



HAL
open science

Contribution à l'identification de facteurs impliqués dans le phénomène de giclage de la bière en vue du développement d'une méthode de détection précoce du “ risque giclage ”

Julien Billard

► To cite this version:

Julien Billard. Contribution à l'identification de facteurs impliqués dans le phénomène de giclage de la bière en vue du développement d'une méthode de détection précoce du “ risque giclage ”. Ingénierie des aliments. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0195 . tel-01906105

HAL Id: tel-01906105

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01906105>

Submitted on 15 Dec 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE (UL)

Ecole doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)

Institut Français des Boissons de la Brasserie et de la Malterie (IFBM)

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP)

THESE

Présentée à l'Université de Lorraine par

Julien BILLARD

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

CONTRIBUTION À L'IDENTIFICATION DE FACTEURS IMPLIQUES DANS LE PHENOMENE DE GICLAGE DE LA BIERE EN VUE DU DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE DETECTION PRECOCE DU « RISQUE GICLAGE »

Soutenue publiquement le 27 octobre 2017

Membres du jury :

Rapporteurs :	Naïma NEDJAR Leslie BOUDESOCQUE	Professeur Maître de conférences - HDR
Examineurs :	Pascal DEGRAEVE Ivan MARC Romain KAPEL	Professeur Directeur de recherche CNRS Maître de conférences - HDR
Invités	Marc SCHMITT Guy DERDELINCKX	Directeur scientifique IFBM Maître de conférences

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA), la plateforme Science et Vie et Santé (SVS) dans le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP). Cette thèse est le fruit d'une collaboration entre le LRGP, l'Institut Français des Boissons de la Malterie et de la Brasserie (IFBM) et les Malteurs et Brasseurs de France.

Je remercie Monsieur Laurent Falk de m'avoir accueilli au sein du LRGP ainsi que Monsieur Gilbert Bauer au sein de l'IFBM.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Messieurs Ivan Marc et Romain Kapel pour avoir accepté d'être mes directeurs de thèse au sein du LRGP, pour leurs aides, leur rigueur scientifique et leurs remarques pertinentes qui ont jalonné ma thèse. J'associe à ces remerciements, Messieurs Marc Schmitt et Patrick Boivin pour leur encadrement à l'IFBM, leurs précieux conseils sur la filière brassicole et pour m'avoir permis de présenter mes travaux lors de l'European Brewing Convention (EBC).

Je tiens à remercier Guy Derlinckx et son équipe, en particulier David, pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire à Leuven et de m'avoir fait partager leur temps et leurs connaissances au sujet des hydrophobines.

Je remercie aussi Emilie et Pauline pour leur implication et les résultats qu'elles ont apportés lors de leurs stages et qui ont permis de faire avancer ma thèse.

Je remercie vivement tous les permanents du LRGP et les thésards de l'ENSAIA, Léna, Aline, Florent, Céline L., Mengyao (pour les nouvelles chinoises), Céline M. pour toutes les discussions les soirées (plus ou moins arrosées) et tous les bons moments passés ensemble qui ont permis de décompresser quand il le fallait.

J'adresse toute ma gratitude aux filles de la plateforme SVS en les personnes de Mélody, Odile, Sara, Claire, Sophie pour leur gentillesse et leur joie de vivre. Je n'oublie pas bien sûr ceux qui ont soutenus comme Nadia, Pierrick et Alice pour leur soutien et les soirées mémorables que nous avons passées.

Je n'oublie pas la partie scientifique avec Emmanuel Guédon pour ses conseils et sa formation précieuse sur l'électrophorèse 2D, Arnaud Aymes pour son aide sur l'AKTA et Xavier Framboisier pour son aide sur SVS et spécialement sur la chromatographie. Je remercie aussi Blandine Simard du LiBio pour son aide sur la chromatographie semi-préparative et Alexandre Kriznick pour son expertise sur la DLS et l'équipe protéine de GENCLIS, Olivier, Gaël et Thibaut pour leur gentillesse et les conseils apportés sur l'identification des protéines.

Je remercie tous les membres de l'IFBM pour leur gentillesse et leur disponibilité en particulier Sophie, Gabriela, Catherine et Aude-Emeline, tout le personnel du LMB, de la plateforme et de la micromalterie.

