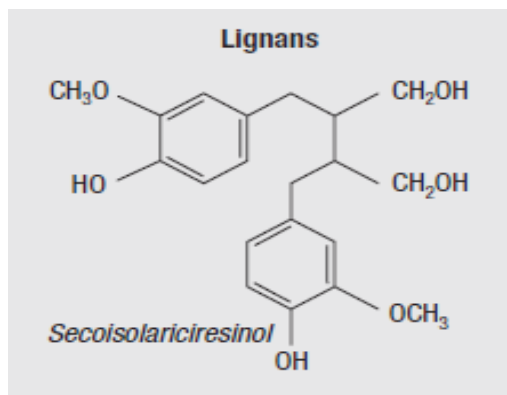


Figure 21 : Structure chimique des lignanes.

(Adapté de (D Archivio et al., 2007)).

3.3 Propriétés biologiques et thérapeutiques des polyphénols

Les polyphénols attirent de plus en plus l'attention en tant que des agents potentiels pour la prévention et le traitement des maladies liées au stress oxydatif. Au cours des deux dernières décennies, les polyphénols ont été largement étudiés et plusieurs bioactivités de ces composés ont été relevées (Li et al., 2014). Les polyphénols sont des antioxydants qui ont plusieurs propriétés biologiques : anti-diabétique, anticancéreuse, anti-inflammatoire, cardioprotectrice, antivirales antiasthmatique, antiseptique, hépato-protecteur, antifongique, antibactériennes, antivirales etc. (figure 22).(Kumar and Pandey, 2013).

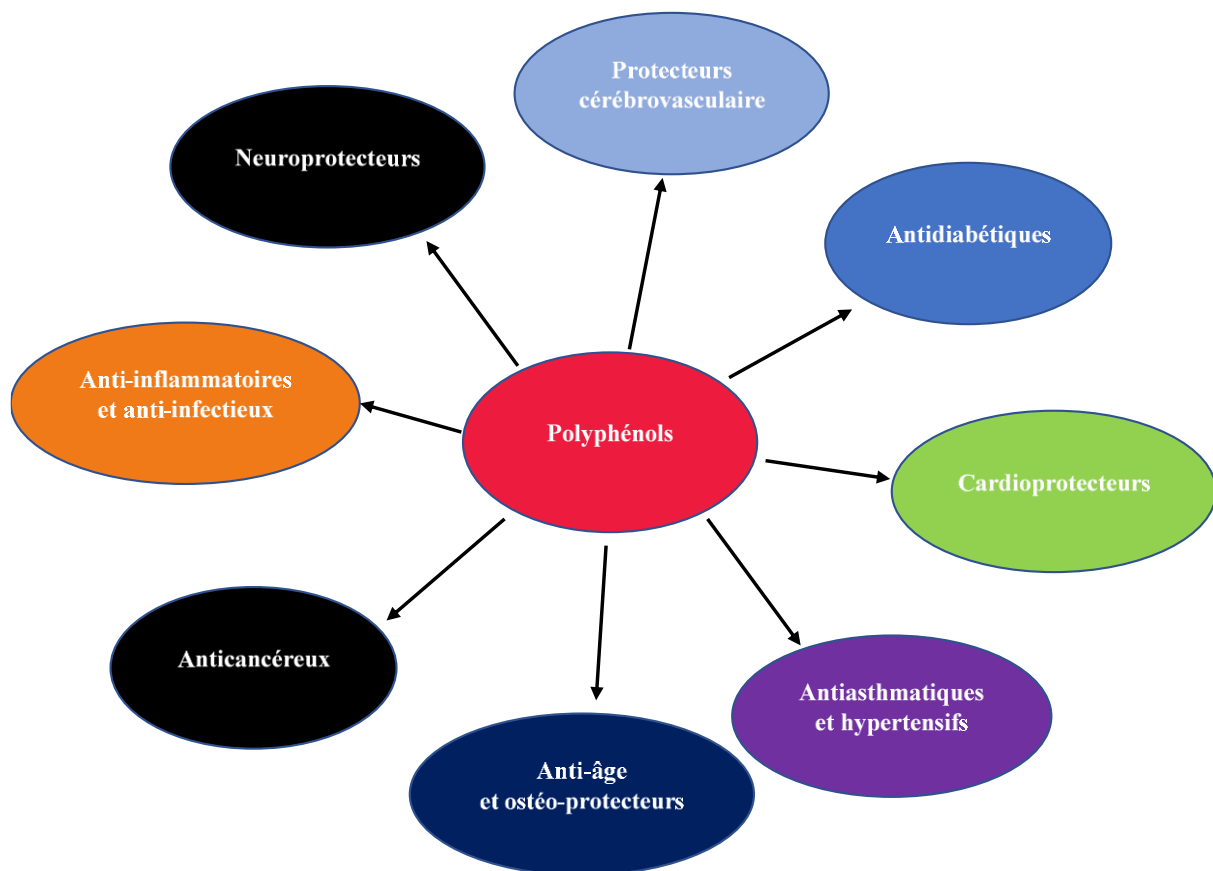


Figure 22 : Propriétés biologiques et thérapeutiques des polyphénols.

(Adapté de (Kumar and Pandey, 2013)).

4 Les saponines

4.1 Définition

Les saponines appelées aussi saponosides sont une classe spécifique de métabolites secondaires, produits naturels abondamment retrouvés dans le règne végétal (Sparg et al., 2004). Leur nom provient du latin « sapo » signifiant « savon » en raison de leurs propriétés à former des solutions moussantes en présence d'eau (Vincken et al., 2007). Les saponines agissent comme une barrière chimique contre les agents pathogènes et les herbivores (Cheok et al., 2014).

Les saponines se trouvent dans les tissus végétaux qui sont les plus vulnérables aux attaques fongiques, bactériennes et des insectes (Cheok et al., 2014). Structuralement parlant, les saponines sont constituées d'un squelette stéroïdique ou triterpénique porteur d'une (monodesmoside) ou de plusieurs (bidesmoside, tridesmoside) sections sucres. La nature des sections osidiques retrouvées à l'intérieur des saponines est très variée.

Les monosaccharides les plus courants sont le D-glucose, le D-galactose, le L-rhamnose, le L-arabinose, le D-xylose, le D-fucose, l'acide D-glucuronique et l'acide D-galacturonique (Deore et al., 2009).

4.2 Classification des saponines

Selon la nature de l'aglycone, les saponines sont classées en deux groupes :

- Saponines stéroïdes (ou stéroïdiques): Elles sont presque exclusivement présentes chez les angiospermes monocotylédones et possèdent un squelette de spirostane (figure 23 A) avec 27 atomes de carbone qui comporte habituellement six cycles. Dans certains cas, le groupe hydroxyle en position 26 est engagé dans une liaison glycosidique pour donner un squelette de furostane (figure 23 B) (Sparg et al., 2004).

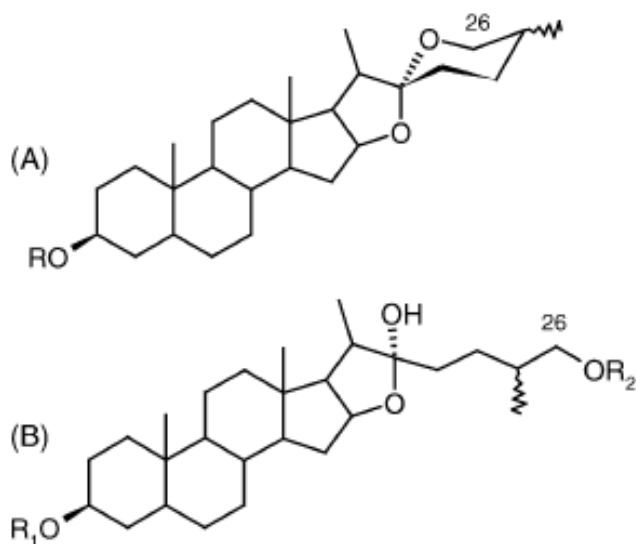


Figure 23 : Squelettes de spirostane stéroïdien (A), furostane stéroïdien (B)

(Adapté de (Sparg et al., 2004))

- Saponines triterpènes : Elles sont les plus abondantes et se trouvent principalement dans les angiospermes dicotylédones. Les saponines triterpènes sont constituées d'un aglycone triterpénoïde (figure 24) formé d'un squelette de 30 atomes de carbone.(Sparg et al., 2004). Elles sont des dérivés du noyau α ou β - amyrine (Deore et al., 2009).

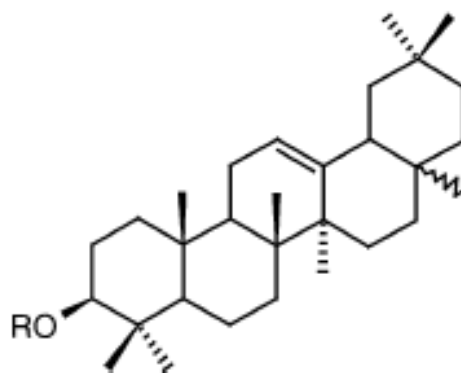


Figure 24 : Squelette de saponine triterpénoïde

(Adapté de (Sparg et al., 2004)).

4.3 Distribution des saponines dans le règne végétal

La présence de saponines a été signalée dans plus de 100 familles de plantes et dans quelques sources marines telles que les étoiles de mer et les Holothuries. Les saponines stéroïdiennes se trouvent principalement dans les monocotylédones (comme les agavaceae, les dioscoréacées et les liliacées) et les saponines triterpéniques sont principalement présentes dans les dicotylédones (légumineuses, araliaceae, caryophyllaceae) (Güçlü-Üstündağ and Mazza, 2007). Les sources les plus connues de saponines sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Les sources les plus connues de saponines

(Adapté de (Deore et al., 2009)).

Dénomination	Dénomination botanique
Soya	<i>Glycine max</i>
Pois chiches	<i>Cicer arietinum</i>
Haricot mungo	<i>Phaseolus aureus</i>
Arachide	<i>Arachis hypogaea L</i>
Fève	<i>Vicia faba</i>
Haricots rouges	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Lentille	<i>Lens culinaris</i>
Poireau	<i>Allium ampelopraum var. porrum L</i>
Ail	<i>Allium sativum</i>
Asperge	<i>Asparagus officinalis</i>
Épinard	<i>Spinacia oleracea</i>
Betterave	<i>Beta vulgaris L</i>
Thé	<i>Camellia sinensis</i>
Patate douce	<i>Dioscorea villosa</i>
Bois de Panama	<i>Quillaja saponaria</i>
Fenugrec	<i>Trigonella foenum-graceum</i>
Luzerne	<i>Medicago sativa</i>
Marronnier d'Inde	<i>Aesculus hippocastanum</i>
Réglisse	<i>Glycyrrhiza glabra</i>
Salsepareille du Honduras	<i>Smilax regelii</i>
Saponaire officinale	<i>Saponaria officinalis</i>
Yucca	<i>Yucca schidigera</i>
Gypsophile paniculée	<i>Gypsophila paniculata</i>
Ginseng	<i>Panax genus</i>

Les saponines peuvent exister dans différentes parties des plantes telles que les racines, les grains, les tiges, les pulpes, les écorces, les fleurs, les fruits, les feuilles, les péricarpes et les tubercules (Cheok et al., 2014).

4.4 Propriétés biologiques et pharmacologiques des saponines

Les saponines possèdent plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques (Sparg et al., 2004) :

- Propriétés hémolytiques (Oda et al., 2000);
- Augmentation des réponses immunitaires (Estrada et al., 2000);
- Activité antibactérienne et antimicrobienne (Killeen et al., 1998);
- Activité antifongique et anti-levure (Sindambiwe et al., 1998, Li et al., 1999);
- Activité antioxydante (Huang and Kong, 2006);
- Cytotoxicité (Itabashi et al., 1999);
- Activité antitumorale (Lee et al., 1999);
- Activité hypocholestérolémiant (Wang and Ng, 1999);
- Activité molluscicide (Sindambiwe et al., 1998);
- Activité anti-inflammatoire (Just et al., 1998).
- Activité antiparasitaire (Delmas et al., 2006, Traore et al., 2000);
- Activité antivirale (Simões et al., 1999);
- Activité hépato-protectrice (Yoshikawa et al., 2003);
- Potentiel d'adjuvant (Estrada et al., 2000).

5 Les techniques d'extraction des molécules bioactives

Les techniques d'extraction employées dans l'extraction des molécules bioactives peuvent être classées en deux catégories (Cheok et al., 2014) :

- Les techniques conventionnelles qui sont basées sur la solubilité d'un soluté dans un solvant. Ces techniques utilisent souvent une grande quantité de solvant pour extraire le soluté désiré. Les techniques conventionnelles se résument en extraction par macération, soxhlet, reflux ou la combinaison de ces techniques.
- Les techniques vertes « greens technologies » qui donnent plus d'efficacité, moins de temps et utilisent des matières premières renouvelables, par conséquent moins de pollution. Les techniques vertes se résument essentiellement en extraction assistée par ultrasons (UAE), extraction assistée par micro-ondes (MAE), extraction accélérée par solvant (ASE) et extraction par fluide supercritique (SFE) (Ligor et al., 2018).

5.1 Les techniques conventionnelles d'extraction des molécules bioactives

5.1.1 Macération

La macération est une extraction solide-liquide dans lequel le composé bioactif (soluté) à l'intérieur de la matière végétale est extrait par un solvant spécifique pendant une période de temps bien déterminée. L'efficacité du processus de macération est déterminée par deux facteurs principaux la solubilité et la diffusion. La macération est le choix le plus fréquent des chercheurs vu la simplicité de la mise d'un système d'extraction par macération. L'inconvénient de la macération est la longue durée d'extraction réduite toutefois par agitation (Cheok et al., 2014).

5.1.2 Extraction par reflux et par soxhlet

L'extraction par reflux ainsi que par Soxhlet est basée sur un procédé de distillation qui est largement utilisé dans les laboratoires et les industries alimentaires et non alimentaires (Cheok et al., 2014). Le procédé consiste à chauffer une solution à ébullition puis à renvoyer les vapeurs condensées dans le ballon d'origine. L'extraction par Soxhlet diffère de l'extraction par reflux par le placement de la matière végétale dans une cartouche et non pas dans le ballon (figure 25).

- 1 Agitateur magnétique
- 2 Ballon à col rodé
- 3 Retour de distillation (tube d'adduction)
- 4 Corps en verre
- 5 Filtre
- 6 Haut du siphon
- 7 Sortie du siphon
- 8 Adaptateur d'expansion
- 9 Condenseur
- 10 Entrée de l'eau de refroidissement
- 11 Sortie de l'eau de refroidissement

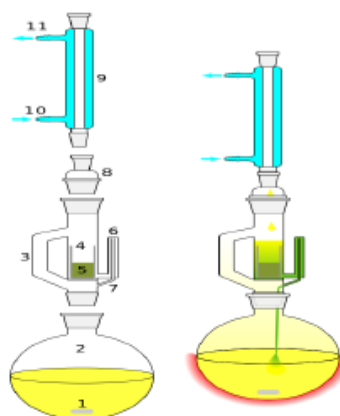


Figure 25 : Représentation schématique d'un extracteur Soxhlet

5.1.3 Extraction par méthodes d'extraction conventionnelles successives

Cette technique consiste à utiliser deux méthodes d'extraction conventionnelles successivement dans le but d'obtenir des molécules bioactives hautement purifiées (Cheok et al., 2014).

5.2 Les techniques vertes d'extraction des molécules bioactives

5.2.1 Extraction assistée par ultrasons (UAE)

L'extraction assistée par ultrasons consiste à traiter sous ultrasons un solide, sec ou humide, en contact avec un solvant. Le phénomène des ultrasons consiste à créer des bulles de cavitation dans le solvant permettant de dénaturer la paroi de la cellule végétale. Les ultrasons permettent d'accélérer l'extraction et de réduire le ratio solvant/soluté ce qui conduit à un meilleur rendement d'extraction des composés bioactifs (Cheok et al., 2014).

Deux types d'équipements à ultrasons sont couramment utilisés dans les laboratoires. Le premier est le bain à ultrasons qui est couramment utilisé pour la dispersion de solides dans un solvant ou pour le dégazage des solutions. Le second équipement, une sonde à ultrasons, est beaucoup plus puissant en raison d'une intensité ultrasonore délivrée sur une petite surface (pointe de la sonde) par rapport au bain à ultrasons.

