

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE VENAM

Année 2011

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Maltage à faible hydratation : dégradation des structures pariétales, diffusion et modification des protéines aleuroniques et caractérisation des barrières hydrophobes cuticulaires

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : sciences biologiques et médicales

Spécialité : Biochimie,

Présentée

et soutenue publiquement par

Jean-Luc RUNAVOT

Le 5 juillet 2011, devant le jury ci-dessous

Président :	Pr. Philippe SIMIER, Faculté des Sciences de Nantes
Rapporteur :	Pr. Françoise CORBINEAU, Université Pierre et Marie Curie de Paris
Rapporteur :	Dr. Alain BARON, INRA de Rennes
Examineur :	Dr. Patrick BOIVIN représenté par Dr Marc Schmitt, IFBM de Nancy
Directeur de thèse :	Dr. Didier MARION, INRA de Nantes
Co-encadrant :	Dr. Bénédicte BAKAN, INRA de Nantes

Remerciements

Cette partie de la thèse, qui sera probablement la partie la plus lue de ce manuscrit, me permet de remercier toutes les personnes qui ont pu faire que cette thèse existe et se soit passée dans des conditions idéales que je souhaiterais à toute personne se lançant dans une thèse.

Tout d'abord je tiens à remercier Bénédicte Bakan et Didier Marion pour leur encadrement exceptionnel, ils ont toujours été présent lorsque j'avais des questions, m'ont appris quantités de choses et ont toujours permis des discussions plus qu'enrichissantes. Je remercie Didier pour tous ses conseils et toutes ses connaissances qu'il n'hésite pas à partager ainsi que pour sa façon de travailler qui montre qu'après des années de carrières le travail de recherche reste captivant et plus qu'intéressant. Je remercie Bénédicte pour sa proximité, toujours d'une rapidité exceptionnelle pour répondre à mes appels au secours. Merci également d'avoir accepté de m'aider pour certaines expérimentations dont les dissections qui ont demandé un temps énorme de sa part.

Je tiens à remercier très sincèrement les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'analyser mon travail. Merci à son président Philippe Simier, mes rapporteurs, Françoise Corbineau et Alain Baron qui, grâce à leur lecture attentive, ont pointé les défauts de mon travail et m'ont permis de corriger mes erreurs, mais également pour les commentaires et questions qui m'ont permis d'apprécier ma soutenance de thèse. Je remercie par ailleurs Françoise Corbineau pour ses discussions agréables et son expertise de la physiologie du grain au cours de nos rencontres durant cette thèse. Je remercie également Marc Schmitt et Patrick Boivin pour leur implication dans ma thèse et leur expertise dans le domaine de la malterie.

Je remercie chaleureusement Nathalie Geneix pour nos petites discussions et nos fous rires, son aide dans nombre d'expériences et pour avoir été une collègue de bureau particulièrement agréable. Je remercie également Nathalie pour son expertise pour tout ce qui attire à l'immunologie. Je remercie beaucoup Fabien Mounet avec qui j'ai passé de longs moments à discuter de science et d'autres choses. C'est un collègue devenu un ami très rapidement et avec qui j'ai beaucoup aimé travailler. Je souhaite également remercier André Lelion pour sa bonne humeur, ses blagues et ses histoires ahurissantes qui ont valu de nombreux rires collectifs avec Fabien. Je remercie bien évidemment tous les membres de l'équipe ELIPS pour m'avoir accueilli mais également pour leurs conseils, pour l'ambiance particulièrement agréable qui règne et leur gentillesse à tous sans exception.

Je remercie Luc Saulnier, Brigitte Bouchet et Fabienne Guillon de l'équipe PVPP qui m'ont apporté leur expertise dans le domaine des polysaccharides et pour l'utilisation des appareils de microscopie. Je remercie également Anne Meynier et Michelle Viau pour leur aide et leurs compétences sur les lipides et l'utilisation de la chromatographie gazeuse pour la séparation de ces lipides.

Je tiens également à remercier toutes les personnes de l'INRA de Nantes que j'ai pu côtoyer durant ces années de thèse. Je remercie plus particulièrement tous ceux qui ont fait

que je n'ai pas passé toute cette durée de thèse cloîtré chez moi le soir et qui font que cette thèse s'est passée sans problème, sans crise de dépression ou sans baisse de moral. Je remercie Valérie, Axelle, Pascal, Jérôme, Manuel, Bérénice, Benoît, Fabien et tous les autres pour les soirées jeux, repas, etc... qui ont égayé cette thèse par cette bonne humeur. Je remercie également tous ceux avec qui j'ai pu me lâcher deux fois par semaine entre 12h et 14h les mardis et vendredis en jouant au badminton. Ces séances étaient des bouffées d'air frais dans des journées parfois très longues.

Enfin, je remercie bien sûr ma famille qui m'a soutenu dans cette thèse. Je remercie particulièrement ma mère qui, bien qu'elle ne comprenne pas toujours de quoi je parlais, était toujours prête à m'écouter, toujours prête à m'aider et me soutenir lorsque j'en avais besoin. J'espère qu'elle est fière de moi désormais.

Liste des figures

- Figure 1. **Vues et organisations générales d'un épi d'orge.**
- Figure 2. **Morphologie du grain d'orge.**
- Figure 3. **Coupe transversale d'un grain d'orge après coloration des zones hydrophobes avec du rouge soudan.**
- Figure 4. **Coupe transversale de grains de riz, de blé et d'orge. D'après Kamal-Eldin (Kamal-Eldin *et al.* 2009)**
- Figure 5. **Les différentes étapes du maltage et du brassage.**
- Figure 6. **Représentation schématique de la production de gibbérellines et d'enzymes hydrolytiques lors de la germination.**
- Figure 7. **Évolution de l'humidité du grain au cours du procédé de maltage.**
- Figure 8. **Structure des protéines majoritaires de la bière.**
- Figure 9. **Distribution et liaisons des cystéines dans la séquence primaire des nsLTP1.**
- Figure 10. **Structure de la LTP1 d'orge.**
- Figure 11. **Acylation de la LTP1 lors du maltage.**
- Figure 12. **Structure des arabinoxylanes et β -glucanes des parois des cellules à aleurone et de l'albumen. D'après Dornez (Dornez *et al.* 2009)**
- Figure 13. **Images de microscopie de sections transversales d'orge.**
- Figure 14. **Structure de l'amidon.**
- Figure 15. **Site d'action des enzymes de dégradation de l'amidon.**
- Figure 16. **Diffusion de l'eau dans le grain d'orge.**
- Figure 17. **Structure et organisation des monomères de cutines. D'après Pollard (Pollard *et al.* 2008)**
- Figure 18. **Grains d'amidon de pois observés par microscopie optique en lumière visible et polarisée.**
- Figure 19. **Schéma de l'extraction des oses solubles de grains de malts touraillés après 5 jours de germination.**
- Figure 20. **Schéma de l'extraction des oses totaux de grains de malts touraillés après 5 jours de germination.**
- Figure 21. **Viscosité induite par les β -glucanes solubles de haute masse moléculaire extraits d'un malt touraillé après 5 jours de germination (fraction Si)**
- Figure 22. **β -glucanes non-hydrolysés de grains d'orge en cours de germination obtenus à 38% ou 45% d'hydratation.**

Figure 23. **Immunolocalisation des (1-3)(1-4) β -D-glucanes réticulés dans des sections transversales de malt vert durant la germination.**

Figure 24. **Activité β -glucanase du malt HH (cercles vides) et LH (cercles pleins) au cours de la germination.**

Figure 25. **Observation au microscope optique de sections longitudinales de malts verts non-fixées pour évaluer la friabilité.**

Figure 26. **Immunolocalisation de l' α -amylase 2 dans des sections longitudinales de malts verts durant la germination.**

Figure 27. **Observation de l'endommagement de l'amidon avec les croix de Malte en lumière polarisée.**

Figure 28. **Observation en microscopie optique des grains d'amidon de malts faiblement ou fortement hydratés après coloration à la safranine orange et au bleu de Niagara.**

Figure 29. **Observation de la diffusion de la LTP1 grâce à un immunomarquage dans des sections transversales de grain d'orge en cours de germination ou non.**

Figure 30. **Analyse des fractions obtenues lors de la purification de la LTP1.**

Figure 31. **Analyse ELISA de LTP1 d'extraits de malts obtenus à forte ou faible hydratation.**

Figure 32. **Analyse par spectrométrie de masse des modifications de la LTP1 de malt.**

Figure 33. **Chromatogramme obtenu à partir d'un malt après séparation par RP-HPLC couplée à un spectromètre de masse.**

Figure 34. **Analyse des glucosylations de la LTP1 par détermination des proportions relatives en amines libres des extraits de LTP1 des malts LH et HH comparé à l'extrait de LTP1 d'orge.**

Figure 35. **Analyse des glucosylations de la LTP1 par suivi des composés de Maillard avec les spectres d'émission de fluorescence des extraits de LTP1 des malts LH et HH.**

Figure 36. **Réaction d'une base de Schiff avec une amine.**

Figure 37. **Fractions du grain d'orge disséquées pour analyses compositionnelles.**

Figure 38. **Coupes de grain d'orge colorée au rouge soudan.**

Figure 39. **Gradients de température utilisés pour la séparation des composés de cires et cutines des grains d'orge.**

Figure 40. **Mesure des épaisseurs des cutines de grains d'orge de 4 variétés.**

Figure 41. **Composition en acides gras hydroxylés et époxydés des cutines de grains d'orge de 4 variétés.**

Figure 42. **Composition des cires de surface de grains d'orge de 4 variétés.**

Figure 43. **Composition en acides gras hydroxylés et époxydés de cutines isolées.**

Figure 44. **Composition des cires des fractions isolées de quatre variétés d'orge.**

Figure 45. **Composition des cires des fractions isolées de quatre variétés d'orge.** (autre représentation)

Figure 46. **Prise en eau de grains d'orge de 4 variétés.**

Figure 47. **Composition en sucres et acides aminés de grains de malts verts en cours de germination.**

Figure 48. **Composition en lipides neutres de grains de malts verts en cours de germination.**

Figure 49. **Composition en glycolipides de grains de malts verts en cours de germination.**

Figure 50. **Composition en phospholipides de grains de malts verts en cours de germination.**

Liste des tableaux

Tableau 1. **Composition des glumelles de l'orge.** D'après Moldes (Moldes *et al.* 2002), Cruz (Cruz *et al.* 2007), Hoije (Höije *et al.* 2005)

Tableau 2. **Composition de l'albumen d'orge.**

Tableau 3. **Composition des parois de l'albumen amylicé de l'orge, du blé et du riz.**

Tableau 4. **Paramètres de qualité des malts touraillés faiblement ou fortement hydratés.**

Liste des acronymes

16OHC16:0 : acide 16-hydroxyhexadécanoïque
18OHC18:0 : acide 18-hydroxyoctadécanoïque
18OHC18:1 : acide 18-hydroxyoctadécénoïque
18OHC18:2 : acide 18-hydroxyoctadécadiénoïque
18OHépoxyC18:0 : acide 9,10-époxy-18hydroxyoctadécanoïque
AG : Acides Gras
AGL : Acides Gras Libres
AL : ALeurone
Am : Albumen amylacé
AP : Alcaline Phosphatase (phosphatase alcaline)
BF₃ : Boron triFluoride
BSTFA : N,O-Bis-(trimethylSilyl)-TriFluoroAcétamide
CI : Courant Ionique
DC : Diagramme Court
DG : DiGlycérides
DGDG : DiGalactosyl DiGlycérides
diOHC16:0 : acide dihydroxyhexadécanoïque
DL : Diagramme Long
DP : Degré de Polymérisation
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GC-FID/MS : Gaz Chromatography coupled with a Flame Ionization Detector / with a Mass Spectrometer (chromatographie en phase gazeuse associée à un détecteur à ionisation de flamme ou à un spectromètre de masse)
GL : GLumelles
Glc : Glucose
GluD : Glumelles Dorsales
GluV : Glumelles Ventrales
GOPOD : Glucose Oxydase plus PerOxyDase et 4-aminoantipyrine
HH : High Hydrated (fortement hydraté)
HPSEC : High Performance Size Exclusion Chromatography (chromatographie d'exclusion stérique haute performance)
IgG : Immunoglobuline G
LC-MS : Liquid Chromatography coupled with a Mass Spectrometer (chromatographie en phase liquide associée à un spectromètre de masse)
LH : Low Hydrated (faiblement hydraté)
LPC : Lyso-Phosphatidyl Ccholine
MGDG : MonoGalactosyl DiGlycéride
MGMG : MonoGalactosyl MonoGlycéride
nsLTP : non-specific Lipid Transfer Proteins (protéines de transfert de lipides non-spécifiques)
OH-Pro : hydroxy-Proline
OPA : O-PhtaldiAldehyde

PBS : Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate salin)

PBS-Tw : PBS contenant 0,1% de Tween 20

PC : Phosphatidyl Choline

Pe : Péricarpe

PE : Phosphatidyl Ethanolamine

PI : Phosphatidyl Inositol

Réd : extrémité Réductrice

RP-HPLC : Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquide haute performance en phase inverse)

Scut : Scutellum

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium)

Ssglu = Sous-glumes

Te : Testa

TFA : TriFluoroacetic Acid (acide trifluoroacétique)

TG : TriGlycérides

TIFF : Tagged Image File Format

Introduction	1
Chapitre I. L'orge et le procédé de maltage	4
<i>I-1. Morphologie et histologie du grain d'orge</i>	<i>5</i>
I-1-1. Les glumelles	6
I-1-2. Le péricarpe	8
I-1-3. L'embryon	8
I-1-4. L'albumen	9
<i>I-2. Les procédés de maltage et brassage : de l'orge à la bière.</i>	<i>10</i>
I-2-1. Le maltage : de l'orge au malt	10
I-2-1-1. La trempé	12
I-2-1-2. La germination	12
I-2-1-3. Le touraillage	13
I-2-1-4. Le dégermage et le stockage du malt	14
I-2-2. Le brassage : du malt à la bière	14
I-2-2-1. Le concassage et la macération/brassage	15
I-2-2-2. La filtration de la maïsche et ébullition du moût	15
I-2-2-3. La fermentation, la garde/maturation et la filtration	16
<i>I-3. Les grands paramètres biochimiques de la qualité du malt</i>	<i>17</i>
I-3-1 Les protéines	17
I-3-2 Les polysaccharides pariétaux	19
I-3-3 L'amidon	23
<i>I-4. Les questions liées à un maltage à faible hydratation</i>	<i>26</i>
I-4-1 La diffusion de l'eau dans le grain : rôle des cutines et cires.	26
I-4-1-1 La cutine	27
I-4-1-2 Les cires	28
I-4-2 Points clés de la germination	29
Chapitre II. Le maltage à faible hydratation influence-t-il la diffusion des enzymes ?	31
<i>II-1 Introduction</i>	<i>32</i>
<i>II-2 Matériels & Méthodes</i>	<i>34</i>
II-2-1 Obtention des malts et malts verts fortement et faiblement hydratés	34
II-2-2 Extraction des polysaccharides des malts et de l'orge	35
II-2-3 Dosage des β -glucanes	35
II-2-4 Suivi de la viscosité induite par les β -glucanes	36
II-2-5 Analyses qualitatives des malts après touraillage	37
II-2-6 Mesure de l'activité β -glucanase	37
II-2-7 Réalisation de coupes à congélation et de coupes incluses en paraffine	37
II-2-8 Évaluation de la texture de l'albumen amylicé	38
II-2-9 Immunomarquage	38

II-2-10 Observation de l'amidon endommagé par microscopie	39
II-3 Résultats	40
II-3-1 Analyse de la qualité d'un malt obtenu à faible hydratation après 5 jours de germination	40
II-3-1-1 Caractéristiques technologiques des malts touraillés faiblement ou fortement hydratés	40
II-3-1-2 Quantité de β -glucanes et viscosité	40
II-3-2 Effet de la germination à faible hydratation sur les β -glucanases et α -amylases	41
II-3-2-1 Dosage des β -glucanes au cours de la germination	41
II-3-2-2 Hydrolyse des β -glucanases	42
II-3-2-3 Activité de la (1-3)(1-4)- β -D-glucanase	43
II-3-2-4 Texture de l'albumen amylicé	45
II-3-2-5 Localisation de l' α -amylase	48
II-3-2-6 Action de l' α -amylase	48
II-4 Discussion et perspectives	50
Chapitre III. Suivi des modifications de la LTP1 lors du maltage à faible hydratation en tant que marqueur de la qualité de la bière	53
III-1 Introduction	54
III-2 Matériels & Méthodes	54
III-2-1 Extraction et purification de la LTP1 d'orge et de malt	54
III-2-2 SDS-PAGE	55
III-2-3 Western blot anti-LTP1 d'orge	56
III-2-4 Immunomarquage pour observation en microscopie	56
III-2-5 Dosage de la LTP1 par ELISA	56
III-2-6 LC-MS	57
III-2-7 Dosage des amines libres par la méthode à l'O-phthalaldéhyde	57
III-2-8 Fluorescence des composés de Maillard	58
III-3 Résultats	58
III-3-1 Diffusion de la LTP1	58
III-3-2 Extraction et purification de la LTP1	60
III-3-3 Dosage de la LTP1	61
III-3-4 Suivi des modifications de la LTP1 par spectrométrie de masse	61
III-3-5 Suivi des glucosylations par la méthode à l'O-phthalaldéhyde	63
III-3-6 Suivi des glucosylations par fluorescence des composés avancés de la réaction de Maillard	65
III-4 Discussion	66
III-5 Conclusion	68

Chapitre IV. Caractérisation des assises cuticulaires de quatre variétés d'orge en relation avec leur comportement à faible hydratation	70
<i>IV-1 Introduction</i>	<i>71</i>
<i>IV-2 Matériels & Méthodes</i>	<i>72</i>
IV-2-1 Suivi de l'imbibition des grains d'orge de quatre variétés	72
IV-2-2 Coloration des enveloppes hydrophobes	72
IV-2-3 Extraction des cires de surface des grains d'orge	72
IV-2-4 Dissection des enveloppes sans albumen ni embryon	73
IV-2-5 Dissection des enveloppes du grain d'orge	73
IV-2-6 Dépolymérisation et dérivation des cires et cutines	74
IV-2-7 Analyse de la composition des cutines et des cires par chromatographie en phase gazeuse	75
<i>IV-3 Résultats</i>	<i>76</i>
IV-3-1 Mesure de l'épaisseur des cuticules de quatre variétés d'orge	76
IV-3-2 Composition en acides gras des cutines de "grains entiers" des quatre variétés d'orge	77
IV-3-3 Composition des cires de surface des quatre variétés d'orge	78
IV-3-4 Composition en acides gras des cutines des fractions périphériques isolées des quatre variétés d'orge	80
IV-3-5 Composition des cires des fractions périphériques isolées des quatre variétés d'orge	81
IV-3-6 Prise en eau de quatre variétés d'orge	86
<i>IV-4 conclusion et perspectives</i>	<i>87</i>
Conclusion générale et perspectives	88
Bibliographie	95
Annexe	1

Introduction

La bière est une boisson alcoolisée dont la consommation a été supérieure à 160 milliards de litres en 2008 qui pourrait atteindre les 200 milliard de litres en 2015 (données e-malt.com). Avec une capacité de production de 1,5 million de tonnes de malt par an et une exportation de près d'un million de tonnes de malt par an, la France se place en troisième position des pays producteurs de malt en Europe et en première position pour l'exportation au niveau mondial en 2009 (données e-malt.com). Pour garder cette place de "leader" dans l'exportation de malt, les malteurs de France s'investissent dans la recherche et le développement des procédés de maltage. Ce procédé se décompose en trois grandes étapes : la trempé, la germination et le touraillage. La phase de trempé permet d'amener l'humidité du grain aux environs de 42-45 % pour que la germination soit optimale. Une bonne répartition de l'eau dans l'albumen du grain en fin de trempé conditionne la qualité du malt. Le touraillage est une étape de séchage qui ramène la teneur en eau du grain entre 2 et 5 %. Cette opération nécessite aujourd'hui une consommation énergétique de 750 à 1000 kWh/tonne. Compte tenu de la production annuelle française de 1,5 milliard de tonnes de malt, cela correspond à une dépense énergétique d'environ 1,25 milliards de kWh, soit environ la consommation électrique d'une ville de 160 000 habitants (données issues du site internet www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/).

Dans le contexte actuel d'économie d'énergie, des études préliminaires ont montré qu'une diminution de l'hydratation des grains durant la trempé, de 43 à 38 % d'humidité par exemple, conduirait à un gain d'énergie de 260 à 350 kWh/tonne. Par ailleurs, moins d'eau serait nécessaire en trempé et donc les effluents rejetés s'en trouveraient amoindris. Dans ce contexte, les études du projet "MALTECO" (soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche) avaient pour objectif d'étudier le maltage d'orge brassicole à faible humidité pour réduire la consommation d'énergie tout en préservant la qualité du malt. Une première partie de ce projet consistait à évaluer les modifications physico-chimiques et biochimiques aux étapes clés du maltage induites par des modifications de diagrammes de trempé (hydratation du grain, répartition de l'eau dans l'albumen, synthèse, diffusion et action des enzymes hydrolytiques lors de la germination). D'autre part, ce projet visait à décrire les mécanismes de diffusion de l'eau dans le grain ainsi que les barrières hydrophobes. L'ensemble du projet ANR Malteco impliquait plusieurs laboratoires : l'équipe de Françoise Corbineau de l'université Pierre et Marie Curie, l'équipe de Valérie Guillard de l'INRA de Montpellier, l'équipe de Michel Fick de l'ENSAIA de Nancy, l'équipe de Loïc Foucat de l'INRA de Clermont-Ferrand et les membres de l'IFBM de Nancy et l'équipe de Didier Marion.

Durant le maltage, utiliser des grains d'orge faiblement hydratés est une nouvelle approche envisagée pour diminuer de façon significative à la fois la quantité d'énergie utilisée pour sécher les grains lors du touraillage et fonction du diagramme de trempe la quantité d'eau rejetée. Il a été évalué (Patrick Boivin, communication personnelle) qu'une diminution de 5 % du taux d'hydratation d'un malt non-touraillé permettrait d'économiser 20 % d'énergie thermique et électrique ce qui correspond à 0,25 milliard de kWh par an pour l'industrie française soit environ la consommation électrique d'une petite ville de plus de 30 000 habitants (d'après le site internet www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/). La principale étape à réaliser pour mettre en place ce maltage à faible hydratation consiste à vérifier la qualité des malts obtenus dans de telles conditions.

Cette thèse, réalisée dans le cadre du projet ANR MALTECO, a eu deux principaux objectifs : étudier l'impact d'un maltage à faible hydratation sur la qualité du malt et caractériser les barrières hydrophobes (assises cuticulaires) du grain d'orge en relation avec la diffusion de l'eau dans les grains d'orge. Les première et deuxième parties ont consistés à étudier la localisation et les caractéristiques biochimiques et structurales de protéines clés pour le brassage (enzymes hydrolytiques du grain telles que les β -glucanases et α -amylases et protéine pro-mousse telle que la LTP1) au cours de la germination du grain d'orge (Marion and Bakan 2009). La troisième partie a été centrée sur la caractérisation biochimique et structurale des assises cuticulaires dans les différents compartiments du grain et leur variabilité dans différents cultivars.

Chapitre I. L'orge et le procédé de maltage

L'orge (*Hordeum vulgare*) est une céréale à paille originaire du Proche-Orient. Elle est, avec le blé, cultivée par l'homme depuis plus de 10 000 ans ce qui en fait une des plus anciennes céréales de grande culture. Pauvre en gluten et donc difficilement panifiable comme le blé, l'orge a donc plutôt été utilisée pour l'alimentation animale ainsi que pour la fabrication de galettes ou de bouillies. C'est probablement au hasard d'une bouillie laissée de côté que la découverte de son utilisation comme pain-boisson (ancêtre lointain de notre bière actuelle) a été faite. Au cours des siècles et des lieux de fabrication de la bière, c'est toujours l'orge qui est restée la céréale majoritairement utilisée, les orges ayant été sélectionnées pour améliorer au fur et à mesure les qualités des malts et de la bière qui en résultait.

Il est possible de produire de la bière avec d'autres céréales comme le blé, le sorgho ou le sarrasin, mais l'orge reste la céréale présentant le plus de caractéristiques favorables à son utilisation pour la fabrication de la bière. En effet, l'orge est une céréale vêtue : comme le blé elle possède des enveloppes qui diminuent le risque de développement des moisissures. Contrairement au blé, ces enveloppes sont très adhérentes au grain mature. Le grain et la plumule sont ainsi protégés contre les chocs lors de la manutention pendant la récolte et durant le transport. De plus ces enveloppes servent de média filtrant de la maïsche lors du brassage ce qui va permettre d'obtenir facilement un liquide exempt de la plupart de particules solides. L'orge possède de plus une composition biochimique adaptée pour son utilisation en malterie/brasserie avec une production enzymatique (amylases, protéases, glucanases, ...) favorisant la fermentation, un amidon avec une température basse d'empesage (60°C) et la présence de composés organoleptiques (protéines, phénols, ...) retrouvés dans la bière en fin de procédé.

I-1. Morphologie et histologie du grain d'orge

Il existe plusieurs types d'orge, en brasseries seules certaines variétés sont utilisées parmi lesquelles l'orge à deux rangs (*Hordeum distichum*) et l'orge à six rangs (*Hordeum polystichum*) (**Figure 1**). On distingue par ailleurs des orges de printemps et des orges d'hiver. L'orge de printemps ne nécessite pas de températures basses pour produire des organes reproducteurs (fleurs) contrairement à l'orge d'hiver qui a besoin de froid (vernalisation) La levée de dormance des grains peut, elle, être effectuée par le froid mais peut également être causée par de la chaleur, de longues journées, la présence de gibbérelline ou d'auxine (Chouard 1960).

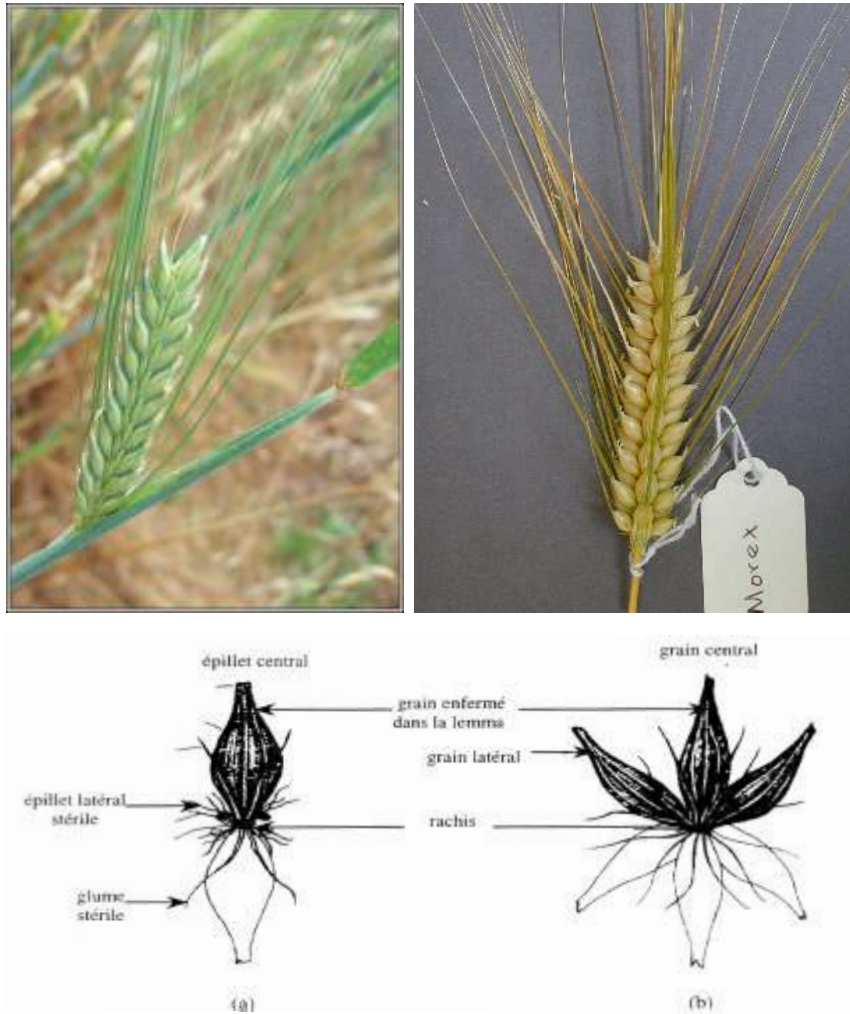


Figure 1. Vues et organisations générales d'un épi d'orge.

Photographies d'épis d'orge à deux rangs (gauche) (<http://www.irishwildflowers.ie/pages-grasses/g-1.html>) et 6 rangs (droite) (<http://barleyworld.org/FAQs/6row.jpg>) ; schémas de variété à deux rangs (a) et à six rangs (b). (Schémas d'après Briggs, 1998)

Le grain d'orge est composé de plusieurs parties : les enveloppes organisées en plusieurs assises (testa, péricarpe, glumelles), l'embryon, la couche à aleurone et l'albumen amylicé (**Figure 2a**).

I-1-1. Les glumelles

Les glumelles constituent l'enveloppe externe du grain d'orge et représentent environ 10 % de son poids sec. On distingue les glumelles dorsales (lemma) des ventrales (palea). Les glumelles sont principalement formées de cellulose (20 %), d'hémicellulose (30-45 %) et de lignine (10-20 %) (**Tableau 1**) (Moldes *et al.* 2002; Höije *et al.* 2005). Elles contiennent également des polyphénols qui influencent la stabilité colloïdale de la bière (Siebert and Lynn 1997, Siebert 1999, Mikyska *et al.* 2002). Les enveloppes jouent un rôle important puisqu'en

malterie elles protègent la plumule (ou acrospire), qui se développe au cours de la germination, contre les chocs durant le procédé de maltage.

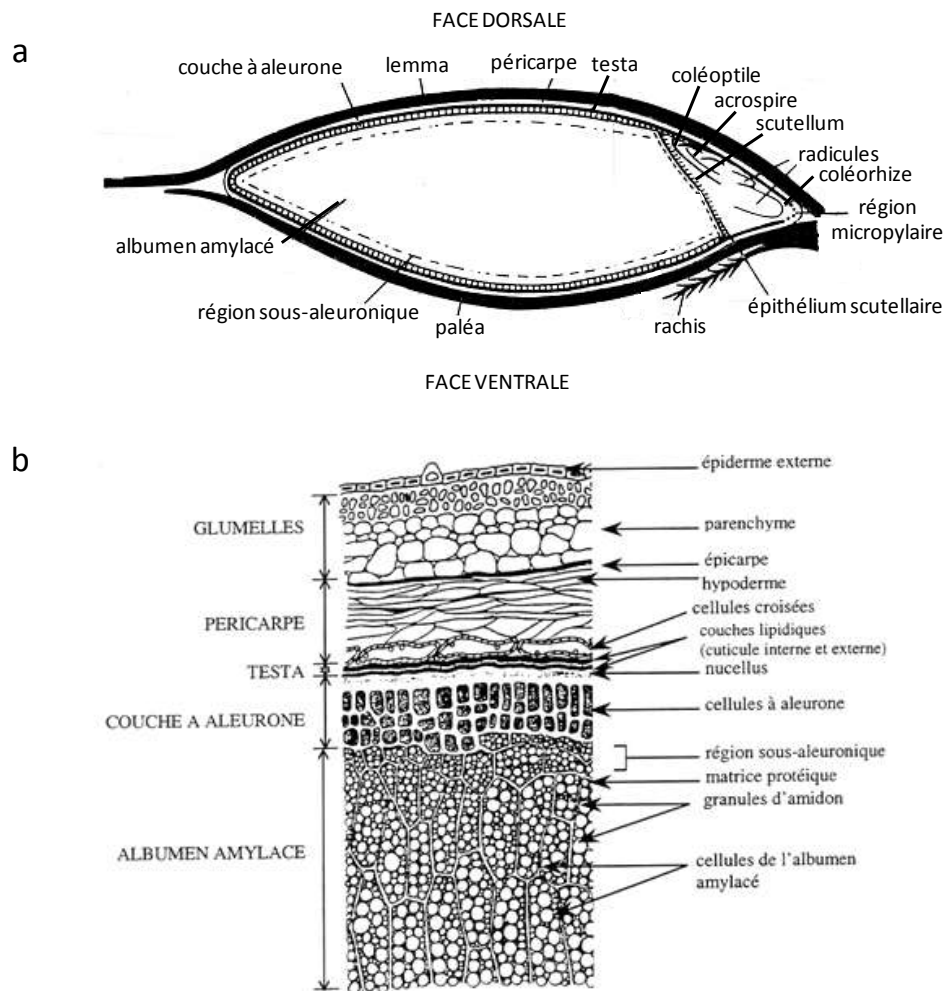


Figure 2. Morphologie du grain d'orge.

(a) Coupe longitudinale d'un grain d'orge. (b) coupe transversale des enveloppes, de la couche à aleurone et de l'albumen amylicé d'un grain d'orge (D'après Briggs, 1998)

Tableau 1. Composition des glumelles de l'orge

D'après	Moldes <i>et al.</i> 2002, Cruz <i>et al.</i> 2007	Hoijeet <i>al.</i> 2005
Hémicellulose	32,7 %	46,0 %
Cellulose	23,0 %	21,0 %
Lignine	21,4 %	12,0 %
Protéines	-	10,0 %
Amidon	-	8,0 %
Lipides	-	3,0 %
Autres	22,9 %	

I-1-2. Le péricarpe

Le péricarpe est composé de plusieurs types de cellules qui se situent entre les glumelles et la testa. Il est séparé des glumelles par une couche protectrice cuticularisée appelée épicarpe et est soudé à la testa (aussi appelé tégument séminal) (**Figure 2b**) (Freeman and Palmer 1984; Briggs 1998). Cette couche agit comme une membrane semi-perméable permettant les échanges gazeux (Briggs 1998). Sur sa face externe, le péricarpe est formé de l'hypoderme et sur sa face interne, de cellules croisées de forme rectangulaire et situées près de la testa (**Figure 2b, Figure 3**). La testa est entourée de deux zones cuticulaires, la plus interne issue du tissu nucellaire étant plus fine que la plus externe qui est issue des cellules de la testa (Briggs 1998).



Figure 3. Coupe transversale d'un grain d'orge

Photographie en microscopie optique d'une coupe de grain d'orge fixée dans de la paraffine. Les zones hydrophobes sont mises en évidence grâce à une coloration avec du rouge soudan. Gl = Glumelles. Pe = Péricarpe. Te = Testa. Al = Aleurone. (*INRA Nantes*)

I-1-3. L'embryon

Situé dans la partie dorsale de la graine, les deux composants majeurs de l'embryon sont l'axe embryonnaire qui formera la plantule au cours de la germination et le scutellum qui aura un rôle dans la synthèse d'enzymes et le transfert des nutriments de l'albumen vers l'embryon lors du développement du grain. A maturité l'embryon se divise en trois régions : la

tige (coléoptile), le mésocotyle et les racicules enveloppées dans le coléorhize. Le mésocotyle et l'axe embryonnaire se trouvent entre le coléoptyle et les racicules (Briggs 1998). Le scutellum, bordé sur son côté dorsal par l'axe embryonnaire et sur son côté ventral par l'albumen amylicé participe activement à la germination en sécrétant de l'acide gibbérellique (hormone végétale de croissance) et en synthétisant dès le début du processus de germination les enzymes nécessaires à la mobilisation des réserves accumulées dans l'albumen amylicé (Ranki and Sopanen 1984; Stuart *et al.* 1986; Fincher 1989; Ranki *et al.* 1990). Enfin, l'embryon contient des composés responsables de la saveur de la bière, en particulier des composés soufrés responsables de certaines saveurs de la bière (diméthylsulfure) (Anness and Bamforth 1982; Yang *et al.* 1998).

I-1-4. L'albumen

L'albumen est le tissu de réserve de l'orge, il contient des grains d'amidon, des protéines de réserve, des lipides et des polysaccharides pariétaux (**Tableau 2**). L'albumen est composé de la couche à aleurone et de l'albumen amylicé (Fincher and Stone 1986; Jadhav *et al.* 1998; Sullivan *et al.* 2010). C'est la composition particulièrement riche en β -glucanes des parois de l'albumen amylicé qui fait de l'orge la céréale la plus adaptée au maltage comparé au blé et au riz (**Tableau 3**).

Tableau 2. Composition de l'albumen d'orge. (D'après Sullivan *et al.* 2010)
Am= Albumen amylicé. Al = couche à aleurone.

		Proportions	
Amidon	Amylose	52-78 %	25,0 %
	Amylopectine		75,0 %
Fibres		13-14 %	
Protéines		5-9 %	
Polysaccharides pariétaux	β -glucanes	6-8 %	Am 70-75 % / Al 25 %
	Arabinoxylanes		Am 20 % / Al 65-70 %

Tableau 3. Composition des parois de l'albumen amylicé de l'orge, du blé et du riz.
(D'après Fincher *et al.* 1986)

	Proportions		
	Orge	Blé	Riz
Cellulose	2 %	3-4 %	20-30 %
β -glucanes	70-75 %	20-25 %	20-25 %
arabinoxylanes	20-25 %	70-75 %	25-30 %
glucomannanes	2-3 %	5-7 %	10-15 %

La couche à aleurone est composée de trois à quatre assises cellulaires dans le grain d'orge contrairement au blé où elle n'est formée que d'une seule assise (**Figure 4**). Elle est riche en matière azotées et en réserves lipidiques. A maturité, la couche à aleurone entoure l'albumen amylicé et une petite partie de l'embryon. Ces cellules sont morphologiquement distinctes des cellules de l'albumen amylicé et constituent le seul tissu vivant à maturité (Briggs 1998). Au cours de la germination, le scutellum et l'embryon sécrètent des gibbérellines qui induisent notamment la synthèse des enzymes hydrolytiques dans les cellules à aleurone. Au cours de la germination, ces enzymes sont diffusent dans les parois des cellules à aleurone avant de migrer dans l'albumen amylicé. Elles vont intervenir sur la dégradation des polysaccharides pariétaux, les protéines de réserve et l'amidon fournissant ainsi les éléments nutritifs nécessaires au développement de l'embryon (Fincher 1989).

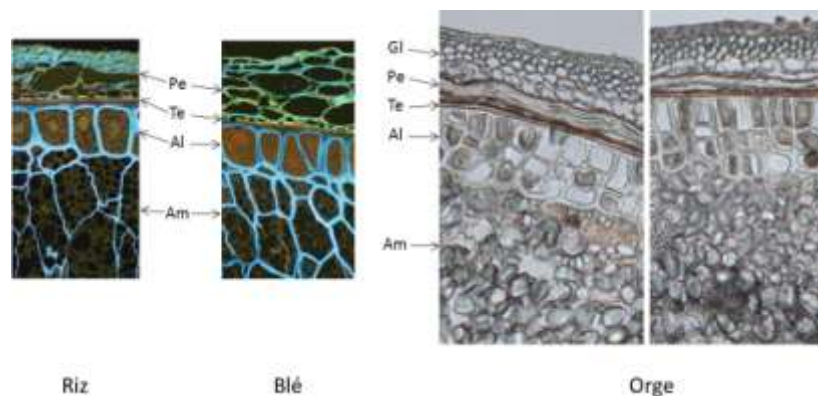


Figure 4. Coupe transversale de grains de riz, de blé et d'orge (D'après Kamal-Eldin *et al.* 2009). Observation par microscopie optique des différents tissus de grains de riz, de blé et d'orge (*INRA Nantes*). Gl = Glumelles; Pe = Péricarpe; Te = Testa; Al = Aleurone; Am = Albumen amylicé

L'albumen amylicé est constitué de cellules "mortes" qui contiennent des grains d'amidon entourés de protéines de réserve, l'ensemble formant une matrice continue. Les parois cellulaires sont principalement composées de β -glucanes et d'arabinoxylanes (polysaccharides pariétaux, **Tableau 2**) (Fincher and Stone 1986; Fincher 1989) qui sont hydrolysés au cours de la germination.

I-2. Les procédés de maltage et brassage : de l'orge à la bière.

I-2-1. Le maltage : de l'orge au malt

Le maltage se décompose en trois grandes étapes : la trempe, la germination et le touraillage (**Figure 5 étapes 1 à 3**). L'objectif du maltage est de produire des enzymes et de

préparer l'albumen pour sa dégradation lors du brassage. L'orge subit donc une germination contrôlée dans la malterie, pour cela plusieurs opérations se succèdent. Tout d'abord les grains d'orge sont nettoyés pour éliminer toutes les impuretés, puis calibrés afin de retirer les grains endommagés et de ne conserver que les grains ayant une taille la plus proche possible de 2,5mm. La trempé fournit ensuite à l'embryon une humidité et une température lui permettant d'initier le processus de germination (Kelly and Briggs 1992, Guillot *et al.* 2008). La germination permet alors au scutellum et à la couche à aleurone de produire les enzymes nécessaires à la modification du grain telles que les β -glucanases, α -amylases, xylanases et les protéases (Fincher 1989). C'est la synthèse de toutes ces enzymes qui permet de transformer l'albumen amylicé afin de le rendre hydrolysable en sucres simples lors du brassage. Les grains sont finalement soumis au touraillage qui consiste à sécher le grain grâce à de l'air chaud jusqu'à éliminer toute activité de développement embryonnaire et de stabiliser le malt. Le grain est également dégermé afin d'éliminer les radicules. Durant cette phase, l'humidité du malt passe de 44-45 % à 3-4 % (Phiarais *et al.* 2005). Suivant la quantité de chaleur apportée lors du touraillage, on obtiendra un malt plus ou moins coloré. Toutes ces étapes permettent d'obtenir un malt dont la texture, la coloration, la flaveur et la composition sont adéquates pour son utilisation en brasserie.

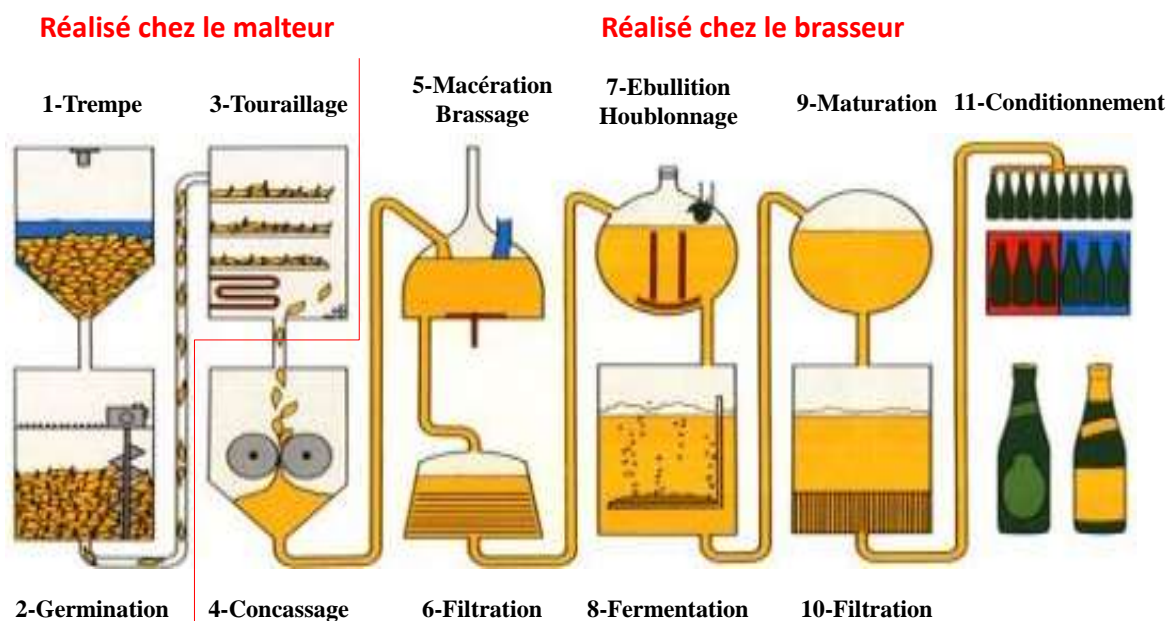


Figure 5. Les différentes étapes du maltage et du brassage

I-2-1-1. La trempe

La trempe est une étape délicate du maltage qui influence considérablement la suite du procédé (Holmberg *et al.* 1997). Cette étape permet à l'embryon d'atteindre une humidité et une température nécessaire pour l'initiation de la germination (Guillot *et al.* 2008). La trempe est généralement réalisée avec une succession de périodes de sous-eau et sous-air (Wentz *et al.* 2004; Wijngaard *et al.* 2005; Tejinder 2007; Bryce *et al.* 2010) qui permettent au grain d'atteindre une humidité d'environ 43-45 % tout en évitant l'anoxie de l'embryon. La trempe permet également d'éliminer en surface du grain les impuretés et les microorganismes mais induit une perte en matières minérales, phénols et autres composés hydrosolubles. La trempe dure généralement entre 1 et 3 jours en fonction de la variété et de l'année de récolte de l'orge. Une trempe comporte deux ou trois sous-eau en fonction de l'efficacité du grain à absorber l'eau. Ces diagrammes de trempe sont régulièrement modifiés pour correspondre aux besoins en hydratation de chaque variété et à chaque récolte. Le dioxyde de carbone dégagé par la respiration du germe est éliminé pour éviter l'asphyxie du grain.

I-2-1-2. La germination

La germination permet de produire un maximum de substrats extractibles (acides aminés, glucides, ...) grâce à la synthèse, la distribution et l'activité des enzymes dans le grain qui provoque la désagrégation de l'albumen. C'est durant cette étape que l'embryon synthétise les gibbérellines qui diffusent dans le grain pour atteindre le scutellum et les cellules de la couche à aleurone (Jones 1973; Lovegrove and Hooley 2000; Ritchie *et al.* 2000; Chen and An 2006). Le scutellum et les cellules de la couche à aleurone produisent alors les différentes enzymes nécessaires à l'hydrolyse de l'amidon (amylases), des protéines (protéases et peptidases) et des parois cellulaires (β -glucanases et xylanases) fournissant les nutriments nécessaires au développement de l'embryon (**Figure 6**). Dans les conditions standard, pour obtenir une désagrégation optimale du grain, la germination dure 4-5 jours à 15-20°C avec éventuellement une brumisation en continu pour maintenir une atmosphère d'environ 95 % d'humidité relative (Tejinder 2007). Le temps de germination est un compromis permettant d'atteindre un niveau suffisant d'hydrolyse des protéines et de biosynthèse des amylases tout en limitant les pertes de réserves par la respiration et la croissance de l'embryon. Le produit obtenu à la fin de la période de germination est appelé malt vert.

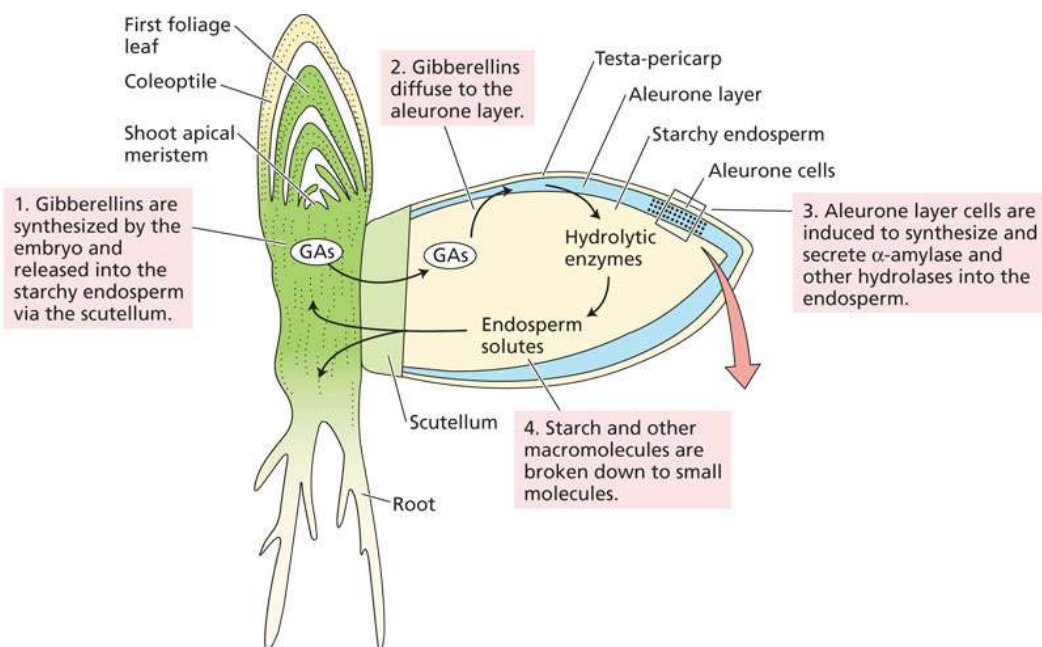


Figure 6. Représentation schématique de la production de gibbérellines et d'enzymes hydrolytiques lors de la germination. (<http://5e.plantphys.net/article.php?ch=0&id=372>)

1-2-1-3. Le touraillage

Le touraillage permet d'arrêter la germination en tuant l'embryon. Cela permet également de réduire l'humidité des grains, d'inactiver les enzymes d'intérêt sans les détruire et de développer l'arôme et la couleur du malt. Le touraillage s'effectue en faisant traverser les couches de grains de malt vert par un courant d'air chaud. Ce courant d'air chaud augmente par paliers de température généralement étalés sur 24 à 48 heures (Aastrup and Erdal 1980; Wentz *et al.* 2004; Tejinder 2007). La qualité de la bière finie dépend d'un contrôle strict du séchage et du "coup de feu" (dernière étape du touraillage). En effet, selon son degré et sa durée, le grain va devenir plus ou moins aromatisé et sa couleur varie du blond pâle au brun foncé voir noir grâce aux réactions de Maillard se produisant dans ces conditions (Coghe *et al.* 2006). Le touraillage se déroule en quatre étapes : l'évaporation de l'eau libre (12 à 22 heures) permet d'évaporer l'humidité en surface. De l'air chaud à 40-60°C entre et ressort saturé à 25-30°C, ce qui fait descendre l'humidité du grain d'orge à 10-15 %. Ensuite, l'évaporation de l'eau liée (10 heures) permet de descendre la teneur en eau des grains à 6 % environ en faisant entrer de l'air à 65-75°C. Le "coup de feu" (4-5 heures) permet d'obtenir une teneur en eau inférieure à 5 % en faisant traverser de l'air chaud. Cet air peut avoir une température de 85°C pour obtenir des malts pâles mais peut monter jusqu'à 180°C pour les

malts les plus foncés (Coghe *et al.* 2006). Enfin le malt sec est refroidi par ventilation avec de l'air froid extérieur ce qui permet de le ramener à 30-35°C.

I-2-1-4. Le dégermage et le stockage du malt

Le maltage terminé, les radicules qui donnent une saveur amère à la bière sont éliminées. Les grains ainsi obtenus forment le malt tel qu'il est stocké pour son utilisation en brasserie. Il faut compter 122kg d'orge issu des champs pour obtenir 100kg de malt fini. Durant le processus de maltage, le grain commence à 12-15 % d'humidité dans les champs puis passe à 42-45 % durant la trempe, taux qui est maintenu durant la germination avant d'être redescendu à moins de 5 % grâce au touraillage dans le malt fini (**Figure 7**) (Angelino 1996). C'est à cette humidité que les grains de malt peuvent être conservés pendant plusieurs mois.



Figure 7. Évolution de l'humidité du grain au cours du procédé de maltage

(www.islayinfo.com/islay_festival_day3.html ; www.cfaitmaison.com/germs/graines3.html ; <http://jg-laurent.com/theorie/maltage.php>)

I-2-2. Le brassage : du malt à la bière

Le malt est la matière première essentielle pour la fabrication de la bière. Sa qualité va influencer la solubilisation au cours du brassage d'une grande quantité de substances issues du grain désagrégé. La fabrication de la bière comprend 7 étapes : la mouture du malt, la macération/brassage, la filtration de la maïsche, l'ébullition du moût, la fermentation, la maturation et la filtration (**Figure 5, étapes 4 à 10**). Ces étapes sont suivies du conditionnement de la bière en vue de sa distribution. Au cours du brassage, un grand nombre d'évènements ont lieu : les composés préformés durant le maltage sont dissous, les enzymes produites durant le maltage transforment l'amidon en sucres fermentescibles, les protéases

continuent d'hydrolyser les protéines de réserve en éléments plus simples (acides aminés, peptides, polypeptides), l'ajout de houblon, ainsi que d'autres produits aromatiques, permet d'introduire des arômes supplémentaires à la bière, et les levures transforment les sucres fermentescibles en alcool.