Mention spéciale à Xavier Framboisier et Emmanuel Rondags pour leur présence, leur soutien pendant mes périodes de doutes et leurs conseils depuis mon master et tout au long de ma thèse.

Je remercie enfin mes parents et ma sœur pour le soutien indéfectible et sans failles dont ils ont fait preuve lors de ces 4 années.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	4
LISTE DES FIGURES, DES TABLEAUX ET DES ANNEXES.....	6
INTRODUCTION GENERALE.....	11
CHAPITRE 1 : BIBLIOGRAPHIE.....	14
1. La filière orge malt bière	16
2. Le phénomène de giclage dans la bière	26
3. Production, extraction et purification de composés potentiellement impliqués dans le giclage ...	47
4. Conclusion.....	53
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	54
1. Matériel	57
2. Matière première	59
3. Méthodes analytiques	61
4. Fractionnement de la matière première	69
Annexes	75
CHAPITRE 3 : FRACTIONNEMENT D'EXTRAIT DE MALT INDUSTRIEL	80
1. Introduction	82
2. Analyse de la fraction protéique.....	83
3. Rôle des protéines dans le giclage.....	94
4. Influence de la fraction polyphénolique libre sur le giclage	111
5. Conclusion.....	115
CHAPITRE 4 : FRACTIONNEMENT D'ORGE ARTIFICIELLEMENT CONTAMINEE ...	117
1. Introduction	119
2. Sélection de moisissures impliquées dans le giclage de la bière.....	120
3. Influence de la concentration en azote total sur le potentiel giclage	123
4. Fractionnement des composés par séparation membranaire	125
5. Fractionnement des composés selon leur caractère hydrophobe.....	134
6. Identification des protéines dans la fraction giclante	139
7. Analyse de la fraction giclante par diffusion dynamique de la lumière	143
8. Conclusion.....	145
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	147
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	153
RESUME ET ABSTRACT	160

LISTE DES ABREVIATIONS

Abs : absorbance

ACN : acétonitrile

ADN : acide désoxyribonucléique

APS : persulfate d'ammonium

CES : chromatographie d'exclusion stérique

CIH : chromatographie d'interaction hydrophobe

CLHP : chromatographie liquide haute performance

Da : dalton

DLS : dynamic light scattering (diffusion dynamique de la lumière)

DON : déoxynivalenone

DTT : dithiothréitol

EBC : European Brewing Convention

ELISA : enzyme linked immunosorbent assay

ETP : équivalent temps plein

F. graminearum : *Fusarium graminearum*

F. tricinctum : *Fusarium tricinctum*

FHB : *Fusarium* head blight (Fusariose)

G + : giclage positif

G - : giclage négatif

IPG-strip : Immobilized pH gradient (gradient de pH immobilisé)

Ns-LTP : non specific lipid transfer protein (protéine de transfert de lipides non spécifiques)

M. nivale : *Microdochium nivale*

MALDI : Matrix assisted laser desorption ionisation (ionisation laser par désorption assistée par matrice)

MEBAK : Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommision

MS : matière sèche

°P : degré plateau

PCR : polymerase chain reaction (réaction en chaîne de polymérisation)

PDA : potato dextrose agar

PFGE : Pulsed field gel electrophoresis (électrophorèse en champ pulsé)

PVPP : polyvinylpolypyrrolidone

PYF : preparture yeast flocculation (floculation précoce des levures)

RADP : random amplified polymorphic DNA (amplification aléatoire d'ADN polymorphe)

RFLP : restriction fragment length polymorphism (polymorphisme de longueur des fragments de restriction)

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de laurylsulfate de sodium)

TEMED : Tetramethylethylenediamine (tétraméthyléthylènediamine)

TCA : trichloroacetic acid (acide trichloroacétique)

TFA : trifluoroacetic acid (acide trifluoroacétique)

TOF : time of flight (temps de vol)