5.2.2 Extraction assistée par micro-ondes (MAE)

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques non ionisantes avec une gamme de fréquences de 0,3 à 300 GHz. Les micro-ondes sont capables de pénétrer dans les biomatériaux et de générer de la chaleur en interagissant avec les molécules polaires comme l'eau. L'interaction entre les micro-ondes et les molécules polaires conduit à un surchauffage interne et une perturbation de la structure cellulaire facilitant la diffusion du composé bioactif à partir de la matrice végétale (Cheok et al., 2014, Takeuchi et al., 2009).

5.2.3 Extraction accélérée par solvant (ASE)

L'extraction accélérée par solvant (ou PLE : extraction par liquide pressurisé) est une technique d'extraction moderne utilisée pour l'extraction des molécules bioactives en utilisant des solvants à haute température et haute pression, mais sans atteindre le point critique (Ligor et al., 2018). L'extraction accélérée par solvant se caractérise par un temps d'extraction court (15-25 minutes) et un volume réduit de solvant utilisé (15-45 ml) (Cheok et al., 2014).

5.2.4 Extraction par fluide supercritique (EFS)

L'extraction par fluide supercritique est une technique d'extraction verte utilisée pour l'extraction d'une grande variété de molécules bioactives. L'extraction par fluide supercritique présentant les avantages d'être rapide, sélective et économise les solvants. L'état supercritique se produit lorsque la température et la pression du fluide sont élevées au-dessus de son point critique. Le dioxyde de carbone est le solvant le plus utilisé dans l'extraction par fluide supercritique (Ligor et al., 2018).

6 Sélection du solvant de l'étude selon les principes de la chimie verte

Depuis leur apparition dans la littérature, les termes « vert » et « durable » sont de plus en plus utilisés et sont de nos jours omniprésents dans plusieurs domaines de recherche. L'origine de la « chimie verte » pourrait être attribuée au lancement de l'initiative « Care » par le Conseil américain de chimie. La chimie verte peut être considérée comme le contexte scientifique et économique dans lequel les universités, l'industrie et le gouvernement tentent de converger leurs efforts pour le développement d'une civilisation durable. L'objectif principal de la chimie verte est d'intégrer la sécurité, la prévention de la pollution, la minimisation des déchets et l'optimisation énergétique dans les processus chimiques existants (Vaccaro, 2016).

Les solvants utilisés dans l'industrie chimique et pharmaceutique sont couramment des solvants pétrochimiques non renouvelables, inflammables et nocifs pour l'environnement. Pour se conformer aux principes de la chimie verte, les industriels et les chercheurs sont de plus en plus orientés vers les solvants renouvelables, biodégradables et non toxiques issus de produits naturels (Capello et al., 2007). Le solvant vert le plus utilisé en industrie chimique et pharmaceutique est l'éthanol vu sa disponibilité, son prix, sa non-toxicité et sa nature biodégradable.

Ce projet de recherche est fait dans une vision verte d'où l'utilisation de l'éthanol et l'eau comme solvants principales de l'extraction.

7 Valorisation des coproduits d'asperge dans la littérature

L'asperge est une plante à forte valeur ajoutée avec une forte intensité de main-d'œuvre et une croissance continue à travers le monde. L'industrie d'asperge génère des milliers de tonnes de déchets vu que seulement 50 % de la tige d'asperge est utilisée pour la consommation humaine alors que le reste est considéré comme un coproduit (Jaramillo-Carmona et al., 2013). Traditionnellement les coproduits ont été utilisés pour l'alimentation animale ou laissés dans le sol pour fertiliser la terre pour la prochaine génération d'asperge (Chen et al., 2014). Des études récentes ont révélées que les coproduits d'asperge sont riches en plusieurs molécules bioactives (principalement des polyphénols et des saponines) présentes déjà dans la partie comestible d'asperge (Jaramillo-Carmona et al., 2013). Ces études ont augmenté la valeur des coproduits d'asperge et plusieurs travaux de valorisation de ses coproduits ont été lancés durant les dix dernières années.

En 2015, les coproduits d'asperge ont été utilisés comme matériaux pour obtenir des composés antioxydants par extraction solide-liquide. L'effet de différents paramètres (les solvants d'extraction, le temps, la température et le rapport soluté-solvant) sur l'extraction des polyphénols, des flavonoïdes et l'activité antioxydante a été étudié. L'activité antioxydante de l'extrait des coproduits d'asperge a été évaluée par HPLC- ABTS⁺ et les molécules bioactives ont été identifiées par HPLC-MS/MS. Les résultats ont montré que le rendement d'extraction était significativement influencé ($p < 0,05$) par la composition du solvant, le temps d'extraction et la température. Les paramètres appropriés étaient 50 % d'éthanol avec un rapport soluté-solvant de 1:30 à 80 °C pour de 2 h (Fan et al., 2015).

En 2014, les coproduits d'asperge ont été utilisés pour produire des peroxydases afin de les utiliser dans la biorestauration des eaux usées contaminées par des phénols comme le 4-chlorophénol, le 2,4-dichlorophénol, et l'hydroxytyrosol. La peroxydase a été purifiée par une chromatographie à échange d'ions et les valeurs optimales de pH et de température étaient respectivement de 4 et 25 °C (Jaramillo-Carmona et al., 2013).

En 2013, les coproduits d'asperge ont été utilisés dans le développement d'un extrait de composés bioactifs par un traitement hydrothermal (121 °C pendant 2 heures avec l'eau comme solvant d'extraction). Deux fractions ont été obtenues après le traitement hydrothermal : un extrait aqueux contenant la plupart des composés bioactifs solubles et un résidu fibreux formant la fibre bioactive d'asperge. Le procédé comprend une étape de purification en utilisant une résine absorbante afin de purifier les composés bioactifs recherchés (Fuentes-Alventosa et al., 2013).

En 2009, les coproduits d'asperge ont été utilisés pour produire des poudres riches en fibres alimentaires en utilisant plusieurs traitements. L'influence de l'intensité du traitement (intense de 90 minutes à 60 °C ou doux de 1 minute à température ambiante), le solvant et le système de séchage (lyophilisation ou traitement au four à 60 °C pendant 16 heures) ont été étudiés. L'étude a montré que les coproduits d'asperge forment une source de production des poudres riches en fibres alimentaires utilisées dans la formulation des aliments enrichis en fibres (Fuentes-Alventosa et al., 2009).

Problématique, hypothèse de recherche, objectif principal et objectifs spécifiques

1 Problématique

La culture d'asperge génère une quantité importante de coproduits riches en molécules bioactives, essentiellement des polyphénols et des saponines, qui pourront être valorisés aux marchés des aliments santé. Selon la littérature, la production d'extrait riche en polyphénols et en saponines passe toujours par l'utilisation de solvants pétrochimiques. Les solvants pétrochimiques sont efficaces pour l'extraction de ces molécules, mais ils sont nocifs pour l'environnement et la santé humaine. Les solvants pétrochimiques sont de sources non renouvelables et toxiques donc non conformes aux exigences de la chimie verte.

2 Hypothèse

Les coproduits d'asperge, riches en molécules bioactives, peuvent être valorisés par la production d'extraits bioactifs pour le marché des produits de santé naturels et des aliments fonctionnels en utilisant une extraction verte.

3 Objectif principal

Concevoir et développer un procédé efficace d'extraction et caractérisation des molécules bioactives dans les coproduits de la production d'asperge en utilisant une technologie verte.

4 Objectifs spécifiques

- Quantification et identification des molécules bioactives dans deux segments de la tige d'asperge (parties supérieure et inférieure);
- Quantification et identification des molécules bioactives dans différentes variétés d'asperge;
- Quantification et identification des molécules bioactives dans les coproduits de la variété Guelph Millennium;
- Développement et mise au point d'un protocole d'extraction et de dosage des saponines dans les coproduits d'asperge.

Chapitre 2 : Études des polyphénols et des flavonoïdes dans l'asperge et ses coproduits

1 Études des polyphénols et des flavonoïdes dans deux segments de la tige d'asperge

1.1 Matériel

Les asperges utilisées dans l'étude des polyphénols et des flavonoïdes dans les deux segments de la tige d'asperge sont des asperges commercialisées sur le marché québécois provenant du Mexique et appartenant au cultivar UC157. Dès leur réception, les turions d'asperge ont été coupés en deux parties (parties supérieure et inférieure) et stockés à -80 °C (figure 26).



Figure 26 : Turions coupés d'asperge : partie supérieure et partie inférieure.

1.2 Réactifs et solutions

Les solvants utilisés sont de grade HPLC provenant de VWR International (Ville Mont-Royal, Québec, Canada). L'éthanol 95% et l'acétone utilisés pour l'extraction et la quantification sont de grade ACS et ont été achetés des Alcools de Commerce Inc (Boucherville, Québec, Canada). L'eau ultrapure a été produite en utilisant un système milli-Q de Millipore Sigma (Burlington, Massachusetts, États-Unis). Le réactif de Folin-Ciocalteu, le carbonate de sodium, le chlorure d'aluminium, l'acétate de potassium, la quercétine et l'acide gallique ont été achetés de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

1.3 Extraction et quantification des polyphénols totaux dans deux segments de la tige d'asperge

1.3.1 Méthode

L'extraction des polyphénols dans les parties supérieure et inférieure de la tige d'asperge du cultivar UC157 a été faite par une double extraction de 1 heure. Les asperges ont été broyées et 10 grammes ont été extraits par sonication par 20 ml de 100 % méthanol pendant 30 minutes. Une centrifugation pendant 5 minutes à 3500 tours/minute a été effectuée et le surnageant a été récupéré. Le résidu a subi une deuxième extraction par sonication par 16 ml d'acétone et 4 ml d'acide acétique 2 % pendant 30 minutes. Une centrifugation pendant 5 minutes à 3500 tours/minute a été effectuée et le surnageant a été récupéré pour l'analyse (figure 27). Toutes les analyses ont été faites avec trois répétitions.

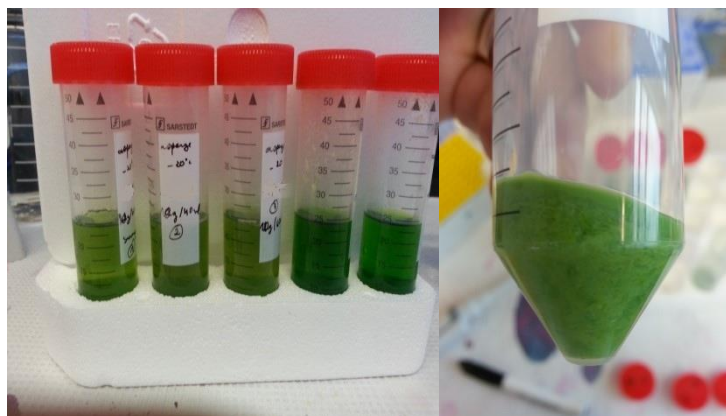


Figure 27 : Extraction des polyphénols totaux dans les parties supérieure et inférieure de la tige d'asperge

La quantification des polyphénols totaux dans les deux segments de la tige d'asperge a été effectuée selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002) qui consiste à une analyse par spectromètre à 765 nm en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et le carbonate de sodium. L'acide gallique a été utilisé comme standard.

La droite d'étalonnage est obtenue en soustrayant la moyenne du blanc à partir des données d'absorbance lues grâce aux standards. La concentration en polyphénols est calculée en utilisant une droite de régression linéaire ($Y = a + b X$) entre la concentration en acide gallique Y (ppm) et l'absorbance (X).

La concentration de l'échantillon est calculée comme la valeur de polyphénols totaux exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'échantillon.

Polyphénols totaux (mg Acide gallique / g échantillon) = $(C * D * V) / (1000 * P)$

C = concentration en polyphénols totaux dans l'extrait (g/l) ; D = facteur de dilution.

V = volume d'extraction ; P = poids de l'échantillon en grammes.

La courbe de régression, en utilisant l'acide gallique comme standard, est $Y = 324,21 X$ avec $r^2 = 0,9986$.

1.3.2 Résultats et Discussion

Tableau 2 : Quantification des polyphénols totaux dans deux segments de la tige d'asperge

	Polyphénols dans la MF (g EAG/kg)	Polyphénols dans la MS (g EAG/kg)	Polyphénols dans MF en %	Polyphénols dans la MS en %	Polyphénols dans l'extrait sec en %
Partie inférieure	0,42 ± 0,03	6,0 ± 0,3	0,042 ± 0,003	0,60 ± 0,03	1,05 ± 0,07
Partie supérieure	0,96 ± 0,06	11,5 ± 0,6	0,096 ± 0,007	1,15 ± 0,06	2,9 ± 0,2

Les résultats sont exprimés en moyenne de triplicata ± écart-type.

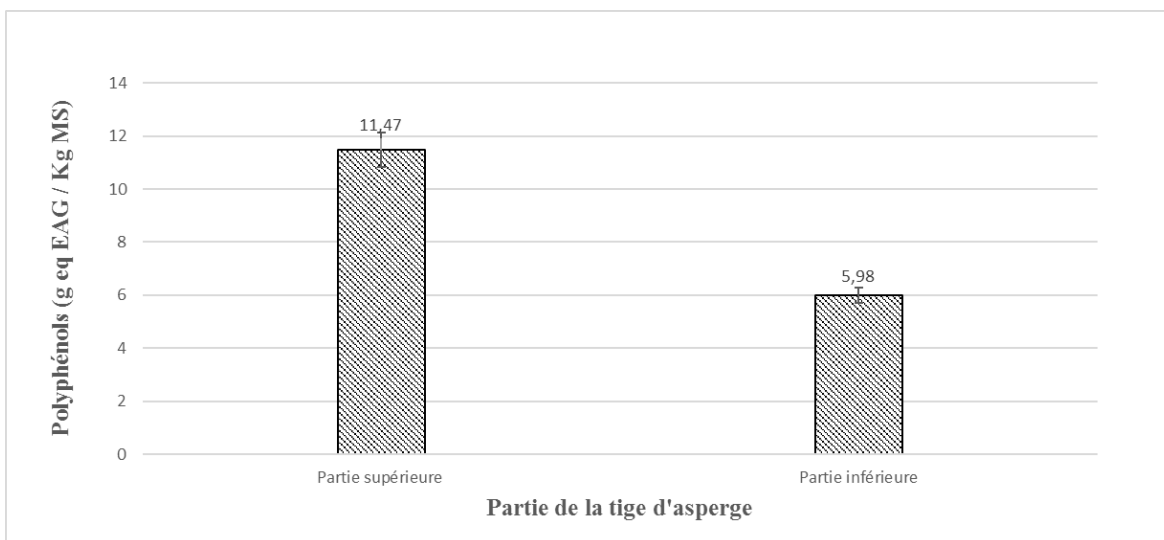


Figure 28 : Quantification des polyphénols totaux dans les parties supérieure et inférieure de la tige d’asperge.

Le tableau 2 ainsi que la figure 28 représentent la quantité des polyphénols totaux dans les deux segments de la tige d’asperge. La partie supérieure du turion d’asperge a montré une quantité de 960 mg EAG/Kg de matière fraîche et 11,5 g EAG/kg de matière sèche de polyphénols totaux. La partie inférieure du turion d’asperge a présenté approximativement la moitié de la quantité des polyphénols contenue dans la partie supérieure avec 420 mg EAG /kg de matière fraîche et 6 g EAG/kg de matière sèche. La différence entre la partie supérieure et la partie inférieure est significativement élevée ($p < 0,05$). Les résultats obtenus sont confirmés par les travaux de Chin et Garrison qui ont montré que la concentration des polyphénols est plus élevée dans la partie supérieure de la tige d’asperge (Chin and Garrison, 2005). La concentration de rutine, flavonoïde abondant dans l’asperge, atteint son maximum à l’extrémité de la tige et diminue à mesure qu’on se rapproche de la base (Stoffyn et al., 2012). Bien que la partie inférieure contienne la moitié des polyphénols totaux contenus dans la partie supérieure, cette valeur reste importante (420 mg EAG /kg MF et 6 g EAG /kg MS) par rapport à quelques autres légumes et fruits à savoir (Radis 384 mg/kg MF ; Poireau 327 mg/kg MF ; Kiwi 281 mg/Kg MF ; Orange 310 mg/kg MF) (Brat et al., 2006). Les résultats obtenus favorisent l’exploitation et la valorisation de cette partie inférieure de la tige qui est similaire aux coproduits d’asperge.