I-2-2-1. Le concassage et la macération/brassage

L'opération de concassage consiste à broyer les grains de malt en séparant les enveloppes (appelées par la suite drêches) du reste du grain qui est transformé en farine. Le brassage est une étape durant laquelle les brasseurs se servent successivement des différentes enzymes produites ou activées durant le maltage afin d'obtenir les produits nécessaires à la fermentation. Le malt concassé et l'eau sont mélangés dans une cuve (mélange appelé maïsche) : c'est l'empattage. Cette maïsche est ensuite soumise à des paliers de températures successifs qui permettent l'action des enzymes en fonction de leur température optimale d'activité. Les enzymes protéolytiques et les β -glucanases sont les premières à être sollicitées, leur température optimale se situant entre 40 et 50°C (Kettunen *et al.* 1996; Palmer and Agu 1999). La température est ensuite augmentée jusqu'à dépasser la température d'empesage de l'amidon (60°C pour l'orge) tout en restant dans la gamme optimale pour les enzymes de dégradation de l'amidon : entre 60 et 70°C (Ahokas and Manninen 2000; Wijngaard and Arendt 2006). Un dernier palier inactivant la majorité des enzymes est finalement réalisé avant la filtration.

I-2-2-2. La filtration de la maïsche et ébullition du moût

La macération conduit à un liquide (le moût) riche en sucres et en matières azotées assimilables par les levures. La filtration permet d'obtenir ces sucres et matières azotées débarrassées des écorces (glumelles) et des parties d'amande non-solubilisées. C'est pour cette raison que les enveloppes sont conservées lors du concassage car elles vont former, avec tous les résidus solides, les drêches qui ont un rôle de filtration du moût. Après cette filtration, le moût est porté à ébullition et est additionné de houblon. L'ébullition permet d'acquérir une stabilité biologique en stérilisant le moût, la coagulation de protéines, la formation de composés colorés (mélanoïdines) et de composés aromatiques grâce à la réaction de Maillard (Mackie and Slaughter 2002). L'évaporation qui se produit lors de l'ébullition concentre le moût ce qui permet d'obtenir la densité désirée. L'ajout de houblon durant cette étape permet

l'isomérisation des acides α -humolones en acides iso- α -humolones, plus solubles et amers, ce qui permet de développer la qualité organoleptique de la bière (Vaughan *et al.* 2005; Jaskula *et al.* 2009). Le moût est ensuite refroidi pour être dans une gamme de température acceptable pour la levure, aux alentours de 6-15°C en fermentation basse et 18-25°C en fermentation haute.

1-2-2-3. La fermentation, la garde/maturation et la filtration

La fermentation en elle-même est un processus anaérobie et exothermique sous la dépendance de la levure. La fermentation permet de transformer les sucres simples obtenus lors du brassage en alcool et gaz carbonique. Le moût refroidi estensemencé par la levure (du genre *Saccharomyces*), alors appelée "levain". Dans un premier temps elle se multiplie rapidement grâce à l'oxygène présent puis, une fois celui-ci en trop faible quantité, la fermentation alcoolique démarre consommant les sucres fermentescibles présents. Deux types de fermentation sont principalement utilisés : la fermentation haute qui se déroule entre 18 et 25°C pendant 2 à 5 jours, la souche utilisée (*Saccharomyces cerevisiae*) remontant à la surface en fin de fermentation ; et la fermentation basse qui dure 5 à 10 jours entre 6 et 15°C, la souche utilisée (*Saccharomyces uvarum*) floculant dans le fond de la citerne à la fin du cycle.

Après la fermentation, la garde permet d'obtenir les propriétés organoleptiques finales de la bière grâce à une maturation des composés. Durant cette étape, le gaz carbonique est dissous, les matières en suspension (levures, précipités formés par des protéines, des substances amères du houblon, des tannins) décantent, et la flaveur s'affine par élimination de certains composés volatils et par atténuation progressive de l'amertume du houblon. La bière est finalement filtrée avant d'être conditionnée (**Figure 5, étapes 11 et 12**).

La qualité de la bière finie dépend donc des caractéristiques présentées par les malts utilisés lors de sa fabrication, caractéristiques qui dépendent des modifications biochimiques ayant lieu lors du maltage et pouvant avoir un impact tout au long du procédé de fabrication.

I-3. Les grands paramètres biochimiques de la qualité du malt

I-3-1 Les protéines

Les orges brassicoles sont caractérisées par leur taux en protéines et polypeptides de 8 à 11 %.

Les protéines ont un impact tout au long du procédé de fabrication de la bière avec des effets variables. Des études ont suggéré au cours du maltage que les hordéines pouvaient avoir un impact sur la prise d'eau de l'orge, leur accumulation dans la région sub-aleuronique jouant un rôle de barrière à la diffusion de l'eau (Molina-Cano *et al.* 2002). Il a également été montré que des protéines en s'associant à des polyphénols sont responsables du trouble qui peut se former lors des dernières étapes de fabrication de la bière (Siebert 1999; Riverol and Cooney 2003). D'autres études ont montré que la composition en protéines de l'orge varie au cours du process, (Ostergaard *et al.* 2002; Perrocheau *et al.* 2005). En effet, beaucoup de protéines sont éliminées au cours du procédé de fabrication pour finir avec un protéome de la bière majoritairement représentés par deux protéines faisant partie des albumines : la protéine Z et les protéines de transfert de lipides (LTPs) (Marion and Bakan 2009) (**Figure 8**). Ces deux protéines ont également toutes les deux été associées à la stabilisation de la mousse de bière (Evans and Hejgaard 1999; Iimure *et al.* 2008).

La protéine Z fait partie de la famille des serpin (**serine protease inhibitor**). Quatre isoformes sont présentes dans l'orge avec une masse moléculaire d'environ 40kDa. Elles représentent 5 % des albumines de l'orge et leur concentration dans la bière peut atteindre 170mg/L (Mills *et al.* 1998; Steiner *et al.* 2011). Bobalova *et al.* (Bobálová *et al.* 2010) ont montré que cette protéine est glucosylée à partir du deuxième jour de maltage, vraisemblablement grâce à la réaction de Maillard, ce qui modifie ses propriétés physiques et contribue probablement à son rôle dans la stabilité de la mousse. De plus, durant l'ébullition du moût une grande partie des protéines issues du malt précipitent ce qui permet alors d'augmenter les proportions de protéine Z et de LTP1 dans la bière (Perrocheau *et al.* 2006).

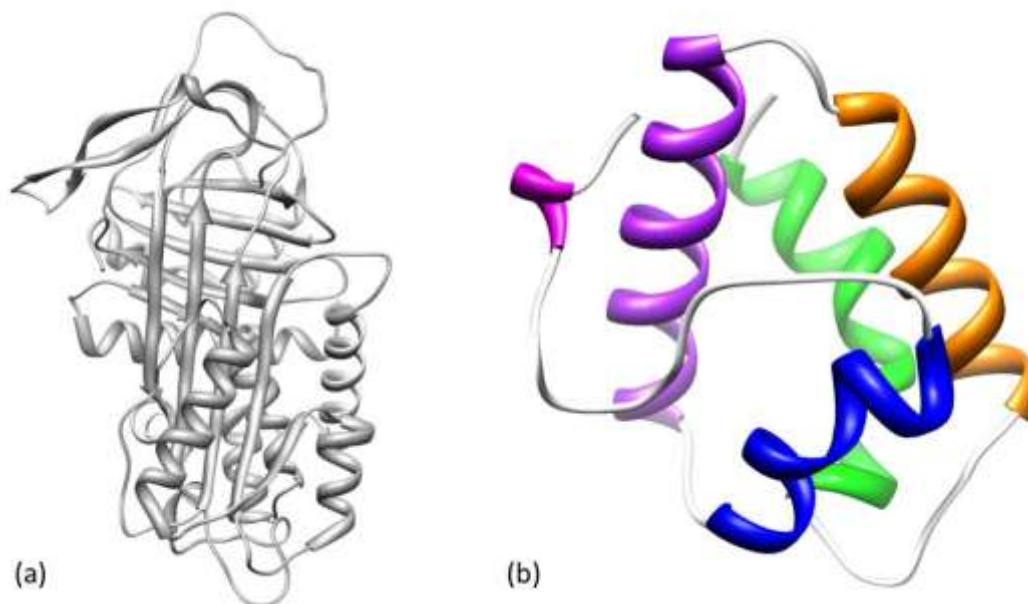


Figure 8. Structure des protéines majoritaires de la bière.

(a) Protéine Z (structure de la serpin α 1-antitrypsin homologue, entrée pdb 1QLP ; Elliott *et al.* 2000).
 (b) LTP1 d'orge (entrée pdb P07597 ; Heinemann 1996).

Parmi les LTP d'orge, deux familles principales, présentant des masses moléculaires différentes, peuvent être isolées. La nsLTP1 (non-specific LTP1) a une masse de 9kDa environ, tandis que la nsLTP2 a une masse de 7kDa environ. Dans le grain d'orge, à la fois la LTP1 et la LTP2 ont été isolées (Skriver *et al.* 1992; Kalla *et al.* 1994), mais seule la LTP1 semble présenter une forte importance pour la fabrication de la bière (Iimure *et al.* 2008; Steiner *et al.* 2011). En effet, la quantité de LTP2 est dix fois inférieure à celle de la LTP1 dans la bière (Jegou *et al.* 2000). En technologie alimentaire, les nsLTP1 ont été principalement étudiées pour deux raisons : ce sont des protéines ayant un fort potentiel allergène (Marion *et al.* 2004; Palacin *et al.* 2009; Zoccatelli *et al.* 2010), et la LTP1 d'orge représente 50 % des protéines solubles de la bière où elle présente des caractéristiques favorisant la stabilité de la mousse (Evans and Hejgaard 1999; Jegou *et al.* 2000; Gorjanovic 2007; Okada *et al.* 2008; Steiner *et al.* 2011).

Les nsLTPs comportent toutes huit résidus cystéine très conservés qui sont toujours impliqués dans des ponts disulfure intramoléculaires dont les connexions sont strictement conservées (**Figure 9**).

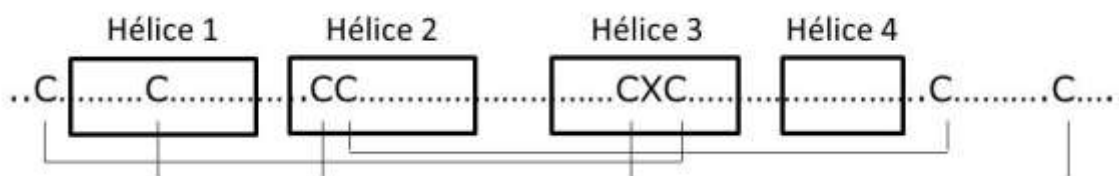


Figure 9. Distribution et liaisons des cystéines dans la séquence primaire des nsLTP1. La distribution des hélices est indiquée par des rectangles. (D'après Douliez *et al.* 2000) ; C = résidu cystéine ; X = résidu autre que cystéine

La structure de la LTP1 d'orge a été déterminée en 1996 (Heinemann *et al.* 1996). Cette protéine comprend quatre hélices α et des coudes ainsi qu'un début d'hélice 3_{10} à l'extrémité C-terminale. Le repliement est stabilisé par quatre ponts disulfures qui entraînent la présence d'une cavité hydrophobe au sein de la protéine (**Figure 10a**). La surface de ce tunnel est composée d'acides aminés hydrophobes qui offrent un site de liaison potentiel pour les ligands hydrophobes ou amphiphiles tels que les lipides (**Figure 10b**) (Lerche *et al.* 1997; Bakan *et al.* 2006; Bakan *et al.* 2009).

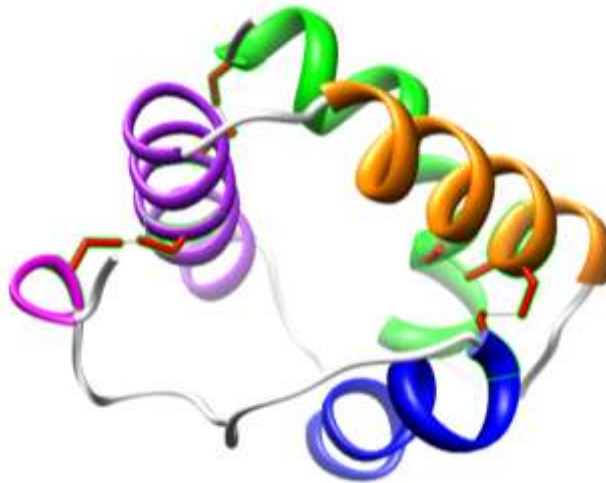
Contrairement à la protéine Z, les modifications que subit la LTP1 au cours du maltage ont été décrites (Douliez *et al.* 2000; Gorjanovic 2007; Gorjanovic 2010). En effet, la LTP1 native ne possède pas les caractéristiques pro-mousse recherchées par les brasseurs (Sørensen *et al.* 1993), c'est au cours du procédé de fabrication du malt et de la bière que la LTP1 subit diverses modifications lui donnant ces caractéristiques. Cette protéine peut ainsi subir des acylations (**Figure 11**) (Bakan *et al.* 2006), des glucosylations grâce à la réaction de Maillard (Jégou *et al.* 2001) ayant lieu principalement au niveau des résidus lysine de sa chaîne polypeptidique (Chmelik *et al.* 2009), des oxydations et être dénaturée. Toutes ces modifications de la LTP1 participent à l'augmentation de ses propriétés pro-mousse. Ces changements structuraux apparaissant au cours du procédé de maltage (touraillage), sont en fait des marqueurs pertinents permettant d'apprécier les modifications des protéines durant le maltage et le brassage (Gorjanovic 2007).

I-3-2 Les polysaccharides pariétaux

Dans l'orge, les polysaccharides pariétaux sont principalement constitués d'arabinoxylanes et de β -glucanes. Ces polymères sont principalement retrouvés dans les parois cellulaires des différents tissus du grain et sont en proportions différentes en fonction du tissu observé. Dans les parois des cellules à aleurone, on retrouve la proportion

arabinoxylanes / β -(1-3)(1-4)-glucanes de 70 %/25 % . Ces proportions sont inversées dans l'albumen amylicé (20 %/75 %).

a



b

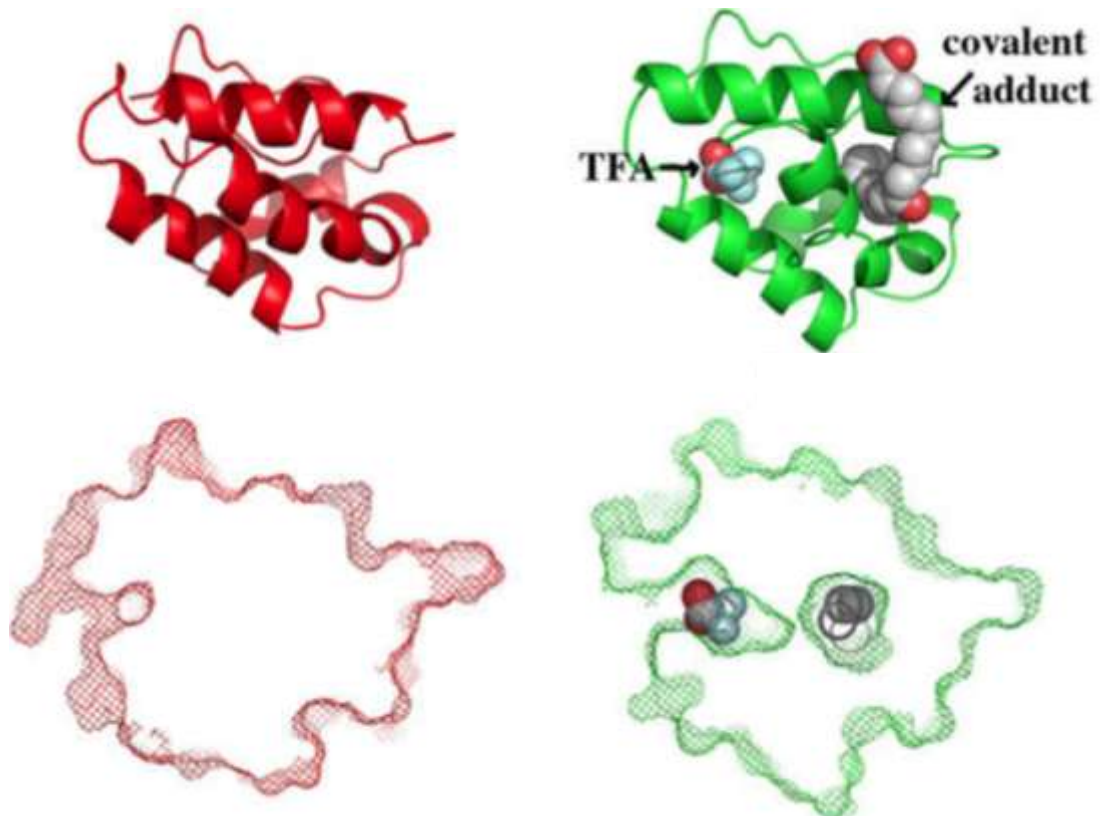


Figure 10. Structure de la LTP1 d'orge.

(a) Structure de la LTP1 native avec hélices et résidus cystéines avec leurs chaînes latérales mis en évidence (hélices colorées de différentes couleurs, chaînes latérales des cystéines en rouge et ponts disulfures en noir). (b) Structure de la LTP native (rouge) et de la LTP avec un adduit lipidique (vert) avec une représentation transversale en dessous (D'après Bakan *et al.* 2009). La molécule de TFA est un artefact de cristallisation. TFA = acide trifluoroacétique.

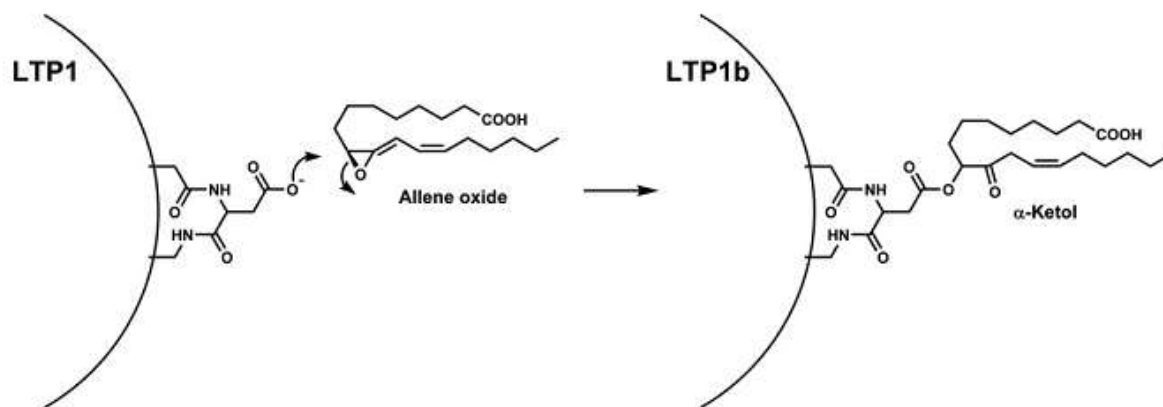


Figure 11. Acylation de la LTP1 lors du maltage.

Attaque nucléophile du groupement époxyde par la fonction carboxylique de la chaîne latérale de l'asparagine 7 de la LTP1 d'orge. (D'après Bakan *et al.* 2006) ; LTP1b = LTP1 acylée

Les arabinoxylanes sont des enchaînements de xylanes liés par des liaisons β -(1-4) avec des unités arabinose branchées en α -(1-2) et α -(1-3) pouvant elles même être reliées à de l'acide férulique (Sungurtas *et al.* 2004) (**Figure 12**). Cet enchaînement de pentoses est à l'origine de leur appellation commune dite de pentosanes. Ces polysaccharides ont été associés à des problèmes de filtration et de viscosité lors du procédé de fabrication de la bière (Sadosky *et al.* 2002), notamment lorsque des oligomères solubles de grande taille sont retrouvés (Sadosky *et al.* 2002). Il faut néanmoins remarquer que les xylanases (enzymes dégradant les arabinoxylanes) sont produites tardivement lors de la germination du grain d'orge en comparaison d'autres enzymes telles que les β -glucanases (Slade *et al.* 1989; Sungurtas *et al.* 2004), et ces arabinoxylanes sont peu présents dans l'albumen amylicé. C'est pour ces deux raisons que la dégradation des pentosanes a été peu étudiée comparée à celle des β -glucanes. En effet, lors d'un maltage classique comportant 5 jours de germination, les xylanases ne sont actives que peu de temps à cause de cette synthèse tardive.

Les β -glucanes sont des enchaînements de glucose. Il existe 3 formes de β -glucanes : des β -(1-3)-glucanes et des β -(1-4)-glucanes qui sont uniquement reliés entre eux par des liaisons β -(1-3) ou β -(1-4) respectivement. La troisième forme de β -glucanes, majoritaire dans le grain d'orge, est constitué de liaisons β -(1-3) et β -(1-4) (Fincher and Stone 1986). L'organisation de ces β -(1-3)(1-4)-glucanes suit généralement l'enchaînement suivant : 2 ou 3 liaisons β -(1-4) entre 2 liaisons β -(1-3). Ces enchaînements représentent environ 85 % des β -(1-3)(1-4)-glucanes (Edney *et al.* 1991). Des blocs plus longs ainsi que des enchaînements de liaisons β -(1-3) ont été observés mais plus rarement (Fleming and Kawakami 1977).

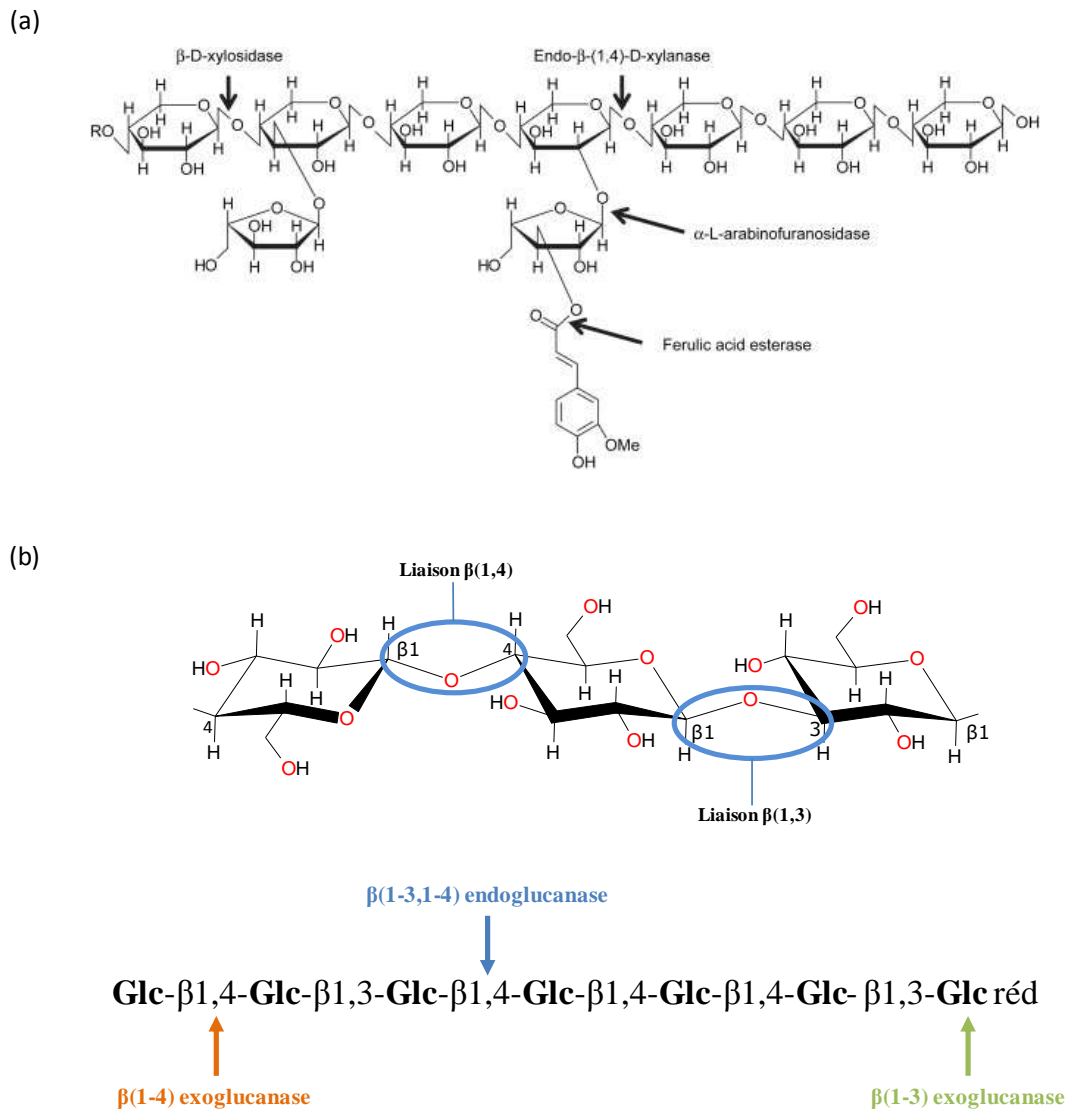


Figure 12. Structure des arabinoxylanes et β -glucanes des parois des cellules à aleurone et de l'albumen.

(a) Arabinoxylanes. (b) β -(1,3)(1,4)-glucanes. Les sites d'hydrolyse des différentes enzymes sont indiqués. (D'après Dornez *et al.* 2009)

Comme pour les arabinoxylanes, ces β -glucanes ont un impact sur la filtration et la viscosité lors de la fabrication de la bière (Bathgate 1983; Sadosky *et al.* 2002). Cependant, compte tenu de l'abondance des β -glucanes, la viscosité a principalement été corrélée à l'hydrolyse de ces polysaccharides. Du fait de l'abondance de ces β -glucanes dans les parois de l'albumen amyacé sous forme de "maillage" (**Figure 13**), il a également été montré un lien entre la friabilité du malt et la dégradation des β -glucanes (Wentz *et al.* 2004; Gianinetti 2009). C'est pourquoi ces β -glucanes ont beaucoup été étudié en rapport avec leur influence sur la qualité du malt (Aastrup and Erdal 1980; Bathgate 1983; Chandra *et al.* 1999). Ces β -glucanes sont hydrolysés par les β -glucanases au cours du maltage du grain d'orge, principalement pendant

les trois premiers jours de germination (Ellis *et al.* 1997; Sungurtas *et al.* 2004; Ferrari *et al.* 2010). Dans le grain d'orge il existe trois familles de β -glucanases (Ballance *et al.* 1976; Stuart and Fincher 1983), la β -(1-3)-glucanase, la β -(1-3)(1-4)-glucanase et la β -(1-4)-glucanase qui sont respectivement spécifiques des polymères de β -(1-3)-glucanes, β -(1-3)(1-4)-glucanes et β -(1-4)-glucanes, la β -(1-4)-glucanase étant également capable d'hydrolyser les enchaînements de liaison β -(1-4) au sein des β -(1-3)(1-4)-glucanes (Hoj and Fincher 1995). Les β -glucanes pouvant entraîner des problèmes de filtration et de viscosité des mouts s'ils ne sont pas correctement hydrolysés durant le maltage ; ces polysaccharides pariétaux et les enzymes de dégradation qui leur sont associés sont fréquemment étudiés lors des analyses de qualité d'un malt (Ayoub and Mather 2002; Woonton *et al.* 2005; Havlova *et al.* 2006; Guido *et al.* 2007; Munoz-Amatriain *et al.* 2010).

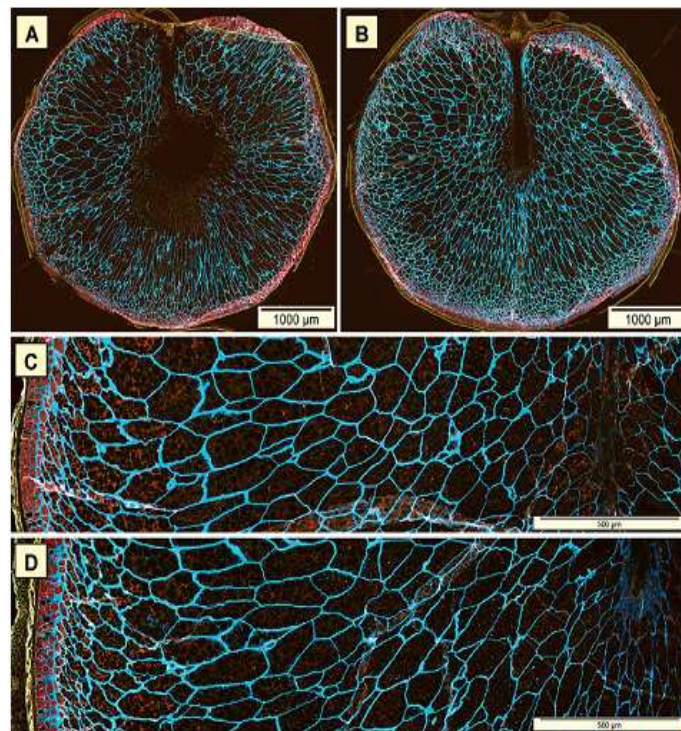


Figure 13. Images de microscopie de sections transversales d'orge.

(A–D) Coloration avec Fuschin acide et Calcofluor pour montrer les protéines (rouge) et les parois cellulaires (bleu clair). (A) variété 1B Barke 2001; (B) variété 3B Scarlett 2002; (C) variété 3A Scarlett; (D) variété 3B Scarlett 2002. (D'après Holopainen *et al.* 2005)

I-3-3 L'amidon

L'amidon est le constituant majoritaire de l'orge, il représente plus de 60 % du poids du grain d'orge. On distingue deux types de granules d'amidon : les gros et les petits granules d'amidon (10-25 μ m et 1-5 μ m de diamètre respectivement). Les gros granules d'amidon

représentent seulement 10 % du nombre de granules d'amidon mais 90 % du poids total d'amidon. Ils ont un diamètre compris entre 10 et 25 μ m et une température de gélatinisation de 61-62°C. Les petits granules représentent 90 % du nombre de granules mais seulement 10 % du poids total d'amidon. Ils ont un diamètre compris entre 1 et 5 μ m et une température de gélatinisation de 75-80°C (Henry 1988). C'est cette grande quantité d'amidon comportant une température de gélatinisation faible qui fait de l'orge une céréale intéressante pour le brassage (MacGregor *et al.* 1999). L'amidon de l'orge est constitué à 25 % d'amylose et à 75 % d'amylopectine. L'amylose est un polymère linéaire de 500 à 2500 unités de glucose liées par des liaisons α -1-4. L'amylopectine est quant à elle une chaîne ramifiée de 10 000 à 100 000 unités de glucose liées par des liaisons α -1-4 et α -1-6, les chaînes comportant de 20 à 25 unités de glucose entre chaque ramification (**Figure 14**). Les levures ne possédant pas les enzymes nécessaires pour utiliser directement cet amidon ramifié pour effectuer la fermentation (MacGregor *et al.* 1999), la production des enzymes de dégradation de l'amidon de l'orge est essentielle durant le maltage.

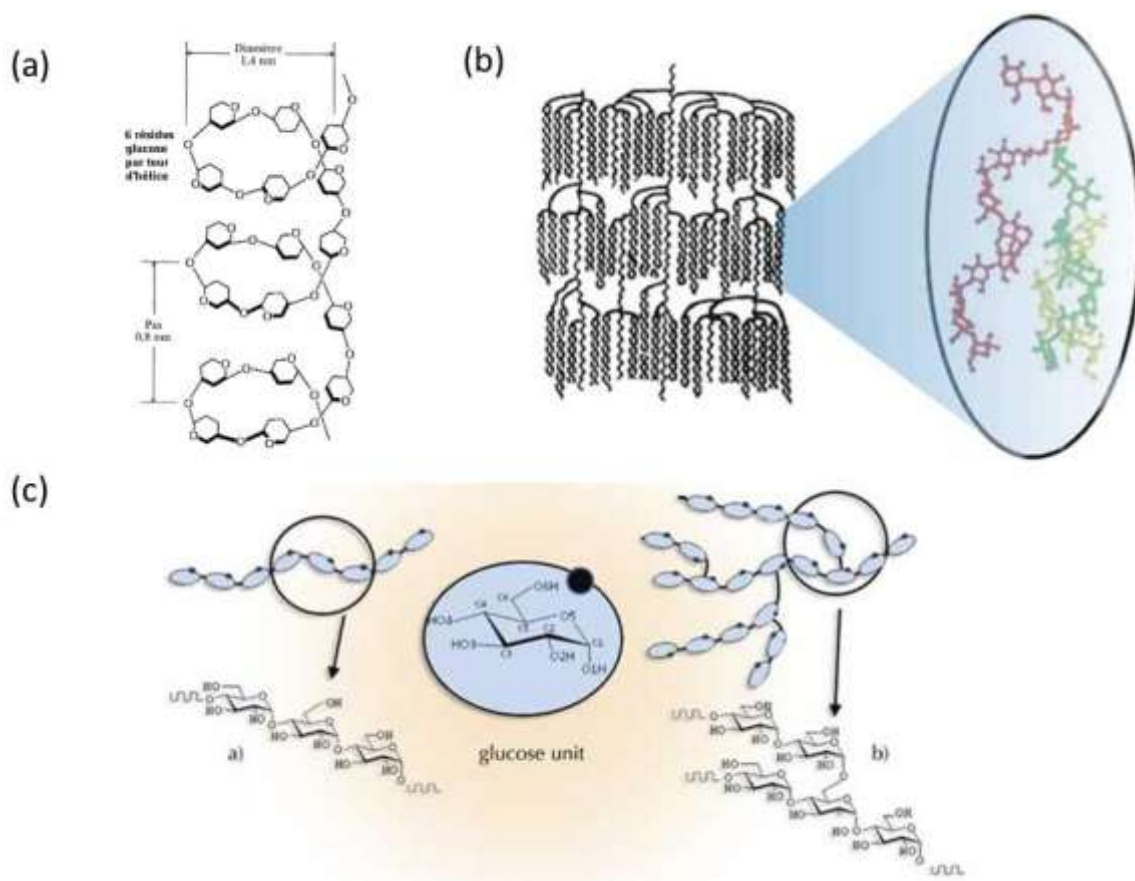


Figure 14. Structure de l'amidon.

(a) Amylose. (b) Amylopectine avec une représentation de l'enchevêtrement possible entre amylose (rouge) et des chaînes d'amylopectine (vert et jaune). (c) Autre représentation de ces deux polymères. (Schémas issus de scienceinschool.org/)

Quatre enzymes de dégradation de l'amidon sont présentes dans le grain d'orge : l' α -glucosidase, la dextrinase limite, la β -amylase et l' α -amylase (**Figure 15**). Parmi ces enzymes, celles responsables de la majeure partie de l'hydrolyse de l'amidon lors du brassage sont les α -amylases (Macgregor 1987; MacGregor *et al.* 1999). En effet, les β -amylases et la dextrinase limite sont très sensibles à la température et commencent à être inactivées à la température de gélatinisation de l'amidon (Macgregor 1987). L' α -glucosidase est également thermo-sensible et a été caractérisée comme secondaire dans la dégradation de l'amidon comparé à l' α -amylase (MacGregor *et al.* 1999; Muslin *et al.* 2000; Bamforth 2009).

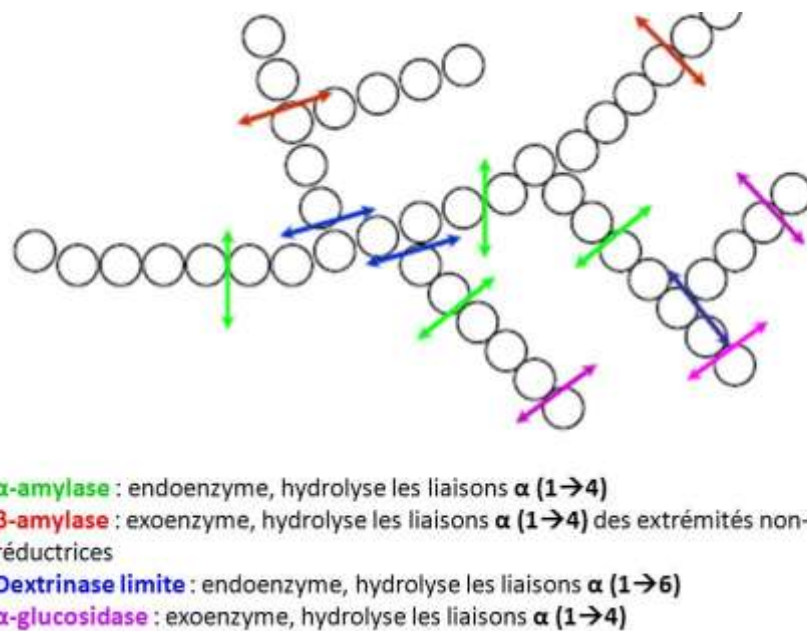


Figure 15. Site d'action des enzymes de dégradation de l'amidon.

Le site de coupure des enzymes sont représentés par des flèches de la même couleur que l'enzyme.

Au cours du brassage, les α -amylases sont donc les dernières enzymes à rester actives, elles permettent l'obtention des sucres fermentescibles et des dextrans. Il existe pour l'orge 10 gènes codant pour des α -amylases qui peuvent être répartis en deux catégories : des α -amylases ayant un faible pI, aux alentours de 4,6 (AMY1) et d'autres ayant un pI plus élevé, aux alentours de 5,9 (AMY2). Les α -amylases sont des endohydrolases qui clivent les liaisons de type α -(1 \rightarrow 4) de l'amylose ou de l'amylopectine de façon aléatoire. Ne pouvant hydrolyser les liaisons α -(1 \rightarrow 6), elles sont moins efficaces sur les liaisons α -(1 \rightarrow 4) proches de ces liaisons. La production d' α -amylase a lieu seulement lors de la germination du grain d'orge (Ostergaard *et al.* 2002), environ trois à quatre jours après l'imbibition (Jones 1973). Dans le cas du maltage, AMY2 résiste en grande partie au tourailage alors qu'AMY1 est en partie

inactivée (Macgregor 1987). La proportion de chacun des 2 isoformes varie en fonction de la variété et du temps de germination, mais AMY2 reste toujours la forme majoritaire avec une proportion supérieure à 90 % du total des α -amylases (Macgregor 1987). AMY2 est l'isoforme la plus active pour hydrolyser l'amylose (MacGregor 1992; Oudjeriouat *et al.* 2003). L' α -amylase est donc une enzyme qui doit être produite durant le maltage, c'est donc un bon marqueur de la qualité d'un malt pour le potentiel de dégradation de l'amidon lors du brassage.

I-4. Les questions liées à un maltage à faible hydratation

Le maltage à faible hydratation consiste à modifier le diagramme de trempage sans affecter la qualité du malt. Dans le cas du maltage à faible hydratation, deux principaux problèmes peuvent éventuellement se poser : la diffusion de l'eau lors de la trempage et le déroulement de la germination.

I-4-1 La diffusion de l'eau dans le grain : rôle des cutines et cires.

Toutes les parties aériennes (feuilles, fruits ou pétales) des plantes supérieures et de certaines bryophytes sont couvertes par une structure continue extracellulaire appelée cuticule ou membrane cuticulaire. Les rôles attribués aux assises cuticulaires sont la protection contre les pathogènes (Schweizer *et al.* 1996; Zabka *et al.* 2008), la prévention de fusion d'organes et de fait la morphogenèse (Sieber *et al.* 2000) mais également la protection contre la dessiccation (Riederer and Schreiber 2001). En effet, ces assises cuticulaires constituent une barrière hydrophobe, qui va limiter l'approvisionnement en eau du grain lors de la trempage (**Figure 16**) (Ishida *et al.* 1995; Gruwel *et al.* 2001; Molina-Cano *et al.* 2002; Ghosh *et al.* 2009) mais va également limiter les pertes d'eau du grain lors de la germination. La cuticule est très variable en composition, épaisseur (de 0,02 à 20 μ m) et structure en fonction du végétal, de l'organe et du stade de développement où on l'étudie (Jeffree 1996). Généralement, elle peut être décomposée en deux parties distinctes : la cutine qui est un polymère d'acides gras hydroxylés et époxydés en C16 et C18 estérifiés et de glycérol, et les cires qui consistent en séries homologues d'acides gras, alcools, aldéhydes, alcanes, cétones et esters comportant un grand nombre de carbones (typiquement entre 24 et 34) (Kunst and Samuels 2003). Ces cires pouvant se présenter sous une forme épicuticulaire (à la surface de la couche hydrophobe) ou intracuticulaire (imbriquées dans la cutine).

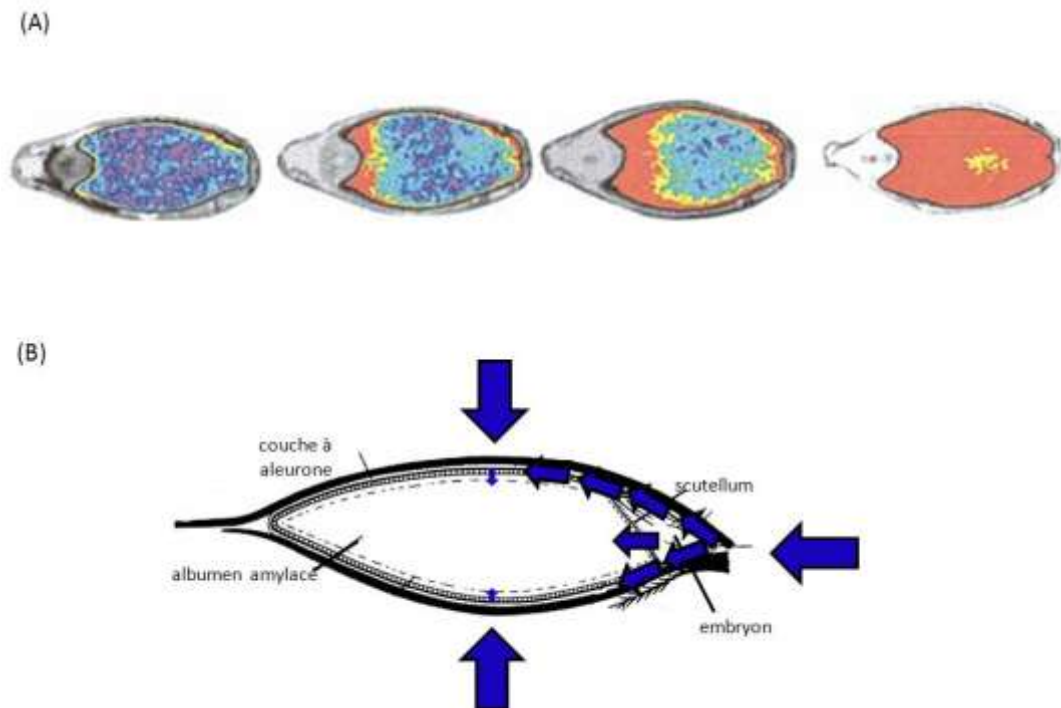


Figure 16. Diffusion de l'eau dans le grain d'orge.

(A) Diffusion de l'eau au cours de la trempe d'un grain d'orge, de gauche à droite après 1h, 12h, 24h et 48h. (D'après Molina-Cano *et al.* 2002). (B) Schémas de diffusion de l'eau dans le grain d'orge en cours de trempe. Les flèches bleues représentent le passage de l'eau.

I-4-1-1 La cutine

La cutine est principalement composée de deux familles d'acides gras hydroxylés et époxydés issus des acides gras cellulaires courants que sont les acides gras en C16 et en C18 (Kolattukudy 1996) (**Figure 17a**). C'est par l'intermédiaire des groupements hydroxyles que ces acides gras sont polymérisés, les groupements en bout de chaîne et le glycérol permettant d'augmenter le polymère linéairement (Graça *et al.* 2002), tandis que les groupements placés en milieu de chaîne permettent les liaisons inter-polymères créant un réseau tridimensionnel (Stark *et al.* 2000) (**Figure 17b**). Dans les cutines riches en C16, ce sont généralement les acides 16-hydroxy- et 10,16-dihydroxyhexadécanoïques qui sont les plus représentés, tandis que dans les cutines riches en C18 on retrouve principalement les acides 9,10,18-trihydroxy- et 9,10-époxy-18-hydroxyoctadécanoïques ainsi que les alcènes correspondants. Les cutines des feuilles et fruits ont beaucoup été étudiées (Holloway and Brown Deas 1973; Briggs and Macdonald 1983; Schweizer *et al.* 1996; Richardson *et al.* 2007a) pour de nombreux végétaux, en revanche les cutines de grains ont été peu étudiées (Molina *et al.* 2006). Ces cutines associées aux cires permettent une protection mécanique et chimique, agissent comme une barrière contre les échanges de gaz et d'eau (Briggs and Macdonald 1983). Les seules

informations dont on dispose sur la composition de la cutine de blé (Matzke and Riederer 1990) ou d'orge (Espelie *et al.* 1979), indiquent une composition riche en acides gras C18 dont les composés majoritaires seraient par ordre d'abondance l'acide 9,10-époxy-18-hydroxyoctadécanoïque (18OHépoxyC18:0), l'acide dihydroxyhexadécanoïque (diOHC16:0) et l'acide 18-hydroxyoctadécenoïque (18OHC18:1).

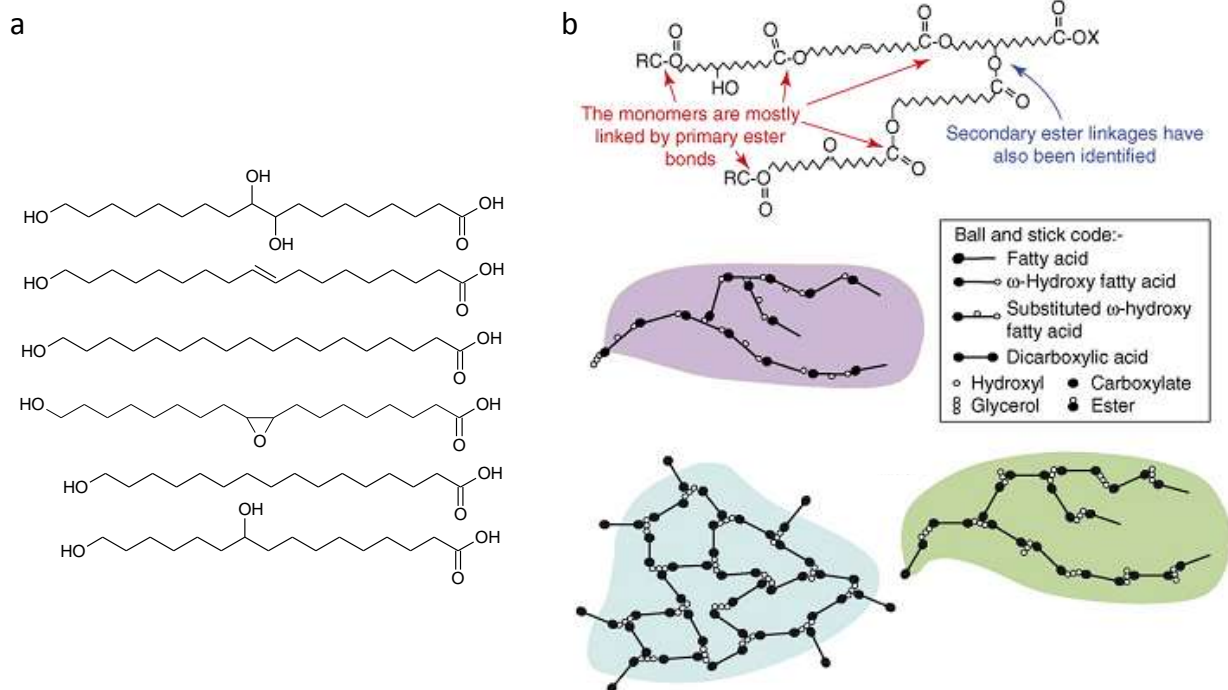


Figure 17. Structure et organisation des monomères de cutines.

(a) Structures des principaux acides gras hydroxylés retrouvés dans les cutines. De haut en bas : acide 9,10,18 trihydroxy-octadécanoïque ; acide 18 hydroxy-octadécenoïque ; acide 18 hydroxy-octadécanoïque ; acide 18 hydroxy-9-époxy-octadécanoïque ; acide 16 hydroxy-hexadécanoïque ; acide 10,16 dihydroxy-hexadécanoïque. (b) Organisation des monomères de cutines pour former un réseau *via* des liaisons esters entre eux et avec du glycérol. (D'après Pollard *et al.* 2008)

1-4-1-2 Les cires

Les cires représentent de 20 à 60 % de la masse totale de cuticule (Samuels *et al.* 2008). Elles sont composées d'un large spectre de molécules comme les composés aliphatiques à longue chaîne (20 à 40 atomes de carbone) avec notamment les alcanes et alcools fortement représentés (Jetter 2000; Aharoni *et al.* 2004), les triterpénoïdes, les stérols ainsi que les flavonoïdes (Kunst and Samuels 2003). La composition de cires peut facilement atteindre la centaine de molécules différentes avec des proportions qui sont spécifiques à chaque plante ce qui rend difficile une analyse exhaustive des cuticules. Les cires ont néanmoins beaucoup été étudiées (Jetter 2000; Von Wettstein-Knowles 2007; Wen and Jetter

2007) car elles renforcent l'imperméabilisation à l'eau des cuticules (Aharoni *et al.* 2004; Richardson *et al.* 2007b). Comme la cutine, les cires sont synthétisées par les cellules épidermales, en revanche la majeure partie des cires ne seraient déposées à la surface de la cutine qu'après la fin de l'élongation cellulaire comme semble le montrer les observations sur les feuilles d'orge (Richardson *et al.* 2007b).

I-4-2 Points clés de la germination

La germination est une étape importante du maltage, car les enzymes de dégradation de l'amidon et des polysaccharides pariétaux doivent être produites. Il faut également que ces enzymes diffusent de leur lieu de synthèse vers leur lieu d'action. Par ailleurs, ces enzymes requièrent une activité de l'eau et humidité au dessus de 20% pour pouvoir être actives (Multon 1982). De plus, il a été montré que la LTP1 d'orge doit diffuser de son lieu de synthèse vers l'albumen amylicé pour être glucosylée (Jégou *et al.* 2001; Chmelik *et al.* 2009). Ces deux processus peuvent être influencés par un maltage à faible hydratation. Ces caractéristiques doivent donc être prises en compte dans l'étude d'un tel changement de procédé.

Les α -amylases sont produites *de novo* dans le grain d'orge au cours de germination. C'est la synthèse de gibbérellines par l'embryon et la diffusion de ces hormones dans les cellules de la couche à aleurone et du scutellum qui va déclencher cette synthèse. La plus grande partie des α -amylases est produites dans la couche à aleurone et le scutellum avec une plus grande proportion de AMY2 que de AMY1 (Macgregor *et al.* 1984; Macgregor 1987; Fincher 1989), une petite quantité étant également produite dans l'embryon. L' α -amylase étant produite tardivement elle ne diffuse que très peu dans l'albumen amylicé lors du maltage.

Pour les β -(1-3)(1-4)-glucanases, deux isoenzymes (EI et EII) sont présents dans le grain d'orge. EI possède un pI de 8,5 et est produit dans les cellules à aleurone ainsi que dans le scutellum. EII possède un pI de 10,6 et n'est exprimé que dans les cellules à aleurone (Stuart *et al.* 1986; Slakeski and Fincher 1992).

Ces β -glucanases sont produites rapidement après le début de la germination ce qui permet aux autres enzymes d'avoir accès à leur substrat (Jones 1973; Chandra *et al.* 1999). Elles doivent donc diffuser de leur lieu de synthèse (aleurone et scutellum) vers l'albumen amylicé rapidement au cours de la germination du grain d'orge. Bien que les deux isoenzymes soit thermosensibles, l'isoenzyme EII est plus stable et environ 35 % de l'activité β -glucanase est maintenue après touraillage (Fincher and Stone 1986).

La LTP1 d'orge est synthétisée dans les cellules à aleurone de l'albumen (Skriver *et al.* 1992). Or lors de la germination, elle doit diffuser vers l'albumen amylicé pour être en contact avec les sucres simples permettant la glycation qui accroît ses caractéristiques pro-mousse. En effet, c'est dans l'albumen amylicé que les β -glucanes des parois sont fortement dégradés libérant du glucose et dans une moindre mesure l'hydrolyse de l'amidon va débiter libérant également des sucres simples.

Chapitre II. Le maltage à faible hydratation influence-t-il la diffusion des enzymes ?

II-1 Introduction

Pour déterminer la qualité d'un malt, de nombreux critères sont classiquement analysés par les malteurs et brasseurs : la friabilité (Guido *et al.* 2007; Laitila *et al.* 2007; Psota *et al.* 2007; Bryce *et al.* 2010) mesure le degré de préparation atteint par le grain pour s'effriter lors du concassage ; la viscosité et la filtration du moût obtenues à partir de malt (Woonton *et al.* 2005; Guido *et al.* 2007; Laitila *et al.* 2007; Gawrysiak-Witulska *et al.* 2008; Bryce *et al.* 2010) est une mesure de la libération des oligomères glucidiques lors de la désagrégation des parois de l'albumen amylicé ; l'extrait de matière sèche (Holopainen *et al.* 2005) à partir du moût qui permet d'estimer la quantité de matériel qui sera utilisable pour le brassage ; la quantité de β -glucanes solubles ou totaux (Ayoub and Mather 2002; Havlova *et al.* 2006; Guido *et al.* 2007) est représentative de la désagrégation des parois de l'albumen amylicé et qui peut être en partie responsable de la viscosité et les activités des α -amylases, β -amylases, β -glucanases ainsi que le pouvoir diastasique (Woonton *et al.* 2005; Munoz-Amatriain *et al.* 2010; Siwela *et al.* 2010) donnent des informations sur la productions des enzymes nécessaires au bon déroulement du maltage et du brassage. Ces mesures d'activité enzymatiques sont importantes car elles doivent agir à des moments bien précis du maltage et brassage pour que le procédé de fabrication se déroule normalement : les β -glucanases doivent être synthétisées rapidement durant le maltage pour agir avant la fin de la germination (Fincher 1989; Gianinetti 2009) tandis que les amylases doivent être synthétisées durant la germination pour être disponibles lors du brassage.