UV : ultraviolet

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Liste des figures

Chapitre 1 : Bibliographie

Figure 1. Schéma récapitulatif du procédé de maltage (http://www.malt.ie)	17
Figure 2. Schéma récapitulatif du procédé de brassage (http://eng.baltika.ru).....	19
Figure 3. Diagramme des étapes principales du procédé de culture de l'orge, maltage et brassage avec mise en évidence des points critiques (rouge). Les différents contaminants sont précisés pour chaque étape.....	23
Figure 4. Représentation du rôle des hydrophobines dans la croissance aérienne des hyphes en environnement aqueux (Wösten 2001).....	28
Figure 5. Arrangement spatial des 8 résidus de cystéine dans une hydrophobine (Linder 2009).	29
Figure 6. Représentation tridimensionnelle d'une hydrophobine HFBII de <i>Trichoderma reesei</i> (Linder <i>et al.</i> 2005)	30
Figure 7. Quantité relative d'hydrophobines à différentes étapes de brassage. La concentration en hydrophobines est mesurée par dosage ELISA (Sarlin <i>et al.</i> 2007).	32
Figure 8. Modifications structurales des LTPs lors du maltage et du brassage de l'orge (d'après Perrocheau <i>et al.</i> 2006).....	33
Figure 9. Corrélation entre la teneur en polyphénols (mg/L) et le volume de giclage (%) dans 5 essais différents de brassage (Müller <i>et al.</i> 2010).....	35
Figure 10. Représentation des différentes étapes de formation des nano-bulles de CO ₂ stabilisé par des hydrophobines (Deckers <i>et al.</i> 2011, 20).....	35
Figure 11. Représentation schématique de l'association des hydrophobines en milieu aqueux et à l'interface air / eau (Kallio <i>et al.</i> 2007)	37
Figure 12. Représentation schématique de l'ELISA développé pour la détection des hydrophobines (Sarlin 2012).	44
Figure 13. Système de fractionnement par bullage de CO ₂ (Khalesi <i>et al.</i> 2013).	49
Figure 14. Chromatogramme de l'extrait brut obtenu à partir du mycélium de <i>Trichoderma reesei</i> (Khalesi <i>et al.</i> 2013).	51
Figure 15. Spectre de MALDI-TOF de la fraction éluée à 53 % d'ACN (Figure 13) (Khalesi <i>et al.</i> 2013).	

52

Figure 16. Stratégie de recherche développée sur le malt industriel et l'orge artificiellement contaminée.	53
---	----

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Figure 17. Exemple d'orge artificiellement contaminée par <i>F. tricinctum</i>	61
Figure 18. Schéma du principe de la diafiltration.....	70
Figure 19. Schéma des expériences servant à éliminer les polyphénols libres.....	71
Figure 20. Système de fractionnement par bullage de CO ₂	72

Chapitre 3 : Fractionnement d'extraits de malt industriel

Figure 21. Solubilisation du culot protéique après précipitation au sulfate d'ammonium dans un tampon acétate 0,1 M (pH 3-5), phosphate 0,1 M (6-8) et carbonate 0,1 M (9-10).	84
---	----