1.4 Extraction et quantification des flavonoïdes totaux dans deux segments de la tige d'asperge

1.4.1 Méthode

L'extraction des flavonoïdes dans la partie supérieure et inférieure de la tige d'asperge du cultivar UC157 a été faite par une double extraction de 1 heure. Les asperges ont été broyées et 10 grammes ont été extraits par sonication par 20 ml de 100 % méthanol pendant 30 minutes. Une centrifugation pendant 5 minutes à 3500 tours/ minute a été effectuée et le surnageant a été récupéré. Le résidu a subi une deuxième extraction par sonication par 16 ml d'acétone et 4 ml d'acide acétique 2 % pendant 30 minutes. Une centrifugation pendant 5 minutes à 3500 tours/ minute a été effectuée et le surnageant a été récupéré pour l'analyse. Toutes les analyses ont été faites avec trois répétitions.

La quantification des flavonoïdes totaux dans les deux segments de la tige d'asperge a été effectuée selon la méthode colorimétrique de chlorure d'aluminium (Chang et al., 2002) qui consiste une analyse par spectromètre à 415 nm en utilisant le chlorure d'aluminium et l'acétate de potassium comme réactifs. La quercétine a été utilisée comme standard.

La droite d'étalonnage est obtenue en soustrayant la moyenne du blanc à partir des données d'absorbance lues grâce aux standards. La concentration en flavonoïdes est calculée en utilisant une droite de régression linéaire ($Y = a + b X$) entre la concentration en quercétine Y (ppm) et l'absorbance (X).

La concentration de l'échantillon est calculée comme la valeur des flavonoïdes totaux exprimée en mg d'équivalent quercétine par gramme d'échantillon.

Flavonoïdes totaux (mg quercétine / g échantillon) = $(C * D * V) / (1000 * P)$

C = concentration en flavonoïdes totaux dans l'extrait (g/l)

D = facteur de dilution.

V = volume d'extraction.

P = poids de l'échantillon en grammes.

La courbe de régression, en utilisant la quercétine comme standard, est $Y = 153,86 X$ avec $r^2 = 0,9992$.

1.4.2 Résultats et Discussion

Tableau 3 : Quantification des flavonoïdes totaux dans deux segments de la tige d'asperge

	Flavonoïdes dans la MF (g/kg)	Flavonoïdes dans la MS (g/kg)	Flavonoïdes dans MF en %	Flavonoïdes dans la MS en %	Flavonoïdes dans l'extrait sec en %
Partie inférieure	0,27 ± 0,02	3,9 ± 0,2	0.027 ± 0,002	0.39 ± 0,02	0.68 ± 0,04
Partie supérieure	0,42 ± 0,01	5,03 ± 0,05	0.042 ± 0,001	0.51 ± 0,01	1.25 ± 0,04

Les résultats sont exprimés en moyenne de triplicata ± écart-type.

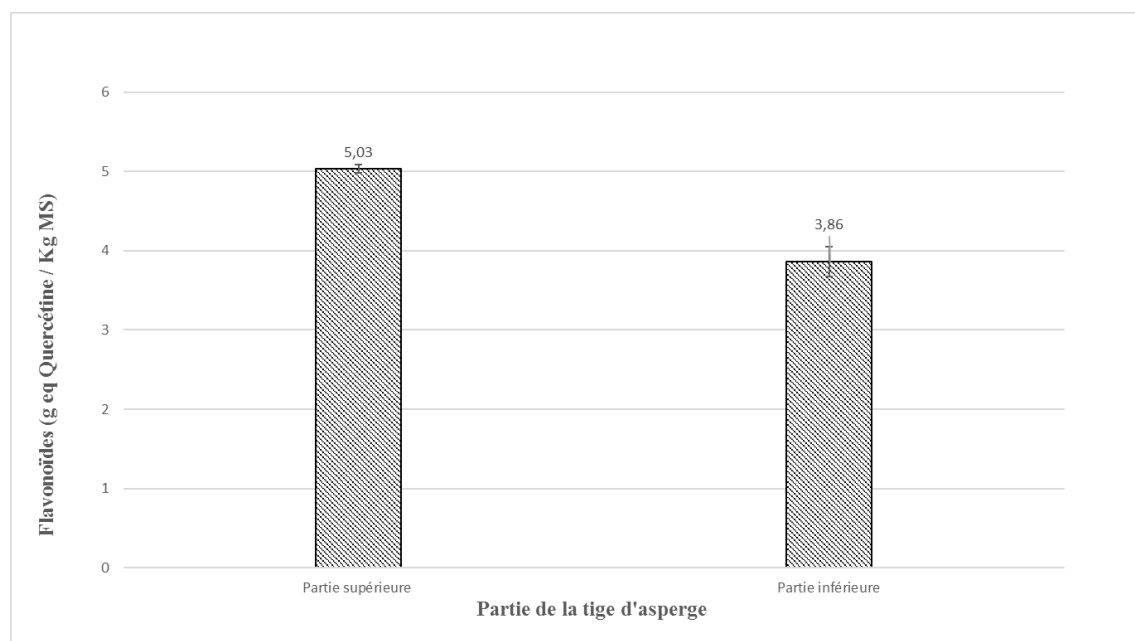


Figure 29 : Quantification des flavonoïdes totaux dans les parties supérieure et inférieure de la tige d'asperge.

Le tableau 3 ainsi que la figure 29 représentent la quantité des flavonoïdes totaux dans les deux segments de la tige d'asperge. La partie supérieure du turion d'asperge a montré une quantité plus élevée de flavonoïdes totaux (420 mg eq quercétine/Kg de matière fraîche et 5,03 g eq quercétine/kg de matière sèche) que la partie inférieure du turion d'asperge (270 mg eq quercétine/kg de matière fraîche et 3,9 g eq quercétine/kg de matière sèche). La différence entre la partie supérieure et la partie inférieure est significativement élevée ($p < 0,05$). Les résultats obtenus sont confirmés par les travaux de Fuentes-Alventosa et al (2013) qui ont montré que les coproduits d'asperge contiennent une teneur en flavonoïdes de 283 mg/kg de matière fraîche (Fuentes-Alventosa et al., 2013).

1.5 Caractérisation par UPLC des polyphénols totaux dans deux segments de la tige d'asperge

1.5.1 Méthode

L'extraction des polyphénols dans la partie supérieure et inférieure de la tige d'asperge du cultivar UC157 a été faite par une double extraction de 1 heure. Les asperges ont été broyées et 10 grammes ont été extraits par sonication par 20 ml de 100 % méthanol pendant 30 minutes. Une centrifugation pendant 5 minutes à 3500 tours/minute a été effectuée et le surnageant a été récupéré. Le résidu a subi une deuxième extraction par sonication par 16 ml d'acétone et 4 ml d'acide acétique 2 % pendant 30 minutes. Une centrifugation pendant 5 minutes à 3500 tours/ minute a été effectuée et le surnageant a été récupéré pour l'analyse.

Pour dresser le profil détaillé des polyphénols dans les deux segments de la tige d'asperge, on a eu recours à une analyse par UPLC-ESI-MS/MS. Pour préparer l'extrait obtenu à l'analyse par UPLC, une dilution de trois fois de l'extrait a été effectuée et l'extrait a été passé à travers un filtre 0.2 μ m. Toutes les analyses ont été faites avec trois répétitions.

L'analyse de l'extrait a été effectuée par un système de Chromatographie liquide ultra performance (Waters, Milford, US) équipé d'un système de pompe quaternaire (Waters, Milford, US). Une colonne T3 de silice à haute résistance (HSS) (150mm_2.1 mm id, taille des particules de 1,8 mm) a été utilisée (Waters, Milford, US). La phase stationnaire est formée par 100 % de particules de silice.

La séparation des polyphénols a été effectuée par une phase mobile composée de 0.1 % d'acide formique (éluant A) et d'acétonitrile (éluant B). Le débit était de 0,4 ml / min et le gradient d'élution était initialement 5 % de B, 5-20 % de B (0-4.5 min), isocratique 20 % de B (4.5-6.45 min), 20-45 % de B (6.45-13.5 min), 45-100 % B (13.5-16.5 min), isocratique 100 % B (16.5-19.5 min), 100-5 % B (19.5-19.52 min), isocratique 5 % B (19.52-22.5 min).

Les analyses de spectromètre de masse (MS) ont été effectuées par un spectromètre de masse Xevo TQD (Waters, Milford, US). L'analyse a été réalisée en mode négatif et les données ont été acquises par de multiples réactions de surveillance (MRM). La source d'ionisation a pour paramètres une tension capillaire de 2,5 kV, une température de source de 140°C, un débit de gaz de cône de 80 L/h, un débit de gaz de désolvatation de 900 L/h et une température de désolvatation de 350°C.

L'azote (99% de pureté) et l'argon (99% de pureté) ont été utilisés respectivement en tant que gaz de nébulisation et de collision. L'acquisition des données est réalisée avec le logiciel Mass Lynx 4.1 (Gratacós-Cubarsí et al., 2010). Toutes les analyses ont été faites avec trois répétitions.

1.5.2 Résultats et Discussion

Tableau 4 : Concentration en polyphénols contenus dans les parties supérieure et inférieure de la tige d'asperge

Composé bioactif	Polyphénols (mg EAG/ kg MS)	
	Partie inférieure	Partie supérieure
Quercétine-glucoside	28,2 ± 0,3	98 ± 5
Quercétine-galactoside	0,27 ± 0,11	0,5 ± 0,1
Quercétine-rhamnoside	0	1,6 ± 0,7
Quercetine-3-xyloside	0,6 ± 0,3	3 ± 1
Quercetine-3-arabinoside	0,21 ± 0,01	0,61 ± 0,01
Kaempferol-galactoside	0	0,39 ± 0,02
Rutine	3664 ± 158	6623 ± 38
Acide férulique	1,4 ± 0,2	4,1 ± 0,8
Acide 4-hydroxyphénylacétique	22 ± 5	44 ± 2
Coumaroyl glucoside	79 ± 2	27 ± 1
Caffeoyl glucoside	48 ± 7	18,5 ± 0,6
Acide 3-caffeoylquinique	138 ± 3	473 ± 1
Acide 5-caffeoylquinique	1,8 ± 0,9	6 ± 1

Les résultats sont exprimés en moyenne de triplicata ± écart-type

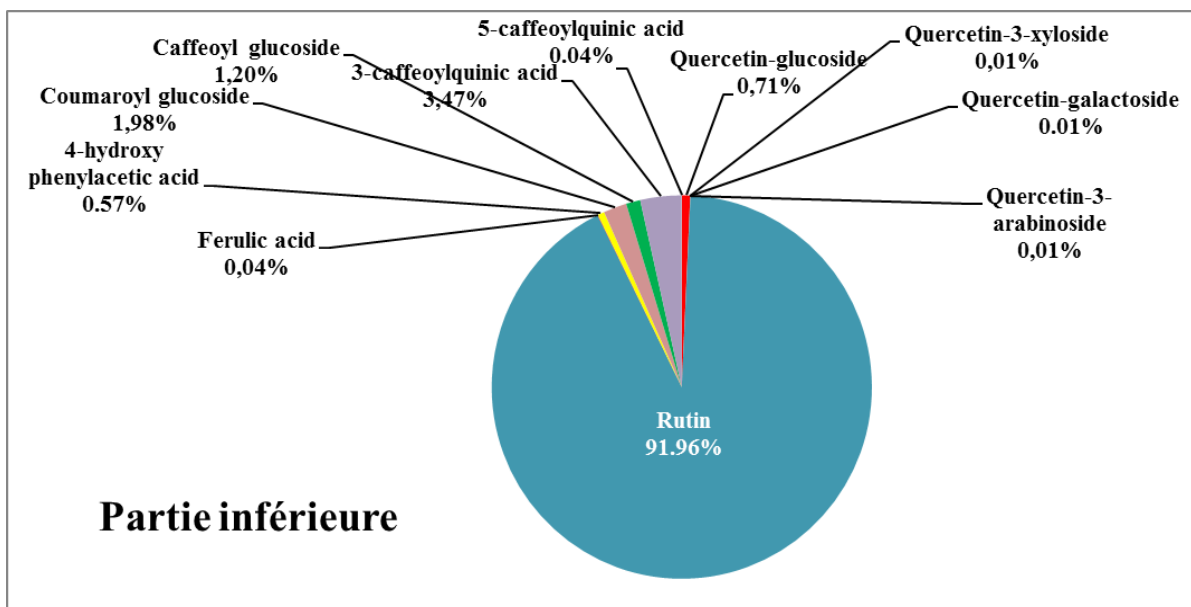


Figure 30 : Proportion des polyphénols contenus dans la partie inférieure de tige d’asperge.

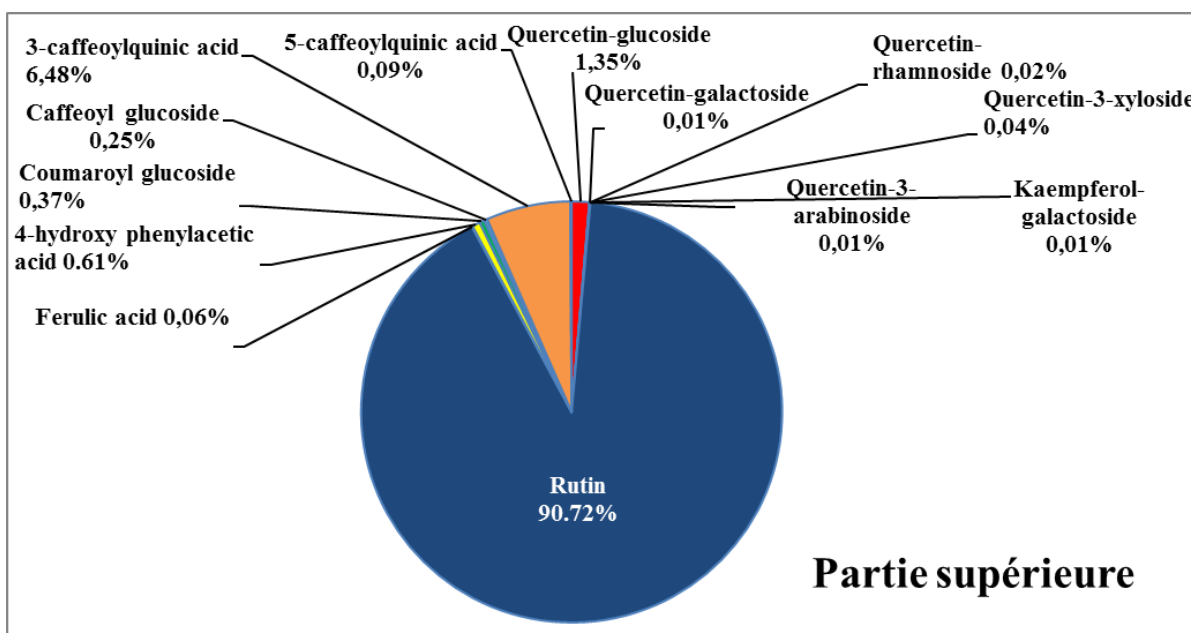


Figure 31 : Proportion des polyphénols contenus dans la partie supérieure de tige d’asperge.

L'identification des polyphénols totaux a été déterminée par UPLC et les composés polyphénoliques sont résumés dans le tableau 4. Les résultats ont montré que l'asperge contient 13 composés phénoliques et que la rutine représente le composé majeur, avec 6 623 mg EAG/kg MS (529,8 mg EAG/kg MF) dans la partie supérieure de la tige d'asperge et 3 664 mg EAG/kg MS (293,2 mg EAG /kg MF) dans la partie inférieure de la tige d'asperge, suivi par l'acide 3-caffeoylquinique. La quercétine-galactoside, la quercétine-glucoside, l'acide 5-caffeoyl-quinique, la quercétine-3-arabinoside et la quercétine-3-xyloside sont présents en faible quantité pour les deux parties de la tige d'asperge. La quercétine-rhamnoside et le kaempferol-galactoside sont présents seulement dans la partie supérieure de la tige d'asperge mais en faible concentration. On peut remarquer aussi que la quantité des polyphénols totaux est plus élevée dans la partie supérieure de la tige d'asperge.