Afin d'étudier l'impact du maltage à faible hydratation sur l'action des enzymes, l' α -amylase 2 et les β -glucanases ont été choisies comme marqueurs de la diffusion des enzymes. En effet, les β -glucanes représentent environ 75 % des polysaccharides pariétaux de l'albumen amylicé (Fincher and Stone 1986; Meikle *et al.* 1994) et leur dégradation est particulièrement importante pour obtenir un malt de qualité (Bamforth and Martin 1981; Fincher and Stone 1986). Lorsque les β -glucanes sont insuffisamment dégradés, ils induisent une diminution de la friabilité du malt obtenu (Noots *et al.* 2001; Wijngaard *et al.* 2005; Ferrari *et al.* 2010) et une augmentation de la viscosité du moût lors du brassage (Papageorgiou *et al.* 2005; Edney *et al.* 2007) ce qui pose des problèmes lors de la filtration de ce moût. De plus, la dégradation de ces β -glucanes et plus largement de ces parois de l'albumen amylicé est nécessaire à la diffusion ultérieure des autres enzymes telles que les α et β -amylases afin qu'elles puissent atteindre leur substrat (Fincher 1989; Gianinetti 2009) qui se trouve dans les cellules de

l'albumen amylicé. L'ensemble de ces répercussions induites par la bonne ou mauvaise dégradation des β -glucanes fait des β -glucanases un bon marqueur de l'efficacité du maltage.

L' α -amylase a été choisie comme marqueur pour son rôle déterminant durant le brassage puisqu'elle permet l'obtention des sucres simples fermentescibles. La synthèse de l' α -amylase est plus tardive que celle des β -glucanes et n'est observable qu'à partir de 2-3 jours de germination (Macgregor *et al.* 1984; Bak-Jensen *et al.* 2007; Finnie and Svensson 2009). C'est durant le brassage que l' α -amylase est active sur l'amidon, cette enzyme n'ayant pas le temps d'agir lors du maltage. L' α -amylase comporte deux isoformes, AMY1 et AMY2. L'isoforme AMY2 représente environ 90 % de l' α -amylase totale produit durant les premiers jours de la germination (Macgregor 1987; Bak-Jensen *et al.* 2007) et c'est également l'isoforme le plus résistant au tourailage puisqu'il contribue à 90-95 % de l'activité α -amylasique dans l'orge maltée (Macgregor 1987). L'action de cette enzyme peut être étudiée en observant la dégradation des grains d'amidons. Parmi les différentes techniques disponibles, certaines permettent d'identifier les grains d'amidons physiquement endommagés (partiellement dégradés par des enzymes ou mécaniquement) alors que certaines autres distinguent les grains d'amidons empesés ou dont l'organisation interne cristalline/amorphe est modifiée. La première technique consiste à colorer successivement les grains d'amidons avec de la safranine O puis avec du bleu de Niagara (Baker and Hobson 1952). La deuxième technique utilise les propriétés physiques des grains d'amidons qui lors de leur observation en lumière polarisée présentent une croix de Malte lorsqu'ils sont natifs (**Figure 18**).

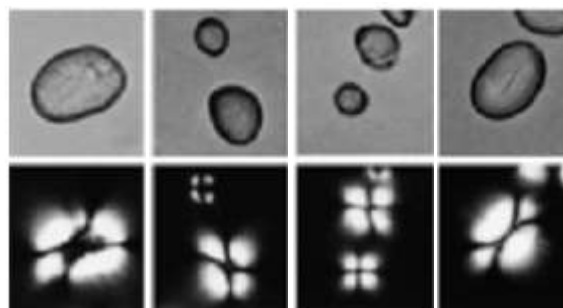


Figure 18. Grains d'amidon de pois.

Grains d'amidon de pois observés par microscopie optique en lumière visible (ligne du haut) et polarisée (ligne du bas). (D'après Hedley *et al.* 2002).

L'objectif de cette étude était de déterminer les effets d'un maltage à faible hydratation sur la diffusion de ces deux enzymes clés du maltage. Pour cela, les caractéristiques de malts obtenus à faible (38 %) ou forte (45 %) hydratation ont été comparées, et l'analyse de deux marqueurs que sont l' α -amylase AMY2 et les β -glucanases a été réalisée. La faible hydratation a été fixée à 38 % puisqu'il a été démontré lors d'une étude préliminaire de ce projet Malteco que l'hydratation doit être supérieure à 36 % pour que la germination des grains d'orge ne soit pas affectée (Guillot *et al.* 2008). Le taux d'hydratation du malt "standard" est de 45 % et sera utilisé comme condition témoin (Bryce *et al.* 2010). Pour suivre les effets d'une diminution d'hydratation sur les β -glucanases, la dégradation des β -glucanes et la viscosité qu'ils induisent ainsi que l'activité des β -glucanases et la texture de l'albumen amylic ont été observées. Pour déterminer les effets d'une modification du diagramme de trempage sur l' α -amylase, la diffusion de cette enzyme au cours de la germination ainsi que la dégradation des grains d'amidon a été également analysée.

II-2 Matériels & Méthodes

II-2-1 Obtention des malts et malts verts fortement et faiblement hydratés

Les grains d'orge (*Hordeum vulgare* cv Esterel) sur lesquels nos analyses ont été effectuées ont été fournis par l'Institut Français des Boissons de la Brasserie et de la Malterie (IFBM). Les échantillons de malt ont été obtenus en appliquant un diagramme de trempage différent aux grains d'orge. Cela a permis d'obtenir des taux d'hydratation en fin de trempage de 38 et 44 %. Les échantillons ont été collectés tous les jours (trois fois 100g) de la fin de trempage jusqu'à sept jours de germination et ont été conservés à -80°C avant les études d'immunomarquage. Au cinquième jour de germination, des échantillons de malts verts ont été touraillés pour avoir des malts avec un déroulement de maltage classique. Pour obtenir les malts à faible ou forte hydratation, deux diagrammes de trempage ont été réalisés : 8h/6h/5h (sous-eau/sous-air/sous-eau) pour obtenir 38 % d'hydratation (= Low Hydrated malt) ou 8h/16h/7h/10h/4h (eau/air/eau/air/eau) pour obtenir 45 % d'hydratation (= Highly Hydrated malt). Pour l'ensemble des échantillons, la température de germination était de 16°C et les diagrammes de touraillage étaient identiques et se sont déroulés au même moment.

II-2-2 Extraction des polysaccharides des malts et de l'orge

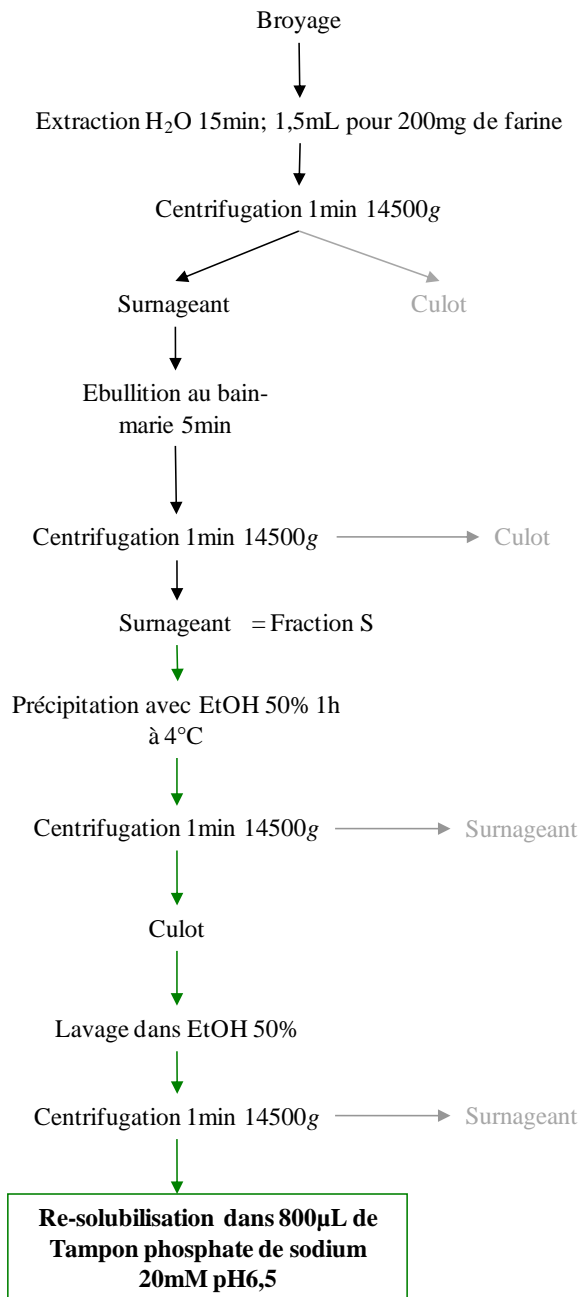
Les farines d'orge et de malts obtenus à différents taux d'hydratation ont été extraites par deux méthodes : une extraction aqueuse et une extraction des oses totaux, insolubles dans l'éthanol à 50 %.

Pour réaliser l'extraction aqueuse, 200 mg de farine (poids frais) ont été placés sous agitation dans 1,5 mL d'eau déionisée pendant 15 minutes à 4°C et centrifugé 1 minute à 14 500g. La fraction soluble (surnageant) a ensuite été portée à ébullition au bain-marie pendant 5 minutes et après refroidissement une centrifugation d'une minute à 14 500g a été réalisée permettant d'obtenir en surnageant la fraction des polysaccharides solubles (fraction S). Le culot de cette fraction soluble a été dilué dans de l'éthanol à 50 % pendant 1 h à 4°C puis centrifugé (14 500g) pour obtenir un culot qui est lavé avec de l'éthanol à 50 % et centrifugé à nouveau pour obtenir un culot qui est repris dans du tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,5 (fraction Si). (**Figure 19**)

Pour l'extraction des polysaccharides totaux, 200 mg de farine (poids frais) ont été placés dans 1,5 mL d'éthanol à 50% pendant 15 minutes sous agitation à 4°C et centrifugé (1 minute, 14 500g). Le surnageant a été éliminé, et le culota été porté à ébullition au bain-marie pendant 5 minutes et centrifugé après refroidissement (1 minute, 14 500g). Le culot a été repris dans de l'éthanol à 50 % puis de nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Cette dernière étape de re-suspension a été réalisée deux fois et le culot finalement re-solubilisé dans du tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,5 (fraction I). (**Figure 20**)

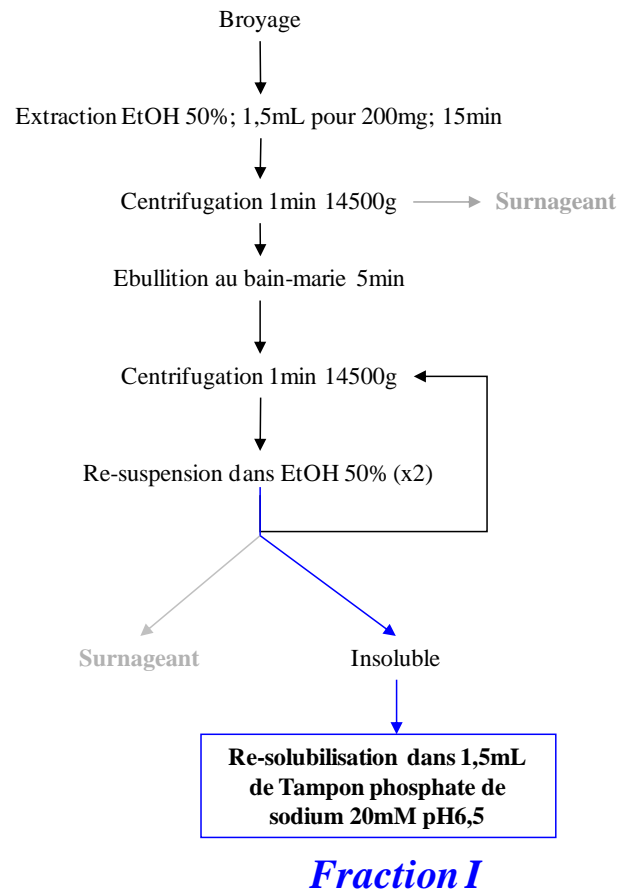
II-2-3 Dosage des β -glucanes

Les analyses de β -glucanes ont été réalisées à l'aide du kit de dosage des β -glucanes de Mégazyme (Mixed-linkage β -glucan assay procedure, Megazyme, Irlande) pour lequel l'extraction a été modifiée. Les fractions I obtenues lors de l'extraction des oses totaux ont été préchauffées à 40°C puis incubées 1 heure à 40°C avec de la lichenase (Megazyme) et centrifugées (1 minute à 14 500 g). Trois fractions ont été préparées à partir du surnageant : de l'acétate de sodium 50 mM pH 4 a été ajouté à l'une des fractions et de la β -glucosidase a été ajoutée dans les deux autres. Après 15 minutes d'incubation à 40°C, le réactif GOPOD (Glucose Oxydase plus Peroxydase et 4-aminoantipyrine) a été ajouté et les échantillons ont été placés 20 minutes à 40°C avant de lire l'absorption à 510 nm.



Fraction Si

Figure 19. Schéma de l'extraction des oses solubles de grains de malts touraillés après 5 jours de germination.



Fraction I

Figure 20. Schéma de l'extraction des oses totaux de grains de malts touraillés après 5 jours de germination.

II-2-4 Suivi de la viscosité induite par les β -glucanes

La viscosité induite par les β -glucanes des malts a été analysée sur les fractions Si (extraction des oses solubles dans l'eau). Les échantillons ont été séparés à l'aide d'une chromatographie d'exclusion stérique haute performance (HPSEC) avec deux colonnes

Shodex OH SB 804-805 HQ 8 x 300 mm couplée à un module de mesure de la viscosité (viscosimètre différentiel, Viscotek 270) et un module de réfractométrie. Le solvant d'élution utilisé à un débit de 0,7 mL/min a été préparé avec du nitrate de sodium 50 mM dans de l'eau. L'acquisition des données a été effectuée avec le logiciel OmniSEC.

II-2-5 Analyses qualitatives des malts après touraillage

Les analyses des caractéristiques technologiques (viscosité du moût, friabilité, extrait du moût, protéines solubles, quantités de β -glucanes et activité β -glucanase) importantes pour la qualité des malts ont été effectuées à l'IFBM selon des protocoles standards (*EBC*) par le laboratoire de l'IFBM.

II-2-6 Mesure de l'activité β -glucanase

L'activité β -glucanase a été mesurée en utilisant la procédure décrite dans le kit de Mégazyme (azo-barley glucan, Megazyme, Irlande) sur les grains d'orge en cours de germination. Les enzymes ont été extraites durant 15 minutes à température ambiante à partir de 0,5 g de farine d'orge (poids frais) en cours de germination avec 8 mL de tampon d'extraction (phosphate de sodium 40 mM, Acétate de sodium 40 mM, pH 4,6). Après une centrifugation de 10 min à 1 000 g, le surnageant et le substrat glucanique coloré ont été pré-incubés 5 min à 30°C. Après l'incubation, 0,5 mL du surnageant et 0,5 mL du substrat ont été mis en contact et agité puis placés exactement 10 min à 30°C. Une solution de précipitation (acétate de sodium 300 mM, acétate de zinc 20 mM, pH 5,0 dans du méthoxyéthanol à 80 %) a été ajoutée et après 5 min à température ambiante le mélange a été centrifugé 10 min à 1 000 g. La densité optique du surnageant a été mesurée au spectrophotomètre à 590 nm contre de l'eau déionisée.

II-2-7 Réalisation de coupes à congélation et de coupes incluses en paraffine

Les coupes à congélation ont été réalisées sur de l'orge et sur les malts faiblement hydratés (LH) et fortement hydratés (HH) en cours de germination. A chaque prélèvement, les grains ont été placés dans l'azote liquide avant d'être conservés à -80°C. Dans une enceinte thermostatée à -20°C, les grains congelés ont été fixés sur un support et enrobés dans un cryoprotectant puis coupés par un cryomicrotome (Micom HM 500 OM, USA). Les coupes

longitudinales ou transversales de 20 µm d'épaisseur ont ensuite été déposées sur des lames traitées pour une meilleure adhérence.

Les coupes paraffine ont été réalisées sur les mêmes échantillons conservés à -80°C. Une étude préalable sur des échantillons fixés à l'état frais a montré que cette étape de congélation avant traitement n'induisait pas de modification du marquage immunocytochimique. Les échantillons sont placés à décongeler dans une cassette plongée dans une solution de fixation contenant 10 mL de formaldéhyde à 40 %, 5 mL d'acide acétique glacial et 85 mL d'éthanol à 60 % pendant 20 h à 4°C. Les échantillons fixés ont ensuite été déshydratés en effectuant 12 bains successifs d'éthanol de 60 à 100%. L'imprégnation dans la paraffine a été réalisée à l'aide d'un automate (Carroussel LEICA 1020). Les grains inclus ont ensuite été coupés avec un microtome (Microm HM340E Microtech, France) pour obtenir des coupes de 10µm d'épaisseur qui ont été déposées sur des lames hydrophobées pour une meilleure adhérence des coupes. La paraffine a ensuite été éliminée en effectuant trois bains d'histosol (HistoClear, Histochoice clearing agent, Sigma) suivis de trois bains d'éthanol à 100 % et de trois bains d'eau déionisée durant chacun 5 min et les coupes ont été laissées à sécher à température ambiante.

II-2-8 Évaluation de la texture de l'albumen amylicé

La texture de l'albumen amylicé a été observée par microscopie optique en suivant une méthode adaptée de Turnbull *et al.* (Turnbull *et al.* 2003). Concrètement, des cryo-sections longitudinales de 20 µm d'épaisseur de malts ont été réalisées puis lavées avec trois fois 500µL de PBS et autant d'eau avant d'effectuer une observation avec un microscope optique (A1 Nikon, Japon)

II-2-9 Immunomarquage

Les coupes de grain d'orge et de malt ont été saturées par du PBS-lait 4% pendant 30 minutes puis l'anticorps spécifique dilué dans du PBS-tween 0,1 %-lait 0,4 % (PBS-Tween-lait) a été déposé sur les coupes pendant 1 heure. Les immunomarquages ont été réalisés avec des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre l' α -amylase 2 (AMY2) (Dako, Danemark) d'orge avec une dilution au 1/100^e et contre les β -(1,3)(1,4)-glucanes (Biosupplies Pty Ltd.

Australia) avec des anticorps monoclonaux de souris avec une dilution au 1/100^e (Meikle *et al.* 1994). Après 5 lavages de 5 minutes des coupes avec du PBS-Tween-lait, les protéines couplées aux anticorps spécifiques sont révélées par l'anticorps marqué (IgG Alexa Fluor[®]-546 de chèvre spécifique de chaque espèce ; Molecular Probes, Invitrogen USA) dilué au 1/100^e. Les coupes sont alors lavées trois fois 5 min avec du PBS-Tween-lait puis trois fois 5 min avec de l'eau déionisée.

Les coupes marquées ont ensuite été observées au microscope confocal à balayage laser (A1 Nikon, Japon) avec une excitation du fluorochrome à 561 nm et en observant la fluorescence entre 570 et 620 nm. Les images ont été acquises et retraitées avec le logiciel Nikon NIS-Elements en utilisant le format TIFF.

II-2-10 Observation de l'amidon endommagé par microscopie

Les grains d'amidon endommagés ont été observés par deux méthodes de microscopie : la coloration des grains par de la safranine O et du bleu de Niagara (Baker and Hobson 1952) et l'observation des croix de Malte de ce même grains d'amidon.

La croix de Malte a été observée avec un microscope photonique (DMRD, Leica, Allemagne) équipé d'un polariseur et d'un analyseur sur des farines de malts faiblement hydratés (LH) et fortement hydratés (HH) obtenus en cours de germination (Hedley *et al.* 2002; Herrera-Gómez *et al.* 2005).

Les conditions de la coloration des grains au bleu de Niagara a été réalisée en colorant dans un premier temps l'ensemble des grains d'amidon de farine de malt LH et HH, obtenus en cours de germination, avec de la safranine orange (1 % dans de l'eau déionisée) qui colore les grains d'amidon. Le colorant en excès a été éliminé et la farine déposée sur une lame. Enfin, du bleu de Niagara (1 % dans de l'eau déionisée), qui ne colore que les grains d'amidon physiquement endommagés (Baker and Hobson 1952), a été déposé sur l'échantillon. L'observation a été effectuée avec un microscope optique (Zeiss Axiovert 135M, Zeiss, Allemagne) et les images ont été acquises au format TIFF avec une caméra Retiga 2000R en utilisant le logiciel Archimed (Zeiss).

II-3 Résultats

II-3-1 Analyse de la qualité d'un malt obtenu à faible hydratation après 5 jours de germination

II-3-1-1 Caractéristiques technologiques des malts touraillés faiblement ou fortement hydratés

Des analyses sur les malts touraillés obtenus après 5 jours de germination ont été effectuées (**Tableau 3**). Les résultats n'ont pas montré de différences significatives pour la quantité de matière sèche extraite du moût, la quantité de protéines solubles ainsi que pour l'activité β -glucanase résiduelle après touraillage. En revanche, il a été observé une friabilité plus faible de 20 % pour le malt faiblement hydraté (LH) comparé au malt standard fortement hydraté (HH).

Tableau 4. Paramètres de qualité des malts touraillés après 5 jours de germination faiblement ou fortement hydratés.

La différence d'hydratation a été obtenue en appliquant des diagrammes d'hydratation spécifiques durant l'étape de trempage des micro-maltages. Les valeurs représentent les moyennes de 3 mesures. Les valeurs en gras sont significativement différentes (données IFBM).

	Fortement hydraté (HH)	Faiblement hydraté (LH)
Hydratation en fin de trempage	44,5%	37,5%
Hydratation en fin de germination	43,7%	39,9%
Viscosité du moût	1,53 mPa.s \pm 0,1	1,68 mPa.s \pm 0,1
Friabilité	86,9% \pm 5	66% \pm 5
Extrait du moût (matière sèche)	80% \pm 0,5	80,2% \pm 0,5
Protéines solubles (matière sèche)	4,72% \pm 0,2	4,12% \pm 0,2
Quantité de beta-glucanes restant (w/w)	0,15% \pm 0,01	0,64% \pm 0,01
Activité β -glucanase	194 U/kg \pm 31	185 U/kg \pm 17

II-3-1-2 Quantité de β -glucanes et viscosité

Deux autres paramètres ont également présenté des différences significatives entre le malt HH (standard) et LH après 5 jours de germination : la viscosité a augmenté de 1,53 à 1,68 mPa.s et la quantité de β -glucanes restant de 0,15 à 0,64 %. Cette dernière valeur reste néanmoins dans l'ordre de grandeur habituellement rencontré de 0,4-0,9 % (Ozkara *et al.*

1998). La viscosité pouvant poser des problèmes de filtration (Bathgate 1983; Sadosky *et al.* 2002), la mesure de la viscosité induite par les β -glucanes solubles de haut poids moléculaire (fraction Si de l'extraction des oses des malts) a été réalisée (**Figure 21**). Les résultats confirment la différence obtenue lors de l'analyse des caractéristiques des malts, la viscosité étant significativement supérieure dans le malt LH comparé au malt HH.

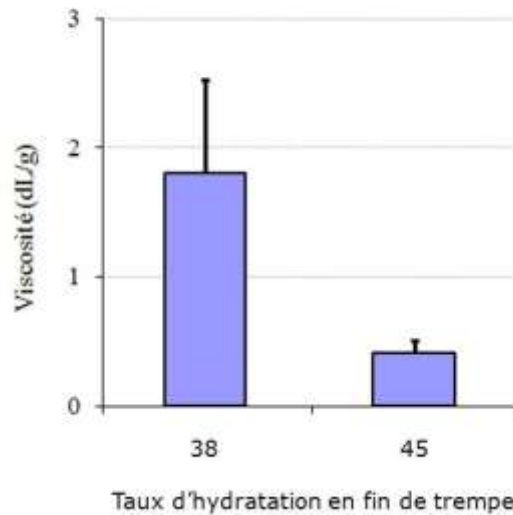


Figure 21. Viscosité induite par les β -glucanes solubles extraits d'un malt touraillé avec 5 jours de germination (fraction Si)

Les premières données technologiques obtenues sur malts touraillés à 5 jours de germination indiquent que les β -glucanes peuvent être un facteur limitant pour l'utilisation de malt à faible hydratation. Ce premier résultat nous a amené à préciser l'impact de cette faible hydratation sur les β -glucanases et α -amylases ainsi que sur leur substrat au cours de la germination.

II-3-2 Effet de la germination à faible hydratation sur les β -glucanases et α -amylases

II-3-2-1 Dosage des β -glucanes au cours de la germination

Le dosage des β -glucanes sur des grains d'orge au cours de la germination a été effectué (**Figure 22**). Durant la trempé la quantité de β -glucanes initialement de $23,5 \pm 0,3$ mg/g dans l'orge est de $19,5 \pm 1,3$ mg/g dans le malt HH et $21,9 \pm 1,5$ mg/g dans le malt LH. Par ailleurs nous avons observé que la plus grande partie de la dégradation des β -

glucanes a eue lieu durant les trois premiers jours de germination avec $5,2 \pm 0,3$ et $6,1 \pm 0,2$ mg/g de β -glucanes restants pour les malts HH et LH respectivement. L'hydrolyse rapide des β -glucanes durant les trois premiers jours de germination est en accord avec les données obtenues pour des malts standards (Ellis *et al.* 1997; Walker *et al.* 2001; Sungurtas *et al.* 2004; Ferrari *et al.* 2010). La diminution de la quantité de β -glucanes s'est ensuite poursuivie plus rapidement pour le malt HH que pour le malt LH conduisant à des quantités de β -glucanes restantes de $1,5 \pm 0,1$ et $0,7 \pm 0,1$ mg/g pour le malt HH et $4,1 \pm 0,2$ et $3,6 \pm 0,1$ mg/g pour le malt LH pour respectivement 5 et 7 jours de germination.

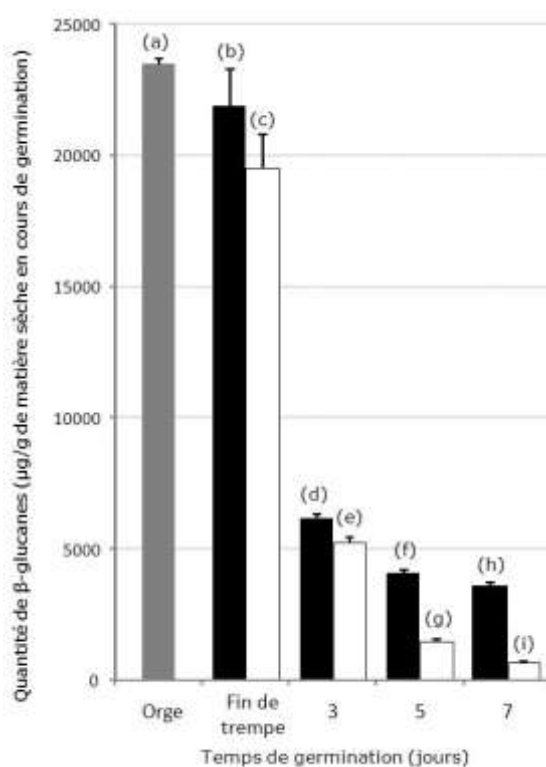


Figure 22. β -glucanes non-hydrolysés de grains d'orge.

Quantités de β -glucanes non-hydrolysés en cours de germination obtenus à 38% (■) ou 45% (□) d'hydratation.

Chaque mesure à été effectuées en triplicata

(a); (b); (c); (d); (e); (f); (g); (h); (i) significativement différent $P < 0.001$

II-3-2-2 Hydrolyse des β -glucanases

En l'absence d'anticorps spécifiques des β -glucanases disponibles, nous avons utilisé des anticorps spécifiques des β -glucanes. En effet, nous avons émis la supposition que la

dégradation des β -glucanes était en très grande majorité due à l'action des β -glucanases et pouvait ainsi être suivie pour avoir une observation indirecte de l'action des β -glucanases. La diffusion des β -glucanases a donc été suivie en observant la disparition de ces polysaccharides pariétaux des grains d'orges au cours de la germination par immunomarquage (**Figure 23**). A la sortie de trempé, (**Figure 23 A0 et B0**) les coupes de malts verts ont toutes présenté un marquage homogène pour l'ensemble des parois. Après 3 jours de germination, pour le malt HH (**Figure 23 A3**), le marquage a pu être observé pour les cellules à aleurone, les cellules du péricarpe et les cellules les plus centrales de l'albumen amylicé. Dans les sections de malt LH (**Figure 23 B3**), après 3 jours de germination aucune différence significative de marquage n'a pu être mise en évidence comparé au marquage observé à la sortie de trempé. Dans le malt HH, on n'observe plus de marquage à partir de 5 jours de germination (**Figure 23 A5 et A7**), ce qui indique que les β -glucanes ont été hydrolysés. Pour le malt LH, le marquage après 5 et 7 jours de germination (**Figure 23 B5 et B7**) est identique au marquage obtenu pour le malt HH à 3 et 5 jours de germination (**Figure 23 A3 et A5**), mettant en évidence 2 jours de décalage pour l'hydrolyse des β -glucanes à faible hydratation comparé à la forte hydratation.

II-3-2-3 Activité de la (1-3)(1-4)- β -D-glucanase

Pour comprendre ces différences de distribution des β -glucanes entre malt LH et HH, des mesures de l'activité β -glucanase ont été effectuées au cours de la germination (**Figure 24**). Le résultat de ces mesures a montré une forte différence à la sortie trempé avec 80 % d'activité en moins pour le malt faiblement hydraté comparé au malt fortement hydraté. En revanche cette différence d'activité β -glucanase s'est réduite au fur et à mesure que le temps de germination s'allongeait, ne montrant plus que 60, 40 puis 20 % de différence à 2, 3 et 4 jours de germination respectivement. Cette différence est fortement réduite à partir de 5 jours de germination avec seulement 10 et 6 % d'activité β -glucanase en moins pour le malt LH pour 5 et 7 jours de germination respectivement.

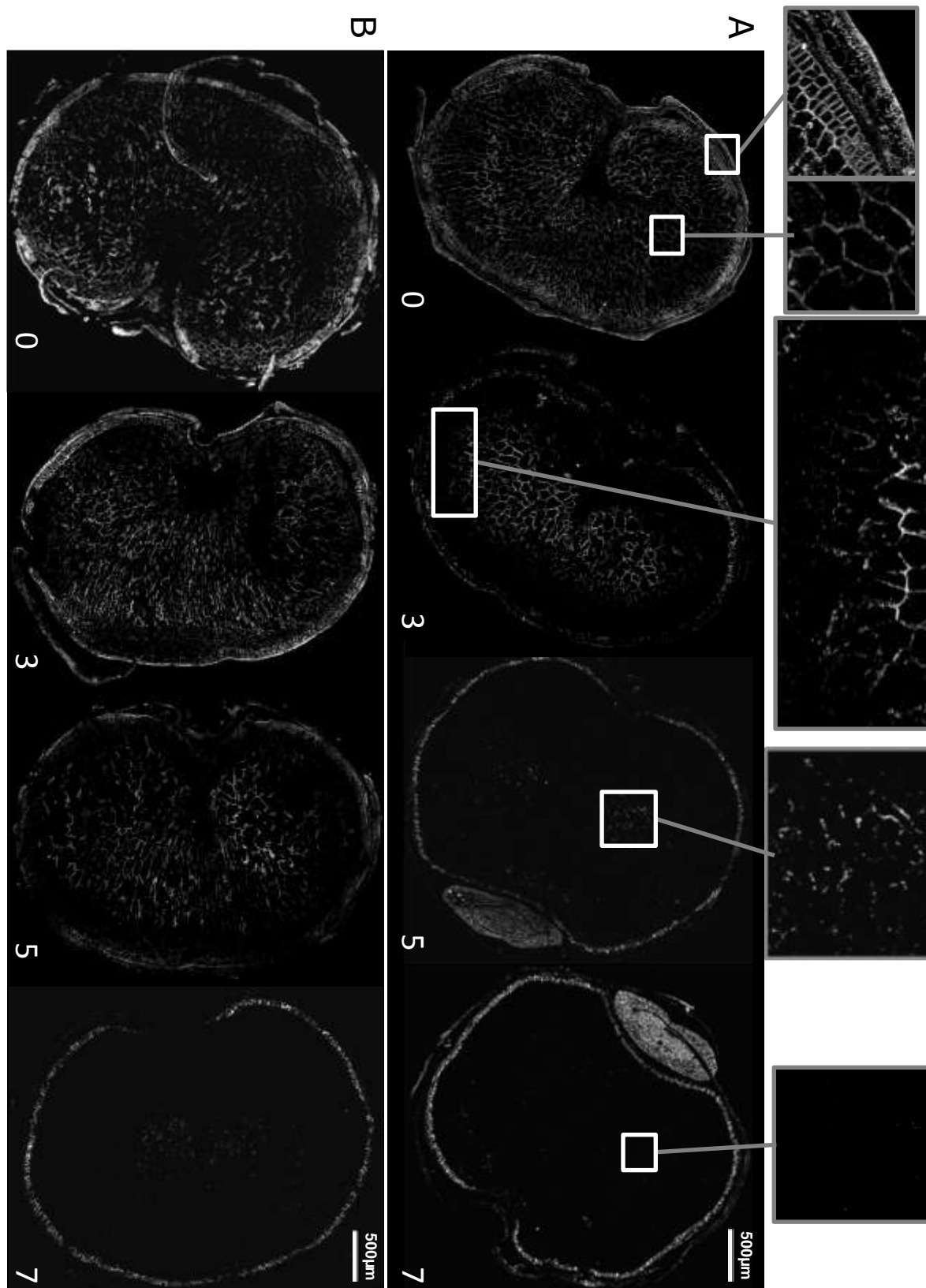


Figure 23. Immunolocalisation des (1-3)(1-4) β -D-glucanes réticulés dans des sections transversales de malt vert durant la germination.

(A) et (B) représentent des malts vert fortement et faiblement hydratés respectivement après 0; 3; 5 et 7 jours de germination de gauche à droite. Les encadrés du haut sont des agrandissements pour une meilleure visibilité.

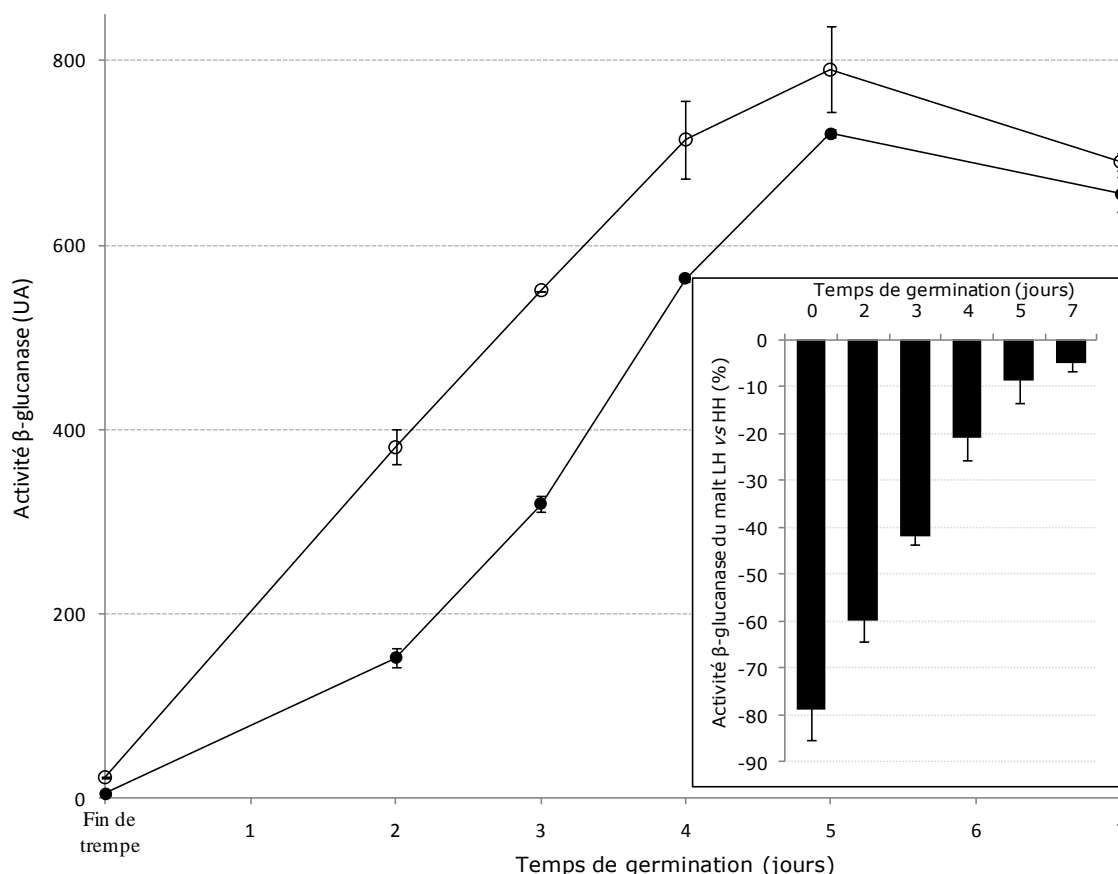


Figure 24. Activité β -glucanase du malt HH (cercles vides) et LH (cercles pleins) au cours de la germination.

L'insert représente la proportion de l'activité β -glucanase d'un malt LH durant la germination comparée à l'activité d'un malt HH. Moyenne de triplicata. Les barres verticales représentent l'écart type.

II-3-2-4 Texture de l'albumen amylicé

La texture de l'albumen amylicé a été évaluée en utilisant des coupes à congélation des malts LH et HH (**Figure 25**). Tandis que l'ensemble de l'albumen amylicé est resté compact pour les grains d'orge en sortie de trempage pour les malts LH et HH, il a été observé une désagrégation de l'albumen plus rapide à forte hydratation. En effet à partir du troisième jour de germination (**Figure 25 A3**) le malt HH a présenté un début de désagrégation dans la partie proche de l'embryon, le long du scutellum. A 5 jours de germination (**Figure 25 A5**), l'albumen a été désagrégé à plus de 50 %, et à 100 % au bout de 7 jours (**Figure 25 A7**). Pour le malt LH, à 3 jours de germination l'intégrité de l'albumen amylicé est maintenue ; seule une petite zone proche de l'embryon est désagrégée (**Figure 25 B3**). Après 5 jours de germination toute la zone près du scutellum et une partie de l'albumen proche des cellules à aleurone a été désagrégée (**Figure 25 B5**). Au bout de 7 jours de germination l'ensemble de

l'albumen amylicé a été désagrégé montrant un profil similaire à celui observé au même temps de germination pour le malt HH (**Figure 25 A7 et B7**).

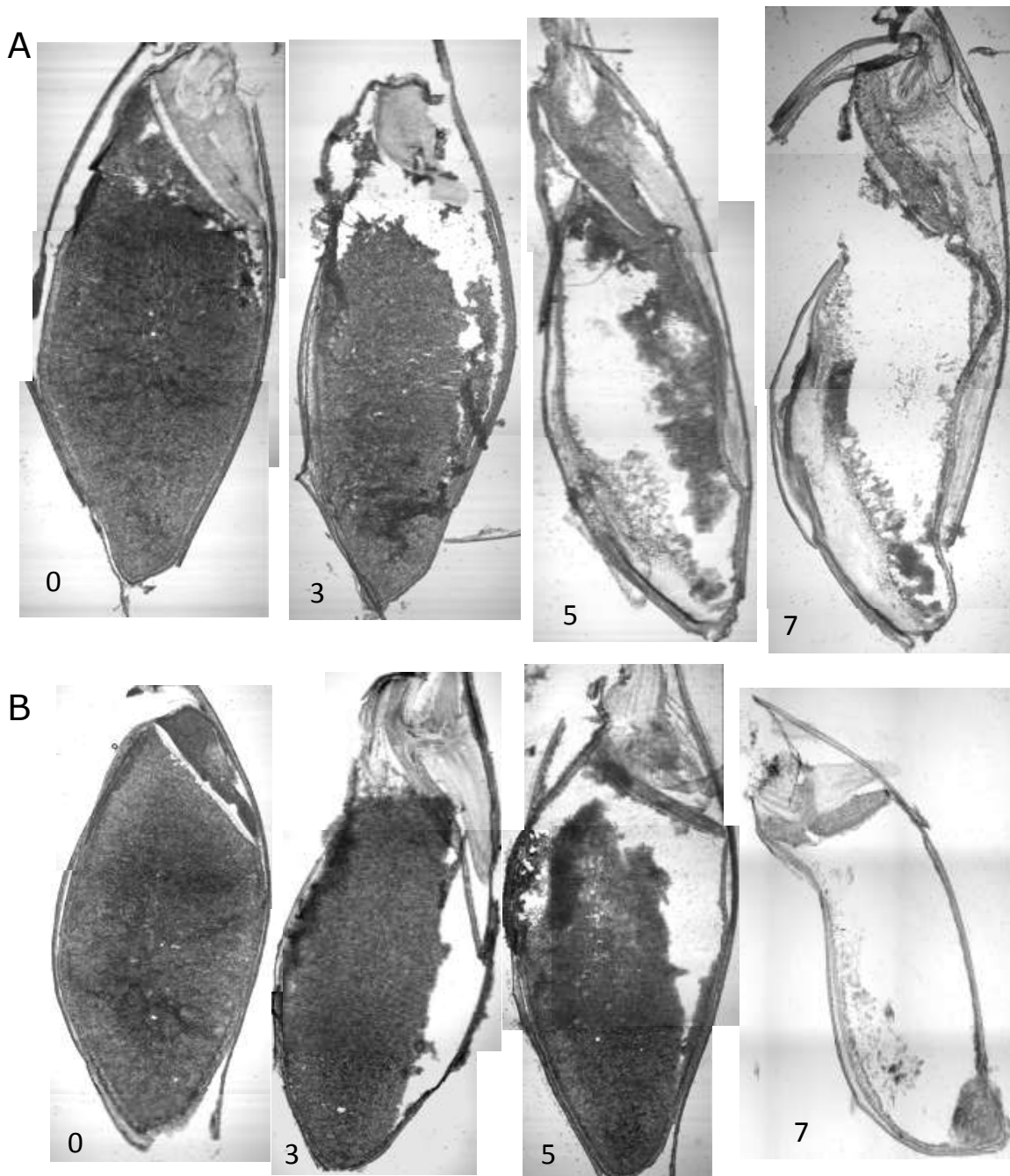


Figure 25. Observation au microscope optique de sections longitudinales de malts verts non-fixés pour évaluer la friabilité.

(A) et (B) représentent des malts verts fortement et faiblement hydratés respectivement après 0; 3; 5 et 7 jours de germination de gauche à droite.

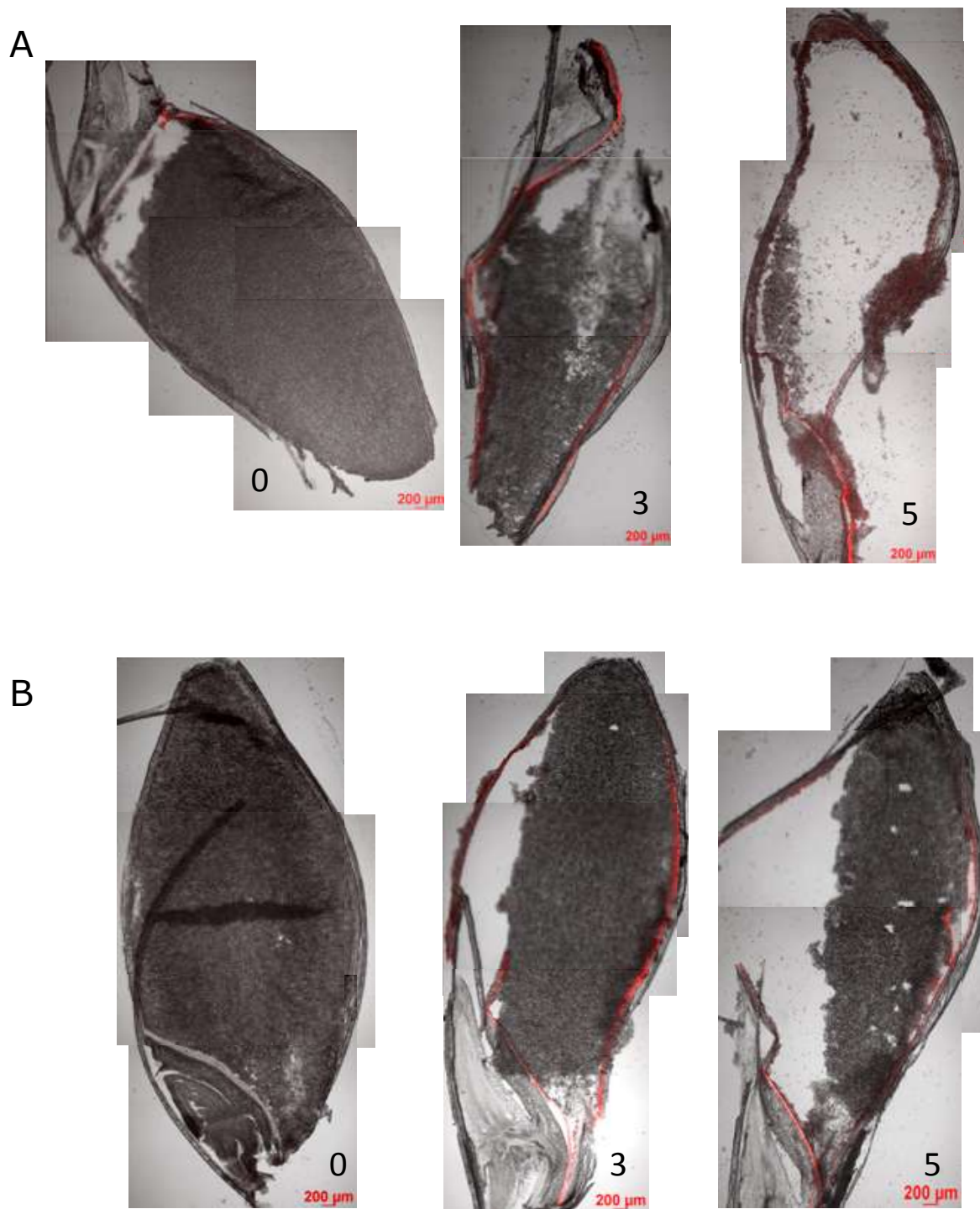


Figure 26. Immunolocalisation de l' α -amylase 2 dans des sections longitudinales de malts verts durant la germination.

(A) et (B) représentent des malts verts fortement et faiblement hydratés respectivement après 0; 3 et 5 jours de germination de gauche à droite. La couleur rouge correspond au marquage de l' α -amylase 2.

II-3-2-5 Localisation de l' α -amylase

La localisation de l' α -amylase a été observée sur les malts LH et HH en cours de germination (**Figure 26**). L' α -amylase synthétisée *de novo* sous l'action des gibbérellines (Jones 1973; Lovegrove and Hooley 2000) est produite plus tardivement que les β -glucanases par les cellules de la couche à aleurone et par le scutellum (Chrispeels and Varner 1967; Macgregor *et al.* 1984; Bernier and Ballance 1993; Sugimoto *et al.* 1998). Nous avons suivi l'initiation de la synthèse de l' α -amylase dans l'ensemble des cellules du scutellum et dans les cellules à aleurone les plus proches du scutellum pour le malt HH dès la sortie de trempe (**Figure 26 A0**). En revanche, très peu de signal a été observé pour le malt LH (**Figure 26 B0**). Cette différence de synthèse disparaît après 3 jours de germination. En effet, le marquage de l' α -amylase est observé dans l'ensemble des cellules à aleurone, de l'extrémité proximale à l'extrémité distale, ainsi que dans les cellules du scutellum pour les malts HH comme pour les malts LH (**Figure 26 A3-5; B3-5**). Au cours de la germination, la biosynthèse de l' α -amylase ne semble donc pas affectée par la modification du diagramme de trempe ; cette enzyme est synthétisée dans la couche à aleurone et reste localisée dans cette zone au cours de la germination. Il semble donc que la synthèse de gibbérellines soit suffisante pour induire la production d' α -amylase (Varner 1964; Macgregor 1987) lors d'un maltage à faible hydratation

II-3-2-6 Action de l' α -amylase

L'impact du maltage à faible hydratation sur l'action de l' α -amylase a également été étudié. L'activité de cette enzyme est surtout observée lors du brassage (MacGregor *et al.* 1999). Néanmoins, des modifications structurales des grains d'amidon (Baker and Hobson 1952; Hedley *et al.* 2002) peuvent être observables au cours du maltage. Un suivi de l'intégrité des grains d'amidons a donc été effectué par deux méthodes au cours de la germination (**Figure 27 et 28**). L'observation des croix de Malte a montré à la sortie de trempe des grains comportant majoritairement des croix entières bien observables que ce soit pour le malt HH ou le malt LH (**Figure 27 J0**). Après 7 jours de germination, l'observation des grains n'a pas mis en évidence de différence significative, seuls certains grains ont présenté des croix de Malte très modifiée à la fois dans le malt LH et dans le malt HH.

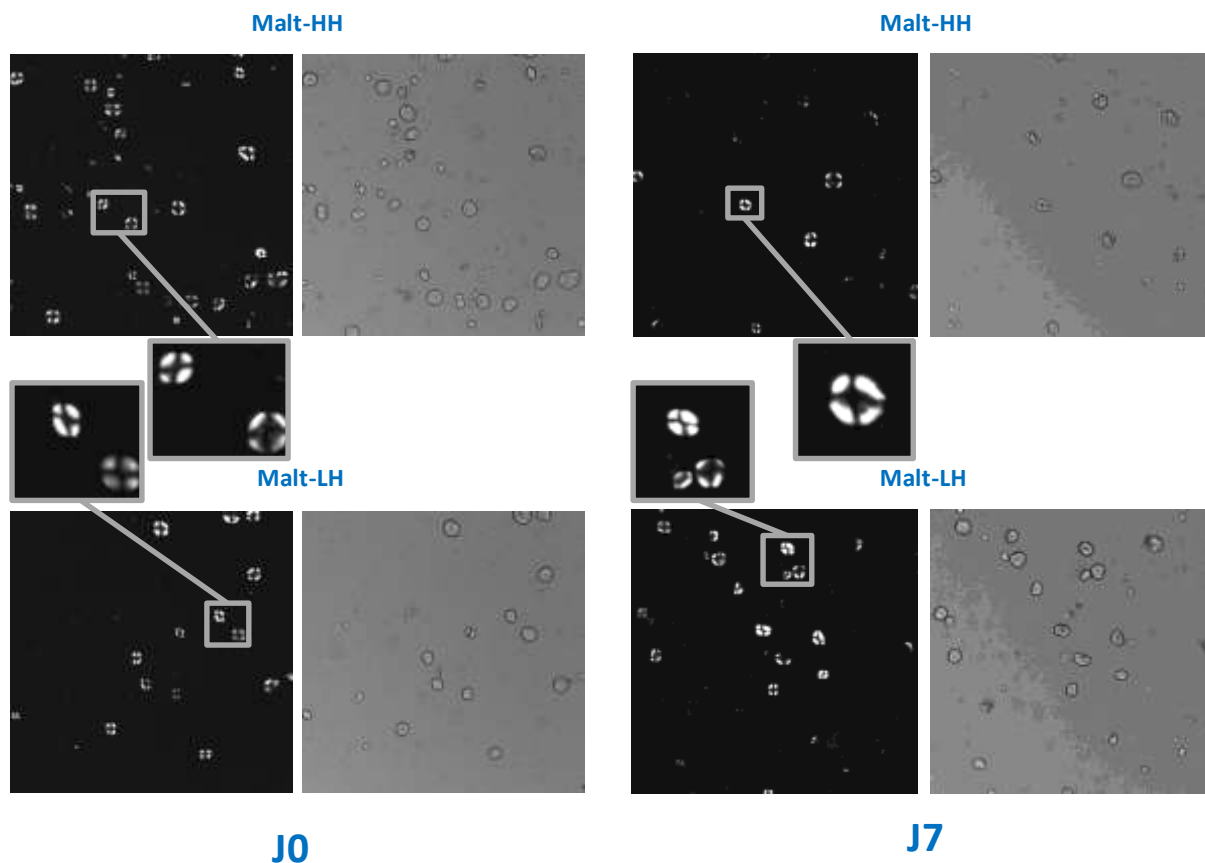


Figure 27. Observation de l'endommagement de l'amidon avec les croix de Malte en lumière polarisée.