Figure 22. Solubilisation des culots protéiques concentrés d'un facteur 1,2 et 4 avec du tampon carbonate pH 9 et 10 ainsi qu'un tampon tris-HCl pH 9.	84
Figure 23. Comparaison de la solubilisation du culot protéique avec de l'eau distillée (a) et du tris-HCl pH 9 (b) par chromatographie de phase inverse (C4). L'analyse est effectuée sur une colonne C4 et l'élution est réalisée avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 100 % en 60 mn.	85
Figure 24. Analyse de la taille des protéines précipitées par le sulfate d'ammonium et concentrées d'un facteur 4 de l'extrait de malt G+ (A) et des fractions issues de la chromatographie en phase inverse (8, 9, 10, 11, 12). La séparation est faite par SDS-PAGE sur un gel à 15 % d'acrylamide en conditions réductrices et révélées par une coloration au bleu de Coomassie G250.	86
Figure 25. Analyse par chromatographie de phase inverse (C4) avec un gradient d'ACN de 0-100 % d'un témoin (extrait de malt dans du Perrier®); de la fraction giclée après ouverture d'une bouteille de Perrier® et la fraction Perrier restant dans la bouteille. L'analyse a été mesurée à 280 (a) et 325 nm (b).	88
Figure 26. Analyse par SDS-PAGE du témoin (1), de la fraction giclée (2) et de la fraction Perrier® (3). Les protéines sont séparées par un gel à 15 % d'acrylamide en condition réductrice et visualisées par une coloration au bleu de Coomassie G250. Les fractions ont été dupliquées.	89
Figure 27. Analyse par chromatographie de phase inverse (C4) avec un gradient d'ACN de 0-100 % en 60 mn des extraits G+ (1 a.), de la mousse G+ (1 b.), des extraits G- (2 a.) et de la mousse (2 b.).	90
Figure 28. Analyse par chromatographie de phase inverse (C4) avec un gradient d'ACN de 0-100 % et par SDS-PAGE en conditions réductrices des extraits G+ (1 a.), de l'extrait enrichi G+ (1 b.), de l'extrait G- (2 a.) et de l'extrait G- enrichi (2 b.). Les fractions enrichies ont été collectées après fractionnement par bullage de CO ₂ . Les protéines (préalablement concentrées d'un facteur 20) sont séparées sur un gel à 15 % d'acrylamide en condition réductrice et visualisées par une coloration au bleu de Coomassie G250.	93
Figure 29. Analyse par chromatographie d'exclusion stérique en gel G25 des protéines de l'extrait de malt G+ après précipitation au sulfate d'ammonium. L'élution est réalisée avec de l'eau. L'absorbance est mesurée à 280 et 325 nm et la conductivité est suivie lors de l'élution.	95
Figure 30. Analyse par chromatographie d'exclusion stérique en gel G25 des protéines de l'extrait de malt G- après précipitation au sulfate d'ammonium. L'élution est réalisée avec de l'eau. L'absorbance est mesurée à 280 et 325 nm et la conductivité est suivie lors de l'élution.	96
Figure 31. Représentation de la collecte des fractions lors de l'élution réalisée avec de l'eau. L'absorbance est mesurée à 280 et 325 nm et la conductivité est suivie lors de l'élution.	96
Figure 32. Analyse par SDS-PAGE des fractions issues du fractionnement en CES de l'extrait de malt G+. Les fractions B6-B1 correspondent au pic a et les fractions C6-D5 au pic c de la figure 29. Les protéines (préalablement concentrées d'un facteur 20) sont séparées sur un gel à 15 % d'acrylamide en condition réductrice et visualisées par une coloration au bleu de Coomassie G250.	97
Figure 33. Analyse par SDS-PAGE des fractions issues du fractionnement en CES de l'extrait de malt G-. Les fractions B6-B1 correspondent au pic a et les fractions C6-D5 au pic c de la Figure 30. Les protéines (préalablement concentrées d'un facteur 20) sont séparées sur un gel à 15 % d'acrylamide en condition réductrice et visualisées par une coloration au bleu de Coomassie G250.	97
Figure 34. Analyse des protéines par chromatographie en phase inverse (C4) avec un gradient d'ACN de 0-100 % (a) et SDS-PAGE (b) d'extrait de malt G+ (1), d'extrait de protéines précipitées au sulfate d'ammonium et reconcentrées 2,77 fois (2) et du pool protéique issu de chromatographie d'exclusion stérique (3). L'analyse est effectuée sur une colonne C4 et l'élution est réalisée avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 100 % en 60 mn. Les protéines (préalablement concentrées d'un facteur 20) sont séparées sur un gel à 15 % d'acrylamide en conditions réductrice et révélées par une coloration au bleu de Coomassie G250.	99
Figure 35. Analyse des protéines par chromatographie en phase inverse (C4) avec un gradient d'ACN de 0-100 % (a) et SDS-PAGE (b) d'extrait de malt G- (1), d'extrait de protéines précipitées au sulfate d'ammonium et reconcentrées 2,77 fois (2) et du pool protéique issu de chromatographie d'exclusion	