Les résultats obtenus sont comparables aux résultats trouvés par Fuentes-Alventosa et al (2007) dans leur identification des flavonoïdes dans différents génotypes d'asperge où ils ont trouvé que la quantité des flavonoïdes totaux varie entre 400 et 700 mg/kg MF avec une teneur en rutine allant de 55 à 98% (Fuentes-Alventosa et al., 2007). Les résultats obtenus sont aussi en concordance avec les travaux de Motoki et al (2007) où ils ont montré que la rutine est le flavonoïde abondant dans l'asperge avec une concentration plus élevée dans la partie supérieure de la tige (Motoki et al., 2012)

2 Études des polyphénols et des flavonoïdes dans différentes variétés d'asperge

2.1 Matériel

Les asperges utilisées dans l'étude des polyphénols et des flavonoïdes dans différentes variétés d'asperge proviennent de l'université de Guelph « Department of Plant Agriculture » (Guelph, Ontario, Canada). Dès leur réception, les turions d'asperge ont été lyophilisés et conservés dans des sacs en plastique dans un dessiccateur.

Les différentes variétés d'asperge sont : le Mill, le Giant, le Gijnlim, le Knight, le Supreme, le UG005, le UG020, le NJ953, le Pacific Endeavour, le JG701 et la variété d'étude le Guelph Millennium.

2.2 Réactifs et solutions

Les solvants utilisés sont de grade HPLC provenant de VWR International (Ville Mont-Royal, Québec, Canada). L'éthanol 95% utilisé est de grade ACS et a été acheté des Alcools de Commerce Inc. (Boucherville, Québec, Canada). L'eau ultrapure a été produite en utilisant un système milli-Q de Millipore Sigma (Burlington, Massachusetts, États-Unis). Le réactif de Folin-Ciocalteu, le carbonate de sodium, le chlorure d'aluminium, l'acétate de potassium, la rutine et l'acide gallique ont été achetés de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

2.3 Extraction et quantification des polyphénols et des flavonoïdes dans différentes variétés d'asperge

2.3.1 Méthode

L'extraction des polyphénols et des flavonoïdes dans les différentes variétés d'asperge a été faite par une double extraction de 2 minutes. 0,5 gramme d'asperge lyophilisée ont été extraits par un Ultra-turrax (T-25), acheté de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada), dans 20 ml de 80 % éthanol pendant 1 minute. Une centrifugation pendant 5 minutes à 3500 tours/minute a été effectuée et le surnageant a été récupéré. Le résidu a subi une deuxième extraction par Ultra-turrax (T-25) dans 20 ml de 80 % éthanol pendant 1 minute. Une centrifugation pendant 5 minutes à 3500 tours/minute a été effectuée et le surnageant a été récupéré pour l'analyse (Vázquez-Castilla et al., 2013). Toutes les analyses ont été faites avec trois répétitions.

La quantification des polyphénols totaux dans les différentes variétés d'asperge a été effectuée selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002). L'acide gallique a été utilisé comme standard.

La quantification des flavonoïdes totaux dans les différentes variétés d'asperge a été effectuée selon la méthode colorimétrique de chlorure d'aluminium (Chang et al., 2002). La rutine a été utilisée comme standard.

2.3.2 Résultats et Discussion

Tableau 5 : Quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux dans différentes variétés d'asperge

Variétés	Polyphénols (g EAG/kg MS)	Flavonoïdes (g eq rutine/kg MS)
GIANT	12,1 ± 0,2	9,1 ± 0,6
MILL	11,4 ± 0,8	8,8 ± 0,8
NJ953	11 ± 1	8 ± 1
PACIFIC ENDEAVOUR	11 ± 1	7 ± 1
KNIGHT	11 ± 1	11 ± 1
SUPREME	10,4 ± 0,5	9,0 ± 0,9
UG005	10,3 ± 0,5	8 ± 1
GUELPH MILLENIUM	10,0 ± 0,3	9,0 ± 0,6
UG020	9,9 ± 0,8	7,6 ± 0,4
JG701	9,5 ± 0,4	7,4 ± 0,7
GIJNLIM	9,2 ± 0,2	7,2 ± 0,8

Les résultats sont exprimés en moyenne de triplicata ± écart-type.

La quantité des polyphénols totaux dans les différentes variétés d'asperge varie de 9,2 g EAG/kg MS (variété Gijnlim) à 12,1 g EAG/kg MS (variété Giant) avec une variation maximale de 23 % entre les différentes variétés. Pour les flavonoïdes totaux la quantité varie de 7,2 g eq rutine/kg MS (variété Gijnlim) à 11 g eq rutine/kg MS (variété Knight) avec une variation maximale de 33 % entre les différentes variétés. La concentration de rutine obtenue dans les différentes variétés est comparables aux résultats trouvés par Drinkwater et al (2014) dans leur étude de différents génotypes d'asperge où ils ont trouvé que la concentration de rutine varie de 3,3 à 8,14 g/kg MS (Drinkwater et al., 2014). Les flavonoïdes totaux représentent 66 à 99 % des polyphénols totaux dans les différentes variétés d'asperge. Les résultats obtenus sont comparables aux résultats trouvés par Sonada et al (2007) dans leur étude des polyphénols dans différents cultivars d'asperge où ils ont trouvé que la teneur en polyphénols totaux, varie de 9,64 à 12,82 g EAG/kg MS (humidité 92%) (Sonoda et al., 2005)

L'analyse statistique (ANOVA avec un test LSD) effectuée par IBM SPSS statistics, a montré que les polyphénols totaux dans la variété Guelph Millenium ne diffèrent pas significativement ($p < 0,05$) des autres variétés sauf les variétés Giant (12,1 g EAG/kg MS) et Mill (11,37 g EAG/kg MS). Les flavonoïdes totaux dans la variété Guelph Millenium sont significativement différents ($p < 0,05$) des autres variétés sauf les variétés Giant, Mill, NJ953 et Supreme.

2.4 Caractérisation des polyphénols par UPLC dans la variété d'asperge Guelph Millenium

2.4.1 Méthode

L'extraction des polyphénols dans les différentes variétés d'asperge a été faite par une double extraction de 2 minutes. 0,5 gramme d'asperge lyophilisée ont été extraits par un Ultra-turrax (T-25), acheté de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada), dans 20 ml de 80 % d'éthanol pendant 1 minute. Une centrifugation pendant 5 minutes à 3500 tours/minute a été effectuée et le surnageant a été récupéré. Le résidu a subi une deuxième extraction par Ultra-turrax (T-25) dans 20 ml de 80 % d'éthanol pendant 1 minute. Une centrifugation pendant 5 minutes à 3500 tours/ minute a été effectuée et le surnageant a été récupéré pour l'analyse (Vázquez-Castilla et al., 2013).

Pour dresser le profil détaillé des polyphénols dans de la variété d'asperge Guelph Millenium, on a eu recours à une analyse par UPLC-ESI-MS/MS décrite en détail dans la partie de caractérisation des polyphénols dans les deux segments de la tige d'asperge (Gratacós-Cubarsí et al., 2010). Pour préparer l'extrait obtenu à l'analyse par UPLC, une dilution de trois fois de l'extrait a été effectuée et l'extrait a été passé à travers un filtre 0.2 µm. Toutes les analyses ont été faites avec trois répétitions.

2.4.2 Résultats et Discussion

Tableau 6 : Profil des polyphénols contenus dans la variété d'asperge Guelph Millenium

Polyphénols		
Composé bioactif	(mg EAG/kg MS)	Proportion en %
Quercétine	3 ± 2	0,03
Quercétine-glucoside	54 ± 4	0,59
Quercétine-rhamnoside	1,59 ± 0,01	0,02
Quercétine-3-xyloside	0,40 ± 0,02	0
Rutine	8430 ± 20	92,18
Acide p-Coumarique	8,96 ± 0,01	0,1
Acide caféique	1,47 ± 0,01	0,02
Acide férulique	12 ± 1	0,14
Acide 4-hydroxyphénylacétique	12 ± 2	0,14
Caffeoyl glucoside	2,6 ± 0,5	0,03
Coumaroyl glucoside	38 ± 1	0,42
Acide 5-caffeoylquinique	580 ± 111	6,35

Les résultats sont exprimés en moyenne de triplicata ± écart-type.

L'identification des polyphénols totaux dans la variété d'asperge Guelph Millenium a été déterminée par UPLC et les composés phénoliques sont résumés dans le tableau 6. Les résultats ont montré que la variété Guelph Millenium contient 12 composés phénoliques et que la rutine représente le composé majeur avec 92 % des polyphénols totaux (8 430 mg EAG/kg MS) suivi par l'acide 5-caffeoylquinique avec 580 mg EAG/kg MS. Les résultats obtenus sont comparables aux résultats trouvés par Cakir en 2007 qui a montré que la rutine représente le flavonoïde le plus dominant dans l'asperge (Cakir, 2007).

3 Études des polyphénols et des flavonoïdes dans les coproduits d'asperge

3.1 Matériel

Les coproduits d'asperge, utilisés comme matière première, proviennent de la Ferme du Domaine 2000 Inc (Shawinigan-sud, Québec, Canada). La variété d'asperge est le Guelph Millenium

Les coproduits d'asperge sont classés en deux catégories :

- Les asperges de calibre inférieur : Les tiges de taille inférieure à 23 cm et/ou de diamètre inférieur à 8 mm (figure 32).
- Les bases d'asperge : les parties éliminées de la tige de taille supérieure à 23 cm (figure 33).



Figure 32 : Asperge de calibre inférieur



Figure 33 : Bases d'asperge

3.2 Réactifs et solutions

Les solvants utilisés sont de grade HPLC provenant de VWR International (Ville Mont-Royal, Québec, Canada). L'éthanol 95% utilisé pour l'extraction et la quantification est de grade ACS et a été acheté des Alcools de Commerce Inc. (Boucherville, Québec, Canada). L'eau ultrapure, utilisée tout au long des expériences, a été produite en utilisant un système milli-Q de Millipore Sigma (Burlington, Massachusetts, États-Unis). Le réactif de Folin-Ciocalteu, le carbonate de sodium, le chlorure d'aluminium, l'acétate de potassium, la rutine et l'acide gallique ont été achetés de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

3.3 Extraction et quantification des polyphénols et des flavonoïdes dans les coproduits d'asperge

3.3.1 Méthode

L'extraction des polyphénols et des flavonoïdes dans les coproduits d'asperge a été faite par une double extraction de 2 minutes. 0,5 gramme d'asperge lyophilisée ont été extraits par un Ultraturrax (T-25), acheté de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada), dans 20 ml de 80 % d'éthanol pendant 1 minute. Une centrifugation pendant 5 minutes à 3500 tours/minute a été effectuée et le surnageant a été récupéré. Le résidu a subi une deuxième extraction par Ultraturrax (T-25) dans 20 ml de 80 % d'éthanol pendant 1 minute. Une centrifugation pendant 5 minutes à 3500 tours/minute a été effectuée et le surnageant a été récupéré pour l'analyse (Vázquez-Castilla et al., 2013). Toutes les analyses ont été faites avec trois répétitions.

La quantification des polyphénols totaux dans les coproduits d'asperge a été effectuée selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002) en utilisant l'acide gallique comme standard.

La quantification des flavonoïdes totaux dans les coproduits d'asperge a été effectuée selon la méthode colorimétrique de chlorure d'aluminium (Chang et al., 2002) en utilisant la rutine comme standard.

3.3.2 Résultats et Discussion

Tableau 7 : Quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux dans les coproduits d'asperge

	Polyphénols	Flavonoïdes
	(g EAG/kg MS)	(g eq rutine/kg MS)
Asperge commercialisée	10,01 ± 0,30	9,05 ± 0,56
Asperge de calibre inférieur	11,3 ± 0,4	10 ± 1
Bases d'asperge	4,8 ± 0,2	2,9 ± 0,2

Les résultats sont exprimés en moyenne de triplicata ± écart-type.

Des analyses de variance (ANOVA) utilisant la procédure mixte avec le test LSD de Fisher ($p \leq 0,05$) du logiciel SAS version 9.3 (Statistical Analysis System Institute, Cary, NC) ont été effectuées pour tous les échantillons. Les polyphénols totaux sont significativement différents dans les asperges de calibre inférieur par rapport à l'asperge commercialisée et les bases d'asperge. Pour les flavonoïdes totaux il n'y a pas de différence significative entre l'asperge de calibre inférieure et l'asperge commercialisée alors que la différence est significative entre les bases d'asperge et l'asperge de calibre inférieur ainsi que l'asperge commercialisée. Les bases d'asperge contiennent approximativement la moitié de la quantité des polyphénols totaux contenus dans l'asperge commercialisée, avec 4,8 g EAG/kg MS, ce qui est en concordance avec notre étude sur les deux segments de la tige d'asperge.

3.4 Caractérisation des polyphénols par UPLC dans les coproduits d'asperge

3.4.1 Méthode

Pour dresser le profil détaillé des polyphénols dans les coproduits d'asperge, on a eu recours à une analyse par UPLC-ESI-MS/MS décrite en détail dans la partie de caractérisation des polyphénols dans deux segments de la tige d'asperge (Gratacós-Cubarsí et al., 2010). L'extrait utilisé est celui utilisé dans la quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux dans les coproduits d'asperge.

Pour préparer l'extrait obtenu à l'analyse par UPLC, une dilution de trois fois de l'extrait a été effectuée et l'extrait a été passé à travers un filtre 0.2 µm. Toutes les analyses ont été faites avec trois répétitions.

3.4.2 Résultats et Discussion

Tableau 8 : Profil des polyphénols contenus dans les coproduits d'asperge.

Polyphénols (mg EAG/kg MS)				
Composé bioactif	Asperge de calibre inférieur	Proportion en %	Bases d'asperge	Proportion en %
Quercétine	6,1 ± 0,8	0,06	0,9 ± 0,8	0,03
Quercétine-glucoside	89 ± 7	0,84	9,6 ± 0,4	0,3
Quercétine-rhamnoside	2 ± 2	0,02	0	0
Quercétine-3-xyloside	1,8 ± 0,5	0,02	0,39 ± 0,01	0,01
Rutine	9706 ± 209	91,97	2989 ± 29	93,58
Acide p-Coumarique	0	0	6 ± 5	0,2
Acide caféique	0,45 ± 0,01	-	2 ± 1	0,05
Acide férulique	6,4 ± 0,2	0,06	6 ± 1	0,19
Acide 4-hydroxyphénylacétique	16 ± 1	0,15	3,1 ± 0,5	0,1
Caffeoyl glucoside	11 ± 3	0,1	15 ± 1	0,46
Coumaroyl glucoside	27,9 ± 0,4	0,26	56 ± 12	1,74
Acide 5-caffeoylquinique	687 ± 50	6,51	106 ± 4	3,34

Les résultats sont exprimés en moyenne de triplicata ± écart-type.

L'identification des polyphénols totaux dans les coproduits de la variété d'asperge Guelph Millenium a été déterminée par UPLC et les composés phénoliques sont résumés dans le tableau 8. Les résultats ont montré que les asperges de calibre inférieur contiennent 11 composés phénoliques avec l'absence de l'acide p-coumarique. La rutine représente le composé majeur dans les asperges de calibre inférieur avec 92 % des polyphénols totaux (9 706 mg EAG /kg MS) suivi par l'acide 5-caffeoylquinique avec 687 mg EAG /kg MS. Les bases d'asperge contiennent 11 composés phénoliques avec l'absence de la quercétine-rhamnoside. La rutine est le composé majeur dans les bases d'asperge avec 94 % des polyphénols totaux (2 989 mg EAG /kg MS) suivi de l'acide 5-caffeoylquinique (106 mg EAG /kg MS) et le coumaroyl glucoside (56 mg EAG /kg MS). Les travaux de Fluentes-Alventosa et al (2008) qui ont montré que la rutine représente le flavonoïde le plus dominant dans l'asperge avec une concentration ≥ 70 % des flavonoïdes totaux sont en concordance avec nos résultats.

4 Optimisation de l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes dans les coproduits d'asperge

4.1 Matériel

L'optimisation de l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes dans les coproduits d'asperge a été effectuée sur les bases d'asperge provenant de la Ferme du Domaine 2000 Inc (Shawinigan-sud, Québec, Canada). La variété d'asperge est le Guelph Millenium.

4.2 Réactifs et solutions

Les solvants utilisés sont de grade HPLC provenant de VWR International (Ville Mont-Royal, Québec, Canada). L'éthanol 95% utilisé pour l'extraction et la quantification est de grade ACS et a été acheté des Alcools de Commerce Inc. (Boucherville, Québec, Canada). L'eau ultrapure a été produite en utilisant un système milli-Q de Millipore Sigma (Burlington, Massachusetts, États-Unis). Le réactif de Folin-Ciocalteu, le carbonate de sodium, le chlorure d'aluminium, l'acétate de potassium, la rutine et l'acide gallique ont été achetés de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

4.3 Méthode

L'extraction des polyphénols et des flavonoïdes a été effectuée par une macération à différentes températures, pour différentes durées de temps dans différentes concentrations d'éthanol.