Les images ont été acquises en lumière polarisée (gauche de chaque doublet d'image) et en lumière normale (droite de chaque doublet d'image).

La coloration au bleu de Niagara des grains d'amidon a permis d'observer les grains physiquement endommagés (**Figure 28**). L'observation des grains en sortie de trempage a montré un grand nombre de ces grains colorés en bleu signifiant un endommagement physique, que ce soit pour le malt HH ou le malt LH. Néanmoins, la proportion de grains d'amidon non-endommagés retrouvée dans les deux cas a été supérieure à la proportion de grains d'amidon endommagés. De plus, ces grains sont présents dès la sortie de trempage (à un moment où l' α -amylase n'est pas encore présente dans l'albumen amylicé). Ces grains endommagés ont donc probablement été modifiés durant le broyage précédent les analyses. Un résultat identique a été obtenu après 7 jours de germination ce qui montre que la dégradation de l'amidon n'est apparemment pas affectée par la modification du diagramme de trempage.

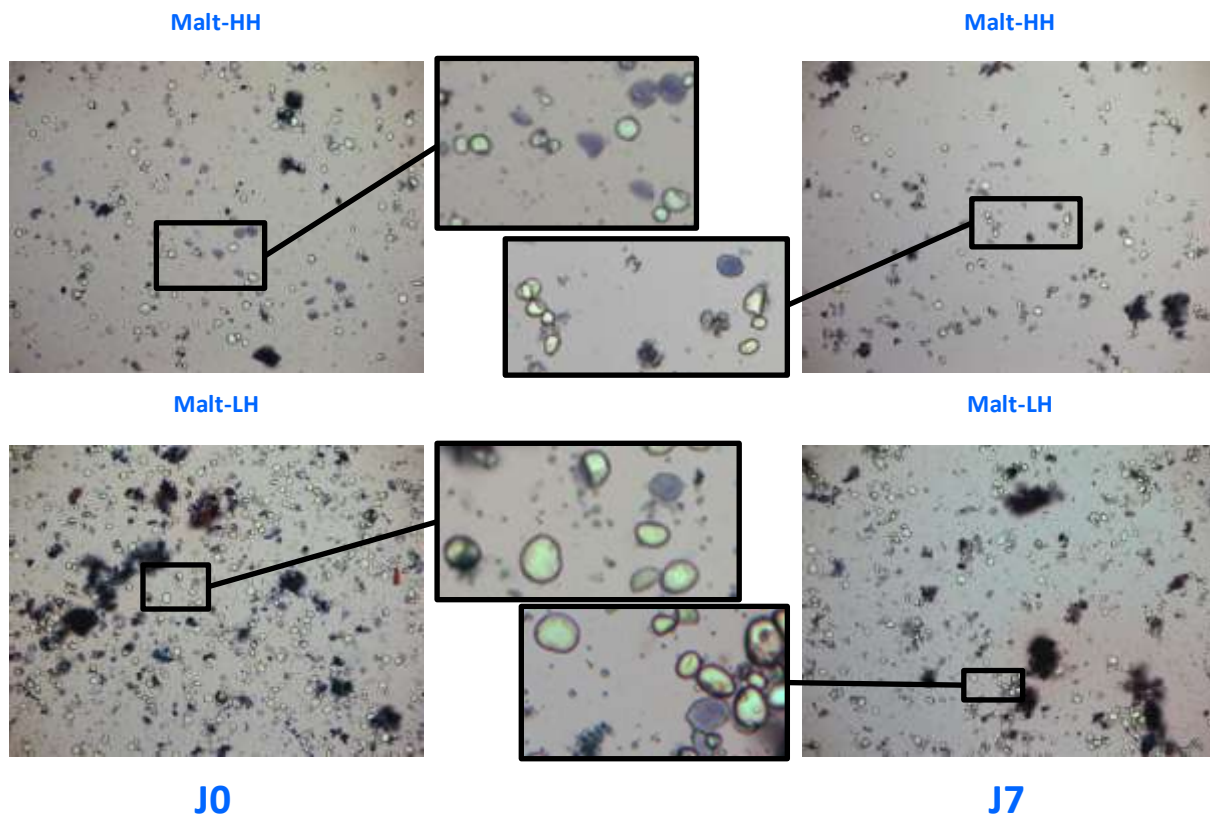


Figure 28. Observation en microscopie optique des grains d'amidon de malts faiblement ou fortement hydratés après coloration à la safranine orange et au bleu de Niagara.

Les grains colorés en bleu sont des grains physiquement endommagés, les grains colorés légèrement en jaune-vert sont des grains d'amidon non-endommagés. Les amas colorés en bleu très foncé ou orange sont des débris de cellules et enveloppes des grains d'orge provenant du broyage des grains.

II-4 Discussion et perspectives

Au cours de cette étude, nous avons montré que la modification du diagramme de trempage a eu des effets différents sur la biosynthèse et la diffusion des deux enzymes étudiées au cours de la germination.

Dans le cas de l' α -amylase aucune différence significative entre les malts LH et HH n'a pu être observée. La biosynthèse de cette enzyme ne semble donc pas affectée par le maltage à faible hydratation et ne poserait *a priori* aucun problème lors d'un maltage réalisé dans ces conditions.

Au contraire, l'activité et l'action de la β -glucanase semble être affectée par la modification du diagramme de trempage. En effet, les caractéristiques d'un malt touraillé à faible hydratation après 5 jours de germination ont montré une friabilité plus faible et une viscosité et une quantité de β -glucanes plus importantes. Ces résultats sont en accord avec des

études précédentes qui ont mis en évidence le lien entre β -glucanes et viscosité (Sadosky *et al.* 2002; Edney *et al.* 2007) ou friabilité (Bathgate 1983).

Afin de préciser les conditions d'hydrolyse des β -glucanes lors d'un maltage à faible hydratation, nous avons suivi la cinétique d'hydrolyse de ces β -glucanes (**Figure 22**) ainsi que la diffusion de l'enzyme au sein de l'albumen dans des malts verts, au cours de la germination. Nous avons pu mettre en évidence une hydrolyse significative des β -glucanes dès la sortie de trempe dans les malts HH comme dans les malts LH conformément à ce qui a été démontré dans d'autres malt standards (Bamforth and Martin, 1981; Sungurtas *et al.* 2004). Après les 3 premiers jours de germination, la quantité de β -glucanes non-hydrolysés dans les malt LH est plus importante que celle mesurée dans les malt HH. Il faut remarquer que même pour le malt faiblement hydraté, les quantités de β -glucanes hydrolysés restent comparables ($< 5\text{mg/g}$) à celles observées à ce même stade de germination, dans d'autres études sur des malts produits dans des conditions d'hydratation standards et dont les caractéristiques technologiques étaient satisfaisantes (Sungurtas *et al.* 2004; Ferrari *et al.* 2010). Néanmoins, en fin de germination, la quantité de β -glucanes non-hydrolysés est plus importante (6 fois) dans les malts LH que dans les malts HH. Outre la quantité totale de β -glucanes résiduels, la distribution des β -glucanes non hydrolysés dans l'albumen est importante car elle peut avoir une influence sur la structure de l'albumen amylicé et par conséquent la friabilité du malt (Aastrup and Erdal 1980; Bathgate 1983). Nous avons alors observé *in situ*, par immunocytochimie, l'hydrolyse des β -glucanes au cours de la germination dans les malts LH et HH. Nos résultats montrent bien une hydrolyse partielle dans les malts LH après 5 jours de germination, en accord avec les résultats obtenus sur les malts tourailles après 5 jours de germination. En revanche, après 7 jours de germination, aucune différence n'est révélée, par immunocytochimie, entre les malts HH et LH. L'anticorps utilisé pour la détection des β -glucanes a une affinité de liaison optimale avec des (1-3)(1-4)- β -D-glucanes comportant un degré de polymérisation (DP) de 6 à 7. Par exemple, l'anticorps a une affinité 66 fois plus forte pour un oligosaccharide de DP6 que pour un oligosaccharide de DP4 (Meikle *et al.* 1994). Cette différence d'affinité pourrait expliquer l'apparente contradiction entre les analyses biochimiques d'une part (**Figure 22**), qui indiquent une quantité de β -glucanes non-hydrolysés 6 fois supérieure dans les malts LH à 7 jours de germination et l'immunomarquage des β -glucanes d'autre part (**Figure 23**), qui montre un taux de dégradation équivalent à ce même temps dans les malts LH et HH. Ce résultat indique par ailleurs, que les β -glucanes résiduels dans les malts LH ont un faible degré de polymérisation. Ce point est à mettre en relation avec la friabilité du malt et la viscosité du moût. En effet, des études ont montré que

la viscosité du moût était corrélée au poids moléculaire des β -glucanes résiduels (Sadosky *et al.* 2002). Or notre évaluation indirecte de la friabilité potentielle du malt par l'observation de la structure de l'albumen donne des résultats comparables pour des malts HH après 5 jours de germination et des malts LH après 7 jours de germination.

L'étude de l'activité enzymatique a montré que l'activité β -glucanase était entre 80 et 60 % plus faible pour un malt à faible hydratation en début de germination, alors qu'elle n'est pas significativement différente après 5 jours de germination. La différence de dégradation des β -glucanes ne serait donc pas due à une plus faible synthèse de l'enzyme mais plutôt à une cinétique plus lente de cette synthèse concomitante au retard de diffusion de l'enzyme observée dans les malts LH

Tous ces résultats semblent montrer des caractéristiques identiques ou très proches pour un malt HH obtenu après 5 jours de germination et un malt LH obtenu après 7 jours de germination. Il a également été montré que la diffusion des β -glucanases et la dégradation des β -glucanes étaient effectuées de façon homogène par rapport à un malt fortement hydraté. Effectuer un maltage avec 7 jours de germination, au lieu de 5 jours, constituerait donc une alternative pour réduire très fortement l'impacte d'un maltage à faible hydratation sur l'hydrolyse des β -glucanes. Dans le but de réduire l'utilisation d'eau durant l'étape de trempage et de ce fait d'économiser de l'énergie lors du touraillage, la modification du temps de l'étape de germination pourrait être validée industriellement en tant qu'alternative pour obtenir les modifications de l'albumen nécessaire pour le maltage et brassage à faible hydratation. Cela est d'autant plus envisageable que le surcoût de l'augmentation du temps de germination serait de 5% à comparer avec les 20% économisés avec un maltage à faible hydratation.

Chapitre III. Suivi des modifications de la LTP1 lors du maltage à faible hydratation en tant que marqueur de la qualité de la bière

III-1 Introduction

Un malt faiblement hydraté doit présenter toutes les caractéristiques nécessaires à la fabrication de la bière. En effet, la qualité de la bière repose sur plusieurs critères dont un particulièrement attendu par les consommateurs : la mousse. Cette mousse doit présenter des caractéristiques de couleur, intensité et stabilité. Cette stabilité de mousse est très dépendante des protéines présentes dans la bière ainsi que des modifications qu'elles présentent (Okada *et al.* 2008). Parmi les protéines retrouvées dans la mousse de bière, les deux majoritaires sont la protéine Z et la LTP1 (Evans and Hejgaard 1999; Gorjanovic 2007; Marion and Bakan 2009). Ces deux protéines sont glucosylées lors du maltage et brassage de l'orge (Marion and Bakan 2009; Gorjanovic 2010), ce qui leur donne leurs propriétés moussantes recherchées (Sørensen *et al.* 1993). Malgré sa forte proportion (40 %) parmi les protéines solubles de la bière (Perrocheau *et al.* 2005), la protéine Z a été peu étudiée (Gorjanovic 2010). En revanche, la LTP1 qui représente la moitié des protéines solubles de la bière a été mieux caractérisée. Son rôle dans la stabilisation de la mousse de bière en a fait une protéine marqueur de la qualité du malt grâce à ces propriétés pro-mousses acquises au cours du maltage/brassage (Gorjanovic 2007; Gorjanovic 2010). En effet, la LTP1 est glucosylée grâce aux réactions de Maillard (Jégou *et al.* 2001; Chmelik *et al.* 2009) durant l'étape de touraillage. De plus, une grande partie de la LTP1 de malt et de bière est acylée avec un ou deux adduits lipidiques (Jégou *et al.* 2000; Perrocheau *et al.* 2006) lors de la germination (Bakan *et al.* 2006), ce qui augmente ses propriétés tensio-actives (Bakan *et al.* 2009). L'étape d'ébullition lors du brassage induit une dénaturation de la LTP1 grâce à la rupture des ponts disulfures (Perrocheau *et al.* 2006) et augmente ainsi les propriétés pro-mousses de cette protéine.

Toutes ces modifications font de la LTP1 une protéine marqueur de la qualité du malt, et ont donc été étudiées afin de déterminer si le maltage à faible hydratation influence les modifications de cette protéine.

III-2 Matériels & Méthodes

III-2-1 Extraction et purification de la LTP1 d'orge et de malt

Les grains d'orge ou de malt ont été broyés dans l'azote liquide à l'aide d'un cryobroyeur (Spex 6700 Freezer/Mill). L'extraction a été réalisée avec 1 g de farine (poids

frais) placés dans 5 mL d'eau milliQ sous agitation à température ambiante pendant 30 min. L'extrait a été ensuite placé au bain-marie à 100°C pendant 30 min et centrifugé à 8 000 g pendant 10 min à température ambiante. Les protéines ont été alkylées, au niveau des fonctions thiol réduites, avec 100 µL d'iodoacetamide à 0,5 M pendant 30 min dans le noir ; la réaction a été arrêtée en ajoutant 50 µL d'acide trifluoroacétique (TFA) à 10 %. Cet extrait a été dialysé contre de l'eau à travers une membrane ayant un seuil de coupure à 3 500 Da pendant 1 nuit et a été lyophilisé.

La purification a été réalisée à partir de l'extrait lyophilisé repris dans 2 mL d'eau milliQ et dont 500 µL ont été injectés en RP-HPLC sur une colonne en phase inverse (Nucleosil C18, 250 x 4 mm, Macherey-Nagel) thermostatée à 62°C. Après un lavage avec 20 % d'acétonitrile contenant 0,04 % de TFA, le diagramme d'élution a été réalisé avec un gradient linéaire d'acétonitrile de 20 à 50 % en 35 min. Les fractions collectées ont été contrôlées par SDS-PAGE et celles qui contenaient de la LTP1 ont été rassemblées avant lyophilisation.

III-2-2 SDS-PAGE

La séparation des protéines a été réalisée sur gel d'acrylamide à 15 %. 30 µL des fractions obtenues en sortie de RP-HPLC ont été diluées dans 20 µL de tampon de solubilisation (tampon Tris 120 mM, SDS 4 %, glycérol 20 %, bleu de bromophenol 0,02 %, pH 6,8) et 3 µL de β-mercaptoéthanol. Après chauffage à 100°C pendant 5 min, les échantillons sont déposés. La migration s'est déroulée à 20 mA par gel dans un tampon contenant 25 mM de Tris, 0,1 % de SDS et 192 mM de glycine.

Après complète migration, les protéines ont été colorées au nitrate d'argent selon une modification de la méthode de Blum (Blum *et al.* 1987). Les protéines ont été fixées pendant 1 h dans une solution d'eau milliQ contenant 40 % d'éthanol et 10 % d'acide acétique. Les gels ont ensuite été lavés 2 fois 20 min dans une solution contenant 30 % d'éthanol puis dans de l'eau pendant 20 min. La sensibilisation a été réalisée dans une solution de thiosulfate de sodium à 0,02 %. Après 3 lavages de 20 sec dans de l'eau milliQ les gels ont été placés dans une solution de nitrate d'argent à 0,1 % contenant 20 µL de formaldéhyde à 37 % pendant 20 min. Trois lavages de 20 sec dans l'eau ont été effectués de nouveau avant révélation de la coloration par une solution de carbonate de sodium à 3 % contenant 0,05 % de thiosulfate de sodium et 50 µL de formaldéhyde à 37 %. Pour arrêter la révélation de la coloration, les gels ont été lavés 20 sec dans de l'eau puis placés dans de l'acide acétique à 1 % pendant 5 min.

III-2-3 Western blot anti-LTP1 d'orge

Les protéines, préalablement séparées par électrophorèse, ont été transférées sur membrane de nitrocellulose 0,2 µm sous l'action d'un champ électrique dans un tampon de transfert contenant 25 mM de Tris, 192 mM de glycine, 0,1 % de SDS et 20 % d'éthanol. Le transfert a été réalisé pendant 45 min à 2,5 mA/cm². Les zones de la membrane non-occupées par des protéines ont été saturées pendant 1 nuit dans une solution de PBS-lait (136 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,46 mM K₂HPO₄, pH 7,4 contenant du lait écrémé à 5 %). La membrane a été lavée 2 fois pendant 10 min avec du PBS contenant du Tween 20 à 0,1 % (PBS-Tw) avant d'être mise en contact pendant 1 h avec un anticorps polyclonal de lapin spécifique de la LTP1 d'orge dilué au 1/3 000^e dans du PBS-Tw contenant du lait écrémé à 0,5 % (PBS-Tw-lait). Après 3 lavages de 10 min, la membrane a été mise en contact pendant 1 h avec un anticorps de chèvre anti-lapin couplé à la phosphatase alcaline dilué au 1/3 000^e dans du PBS-Tw-lait. Le réactif de révélation colorimétrique AP (Alcaline Phosphatase conjugate substrate kit, BioRad) a été ajouté ; l'AP catalyse la transformation de son substrat soluble en un composé coloré au niveau du complexe antigène/anticorps. La réaction a été stoppée avec un lavage abondant de la membrane avec de l'eau.

III-2-4 Immunomarquage pour observation en microscopie

Les coupes de grain d'orge et de malt incluses en paraffine (voir paragraphe II-2-7) ont été saturées par du PBS contenant du lait écrémé 4 % pendant 30 min puis l'anticorps monoclonal de souris spécifique de la LTP1 d'orge dilué au 1/300^e dans du PBS contenant du Tween 20 à 0,1 % et du lait écrémé à 0,4 % (PBS-Tween-lait) a été déposé sur les coupes pendant 1 h. Après 5 lavages de 5 min avec du PBS-Tween-lait, l'anticorps marqué avec un fluorochrome (IgG de chèvre anti-souris Alexa Fluor[®]-546 ; Molecular Probes, Invitrogen USA) avec une dilution au 1/100^e dans du PBS-Tween-lait a été déposé pendant 1 h. Les étapes suivantes de l'immunomarquage et de l'observation en microscopie ont été réalisées comme décrit dans le paragraphe II-2-9.

III-2-5 Dosage de la LTP1 par ELISA

Les analyses de la quantité de LTP1 des malts ont été réalisées avec la méthode de dosage par la technique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Sur une plaque

96 puits, 100 µL d'échantillon ou de LTP1 standard (LTP1 acylée ou mélange de LTP1 + LTP1 acylée) ont été adsorbés dans chaque puits pendant 2 h à 37°C. Après avoir été lavés par du PBS, une saturation a été effectuée en ajoutant 250 µL de PBS contenant 4 % de lait écrémé dans chaque puits pendant 1 h à 37°C. La plaque a ensuite été lavée avec du PBS contenant 0,05 % de Tween 20 (PBS-Tween) avant de déposer 100 µL d'anticorps spécifique anti-LTP1 (anticorps monoclonal anti-LTP1 acylée ou anticorps polyclonal anti-LTP1 totale) dilué dans le PBS-Tween contenant 0,4 % de lait écrémé pendant 1 h à 37°C. Après lavage avec du PBS-Tween, 100 µL d'anticorps conjugué à la peroxydase dilué au 1/3 000^e ont été ajoutés dans chaque puits. La fixation incubée 1 h à 37°C dans l'obscurité a été suivie d'un rinçage de la plaque avec du PBS-Tween, et 100 µL de solution contenant le substrat (0,04 % d'o-phenylenediamine et 0,02 % d'H₂O₂ dans 0,05 M de tampon citrate pH 5,5) ont été ajoutés dans chaque puits. Après 30 min d'incubation à l'obscurité, la réaction colorée a été arrêtée en ajoutant 25 µL d'acide sulfurique 4N. La mesure de la coloration a été réalisée avec un lecteur d'absorption en observant à 490 nm et en soustrayant le bruit de fond mesuré à 630 nm.

III-2-6 LC-MS

L'analyse des modifications de la LTP1 a été effectuée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) couplé à un spectromètre de masse à trappe d'ion en ionisation négative (Waters 616 system, Waters, Manchester UK ; LCQ advantage, ThermoFinnigan, USA). La séparation des différentes formes de LTP1 a été réalisée sur une colonne en phase inverse (Nucleosil C18, 4 mm x 25 cm de longueur, Macherey-Nagel) maintenue à 62°C et à un débit de 0,3 mL/min. Le gradient a consisté en une augmentation linéaire de 20 à 50 % en acétonitrile contenant 0,08 % d'acide formique durant 35 min suivies d'une augmentation rapide à 100 % en 1 min. Les données d'acquisition ont été retraitées avec le logiciel Xcalibur.

III-2-7 Dosage des amines libres par la méthode à l'O-phthaldialdéhyde

Le dosage des amines libre a été réalisé selon la méthode modifiée de Rowlett (Rowlett and Murphy 1981). Une solution d'OPA a été réalisée en pesant 40 mg d'ortho-phthaldialdéhyde dans 1 mL de méthanol puis en y ajoutant 2,5 mL de SDS à 10 %, 100 µL de β-mercaptoéthanol et 25 mL de tampon tétraborate de di-sodium à 0,1 M pH 9.3, le tout complété à 50 mL avec de l'eau déionisée. Le dosage a été réalisé en prenant 50 µL de LTP1

purifiée à 2 mg/mL dans du tampon phosphate à 50 mM pH 7,8 auxquels a été ajouté 1 mL de solution d'OPA. La lecture a été réalisée à 340 nm sur un spectrophotomètre dans la limite d'une heure. Pour estimer la quantité d'amine libre, une gamme étalon de leucine de 0 à 2,5 mM a été réalisée et un échantillon de LTP1 purifiée d'orge a été ajouté.

III-2-8 Fluorescence des composés de Maillard

Les spectres d'émission de fluorescence ont été obtenus sur un spectrophotomètre FluoroMax (Spex, Jobin-Yvon). Les mesures ont été réalisées en effectuant une excitation à 330 nm (Andersen and Mortensen 2008) et en enregistrant l'émission de fluorescence de 350 à 500 nm sur des solutions de LTP1 extraites de malt et de LTP1 d'orge purifiées à 0,5 mg/mL. La mesure de fluorescence a été effectuée tous les 0,5 nm.

III-3 Résultats

III-3-1 Diffusion de la LTP1

La diffusion de la LTP1 dans le grain d'orge en cours de germination a été observée par microscopie à l'aide d'un immunomarquage (**Figure 29**). Sur grain d'orge, la LTP1 est localisée dans la couche à aleurone, aucun marquage n'est retrouvé dans l'albumen amylicé (**Figure 29A**). En revanche, dès la sortie de trempe la LTP1 a été observée à la fois dans la couche à aleurone et dans l'albumen amylicé, l'ensemble de l'albumen a été marqué (**Figure 29 B0 et C0**). La LTP1 a donc diffusé dans l'albumen durant la trempe pour le malt faiblement hydraté (LH) et pour le malt fortement hydraté (HH). Après 3 et 5 jours de germination, le marquage est toujours situé dans l'albumen amylicé et la couche à aleurone (**Figure 29 B3-5 et C3-5**). Nous avons donc pu montrer avec ces résultats que la LTP1 diffusait lors de la trempe de la couche à aleurone vers l'albumen amylicé. De plus, aucune différence de diffusion entre malt LH et malt HH n'a été mise en évidence.

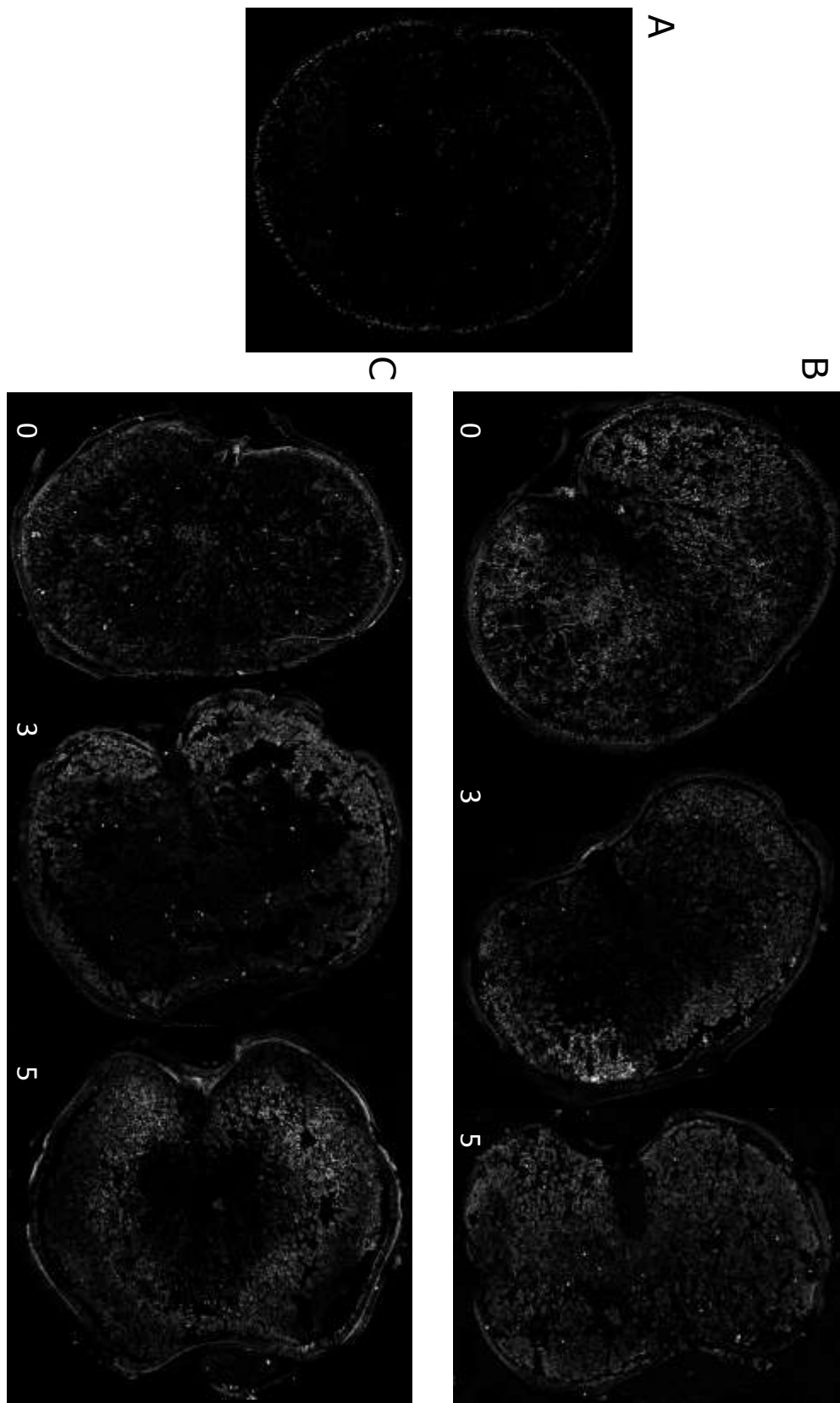


Figure 29. Observation de la diffusion de la LTP1 grâce à un immunomarquage dans des sections transversales de grain d’orge en cours de germination ou non.
 (A) représente une coupe d’orge non germé; (B) et (C) représentent des coupes de malts verts fortement et faiblement hydratés respectivement après 0; 3 et 5 jours de germination de gauche à droite.

III-3-2 Extraction et purification de la LTP1

Les fractions purifiées de LTP1 à partir d'orge ou de malt touraillé ont été contrôlées par SDS-PAGE (**Figure 30a**) et western-blot (**Figure 30b**). Le SDS-PAGE a permis de voir que lors de l'extraction, la LTP1 a été extraite et retrouvée dans les premières fractions lors de la purification par HPLC. La protéine a été en grande partie isolée des autres protéines, les trois premières fractions ne montrant aucune protéine contaminante en plus des bandes de la LTP1 présentes à environ 10 kDa. Ces résultats sont confirmés par le western blot spécifique de la LTP1 qui a présenté trois bandes correspondant à celles des trois premières fractions sur le SDS-PAGE. Les fractions contenant de la LTP1 purifiée ont été rassemblées et ont constitué l'extrait utilisé pour les analyses de cette protéine.

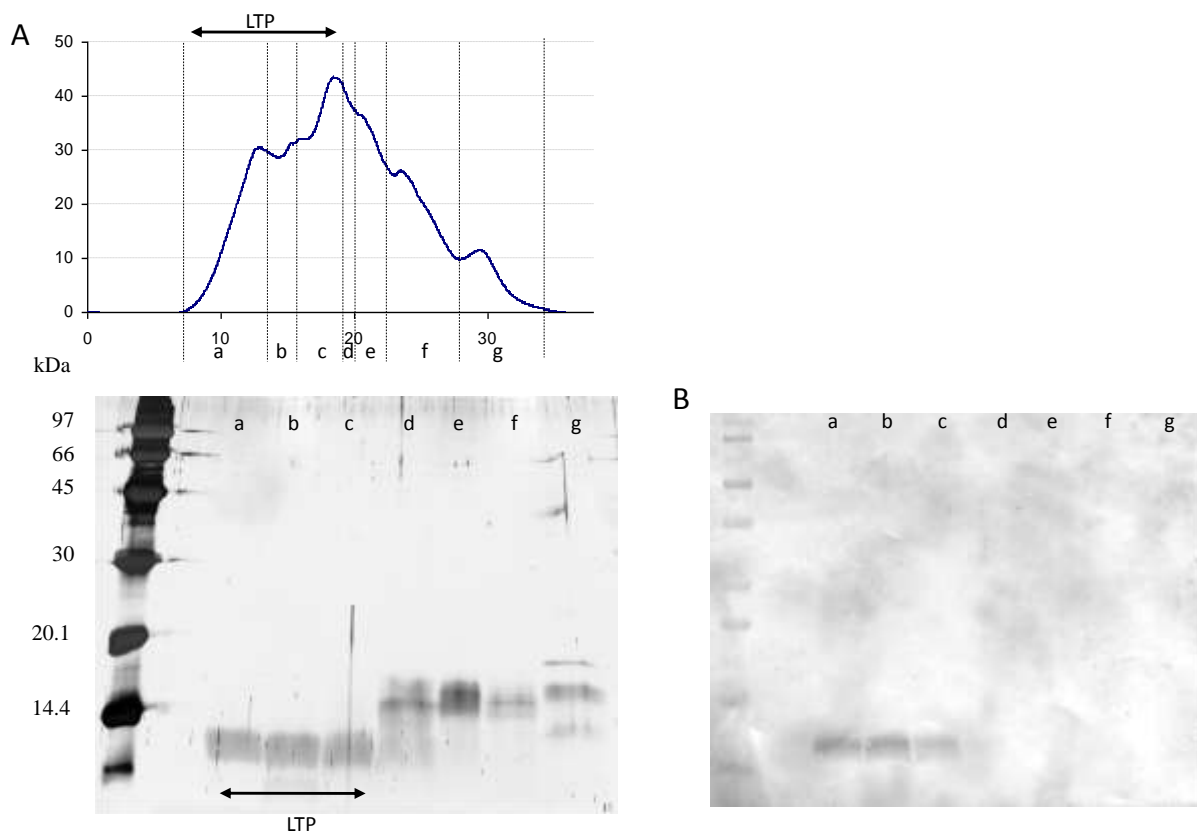


Figure 30. Analyse des fractions obtenues lors de la purification de la LTP1.

A) Chromatogramme d'HPLC avec le SDS-PAGE correspondant dessous. B) Western blot obtenu avec un anticorps anti-LTP1 réalisé avec les mêmes fractions que le SDS-PAGE. Les pointillés verticaux correspondent aux différentes fractions séparées par HPLC.

III-3-3 Dosage de la LTP1

L'analyse de la quantité de LTP1 a été effectuée par dosage ELISA (**Figure 31**) à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre la LTP1 totale ou la LTP1 acylée sur les malts LH et HH touraillés (Bakan *et al.* 2006). Les résultats ont montré que la totalité de la LTP1 retrouvée est acylée que ce soit pour le malt HH ou le malt LH. Les quantités moyennes de LTP1 n'étaient pas significativement différentes. Le taux d'hydratation ne semble donc pas avoir influencé la quantité de LTP1 extraite.

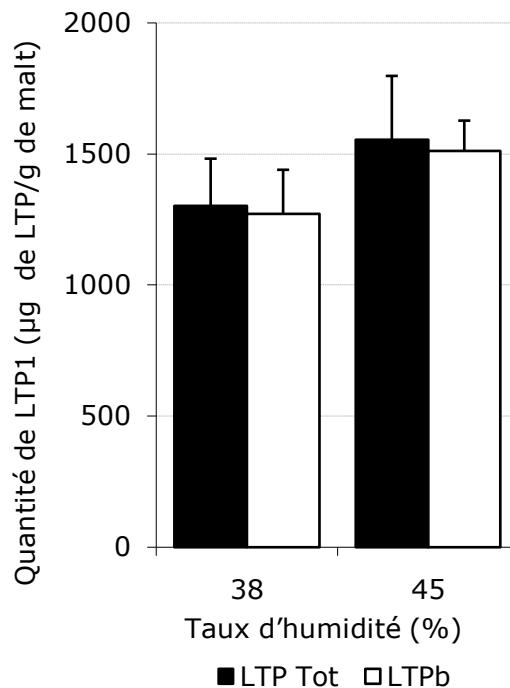


Figure 31. Analyse ELISA de LTP1 d'extraits de malts obtenus à forte ou faible hydratation.

LTP1 totale (colonnes blanches) et LTP1 acylée (colonnes noires) ne présentent aucune différence.

III-3-4 Suivi des modifications de la LTP1 par spectrométrie de masse

Les modifications qui peuvent avoir lieu sur la LTP1 au cours des procédés de maltage et de brassage ont été observées par spectrométrie de masse (**Figure 32**). Les analyses ont montré un grand nombre de formes différentes de la LTP1, à la fois pour le malt HH et le malt LH. Parmi les formes de LTP1 qui ont été observées, il a pu être identifié la LTP1 acylée 1 ou 2 fois. L'identification a été réalisée en utilisant la masse correspondant à la LTP1 native, incrémentée de 294 Da (Bakan *et al.* 2006; Perrocheau *et al.* 2006) ou 2 x 294 Da ce qui

A

Malt LH

9687 = LTP
 9849 = LTP + 162
 9865 = LTP + 162 + 16
 10077 = LTP + 162 + 4alkyl
 10011 = LTP + 2x162
 10027 = LTP + 2x162 + 16
 10141 = LTP + 2x162 + 2alkyl
 10189 = LTP + 3x162 + 16
 10303 = LTP + 3x162 + 2alkyl
 10645 = LTP + 3x162 + 8alkyl
 10497 = LTP + 5x162
 10611 = LTP + 5x162 + 2alkyl
 10448 = LTP + 5x162 + 2alkyl -Tyr C-term
 10562 = LTP + 5x162 + 4alkyl -Tyr C-term
 9801 = LTP + 2alkyl
 9817 = LTP + 2alkyl + 16
 9915 = LTP + 4alkyl
 10029 = LTP + 6alkyl ou LTPc + 4x162 + 6alkyl + 16
 9703 = LTP + 16
 9524 = LTP-Tyr C-term
 9981 = LTPb
 10143 = LTPb + 162
 10485 = LTPb + 162 + 6alkyl
 10599 = LTPb + 162 + 8alkyl
 10305 = LTPb + 2x162
 10321 = LTPb + 2x162 + 16
 10467 = LTPb + 3x162
 10695 = LTPb + 3x162 + 4alkyl
 10971 = LTPb + 4x162 + 6alkyl
 10466 = LTPb + 4x162 -Tyr C-term
 10628 = LTPb + 5x162 -Tyr C-term
 10437 = LTPb + 8alkyl
 10453 = LTPb + 8alkyl + 16
 10274 = LTPb + 8alkyl -Tyr C-term
 9818 = LTPb-Tyr C-term ou LTP + 2alkyl + 16
 10453 = LTPc + 162 + 16
 10681 = LTPc + 162 + 4alkyl + 16
 10795 = LTPc + 162 + 6alkyl + 16
 10893 = LTPc + 162 + 8alkyl
 10615 = LTPc + 2x162 + 16
 10941 = LTPc + 2x162 + 6alkyl
 10957 = LTPc + 2x162 + 6alkyl + 16
 10777 = LTPc + 3x162 + 16
 11217 = LTPc + 3x162 + 8alkyl
 11233 = LTPc + 3x162 + 8alkyl + 16
 11037 = LTPc + 4x162 + 2alkyl
 11443 = LTPc + 5x162 + 6alkyl + 16
 10503 = LTPc + 4alkyl

Malt HH

9687 = LTP
 9703 = LTP + 16
 9849 = LTP + 162
 9963 = LTP + 162 + 2alkyl
 10141 = LTP + 2x162 + 2alkyl
 10483 = LTP + 2x162 + 8alkyl
 9848 = LTP + 2x162 -Tyr C-term
 10189 = LTP + 3x162 + 16
 10303 = LTP + 3x162 + 2alkyl
 10417 = LTP + 3x162 + 6alkyl
 10579 = LTP + 4x162 + 6alkyl
 10693 = LTP + 4x162 + 8alkyl
 10497 = LTP + 5x162
 10725 = LTP + 5x162 + 4alkyl
 9801 = LTP + 2alkyl
 10029 = LTP + 6alkyl
 10045 = LTP + 6alkyl + 16
 9866 = LTP + 6alkyl -Tyr C-term
 9981 = LTPb
 10143 = LTPb + 162
 10371 = LTPb + 162 + 4alkyl
 10485 = LTPb + 162 + 6alkyl
 10533 = LTPb + 2x162 + 4alkyl
 10761 = LTPb + 2x162 + 8alkyl
 10467 = LTPb + 3x162
 10483 = LTPb + 3x162 + 16
 10581 = LTPb + 3x162 + 2alkyl
 10304 = LTPb + 3x162 -Tyr C-term
 10645 = LTPb + 4x162 + 16
 10905 = LTPb + 5x162 + 2alkyl
 11019 = LTPb + 5x162 + 4alkyl
 10856 = LTPb + 5x162 + 4alkyl-Tyr C-term
 11133 = LTPb + 5x162 + 6alkyl
 10339 = LTPb + 6alkyl + 16
 10453 = LTPb + 8alkyl + 16
 9818 = LTPb-Tyr C-term ou LTP + 2alkyl + 16
 10291 = LTPc + 16
 10437 = LTPc + 162
 10551 = LTPc + 162 + 2alkyl
 10795 = LTPc + 162 + 6alkyl + 16
 10893 = LTPc + 162 + 8alkyl
 10909 = LTPc + 162 + 8alkyl + 16
 10615 = LTPc + 2x162 + 16
 10843 = LTPc + 2x162 + 4alkyl + 16
 10941 = LTPc + 2x162 + 6alkyl
 10891 = LTPc + 3x162 + 2alkyl + 16
 10989 = LTPc + 3x162 + 4alkyl
 11103 = LTPc + 3x162 + 6alkyl
 11037 = LTPc + 4x162 + 2alkyl
 11053 = LTPc + 4x162 + 2alkyl + 16
 11085 = LTPc + 5x162
 11427 = LTPc + 5x162 + 6alkyl
 11541 = LTPc + 5x162 + 8alkyl
 10405 = LTPc + 2alkyl + 16
 10731 = LTPc + 8alkyl

B

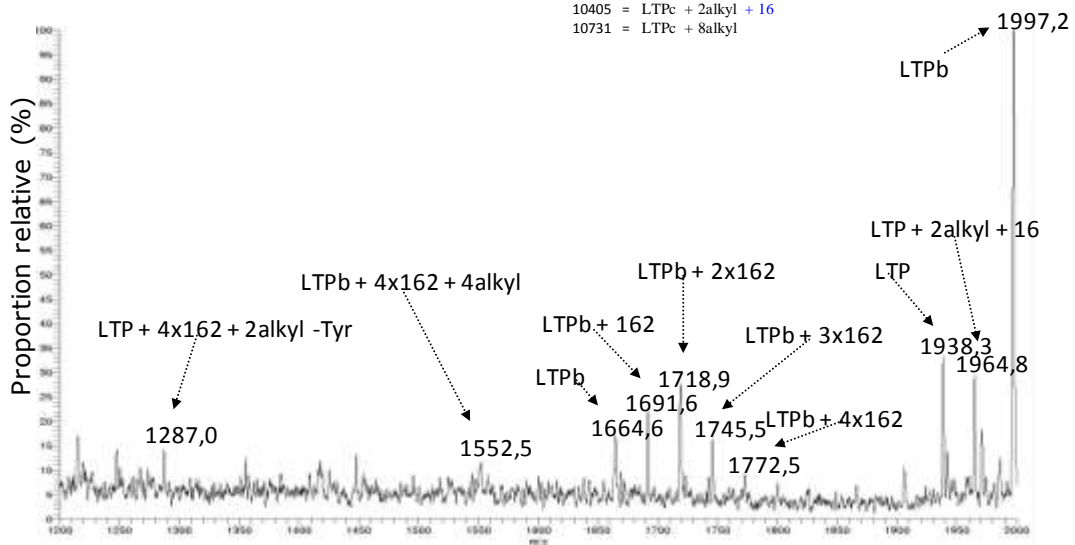


Figure 32. Analyse par spectrométrie de masse des modifications de la LTP1 de malt.

(A) Liste de toutes les masses identifiées et les formes modifiées observées correspondantes dans les malts LH et HH. (B) Exemple d'analyse obtenue sur une portion de chromatogramme.

LTPb = 1 acylation; LTPc = 2 acylations; + $n \times 162$ = n glucosylations; + n alkyl = $n/2$ pont disulfure réduit; +16 = oxydation

correspond à l'ajout de un ou deux allène oxyde à la LTP1. Par ailleurs, de 0 à 5 hexoses liés à la LTP1 native ou acylée ont été observés, cette glycosylation a été identifiée en ajoutant $n \times 162$ Da (Jegou *et al.* 2000; Jégou *et al.* 2001; Perrocheau *et al.* 2006; Bobalova and Chmelik 2007; Chmelik *et al.* 2009) à la masse de la LTP1. L'observation de ces LTP1 glycosylées montrent que suffisamment de sucres sont présents à faible hydratation pour que ce type de modification ait lieu. La LTP1 possède 4 ponts disulfures qui peuvent être réduits lors de l'extraction. La réduction des fonctions thiols des cystéines associées à ces ponts disulfures a été identifiée par des alkylations de 57 Da (Sun *et al.* 2008) augmentant 2 par 2 (soit un incrément de 114 Da associé à 1 pont disulfure réduit). Deux autres formes de la LTP1 ont pu être observées : une oxydation de la méthionine identifiée par une augmentation de masse de 16 Da (soit la masse d'un atome d'oxygène), et une LTP1 dépourvue de résidu Tyrosine à l'extrémité C-terminale identifiée par la diminution de masse de 163 Da (Chmelik *et al.* 2009). Il faut noter qu'une partie du signal obtenu en LC-MS n'a pas permis d'identification. En effet, dans certains pics, le rapport signal/bruit obtenu en spectrométrie de masse a rendu l'identification de composés compliquée (**Figure 33**). Il est possible que ces zones correspondent également à des formes de LTP1, mais au vu du nombre très important de modifications possible à la suite de réactions telles que la réaction de Maillard ces espèces moléculaires ne sont pas présentes en quantités suffisamment importantes pour être détectées par spectrométrie de masse dans nos conditions d'analyse (courant ionique faible, rapport signal/bruit faible). Toutes ces formes de LTP1 ont été observées dans les malts HH comme dans les malts LH.

III-3-5 Suivi des glycosylations par la méthode à l'O-phthalaldéhyde

Les glycosylations dues à la réaction de Maillard sont principalement observées sur les amines des lysines de la LTP1 (Chmelik *et al.* 2009). L'analyse des amines libres a été effectuée sur les extraits de LTP1 de malts HH et LH touraillés puisque la glycation de cette protéine a lieu principalement durant l'étape de touraillage. Les résultats (**Figure 34**) ont montré une quantité d'amines libres plus importante pour la LTP1 d'orge que pour la LTP1 des malts. La LTP1 d'orge a été utilisée comme témoin pour lequel l'ensemble des amines ont été considérées comme libres. Les proportions d'amine libre des malts ont été calculées en fonction de cette quantité témoin d'amine libre correspondant à 100 %. Ainsi, dans les malts, environ 80 % des amines de la LTP1 ont été observées comme libres montrant une différence significative par rapport à la LTP1 d'orge. En revanche, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre le malt LH et le malt HH.

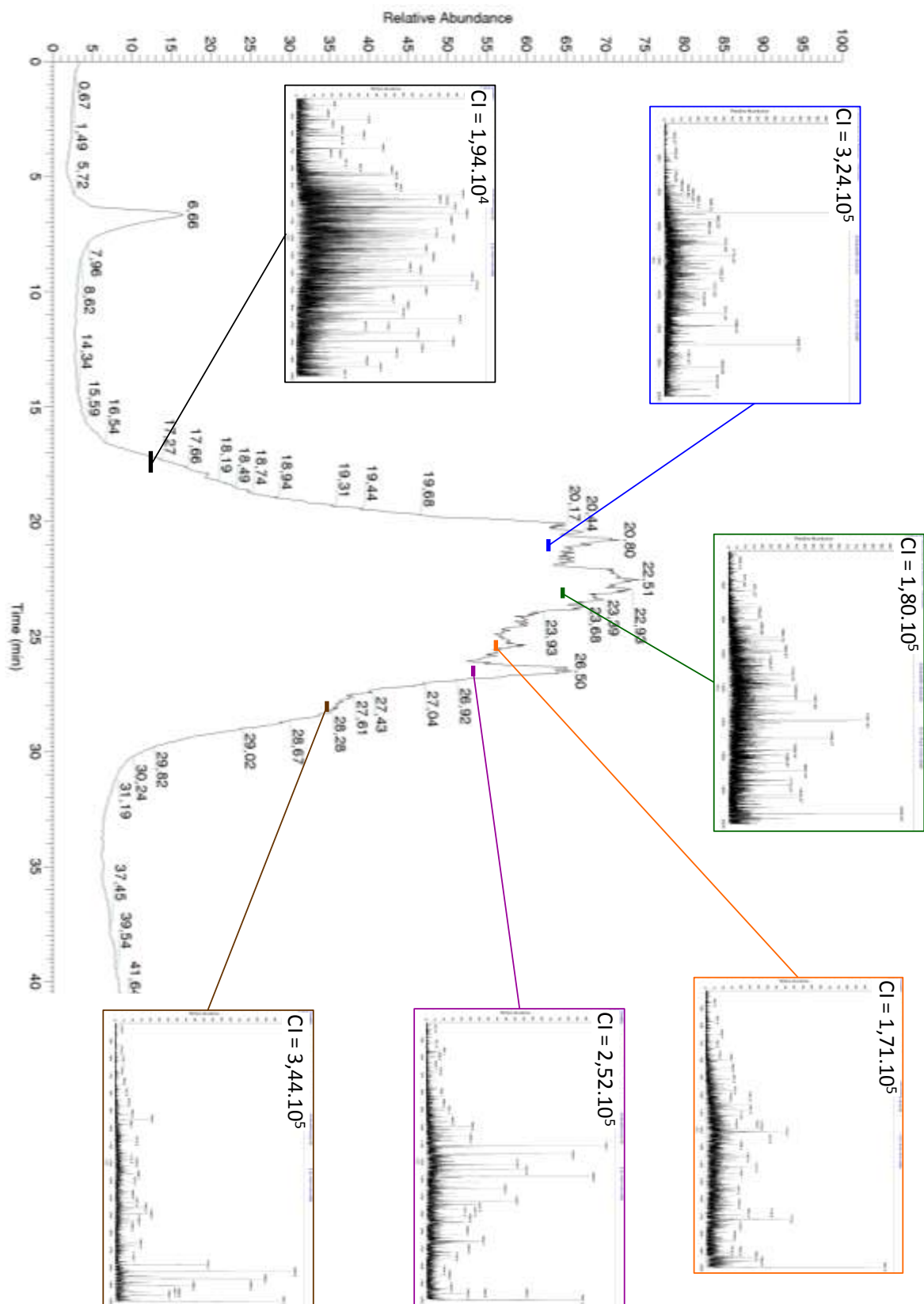


Figure 33. Chromatogramme obtenu à partir d'un malt après séparation par RP-HPLC couplée à un spectromètre de masse.

Les traits de couleur correspondent à différentes zones pour lesquelles des spectres de masses sont présentés. CI = Courant ionique

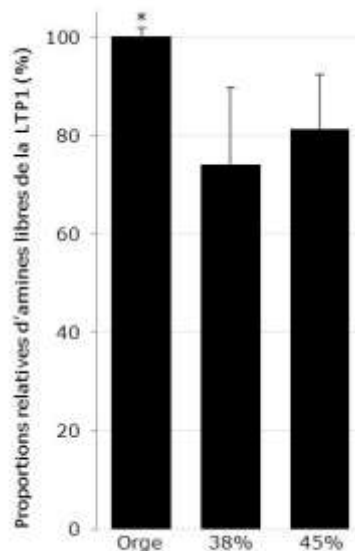


Figure 34. Analyse des glycosylations de la LTP1.

Analyse des glycosylations de la LTP1 par détermination des proportions relatives en amines libres des extraits de LTP1 des malts LH et HH comparé à l'extrait de LTP1 d'orge.

* = Significativement différent.

III-3-6 Suivi des glycosylations par fluorescence des composés avancés de la réaction de Maillard

Les composés avancés de la réaction de Maillard peuvent présenter de la fluorescence (Andersen and Mortensen 2008). Les extraits de LTP1 d'orge et des malts touraillés ont été analysés pour détecter cette fluorescence. Dans un premier temps la longueur d'onde d'émission a été choisie à 450nm d'après des travaux antérieurs (Birlouez-Aragon *et al.* 1998; Jing and Kitts 2004; Andersen and Mortensen 2008), cela nous a permis d'obtenir un maximum d'excitation à 330 nm en effectuant des spectres d'excitation. Non-modifiée par la réaction de Maillard, la LTP1 d'orge a montré un signal de fluorescence non-délectable aux longueurs d'onde observées (**Figure 35**). En revanche, les spectres des malts ont présentés un fort signal de fluorescence avec un maximum à environ 440 nm. Comme cela a été observé lors de l'analyse des amines libres, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre la LTP1 du malt HH et la LTP1 du malt LH, les spectres d'émission de fluorescence de la LTP1 des deux malts étant parfaitement superposés.

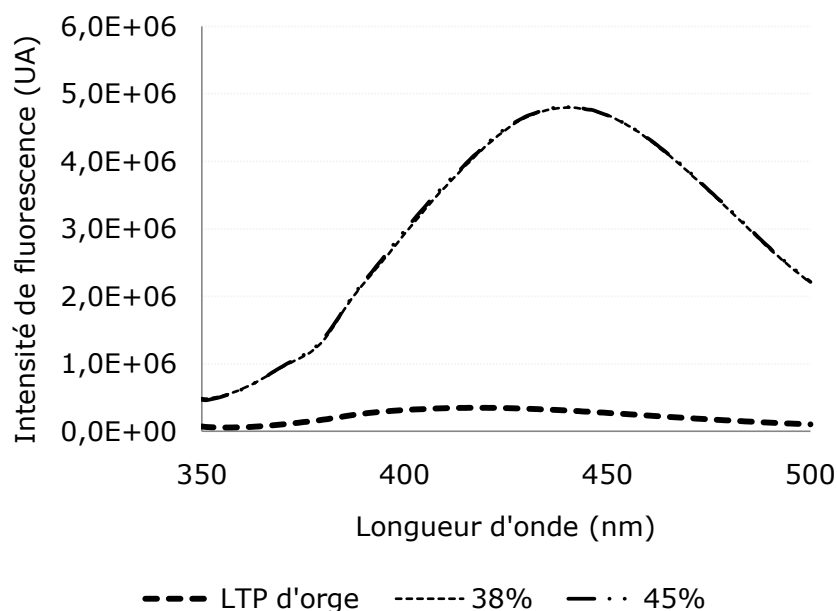


Figure 35. Analyse des glucosylations de la LTP1.

Analyse des glucosylations de la LTP1 par suivi des composés de Maillard avec les spectres d'émission de fluorescence des extraits de LTP1 des malts LH et HH. L'excitation a été fixée à 330nm.

III-4 Discussion

Les modifications et la diffusion de la LTP1 ne sont pas affectées par la modification du diagramme de trempage. En effet, l'ensemble des modifications de la LTP1 sont retrouvées à la fois dans les malts LH et HH, et ces modifications sont retrouvées en proportions équivalentes quelle que soit la technique utilisée pour les analyser.