stérique (3) L'analyse est effectuée sur une colonne C4 et l'élution est réalisée avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 100 % en 60 mn. Les protéines (préalablement concentrées d'un facteur 20) sont séparées sur un gel à 15 % d'acrylamide en conditions réductrice et révélées par une coloration au bleu de Coomassie G250.	100
Figure 36. Histogramme de la matière sèche, de la concentration en protéine et de la pureté en protéines des extraits G+/G- et des pools protéiques G+/G- issus de CES.....	101
Figure 37. Quantification du giclage d'extraits de malt G+/G- et des fractions protéiques G+ / G- obtenues après dessalage par chromatographie d'exclusion stérique.....	102
Figure 38. Quantification du giclage selon la méthode Carlsberg modifiée dans de la bière de l'extrait de malt, de la fraction supérieure (rétentat) et inférieure (perméat) à 5 kDa et d'un témoin de bière négatif. Ces échantillons ont été obtenus après une diafiltration de 8 diavolumes avec de l'eau ultrapure sur une membrane de 5 kDa.....	104
Figure 39. Bilans de matière (protéines, glucides totaux, polyphénols sur 2 L d'échantillons) de l'extrait de malt G+ (a), du rétentat 5 kDa (b) et du perméat 5 kDa (c) après fractionnement sur une membrane de 5 kDa. La matière sèche (d) a été mesurée sur le rétentat et le perméat.....	105
Figure 40. Analyse des protéines par chromatographie de phase inverse (C4) avec un gradient d'ACN de 0-100 % (a) et SDS-PAGE (b) d'extrait de malt G+ (1), de rétentat 5 kDa (2) et de perméat 5 kDa (3) après fractionnement sur une membrane de 5 kDa. L'analyse est effectuée sur une colonne C4 et l'élution est réalisée avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 100 % en 60 mn. Les protéines (préalablement concentrées d'un facteur 20) sont séparées sur un gel à 15 % d'acrylamide en conditions réductrice et révélées par une coloration au bleu de Coomassie G250.....	106
Figure 41. Quantification du giclage selon la méthode Carlsberg modifiée dans de la bière de l'extrait de malt, de la fraction supérieure (rétentat) et inférieure (perméat) à 30 kDa et d'un témoin de bière négatif. Ces échantillons ont été obtenus après une diafiltration de 8 diavolumes avec de l'eau ultrapure sur une membrane de 30 kDa.....	108
Figure 42. Bilans de matière (protéines, glucides totaux, polyphénols sur 2 L d'échantillons) de l'extrait de malt G+ (a), du rétentat 30 kDa (b) et du perméat 30 kDa (c) après fractionnement sur une membrane de 5 kDa. La matière sèche (d) a été mesurée sur le rétentat et le perméat.....	109
Figure 43. Analyse des protéines par chromatographie de phase inverse (C4) avec un gradient d'ACN de 0-100 % (a) et SDS-PAGE (b) d'extrait de malt G+ (1), de rétentat 30 kDa (2) et de perméat 30 kDa (3) après fractionnement sur une membrane de 30 kDa. L'analyse est effectuée sur une colonne C4 et l'élution est réalisée avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 100 % en 60 mn. Les protéines (préalablement concentrées d'un facteur 20) sont séparées sur un gel à 15 % d'acrylamide en conditions réductrice et révélés par une coloration au bleu de Coomassie G250.....	110
Figure 44. Quantification du giclage après traitement de l'extrait de malt avec 50 g et 200 g/hL de PVPP. Un témoin positif (extrait de malt G+) non traité, un témoin de filtration et enfin un témoin négatif (bière sans échantillon) ont été analysés.....	112
Figure 45. Analyse des protéines (préalablement concentrées) par SDS-PAGE après traitement de l'extrait de malt à la PVPP. Les protéines sont séparées par un gel à 15 % d'acrylamide en condition réductrice et révélées par une coloration au bleu de Coomassie G250.....	113
Figure 46. Evolution de la concentration en polyphénols totaux d'un extrait de malt industriel après un traitement à la PVPP à différentes concentrations pendant 1h sous agitation magnétique. Le dosage a été effectué selon la méthode EBC 9.26.....	114
Figure 47. Schéma récapitulatif des expérimentations sur les extraits de malt.....	115

Chapitre 4 : Fractionnement d'orges artificiellement contaminées par des moisissures

Figure 48. Quantification du giclage après extraction de composés à l'eau ultrapure en surface d'orge artificiellement contaminée par *Alternaria sp.*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium graminearum* et *Microdochium nivale* selon le protocole Carlsberg modifié dans de la bière après 3 jours d'agitation (n = 3).

120

Figure 49. Analyse par SDS-PAGE d'extrait de surface d'orges artificiellement contaminées par des moisissures. *Fusarium tricinctum* (1), *Alternaria sp.* (2), *Fusarium graminearum* (3), *Microdochium nivale* (4). Un extrait d'orge stérile a été utilisé comme témoin (5). Les protéines ont été séparées en conditions réductrices sur un gel à 15 % d'acrylamide puis colorées au bleu de Coomassie G250. 122

Figure 50. Influence de la quantité d'azote de l'extrait de *M. nivale* sur le potentiel giclage dans la bière.