Les paramètres étudiés afin d'avoir le rendement maximal en polyphénols et flavonoïdes sont :

- La température : $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- La concentration éthanol/eau (v/v) : 0 % ; 20 % ; 50 % ; 80 %.
- Le temps : 0 ; 0.5 h ; 1 h ; 3 h ; 6 h ; 9 h.
- Le ratio soluté/solvant (w/v) : 1 : 10 ; 1 : 20 ; 1 : 40.

L'extraction a été effectuée dans des tubes coniques sur 0,5 gramme de bases d'asperge lyophilisées avec 20 ml de solvant dans chaque tube.

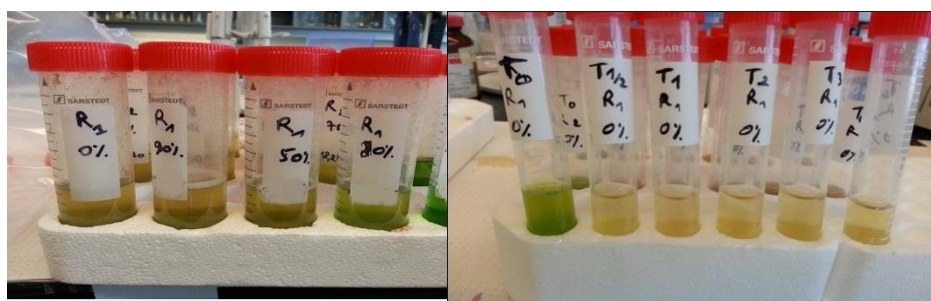


Figure 34 : Optimisation de l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes à partir des coproduits l'asperge.

Pour déterminer la température optimale d'extraction, la concentration de l'éthanol a été fixée à 80 %. Après la détermination de la température optimale la concentration optimale de l'éthanol a été étudiée. Toutes les analyses ont été faites avec trois répétitions.

La quantification des polyphénols au cours de l'étude de l'optimisation de l'extraction a été effectuée selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002) en utilisant l'acide gallique comme standard. La quantification des flavonoïdes au cours de l'étude de l'optimisation de l'extraction a été effectuée selon la méthode colorimétrique de chlorure d'aluminium (Chang et al., 2002) en utilisant la rutine comme standard.

4.4 Résultats et Discussion

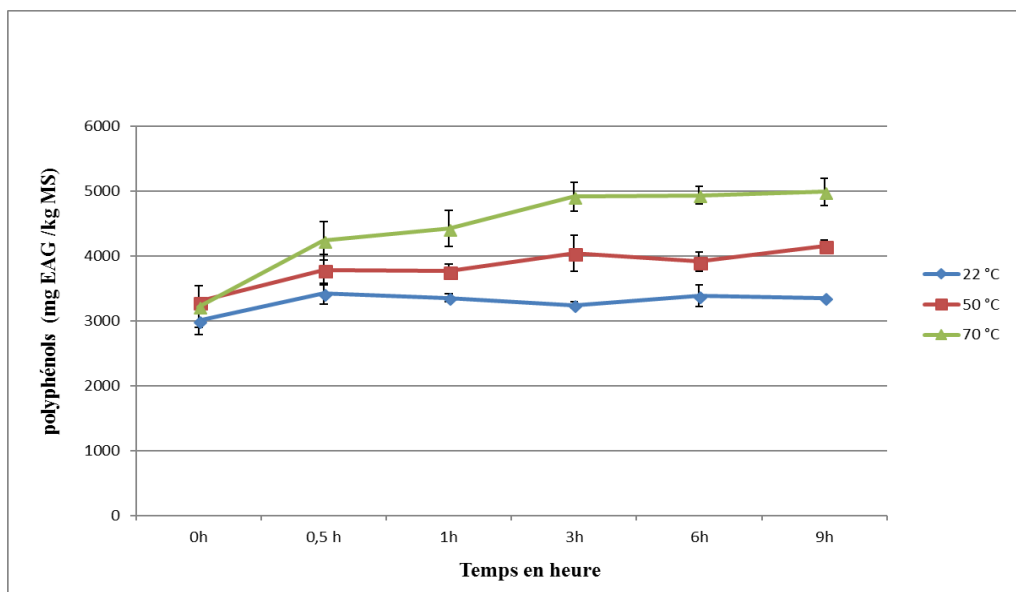


Figure 35 : Optimisation de l'extraction des polyphénols à partir des coproduits d'asperge en fonction de la température.

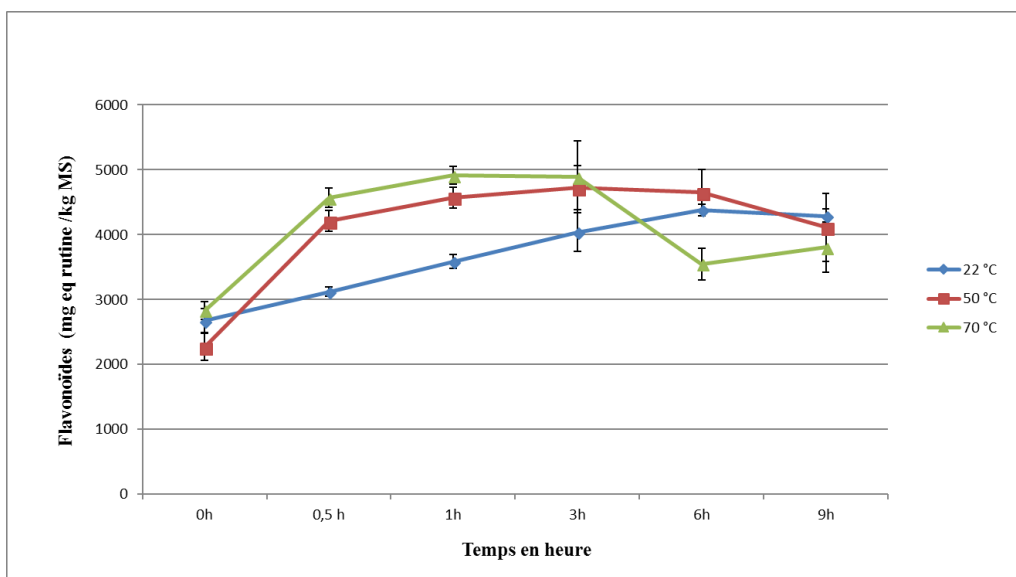


Figure 36 : Optimisation de l'extraction des flavonoïdes à partir des coproduits d'asperge en fonction de la température.

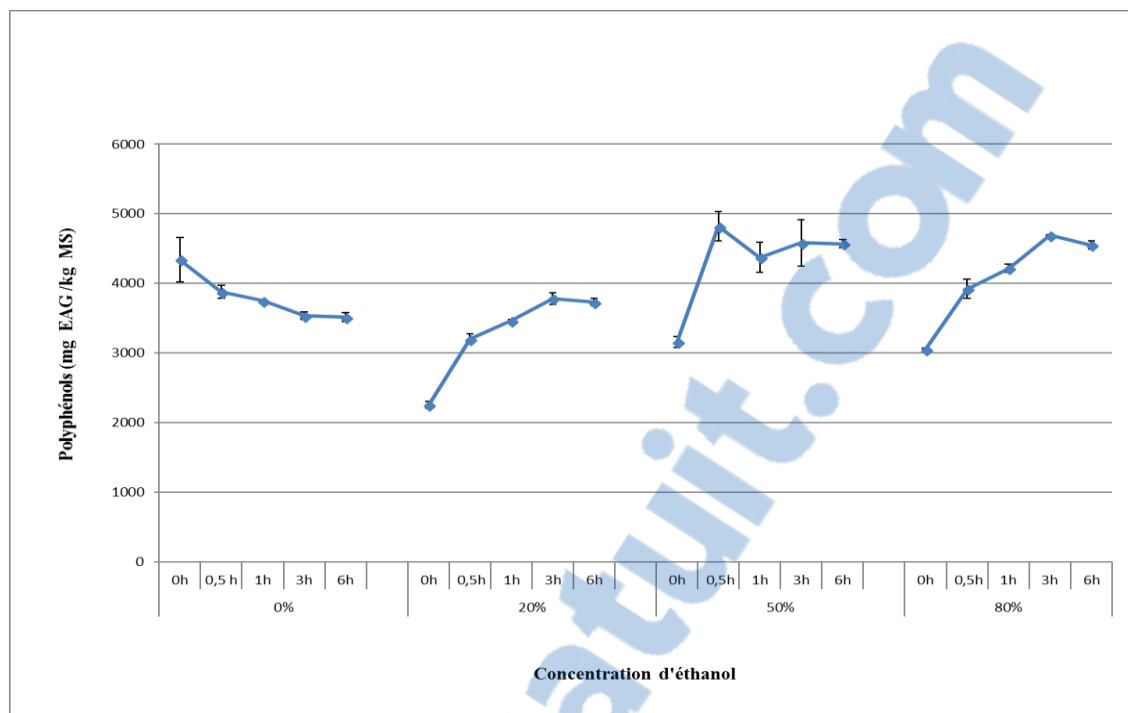


Figure 37 : Optimisation de l'extraction des polyphénols à partir des coproduits d'asperge en fonction de la concentration d'éthanol.

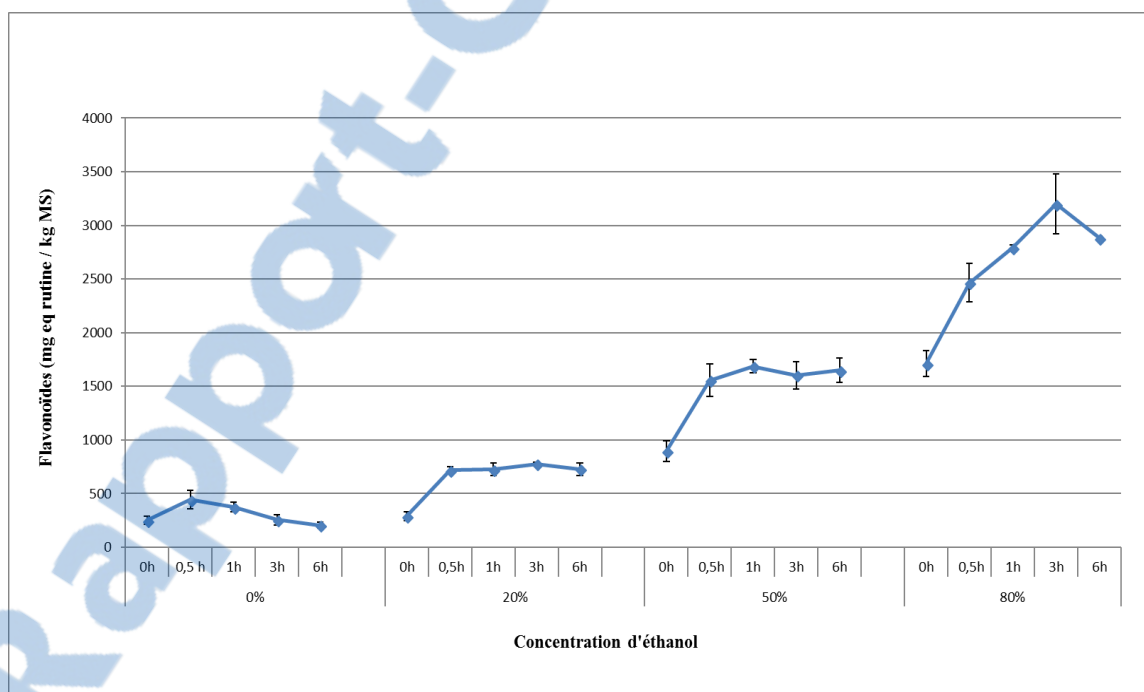


Figure 38 : Optimisation de l'extraction des flavonoïdes à partir des coproduits d'asperge en fonction de la concentration d'éthanol.

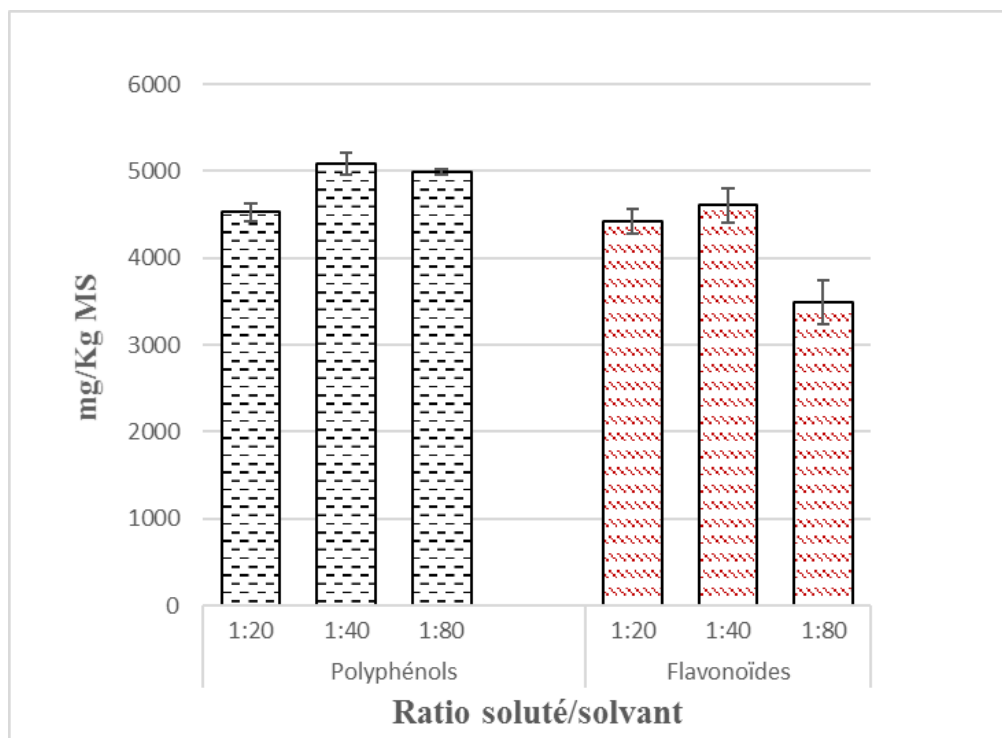


Figure 39 : Optimisation de l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes à partir des coproduits d'asperge en fonction du ratio soluté/solvant.

Des analyses de variance (ANOVA) utilisant la procédure mixte avec le test LSD de Fisher ($p \leq 0,05$) du logiciel SAS version 9.3 (Statistical Analysis System Institute, Cary, NC) ont été effectuées pour tous les échantillons.

L'étude de l'influence de la température sur l'extraction des polyphénols (figure 35) et les flavonoïdes (figure 36), a démontré que la température a une influence positive sur l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes dans les bases d'asperge. La température optimale pour l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes est $T=70^{\circ}\text{C}$. Les résultats obtenus sont en concordance avec les travaux de Ana Bucić-Kojić et al (2007) qui ont montré que la température a une influence positive sur l'extraction des polyphénols (Bucić-Kojić et al., 2007). Fan et al (2015) dans leur étude de valorisation des coproduits d'asperge, ont montré que la température optimale de l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes est $T=80^{\circ}\text{C}$ qui est proche de la température trouvée dans notre étude.

L'étude de l'influence de la concentration en éthanol sur l'extraction des polyphénols (figure 37), a démontré que la concentration optimale pour l'extraction des polyphénols est 50 % éthanol à 0,5 heures avec une quantité de polyphénols totaux de l'ordre de 4 820 mg EAG/kg MS.

Ce résultat est en concordance avec les travaux de Fan et al (2015) qui ont démontré que la concentration optimale de l'extraction de polyphénols totaux dans les coproduits d'asperge est 50 % éthanol. L'étude de l'influence de la concentration de l'éthanol sur l'extraction des flavonoïdes (figure 38), a démontré que la concentration optimale pour l'extraction des flavonoïdes est 80 % éthanol à 3 heures avec une quantité de flavonoïdes totaux de l'ordre de 3 199 mg eq rutine/kg MS. Les analyses statistiques ont montré que pour les polyphénols totaux la différence n'est pas significative entre la concentration 50 % éthanol pour 0,5 heure et la concentration 80 % pour 3 heures. On considère la concentration 80 % pour 3 heures comme la concentration optimale pour l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes totaux.