Par ailleurs, nos études ont mis en évidence la très grande diffusivité de la LTP1 dans l'albumen au cours du maltage et en particulier au cours de la trempage contrairement au résultat obtenu avec les enzymes. Sans pouvoir le démontrer, des travaux avaient suggérés que la LTP1 doit diffuser lors du maltage pour subir ses modifications (Perrocheau *et al.* 2006; Bobalova and Chmelik 2007; Gorjanovic 2010). Il est important de noter que les nsLTP sont de petites protéines extracellulaires (Douliez *et al.* 2000; Carvalho and Gomes 2007; Gorjanovic 2007) localisées dans les parois et apoplastes. Chez *Arabidopsis*, il a été démontré que la protéine Dir1, une LTP localisée dans l'apoplaste, était impliquée dans la résistance systémique acquise (Maldonado *et al.* 2002). Cette capacité à diffuser dans les organes végétaux est en accord avec la forte diffusivité de la LTP1 observée dans l'albumen avant que les parois des β -glucanes ne soient hydrolysées.

Des études antérieures menées au laboratoire ont démontré que la LTP1 native ne possède pas de propriétés favorisant la formation de mousse (Jégou *et al.* 2000; Jégou *et al.* 2001). C'est lors du maltage mais également lors du brassage que la LTP1 subit des modifications lui donnant des caractéristiques idéales pour la formation de cette mousse (Sørensen *et al.* 1993; Jégou *et al.* 2001; Perrocheau *et al.* 2006). Par ailleurs, en utilisant différentes techniques, nous nous sommes aperçus que ces modifications sont assez complexes. En effet, comme l'ont montré les résultats du paragraphe III-3-6, la réaction de Maillard a produit des composés avancés qui comportent des propriétés fluorescentes. Cette même réaction a également conduit à la glucosylation de la LTP1 comme l'ont montré les résultats de LC-MS et d'amine libre. Cette dernière analyse a par ailleurs montré une proportion d'amine modifiée au cours du maltage relativement faible par rapport au nombre total d'amine de la LTP1. Ce résultat suggère que ces amines sont protégées au cours du maltage, ce qui les rendrait inaccessible à la réaction de Maillard. En effet, au cours du maltage des lipides sont oxydés et permettent la formation d'aldéhydes d'origine enzymatique (lipoxygénase, hydroperoxyde lyase) ou non-enzymatique (peroxydation) à partir d'acides gras polyinsaturés (Kaukovirtanorja *et al.* 1993)). Ces aldéhydes pourraient former des bases de Schiff avec des amines des protéines, ces dernières n'étant pas alors modifiées au cours du touraillage par la réaction de Maillard. Dans cette hypothèse et compte tenu de la méthode de dosage OPA, qui implique une réaction irréversible, les amines libres de la LTP1 que nous avons révélé peuvent provenir à la fois des amines libres de la LTP1 et des amines ayant formé des bases de Schiff, réversibles, avec des aldéhydes (**Figure 36**).

C'est au cours des diagrammes de trempe qui comprennent des phases de sous-eau et sous-air que des différences d'oxydation pourraient être observées entre malts faiblement et fortement hydratés. En effet, ce procédé peut entraîner des phénomènes d'hypoxie (sous-eau) et d'hyperoxie (sous-air), tous deux générateurs de stress oxydant (Benech-Arnold *et al.* 2006; Borisjuk *et al.* 2007). Nos résultats semblent donc indiquer que les diagrammes de trempe (alternance sous-air, sous-eau) ne modifient pas uniquement le taux d'hydratation mais induisent également d'autres phénomènes physiologiques, tel que le stress oxydant, susceptibles de modifier les molécules importantes pour la qualité des malts (protéines, lipides).

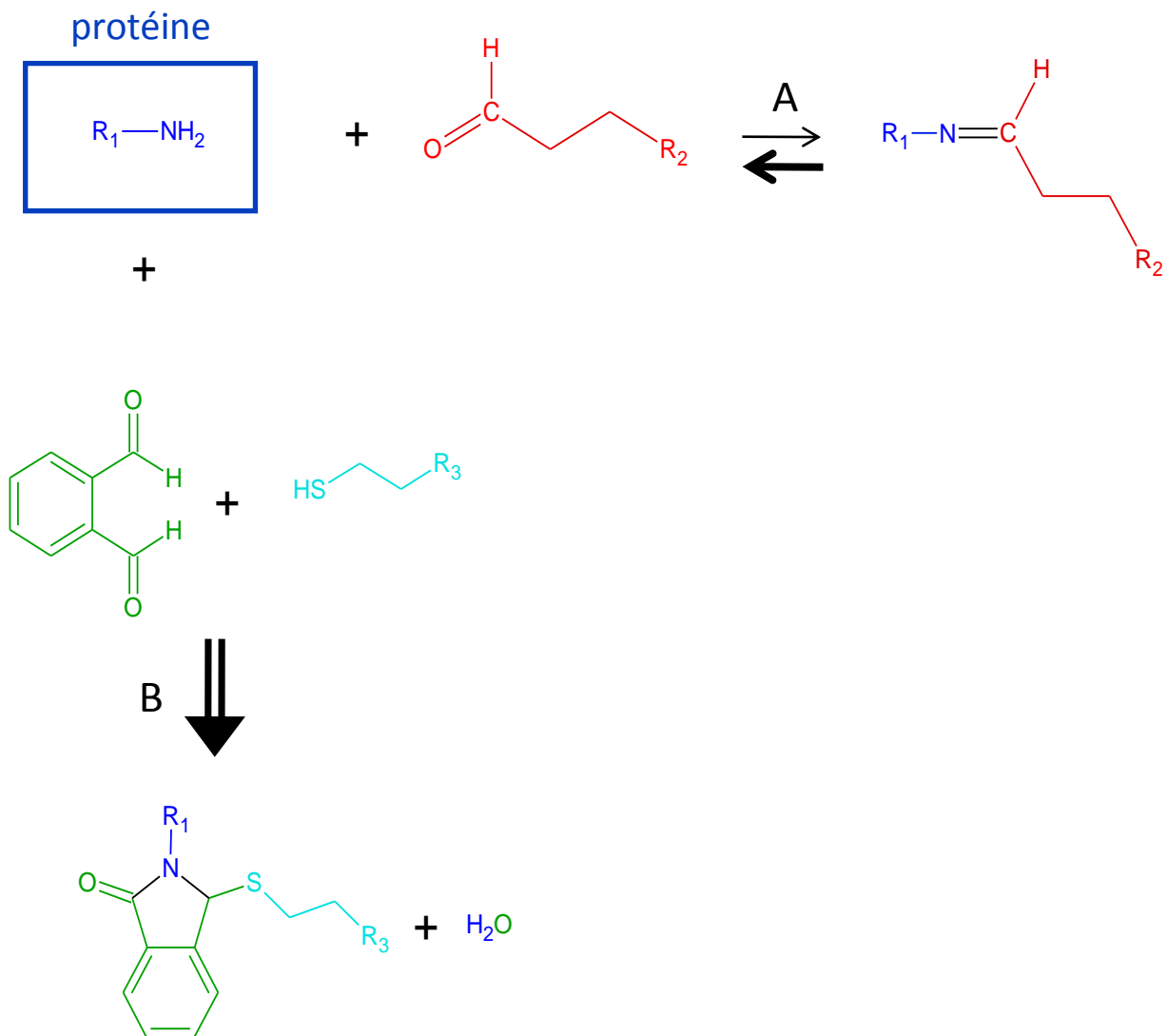


Figure 36. Réaction d'une base de Schiff avec une amine.

Lorsqu'un aldéhyde de l'orge ou du malt est présent, la réaction se déroule en équilibre (A). Lorsque l'o-Phtaldialdéhyde est présent, l'équilibre (A) est déplacé (B) pour permettre la formation d'un composé stable.

III-5 Conclusion

Les différentes analyses des modifications de la LTP1 et de sa diffusion lors de la germination ont toutes abouties à la même conclusion : un malt faiblement hydraté se trouve dans des conditions qui modifient les caractéristiques de la LTP1 d'orge, lui donnant ainsi les propriétés pro-mousse recherchées par les malteurs et brasseurs. En effet, grâce à la méthode d'extraction de la LTP1 qui a été réalisée de façon à mimer l'étape d'ébullition du moût, la LTP1 qui a été étudiée a subi toutes les étapes connues comme ayant une influence sur sa conformation et ses propriétés physico-chimiques (Jégou *et al.* 2001; Perrocheau *et al.* 2005;

Bakan *et al.* 2006; Bobalova and Chmelik 2007; Gorjanovic 2007; Gorjanovic 2010). Cependant certaines observations (amines libres et fluorescence des composés de Maillard) nous ont mené à envisager un impact des diagrammes de trempe autre que l'hydratation. Des analyses des composés issus de différents métabolismes du grain d'orge en cours de germination permettraient d'avoir plus d'information à ce sujet.

Chapitre IV. Caractérisation des assises cuticulaires de quatre variétés d'orge en relation avec leur comportement à faible hydratation

IV-1 Introduction

Plusieurs études ont mis en évidence des différences de prise en eau ou de diffusion d'eau dans le grain à la fois entre variétés (McEntyre *et al.* 1998; Molina-Cano *et al.* 2002; Swanston *et al.* 2006; Bryce *et al.* 2010) et entre sites de culture pour une même variété (Molina-Cano *et al.* 2002; Swanston *et al.* 2006). Dans tous les cas, la cinétique de prise en eau se déroule généralement en deux phases : une hydratation rapide de l'embryon et les couches externes (glumelles) durant les premières heures de trempe dans un premier temps. Dans un deuxième temps (entre 12 et 48h de trempe), l'eau diffuse vers l'albumen amylicé (McEntyre *et al.* 1998; Molina-Cano *et al.* 2002). De plus, d'après ces études le scutellum et le sillon sont des sites préférentiels d'entrée de l'eau dans le grain (**Figure 16, p 27**). Ces travaux mettent en évidence une barrière à la diffusion de l'eau se situant entre les glumelles et la couche à aleurone. Or cette région contient les assises cuticulaires du grain.

Il existe en effet à la surface des organes aériens des plantes supérieures des assises cuticulaires appelées cuticules (Holloway 1982; Jeffree 1996) qui leur permettent de se protéger des pathogènes (Kolattukudy 1985) et de la dessiccation (Riederer and Schreiber 2001; Samuels *et al.* 2008). Cette cuticule est composée de cutine et de cires qui possèdent des compositions variables non seulement en fonction du végétal mais également en fonction des organes d'une même plante (Jeffree 1996). Sur l'orge, de nombreuses études ont été réalisées sur la composition des cires de feuilles (Von Wettstein-Knowles 1974; Baker and Hunt 1986; Hollenbach *et al.* 1997; Reynhardt 1997; Conte *et al.* 2003; Richardson *et al.* 2005; Shepherd and Wynne Griffiths 2006) montrant une proportion d'alcool C26 supérieure à 50%, les alcools étant la classe la plus fortement représentée allant jusqu'à plus de 87% de la composition totale (Reynhardt and Riederer 1994; Simanova *et al.* 2005). En revanche, la composition des cires du grain d'orge n'ont pas été décrites, seuls certains composés (alkylresorcinols et dicétones) ont été analysés individuellement (Garcia *et al.* 1997; King and von Wettstein-Knowles 2000). De même, peu d'informations sont disponibles pour la composition des cutines de grain d'orge pour laquelle seuls Espelie *et al.* (1979) ont mené une étude sur le grain entier. Ils ont ainsi observé que les cutines de grains d'orge sont majoritairement composés d'acides gras C18 époxydés et C16 dihydroxylés.

L'objectif durant cette thèse a été de caractériser les assises cuticulaires de quatre variétés d'orge sur grain entier et dans différents tissus du grain. Les quatre variétés ont été

choisies d'après des observations d'hydratabilité différentes à l'échelle industrielle (Concerto, Sebastian, Esterel et Cervoise de la moins hydratable à la plus hydratable).

IV-2 Matériels & Méthodes

IV-2-1 Suivi de l'imbibition des grains d'orge de quatre variétés

Pour suivre la prise d'eau des grains d'orge de différentes variétés (Cervoise, Concerto, Esterel et Sebastian), des grains ont été pesés puis placés en immersion dans de l'eau. Au bout de 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 8 h, ou 24 h les grains ont été égouttés sur un papier absorbant pour éliminer l'eau de surface et pesés à nouveau.

IV-2-2 Coloration des enveloppes hydrophobes

Des coupes d'orge de quatre variétés (Cervoise, Concerto, Esterel et Sebastian) fixées dans la paraffine (voir chapitre II) ont été colorées avec du rouge soudan IV (Scarlet red, Fluka). La solution de rouge soudan a été préparée à 1 % dans du propylène glycol (Chiffelle and Putt 1951) dans un bain d'eau chaude, puis filtrée pour éliminer les particules non-solubilisées. Les coupes ont été colorées pendant 20 min puis l'excès de colorant éliminé avec de l'éthanol à 70%. Pour chaque échantillon, environ 20 mesures/coupe ont été effectuées, 2 ou 3 coupes/grain observées, et 3 grains par variété ont été analysés. L'observation a été effectuée en utilisant un microscope Zeiss Axiovert 135M (Zeiss, Allemagne) et les images ont été acquises au format TIFF avec une caméra Retiga 2000R en utilisant le logiciel Archimed (Zeiss). Les mesures d'épaisseur de cutines ont été réalisées en utilisant le logiciel ImageJ avec une mesure référence basée sur du papier comportant une grille standardisée enregistrée dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus ont été analysés statistiquement pour comparer les moyennes des mesures.

IV-2-3 Extraction des cires de surface des grains d'orge

Des lots de 40 grains ont été pesés puis placés dans 50 mL de chloroforme sous agitation pendant 10 min. Le chloroforme a été transféré dans un autre récipient et, après évaporation du chloroforme à l'agitateur rotatif, les cires ont été reprises dans un minimum de volume de chloroforme et transférées dans des tubes en pyrex où le solvant est à nouveau

éliminé sous flux d'azote. Les cires ont finalement été reprises dans 250 μ L de chloroforme pour être dérivées et analysées par chromatographie en phase gazeuse (GC).

IV-2-4 Dissection des enveloppes sans albumen ni embryon

Les enveloppes ont été isolées du reste de 100 grains (albumen et embryon). Pour cela, des grains entiers ont été placés dans l'eau pendant 72 h et le maximum d'albumen ainsi que l'embryon ont été délicatement décollés des enveloppes avec une lame de scalpel en prenant soin de conserver le scutellum. Les enveloppes ont ensuite été lavées 4 à 5 fois à l'eau distillée avec des bains à ultrasons pour éliminer le maximum d'albumen restant. Pour s'affranchir des lipides provenant des membranes, un traitement de 1 h avec du propan-1-ol à 70 % puis un lavage avec du chloroforme/méthanol (2:1) a été réalisé (Morrison and Coventry 1985).

IV-2-5 Dissection des enveloppes du grain d'orge

Les différentes fractions (**Figure 37 et 38**) du grain d'orge ont été obtenues en effectuant des dissections progressives. Les grains ont été placés 1 nuit dans de l'eau à 4°C ce qui a permis de séparer les glumelles dorsales et ventrales du grain et d'enlever l'embryon pour éviter toute germination. Toutes les autres fractions du grain ont été obtenues grâce à une dissection réalisée manuellement sous loupe binoculaire : les sous-glumes 1 et 2 qui sont des fractions enrichies en péricarpe et testa respectivement, le sillon qui anatomiquement est différent des autres enveloppes, et le scutellum qui est une zone privilégiée de transition de l'eau entre l'embryon et l'albumen.

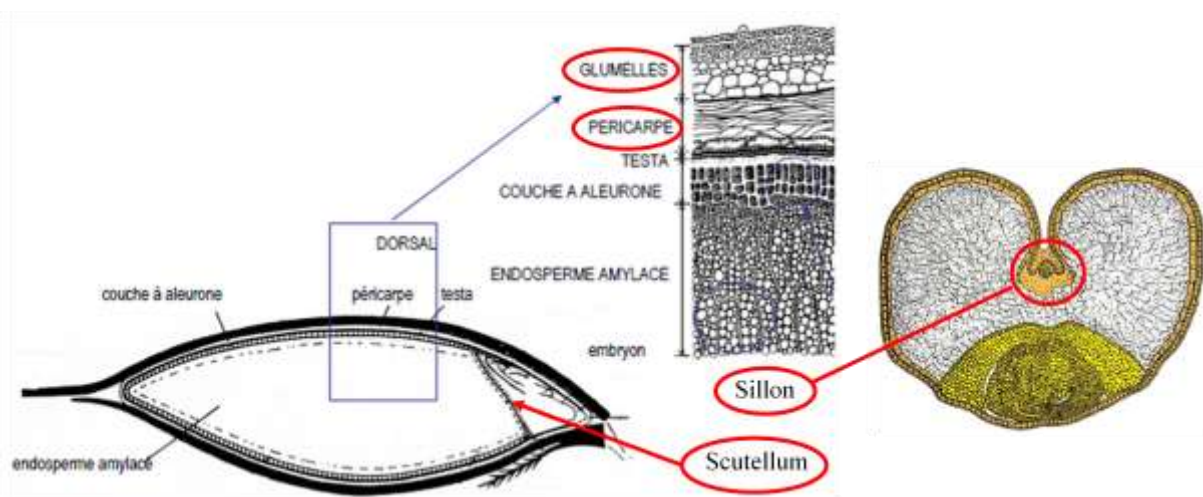


Figure 37. Fractions du grain d'orge disséquées pour analyses compositionnelles

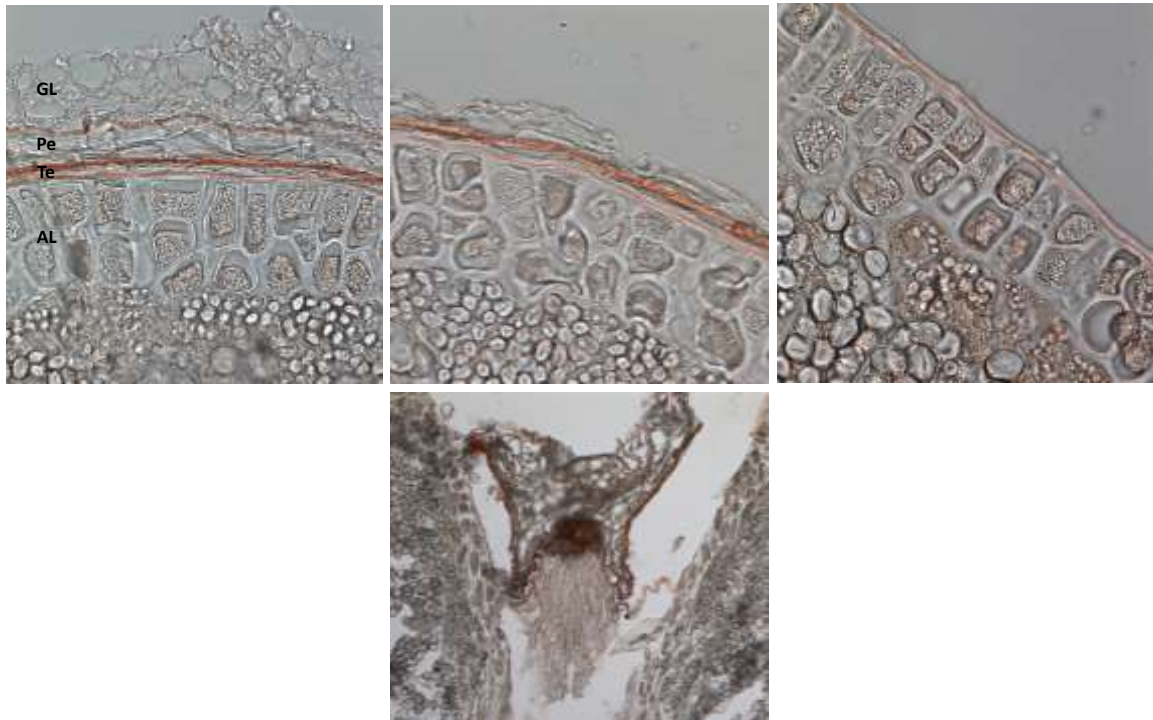


Figure 38. Coupes de grain d'orge colorées au rouge soudan.

De gauche à droite : coupe d'orge non-disséqué ; coupe d'orge dont les glumelles et une première épaisseur de péricarpe (sous-glumes 1) ont été enlevées ; coupe d'orge dont une deuxième épaisseur de péricarpe comprenant de la testa (sous-glumes 2) a été enlevée. Deuxième ligne : sillon en coupe transversale. GL = glumelles ; Pe = péricarpe ; Te = testa ; AL = aleurone.

Les cires et les cutines ont été séparées en réalisant des délipidations avec du dichlorométhane pendant 30 min suivies de plusieurs bains ultrasons, le dichlorométhane contenant les cires étant transféré dans d'autres tubes. Les tubes contenant les cires dans le dichlorométhane et les tubes contenant les cuticules délipidées ont ensuite été placés sous flux d'azote pour permettre l'évaporation du solvant.

IV-2-6 Dépolymérisation et dérivation des cires et cutines

Les cutines ont été dépolymérisées et les fonctions carboxyliques méthylées en ajoutant du BF_3 à 15 % dans du méthanol (Sigma) et en plaçant les tubes à 60°C pendant 1 nuit (environ 15 h) après avoir ajouté de l'acide margarique (acide gras C17) comme étalon interne. Au bout des 15 h, la réaction a été arrêtée en ajoutant deux volumes d'une solution saturée en NaCl. Ensuite, trois extractions successives avec du dichlorométhane ont été réalisées et rassemblées. Ces extraits ont été lavés avec de l'eau 4 à 5 fois pour éliminer les sels et le méthanol. Du sulfate de sodium anhydre a été ajouté pour sécher la phase organique et cette phase a ensuite été évaporée sous flux d'azote. La dérivation des fonctions

hydroxylées a finalement été réalisée avec du N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacétamide (BSTFA) (Sigma) pendant 1 h à 70°C et après évaporation les échantillons ont été analysés par chromatographie gazeuse associée à un détecteur à ionisation de flamme ou à une spectrométrie de masse (GC-FID ou GC-MS).

Les cires ont seulement été silylées avec le BSTFA dans les mêmes conditions que les échantillons contenant des cuticules délipidées et du tétracosane (alcane C24) a été ajouté comme étalon interne à la place de l'acide margarique.

IV-2-7 Analyse de la composition des cutines et des cires par chromatographie en phase gazeuse

Les cires et cutines ayant subies des dérivations ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse associée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) (Hewlett Packard 5890) ou à une spectrométrie de masse (GC-MS) (Thermo Trace GC Ultra couplé à un Thermo DSQII). Les échantillons repris dans du cyclohexane après la dérivation ont été injecté dans les appareils de chromatographie. La température de l'injecteur a été fixée à 250°C pour les analyses des acides gras de cutines et 220°C pour les cires et pour le détecteur de la GC-MS la source d'ions a été fixée à 250°C en mode ionisation positive, la ligne de transfert à 300°C pour les acides gras de cutines et 320°C pour les cires et les spectres de masse ont été enregistrés pour les ions compris entre 50 et 650 m/z. Pour séparer les différents composants, deux gradients de température ont été appliqués selon si l'échantillon à analyser était des composés de cires ou des composés de cutines. Pour les analyses en GC-MS, une colonne capillaire DB-5MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent) a été utilisée avec un débit de gaz vecteur à 1mL/min, alors que pour les analyses en GC-FID, une colonne capillaire DB-5MS (30 m x 0,32 mm x 0,1 µm, Agilent) a été utilisée avec un débit de 2 mL/min.

Pour les échantillons contenant des acides gras de cutine, le gradient de température est décrit **Figure 39A**, pour les cires le gradient utilisé est décrit **Figure 39B**.

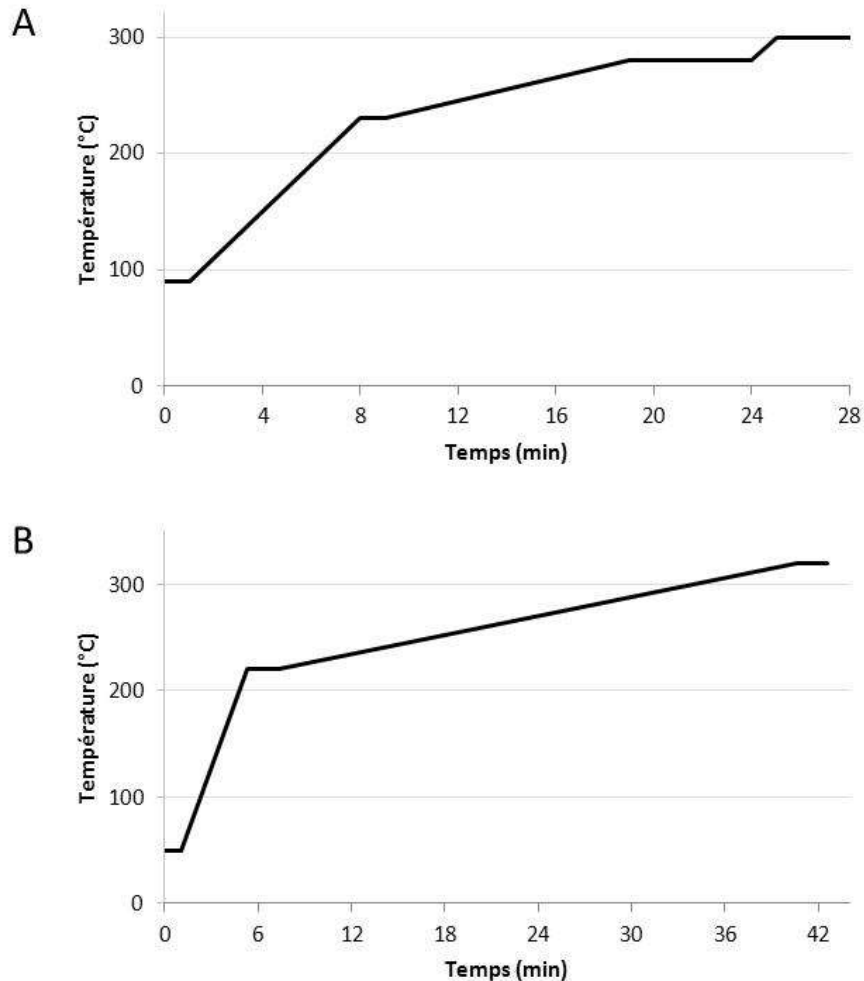


Figure 39. Gradients de température utilisés pour la séparation des composés de cires et cutines des grains d'orge.

IV-3 Résultats

IV-3-1 Mesure de l'épaisseur des cuticules de quatre variétés d'orge

Les mesures d'épaisseur des cuticules des différentes variétés d'orge étudiées ont été analysées (**Figure 40**) grâce à des observations au microscope après coloration des zones hydrophobes par du rouge soudan. Les mesures pour chaque épaisseur de cutine ont été comparées. Ces mesures ont montré que les cuticules entre l'aleurone et la testa (Al/Te) et les cuticules entre le péricarpe et les glumelles (Pe/Gl) sont plus fines que celle présente entre la testa et le péricarpe (Te/Pe). En effet, nous avons mesuré pour la cuticule Al/Te une épaisseur d'environ 0,7 μm pour les différentes variétés excepté Sebastian pour laquelle elle mesure 0,64 μm . La cuticule Pe/Gl mesure environ 0,57 μm d'épaisseur pour les différentes variétés

excepté Concerto pour laquelle elle mesure 0,65 μm . Enfin, la cuticule Te/Pe a présenté une épaisseur très variable en fonction de la variété (entre 1 et 1,55 μm d'épaisseur) les variétés Esterel et Sebastian étant plus fines que les variétés Cervoise et Concerto. Ces analyses ont montré que la variété Sebastian possède les cuticules les plus fines parmi les 4 variétés testées à l'inverse de la variété concerto qui possède les cuticules les plus épaisses, notamment au niveau de la séparation Pe/Gl.

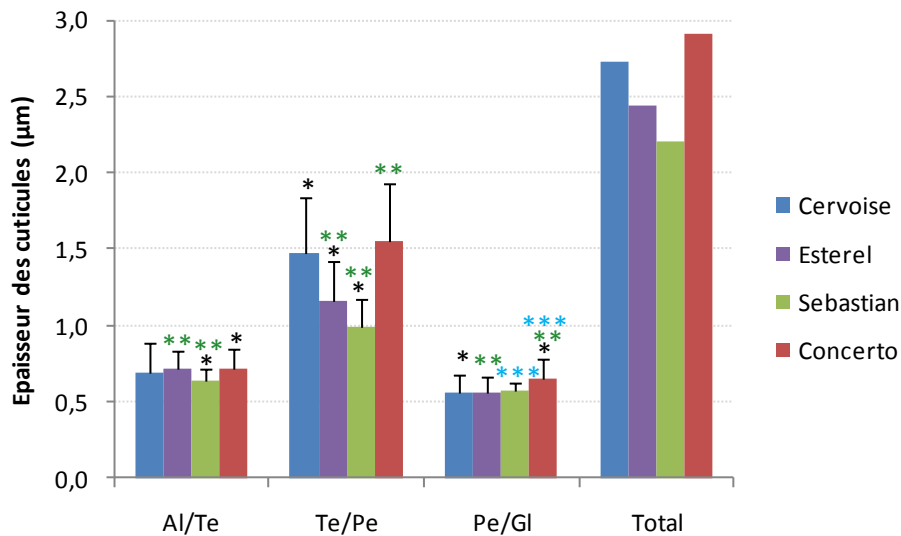


Figure 40. Mesure des épaisseurs des cutines de grains d'orge de 4 variétés.

Les mesures ont été effectuées sur des coupes transversales de grains d'orge pour chaque variété. Al/Te = cutine entre la couche à aleurone et la testa ; Te/Pe = cutine entre la testa et le péricarpe ; Pe/Gl = cutine entre le péricarpe et les glumelles. Au sein d'une épaisseur de cutine, les variétés présentant des différences significatives ($p < 0,001$; test de Student, $n=30$) sont surmontées d'étoiles identiques. Les barres verticales représentent les écarts types.

IV-3-2 Composition en acides gras des cutines de "grains entiers" des quatre variétés d'orge

La composition des cuticules délipidées des "grains entiers" (enveloppes sans albumen ni embryon) des différentes variétés d'orge a montré la présence concomitante d'acides gras hydroxylés et époxydés en C16 et C18 (**Figure 41**) comme cela a été décrit dans la littérature (Kolattukudy 1996). Les 3 composés majoritaires sont le 18OHC18:1 (54-67 %), le 18OHépoxyC18:0 (19-35 %) et le 16OHC16:0 (10-15 %) comme décrit par Espélie *et al.* (1979). En ce qui concerne l'analyse des différentes variétés, Cervoise, Esterel et Sebastian n'ont pas présentés de différences significatives. En revanche, la variété Concerto comportait significativement moins de 18OHC18:1 et de 16OHC16:0. De plus, la teneur en

18OHépoxyC18:0 semble être plus importante dans la variété Concerto, mais l'analyse statistique indique que cet écart n'est pas significatif.

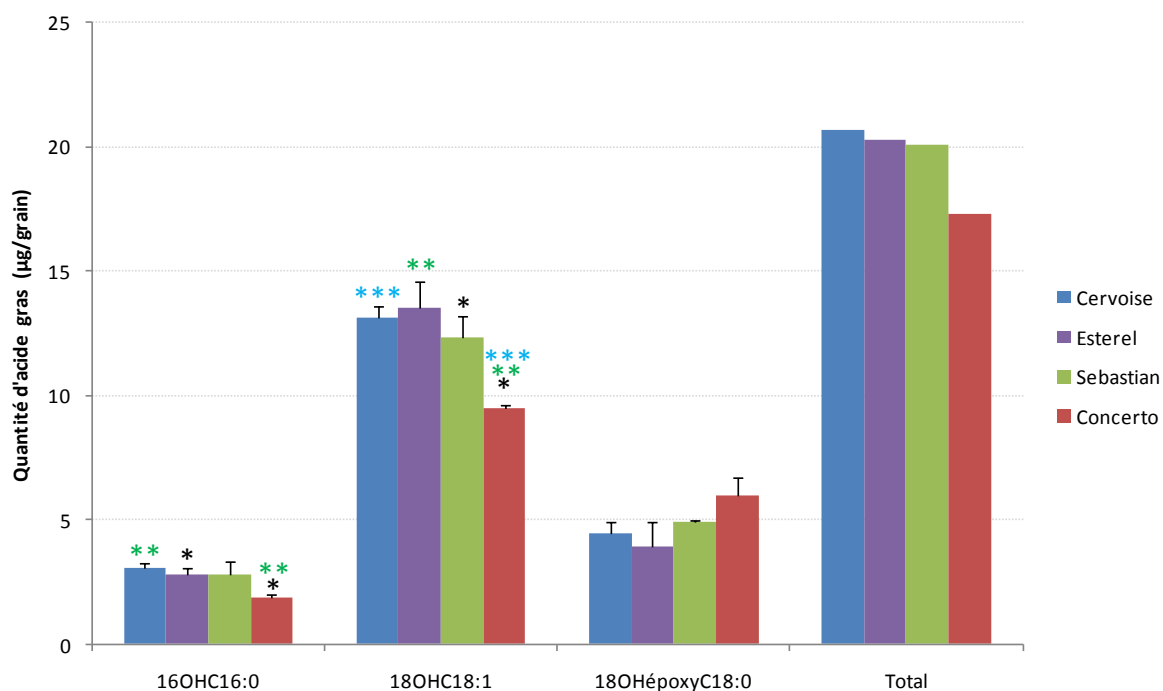


Figure 41. Composition en acides gras hydroxylés et époxydés des cutines de grains d'orge de 4 variétés.

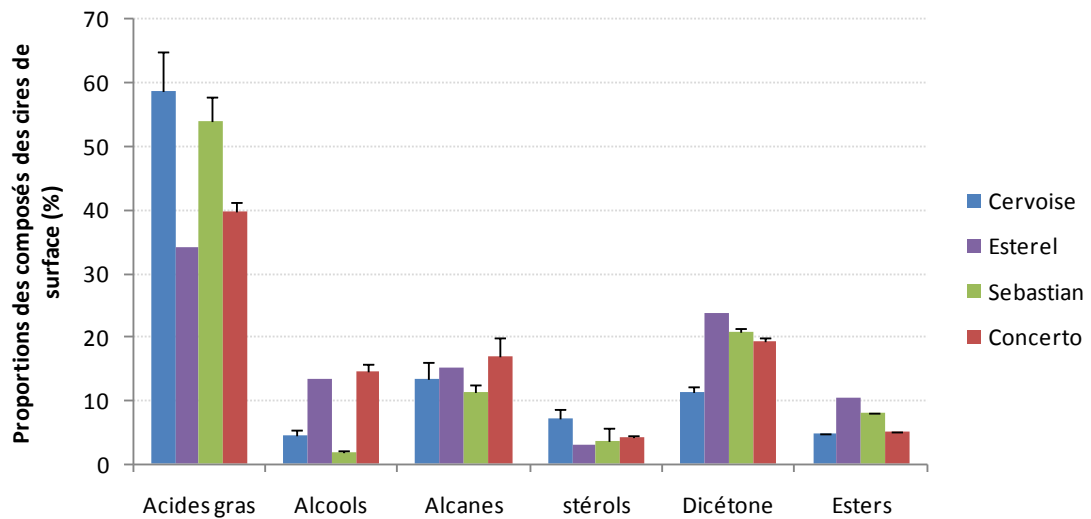
Quantités d'acides gras hydroxylés et époxydés retrouvées pour 1 grain d'orge des variétés Cervoise, Esterel, Sebastian et Concerto. Au sein d'un composé de cutine, les variétés présentant des différences significatives ($p < 0,05$; Test de student) sont surmontées d'étoiles identiques. Les barres verticales représentent les écarts types.

IV-3-3 Composition des cires de surface des quatre variétés d'orge

La composition des cires de surface des 4 variétés a été analysée par chromatographie en phase gazeuse (**Figure 42**). Plusieurs classes de composés ont été identifiées : les acides gras, les alcools, les alcanes, les stérols et les phénols. Cette composition est en accord avec les résultats obtenus sur les feuilles d'orges pour lesquelles des alcools, alcanes et acides ont majoritairement été retrouvés (Conte *et al.* 2003; Richardson *et al.* 2005). Pour toutes les variétés étudiées, les acides gras ont représenté la classe majoritairement observée représentant entre 30 et 60 % de la totalité des composés selon les variétés. Les dicétones, alcanes, esters et alcools ont chacun représenté une proportion significative des cires pour les 4 variétés, l'alcool C26 représentant à lui seul la majeure partie des quantités d'alcool retrouvées, ce qui correspond à des proportions proches de celles observées dans les feuilles

d'orge (Von Wettstein-Knowles 1974; Baker and Hunt 1986; Reynhardt 1997). Nous avons observé des différences de composition entre variétés : les variétés Concerto et Esterel comportaient moins d'acides gras que les variétés Cerveise et Sebastian (environ un tiers de moins), à l'inverse ils étaient plus riches en alcools (environ 3 fois plus). Cerveise a montré une proportion plus faible de dicétones que les autres variétés. Peu de différence ont été observées pour les quantités de stérols d'alcanes et d'esters.

A



B

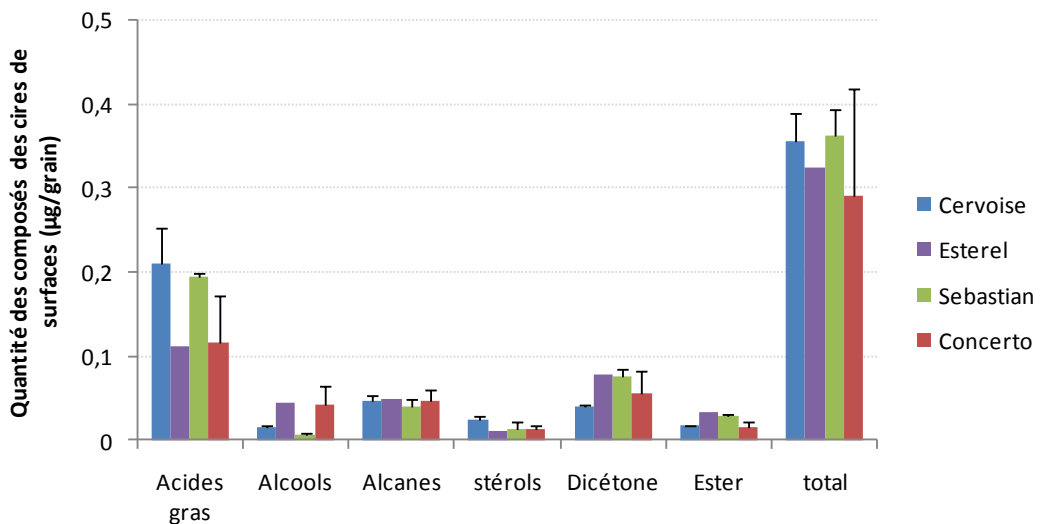


Figure 42. Composition des cires de surface de grains d'orge de 4 variétés.

(A) Proportions des différentes classes de composés retrouvés dans les cires d'orge des variétés Cerveise, Esterel, Sebastian et Concerto. (B) valeurs quantitatives pour ces mêmes variétés d'orge. Moyennes de deux répliques. Les barres verticales représentent les écarts types.

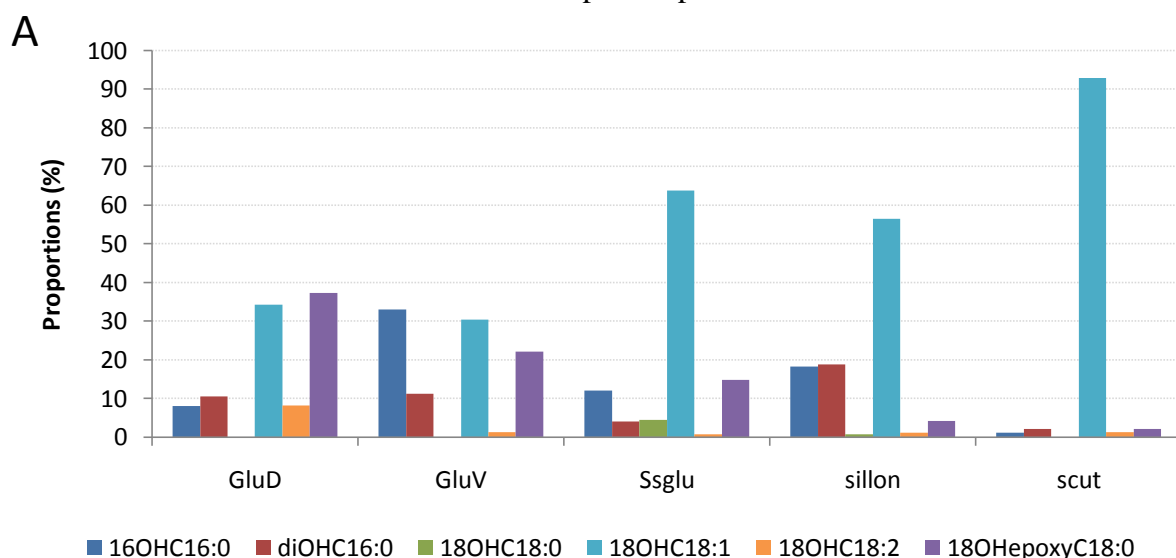
IV-3-4 Composition en acides gras des cutines des fractions périphériques isolées des quatre variétés d'orge

La composition des acides gras des cutines des différentes fractions périphériques isolées de grain d'orge a été analysée pour les variétés Sebastian et Cervoise (**Figure 43**). Comme pour la composition de cutine du "grain entier", les composés 18OHC18:1, 18OHépoxyC18:0 et 16OHC16:0 constituent les composés majoritaire. La dissection ayant permis d'obtenir des tissus très enrichis en cutine, un meilleur rapport signal/bruit a pu être observé. En conséquence, les composés minoritaires diOHC16:0, 18OHC18:0 et 18OHC18:2 qui n'étaient pas détectés dans les compositions de "grains entiers" ont été observés lors de l'analyse des fractions isolées.

Au sein d'une même variété, peu de différences de composition sont observées entre les cutines des glumelles dorsales et ventrales. En revanche, les autres fractions ont présenté des différences importantes de composition de cutine. Les résultats obtenus attestent donc d'une hétérogénéité dans la composition de la cutine dans les différentes fractions du grain d'orge. En particulier, le scutellum présente une composition très remarquable puisque presque exclusivement représentée par le 18OHC18:1.

Entre les variétés Cervoise et Sebastian, quelques différences ont également été observées notamment au niveau des proportions d'acide gras époxydés. En effet, pour la variété Cervoise, cet acide gras est retrouvé dans l'ensemble des fractions en proportions similaires alors qu'il a été peu retrouvé dans les fractions les plus internes de la variété Sebastian. Pour les autres composés, peu de différences ont été détectées.

Ces résultats semblent donc montrer peu de différence entre variétés. En revanche la variabilité en fonction du tissu étudié semble plus importante.



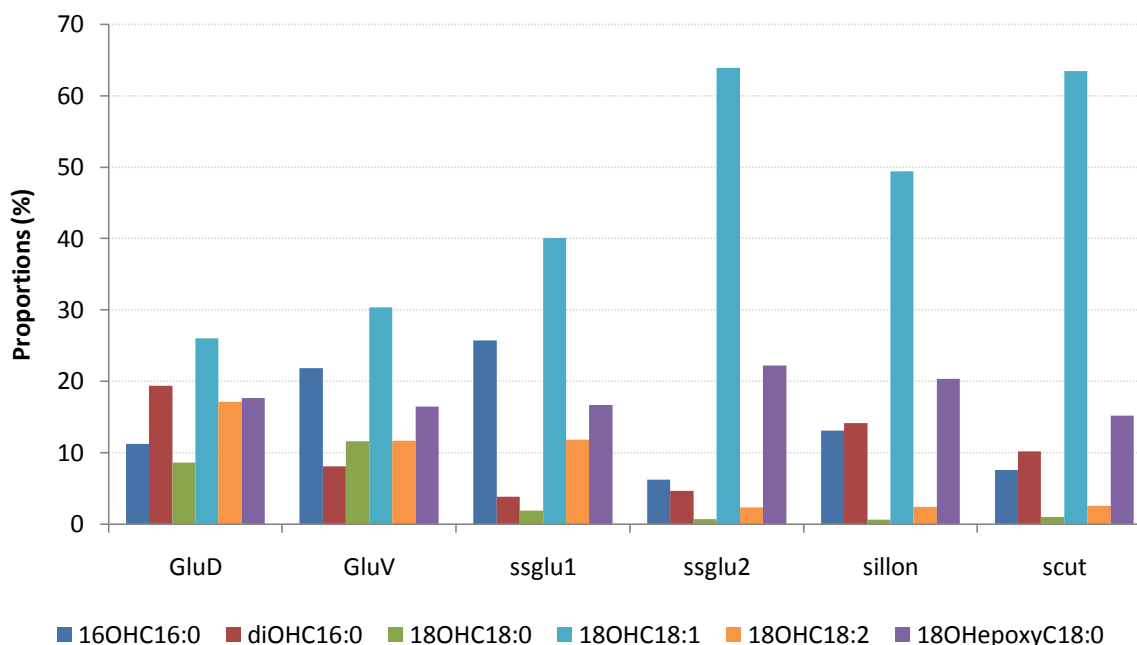
B

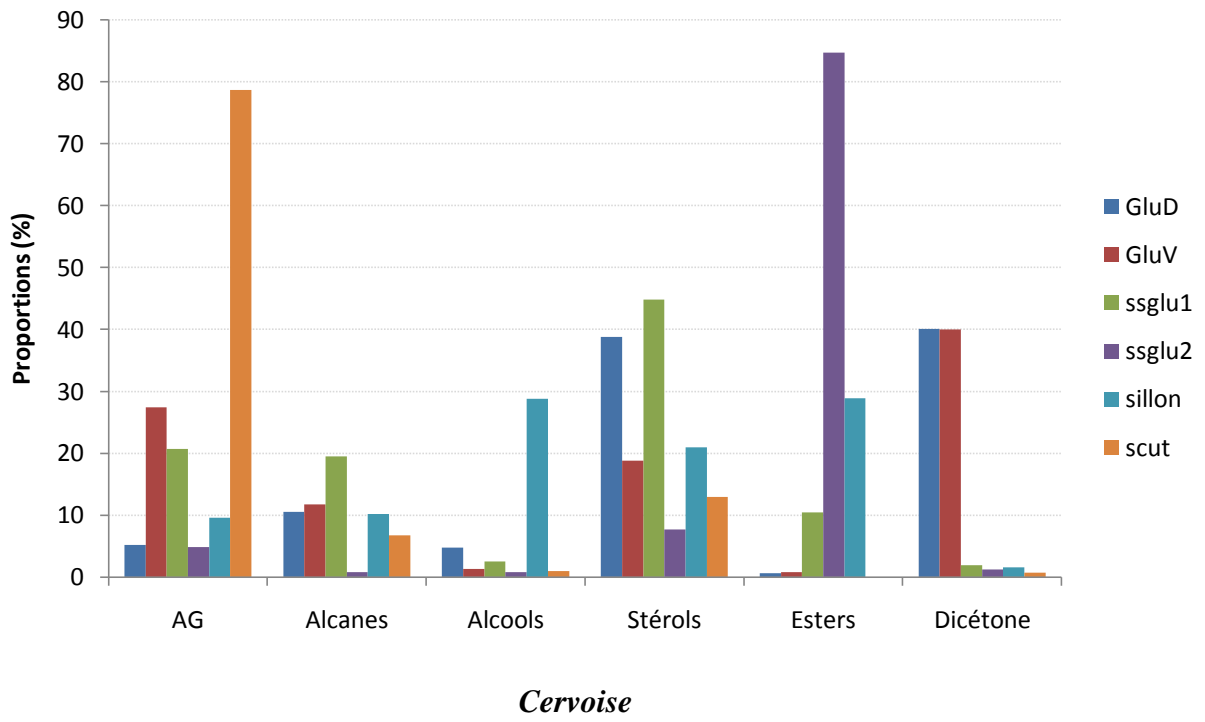
Figure 43. Composition en acides gras hydroxylés et époxydés de cutines isolées.

(A) et (B) représentent les proportions d'acides gras hydroxylés et époxydés dans les différents tissus isolés pour les variétés Sebastian et Cervoise respectivement.