124

Figure 51. Quantification du giclage sur les extraits de malt et les fractions (rétentat et perméat) obtenues après fractionnement membranaire sur une membrane de 5 kDa. Ces échantillons ont été obtenus après une diafiltration de 8 diavolumes avec de l'eau ultrapure sur une membrane de 5 kDa. 125

Figure 52. Bilan de matière (protéines, glucides totaux, polyphénols et matière sèche) de l'extrait de surface d'orge artificiellement contaminé par *M. nivale* (a), du rétentat 5 kDa (b) et du perméat 5 kDa (c) après fractionnement sur une membrane de 5 kDa. La matière sèche du rétentat et du perméat est illustrée dans le camembert d. 126

Figure 53. Analyse des protéines par chromatographie de phase inverse (a) et SDS-PAGE (b) d'extrait de *M. nivale* (1), de rétentat 5 kDa (2) et de perméat 5 kDa (3) après fractionnement sur une membrane de 5 kDa. L'analyse est effectuée sur une colonne C4 et l'élution est réalisée avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 100 % en 60 mn. Les protéines sont séparées sur un gel à 15 % d'acrylamide en condition réductrice et visualisées par une coloration au bleu de Coomassie G250. Un agrandissement du chromatogramme est présenté en 1c, 2c et 3c. 128

Figure 54. Quantification du giclage sur les extraits de malt et les fractions (rétentat et perméat) obtenues après fractionnement membranaire sur une membrane de 30 kDa. Ces échantillons ont été obtenus après une diafiltration de 8 diavolumes avec de l'eau ultrapure sur une membrane de 30 kDa. 130

Figure 55. Bilan de matière (protéines, glucides totaux, polyphénols et matière sèche) de l'extrait de surface d'orge artificiellement contaminée par *M. nivale* (a), du rétentat 30 kDa (b) et du perméat 30 kDa (c) après fractionnement sur une membrane de 30 kDa. La matière sèche du rétentat et du perméat est illustrée sur le graphique d. 131

Figure 56. Analyse des protéines par chromatographie de phase inverse (a) et SDS-PAGE (b) d'extrait de *M. nivale* (1), de rétentat 30 kDa (2) et de perméat 30 kDa (3) après fractionnement sur une membrane de 30 kDa. L'analyse est effectuée sur une colonne C4 et l'élution est réalisée avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 100 % en 60 mn. Les protéines sont séparées sur un gel à 15 % d'acrylamide en condition réductrice et visualisées par une coloration au bleu de Coomassie G250. Un agrandissement du chromatogramme est présenté en 1c, 2c et 3c. 132

Figure 57. Fractionnement d'extrait de *M. nivale* par chromatographie de phase inverse sur une colonne Zorbax C3. L'élution a été réalisée avec un gradient d'ACN de 5 à 100 % (en noir). L'absorbance est mesurée à 280 nm (en rouge) et 325 nm (en bleu). 135

Figure 58. Analyse du potentiel giclage des différentes fractions obtenues après séparation par chromatographie en phase inverse de l'extrait de surface d'orge contaminée par *M. nivale*. Le giclage a été quantifié selon le protocole Carlsberg modifié après 3 jours d'agitation à 60 rpm (n=3). 136

Figure 59. Analyse par SDS-PAGE de l'extrait brut (1), la fraction 2 (3) et la fraction 3 (4) obtenue après fractionnement par chromatographie en phase inverse. Un extrait de surface d'orge a aussi été analysé (5). Les protéines sont séparées sur un gel d'acrylamide à 15 % en conditions réductrices puis colorées avec du bleu de Coomassie G250. 138

Figure 60. Sélection des spots d'intérêt après analyse en électrophorèse bidimensionnelle de la fraction giclante d'un extrait de surface de <i>M. nivale</i> après fractionnement en chromatographie de phase inverse. Les protéines sont séparées sur une IPG strip de pI 3-10 pour la première dimension et sur un gel d'acrylamide à 15 % pour la deuxième dimension. Les protéines sont colorées avec du bleu de Coomassie G 250.....	140
Figure 61. Profil de DLS de l'extrait brut (1), de la fraction 1 (2), de la fraction 2 (3) et de la fraction 3 (4) obtenue après fractionnement en chromatographie de phase inverse d'un extrait de surface de <i>M. nivale</i>	143
Figure 62. Schéma récapitulatif des expérimentations sur l'orge artificiellement contaminée.	145