L'étude de l'influence du ratio soluté/solvant sur l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes (figure 39), a démontré que le ratio optimal soluté/solvant pour l'extraction des polyphénols totaux est le ratio 1:20 vu que la différence est non significative entre le ratio 1:20 et 1:40.

Le ratio optimal soluté/solvant pour l'extraction des flavonoïdes est le ratio 1 :40 vu que la différence est significative entre le ratio 1 :20 et 1 :40. Ce résultat est proche des résultats trouvés par Fan et al (2015) qui ont démontré que le ratio optimal de l'extraction de polyphénols totaux dans les coproduits d'asperge est 1 :30 (Fan et al., 2015).

Les paramètres optimaux de l'extraction des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux dans les coproduits d'asperge sont:

- La température : $T=70^{\circ}\text{C}$.
- La concentration éthanol/eau (v/v) : 80 %.
- Le temps : 3 heures.
- Le ratio soluté/solvant (w/v) : 1 : 40.

En utilisant ces paramètres optimaux pour l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes totaux à partir des coproduits d'asperge, on a obtenu un rendement d'extraction de 96 % des polyphénols totaux avec un pourcentage de polyphénols dans l'extrait sec de 3,29 % et un rendement de 110 % des flavonoïdes totaux avec un pourcentage de flavonoïdes dans l'extrait sec de 2,38 %.

Chapitre 4 : Études des saponines dans l'asperge et ses coproduits

1 Mise au point d'un protocole d'extraction et de dosage des saponines totales

Ce chapitre porte sur la recherche et la mise au point d'un protocole d'extraction et de dosage des saponines totales dans l'asperge et ses coproduits. Plusieurs protocoles ont été comparés afin de déterminer les modifications nécessaires pour obtenir un protocole adéquat à l'extraction et le dosage des saponines dans l'asperge et ses coproduits.

1.1 Mise au point et comparaison de différents protocoles d'extraction et de dosage des saponines totales

1.1.1 Matériel

Les coproduits d'asperge (les bases d'asperge), utilisés comme matière première, proviennent de la Ferme du Domaine 2000 Inc (Shawinigan-sud, Québec, Canada). La variété d'asperge est le Guelph Millenium (figure 40).



Figure 40 : Coproduits d'asperge : bases d'asperge

1.1.2 Réactifs et solutions

Les solvants utilisés sont de grade HPLC provenant de VWR International (Ville Mont-Royal, Québec, Canada). L'éthanol 95% utilisé pour l'extraction est de grade ACS et a été acheté des Alcools de Commerce Inc. (Boucherville, Québec, Canada). L'eau ultrapure a été produite en utilisant un système milli-Q de Millipore Sigma (Burlington, Massachusetts, États-Unis). La vanilline, le ginsenoside Rb1, l'acide acétique et l'acide perchlorique ont été achetés de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

1.1.3 Méthode

1.1.3.1 Protocole 1 : Méthode gravimétrique avec pesage direct

La méthode de (Kwon et al., 2003) a été utilisée avec les modifications suivantes pour adapter le protocole à nos conditions de travail :

- Remplacement des erlenmeyers par des tubes coniques de 50 ml.
- La masse d'asperge a été fixée à 3 g.
- Changement du volume du solvant de 50 ml pour chaque extraction par 42 ml pour la première extraction et 30 ml pour les deux autres extractions.
- Augmentation de la température d'évaporation de la fraction butanolique de 55 °C à 80 °C.

Extraction des saponines totales

Trois grammes de base d'asperge lyophilisée ont été pesés dans un tube conique de 50 ml équipé d'un condensateur de refroidissement. Le tube a été chauffé pour 3 heures à 75 °C après l'ajout de 42 ml de méthanol 80 %. Une centrifugation à 3500 tours/minute a été effectuée pendant 5 minutes après le refroidissement des tubes. Le surnageant a été récupéré pour l'analyse. Le résidu a subi deux extractions de plus avec 30 ml de méthanol 80 %. Deux centrifugations à 3500 tours/minute ont été effectuées pendant 5 minutes et les surnageants ont été récupérés pour l'analyse. Le condensateur de refroidissement a été lavé avec 10 ml de méthanol 80 %. Le surnageant collecté a été filtré sous vide à travers deux filtres Whatman 41 et quantitative Q2 achetés de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). Le récipient de filtration a été lavé par 20 ml de méthanol 80 % (figure 41).

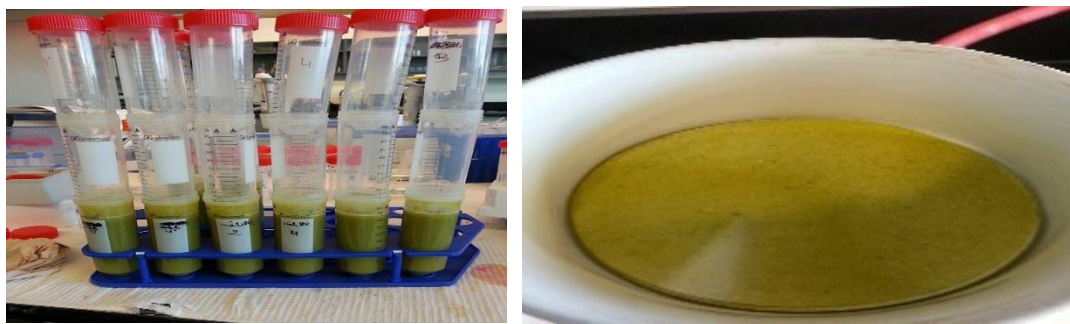


Figure 41 : Extraction des saponines totales à partir des coproduits d'asperge (Protocole.1)

Quantification des saponines totales

L'extrait obtenu a été évaporé totalement sous vide à 55 °C et le résidu a été redissous dans 30 ml d'eau ultrapure. La fraction aqueuse a été lavée, à l'aide d'une ampoule de décantation, par 2*30 ml de diéthyl éther et par 3*30 ml de n-butanol saturé. La fraction butanolique a été récupérée et lavée par 2*30 ml d'eau ultrapure pour éliminer les impuretés. La fraction butanolique a été évaporée totalement sous vide à 80 °C dans un ballon taré. La quantité des saponines totales a été déterminée par le pesage du ballon taré (figure 42).



Figure 42 : Récupération des saponines totales par décantation à partir des coproduits d'asperge (Protocole 1).

1.1.3.2 Protocole 2 : Méthode gravimétrique avec pesage après lyophilisation

La méthode de (Hassan et al., 2013) a été utilisée avec les modifications suivantes pour adapter le protocole à nos conditions de travail :

- La masse d'asperge est fixé à 5 g au lieu de 25 g.
- Changement du volume du solvant de 250 ml par 50 ml.
- Augmentation de la température d'évaporation de la fraction butanolique de 50 °C à 80 °C.

Extraction des saponines totales

Cinq grammes de base d'asperge lyophilisée ont été pesés dans un erlenmeyer de 100 ml équipé d'un condensateur de refroidissement. L'erlenmeyer a été chauffé pour 3 heures à 75 °C après l'ajout de 50 ml d'éthanol 50 %. L'extrait a été filtré sous vide, après refroidissement, à travers deux filtres 150 µm (Whatman 2) et 125 µm (Whatman 114) achetés de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). Le filtrat a été collecté dans une fiole pour l'analyse.

Quantification des saponines totales :

L'extrait obtenu a été évaporé sous vide à 55 °C jusqu'à l'obtention du 1/3 du volume initial pour éliminer l'éthanol. La fraction aqueuse obtenue a été lavée deux fois par le n-butanol 1:1 (v : v). La fraction butanolique a été collectée dans un ballon et évaporée totalement à 80 °C. Le résidu a été redissous dans 10 ml d'eau ultrapure et lyophilisé dans un tube conique taré. La quantité des saponines totales a été déterminée par le pesage du tube conique taré après lyophilisation (figure 43).

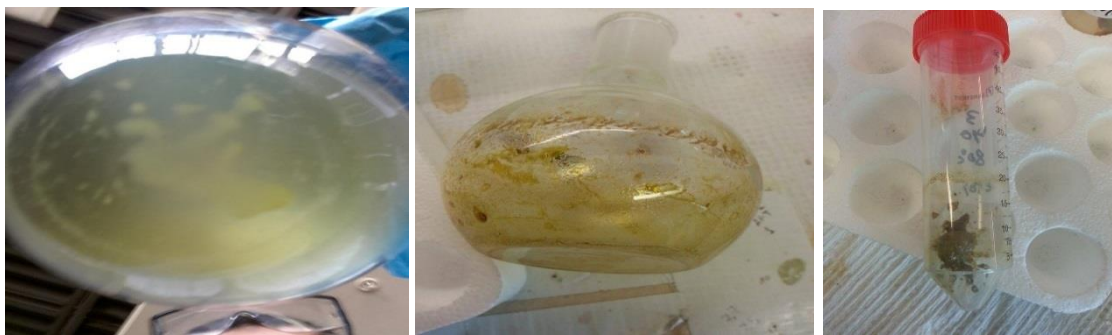


Figure 43 : Récupération des saponines totales par décantation à partir des coproduits d'asperge (Protocole 2).

1.1.3.3 Protocole 3 : Méthode spectrophotométrique

La méthode de (Madland, 2013) a été utilisée avec les modifications suivantes pour adapter le protocole à nos conditions de travail :

- Augmentation de la température d'évaporation de la fraction butanolique de 50°C à 80°C.
- Le dégraissage a été effectué sur le résidu et non pas sur la matière fraîche.

Extraction des saponines totales

Cinq grammes de base d'asperge lyophilisée ont été pesés dans un erlenmeyer de 250 ml équipé d'un condensateur de refroidissement. L'erlenmeyer a été chauffé pour 4 heures à 70 °C après l'ajout de 150 ml d'éthanol 75 %. L'extrait a été filtré sous vide, après refroidissement, à travers un filtre Whatman 41 acheté de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). Le filtrat a été collecté pour l'analyse (figure 44).



Figure 44 : Extraction des saponines totales à partir des coproduits d'asperges (Protocole 3)

Quantification des saponines totales

Le filtrat obtenu a été totalement évaporé sous vide à 40 °C. Le résidu a été redissous dans 20 ml d'eau ultrapure. La fraction aqueuse obtenue a été lavée, dans une ampoule de décantation, par 2*20 ml de diéthyl éther. Ensuite, la fraction aqueuse a été extraite par 3*20 ml de n-butanol. La fraction butanolique a été totalement évaporée sous vide à 80 °C. Le résidu a été redissous dans 20 ml d'eau ultrapure pour l'analyse par spectrophotomètre (figure 45).



Figure 45 : Récupération des saponines totales par décantation à partir des coproduits d'asperge (Protocole 3)

La détermination des saponines totales dans les coproduits d'asperge a été effectuée à 550 nm en utilisant le ginsenoside Rb1 (préparé dans l'éthanol 70%) comme standard.

Cinquante µl de l'échantillon du blanc et du standard ont été totalement évaporés sous un courant d'azote dans un tube conique. Ensuite 0.2 ml d'une solution de vanilline-acide acétique (5% w/v) a été ajoutée. Les tubes ont été chauffés pour 15 minutes à 70 °C après l'ajout de 0.8 ml d'acide perchlorique. Cinq ml d'acide acétique pur ont été ajoutés après le refroidissement des tubes dans un bain de glace pour quelques secondes. Une dilution de 3 fois a été effectuée sur l'extrait final obtenu. L'extrait dilué a été placé dans une cuvette de 4 ml et la lecture a été effectuée 550 nm (figure 46).



Figure 46 : Formation du complexe coloré pour l'analyse par spectrophotomètre des saponines totales des coproduits d'asperge.

1.1.4 Résultats et Discussion

Tableau 9 : Quantification des saponines totales dans les coproduits d'asperge selon différents protocoles d'extraction et de dosage

	Protocole 1	Protocole 2	Protocole 3
Saponines (mg/g MS)	41 ± 20	52 ± 19	12 ± 4

Les résultats sont exprimés en moyenne de triplicata ± écart-type.

Selon les travaux de Fuentes-Alventosa et al (2013) sur les coproduits d'asperge, la quantité des saponines totales est de l'ordre de 8.07 mg/g de matière sèche (humidité 92%). De plus selon les travaux de Schwarzbach et al (2006) sur l'asperge, la quantité de saponines totales varie de 1,75 mg/g MS à 10 mg/g MS (humidité 92%). Le protocole spectrophotométrique (protocole 3) est le plus proche des résultats trouvés dans la littérature. Bien que le protocole spectrophotométrique soit le plus fiable, ce protocole nécessite plus d'amélioration vu que l'instabilité, constaté durant l'expérience, du complexe coloré.

Pour les protocoles 1 et 2, l'évaporation de n-butanol était difficile ce qui donne un résidu humide en plus des erreurs de pesage vu que la faible quantité extraite de saponines. Les méthodes gravimétriques peuvent être plus fiables avec les extractions à grande échelle.

Les paramètres à prendre pour la mise au point du protocole d'extraction et de dosage des saponines totales dans les coproduits d'asperge sont :

- Utilisation des méthodes spectrophotométrique pour la quantification des saponines ;
- Utilisation de l'éthanol comme solvant d'extraction (un solvant vert) ;
- Une concentration en éthanol autour de 75% à utiliser.

Les paramètres à améliorer pour la mise au point du protocole d'extraction et de dosage des saponines totales dans les coproduits d'asperge sont :

- Réduction du temps d'extraction (4 heures dans le protocole 3) ;
- Stabilisation du complexe coloré dans l'analyse spectrométrique ;
- Remplacement du ginsenoside Rb1 par la diosgénine.

1.2 Mise au point d'un protocole d'extraction et de dosage des saponines totales à partir des coproduits d'asperge

1.2.1 Matériel

Les bases d'asperge (coproduits d'asperge) proviennent de la Ferme du Domaine 2000 Inc (Shawinigan-sud, Québec, Canada). La variété d'asperge est le Guelph Millenium.

1.2.2 Réactifs et solutions

Les solvants utilisés sont de grade HPLC provenant de VWR International (Ville Mont-Royal, Québec, Canada). L'éthanol 95% utilisé pour l'extraction est de grade ACS et a été acheté des Alcools de Commerce Inc. (Boucherville, Québec, Canada). L'eau ultrapure a été produite en utilisant un système milli-Q de Millipore Sigma (Burlington, Massachusetts, États-Unis). Le p-anisaldéhyde 98%, la diosgénine, l'acétate d'éthyle et l'acide sulfurique ont été achetés de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

1.2.3 Méthode

1.2.3.1 Extraction des saponines totales

À la suite des paramètres recommandés dans la section précédente, l'extraction des saponines dans les coproduits d'asperge a été faite par une double extraction de 2 minutes. 0.5 gramme d'asperge lyophilisée ont été extraits par un Ultra-turrax (T-25), acheté de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada), dans 20 ml de 80 % d'éthanol pendant 1 minute. Une centrifugation pendant 5 minutes à 3500 tours/minute a été effectuée et le surnageant a été récupéré. Le résidu a subi une deuxième extraction par Ultra-turrax (T-25) dans 20 ml de 80 % d'éthanol pendant 1 minute. Une centrifugation pendant 5 minutes à 3500 tours/minute a été effectuée et le surnageant a été récupéré pour l'analyse (Vázquez-Castilla et al., 2013). Toutes les analyses ont été faites en triplicata.

1.2.3.2 Purification des saponines totales

La purification des saponines totales dans les coproduits d'asperge a été effectuée selon deux méthodes :

- Purification par extraction liquide-liquide en utilisant le n-butanol

L'extrait obtenu dans l'étape d'extraction a été évaporé totalement sous vide à 55 °C et le résidu a été redissous dans 15 ml d'eau ultrapure. La fraction aqueuse a été extraite, à l'aide d'une ampoule de décantation, par 2*15 ml de diétyl éther et par 2*15 ml de n-butanol saturé. La fraction butanolique a été récupérée et lavée par 2*15 ml d'eau ultrapure pour éliminer les impuretés. La fraction butanolique a été stockée à -20°C pour l'analyse.

- Purification par chromatographie d'adsorption en utilisant une cartouche de résine Sep-Pak C18 de 500 mg (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, États-Unis).