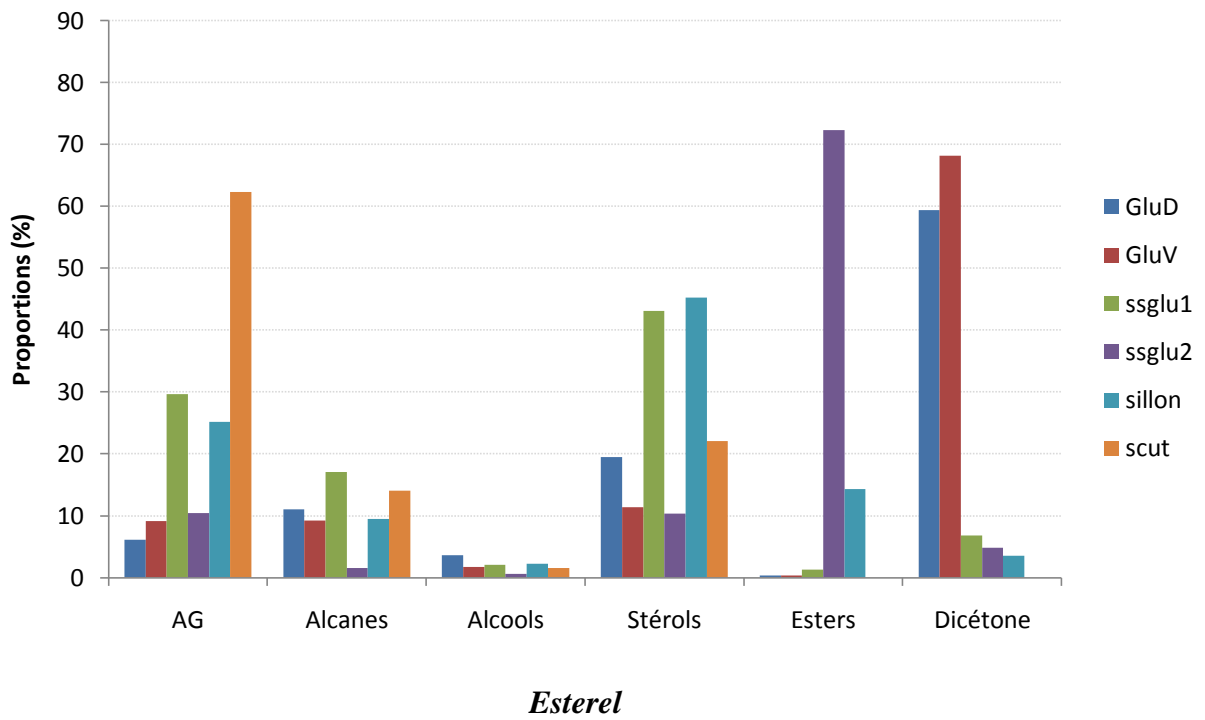
IV-3-5 Composition des cires des fractions périphériques isolées des quatre variétés d'orge

Les compositions des cires des fractions périphériques isolées ont été analysées (**Figure 44** et **45**) pour les 4 variétés d'orge étudiées. Lors de la comparaison des différentes variétés il a pu être observé des profils identiques, les composés majoritaires restant les mêmes dans les différentes fractions étudiées excepté pour le sillon qui a présenté une composition relativement variable en fonction de la variété analysée. Il semblerait donc que peu de différences soient observables entre variétés au niveau des cires. En revanche, La composition au sein d'une variété est extrêmement dépendante de la fraction étudiée. En effet, dans les cires des glumelles (ventrales et dorsales) le composé majoritairement retrouvé était une dicétone en C31 (40-70 % des composés retrouvés), les autres composés de ces cires étant des stérols (10-40 %) et des acides gras (5-30 %). Pour les fractions de sous-glumes 1, les composés majoritaires étaient des acides gras (20-50%) et des stérols (20-45 %) ainsi que des alcanes dans une moindre proportion (10-20 %). Dans les fractions de sous-glumes 2, des esters de longueur variable ont été observé en composé majoritaire (65-85 %), les autres composés étant minoritaires. Pour les cires du sillon, les composés majoritaires varient en fonction des cultivars, les stérols sont les plus représentés pour les variétés Esterel (45 %),

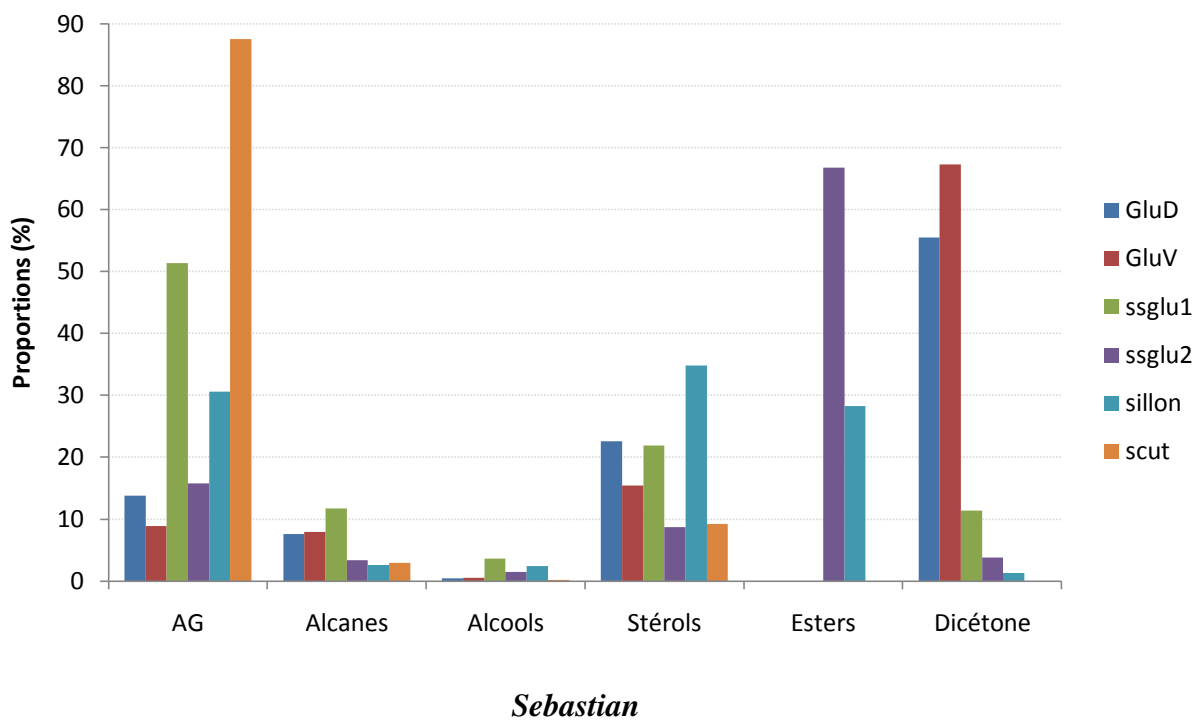
A



B



C



D

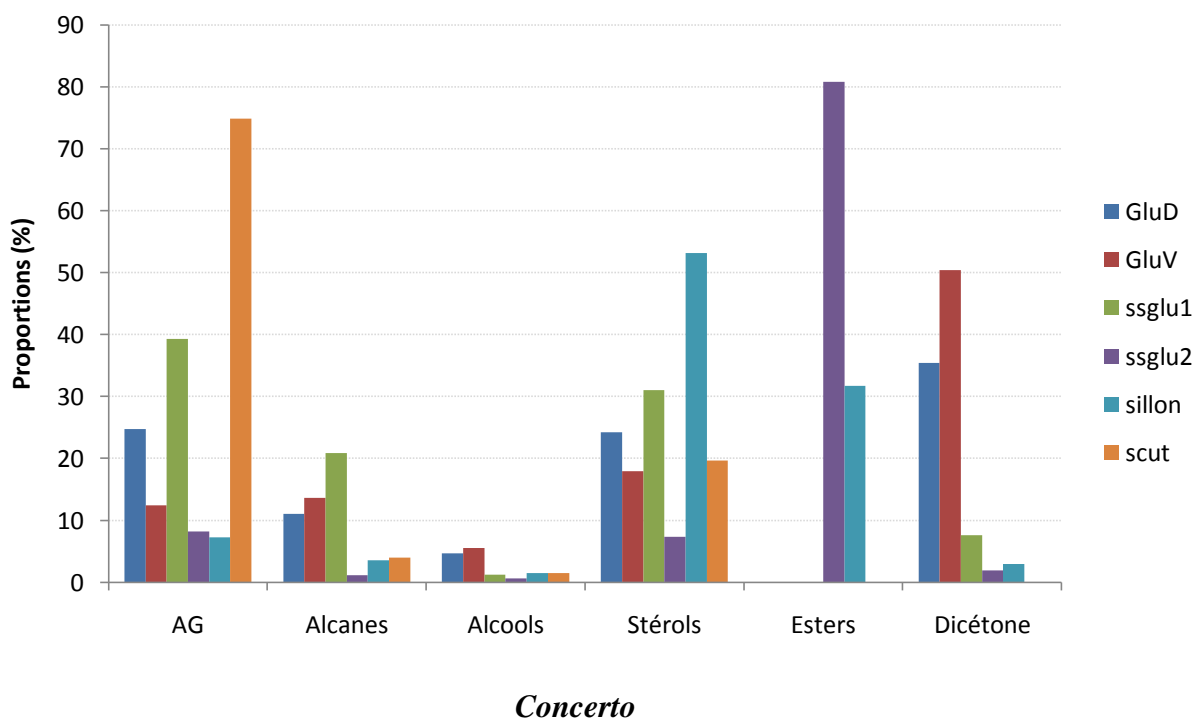
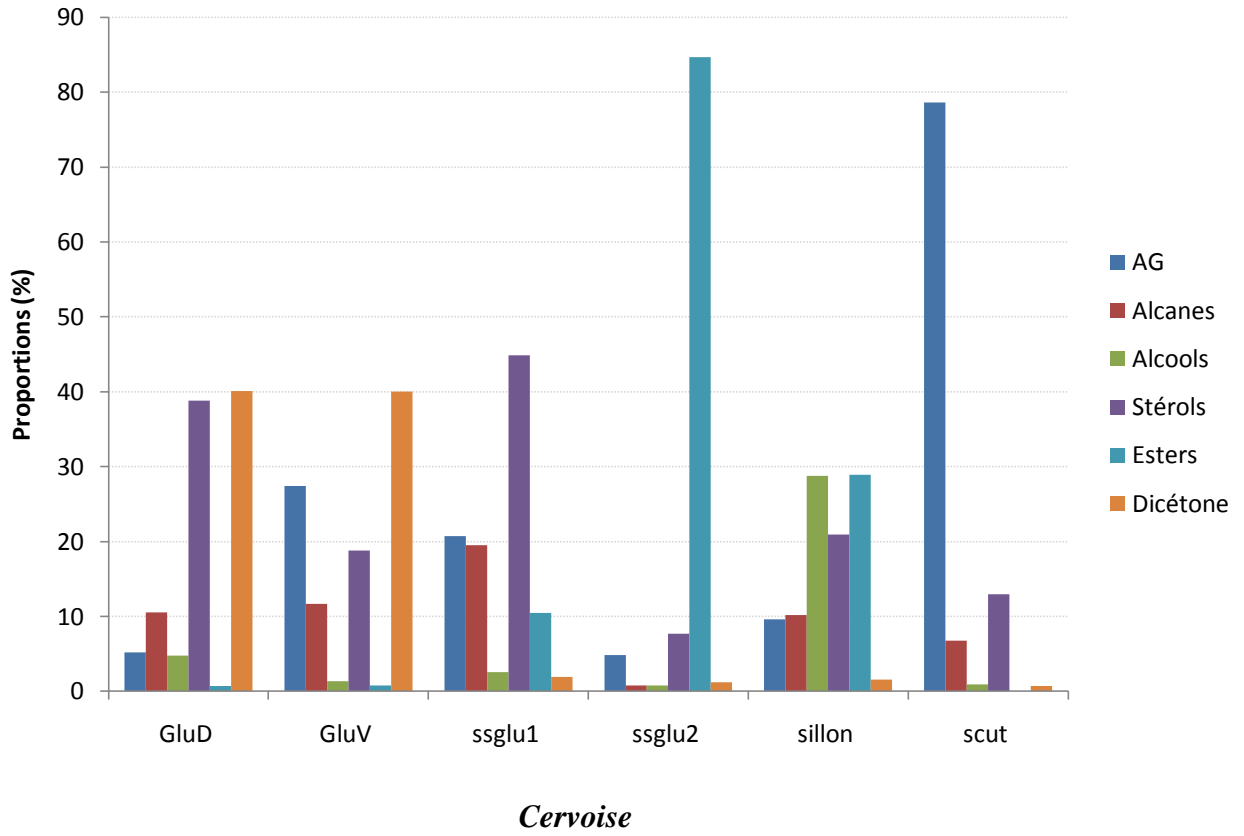


Figure 44. Composition des cires des fractions isolées de quatre variétés d'orge.

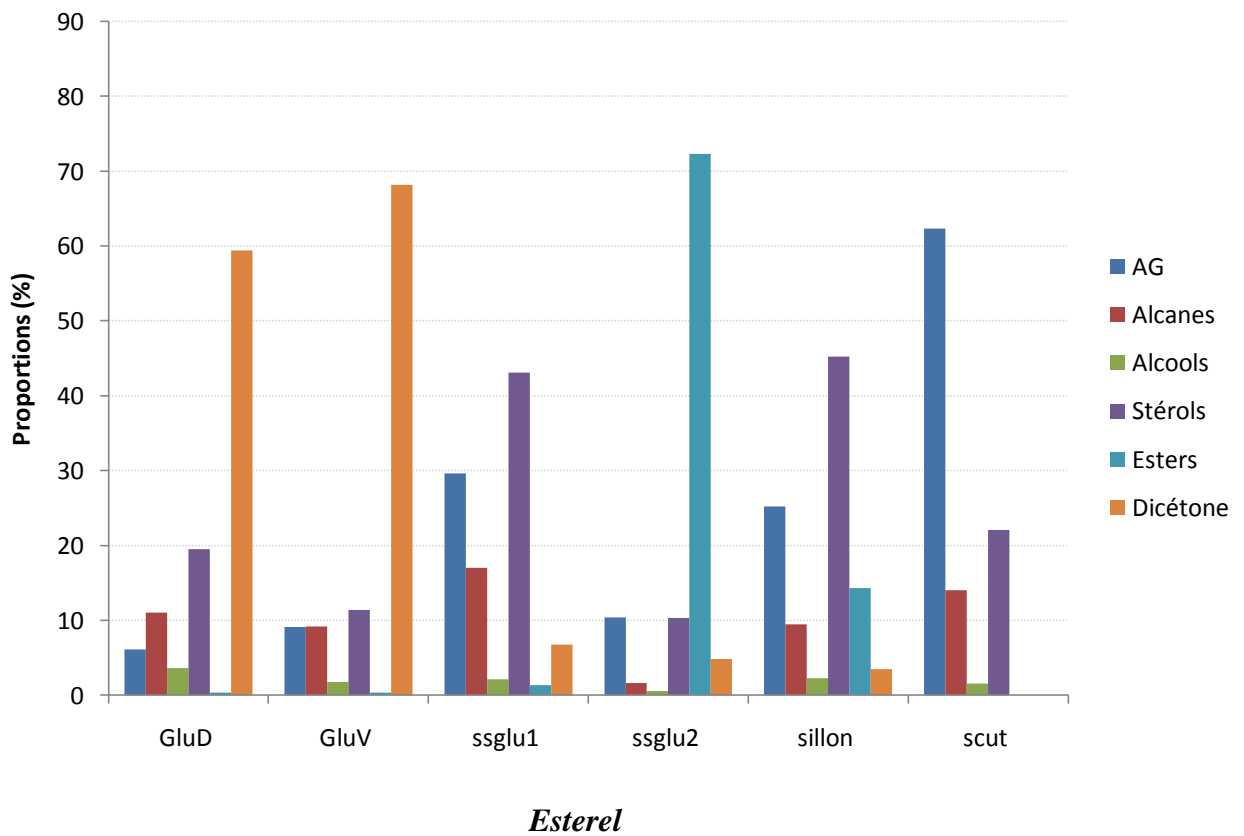
(A); (B); (C) et (D) représentent les proportions des différents composés observés pour les variétés Cerveise, Esterel, Sebastian et Concerto respectivement.

AG = Acides Gras ; GluD = Glumelles Dorsales ; GluV = Glumelles Ventrales ; ssglu1 et ssglu2 = fractions enrichies en péricarpe et testa respectivement ; scut = scutellum

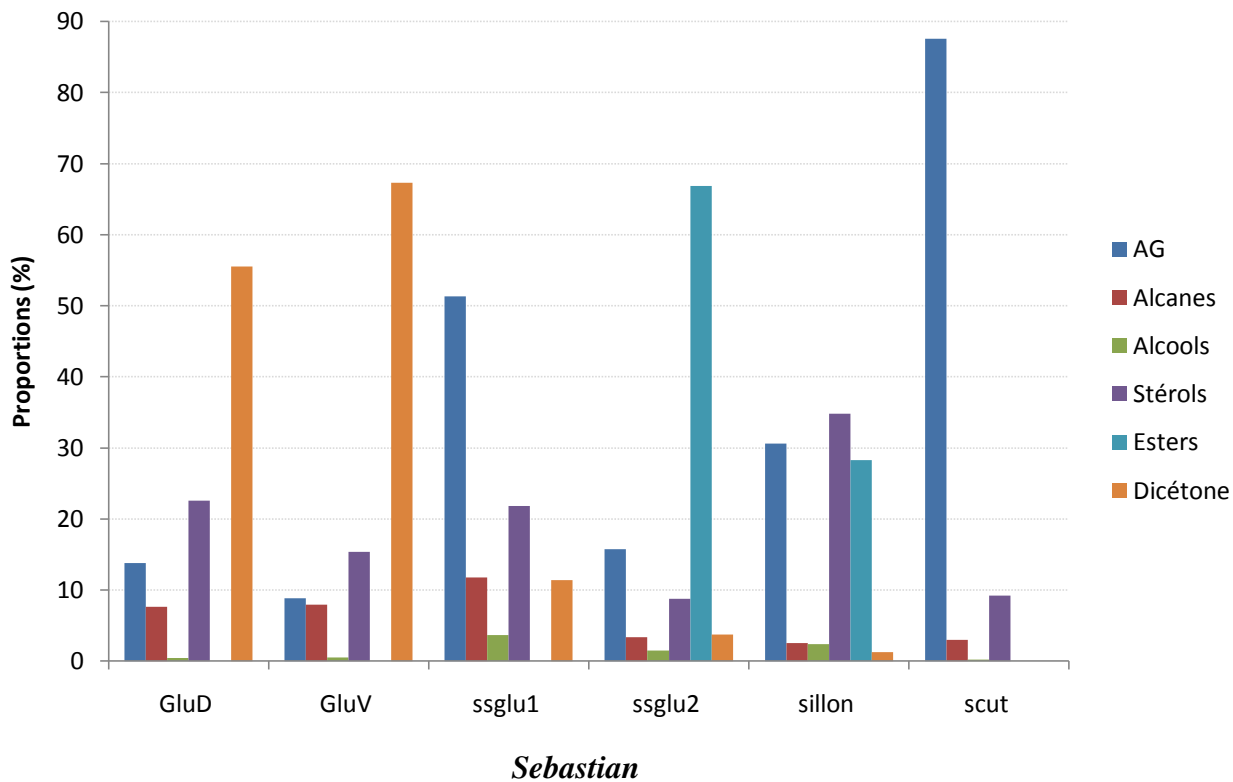
A



B



C



D

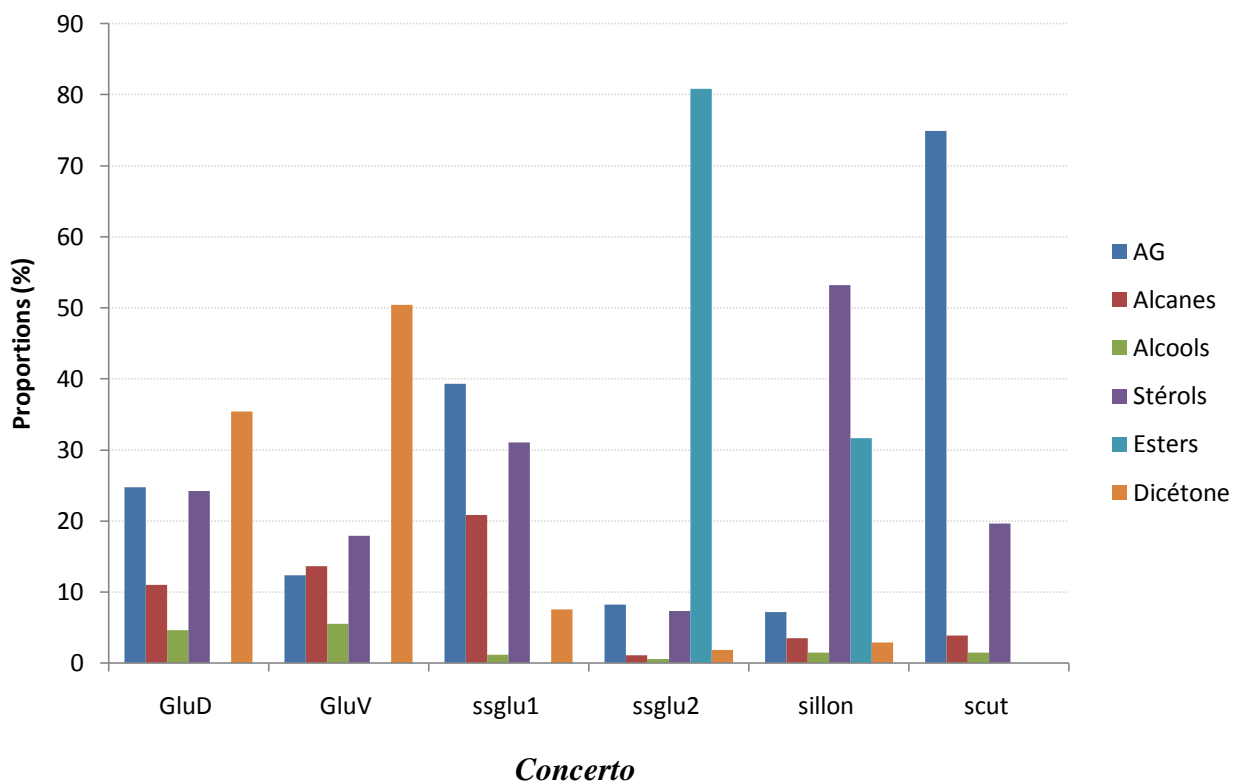


Figure 45. Composition des cires des fractions isolées de quatre variétés d'orge.

(A); (B); (C) et (D) représentent les proportions des différents composés observés pour les variétés Cerveise, Esterel, Sebastian et Concerto respectivement.

AG = Acides Gras ; GluD = Glumelles Dorsales ; GluV = Glumelles Ventrales ; ssglu1 et ssglu2 = fractions enrichies en péricarpe et testa respectivement ; scut = scutellum

Sebastian (35 %) et Concerto (55 %), les alcools et esters ont été autant observés pour la variété Cervoise (30 %), les esters furent également fortement observés pour les variétés Sebastian et Concerto (30 %) et les acides gras très présents pour les variétés Esterel (25 %) et Sebastian (30 %). Les cires du scutellum étaient principalement composées d'acides gras (60-90 %) et de stérols (10-20 %). Ces résultats montrent donc qu'il y a de fortes variations de composition en fonction des fractions étudiées.

IV-3-6 Prise en eau de quatre variétés d'orge

La prise d'eau de grains d'orge de quatre variétés a été suivie pendant 24 h (**Figure 46**). Ces résultats ont mis en évidence, une absorption d'eau très rapide dans les huit premières heures. Cette phase rapide est suivie d'une phase plus lente conduisant à une prise d'eau identique au bout de 24 h d'immersion pour chacune des variétés. Ces résultats ne montrent pas de différence, à la fois au niveau de la cinétique d'absorption et pour la quantité totale d'eau absorbée.

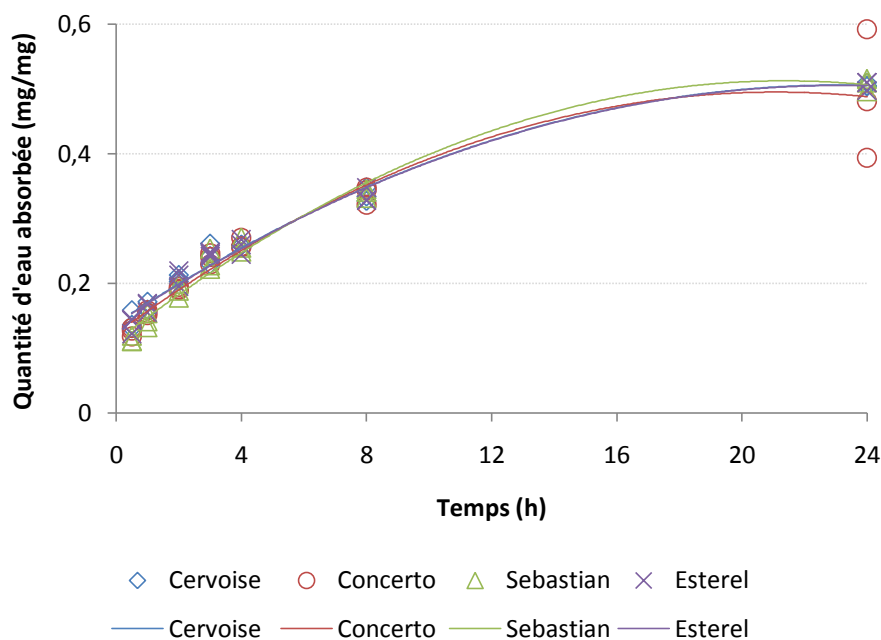


Figure 46. Prise en eau de grains d'orge de 4 variétés.
Prise d'eau de grains d'orge de différentes variétés en fonction du temps

IV-4 conclusion et perspectives

Des différences variétales de cinétique de diffusion d'eau dans le grain ont été démontrées dans d'autres études (McEntyre *et al.* 1998; Gruwel *et al.* 2001; Molina-Cano *et al.* 2002; Swanston *et al.* 2006). Dans ce travail, l'analyse de la composition des cutines et de leur épaisseur pour quatre variétés d'orge (présentant des différences de maltabilité) a montré des différences. Ainsi, la variété Concerto présente une plus forte épaisseur de cutine, (notamment pour celle se trouvant à la limite péricarpe/glumelles) ainsi qu'une proportion plus faible en 16OHC16:0 et 18OHC18:1. Or, lorsque l'on compare la cinétique de prise d'eau de cette variété, dans les conditions de laboratoire, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre la variété Concerto et les 3 autres variétés testées. La caractérisation des cutines et cires des grains d'orge de quatre variétés a donc montré que les différences d'épaisseur et de composition de cutine et de cire ne sont pas directement corrélable à leur cinétique de prise d'eau dans les conditions utilisées au laboratoire. En conditions industrielles, les bains d'hydratation sont plus longs et comportent des étapes de sous-airs. Poursuivre ces analyses avec des conditions plus proches de celles utilisées en malterie permettraient d'obtenir des résultats plus représentatifs.

Si les différences entre variétés ne sont pas spectaculaires, cette étude préliminaire a surtout mis en évidence des différences majeures de composition des assises cuticulaires, en particulier des cires, au sein du grain d'orge d'une même variété. Ces différences sont d'autant plus intéressantes que la diffusion de l'eau au sein du grain d'orge n'est pas homogène mais passe par des sites préférentiels (scutellum, sillon en particulier) (McEntyre *et al.* 1998; Molina-Cano *et al.* 2002). Certains composés des cires semblent être spécifiques de certains tissus (dicétones dans les glumelles, esters principalement dans les "sous-glumes 2"). Compte tenu de l'existence de collections de mutants d'orges affectés dans la composition et la teneur en cire (mutants *eceriferum*) (Von Wettstein-Knowles 2007), il serait intéressant de poursuivre l'étude de la diffusion de l'eau au sein du grain à l'aide de ces mutants. Il serait également intéressant d'étudier les effets de divers adjuvants permettant d'augmenter la perméabilité à l'eau des grains.

Conclusion générale et perspectives

Le maltage à faible hydratation est l'une des pistes prometteuse pour améliorer économiquement et écologiquement le procédé de fabrication du malt. Le travail réalisé au cours de cette thèse avait comme objectifs d'étudier certains paramètres clés d'un malt tels que les enzymes de dégradation de l'amidon et des parois de l'albumen amylicé, ainsi qu'une protéine marqueur de la qualité de la mousse de bière. L'un des objectifs de cette thèse consistait également à caractériser les assises cuticulaires hydrophobes du grain d'orge en relation avec la diffusion de l'eau dans le grain.

Les analyses des enzymes clés du maltage ont montré des résultats différents pour les β -glucanases et l' α -amylase. L' α -amylase qui n'est pas présente dans le grain d'orge (Macgregor *et al.* 1984; Macgregor 1987; Ostergaard *et al.* 2002; Finnie and Svensson 2009) est produite par les cellules à aleurone et le scutellum (Chrispeels and Varner 1967; Sugimoto *et al.* 1998) tardivement au cours du maltage : peu ou pas d'activité est observée avant 3 jours de germination (Macgregor *et al.* 1984; Bak-Jensen *et al.* 2007). Lors de notre étude, l'état de dégradation de l'amidon était identique entre les malts obtenus à faible hydratation et les malts obtenus à forte hydratation, indiquant une activité enzymatique similaire. De plus, la localisation de l'enzyme dans les grains au cours de la germination a montré qu'au bout de 5 jours de germination, pour les deux types de malt, l' α -amylase a été produite dans l'ensemble des cellules du scutellum et de la couche à aleurone. Les β -glucanases, contrairement à l' α -amylase, sont produites précocement au cours du maltage, l'activité étant décelable dès la sortie de trempe (Fincher 1989; Sungurtas *et al.* 2004; Gianinetti 2009). Comme pour l' α -amylase, ces enzymes sont produites par les cellules à aleurone et le scutellum (Ballance *et al.* 1976; Stuart *et al.* 1986; Slakeski and Fincher 1992; Bernier and Ballance 1993). Durant ce travail, nous avons montré qu'à 5 jours de germination, moins de β -glucanes sont dégradés dans les malts faiblement hydratés ce qui laissait l'albumen amylicé moins friable. L'activité β -(1,3)(1,4)-D-glucanase que nous avons mesuré nous a permis d'associer cette différence de dégradation à une cinétique de biosynthèse de l'enzyme plus lente pour les malts faiblement hydratés. Le suivi de la disparition des β -glucanes nous a permis de mettre en évidence la diffusion des β -glucanases, montrant une dégradation complète au bout de 5 jours pour un malt fortement hydraté, et 7 jours pour un malt faiblement hydraté. De même, le suivi de la désagrégation de l'albumen amylicé nous a permis d'observer un albumen complètement désagrégé au bout de 5 et 7 jours pour les malts fortement et faiblement hydratés respectivement. Tous ces résultats nous ont donc permis d'émettre l'hypothèse que le maltage à faible hydratation permettrait d'obtenir un malt de bonne qualité, au regard de ces marqueurs, si le temps de germination était augmenté de

2 jours. Une étude à l'échelle pilote pourrait permettre d'analyser la faisabilité technique et économique d'un maltage à faible hydratation avec une durée de 7 jours à la place de 5 jours pour l'étape de germination.

Durant ce travail, un autre marqueur de qualité a été étudié. En effet, la LTP1 d'orge qui constitue 50 % des protéines de la bière a fréquemment été décrite comme protéine marqueur de la qualité de la mousse (Evans and Hejgaard 1999; Gorjanovic 2007). Elle est également représentative des protéines glucosylées par la réaction de Maillard lors de la fabrication de la bière (Bobalova and Chmelik 2007; Gorjanovic 2010). La LTP1 a été choisie comme traceur protéique du procédé de maltage en raison des modifications importantes qui s'y produisent et du fait que la LTP1 est très abondante dans la bière et en particulier est indispensable à la formation de la mousse de bière (Sørensen *et al.* 1993; Marion and Bakan 2009). Les analyses de diffusion de cette protéine ont montré que dès la trempé, la LTP1 diffusait de la couche à aleurone où elle est produite (Skriver *et al.* 1992) vers l'ensemble de l'albumen amylicé pour être retrouvée partout dans cet albumen à la sortie de trempé. L'étude des modifications de la LTP1 telles que l'acylation ou la glucosylation n'a pas mis en évidence de différence significative entre les malts fortement ou faiblement hydratés. Notre étude démontre que la diminution du taux d'hydratation du grain en fin de trempé n'affecte pas la diffusion et les modifications que subit cette protéine. Par ailleurs, la présence d'oxydation observée lors des analyses par LC-MS nous a mené à envisager un impact des diagrammes de trempé autre que le simple changement du taux d'hydratation du grain. Par exemple, les diagrammes de trempé ont pu également induire une modification de l'état d'oxydation du malt. En effet, il existe des exemples d'hyperoxie (représentée ici par les sous-airs) ou d'hypoxies (ici les sous-eaux) ayant des effets sur la biosynthèse de l'ATP, la germination et la levée de dormance (Benech-Arnold *et al.* 2006; Borisjuk *et al.* 2007). Dans notre étude, la durée du procédé de "trempé" d'une part et l'alternance sous-eau/sous-air d'autre part ont été modifiés pour obtenir les malts LH et HH. Il est possible que cela ait également entraîné des modifications de métabolismes ou de composés aromatiques. Nous avons effectué des analyses préliminaires des métabolites et des lipides du grain d'orge afin d'évaluer cette hypothèse et observer si le changement de diagramme d'hydratation pouvait avoir un impact sur la dégradation ou la synthèse de composés tels que les glucides, les acides aminés ou les lipides (**Figures 47, 48, 49 et 50**). Les analyses de glucides (**Figure 47 A et B**) ont montré que la quantité de sucres simples augmente au fur et à mesure du temps de germination. Ce résultat est à mettre en relation avec la dégradation des parois polysaccharidiques et le début

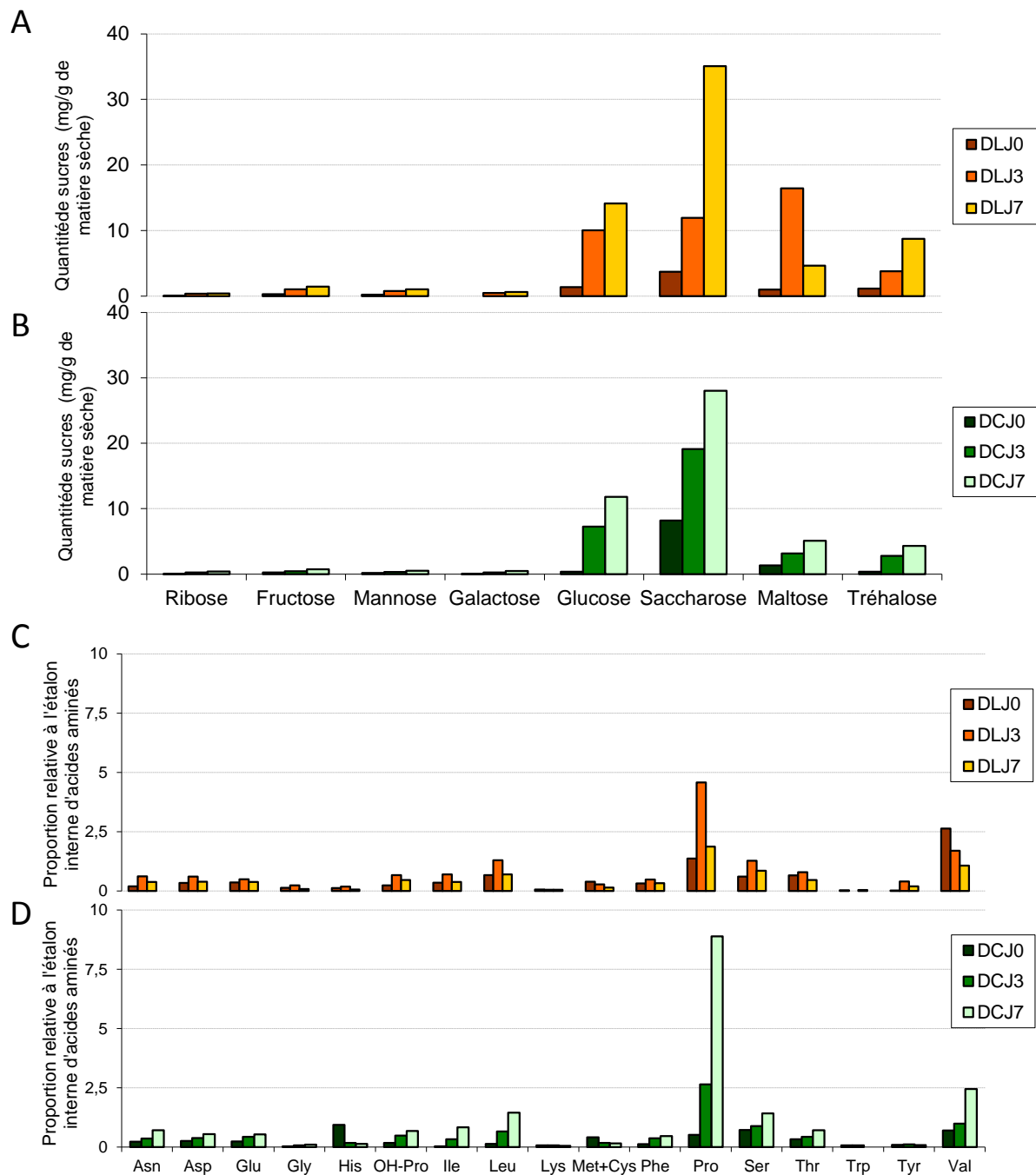


Figure 47. Composition en sucres et acides aminés de grains de malts verts en cours de germination.

(A) et (B) représentent les quantités de sucres retrouvées après un diagramme d'hydratation long et court respectivement pour 0, 3 et 7 jours de germination. (C) et (D) représentent les proportions d'acides aminés retrouvées après un diagramme d'hydratation long et court respectivement pour 0, 3 et 7 jours de germination.

DL = Diagramme Long (3 sous-eaux) ; DC = Diagramme Court (2 sous-eaux) ; OH-Pro = hydroxyproline

de l'hydrolyse de l'amidon. Moins de glucides ont été retrouvés pour le diagramme court ce qui reste corrélé avec les résultats d'une dégradation des parois plus lente à faible hydratation. Les analyses des acides aminés (**Figure 47 C et D**) ont montré des proportions similaires pour tous les acides aminés sauf pour la proline dont la proportion est doublée avec un diagramme court comportant deux sous-eaux/un sous-air (19 h) qu'avec un diagramme long comportant trois sous-eaux et deux sous air (45 h). Cette accumulation de proline est vraisemblablement liée à une réponse à un stress hydrique du grain en germination comme cela a déjà été observé (Hoekstra *et al.* 2001; Lehmann *et al.* 2010). L'accumulation de cet acide aminé pourrait avoir une incidence sur la qualité de la bière car cet acide aminé n'est pas métabolisé par la levure (Jones and Pierce 1964). Par ailleurs, ces premiers résultats ne montrent apparemment que peu d'impact au niveau de la synthèse/dégradation des lipides : les proportions de lipides neutres et glycolipides sont similaires (**Figures 48 et 49**). En revanche, quelques différences sont observables au niveau des phospholipides (**Figures 50**) : il semble y avoir une consommation des N-acyl PE plus importante pour un malt obtenu avec un diagramme long comparé à un malt obtenu avec un diagramme court. De plus, ces études préliminaires suggèrent une synthèse plus importante des lyso-phospholipides lors d'un diagramme court. Ces premiers résultats montrent qu'il serait intéressant d'étudier les mécanismes d'oxydation des lipides dans ces différents diagrammes de trempage.

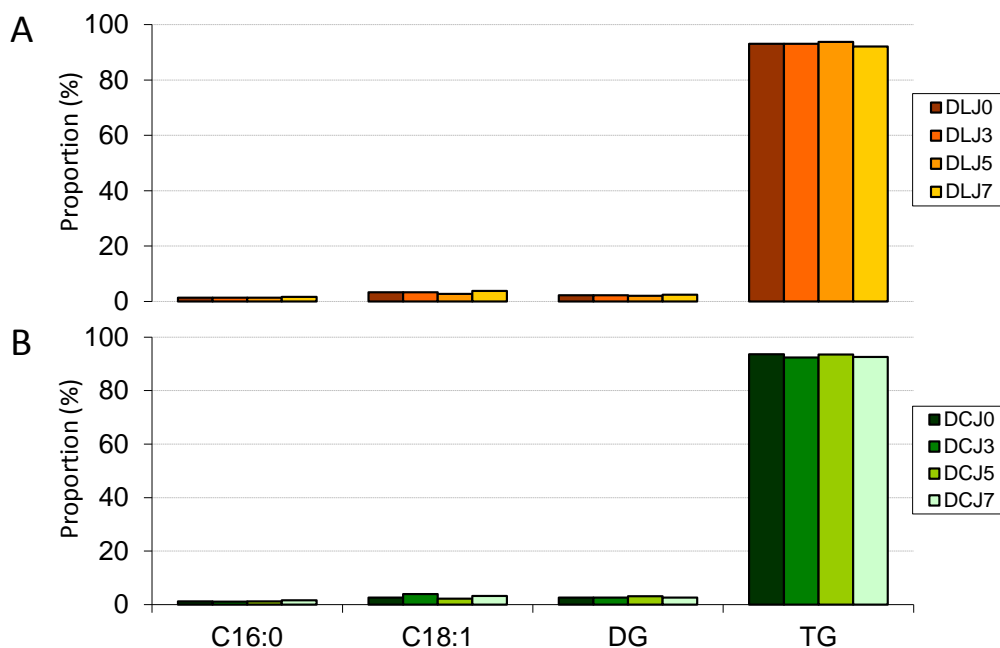


Figure 48. Composition en lipides neutres de grains de malts verts en cours de germination.

(A) et (B) représentent les proportions de lipides neutres retrouvées après un diagramme d'hydratation long et court respectivement pour 0, 3, 5 et 7 jours de germination. DL = Diagramme Long (3 sous-eaux) ; DC = Diagramme Court (2 sous-eaux) DG = Diglycérides ; TG = Triglycérides.

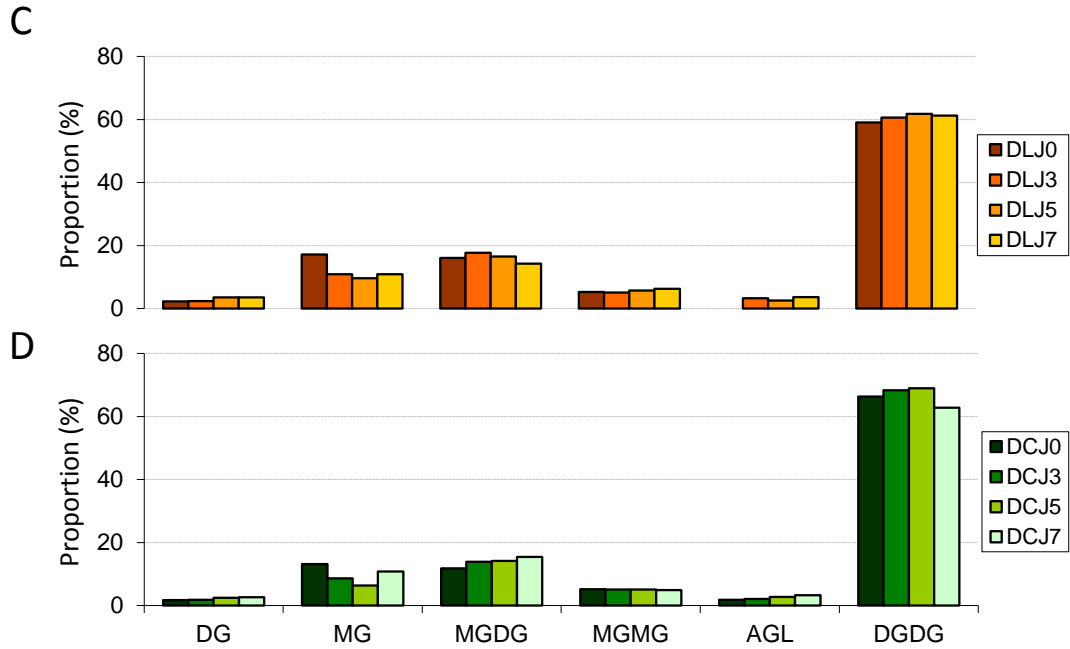


Figure 49. Composition en glycolipides de grains de malts verts en cours de germination. (A) et (B) représentent les proportions de glycolipides retrouvées après un diagramme d'hydratation long et court respectivement pour 0, 3, 5 et 7 jours de germination. DL = Diagramme Long (3 sous-eaux) ; DC = Diagramme Court (2 sous-eaux) ; MG = Monoglycérides ; DG = Diglycérides ; MGMG = Monogalactosyl Monoglycérides ; MGDG = Monogalactosyl Diglycérides ; DGDG = Digalactosyl Diglycérides ; AGL = Acides Gras Libres.

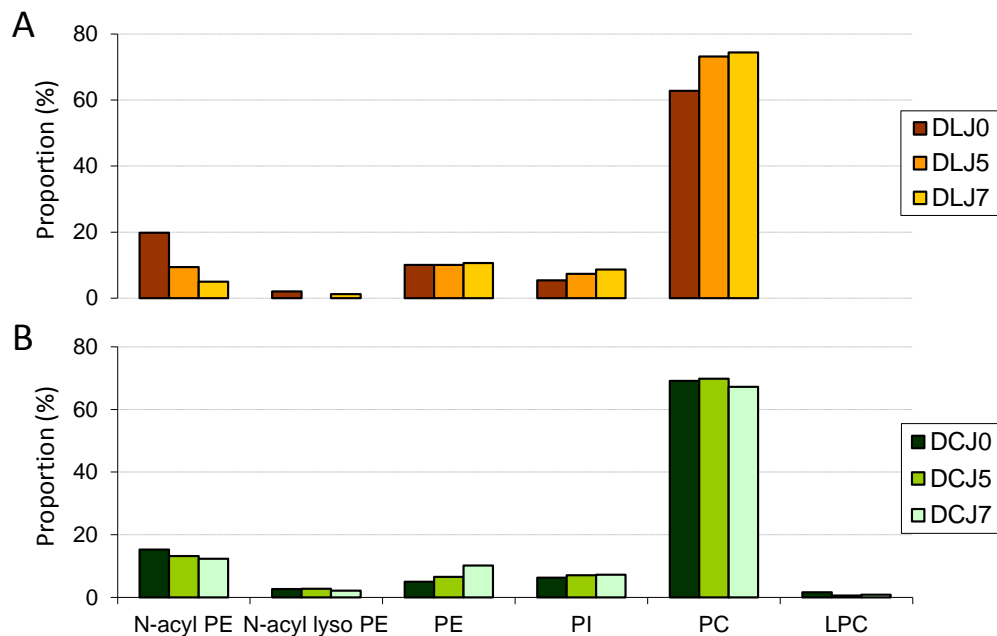


Figure 50. Composition en phospholipides de grains de malts verts en cours de germination.

(A) et (B) représentent les proportions de phospholipides retrouvées après un diagramme d'hydratation long et court respectivement pour 0, 3, 5 et 7 jours de germination. DL = Diagramme Long (3 sous-eaux) ; DC = Diagramme Court (2 sous-eaux) ; PE = Phosphatidyl Ethanolamine ; PI = Phosphatidyl Inositol ; PC = Phosphatidyl Choline ; LPC = Lyso Phosphatidyl Choline.

La caractérisation des assises cuticulaires des grains d'orges de 4 variétés a permis de mettre en évidence de faibles différences d'épaisseur et de composition des cutines mais également des cires en fonctions des variétés. En revanche, l'analyse de fractions périphériques isolées enrichies en certaines de ces assises cuticulaires a mis en évidence de fortes différences de compositions, notamment entre les glumelles (enveloppes les plus externes) et les sous-glumes 1 et 2 qui étaient des fractions enrichies en cutines et cires présentes au niveau glumelles/péricarpe et péricarpe/testa. Ces différences sont intéressantes puisque des études de diffusion de l'eau dans le grain d'orge au cours de la trempé ont montré des passages d'eau préférentiels par l'embryon contrairement aux autres parties du grain (Molina-Cano *et al.* 2002). En effet, le coefficient de diffusion de l'eau à travers les enveloppes plus internes vers l'albumen amylicé pour toutes les autres zones du grain est bien moindre (McEntyre *et al.* 1998). D'autres études qui impliqueraient de la micro-dissection (Mizuarai *et al.* 2005) permettraient d'avoir une caractérisation plus fine de chacune de ces assises cuticulaires et permettrait d'étudier la troisième zone de cutine testa/aleurone qui n'a pu être analysée par notre méthode de dissection car très adhérente à la couche à aleurone (**Figure 38**). De plus, lorsque nous comparons les épaisseurs et la composition des cutines nous avons observé pour la variété Concerto une cutine épaisse mais avec moins de quantité d'acides gras hydroxylés et époxydés que pour les autres variétés. Nous supposons donc que les cutines de cette variété présentent une densité moindre en comparaison des autres cultivars. A cet égard, une caractérisation structurale par microscopie infra-rouge permettrait peut-être de confirmer cette hypothèse et de révéler plus de variations entre cultivars.

Par ailleurs, il existe des collections de mutants d'orge (*eceriferum*) (Von Wettstein-Knowles 2007) qui présentent des déficiences en cires avec différents phénotypes observés. L'utilisation de ces mutants, fortement affectés dans leurs structures, composition, ou quantité de cires, permettrait d'approfondir les mécanismes de diffusion de l'eau au sein du grain.

Bibliographie

- Aastrup, S. and K. Erdal** (1980). "Quantitative determination of endosperm modification and its relationship to the content of 1,3:1,4- β -glucans during malting of barley." *Carlsberg Research Communications* **45**(5): 369-379.
- Aharoni, A., S. Dixit, R. Jetter, E. Thoenes, G. van Arkel and A. Pereira** (2004). "The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in Arabidopsis." *Plant Cell* **16**(9): 2463-80.
- Ahokas, H. and M. L. Manninen** (2000). "Thermostabilities of grain beta-amylase and beta-glucanase in Finnish landrace barleys and their putative past adaptedness." *Hereditas* **132**(2): 111-118.
- Andersen, C. M. and G. Mortensen** (2008). "Fluorescence spectroscopy: A rapid tool for analyzing dairy products." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(3): 720-729.
- Angelino, S.** (1996). "Determination of the moisture and nitrogen contents of barley and malt by near infrared spectroscopy (NIRS)." *Journal of the Institute of Brewing* **102**(2): 73-74.
- Anness, B. J. and C. W. Bamforth** (1982). "Dimethyl sulfide - A review." *Journal of the Institute of Brewing* **88**(4): 244-252.
- Ayoub, M. and D. E. Mather** (2002). "Effectiveness of selective genotyping for detection of quantitative trait loci: an analysis of grain and malt quality traits in three barley populations." *Genome* **45**(6): 1116-1124.
- Bak-Jensen, K. S., S. Laugesen, O. Østergaard, C. Finnie, P. Roepstorff and B. Svensson** (2007). "Spatio-temporal profiling and degradation of α -amylase isozymes during barley seed germination." *FEBS Journal* **274**(10): 2552-2565.
- Bakan, B., M. Hamberg, L. Perrocheau, D. Maume, H. Rogniaux, O. Tranquet, C. Rondeau, J.-P. Blein, M. Ponchet and D. Marion** (2006). "Specific Adduction of Plant Lipid Transfer Protein by an Allene Oxide Generated by 9-Lipoxygenase and Allene Oxide Synthase." *Journal of Biological Chemistry* **281**(51): 38981-38988.
- Bakan, B., M. Hamberg, V. Larue, T. Prangé, D. Marion and M. B. Lascombe** (2009). "The crystal structure of oxylipin-conjugated barley LTP1 highlights the unique plasticity of the hydrophobic cavity of these plant lipid-binding proteins." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **390**(3): 780-785.
- Baker, E. A. and G. M. Hunt** (1986). "Erosion of waxes from leaf surfaces by simulated rain." *New Phytologist* **102**(1): 161-173.
- Baker, F. and P. N. Hobson** (1952). "The selective staining of intact and damaged starch granules by safranin o and niagara blue 4B." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **3**(12): 608-612.

- Ballance, G. M., W. O. S. Meredith and D. E. Laberge** (1976). "Distribution and development of endo-beta-glucanase activities in barley tissues during germination." *Canadian Journal of Plant Science* **56**(3): 459-466.
- Bamforth, C. W. and H. L. Martin** (1981). "Beta-glucan and beta-glucan solubilase in malting and mashing." *Journal of the Institute of Brewing* **87**(6): 365-371.
- Bamforth, C. W.** (2009). "Current perspectives on the role of enzymes in brewing." *Journal of Cereal Science* **50**(3): 353-357.
- Bathgate, G. N.** (1983). "The relationship between malt friability and wort viscosity." *Journal of the Institute of Brewing* **89**(6): 416-419.
- Benech-Arnold, R. L., N. Gualano, J. Leymarie, D. Come and F. Corbineau** (2006). "Hypoxia interferes with ABA metabolism and increases ABA sensitivity in embryos of dormant barley grains." *J Exp Bot* **57**(6): 1423-30.
- Bernier, A. M. and G. M. Ballance** (1993). "Induction and secretion of alpha-amylase, (1-3),(1-4)-beta-glucanase, and (1-3)-beta-glucanase activities in gibberellic-acid and CaCl₂-treated half seeds and aleurones of wheat." *Cereal Chemistry* **70**(2): 127-132.
- Birlouez-Aragon, I., M. Nicolas, A. Metais, N. Marchond, J. Grenier and D. Calvo** (1998). "A rapid fluorimetric method to estimate the heat treatment of liquid milk." *International Dairy Journal* **8**(9): 771-777.
- Blum, H., H. Beier and H. J. Gross** (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." *Electrophoresis* **8**(2): 93-99.
- Bobalova, J. and J. Chmelik** (2007). "Proteomic identification of technologically modified proteins in malt by combination of protein fractionation using convective interaction media and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **1163**(1-2): 80-85.
- Bobálová, J., I. Petry-Podgórska, M. Laštovičková and J. Chmelík** (2010). "Monitoring of malting process by characterization of glycation of barley protein Z." *European Food Research and Technology* **230**(4): 665-673.
- Borisjuk, L., D. Macherel, A. Benamar, U. Wobus and H. Rolletschek** (2007). "Low oxygen sensing and balancing in plant seeds: a role for nitric oxide." *New Phytol* **176**(4): 813-23.
- Briggs, D. E. and J. Macdonald** (1983). "The permeability of the surface-layers of cereal-grains, and implications for tests of abrasion in Barley." *Journal of the Institute of Brewing* **89**(5): 324-332.
- Briggs, D. E.** (1998). *Malts and malting*. London, Springer.
- Bryce, J. H., V. Goodfellow, R. C. Agu, J. M. Brosnan, T. A. Bringhurst and F. R. Jack** (2010). "Effect of Different Steeping Conditions on Endosperm Modification and Quality of Distilling Malt." *Journal of the Institute of Brewing* **116**(2): 125-133.

- Carvalho, A. d. O. and V. M. Gomes** (2007). "Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology--A concise review." *Peptides* **28**(5): 1144-1153.
- Chandra, G. S., M. O. Proudlove and E. D. Baxter** (1999). "The structure of barley endosperm – an important determinant of malt modification." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**(1): 37-46.
- Chen, K. and Y. Q. C. An** (2006). "Transcriptional Responses to Gibberellin and Abscisic Acid in Barley Aleurone." *Journal of Integrative Plant Biology* **48**(5): 591-612.
- Chiffelle, T. L. and F. A. Putt** (1951). "Propylene and Ethylene Glycol as Solvents for Sudan IV and Sudan Black B." *Biotechnic & Histochemistry* **26**(1): 51-56.
- Chmelik, J., J. Zidkova, P. Rehulka, I. Petry-Podgorska and J. Bobalova** (2009). "Influence of different proteomic protocols on degree of high-coverage identification of nonspecific lipid transfer protein 1 modified during malting." *Electrophoresis* **30**(3): 560-7.
- Chouard, P.** (1960). "Vernalization and its relation to dormancy." *Annual Review of Plant Physiology*. **11**: 191-238.
- Chrispeels, M. J. and J. E. Varner** (1967). "Gibberellic Acid-Enhanced Synthesis and Release of {alpha}-Amylase and Ribonuclease by Isolated Barley and Aleurone Layers." *Plant Physiology* **42**(3): 398-406.
- Coghe, S., B. Gheeraert, A. Michiels and F. R. Delvaux** (2006). "Development of Maillard reaction related characteristics during malt roasting." *Journal of the Institute of Brewing* **112**(2): 148-156.
- Conte, M. H., J. C. Weber, P. J. Carlson and L. B. Flanagan** (2003). "Molecular and carbon isotopic composition of leaf wax in vegetation and aerosols in a northern prairie ecosystem." *Oecologia* **135**(1): 67-77.
- Cruz, J. M., A. B. Moldes, G. Bustos, A. Torrado and J. M. Domínguez** (2007). "Integral utilisation of barley husk for the production of food additives." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**(6): 1000-1008.
- Dornez, E., K. Gebruers, J. A. Delcour and C. M. Courtin** (2009). "Grain-associated xylanases: occurrence, variability, and implications for cereal processing." *Trends in Food Science & Technology* **20**(11-12): 495-510.
- Douliez, J. P., T. Michon, K. Elmorjani and D. Marion** (2000). "Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels." *Journal of Cereal Science* **32**(1): 1-20.
- EBC European Brewery Convention (EBC).** *Analytica-EBC*, 4th ed.; Brauerei-und Getränke-Rundschau: Zurich, 1987.