Liste des Tableaux

Tableau 1. Tableau récapitulatif des principales moisissures retrouvées sur les céréales (d'après http://www.fao.org/wairdocs/x5008e/x5008e01.htm).....	25
Tableau 2. Solvants et gradient utilisés lors de l'élution en chromatographie de phase inverse.	63
Tableau 3. Concentration en azote après l'extraction solide / liquide de l'orge contaminée par des moisissures. L'azote a été quantifié par la méthode Kjeldhal.....	121
Tableau 4. Quantification de l'azote, des glucides et des polyphénols dans l'extrait brut et les fractions définies dans la figure 57.....	137
Tableau 5. Protéines provenant de la fraction giclante (figure 13) identifiées par MALDI-TOF et peptide mass fingerprint.	141

Liste des annexes

Annexes 1. Solutions et tampons d'électrophorèse.....	75
1.1. Tampon de solubilisation SDS-PAGE.....	75
1.2. Tampon Tricine 3 X.....	75
1.3. Tampon Anode 10 X.....	75
1.4. Tampon Cathode 10 X.....	75
1.5. Solution de coloration.....	76
1.6. Solution de décoloration.....	76
1.7. Solution de lyse / réhydratation (2D).....	76
1.8. Solution d'équilibration DTT ou iodoacétamide.....	77
1.9. Gel d'agarose.....	77
1.10. Tampon d'électrophorèse 1 X.....	77
1.11. Tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8.....	77
Annexes 2. Solutions et tampons divers.....	78
2.1. Tampon Tris-HCl pH 9.....	78
2.2. Matrice CHCA.....	78
2.3. Matrice acide sinapinique.....	78
Annexes 3. Solutions pour dosage.....	79
3.1. Solution de CMC / EDTA.....	79
3.2. Réactif ferrique.....	79
3.3. Réactif à l'antrone.....	79

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

La filière brassicole est une filière complexe regroupant des acteurs dans les domaines de l'agriculture et des industries de première puis de seconde transformation respectivement en malterie et brasserie. Face à l'ensemble des critères requis par la filière, les agriculteurs et les malteurs doivent répondre à un certain nombre d'exigences en termes de qualité technologique et sanitaire de l'orge et du malt. La recherche et le maintien de cette qualité font que cette filière est très sensible aux altérations de la matière première.

Ces travaux vont s'intéresser à la conséquence d'une des altérations de la matière première : le giclage de la bière. Le giclage (*gushing* selon la dénomination anglo-saxonne), est un phénomène de génération spontanée de mousse plus ou moins intense pouvant apparaître à l'ouverture d'une bouteille de bière, sans agitation préalable et induire, ainsi, une perte jusqu'à 80 % de son contenu.

A l'heure actuelle, la littérature montre un lien entre la contamination fongique naturelle de l'orge et le phénomène de giclage (Schwarz *et al.* 1996 ; Lutterschmid *et al.* 2011 ; Sarlin 2012). Ces microorganismes vont produire des molécules qui vont détériorer l'enveloppe des grains d'orge pour faciliter leur propagation en surface. Parmi les composés excrétés, il a été notamment montré que des protéines appelées hydrophobines avec des propriétés de stabilisation des interfaces gaz / liquide pouvaient provoquer du giclage dans les boissons carbonatées (Sarlin *et al.* 2007 ; Askolin *et al.* 2001 ; Cox *et al.* 2007). Ces protéines très hydrophobes de faible poids moléculaire, présentes en faibles concentrations mais très actives, ont été décrites dans la littérature comme étant potentiellement impliquées dans ce phénomène de giclage. Ces molécules, très résistantes à la dénaturation thermique et chimique, se retrouvent tout au long des procédés de maltage et de brassage et sont retrouvées également dans la bière en quantité suffisante pour induire du giclage. Néanmoins d'autres interactions ont été observées et ces molécules ne sont peut-être pas les seules impliquées dans ce phénomène.