L'extrait obtenu dans l'étape d'extraction a été évaporé totalement sous vide à 55 °C et le résidu a été redissous dans 15 ml d'eau ultrapure. La fraction aqueuse a été passée sur une cartouche de résine Sep-Pak C18 de 500 mg, déjà activée par 10 ml d'éthanol 96%. Ensuite la cartouche de résine a été éluée successivement par 20 ml d'eau ultrapure, 30 ml d'éthanol 20 %, 30 ml d'éthanol 40 % et 20 ml d'éthanol 96 %. L'élution de l'éthanol 40 % a été récupérée pour la quantification des saponines totales dans les coproduits d'asperge.

1.2.3.3 Quantification des saponines totales

Pour la quantification des saponines totales dans les coproduits d'asperge, une méthode spectrophotométrique a été utilisée. La diosgénine a été utilisée comme standard. L'utilisation de l'acide acétique, la vanilline et l'acide perchlorique donne un complexe coloré instable qui vire rapide a une couleur noire. Pour avoir un complexe coloré plus stable le p-anisaldéhyde 98%, l'acide sulfurique et l'acétate d'éthyle ont été utilisés comme réactifs (Baccou et al., 1977).

Cinq ml de l'extrait, obtenu à la suite de la purification, ont été évaporés totalement sous un courant d'azote à température ambiante. Le résidu a été redissous par sonication dans 2 ml d'acétate d'éthyle. Un ml du réactif A (mélange de 0,5 ml de p-anisaldéhyde et 99,5 ml d'acétate d'éthyle) et 1 ml du réactif B (mélange de 50 ml d'acide sulfurique et 50 ml d'acétate d'éthyle) ont été ajoutés. Un chauffage de 20 minutes à 60 °C a été effectué après 30 secondes d'agitation. Ensuite un refroidissement des tubes a été effectuée dans un bain de glace pour 10 minutes. La solution a été placée dans une cuvette et la lecture a été faite à 430 nm.

Les réactions ont été faite dans des tubes de verre pour éliminer toute interaction entre les réactifs et le matériel des tubes. La lecture par spectrophotomètre a été faite dans des cuvettes de Quartz achetées de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

1.2.3.4 Étude de l'effet de dégraissage sur la quantification des saponines totales

L'effet de dégraissage sur la quantification de saponines totales dans les coproduits d'asperge a été fait sur :

- Des coproduits non dégraissés
- Des coproduits dégraissés avant l'extraction
- L'extrait obtenu après l'extraction des coproduits.

La courbe de régression, en utilisant la diosgénine comme standard, est $Y = 65,59 X$ avec $r^2 = 0,9982$.

1.2.4 Résultats et Discussion

Tableau 10 : Effet de la méthode de purification sur la quantification des saponines totales dans les coproduits d'asperge.

	Coproduits d'asperge	Saponines (g/ kg MS)
Purification par n-butanol	Asperge de calibre inférieur	$3,66 \pm 0,05$
	Bases d'asperge	$2,03 \pm 0,01$
Purification par Sep-Pak C18	Asperge de calibre inférieur	$0,88 \pm 0,01$
	Bases d'asperge	$0,41 \pm 0,01$

Les résultats sont exprimés en moyenne de triplicata \pm écart-type

D'après les travaux de Schwarzbach et al (2006) sur l'asperge, la quantité de saponines totales varie de 1,75 g/Kg MS à 10 g/kg MS (humidité 92%). D'après ces résultats la purification par n-butanol est plus fiable que la purification par une cartouche de résine Sep-Pak C18. Au cours de la purification par une cartouche de résine Sep-Pak C18, on a constaté que la résine reste colorée ce qui explique la faible quantité de saponines trouvée (les saponines restent accrochées sur la résine).

Tableau 11 : Effet du dégraissage sur la quantification des saponines totales dans les coproduits d'asperge.

	Saponines (g/ kg MS)
Bases non dégraissées	2,21 ± 0,04
Bases dégraissées	1,96 ± 0,09
Extrait dégraissé	2,06 ± 0,07

Les résultats sont exprimés en moyenne de triplicata ± écart-type.

L'analyse statistique (ANOVA avec un test LSD) effectuée par IBM SPSS statistics, a montré que la différence est significative ($p < 0,05$) entre les bases d'asperge dégraissées et les bases d'asperge non dégraissées d'où l'efficacité de l'étape de dégraissage à éliminer toutes sorte d'interférence provoquée par les lipides.

Les analyses statistiques ont montré aussi que la différence est non significative entre un dégraissage effectué sur les coproduits avant l'extraction ou sur l'extrait obtenu après l'extraction des coproduits.

2 Extraction et quantification des saponines dans l'asperge et ses coproduits

2.1 Matériel

L'asperge et ses coproduits (asperges de calibre inférieur et bases d'asperge) proviennent de la Ferme du Domaine 2000 Inc (Shawinigan-sud, Québec, Canada). La variété d'asperge est le Guelph Millenium.

2.2 Méthode

L'extraction des saponines dans l'asperge et ses coproduits a été faite par une double extraction de 2 minutes en utilisant un Ultra-turrax T-25 à une vitesse de 10000 tours/minute (Vázquez-Castilla et al., 2013).

2.2.1 Purification des saponines totales

La purification des saponines totales dans l'asperge et ses coproduits a été effectuée par une extraction liquide-liquide en utilisant le n-butanol. L'extrait obtenu dans l'étape d'extraction a été évaporé totalement sous vide à 55 °C et le résidu a été redissous dans 15 ml d'eau ultrapure. La fraction aqueuse a été extraite, à l'aide d'une ampoule de décantation, par 2*15 ml de diéthyl éther et par 2*15 ml de n-butanol saturé. La fraction butanolique a été récupérée et lavée par 2*15 ml d'eau ultrapure pour éliminer les impuretés. La fraction butanolique a été stockée à -20°C pour l'analyse.

2.2.2 Quantification des saponines totales

La quantification des saponines totales dans l'asperge et ses coproduits d'asperge a été effectuée par une méthode spectrophotométrique en utilisant la diosgénine comme standard.

Cinq ml de l'extrait, obtenu à la suite de la purification, ont été évaporés totalement sous un courant d'azote à température ambiante dans des tubes de verre. Le résidu a été redissous par sonication dans 2 ml d'acétate d'éthyle. Un ml du réactif A (mélange de 0,5 ml de p-anisaldéhyde et 99,5 ml d'acétate d'éthyle) et 1 ml du réactif B (mélange de 50 ml d'acide sulfurique et 50 ml d'acétate d'éthyle) ont été ajoutés. Un chauffage de 20 minutes à 60 °C a été effectué après 30 secondes d'agitation. Ensuite un refroidissement des tubes a été effectuée dans un bain de glace pour 10 minutes. La solution a été placée dans une cuvette de Quartz et la lecture a été faite à 430 nm.

La courbe de régression, en utilisant la diosgénine comme standard, est $Y = 59,22 X$ avec $r^2 = 0,997$. Les résultats sont exprimés en moyenne de triplicata \pm écart-type.

2.3 Résultats et Discussion

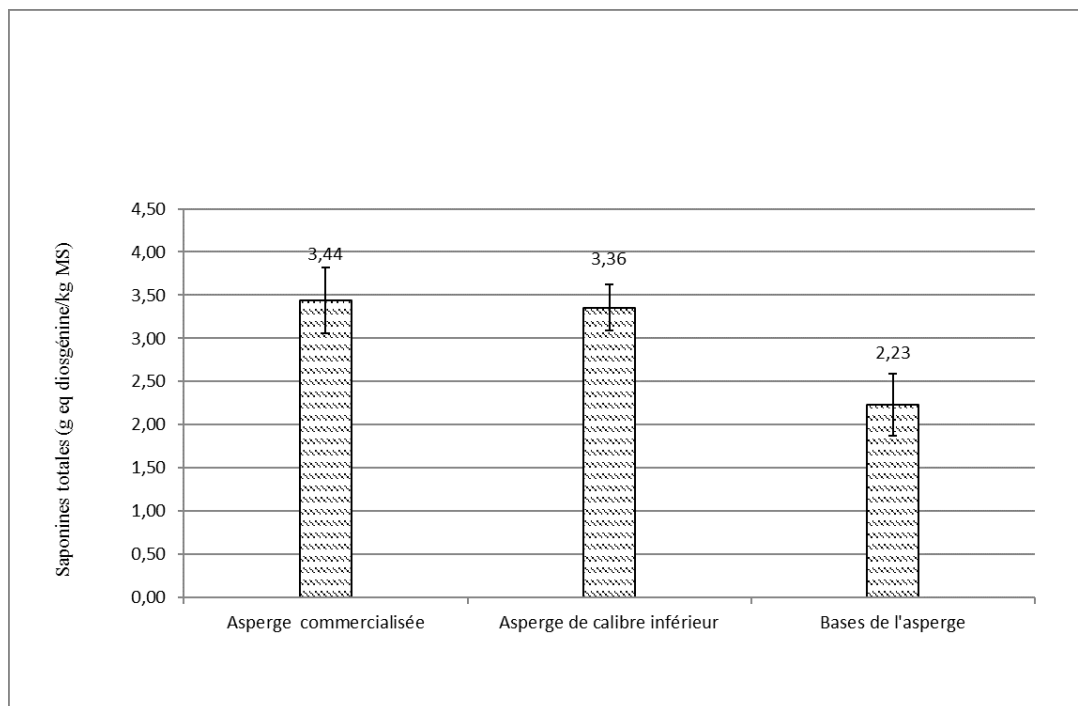


Figure 47 : Quantification des saponines totales dans l'asperge et ses coproduits.

Les résultats ont montré que la différence est non significative entre l'asperge commercialisée et l'asperge de calibre inférieur de la variété Guelph Millennium. Les bases d'asperge ont présenté une quantité considérable de saponines totales avec 2,23 g eq diosgénine/kg MS. Les résultats obtenus sont en concordance avec les travaux de Schwarzbach et al (2006) qui ont montré que la quantité de saponines totales dans l'asperge varie de 1,75 g/Kg MS à 10 g/kg MS (humidité 92%).

Chapitre 5 : Discussion générale, conclusion et perspectives

1 Discussion générale

La chimie verte est une vision durable, adoptée par les universités, l'industrie et les gouvernements, pour rendre la chimie moins néfaste pour l'environnement et pour la santé humaine. La chimie verte est une façon d'intégrer la sécurité, la prévention de la pollution, la minimisation des déchets et l'optimisation énergétique dans les processus chimiques existants.

Ce projet se déroulait dans une vision verte en utilisant des solvants verts (l'eau et l'éthanol) avec une finalité de produire des extraits végétaux riches en molécules bioactives destinés au marché des ingrédients fonctionnels. Cette discussion résume les principaux résultats et répond aux problématiques de recherche et aux objectifs fixés.

Dans une première partie la quantification et l'identification des molécules bioactives dans deux segments de la tige de l'asperge (parties supérieure et inférieure) ont été étudiées. Les polyphénols dans la tige de l'asperge sont essentiellement des acides phénoliques et des flavonoïdes avec une dominance de la rutine avec plus de 91% des polyphénols totales. La partie supérieure de l'asperge est plus riche en polyphénols et en flavonoïdes que la partie inférieure. Cette richesse en polyphénols et en flavonoïdes de la partie supérieure de la tige de l'asperge est expliquée par l'exposition de cette partie plus au soleil (Kohmura et al., 2008). Les polyphénols sont produits par la plante comme une lutte contre les rayons UV (Dai and Mumper, 2010, Bravo, 1998). Bien que la partie inférieure contienne la moitié des polyphénols totaux contenus dans la partie supérieure, cette valeur reste importante (6,0 g EAG/kg MS) ce qui favorise l'exploitation et la valorisation de cette partie inférieure de la tige de l'asperge qui est similaire aux coproduits d'asperge.

La quantification et l'identification des polyphénols et des flavonoïdes totaux ont été étudiées dans différentes variétés de l'asperge englobant la variété de l'asperge à valoriser le Guelph Millenium. Les polyphénols totaux dans la variété Guelph Millenium sont non significativement différents ($p < 0,05$) des autres variétés sauf les variétés Giant (12,1 g EAG/kg MS) et Mill (11,4 g EAG/kg MS). Les flavonoïdes totaux dans la variété Guelph Millenium sont significativement différents ($p < 0,05$) des autres variétés sauf les variétés Giant, Mill, NJ953 et Supreme.

Les polyphénols dans la variété Guelph Millenium sont essentiellement des acides phénoliques et des flavonoïdes avec une dominance de la rutine avec de 92% des polyphénols totaux. Le Guelph Millenium est bien placé, sur le plan de la quantité des polyphénols et des flavonoïdes totaux, par rapport aux différentes variétés étudiées. Les résultats obtenus renforcent l'utilité de la valorisation des coproduits de cette variété (Guelph Millenium).

Les coproduits de l'asperge, formés par les asperges de calibre inférieur et les bases de l'asperge, ont été étudiés pour quantifier les polyphénols et les flavonoïdes totaux. Les polyphénols dans les coproduits de l'asperge sont essentiellement des acides phénoliques et des flavonoïdes avec une dominance de la rutine avec 92 % des polyphénols totales pour l'asperge de calibre inférieur et 94% pour les bases de l'asperge. Les bases de l'asperge contiennent approximativement la moitié de la quantité des polyphénols totaux contenus dans l'asperge commercialisée, avec 4,8 g EAG/kg MS, ce qui est en concordance avec notre étude sur les deux segments de la tige de l'asperge.

Suite à la caractérisation des coproduits de l'asperge, une optimisation verte, en utilisant l'eau et l'éthanol, de l'extraction des polyphénols et flavonoïdes totaux dans les bases de l'asperge a été lancée. Cette partie est innovante, car elle utilise un système de solvant entièrement vert à la place des solvants nocifs souvent utilisés pour l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes. En plus cette optimisation permet l'extraction à l'échelle industrielle de molécules bioactives à faible coût. Les paramètres optimaux ont été une extraction de 3 heures à 70 °C avec de l'éthanol 80 % et un ratio soluté/solvant de 1:40. En utilisant ces paramètres optimaux pour l'extraction des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux à partir des coproduits de l'asperge, on a obtenu un rendement d'extraction de 96 % des polyphénols totaux avec un pourcentage de polyphénols dans l'extrait sec de 3,29 % et un rendement de 110 % des flavonoïdes totaux avec un pourcentage de flavonoïdes dans l'extrait sec de 2,38%. Ce procédé permettait donc de confirmer notre hypothèse de recherche et l'objectif d'optimiser l'extraction des molécules bioactives dans les coproduits de l'asperge en utilisant des solvants verts de façon à garder une efficacité similaire à l'efficacité des solvants pétrochimiques. Néanmoins, ce procédé ne permet pas une séparation des différentes molécules bioactives vu que l'affinité similaire au système de solvant utilisé.

Les coproduits de l'asperge sont riches en saponines d'où la nécessité de mettre à niveau un protocole d'extraction et de quantification de ces molécules. Plusieurs protocoles d'extraction des saponines totales ont été étudiés durant cette étude et un protocole d'extraction et de quantification des saponines totales dans l'asperge et ses produits a été mis au point en utilisant une méthode spectrophotométrique basée sur l'utilisation du p-anisaldéhyde 98%, de l'acétate d'éthyle et de l'acide sulfurique. La différence est non significative entre l'asperge commercialisée et l'asperge de calibre inférieur de la variété Guelph Millennium. Les bases de l'asperge contiennent une quantité considérable de saponines totales avec 2,23 g eq diosgénine/kg MS.

2 Conclusion et perspectives

Les objectifs de cette recherche ont été atteints en développant un extrait riche en molécules bioactives à partir des coproduits de l'asperge et en utilisant une technologie verte. Le procédé d'extraction déterminé donne une efficacité comparable à celle obtenue par les solvants pétrochimiques. Un protocole d'extraction et de quantification des saponines totales dans l'asperge et ses coproduits a été développé. Suite à l'obtention d'une méthode fiable de quantification des saponines totales dans l'asperge et ses coproduits, une optimisation de l'extraction de ces molécules et une étude des saponines totales dans différentes variétés de l'asperge peuvent être lancées.