- Edney, M. J., B. A. Marchylo and A. W. Macgregor** (1991). "Structure of total barley β -glucan." *Journal of the Institute of Brewing* **97**(1): 39-44.
- Edney, M. J., J. K. Eglinton, H. M. Collins, A. R. Barr, W. G. Legge and B. G. Rossnagel** (2007). "Importance of endosperm modification for malt Wort fermentability." *Journal of the Institute of Brewing* **113**(2): 228-238.
- Ellis, R. P., J. S. Swanston, A. Rubio, A. M. Perez-Vendrell, I. Romagosa and J. L. Molina-Cano** (1997). "The Development of [β]-Glucanase and Degradation of [β]-Glucan in Barley Grown in Scotland and Spain." *Journal of Cereal Science* **26**(1): 75-82.
- Espelie, K. E., B. B. Dean and P. E. Kolattukudy** (1979). "Composition of Lipid-derived Polymers from Different Anatomical Regions of Several Plant Species." *Plant Physiol* **64**(6): 1089-1093.
- Evans, D. E. and J. Hejgaard** (1999). "The impact of malt derived proteins on beer foam quality. Part I. The effect of germination and kilning on the level of protein Z4, protein Z7 and LTP1." *Journal of the Institute of Brewing* **105**(3): 159-169.
- Ferrari, B., M. Baronchelli, A. M. Stanca and A. Gianinetti** (2010). "Constitutive differences between steely and mealy barley samples associated with endosperm modification." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**(12): 2105-2113.
- Fincher, G. B. and B. A. Stone** (1986). Cell walls and their components in cereal grain technology. *Advances in Cereal Science and Technology*. American Association of Cereal Chemists. St Paul. **8**: 207-295
- Fincher, G. B.** (1989). "Molecular and Cellular Biology Associated with Endosperm Mobilization in Germinating Cereal Grains." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**(1): 305-346.
- Finnie, C. and B. Svensson** (2009). "Barley seed proteomics from spots to structures." *Journal of Proteomics* **72**(3): 315-24.
- Fleming, M. and K. Kawakami** (1977). "Studies of the fine structure of [β]-d-glucans of barleys extracted at different temperatures." *Carbohydrate Research* **57**: 15-23.
- Freeman, P. L. and G. H. Palmer** (1984). "The structure of the pericarp and testa of Barley." *Journal of the Institute of Brewing* **90**(2): 88-94.
- Garcia, S., C. Garcia, H. Heinzen and P. Moyna** (1997). "Chemical basis of the resistance of barley seeds to pathogenic fungi." *Phytochemistry* **44**(3): 415-8.
- Gawrysiak-Witulska, M., J. Wawrzyniak, A. Ryniecki and J. Perkowski** (2008). "Relationship of ergosterol content and fungal contamination and assessment of technological quality of malting barley preserved in a metal silo using the near-ambient method." *Journal of Stored Products Research* **44**(4): 360-365.

- Ghosh, P. K., D. S. Jayas and M. L. H. Gruwel** (2009). "Measurement of Water Diffusivities in Barley Components Using Diffusion Weighted Imaging and Validation with a Drying Model." *Drying Technology: An International Journal* **27**(3): 382 - 392.
- Gianinetti, A.** (2009). "A theoretical framework for β -glucan degradation during barley malting." *Theory in Biosciences* **128**(2): 97-108.
- Gorjanovic, S.** (2007). "Barley grain non-specific lipid-transfer proteins (ns-LTPs) in beer production and quality." *Journal of the Institute of Brewing* **113**(3): 15.
- Gorjanovic, S.** (2010). "A Review: The Role of Barley Seed Pathogenesis-Related Proteins (PRs) in Beer Production." *Journal of the Institute of Brewing* **116**(2): 111-124.
- Graça, J., L. Schreiber, J. Rodrigues and H. Pereira** (2002). "Glycerol and glyceryl esters of [ω]-hydroxyacids in cutins." *Phytochemistry* **61**(2): 205-215.
- Gruwel, M. L. H., B. Chatson, X. S. Yin and S. Abrams** (2001). "A magnetic resonance study of water uptake in whole barley kernels." *International Journal of Food Science & Technology* **36**(2): 161-168.
- Guido, L. F., A. F. Curto, P. Boivin, N. Benismail, C. R. Goncalves and A. A. Barros** (2007). "Correlation of malt quality parameters and beer flavor stability: Multivariate analysis." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**(3): 728-733.
- Guillot, F., C. Bailly and F. Corbineau** (2008). "Effect of water content of barley grains during malting on germination and malt quality." *Polish Journal of Natural Sciences Suppl* **5**: 64-65.
- Havlova, P., K. Lancova, M. Vanova, J. Havel and J. Hajslova** (2006). "The effect of fungicidal treatment on selected quality parameters of barley and malt." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(4): 1353-1360.
- Hedley, C. L., T. Y. Bogracheva and T. L. Wang** (2002). "A Genetic Approach to Studying the Morphology, Structure and Function of Starch Granules using Pea as a Model." *Starch - Stärke* **54**(6): 235-242.
- Heinemann, B., K. V. Andersen, P. R. Nielsen, L. M. Bech and F. M. Poulsen** (1996). "Structure in solution of a four-helix lipid binding protein." *Protein Science* **5**(1): 13-23.
- Henry, R. J.** (1988). "The carbohydrates of barley grains - A review." *Journal of the Institute of Brewing* **94**(2): 71-78.
- Herrera-Gómez, A., M. Canónico-Franco and G. Ramos** (2005). "Aggregate Formation and Segregation of Maize Starch Granules Cooked at Reduced Moisture Conditions." *Starch - Stärke* **57**(7): 301-309.
- Hoekstra, F. A., E. A. Golovina and J. Buitink** (2001). "Mechanisms of plant desiccation tolerance." *Trends in Plant Science* **6**(9): 431-438.

- Höije, A., M. Gröndahl, K. Tømmeraas and P. Gatenholm** (2005). "Isolation and characterization of physicochemical and material properties of arabinoxylans from barley husks." *Carbohydrate Polymers* **61**(3): 266-275.
- Hoj, P. B. and G. B. Fincher** (1995). "Molecular evolution of plant beta-glucan endohydrolases." *Plant Journal* **7**(3): 367-379.
- Hollenbach, B., L. Schreiber, W. Hartung and K. J. Dietz** (1997). "Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly." *Planta* **203**(1): 9-19.
- Holloway, P. J. and A. H. Brown Deas** (1973). "Epoxyoctadecanoic acids in plant cutins and suberins." *Phytochemistry* **12**(7): 1721-1735.
- Holloway, P. J.** (1982). Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview. The plant cuticle. D.F. Cutler, K.L. Alvin and C.E. Price. London, Academic Press: 1-32.
- Holmberg, J., J. J. Hamalainen, P. Reinikainen and J. Olkku** (1997). "A mathematical model for predicting the effects of the steeping programme on water uptake during malting." *Journal of the Institute of Brewing* **103**(3): 177-182.
- Holopainen, U. R. M., A. Wilhelmson, M. Salmenkallio-Marttila, P. Peltonen-Sainio, A. Rajala, P. Reinikainen, E. Kotavta, H. Simolin and S. Home** (2005). "Endosperm structure affects the malting quality of barley (*Hordeum vulgare* L.)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(18): 7279-7287.
- Iimure, T., K. Takoi, T. Kaneko, M. Kihara, K. Hayashi, K. Ito, K. Sato and K. Takeda** (2008). "Novel prediction method of beer foam stability using protein Z, barley dimeric alpha-amylase inhibitor-1 (BDAI-1) and yeast thioredoxin." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(18): 8664-71.
- Ishida, N., H. Ogawa and H. Kano** (1995). "Diffusion of cell-associated water in ripening barley seeds." *Magnetic resonance imaging* **13**(5): 745-751.
- Jadhav, S. J., S. E. Lutz, V. M. Ghorpade and D. K. Salunkhe** (1998). "Barley: chemistry and value-added processing." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **38**(2): 123-71.
- Jaskula, B., K. Goiris, F. Van Opstaele, G. De Rouck, G. Aerts and L. De Cooman** (2009). "Hopping Technology in Relation to alpha-Acids Isomerization Yield, Final Utilization, and Stability of Beer Bitterness." *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **67**(1): 44-57.
- Jeffree, C. E.** (1996). Structure and ontogeny of plant cuticles. Plant cuticles. G. Kerstiens. Oxford, BIOS Scientific Publishers Ltd: 33-82.

- Jegou, S., J. P. Douliez, D. Molle, P. Boivin and D. Marion** (2000). "Purification and Structural Characterization of LTP1 Polypeptides from Beer." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**(10): 5023-5029.
- Jégou, S., J.-P. Douliez, D. Mollé, P. Boivin and D. Marion** (2001). "Evidence of the Glycation and Denaturation of LTP1 during the Malting and Brewing Process." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**(10): 4942-4949.
- Jetter, R. S., S. Riederer, M.** (2000). "Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L." *Plant, Cell & Environment* **23**(6): 619-628.
- Jing, H. and D. D. Kitts** (2004). "Chemical characterization of different sugar-casein Maillard reaction products and protective effects on chemical-induced cytotoxicity of Caco-2 cells." *Food and Chemical Toxicology* **42**(11): 1833-44.
- Jones, M. and Pierce, J. S.** (1964). "Adsorption of amino acids from wort by yeasts." *Journal of the Institute of Brewing* **70**: 307-315.
- Jones, R. L.** (1973). "Gibberellins: Their Physiological Role." *Annual Review of Plant Physiology* **24**(1): 571-598.
- Kalla, R., K. Shimamoto, R. Potter, P. S. Nielsen, C. Linnestad and O.-A. Olsen** (1994). "The promoter of the barley aleurone-specific gene encoding a putative 7 kDa lipid transfer protein confers aleurone cell-specific expression in transgenic rice." *The Plant Journal* **6**(6): 849-860.
- Kamal-Eldin, A., H. N. Lærke, K. E. B. Knudsen, A. M. Lampi, V. Piironen, H. Adlercreutz, K. Katina, K. Poutanen and P. Aman** (2009). "Physical, microscopic and chemical characterisation of industrial rye and wheat brans from the Nordic countries." *Food and Nutrition Research* **53**.
- Kaukovirtanorja, A., S. Laakso, P. Reinikainen and J. Olkku** (1993). "Lipolytic and oxidative changes of barley lipids during malting and mashing." *Journal of the Institute of Brewing* **99**(5): 395-403.
- Kelly, L. and D. E. Briggs** (1992). "Barley maturity and the effects of steep aeration on malting." *Journal of the Institute of Brewing* **98**(4): 329-334.
- Kettunen, A., J. J. Hämäläinen, K. Stenholm and K. Pietilä** (1996). "A model for the prediction of [beta]-glucanase activity and [beta]-glucan concentration during mashing." *Journal of Food Engineering* **29**(2): 185-200.
- King, R. W. and P. von Wettstein-Knowles** (2000). "Epicuticular waxes and regulation of ear wetting and pre-harvest sprouting in barley and wheat." *Euphytica* **112**(2): 157-166.
- Kolattukudy, P. E.** (1985). "Enzymatic Penetration of the Plant Cuticle by Fungal Pathogens." *Annual Review of Phytopathology* **23**(1): 223-250.

- Kolattukudy, P. E.** (1996). Biosynthetic pathways of cutin and waxes, and their sensitivity to environmental stresses. *Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach*. G. Kerstiens, Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers: 83-108.
- Kunst, L. and A. L. Samuels** (2003). "Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax." *Progress in Lipid Research* **42**(1): 51-80.
- Laitila, A., E. Kotaviita, P. Peltola, S. Home and A. Wilhelmson** (2007). "Indigenous microbial community of barley greatly influences grain germination and malt quality." *Journal of the Institute of Brewing* **113**(1): 9-20.
- Lehmann, S., D. Funck, L. Szabados and D. Rentsch** (2010). "Proline metabolism and transport in plant development." *Amino Acids* **39**(4): 949-962.
- Lerche, M. H., B. B. Kragelund, L. M. Bech and F. M. Poulsen** (1997). "Barley lipid-transfer protein complexed with palmitoyl CoA: the structure reveals a hydrophobic binding site that can expand to fit both large and small lipid-like ligands." *Structure* **5**(2): 291-306.
- Lovegrove, A. and R. Hooley** (2000). "Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone." *Trends in Plant Science* **5**(3): 102-10.
- Macgregor, A. W., F. H. Macdougall, C. Mayer and J. Daussant** (1984). "Changes in levels of α -amylase components in barley tissues during germination and early seedling growth." *Plant Physiology* **75**(1): 203-206.
- Macgregor, A. W.** (1987). " α -Amylase, Limit Dextrinase, and α -Glucosidase Enzymes in Barley and Malt." *Critical Reviews in Biotechnology* **5**(2): 117 - 128.
- MacGregor, A. W., S. L. Bazin, L. J. Macri and J. C. Babb** (1999). "Modelling the Contribution of Alpha-Amylase, Beta-Amylase and Limit Dextrinase to Starch Degradation During Mashing." *Journal of Cereal Science* **29**(2): 161-169.
- MacGregor, A. W. a. M., J. E.** (1992). "Determination os specific activities of malt alpha-amylases." *Journal of Cereal Science* **16**: 267-277.
- Mackie, A. E. and J. C. Slaughter** (2002). "Formation of 4-hydroxyfuranones and their precursors during production of worts and beers." *Journal of the Institute of Brewing* **108**(3): 336-343.
- Maldonado, A. M., P. Doerner, R. A. Dixon, C. J. Lamb and R. K. Cameron** (2002). "A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis." *Nature* **419**(6905): 399-403.
- Marion, D., J. P. Douliez, M. F. Gautier and K. Elmorjani** (2004). Plant lipid transfer proteins:relationships between allergenicity and structural, biological and technological properties. *Plant food allergens*. E. N. C. Mills and P. R. Shewry, Blackwell Science: 57-69.

- Marion, D. and B. Bakan** (2009). Soluble proteins of beer. Beer in health and disease prevention. V.R. Preedy, Academic Press.
- Matzke, K. and M. Riederer** (1990). "The composition of the cutin of the caryopses and leaves of *Triticum aestivum* L." *Planta* **182**(3): 461-466.
- McEntyre, E., R. Ruan and R. G. Fulcher** (1998). "Comparison of Water Absorption Patterns in Two Barley Cultivars, Using Magnetic Resonance Imaging." *Cereal Chemistry* **75**(6): 792-795.
- Meikle, P. J., N. J. Hoogenraad, I. Bonig, A. E. Clarke and B. A. Stone** (1994). "A (1-3,1-4)-beta-glucan-specific monoclonal-antibody and its use in the quantitation and immunocyto-chemical location of (1-3,1-4)-beta-glucans." *Plant Journal* **5**(1): 1-9.
- Mikyska, A., M. Hrabak, D. Haskova and J. Srogl** (2002). "The role of malt and hop polyphenols in beer quality, flavour and haze stability." *Journal of the Institute of Brewing* **108**(1): 78-85.
- Mills, E. N. C., J. A. Kauffman, M. R. A. Morgan, J. M. Field, J. Hejgaard, M. O. Proudlove and A. Onishi** (1998). "Immunological Study of Hydrophobic Polypeptides in Beer." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**(11): 4475-4483.
- Mizuarai, S., K. Takahashi, T. Kobayashi and H. Kotani** (2005). "Advances in isolation and characterization of homogeneous cell populations using laser microdissection." *Histology and Histopathology* **20**(1): 139-146.
- Moldes, A. B., J. M. Cruz, J. M. Dominguez and J. C. Parajo** (2002). "Production of a cellulosic substrate susceptible to enzymatic hydrolysis from prehydrolyzed barley husks." *Agricultural and Food Science in Finland* **11**(1): 51-58.
- Molina-Cano, J. L., A. Sopena, J. P. Polo, C. Bergareche, M. A. Moralejo, J. S. Swanston and S. M. Glidewell** (2002). "Relationships Between Barley Hordeins and Malting Quality in a Mutant of cv. Triumph. II. Genetic and Environmental Effects on Water Uptake." *Journal of Cereal Science* **36**(1): 39-50.
- Molina, I., G. Bonaventure, J. Ohlrogge and M. Pollard** (2006). "The lipid polyester composition of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* seeds." *Phytochemistry* **67**(23): 2597-2610.
- Morrison, W. R. and A. M. Coventry** (1985). "Extraction of Lipids from Cereal Starches with Hot Aqueous Alcohols." *Starch - Stärke* **37**(3): 83-87.
- Munoz-Amatriain, M., L. Cistue, Y. Xiong, H. Bilgic, A. D. Budde, M. R. Schmitt, K. P. Smith, P. M. Hayes and G. J. Muehlbauer** (2010). "Structural and functional characterization of a winter malting barley." *Theoretical and Applied Genetics* **120**(5): 971-984.

- Multon, J. L.** (1982). Interactions entre l'eau et les constituants des grains et graines et produits dérivés. Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés. vol 1. J.L. Multon, Lavoisier et APRIA, 115-186.
- Muslin, E. H., A. M. Kanikula, S. E. Clark and C. A. Henson** (2000). "Overexpression, Purification, and Characterization of a Barley [alpha]-Glucosidase Secreted by *Pichia pastoris*." *Protein Expression and Purification* **18**(1): 20-26.
- Noots, I., V. Derycke, K. Cornelis, C. Michiels, J. A. Delcour, R. Delrue, J. De Keersmaecker and T. Coppens** (2001). "Degradation of starchy endosperm cell walls in nongerminating sterilized barley by fungi." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**(2): 975-981.
- Okada, Y., T. Iimure, K. Takoi, T. Kaneko, M. Kihara, K. Hayashi, K. Ito, K. Sato and K. Takeda** (2008). "The Influence of Barley Malt Protein Modification on Beer Foam Stability and Their Relationship to the Barley Dimeric α -Amylase Inhibitor-I (BDAI-I) as a Possible Foam-Promoting Protein." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(4): 1458-1464.
- Ostergaard, O., S. Melchior, P. Roepstorff and B. Svensson** (2002). "Initial proteome analysis of mature barley seeds and malt." *Proteomics* **2**(6): 733-9.
- Oudjeriouat, N., Y. Moreau, M. Santimone, B. Svensson, G. Marchis-Mouren and V. Desseaux** (2003). "On the mechanism of alpha-amylase." *European Journal of Biochemistry* **270**(19): 3871-9.
- Ozkara, R., A. Basman, H. Koxsel and S. Celik** (1998). "Effects of cultivar and environment on beta-glucan content and malting quality of Turkish barleys." *Journal of the Institute of Brewing* **104**(4): 217-220.
- Palacin, A., J. Varela, S. Quirce, V. del Pozo, L. Tordesillas, P. Barranco, M. Fernandez-Nieto, J. Sastre, A. Diaz-Perales and G. Salcedo** (2009). "Recombinant lipid transfer protein Tri a 14: a novel heat and proteolytic resistant tool for the diagnosis of baker's asthma." *Clinical and Experimental Allergy* **39**(8): 1267-1276.
- Palmer, G. H. and R. C. Agu** (1999). "Effect of mashing temperatures and endo-beta-glucanase on beta-glucan content of malt worts." *Journal of the Institute of Brewing* **105**(4): 233-235.
- Papageorgiou, M., N. Lakhdara, A. Lazaridou, C. G. Biliaderis and M. S. Izydorczyk** (2005). "Water extractable (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)-[beta]-d-glucans from barley and oats: An intervarietal study on their structural features and rheological behaviour." *Journal of Cereal Science* **42**(2): 213-224.
- Perrocheau, L., H. Rogniaux, P. Boivin and D. Marion** (2005). "Probing heat-stable water-soluble proteins from barley to malt and beer." *Proteomics* **5**(11): 2849-2858.
- Perrocheau, L., B. Bakan, P. Boivin and D. Marion** (2006). "Stability of Barley and Malt Lipid Transfer Protein 1 (LTP1) toward Heating and Reducing Agents: Relationships

- with the Brewing Process." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(8): 3108-3113.
- Phiarais, B. P. N., H. H. Wijngaard and E. K. Arendt** (2005). "The impact of kilning on enzymatic activity of buckwheat malt." *Journal of the Institute of Brewing* **111**(3): 290-298.
- Pollard, M., F. Beisson, Y. Li and J. B. Ohlrogge** (2008). "Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin." *Trends in Plant Science* **13**(5): 236-246.
- Psota, V., K. Vejrazka, O. Famera and M. Hrcka** (2007). "Relationship between grain hardness and malting quality of barley (*Hordeum vulgare* L.)." *Journal of the Institute of Brewing* **113**(1): 80-86.
- Ranki, H. and T. Sopanen** (1984). "Secretion of alpha-amylase by the aleurone layer and the scutellum of germinating barley grain." *Plant Physiology* **75**(3): 710-5.
- Ranki, H., T. Sopanen and R. Voutilainen** (1990). "Localization of carboxypeptidase I in germinating barley grain." *Plant Physiology* **93**(4): 1449-52.
- Reynhardt, E. C. and M. Riederer** (1994). "Structures and molecular-dynamic of plant waxes. 2. Cuticular waxes from leaves of *Fagus-Sylvatica* L and *Hordeum Vulgare* L." *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **23**(1): 59-70.
- Reynhardt, E. C.** (1997). "The role of hydrogen bonding in the cuticular wax of *Hordeum vulgare* L." *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **26**(2): 195-201.
- Richardson, A., R. Franke, G. Kerstiens, M. Jarvis, L. Schreiber and W. Fricke** (2005). "Cuticular wax deposition in growing barley (*Hordeum vulgare*) leaves commences in relation to the point of emergence of epidermal cells from the sheaths of older leaves." *Planta* **222**(3): 472-83.
- Richardson, A., A. Boscari, L. Schreiber, G. Kerstiens, M. Jarvis, P. Herzyk and W. Fricke** (2007a). "Cloning and expression analysis of candidate genes involved in wax deposition along the growing barley (*Hordeum vulgare*) leaf." *Planta* **226**(6): 1459-1473.
- Richardson, A., T. Wojciechowski, R. Franke, L. Schreiber, G. Kerstiens, M. Jarvis and W. Fricke** (2007b). "Cuticular permeance in relation to wax and cutin development along the growing barley (*Hordeum vulgare*) leaf." *Planta* **225**(6): 1471-1481.
- Riederer, M. and L. Schreiber** (2001). "Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles." *Journal of Experimental Botany* **52**(363): 2023-32.
- Ritchie, S., S. J. Swanson and S. Gilroy** (2000). "Physiology of the aleurone layer and starchy endosperm during grain development and early seedling growth: new insights from cell and molecular biology." *Seed Science Research* **10**(03): 193-212.

- Riverol, C. and J. Cooney** (2003). "Influence of temperature and the presence of adjuncts in the removing of protein-polyphenol complexes and carbohydrates in cold wort." *Journal of Food Technology* **1**(3): 130-132.
- Rowlett, R. and J. Murphy** (1981). "A convenient spectrophotometric method for the kinetic analysis of the enzymatic hydrolysis of N-acyl peptides using phthaldialdehyde." *Analytical Biochemistry* **112**(1): 163-169.
- Sadosky, P., P. B. Schwarz and R. D. Horsley** (2002). "Effect of arabinoxylans, beta-glucans, and dextrans on the viscosity and membrane filterability of a beer model solution." *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **60**(4): 153-162.
- Samuels, L., L. Kunst and R. Jetter** (2008). "Sealing plant surfaces: Cuticular wax formation by epidermal cells." *Annual Review of Plant Biology* **59**: 683-707.
- Schweizer, P., A. Jeanguenat, D. Whitacre, J. P. Metraux and E. Mosinger** (1996). "Induction of resistance in barley against *Erysiphe graminis f. sp. hordei* by free cutin monomers." *Physiological and Molecular Plant Pathology* **49**(2): 103-120.
- Shepherd, T. and D. Wynne Griffiths** (2006). "The effects of stress on plant cuticular waxes." *New Phytologist* **171**(3): 469-499.
- Sieber, P., M. Schorderet, U. Ryser, A. Buchala, P. Kolattukudy, J.-P. Metraux and C. Nawrath** (2000). "Transgenic Arabidopsis Plants Expressing a Fungal Cutinase Show Alterations in the Structure and Properties of the Cuticle and Postgenital Organ Fusions." *Plant Cell* **12**(5): 721-738.
- Siebert, K. J. and P. Y. Lynn** (1997). "Mechanisms of beer colloidal stabilization." *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **55**(2): 73-78.
- Siebert, K. J.** (1999). "Effects of Protein-Polyphenol Interactions on Beverage Haze, Stabilization, and Analysis." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**(2): 353-362.
- Simanova, E., T. Shi, J. Schonherr and L. Schreiber** (2005). "Sorption in reconstituted waxes of homologous series of alcohol ethoxylates and n-alkyl esters and their effects on the mobility of 2,4-dichlorophenoxybutyric acid." *Pest Management Science* **61**(4): 383-9.
- Siwela, M., J. R. N. Taylor, W. A. J. de Milliano and K. G. Duodu** (2010). "Influence of phenolics in finger millet on grain and malt fungal load, and malt quality." *Food Chemistry* **121**(2): 443-449.
- Skriver, K., R. Leah, F. Mulleruri, F. L. Olsen and J. Mundy** (1992). "Structure and expression of barley lipid transfer protein gene LTP1." *Plant Molecular Biology* **18**(3): 585-589.
- Slade, A. M., P. B. Hoj, N. A. Morrice and G. B. Fincher** (1989). "Purification and characterization of 3 (1-4)-beta-D-xylan andohydrolases from germinated barley." *European Journal of Biochemistry* **185**(3): 533-539.

- Slakeski, N. and G. B. Fincher** (1992). "Developmental regulation of (1-3,1-4)-beta-glucanase gene-expression in barley - Tissue-specific expression of individual isoenzymes." *Plant Physiology* **99**(3): 1226-1231.
- Sørensen, S. B., L. M. Bech, M. Muldbjerg, T. Beenfeldt and K. Breddam** (1993). "Barley Lipid Transfer Protein 1 is Involved in Beer Foam Formation." *MBAA Technical Quarterly* **30**,: 136-145.
- Stark, R. E., B. Yan, A. K. Ray, Z. Chen, X. Fang and J. R. Garbow** (2000). "NMR studies of structure and dynamics in fruit cuticle polyesters." *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **16**(1-2): 37-45.
- Steiner, E., M. Gastl and T. Becker** (2011). "Protein changes during malting and brewing with focus on haze and foam formation: a review." *European Food Research and Technology* **232**(2): 191-204.
- Stuart, I. M. and G. B. Fincher** (1983). "Immunological determination of (1 --> 3),(1 --> 4)-[beta]-D-glucan endohydrolase development in germinating barley (*Hordeum vulgare*)." *FEBS Letters* **155**(2): 201-204.
- Stuart, I. M., L. Loi and G. B. Fincher** (1986). "Development of (1->3,1->4)-{beta}-D-Glucan Endohydrolase Isoenzymes in Isolated Scutella and Aleurone Layers of Barley (*Hordeum vulgare*)." *Plant Physiology* **80**(2): 310-314.
- Sugimoto, N., G. Takeda, Y. Nagato and J. Yamaguchi** (1998). "Temporal and spatial expression of the alpha-amylase gene during seed germination in rice and barley." *Plant and Cell Physiology* **39**(3): 323-333.
- Sullivan, P., J. O'Flaherty, N. Brunton, V. L. Gee, E. Arendt and E. Gallagher** (2010). "Chemical composition and microstructure of milled barley fractions." *European Food Research and Technology* **230**(4): 579-595.
- Sun, M.-C., C.-D. Chen, Y.-S. Huang, Z.-S. Wu and Y.-P. Ho** (2008). "Matrix-assisted laser desorption/ionization-MS-based relative quantification of peptides and proteins using iodoacetamide and N-methyliodoacetamide as labeling reagents." *Journal of Separation Science* **31**(3): 538-547.
- Sungurtas, J., J. S. Swanston, H. V. Davies and G. J. McDougall** (2004). "Xylan-degrading enzymes and arabinoxylan solubilisation in barley cultivars of differing malting quality." *Journal of Cereal Science* **39**(2): 273-281.
- Swanston, J. S., A. C. Newton, S. P. Hoad and W. Spoor** (2006). "Variation across environments in patterns of water uptake and endosperm modification in barley varieties and variety mixtures." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**(5): 826-833.
- Tejinder, S.** (2007). "Effect of high temperature-high humidity treatment of germinated unkilned barley on malt quality and extract characteristics." *Journal of the Institute of Brewing* **113**(2): 219-227.

- Turnbull, K. M., D. Marion, T. Gaborit, R. Appels and S. Rahman** (2003). "Early expression of grain hardness in the developing wheat endosperm." *Planta* **216**(4): 699-706.
- Varner, J. E.** (1964). "Gibberellic Acid Controlled Synthesis of {alpha}-Amylase in Barley Endosperm." *Plant Physiology* **39**(3): 413-415.
- Vaughan, A., T. O'Sullivan and D. van Sinderen** (2005). "Enhancing the microbiological stability of malt and beer - A review." *Journal of the Institute of Brewing* **111**(4): 355-371.
- Von Wettstein-Knowles, P.** (1974). "Gene mutation in barley inhibiting the production and use of C26 chains in epicuticular wax formation." *FEBS Letters* **42**(2): 187-91.
- Von Wettstein-Knowles, P.** (2007). "Analyses of barley spike mutant waxes identify alkenes, cyclopropanes and internally branched alkanes with dominating isomers at carbon n°9." *The Plant Journal* **49**(2): 250-264.
- Walker, C., K. Dickie, J. P. Biawa, T. Ueda and R. E. Muller** (2001). "Prediction of extract potential in new barley varieties by measuring cell-wall breakdown." *Journal of the Institute of Brewing* **107**(3): 167-174.
- Wen, M. and R. Jetter** (2007). "Very-long-chain hydroxyaldehydes from the cuticular wax of *Taxus baccata* needles." *Phytochemistry* **68**(20): 2563-9.
- Wentz, M. J., R. D. Horsley and P. B. Schwarz** (2004). "Relationships among common malt quality and modification parameters." *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **62**(3): 103-107.
- Wijngaard, H. H., H. M. Ulmer, M. Neumann and E. K. Arendt** (2005). "The effect of steeping time on the final malt quality of buckwheat." *Journal of the Institute of Brewing* **111**(3): 275-281.
- Wijngaard, H. H. and E. K. Arendt** (2006). "Optimisation of a mashing program for 100% malted buckwheat." *Journal of the Institute of Brewing* **112**(1): 57-65.
- Woonton, B. W., J. V. Jacobsen, F. Sherkat and I. M. Stuart** (2005). "Changes in germination and malting quality during storage of barley." *Journal of the Institute of Brewing* **111**(1): 33-41.
- Yang, B., P. Schwarz and R. Horsley** (1998). "Factors involved in the formation of two precursors of dimethylsulfide during malting." *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **56**(3): 85-92.
- Zabka, V., M. Stangl, G. Bringmann, G. Vogg, M. Riederer and U. Hildebrandt** (2008). "Host surface properties affect prepenetration processes in the barley powdery mildew fungus." *New Phytologist* **177**(1): 251-263.

Zoccatelli, G., S. Pokoj, K. Foetisch, J. Bartra, A. Valero, M. del Mar San Miguel-Moncin, S. Vieths and S. Scheurer (2010). "Identification and characterization of the major allergen of green bean (*Phaseolus vulgaris*) as a non-specific lipid transfer protein (Pha v 3)." *Molecular Immunology* **47**(7-8): 1561-1568.

Annexe

Impact of Low Hydration of Barley Grain on β -Glucan Degradation and Lipid Transfer Protein (LTP1) Modifications During the Malting Process

Jean-Luc Runavot,^{†,‡} Benedicte Bakan,^{*,‡} Nathalie Geneix,[‡] Luc Saulnier,[‡] Keltouma Moco,[§] Fabienne Guillon,[‡] Françoise Corbineau,[§] Patrick Boivin,[‡] and Didier Marion[†]

[†]IFBM-Qualtec, Institut Francais des Boissons de la Brasserie et de la Malterie, 7 rue du Bois de la Champelle, BP 86, 54503 Vandoeuvre cedex, France

[‡]INRA, BIA, Rue de la Géraudière, BP 71627, 44316 Nantes cedex 3, France

[§]Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Germination et Dormance des Semences, URS UPMC-EAC 7180, 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France

 Supporting Information

ABSTRACT: One of the objectives of the malting industry is to reduce the energy cost during kilning without major effect on malt quality. In this study, the impact of a low hydration steeping process on lipid transfer protein (LTP1) modifications and β -glucan breakdown was evaluated in low (LH) and high (HH) hydrated malts. LTP1 modifications analyzed by MS/MS revealed acylation, glycation, and disulfide bond breakage in both LH and HH malts. LTP1 free amine content measurement and fluorescence of Maillard protein adducts revealed no significant difference between LH and HH malts. Immunolabeling of LTP1 during malting highlighted the diffusion of the protein from the aleurone layer to the endosperm at the end of steeping in both LH and HH malts. By contrast, a significant higher amount of β -glucans was measured in LH malts after five days of germination, whereas no significant difference between LH and HH malts was revealed through immunostaining of β -glucans or evaluation of the endosperm integrity after seven days of germination. The possibility to reduce the effects of a low hydration steeping process on β -glucan hydrolysis by increasing germination time was discussed.

KEYWORDS: barley, malt, steeping process, β -glucan, lipid transfer protein

INTRODUCTION

In regard to the increased interest in economic and environmental issues, the malting industry is looking for processes that could reduce the cost of energy¹ and wastes.² In the malting process, steeping at low hydration level is one of the new insights that would allow not only significant economical benefits by reducing the energy necessary for kilning but would also reduce the water consumption and the amount of effluent to be treated. Indeed, a 5% reduction of green malt hydration level was estimated to allow a 20% economy in thermal and electric energy, corresponding to 0.25×10^9 kWh/year for the French malting industry (P. Boivin, unpublished result), but the critical point is to obtain sufficient modifications of the grain to provide a malt quality compatible with beer production.

In barley grains, β -glucans account for up to 75% of the cell wall polysaccharides of the endosperm³ and efficient degradation of β -glucans has been described as a crucial element for the malt quality.^{4–6} Actually, a high amount of nonhydrolyzed β -glucans in malt induces a lower friability^{7–9} and a higher wort viscosity^{5,10} that are deleterious for the mashing and filtration steps of brewing. In addition, an efficient degradation of β -glucans is determinant for the subsequent action of other enzymes such as α and β -amylases that need to diffuse and access to their substrate.^{11,12} Altogether, this emphasizes the importance of β -glucan degradation during malting.

Besides, the modifications of barley grain during malting are determinant for the quality of beer, especially the formation of foam.¹³ In this regard, the lipid transfer protein 1 (LTP1), abundantly expressed in the aleurone layer of barley endosperm, has been extensively associated with beer foam formation.^{14,15} Indeed, LTP1 can account for about 5% of soluble proteins¹⁶ but has been identified as a major protein of beer and beer foams together with protein Z.^{13,17} While the native barley seed LTP1 displays poor foaming properties, this protein becomes a surface-active protein that concentrates in beer foam during the malting and brewing process.¹⁸ In particular, it has been shown that during the germination, LTP1 has to be transferred in the endosperm to allow its glycation through Maillard reactions^{19,20} during the kilning step. In addition, most of the LTP1 from malt and beer is acylated with one or two lipid adducts.^{21,22} It has been demonstrated that this lipid adduction occurs during germination²³ and enhance the surfactant properties of the protein.²⁴ Finally, the foaming properties of modified LTP1 are acquired after its unfolding due to disulfide bond breakages on boiling during the brewing process.²²

Received: March 18, 2011

Accepted: June 1, 2011

Revised: June 1, 2011

Table 1. Quantification of LTP1 and Acylated LTP1 in HH and LH Malt Extracts^a

	total LTP1 (μg of LTP1/g of malt)	total LTP1 (μg of LTP1/g of malt)
LH malt	1270 \pm 169	1300 \pm 180
HH malt	1510 \pm 192	1550 \pm 208

^aELISA analyses were conducted on triplicates. Mean values of ELISA triplicates \pm standard deviation.

The aim of the present work was to determine the effects of a steeping process leading to low hydrated barley grains on these two markers of malt quality, i.e. the degradation of β -glucans as well as the physicochemical modifications of barley LTP1. Previous studies have shown that germination rate was sharply affected beyond 36% hydration level at the end of steeping.²⁵ Consequently, steeping diagrams of the micromalting process were designed to obtain green malt at 38% and 45% moisture.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material. Barley (*Hordeum vulgare*, cv Esterel) grains were obtained from IFBM (Institut Français des Boissons, de la Brasserie et de la Malterie, Vandoeuvre, France). Malt samples were obtained by applying two steeping programs to barley grains. They allow 38% and 44% (fresh weight basis) hydration level at the end of steeping. To obtain malts at low or high hydration level, two distinct steeping programs were used. The steeping schedule used for 38% moisture was 8 h wet, 6 h dry, and 5 h wet, whereas the steeping diagram 8 h wet, 16 h dry, 7 h wet, 10 h dry, and 4 h wet was used for the 45% moisture malt. Germination was conducted in the same conditions for LH and HH malts at 16 °C. The samples were collected every day from the end of steeping to seven days of germination and were either stored at -80 °C before immunolabeling studies or used immediately for physiological and biochemical studies. At the fifth day of germination, green malt samples were kilned (50 °C, 8 h; 1 h to reach 64 °C, 7 h; 1 h to reach 80 °C, 3 h; 1 h to reach 85 °C, 3 h; ambient temperature reached in 2 h) in order to get malt with a classical malting duration.

LTP1 Purification. LTP1 purification was realized as previously described.²⁶ Briefly, 1 g of malt flour was mixed with 5 mL of deionized water for 30 min and then heated to 100 °C for 30 min in a water bath. After a centrifugation of 10 min at 8000g, 100 μL of iodoacetamide 0.5 M was added to the recovered supernatant and the mixture was incubated in the dark for 30 min, the latter reaction was stopped by adding 0.1% of trifluoroacetic acid. The sample was dialyzed against water and lyophilized before purification by RP-HPLC using a column (25 cm \times 4 mm) packed with Nucleosil C18 (Macherey-Nagel, France) coupled with a UV detector (205 and 218 nm). The fractions containing LTP1, assessed by SDS-PAGE with a 15% acrylamide gel, were pooled and freeze-dried.

Fluorescence of Advanced Maillard Compounds. Fluorescence emission spectra were recorded from 350 to 500 nm with an excitation wavelength at 330 nm by using a FluoroMax fluorescence spectrophotometer (Spex–Jobin-Yvon, France) to follow advanced compounds of Maillard reaction²⁷ in purified LTP1 samples.

LC-MS Analysis. Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) analyses of purified LTP1 were performed using a Waters 616 system (Waters, Manchester, UK) coupled to a LCQ Advantage ion trap mass spectrometer (ThermoFinnigan, USA). Chromatographic separations were conducted on a reverse-phase column (Nucleosil C18, 4 mm i.d., 25 cm length, Macherey-Nagel) at a flow rate of 0.3 mL/min and maintained at 62 °C. The gradient consisted of a linear increase from 20% to 50% of solvent B (acetonitrile containing 0.08% formic acid;

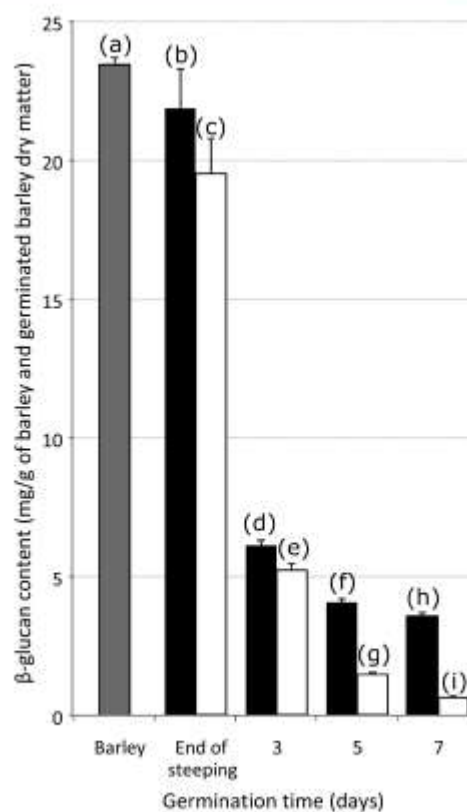


Figure 1. Nonhydrolyzed β -glucan content in barley (gray solid square) and green malts obtained at 38% (black solid square) or 45% (open square) hydration level. Means of three measurements \pm standard deviation. Vertical bars represent standard deviation. Letters on the bars indicate whether the values are significantly different at $P < 0.001$.

solvent A consisting in H_2O containing 0.12% formic acid) in 35 min, followed by a rapid increase up to 100% of B within 1 min. Mass data acquisitions were piloted by the Xcalibur software. The instrument operated in the positive ion mode. The spray voltage was 4.5 kV, and measurements were recorded on the m/z range (400–2000).

Determination of LTP1/LTP1b Content by Indirect ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). The assay was conducted as previously described.²³ Microtiter plates (Maxisorp; Nunc, Denmark) were coated with 100 μL of LTP1 standard (LTP1b or total LTP1) or assay solution. The specific detection was obtained using purified monoclonal antibodies (MAbs) anti-LTP1b or antitotal LTP1. A standard curve was generated by using pure barley LTP1. The amount of LTP1 in samples was estimated by reference to the standard curve.

Paraffin Embedding for Immunolabeling. Transverse sections sampled from half grains were transferred into plastic molds, fixed in a formaldehyde solution for 20 h at 20 °C, and processed for paraffin inclusion as described by Jamme et al.²⁸ Microtome sections of 10 μm (Microm HM340E Microtech, France) were used for immunolabeling.

Immunolabeling. Sample sections were saturated with 0.01 M Naphosphate buffer saline (PBS), pH 7.2 containing 4% of fat-free milk powder (PBS-milk) during 30 min prior to incubation for 1 h with monoclonal antibodies anti-(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)- β -glucans³ (1:250; Biosupplies Pty Ltd, Australia) and monoclonal anti-LTP1 (1:300; produced at the laboratory). After extensive washing in PBS, the sections were incubated for 1 h with the goat antimouse IgG coupled to Alexa Fluor-546- (1:100; Molecular Probes, Invitrogen USA). Immunostained

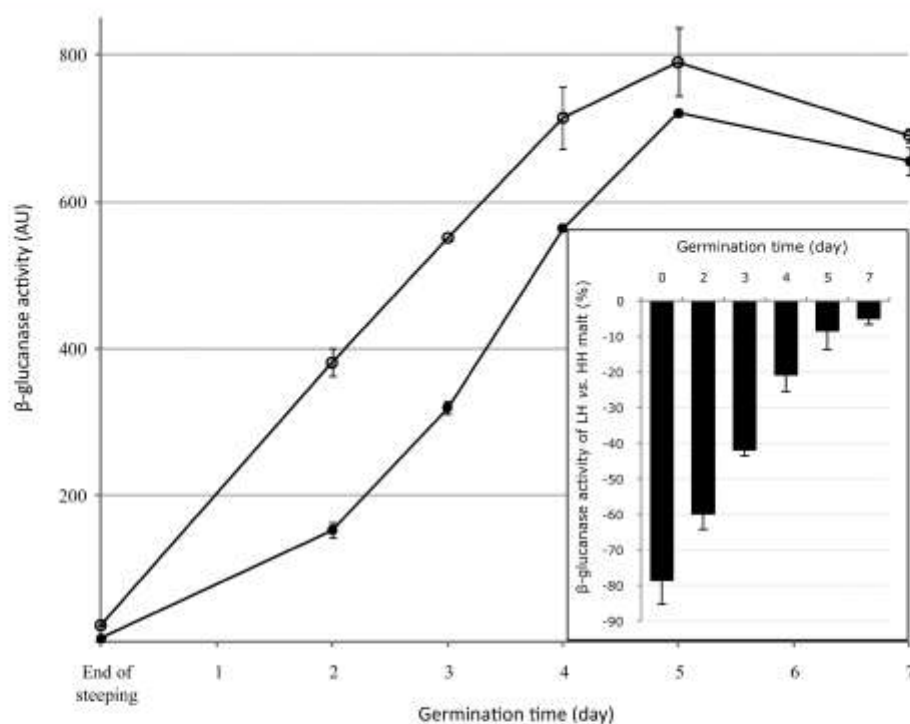


Figure 2. β -Glucanase activity of HH (empty circles) and LH (full circles) malts during germination. Insert indicates the proportion of β -glucanase activity of low hydrated malt compared to that in high hydrated malt during germination. Mean value of three measurements \pm standard deviation (vertical bars).

sections were then thoroughly washed in PBS and deionized water and mounted in deionized water to be visualized by fluorescence. The immunofluorescence sections were analyzed by a A1 Nikon (Japan) confocal laser scanner microscope. The resulting images were acquired, stored, and visualized with a Nikon NIS-Elements software program.

Evaluation of Endosperm Integrity of Green Malt by Light Microscopy. For albumen texture analysis, 20 μ m thick longitudinal cryosections of grain/malt at different stages of germination were obtained using a cryotome (Microm HM 500 OM, France). Light microscope observations of longitudinal cryosections were used to evaluate the endosperm texture of malts during germination. The method was adapted from Turnbull et al.²⁹ Longitudinal 20 μ m cryosections of malt were realized and washed through PBS and water before observation with a A1 Nikon (Japan) confocal laser scanner microscope.

Biochemical Analyses. O-Phthalaldehyde Assay. O-Phthalaldehyde assay was realized with a modified method of Rowlett and Murphy.³⁰ Briefly, 50 μ L of purified LTP1 samples of 2 mg/mL in 50 mM pH 7.8 phosphate buffer were added to 1 mL of OPA solution (O-phthalaldehyde 0.8 g/L in 50 mL containing 1 mL methanol; 25 mL tetraborate 0.1 M pH 9.3; 2.5 mL SDS 10%; 100 μ L 2-mercapto-ethanol and H₂O) and incubated 2 min. The absorbance was measured at 340 nm, and free amine content was determined from a standard curve obtained from lysine.

β -Glucanase Activity was measured using the azo-barley glucan procedure (Megazyme, Ireland) on the green malts. The enzyme was extracted during 15 min from 0.5 g of a green-malt flour with 8 mL of extraction buffer (40 mM acetate/phosphate, pH 4.6). The supernatant of the extract was then preincubated 5 min at 30 $^{\circ}$ C as the azo-barley glucan substrate solution (in 0.5 mL aliquots). Substrate and enzyme were mixed by adding 0.5 mL of extract in the aliquots, and the reaction was incubated for 10 min at 30 $^{\circ}$ C. A precipitating solution (sodium acetate 300 mM, zinc acetate 20 mM, pH 5.0, in methoxyethanol 80%)

was then added, after 5 min at room temperature. After centrifugation, absorbance at 590 nm of the supernatant was measured.

Determination of Nonhydrolyzed β -Glucans. the content of non hydrolyzed β -glucans was determined by following the instruction of the mixed-linkage β -glucan assay procedure (Megazyme, Ireland). Briefly, malts obtained at various hydration levels and at different times of germination were crushed in liquid nitrogen. The β -glucans were extracted in ethanol 50% at 4 $^{\circ}$ C for 15 min, and then the enzymes were inhibited with 5 min of incubation at 100 $^{\circ}$ C in boiling water. Samples were centrifuged 1 min at 14500g, and the pellets were washed twice in ethanol 50%. The final pellets were resuspended in 20 mM sodium phosphate buffer pH 6.5 and heated to 40 $^{\circ}$ C before incubation with lichenase during 1 h at 40 $^{\circ}$ C. The samples were then centrifuged 1 min at 14500g, and three fractions were prepared from the supernatant: 50 mM sodium acetate pH 4 were added to one of them while β -glucosidase was added to the others. After 15 min incubation at 40 $^{\circ}$ C, the GOPOD reagent (glucose oxidase plus peroxidase and 4-aminoantipyrine) was added and the samples were further incubated 20 min at 40 $^{\circ}$ C. The amount of glucose released was evaluated through 510 nm absorbance.

RESULTS AND DISCUSSION

Impact of Low Hydration on β -Glucan Content and β -Glucanase Activity of Green Malts. The steeping programs used in this study led to grains with high (44.5% fresh weight basis) and low (37.5% fresh weight basis) hydration level. The 45% hydration level was used as a standard malt hydration level, whereas 38% was chosen as a low hydration level that would not hinder the germination.²⁵ The germination and kilning steps were conducted in the same conditions for the two samples and resulted in green malt with 43.7% and 39.9% fresh weight basis water

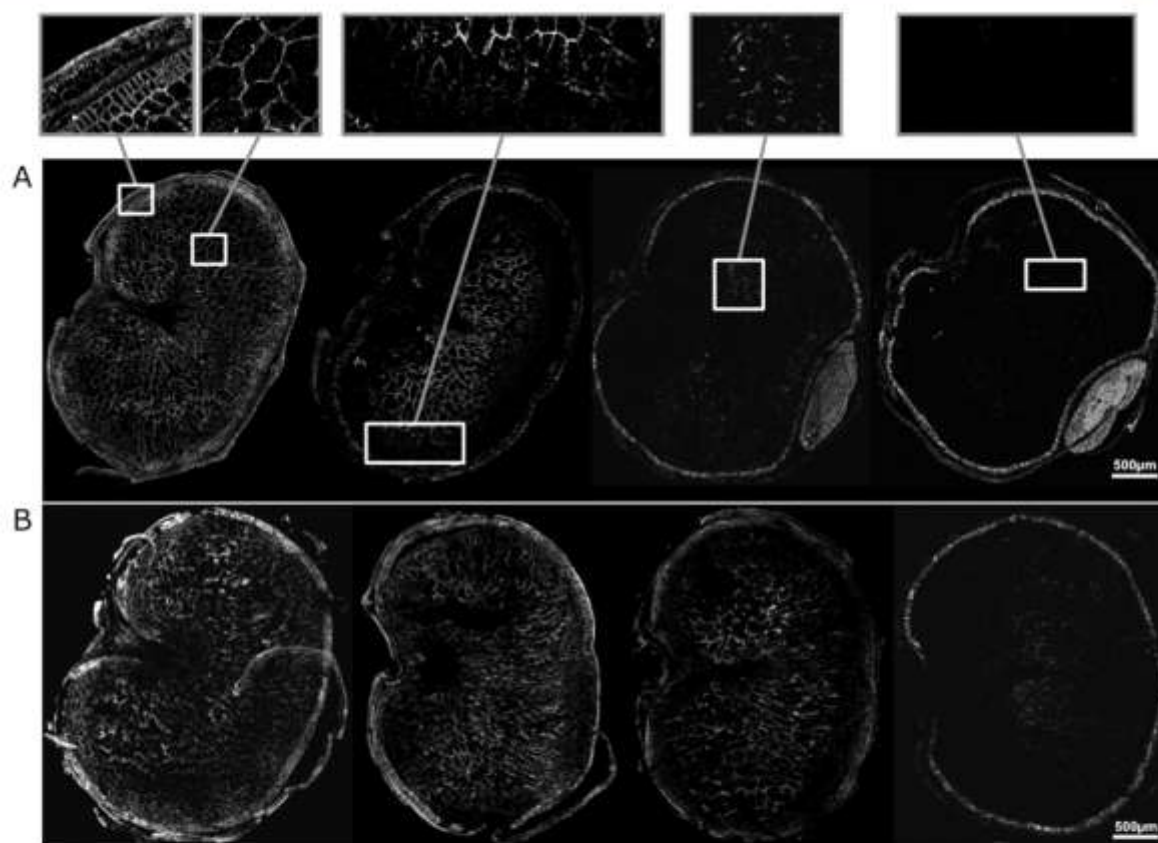


Figure 3. Immunolocalization of reticulated (1–3)(1–4) β -D-glucan in green malt transversal sections during the germination steps of malting. (A) and (B) represent high hydrated and low hydrated malts, respectively, after 0, 3, 5, and 7 days after steeping, from left to right. The boxes on top are zooms.

content, respectively. These malts were called hereafter high hydrated (HH) and low hydrated (LH) malt, respectively. In both malt types, germination occurred and grains starting to germinate quickly after steeping.

Nonhydrolyzed β -glucan content was determined in the HH and LH samples at the end of steeping and during germination (Figure 1). After steeping, the β -glucan content decreased from 23.5 mg in barley to 19.5 mg/g in HH and 21.9 mg/g in LH grains. These results confirmed that β -glucan degradation was significant during the steeping step, as shown by Bamforth et al.⁶ and in accordance with Sungurtas et al.,³¹ who showed that (1–3, 1–4) β -D-endoglucanase activity is already significant at the end of the steeping process. During germination, the majority of β -glucan hydrolysis occurred in the first three days in both samples in agreement with previous reports.^{7,30,32} However β -glucan hydrolysis was further observed until seven days of germination in the green malts. The amount of nonhydrolyzed β -glucans was significantly higher in LH green malt than in HH green malt. Indeed, after seven days of germination, 3% of the initial barley β -glucans remained in HH green malt and 15% in the LH green malt. Nevertheless, for both malts, the remaining amount of nonhydrolyzed β -glucans (4 mg/g) was comprised in the range value described for standard steeping conditions.^{7,31}

To complete these results, β -glucanase activity of HH green malt and LH green malt extracts were compared during germination (Figure 2). At the end of steeping, β -glucanase activity was low for both LH and HH programs. During germination, β -glucanase was significantly ($p < 0.01$) lower in LH green malt

compared to HH green malt. However, it is noticeable that this difference in β -glucanase activity decreased along germination, only 10% and 6% of difference activity between LH and HH green malt being measured at five days and seven days of germination, respectively (Figure 2 inset). These results showed that the LH steeping program did not impact the production of β -glucanase enzyme but rather affected the kinetics of the enzyme biosynthesis.