Bibliographie

- AGATI, G., AZZARELLO, E., POLLASTRI, S. & TATTINI, M. 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76.
- BACCOU, J. C., LAMBERT, F. & SAUVAIRE, Y. 1977. Spectrophotometric method for the determination of total steroidal sapogenin. *Analyst*, 102, 458-465.
- BAVARESCO, L. 2003. Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs under experimental and clinical research*, 29, 181-187.
- BRAT, P., GEORGÉ, S. P., BELLAMY, A., CHAFFAUT, L. D., SCALBERT, A., MENNEN, L., ARNAULT, N. & AMIOT, M. J. P. 2006. Daily Polyphenol Intake in France from Fruit and Vegetables. *The Journal of Nutrition*, 136, 2368-2373.
- BRAVO, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56, 317-333.
- BUCIĆ-KOJIĆ, A., PLANINIĆ, M., TOMAS, S., BILIĆ, M. & VELIĆ, D. 2007. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81, 236-242.
- CABRINI, L., BARZANTI, V., CIPOLLONE, M., FIORENTINI, D., GROSSI, G., TOLOMELLI, B., ZAMBONIN, L. & LANDI, L. 2001. Antioxidants and total peroxyl radical-trapping ability of olive and seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 6026-6032.
- CAKIR, E. 2007. *Varietal differences in antioxidant activity and phenolic composition of Asparagus*. Washington State University.
- CAPELLO, C., FISCHER, U. & HUNGERBUHLER, K. 2007. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry*, 9, 927-934.
- CHANG, C.-C., YANG, M.-H., WEN, H.-M. & CHERN, J.-C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10.
- CHEN, X., GU, Y., ZHOU, X. & ZHANG, Y. 2014. Asparagus stem as a new lignocellulosic biomass feedstock for anaerobic digestion: Increasing hydrolysis rate, methane production and biodegradability by alkaline pretreatment. *Bioresource technology*, 164, 78-85.
- CHEOK, C. Y., SALMAN, H. A. K. & SULAIMAN, R. 2014. Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59, 16-40.
- CHIN, C. & GARRISON, S. A. Functional elements from asparagus for human health. XI International Asparagus Symposium 776, 2005. 219-226.
- CROZIER, A., CLIFFORD, M. N. & ASHIHARA, H. 2008. *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*, John Wiley & Sons.
- CROZIER, A., JAGANATH, I. B. & CLIFFORD, M. N. 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural product reports*, 26, 1001-1043.
- D ARCHIVIO, M., FILESI, C., DI BENEDETTO, R., GARGIULO, R., GIOVANNINI, C. & MASELLA, R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, 43, 348.
- DAI, J. & MUMPER, R. J. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.
- DELMAS, D., LANÇON, A., COLIN, D., JANNIN, B. & LATRUFFE, N. 2006. Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. *Current drug targets*, 7, 423-442.
- DEORE, S., KHADABADI, S., CHITTAM, K., BHUJADE, P., WANE, T., NAGPURKAR, Y., CHANEKAR, P. & JAIN, R. 2009. Properties AD pharmacological applications of saponins. *Pharmacologyonline*, 2, 61-84.
- DI CARLO, G., MASCOLO, N., IZZO, A. A. & CAPASSO, F. 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 65, 337-353.

- DI FERDINANDO, M., BRUNETTI, C., AGATI, G. & TATTINI, M. 2014. Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. *Environmental and experimental botany*, 103, 107-116.
- DORÉ, C. 1990. Asparagus anther culture and field trials of dihaploids and F 1 hybrids. *Haploids in Crop Improvement I*. Springer.
- DRINKWATER, J. M., TSAO, R., LIU, R. & WOLYN, D. J. 2014. Genetic variation and heritability of rutin and glutathione concentrations in asparagus spears. *Canadian Journal of Plant Science*, 94, 1355-1362.
- ELENA, K. 2007. Asparagus diseases. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 1, 76-83.
- ESTRADA, A., KATSELIS, G. S., LAARVELD, B. & BARL, B. 2000. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 23, 27-43.
- FAN, R., YUAN, F., WANG, N., GAO, Y. & HUANG, Y. 2015. Extraction and analysis of antioxidant compounds from the residues of *Asparagus officinalis* L. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 2690-2700.
- FUENTES-ALVENTOSA, J., JARAMILLO, S., RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, G., CERMEÑO, P., ESPEJO, J., JIMÉNEZ-ARAUJO, A., GUILLÉN-BEJARANO, R., FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. & RODRÍGUEZ-ARCOS, R. 2008. Flavonoid profile of green asparagus genotypes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 6977-6984.
- FUENTES-ALVENTOSA, J. M., JARAMILLO-CARMONA, S., RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, G., GUILLÉN-BEJARANO, R., JIMÉNEZ-ARAUJO, A., FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. & RODRÍGUEZ-ARCOS, R. 2013. Preparation of bioactive extracts from asparagus by-product. *Food and Bioproducts Processing*, 91, 74-82.
- FUENTES-ALVENTOSA, J. M., RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, G., JARAMILLO-CARMONA, S., ESPEJO-CALVO, J. A., RODRÍGUEZ-ARCOS, R., FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J., GUILLÉN-BEJARANO, R. & JIMÉNEZ-ARAUJO, A. 2009. Effect of extraction method on chemical composition and functional characteristics of high dietary fibre powders obtained from asparagus by-products. *Food Chemistry*, 113, 665-671.
- FUENTES-ALVENTOSA, J. M., RODRÍGUEZ, G., CERMEÑO, P., JIMÉNEZ, A., GUILLÉN, R., FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. & RODRÍGUEZ-ARCOS, R. 2007. Identification of Flavonoid Diglycosides in Several Genotypes of *Asparagus* from the Huétor-Tájar Population Variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10028-10035.
- GRATACÓS-CUBARSÍ, M., RIBAS-AGUSTI, A., GARCÍA-REGUEIRO, J. & CASTELLARI, M. 2010. Simultaneous evaluation of intact glucosinolates and phenolic compounds by UPLC-DAD-MS/MS in *Brassica oleracea* L. var. botrytis. *Food Chemistry*, 121, 257-263.
- GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ, Ö. & MAZZA, G. 2007. Saponins: properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food science and nutrition*, 47, 231-258.
- HASLAM, E. & CAI, Y. 1994. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Natural product reports*, 11, 41-66.
- HASSAN, S., AL AQIL, A. & ATTIMARAD, M. 2013. Determination of crude saponin and total flavonoids content in guar meal. *Advancement in Medicinal Plant Research*, 1, 24-28.
- HELLER, W. & FORKMANN, G. 1994. The Flavonoids: advances in research since 1986. *Secondary plant products. Encyclopedia of plant physiology*, ed. by JB Harborne (Chapman & Hall, London, 1993), 399.
- HUANG, X. & KONG, L. 2006. Steroidal saponins from roots of *Asparagus officinalis*. *Steroids*, 71, 171-176.
- ITABASHI, M., SEGAWA, K., IKEDA, Y., KONDO, S., NAGANAWA, H., KOYANO, T. & UMEZAWA, K. 1999. A new bioactive steroidal saponin, furcreastatin, from the plant *Furcraea foetida*. *Carbohydrate Research*, 323, 57-62.

- JANG, D. S., CUENDET, M., FONG, H. H., PEZZUTO, J. M. & KINGHORN, A. D. 2004. Constituents of *Asparagus officinalis* evaluated for inhibitory activity against cyclooxygenase-2. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 2218-2222.
- JARAMILLO-CARMONA, S., LOPEZ, S., VAZQUEZ-CASTILLA, S., RODRIGUEZ-ARCOS, R., JIMENEZ-ARAUJO, A. & GUILLEN-BEJARANO, R. 2013. Asparagus byproducts as a new source of peroxidases. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61, 6167-6174.
- JUST, M. J., RECIO, M. C., GINER, R. M., CUÉLLAR, M. J., MÁÑEZ, S., BILIA, A. R. & RÍOS, J.-L. 1998. Anti-inflammatory activity of unusual lupane saponins from *Bupleurum fruticosum*. *Planta medica*, 64, 404-407.
- KHODDAMI, A., WILKES, M. A. & ROBERTS, T. H. 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18, 2328-2375.
- KILLEEN, G. F., MADIGAN, C. A., CONNOLLY, C. R., WALSH, G. A., CLARK, C., HYNES, M. J., TIMMINS, B. F., JAMES, P., HEADON, D. R. & POWER, R. F. 1998. Antimicrobial saponins of *Yucca schidigera* and the implications of their in vitro properties for their in vivo impact. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3178-3186.
- KOHMURA, H., WATANABE, Y. & MUTO, N. POLYPHENOL CONTENT, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND SURFACE COLOUR OF ASPARAGUS SPEARS CULTIVATED UNDER DIFFERENT CONDITIONS OF SUNLIGHT. 2008. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium, 255-260.
- KUMAR, S. & PANDEY, A. K. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 162750.
- KWON, J.-H., BÉLANGER, J. M. R., PARÉ, J. R. J. & YAYLAYAN, V. A. 2003. Application of the microwave-assisted process (MAP™☆☆MAP is a Trademark of Her Majesty the Queen in Right of Canada as represented by the Minister of the Environment.) to the fast extraction of ginseng saponins. *Food Research International*, 36, 491-498.
- LEE, S.-J., SUNG, J.-H., LEE, S.-J., MOON, C.-K. & LEE, B.-H. 1999. Antitumor activity of a novel ginseng saponin metabolite in human pulmonary adenocarcinoma cells resistant to cisplatin. *Cancer letters*, 144, 39-43.
- LI, A.-N., LI, S., ZHANG, Y.-J., XU, X.-R., CHEN, Y.-M. & LI, H.-B. 2014. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients*, 6, 6020-6047.
- LI, X.-C., ELSOHLY, H. N., NIMROD, A. C. & CLARK, A. M. 1999. Antifungal Jujubogenin Saponins from *Colubrina retusa*. *Journal of natural products*, 62, 674-677.
- LIGOR, M., RATIU, I. A., KIELBASA, A., AL-SUOD, H. & BUSZEWSKI, B. 2018. Extraction approaches used for the determination of biologically active compounds (cyclitols, polyphenols and saponins) isolated from plant material. *Electrophoresis*.
- LIN, C. S. K., PFALTZGRAFF, L. A., HERRERO-DAVILA, L., MUBOFU, E. B., ABDERRAHIM, S., CLARK, J. H., KOUTINAS, A. A., KOPSAHELIS, N., STAMATELATOU, K. & DICKSON, F. 2013. Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy & Environmental Science*, 6, 426-464.
- LIU, Y., WANG, Z. & ZHANG, J. 2015. *Dietary Chinese Herbs: Chemistry, Pharmacology and Clinical Evidence*, pringer Science & Business Media: Berlin, Germany, 767-780.
- MADLAND, E. 2013. *Extraction, isolation and structure elucidation of saponins from Herniaria incana*. Institutt for kjemi.
- MAEDA, T., KAKUTA, H., SONODA, T., MOTOKI, S., UENO, R., SUZUKI, T. & OOSAWA, K. 2005. Antioxidation capacities of extracts from green, purple, and white asparagus spears related to polyphenol concentration. *HortScience*, 40, 1221-1224.
- MAURYA, A. K., PANDEY, R. K., RAI, D., PORWAL, P. & RAI, D. C. 2015. Waste Product of Fruits and Vegetables Processing as A Source of Dietary Fibre: A Review. *Trends in Biosciences*, 8, 5129-5140.

- MAZZA, G., CACACE, J. E. & KAY, C. D. 2004. Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. *Journal of AOAC international*, 87, 129-145.
- MIRABELLA, N., CASTELLANI, V. & SALA, S. 2014. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 28-41.
- MORENO, J. & PEINADO, R. 2012. *Enological chemistry*, London: Academic Publisher.
- MOTOKI, S., KITAZAWA, H., KAWABATA, T., SAKAI, H., MATSUSHIMA, K.-I. & HAMAIZU, Y. 2012. Rapid rutin accumulation during spear elongation in asparagus. *HortScience*, 47, 599-602.
- ODA, K., MATSUDA, H., MURAKAMI, T., KATAYAMA, S., OHGITANI, T. & YOSHIKAWA, M. 2000. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biological Chemistry*, 381, 67-74.
- POWER, K. A., LU, J. T., MONK, J. M., LEPP, D., WU, W., ZHANG, C., LIU, R., TSAO, R., ROBINSON, L. E., WOOD, G. A. & WOLYN, D. J. 2016. Purified rutin and rutin-rich asparagus attenuates disease severity and tissue damage following dextran sodium sulfate-induced colitis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60, 2396-2412.
- SCHWARZBACH, A., SCHREINER, M. & KNORR, D. 2006. Effect of cultivars and deep freeze storage on saponin content of white asparagus spears (*Asparagus officinalis* L.). *European Food Research and Technology*, 222, 32.
- SHAO, Y., POOBRASERT, O., KENNELLY, E. J., CHIN, C.-K., HO, C.-T., HUANG, M.-T., GARRISON, S. A. & CORDELL, G. A. 1997. Steroidal saponins from *Asparagus officinalis* and their cytotoxic activity. *Planta medica*, 63, 258-262.
- SHASHIREKHA, M., MALLIKARJUNA, S. & RAJARATHNAM, S. 2015. Status of bioactive compounds in foods, with focus on fruits and vegetables. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55, 1324-1339.
- SHIMOYAMADA, M., SUZUKI, M., SONTA, H., MARUYAMA, M. & OKUBO, K. 1990. Antifungal activity of the saponin fraction obtained from *Asparagus officinalis* L. and its active principle. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54, 2553-2557.
- SIMÕES, C., AMOROS, M. & GIRRE, L. 1999. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 13, 323-328.
- SINDAMBIWE, J., CALOMME, M., GEERTS, S., PIETERS, L., VLIETINCK, A. & VANDEN BERGHE, D. 1998. Evaluation of biological activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*. *Journal of Natural Products*, 61, 585-590.
- SONODA, T., MOTOKI, S., MAEKAWA, K., SUZUKI, T., OOSAWA, K., MAEDA, T. & KAKUTA, H. Differences in antioxidative polyphenols contents of asparagus related to cultivars and seasonal change under various cultural conditions of the mother-fern culture. XI International Asparagus Symposium 776, 2005. 227-234.
- SPARG, S., LIGHT, M. & VAN STADEN, J. 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of ethnopharmacology*, 94, 219-243.
- STOFFYN, O. M., TSAO, R., LIU, R. & WOLYN, D. J. 2012. The effects of environment and storage on rutin concentration in two asparagus cultivars grown in southern Ontario. *Canadian Journal of Plant Science*, 92, 901-912.
- TAKEUCHI, T., PEREIRA, C., BRAGA, M., MAROSTICA, M., LEAL, P. & MEIRELES, M. 2009. Low-pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. *Extracting bioactive compounds for food products*, 137-218.
- TRAORE, F., FAURE, R., OLLIVIER, E., GASQUET, M., AZAS, N., DEBRAUWER, L., KEITA, A., TIMON-DAVID, P. & BALANSARD, G. 2000. Structure and antiprotozoal activity of triterpenoid saponins from *Glinus oppositifolius*. *Planta Medica*, 66, 368-371.
- TSAO, R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231-1246.
- VACCARO, L. 2016. Green chemistry. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 12, 2763-2765.

- VÁZQUEZ-CASTILLA, S., JARAMILLO-CARMONA, S., FUENTES-ALVENTOSA, J. M., JIMÉNEZ-ARAUJO, A., RODRIGUEZ-ARCOS, R. O., CERMEÑO-SACRISTÁN, P., ESPEJO-CALVO, J. A. & GUILLÉN-BEJARANO, R. 2013. Optimization of a method for the profiling and quantification of saponins in different green Asparagus genotypes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61, 6250-6258.
- VINCKEN, J.-P., HENG, L., DE GROOT, A. & GRUPPEN, H. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68, 275-297.
- WANG, H. & NG, T. 1999. Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. *Life sciences*, 65, 2663-2677.
- WATERHOUSE, A. L. 2002. Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry*, Unit II.1, 1-4.
- XINHUI, T. & JING, G. 2001. Inhibitory Effects of Juice from Asparagus Officinalis L. on Cyclophosphamide (CTX)-induced Mutagenic Activities in Mice [J]. *Journal of Naijing University (Natural Sciences)*, 5, 007.
- YOSHIKAWA, M., MORIKAWA, T., KASHIMA, Y., NINOMIYA, K. & MATSUDA, H. 2003. Structures of New Dammarane-Type Triterpene Saponins from the Flower Buds of Panax notoginseng and Hepatoprotective Effects of Principal Ginseng Saponins. *Journal of natural products*, 66, 922-927.
- ZHAO, Z. & MOGHADASIAN, M. H. 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*, 109, 691-702.