In Situ Hydrolysis of β -Glucans in LH and HH Green Malts.

The structure of barley endosperm and in particular the distribution of the β -glucans has been described as a key parameter of the malt production.^{33,34} In this regard, the diffusion of the β -glucanases within the endosperm and the extent of endosperm cell wall degradation are critical points. We therefore followed along germination, the degradation of β -glucans in the endosperm by immunolabeling (Figure 3). In barley grain before steeping or at the end of steeping (stage 0 of Figure 3), the β -glucans were evenly distributed in the starchy endosperm. Strong labeling of the aleurone layer and of the pericarp was obtained in barley and steeped grains as previously observed in wheat grains.^{35,36} The production of β -glucanase takes place in the aleurone layer and in the scutellum.^{37,38} As expected, upon germination, the nonhydrolyzed β -glucans were progressively restricted to the central region of the endosperm as observed in the cross sections of germinating barley grain. The same pattern of degradation was observed in both HH and LH green malts, which indicated that the diffusion of the enzyme occurred. After five days of germination, cell wall degradation was almost completed in the starchy endosperm of HH green malt but less extended in LH green malt.

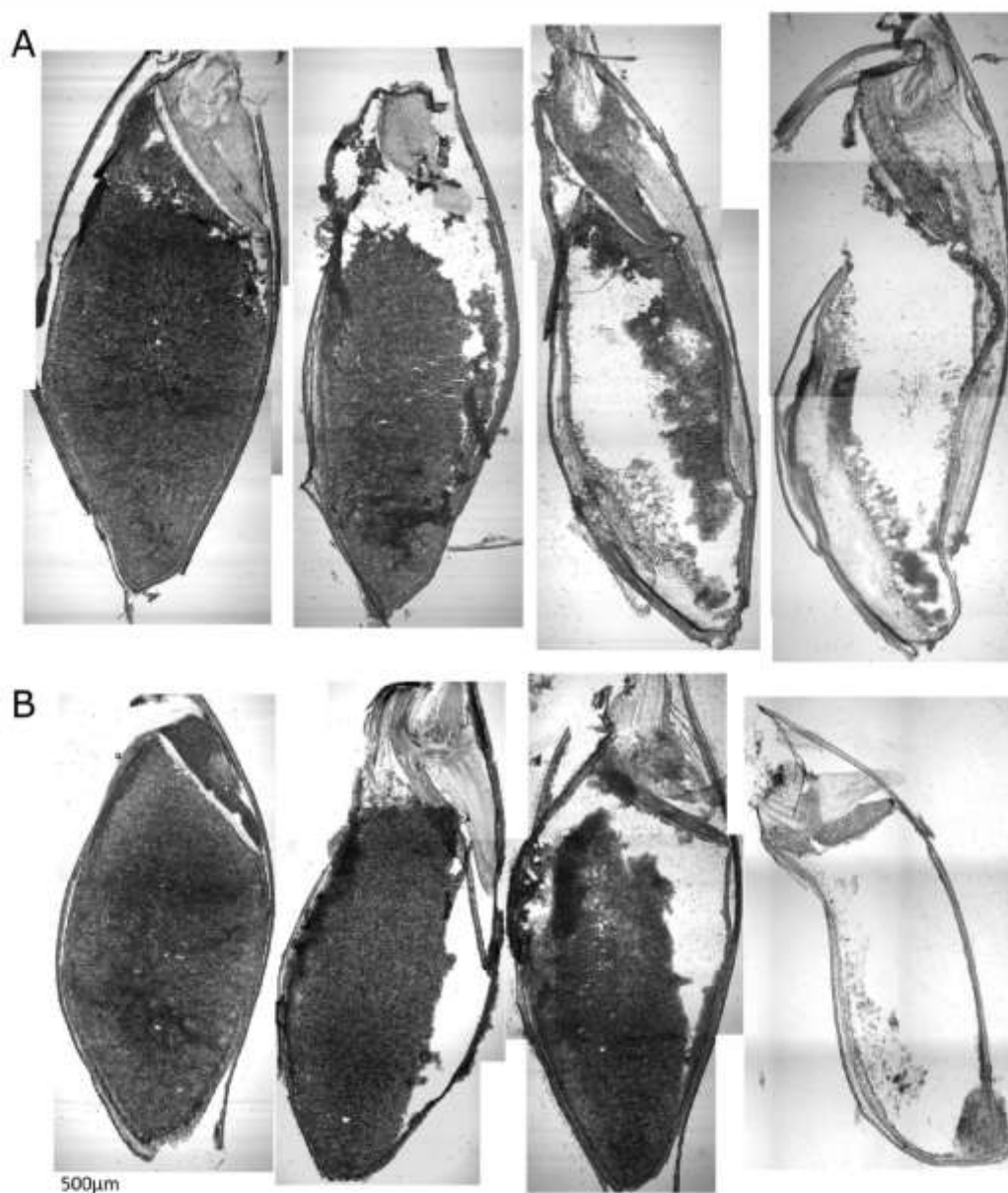


Figure 4. Light microscopy images of cryosection of germinating barley. (A) and (B) represent high hydrated and low hydrated malts, respectively, after 0, 3, 5, and 7 days after steeping, from left to right.

A comparable amount of nonhydrolyzed β -glucans was revealed after three days of germination in HH malt and five days of germination in LH malt (Figure 3). This suggested a two-day lag when germination was performed at lower hydration. Indeed, after seven days of germination, β -glucans could not be anymore detected in LH malt, as observed after five days of germination for HH samples.

The antibody used for revealing nonhydrolyzed β -glucans has a high binding with the (1–3, 1–4) β -D-glucans with a degree of polymerization (DP) of 6–7 and higher.³ For instance, the affinity of the antibody for the DP6 oligosaccharides is 66 times higher than that for the DP4 oligosaccharide.³ This could explain the apparent discrepancy between biochemical analyses (Figure 1) and immunolabeling results in LH malt (Figures 3a,b). Furthermore,

these results also suggested that the remaining β -glucans in the LH green malt after 7 days of germination had a low degree of polymerization. This point is noticeable, as previous studies have suggested that an increase of wort viscosity is correlated to the presence of residual β -glucans with DP 500 and higher.^{39–41}

Incomplete or inhomogeneity in β -glucan degradation is often associated with malt friability.^{9,12} Microscopy observations of longitudinal cryosections were then used to evaluate the starchy endosperm texture of LH and HH green malts during germination. Indeed, at each germination stage, the cross sections were washed with aqueous buffer. While barley starchy endosperm remained intact at the end of steeping, a progressive extraction of starchy endosperm material occurred during germination. These results highlighted the germination-induced modifications in the

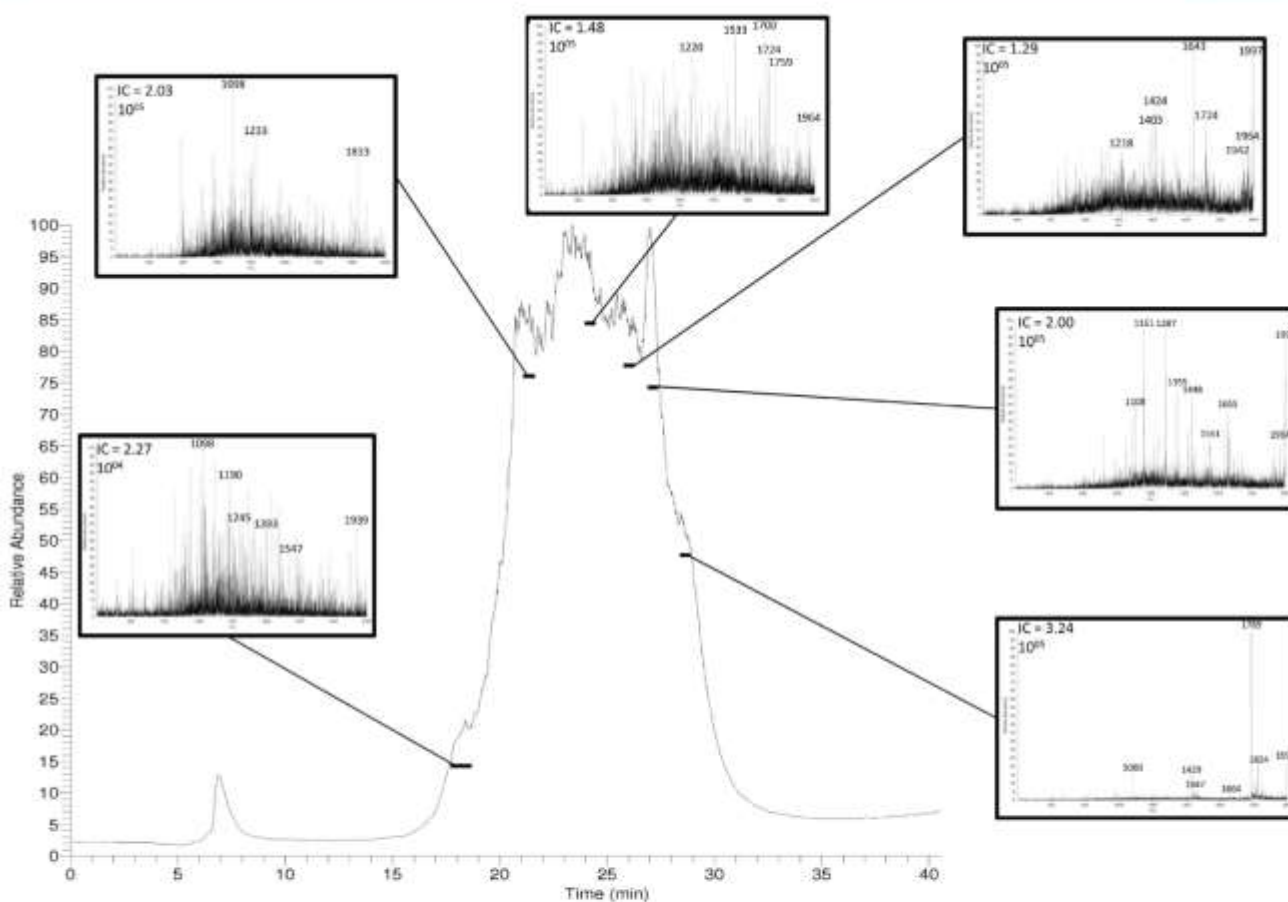


Figure 5. LC-MS chromatogram of LTP1 extracted from high hydrated (HH) malt with associated mass spectra. The same chromatogram has been observed with low hydrated malts (Supporting Information Figure 1). The experimental ions corresponding to the modified forms of LTP1 in LH and HH malts are presented in Supporting Information Tables 1 and 2. IC = ionical current.

endosperm integrity that occurred during malting as illustrated by light microscopy images (Figure 4). In accordance with β -glucan disappearance, more than half of the endosperm of HH green malt was extracted after five days of germination, whereas complete disaggregation of the endosperm was obtained after seven days of germination in LH and HH green malts.

Altogether, these results showed that a lower hydration of barley grains at the end of the steeping process delayed cell wall degradation in LH green malt compared to a HH one. These differences were obviously weakened after seven days of germination.

LTP1 Modifications in LH and HH Malts. The different modifications of LTP1 during malting were assessed through LC-MS analysis (Figure 5 and Supporting Information Table 1). To monitor the LTP1 modifications during brewing, these analyses were conducted on LTP1 extracted from boiled malt extracts. Indeed, previous studies²⁶ have demonstrated that the protein content of a boiled malt extract is nearly identical to that of the corresponding beer extract.

MS analyses revealed the occurrence of acylation (with one and two lipid adducts with a mass of 294 Da). These modifications were due to the covalent adduction of the α -ketol 9-hydroxy-10-oxo-12(*Z*)-octadecenoic acid. This oxylipin is formed from linoleic acid through the combined action of lipoxygenase and allene oxide synthase.²³ Glycations (with 1 up to 5 hexoses adducts with a mass of 162 Da) were also highlighted through MS analyses

as well as cysteine alkylation in relation to disulfide bond disruption upon LTP1 denaturation. All these modifications were observed in both LH and HH malts (Supporting Information Tables 1 and 2).

By using specific antibodies, total LTP1 and lipid adducted LTP1 were quantified by ELISA in LH and HH malts (Table 1). As previously observed,^{22,23} almost all the LTP1 was lipid adducted in malts without significant ($p > 0.01$) differences between LH and HH malts. It seemed therefore that LTP1 acylation was not affected by the reduced hydration level during the steeping process. Therefore, the acylation-related foaming properties of LTP1 should not be affected by the reduction of the hydration level.

During malting, LTP1 is also glycosylated through Maillard reaction, which includes the initial condensation reaction between amine groups of the protein (N-terminal and ϵ -NH₂ of lysine residue) and reducing sugars.^{19,20} As a consequence, the measurement of free amine groups within the protein was used to evaluate the degree of LTP1 glycation in the LH and HH malts (Figure 6A). As the Maillard reaction mainly occurs during the kilning step of malting, the relative proportion of free amine contents was evaluated on purified LTP1 extracted from LH and HH kilned malts (Figure 6A,B). A significant decrease of free amine groups was observed between barley LTP1 and malt LTP1 which contain four lysine residues. Indeed, we measured a 20%

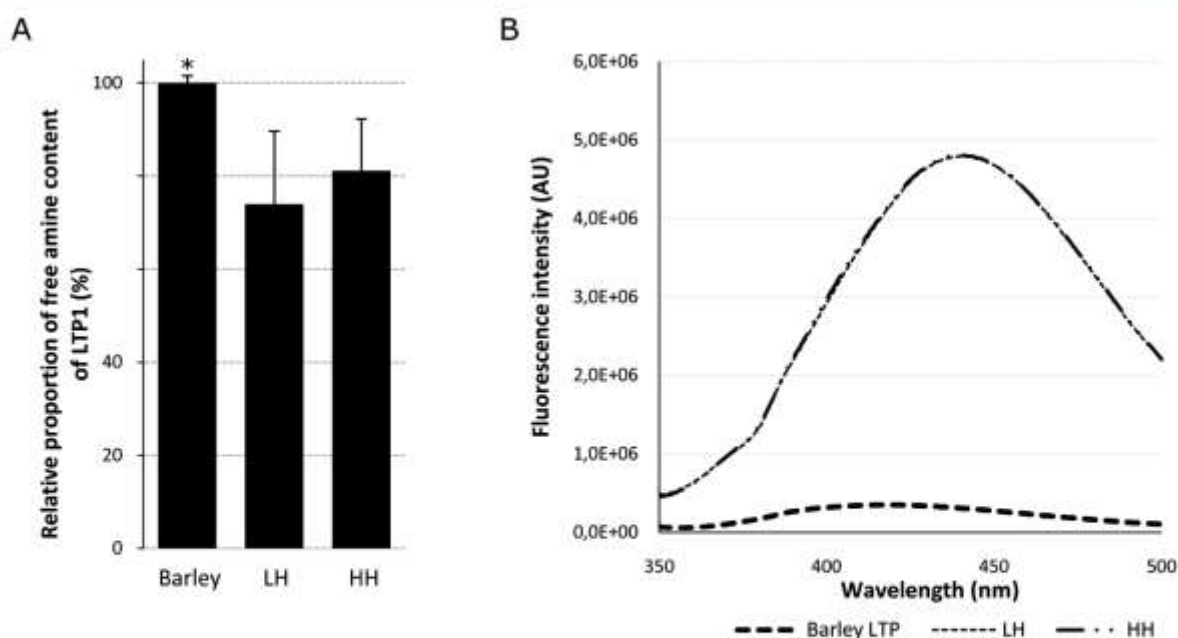


Figure 6. Analyses of LTP1 glucosylations. (A) Relative proportion of free amine content of LH and HH malts LTP1 extracts compared to barley LTP1 extracts. (B) Emission spectra of advanced maillard products of LH and HH malts were obtained with an excitation fixed at 330 nm. Mean values of 3 measurements \pm standard deviation (vertical bars). * = significantly different ($p < 0.005$).

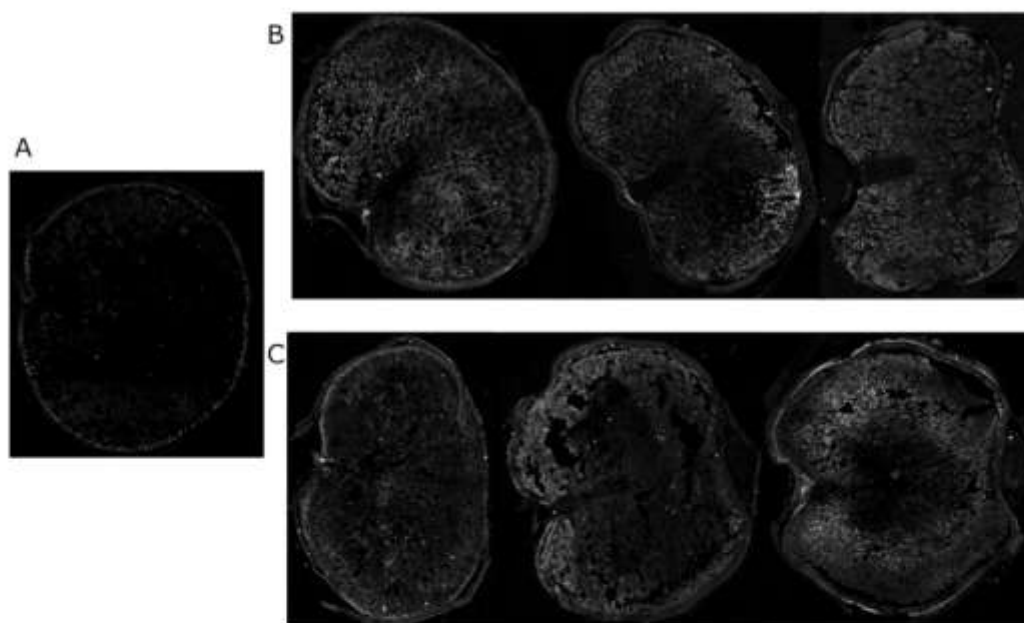


Figure 7. Fluorescence observations of LTP1 diffusion by immunostaining in green malts during the germination step of malting. (A) represents a section of barley before steeping. (B) and (C) represent high hydrated and low hydrated malts, respectively, after 0, 3, and 5 days after steeping, from left to right.

reduction of free amine in malt samples compared to barley LTP1. In addition, no significant difference was observed between LH and HH malt LTP1. Nevertheless, glycation of other amino acid residues could not be ruled out. In addition, LTP1 modifications with advanced Maillard products were observed. These advanced Maillard products consist of a broad range of compounds formed from carbohydrates and lipids as well.⁴² For instance LTP1 adduction

with *N*^ε-(carboxymethyl)lysine, *N*^ε-(carboxyethyl)lysine, pyrrolidine and argpyrimidine were observed (Figure 5 and Supporting Information Tables 1 and 2) in both LH and HH malts. Adduction of LTP1 with other advanced products of Maillard reaction was possible and could contribute to the noisy zone of the LC-MS peak of LTP1 (Figure 5). Consequently, to further compare the chemical LTP1 modifications induced in LH and HH malts, we chose to monitor

the formation of advanced Maillard compounds through fluorescence analysis of the purified protein (Figure 6B). The fluorescence intensity of barley LTP1 from 350 to 490 nm was sharply lower than those of malt LTP1, which fit the formation of advanced Maillard reaction products.

In accordance with free amine group measurement, no significant difference in fluorescence was observed between LTP1 isolated from HH and LH malts.

LTP1 Diffusion in LH and HH Green Malts. In mature cereal grains, LTP1 was located in the aleurone layer (Figure 7) as previously observed.^{43,44} It has been hypothesized that a diffusion of LTP1 during germination would partly account for the modifications of the protein widely described during malting.^{17,20,22,45}

In the present study, specific immunostaining of LTP1 confirms such a diffusion of the protein within the endosperm and also clearly demonstrated that this diffusion occurs during the steeping step in barley (Figure 7). Because any significant difference in the LTP1 diffusion was observed in LH and HH malt, it can be concluded that a low hydrated steeping process would not hinder LTP1 diffusion within the endosperm in full agreement with the LTP1 modifications observed in LH and HH malts. The diffusion of LTP1 within endosperm coupled to a significant β -glucan hydrolysis was probably sufficient to ensure LTP1 glycation during kilning of LH malt.

In summary, our results clearly showed that malting at low hydration level, i.e. 38% water content of steeped grains, did not significantly impact LTP1 diffusion and the physicochemical modifications necessary for the expression of its foaming properties. Indeed, all the modifications undergone by barley LTP1, i.e. acylation, glycation, denaturation, and adduction with advanced Maillard reaction products, were observed in both LH and HH malts. By contrast, after five days of germination, a steeping process leading to low hydrated grains induced a delay in β -glucanase diffusion and therefore in β -glucan hydrolysis, another key parameter of malt quality. Nevertheless, β -glucan degradation was homogeneous and the amount of glucose released by β -glucanase in LH malts was sufficient for LTP1 glycation. Moreover, our results indicated that the impact of the low hydration steeping process could be sharply reduced after seven days of germination. In the attempt to reduce water use in the steeping process and consequently the energy necessary for kilning, the extent of the germination time could therefore be further investigated at industrial scale as an alternative to achieve the endosperm modifications necessary for malting and brewing industries. The increase of germination time would result in a 2.5% increase of the energy cost (P. Boivin, unpublished results), whereas the LH malt processing would induce a 20% reduction of the energy cost of malting.

■ ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. LC-MS chromatogram of LTP1 extracted from low hydrated (LH) malt with associated mass spectra. List of the modified forms of LTP1 with the corresponding experimental ions observed in LH malts. List of the modified forms of LTP1 with the corresponding experimental ions observed in HH malts. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +33 02 40 67 52 15. Fax: +33 02 40 67 50 25. E-mail: bakan@nantes.inra.fr.

Funding Sources

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche by the MALTECO project.

■ ACKNOWLEDGMENT

We thank Brigitte Bouchet and André Lelion for their technical assistance. The mass spectrometry and microscopy experiments have been performed with the facilities of the BIBS platform (INRA Angers-Nantes, France).

■ ABBREVIATIONS USED

DP, degree of polymerization
HH, high hydrated
LH, low hydrated
LTP1, lipid transfer protein 1

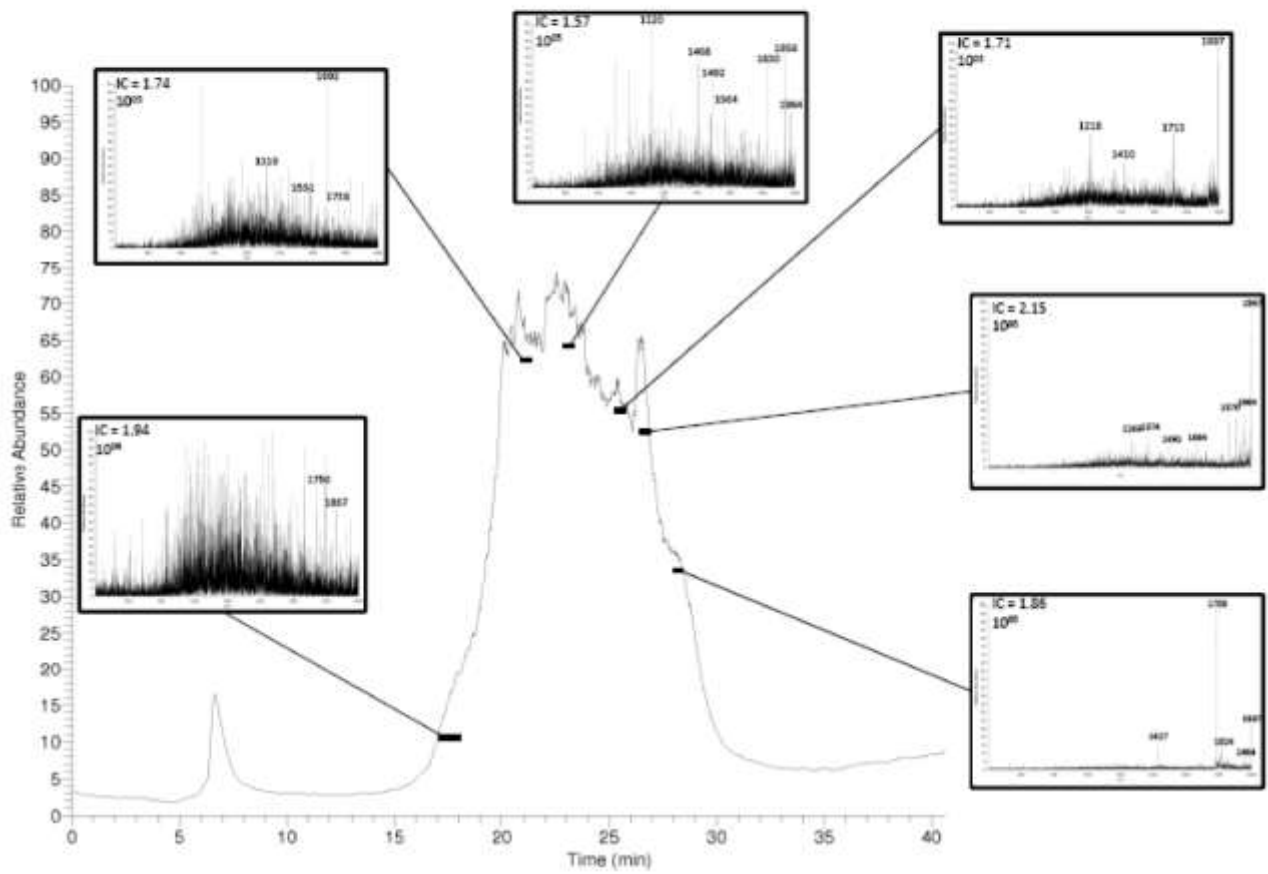
■ REFERENCES

- (1) Tejinder, S. Effect of high temperature-high humidity treatment of germinated unkilned barley on malt quality and extract characteristics. *J. Inst. Brew.* **2007**, *113* (2), 219–227.
- (2) Bryce, J. H.; Goodfellow, V.; Agu, R. C.; Brosnan, J. M.; Bringham, T. A.; Jack, F. R. Effect of Different Steeping Conditions on Endosperm Modification and Quality of Distilling Malt. *J. Inst. Brew.* **2010**, *116* (2), 125–133.
- (3) Meikle, P. J.; Hoogenraad, N. J.; Bonig, L.; Clarke, A. E.; Stone, B. A. A (1- \rightarrow 3,1- \rightarrow 4)- β -glucan-specific monoclonal-antibody and its use in the quantitation and immunocyto-chemical location of (1- \rightarrow 3,1- \rightarrow 4)- β -glucans. *Plant J.* **1994**, *5* (1), 1–9.
- (4) Gianinetti, A.; Ferrari, B.; Frigeri, P.; Stanca, A. M. In vivo modeling of beta-glucan degradation in contrasting barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (8), 3158–3166.
- (5) Fincher, G. B.; Stone, B. A., Cell walls and their components in cereal grain technology. In *Advances in Cereal Science and Technology*; American Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN, **1986**; Vol. 8, pp 207–295.
- (6) Bamforth, C. W.; Martin, H. L. Beta-glucan and beta-glucan solubilase in malting and mashing. *J. Inst. Brew.* **1981**, *87* (6), 365–371.
- (7) Ferrari, B.; Baronchelli, M.; Stanca, A. M.; Gianinetti, A. Constitutive differences between steely and mealy barley samples associated with endosperm modification. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90* (12), 2105–2113.
- (8) Noots, L.; Derycke, V.; Cornelis, K.; Michiels, C.; Delcour, J. A.; Delrue, R.; De Keersmaeker, J.; Coppens, T. Degradation of starchy endosperm cell walls in nongerminating sterilized barley by fungi. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (2), 975–981.
- (9) Wentz, M. J.; Horsley, R. D.; Schwarz, P. B. Relationships among common malt quality and modification parameters. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2004**, *62* (3), 103–107.
- (10) Papageorgiou, M.; Lakhidara, N.; Lazaridou, A.; Biliaderis, C. G.; Izydorczyk, M. S. Water extractable (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)-[β]-D-glucans from barley and oats: an intervarietal study on their structural features and rheological behaviour. *J. Cereal Sci.* **2005**, *42* (2), 213–224.
- (11) Fincher, G. B. Molecular and Cellular Biology Associated with Endosperm Mobilization in Germinating Cereal Grains. *Annu. Rev. Plant Phys.* **1989**, *40* (1), 305–346.
- (12) Gianinetti, A. A theoretical framework for β -glucan degradation during barley malting. *Theor. Biosci.* **2009**, *128* (2), 97–108.
- (13) Okada, Y.; Imure, T.; Takoi, K.; Kaneko, T.; Kihara, M.; Hayashi, K.; Ito, K.; Sato, K.; Takeda, K. The Influence of Barley Malt Protein Modification on Beer Foam Stability and Their Relationship to the Barley Dimeric α -Amylase Inhibitor-1 (BDAL-1) as a Possible Foam-Promoting Protein. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (4), 1458–1464.
- (14) VanNierop, S. N. E.; Evans, D. E.; Axcell, B. C.; Cantrell, I. C.; Rautenbach, M. Impact of Different Wort Boiling Temperatures on the

Beer Foam Stabilizing Properties of Lipid Transfer Protein 1. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (10), 3120–3129.

- (15) Marion, D.; Bakan, B. Soluble proteins of beer. In *Beer in Health and Disease Prevention*; Preedy, V. R., Ed.; Academic Press: New York, 2009.
- (16) Evans, D. E.; Hejgaard, J. The impact of malt derived proteins on beer foam quality. Part I. The effect of germination and kilning on the level of protein Z4, protein Z7 and LTP1. *J. Inst. Brew.* **1999**, *105* (3), 159–169.
- (17) Perrocheau, L.; Rogniaux, H.; Boivin, P.; Marion, D. Probing heat-stable water-soluble proteins from barley to malt and beer. *Proteomics* **2005**, *5* (11), 2849–2858.
- (18) Sorenson, S. B.; Bech, L. M.; Muldbjerg, M.; Beenfeldt, T.; Breddam, K. Barley Lipid Transfer Protein 1 is Involved in Beer Foam Formation. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **1993**, *30*, 136–145.
- (19) Jégou, S.; Douliez, J.-P.; Mollé, D.; Boivin, P.; Marion, D. Evidence of the Glycation and Denaturation of LTP1 during the Malting and Brewing Process. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (10), 4942–4949.
- (20) Chmelik, J.; Zidkova, J.; Rehulka, P.; Petry-Podgorska, L.; Bobalova, J. Influence of different proteomic protocols on degree of high-coverage identification of nonspecific lipid transfer protein 1 modified during malting. *Electrophoresis* **2009**, *30* (3), 560–567.
- (21) Jegou, S.; Douliez, J. P.; Molle, D.; Boivin, P.; Marion, D. Purification and Structural Characterization of LTP1 Polypeptides from Beer. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (10), 5023–5029.
- (22) Perrocheau, L.; Bakan, B.; Boivin, P.; Marion, D. Stability of Barley and Malt Lipid Transfer Protein 1 (LTP1) toward Heating and Reducing Agents: Relationships with the Brewing Process. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (8), 3108–3113.
- (23) Bakan, B.; Hamberg, M.; Perrocheau, L.; Maume, D.; Rogniaux, H.; Tranquet, O.; Rondeau, C.; Blein, J.-P.; Ponchet, M.; Marion, D. Specific Adduction of Plant Lipid Transfer Protein by an Allene Oxide Generated by 9-Lipoxygenase and Allene Oxide Synthase. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (51), 38981–38988.
- (24) Bakan, B.; Hamberg, M.; Larue, V.; Prangé, T.; Marion, D.; Lascombe, M. B. The crystal structure of oxylipin-conjugated barley LTP1 highlights the unique plasticity of the hydrophobic cavity of these plant lipid-binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *390* (3), 780–785.
- (25) Guillot, F.; Bailly, C.; Boivin, P.; Corbineau, F. Effect of water content of barley grains during malting on germination and malt quality. *Pol. J. Nat. Sci.* **2008**, *Suppl. 5*, 64–65.
- (26) Perrocheau, L.; Rogniaux, H.; Boivin, P.; Marion, D. Probing heat-stable water-soluble proteins from barley to malt and beer. *Proteomics* **2005**, *5* (11), 2849–2858.
- (27) Andersen, C. M.; Mortensen, G. Fluorescence spectroscopy: A rapid tool for analyzing dairy products. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (3), 720–729.
- (28) Jamme, F.; Robert, P.; Bouchet, B.; Saulnier, L.; Dumas, P.; Guillon, F. Aleurone cell walls of wheat grain: high spatial resolution investigation using synchrotron infrared microspectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **2008**, *62* (8), 895–900.
- (29) Turnbull, K. M.; Marion, D.; Gaborit, T.; Appels, R.; Rahman, S. Early expression of grain hardness in the developing wheat endosperm. *Planta* **2003**, *216* (4), 699–706.
- (30) Rowlett, R.; Murphy, J. A convenient spectrophotometric method for the kinetic analysis of the enzymatic hydrolysis of N-acyl peptides using phthalaldehyde. *Anal. Biochem.* **1981**, *112* (1), 163–169.
- (31) Sungurtas, J.; Swanston, J. S.; Davies, H. V.; McDougall, G. J. Xylan-degrading enzymes and arabinoxylan solubilisation in barley cultivars of differing malting quality. *J. Cereal Sci.* **2004**, *39* (2), 273–281.
- (32) Ellis, R. P.; Swanston, J. S.; Rubio, A.; Perez-Vendrell, A. M.; Romagosa, I.; Molina-Cano, J. L. The Development of [beta]-Glucanase and Degradation of [beta]-Glucan in Barley Grown in Scotland and Spain. *J. Cereal Sci.* **1997**, *26* (1), 75–82.
- (33) Chandra, G. S.; Proudlove, M. O.; Baxter, E. D. The structure of barley endosperm—an important determinant of malt modification. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79* (1), 37–46.
- (34) Aastrup, S.; Erdal, K. Quantitative determination of endosperm modification and its relationship to the content of 1,3–1,4- β -glucans during malting of barley. *Carlsberg Res. Commun.* **1980**, *45* (5), 369–379.
- (35) Philippe, S.; Saulnier, L.; Guillon, F. Arabinoxylan and (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)-beta-glucan deposition in cell walls during wheat endosperm development. *Planta* **2006**, *224* (2), 449–461.
- (36) Nemeth, C.; Freeman, J.; Jones, H. D.; Sparks, C.; Pellny, T. K.; Wilkinson, M. D.; Dunwell, J.; Andersson, A. A. M.; Aman, P.; Guillon, F.; Saulnier, L.; Mitchell, R. A. C.; Shewry, P. R. Down-Regulation of the CSLF6 Gene Results in Decreased (1,3;1,4)-beta-D-Glucan in Endosperm of Wheat. *Plant Physiol.* **2010**, *152* (3), 1209–1218.
- (37) Stuart, I. M.; Loi, L.; Fincher, G. B. Development of (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)-[beta]-D-Glucan Endohydrolase Isoenzymes in Isolated Scutella and Aleurone Layers of Barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Physiol.* **1986**, *80* (2), 310–314.
- (38) Slakeski, N.; Fincher, G. B. Developmental regulation of (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)-beta-glucanase gene-expression in barley—tissue specific expression of individual isoenzymes. *Plant Physiol.* **1992**, *99* (3), 1226–1231.
- (39) Izydorczyk, M. S.; Storsley, J.; Labossiere, D.; MacGregor, A. W.; Rossnagel, B. G. Variation in Total and Soluble b-Glucan Content in Hullless Barley: Effects of Thermal, Physical, and Enzymic Treatments. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (4), 982–989.
- (40) Sadosky, P.; Schwarz, P. B.; Horsley, R. D. Effect of arabinoxylans, beta-glucans, and dextrans on the viscosity and membrane filterability of a beer model solution. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2002**, *60* (4), 153–162.
- (41) Stewart, D. C.; Hawthorne, D.; Evans, D. E. Cold sterile filtration: a small scale filtration test and investigation of membrane plugging. *J. Inst. Brew.* **1998**, *104* (6), 321–326.
- (42) Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino Acids* **2003**, *25* (3), 275–281.
- (43) Skriver, K.; Leah, R.; Mulleruri, F.; Olsen, F. L.; Mundy, J. Structure and expression of the barley lipid transfer protein gene LTP1. *Plant Mol. Biol.* **1992**, *18* (3), 585–589.
- (44) Dubreil, L.; Gaborit, T.; Bouchet, B.; Gallant, D. J.; Broekaert, W. F.; Quillien, L.; Marion, D. Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and non-specific lipid transfer protein (ns-LTP1e1) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties. *Plant Sci.* **1998**, *138* (2), 121–135.
- (45) Bobalova, J.; Chmelik, J. Proteomic identification of technologically modified proteins in malt by combination of protein fractionation using convective interaction media and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1163* (1–2), 80–85.

Supplemental Figure 1. LC-MS chromatogram of LTP1 extracted from low hydrated (LH) malt with associated mass spectra. IC = ionical current



Supplemental Figure 1

Supplemental Table 1. List of the modified forms of LTP1 with the corresponding experimental ions observed in LH malts.

LTPb = 1 acylation; LTPc = 2 acylations; + n x 162 = n glycations; + nalkyl = n/2 reduced disulfide bond; + 16 = oxidation; -Tyr C-term = loss of C-terminal tyrosine residue; + CML = N^ε-(carboxymethyl)lysine; + CEL = N^ε-(carboxyethyl)lysine; + Pyrr = pyrrolidine; + ArgPyr = argpyrimidine

Supplementary Table 1

Low hydrated malt	Observed m/z						
	Mass	m/z (5+)	m/z (6+)	m/z (7+)	m/z (8+)	m/z (9+)	m/z (10+)
LTP -Tyr C-term	9524	1905.8					
LTP + 162 -tyr	9686	1938.2	1615.3				
LTP	9687	1938.4	1615.5				
LTP + 16	9703	1941.6	1618.1				
LTP + 2alkyl	9801	1961.2	1634.5				
LTP + 2alkyl + 16	9817	1964.4	1637.2				
LTPb -Tyr C-term	9818	1964.6	1637.3				
LTP+162	9849	1970.8	1642.5	1408.0			
LTP+162+16	9865	1974.0	1645.2	1410.3			
LTP + 4alkyl	9915	1984.0	1653.5				
LTPb	9981	1997.2	1664.5	1426.9	1248.6		
LTP+2x162	10011		1669.5	1431.1			
LTP+2x162+16	10027		1672.2	1433.4			
LTP + 6alkyl	10035				1255.4		
LTP+162+4alkyl	10077				1660.6	1120.7	
LTP+2x162+2alkyl	10141		1691.2	1449.7			
LTPb + 162	10143		1691.5	1450.0	1268.9		
LTP + 3x162 + 16	10189		1699.2	1456.6			
LTPb + 8alkyl -Tyr C-term	10274		1713.3	1468.7	1285.3		
LTP + 3x162 + 2alkyl	10287				1286.9		
LTPb + 2x162	10305			1473.1	1289.1		
LTPb + 2x162 + 16	10321			1475.4	1291.1		
LTPb + 8alkyl	10437		1740.5	1492.0			
LTP + 5x162 + 2alkyl -Tyr C-term	10448			1493.6	1307.0	1161.9	
LTPb + 8alkyl + 16	10453		1743.2*	1494.3*			
LTPc + 162 + 16	10453		1743.2*	1494.3*			
LTPb + 4x162 -Tyr C-term	10466			1496.1			
LTPb + 3x162	10467		1745.5				
LTPb + 162 + 6alkyl	10485			1498.9			

LTP + 5x162	10497			1313.1	
LTPc + 4alkyl	10503	1751.5			
LTP + 5x162 + 4alkyl -Tyr C-term	10562	1761.3			
LTPb + 162 + 8alkyl	10599	1767.5	1515.1		
LTP + 5x162 + 2alkyl	10611	1769.5			
LTPc + 2x162 + 16	10615			1327.9	
LTPb + 5x162 -Tyr C-term	10628		1519.3		
LTP + 3x162 + 8alkyl	10629	1772.5			
LTPc + 162 + 4alkyl + 16	10681		1526.9	1336.1	
LTPb + 3x162 + 4alkyl	10695		1528.9		
LTP + 5x162 + 4alkyl	10725	1788.5			
LTPc + 3x162 + 16	10777		1540.6	1348.1	
LTPc + 162 + 6alkyl + 16	10795		1543.1		
LTPc + 162 + 8alkyl	10893			1362.6	1211.3
LTPc + 2x162 + 6alkyl	10941	1824.5	1564.0	1368.6	
LTPc + 2x162 + 6alkyl + 16	10957				1218.4
LTPb + 4x162 + 6alkyl	10971	1829.6	1568.3	1372.4	1220.0
LTPc + 4x162 + 2alkyl	11037			1380.6	1227.3
LTPc + 3x162 + 8alkyl	11217	1870.5			1247.3
LTPc + 3x162 + 8alkyl + 16	11233			1405.1	
LTPc + 5x162 + 6alkyl + 16	11443		1635.7	1431.4	
LTP + CML	9745		1393.1		
LTP + 4x162 + CML	10393			1300.1	
LTPb + CML	10039			1255.8	
LTPb + 2x162 + CML	10363				1152.5
LTPb + 3x162 + CML	10525				1170.3
LTPb + 4x162 + CML	10687		1527.7		1188.3
LTPb + 5x162 + CML	10849		1550.7		
LTPc + 162 + CML	10495	1750.0			
LTPc + 2x162 + CML	10657				1066.7
LTPc + 3x162 + CML	10819		1546.7		
LTPc + 4x162 + CML	10981			1373.8	
LTP + 162 + CEL	9921	1654.7			
LTP + 3x162 + CEL	10245		1464.7	1281.6	
LTPb + 162 + CEL	10215		1460.3		
LTPb + 2x162 + CEL	10377				1038.6
LTPb + 4x162 + CEL	10701		1529.9	1190.1	
LTPc + 2x162 + CEL	10671		1525.3		
LTPc + 5x162 + CEL	11157			1240.6	1116.8

LTP + 162 + Pyrr	9957	1992.4	1245.5	
LTP + 4x162 + Pyrr	10443		1492.9	
LTPb + 162 + Pyrr	10251	1709.3		
LTPb + 5x162 + Pyrr	10899	1817.5		1212.1
LTPc + 162 + Pyrr	10545	1758.4		1319.3*
LTPc + 3x162 + Pyrr	10869		1553.7	
LTPc + 4x162 + Pyrr	11031	1839.7		
LTPc + 5x162 + Pyrr	11193	1866.6		
LTP + 2x162 + ArgPyr	10091		1262.4	
LTPc + ArgPyr	10355			1151.5 1036.5
LTP + 4x162 + ArgPyr	10415			1158.3
LTPc + 162 + ArgPyr	10517		1503.6	1169.7
LTPb + 3x162 + ArgPyr	10547			1319.3*
LTP + 5x162 + ArgPyr	10577			1176.2
LTPb + 5x162 + ArgPyr	10871			1208.9
LTPc + 5x162 + ArgPyr	11165	1861.9		

*: this ion could be attributed to different forms of modified LTP1 with identical or very close mass value.

Supplemental Table 2. List of the modified forms of LTP1 with the corresponding experimental ions observed in HH malts.

LTPb = 1 acylation; LTPc = 2 acylations; + n x 162 = n glycations; + nalkyl = n/2 reduced disulfide bond; + 16 = oxidation; -Tyr C-term = loss of C-terminal tyrosine residue; + CML = N^ε-(carboxymethyl)lysine; + CEL = N^ε-(carboxyethyl)lysine; + Pyrr = pyrroline; + ArgPyr = argpyrimidine

Supplementary Table 2

High hydrated malt	Observed m/z						
	Mass	m/z (5+)	m/z (6+)	m/z (7+)	m/z (8+)	m/z (9+)	m/z (10+)
LTP	9687	1938.4	1615.5	1384.9			
LTP + 16	9703	1941.6	1618.2				
LTP + 2alkyl	9801	1961.2	1634.5				
LTP + 2alkyl + 16	9817	1964.4	1637.1				
LTPb-Tyr C-term	9818	1964.5	1637.3	1403.5			
LTP + 2x162 -Tyr C-term	9848	1970.6					
LTP + 162	9849	1970.8	1642.5				
LTP + 6alkyl -Tyr C-term	9866	1974.2	1645.3				
LTP + 162 + 2alkyl	9963	1993.6	1661.5	1424.3			
LTPb	9981	1997.2	1664.5	1426.9	1248.6	1110.0	
LTP + 6alkyl	10029		1672.5	1433.7			
LTP + 6alkyl + 16	10045		1675.2				
LTP + 2x162 + 2alkyl	10125			1447.4			
LTPb + 162	10143		1691.5				
LTP + 3x162 + 16	10189		1699.2	1456.6			
LTP + 3x162 + 2alkyl	10287		1715.5	1470.6	1286.9		
LTPc + 16	10291		1716.2				
LTPb + 3x162 -Tyr C-term	10304		1718.3	1473.0			
LTPb + 6alkyl + 16	10339		1724.2	1478.0			
LTPb + 162 + 4alkyl	10371			1482.6			
LTPc + 2alkyl + 16	10405			1487.4			
LTPc + 162	10437		1740.5	1492.0	1305.6		
LTPb + 8alkyl + 16	10453			1494.3			
LTP + 2x162 + 8alkyl	10467				1309.4*	1164.0*	
LTPb + 3x162	10467				1309.4*	1164.0*	
LTPb + 3x162 + 16	10483			1498.6			
LTPb + 162 + 6alkyl	10485		1748.5				
LTP + 5x162	10497		1750.5	1500.6			
LTP + 3x162 + 6alkyl	10515				1315.4		
LTPb + 2x162 + 4alkyl	10533			1505.7			

LTPc + 162 + 2alkyl	10551	1759.6	1508.3		
LTPb + 3x162 + 2alkyl	10581			1323.6	1176.7
LTPc + 2x162 + 16	10615	1770.2			
LTPb + 4x162 + 16	10645		1521.7		
LTP + 5x162 + 4alkyl	10725	1788.5	1533.1	1341.6	
LTPc + 8alkyl	10731	1789.5	1534.0		
LTPb + 2x162 + 8alkyl	10761	1794.5	1538.3		
LTP + 4x162 + 8alkyl	10791			1349.9	
LTPc + 162 + 6alkyl + 16	10795				1080.5
LTPc + 2x162 + 4alkyl + 16	10843			1356.4	
LTPb + 5x162 + 4alkyl -Tyr C-term	10856		1551.9		
LTPc + 3x162 + 2alkyl + 16	10891		1556.9	1362.4	
LTPc + 162 + 8alkyl	10893	1816.5			
LTPb + 5x162 + 2alkyl	10905		1558.9		
LTPc + 162 + 8alkyl + 16	10909			1364.6	
LTPc + 2x162 + 6alkyl	10941		1564.0	1368.6	
LTP + 4x162 + 6alkyl	10971			1372.4	1220.0 1098.1
LTPc + 3x162 + 4alkyl	10989	1832.6	1570.9	1374.6	1222.0
LTPb + 5x162 + 4alkyl	11019			1378.4	
LTPc + 4x162 + 2alkyl	11037			1380.6	
LTPc + 4x162 + 2alkyl + 16	11053		1580.0	1382.6	
LTPc + 5x162	11085			1386.6	1232.7
LTPc + 3x162 + 6alkyl	11103				1234.7
LTPb + 5x162 + 6alkyl	11133			1392.6	
LTPc + 5x162 + 6alkyl	11427			1429.4	1270.7
LTPc + 5x162 + 8alkyl	11541				1283.3
LTP + CML	9745		1393.1		
LTP + 4x162 + CML	10393			1300.3	
LTPb + CML	10039				1116.6 1004.9
LTPc + CML	10333	1723.2			
LTPc + 3x162 + CML	10819		1546.7		1203.0
LTPc + 5x162 + CML	11143	1858.1			
LTP + CEL	9759				1085.4
LTP + 162 + CEL	9921	1654.6			
LTPb + 162+ CEL	10215		1460.3		
LTPb + 2x162 + CEL	10377		1483.7		
LTPb + 3x162 + CEL	10539	1757.5	1506.7		1172.1
LTPb + 4x162 + CEL	10701				1190.1
LTPb + 5x162 + CEL	10863	1811.5			
LTPc + 2x162 + CEL	10671		1525.3		

LTPc + 3x162 + CEL	10833		1355.1
LTPc + 4x162 + CEL	10995	1833.7	1375.4
LTPc + 5x162 + CEL	11157		1395.8
LTP + Pyrr	9795	1959.7	
LTP + 162 + Pyrr	9957		1107.5
LTP + 2x162 + Pyrr	10119	1687.8	
LTP + 5x162 + Pyrr	10605		1179.4
LTPb + 162 + Pyrr	10251		1282.5*
LTPb + 2x162 + Pyrr	10413	1488.4	
LTPb + 5x162 + Pyrr	10899		1363.2
LTPc + 3x162 + Pyrr	10869	1812.6*	
LTPc + 5x162 + Pyrr	11193		1244.5
LTP + 162 + ArgPyr	9929	1986.9	
LTP + 2x162 + ArgPyr	10091		1010.2
LTP + 3x162 + ArgPyr	10253		1282.5*
LTPc + ArgPyr	10355	1726.7	
LTP + 4x162 + ArgPyr	10415		1158.3
LTPc + 2x162 + ArgPyr	10679	1526.5	
LTPb + 5x162 + ArgPyr	10871	1812.6*	
LTPc + 4x162 + ArgPyr	11003	1572.7	

*: this ion could be attributed to different forms of modified LTP1 with identical or very close mass value.

Résumé

Maltage à faible hydratation : dégradation des structures pariétales, diffusion et modification des protéines aleuroniques et caractérisation des barrières hydrophobes cuticulaires.

L'industrie du malt tente actuellement de réduire les coûts énergétiques (touraillage) sans affecter la qualité de malt obtenu. Cette économie d'énergie passe nécessairement par une diminution de la teneur en eau du grain d'orge en fin de trempage et durant la germination.

Nous avons choisi d'étudier des paramètres clés de la qualité brassicole des malts concernant leurs capacités diastatiques et pro-mousse. Ainsi la diffusion et les modifications de la LTP1, protéine pro-mousse du malt, ont montré des résultats équivalents pour un malt faiblement hydraté comparé à un malt fortement hydraté. Par contre, le taux d'hydratation du grain affecte la diffusion et l'activité des β -glucanases et en conséquence la dégradation des β -glucanes. Ces effets sont liés à une différence dans la cinétique de diffusion et de synthèse de ces enzymes et peuvent être fortement réduits en augmentant la durée de germination.

La migration de l'eau dans le grain suit un cheminement particulier lié au contournement des barrières hydrophobes du grain situées en surface du péricarpe et à l'interface entre aleurone et péricarpe (testa). Sur des variétés produisant, au niveau pilote industriel, des malts qualitativement différents suivant le taux d'hydratation, nous avons remarqué de faibles différences de composition et d'épaisseur entre les assises cuticulaires. En revanche, nous avons mis en évidence une très grande variabilité de composition des cuticules dans les différentes parties du grain, par exemple le scutellum, le sillon ou les glumelles.

Mots clés : maltage, orge, malt, hydratation, α -amylase, β -glucanase, β -glucanes, protéine de transfert de lipides 1, assises cuticulaires.

Low hydration malting: degradation of cell wall structures, diffusion and modification of aleuronic proteins and characterization of cuticular hydrophobic barriers

During kilning, reduction of energy costs without impacting significantly the malt quality, represents a major challenge of the malting industry. This energy reduction requires a reduction of barley grain water content at the end of steeping and during germination.

In the present work, we focused on key malting quality parameters involved in diastatic power and foam promoting capacities of malt. When analysed in a low hydrated malt and a high hydrated malt, the LTP1 (a foam promoting protein) modifications and its diffusion from the aleurone layer to the starchy endosperm were similar. The hydration level of the grain affects however β -glucanase diffusion and activity, and consequently the β -glucan degradation. These effects are linked to a delay in the synthesis and the diffusion of these enzymes. An increase of the time of germination allows to sharply reduce these effects.

According to grain hydrophobic barriers localized at the pericarp surface and at the interface of aleurone and pericarp (testa), water diffusion inside the grain follows a specific pathway. Only weak, although significant, differences in cuticular thickness and composition were observed between cultivars with different malt qualities according to their hydration levels. On the contrary, we observed a great variability in the cuticular composition of the various tissues of the grain e.g. scutellum, chalaza or husk.

Keywords: malting, barley, malt, hydration, α -amylase, β -glucanase, β -glucans, lipid transfer protein 1, cuticular layers.