L'objectif de cette thèse est d'identifier le ou les composés impliqués dans le giclage de la bière et savoir si ils agissent de façon isolée ou en association / synergie. Connaître ces composés devrait permettre de mieux comprendre le phénomène du giclage et de développer une méthode rapide de criblage des lots d'orges et de malt à risque.

La démarche suivie repose sur une stratégie à deux axes :

- développer ou adapter des méthodes d'analyse pour l'identification des composés potentiellement impliqués dans le phénomène du giclage,
- déterminer l'origine de ce(s) composé(s) et suivre son (leur) évolution au cours du procédé de fabrication de la bière à l'aide d'une méthodologie de criblage de la matière première.

Pour répondre à ces problématiques, nous travaillerons sur deux types de matière première :

- du malt naturellement contaminé, présentant un potentiel giclage, à partir duquel nous avons réalisé un extrait selon le protocole de référence dans l'industrie brassicole pour la détermination du giclage,
- des grains d'orges artificiellement contaminés par des moisissures de la filière impliqués dans le giclage dont nous avons extrait les composés, présents en surface, produits et/ou dégradés par les moisissures.

Une première étape de fractionnement sera initiée sur des extraits de malt en précipitant la fraction protéique avec du sulfate d'ammonium. Ceci conduira à une phase de dessalage par chromatographie d'exclusion stérique pour étudier leur activité giclante. Une séparation selon leurs propriétés hydrophobes par chromatographie de phase inverse sera alors étudiée sur les protéines précipitées et remises en suspension. Une deuxième étape de fractionnement par voie membranaire sera nécessaire pour séparer les constituants de l'extrait selon leur taille avec deux seuils de coupure 5 et 30 kDa. Enfin, les composés seront fractionnés selon leur capacité de formation, de stabilisation de la mousse et leur affinité avec le CO₂.

En parallèle, un travail sur l'extraction des composés en surface d'orge sera développé. L'extraction des composés sera étudiée en fonction des souches et le giclage sera mesuré. Nous appliquerons aussi la méthodologie de fractionnement membranaire avec les deux seuils de coupures 5 et 30 kDa. Finalement, les composés seront séparés selon leur caractère hydrophobe.

Enfin, lorsque que les composés seront assez isolés une méthodologie d'identification sera mise en place pour chaque constituant.

Chapitre 1 : **Bibliographie**

SOMMAIRE

1. La filière orge malt bière	16
1.1. Le marché de la filière en France	16
1.2. Description des procédés de maltage et de brassage	16
1.3. Points critiques de la filière	23
1.4. Problématiques de la filière	24
1.4.1. Exigences qualitatives de la matière première	24
1.4.2. Altération de la matière première	24
2. Le phénomène de giclage dans la bière.....	26
2.1. Facteurs impliqués dans le giclage primaire.....	26
2.1.1. Contaminants microbiologiques en lien avec le phénomène de giclage	26
2.1.2. Composés potentiellement impliqués dans le giclage	28
2.2. Théorie sur le giclage – les nano-bombes	35
2.3. Méthodes de mise en évidence du giclage.....	38
2.3.1. Méthode de quantification préventive du giclage.....	38
2.3.2. Marqueurs de la contamination fongique	40
2.3.2.1. Quantification des moisissures	40
2.3.2.2. Quantification des hydrophobines	43
2.3.2.3. Quantification des mycotoxines	46
3. Production, extraction et purification de composés impliqués dans le giclage	47
3.1. Production par fermentation liquide	47
3.2. Extraction des hydrophobines	48
3.2.1. Extraction par tampons aqueux	48
3.2.2. Extraction par bullage de CO ₂	48
3.2.3. Purification par chromatographie d'interactions hydrophobes.....	50
3.2.4. Purification par chromatographie de phase inverse.....	51
4. Conclusion :.....	53

1. La filière orge malt bière

La production de la bière est séparée en trois grandes étapes : la production de l'orge, le maltage et le brassage. C'est donc une filière très complexe qui regroupe des acteurs dans les domaines de l'agriculture et des industries de première transformation (malterie) et seconde transformation (brasserie). Cette filière est interconnectée mais les procédés utilisés en brasserie ne permettent pas de s'adapter facilement aux variations de la qualité des malts. Par conséquent, les malteurs, agriculteurs et semenciers doivent satisfaire aux cahiers des charges très stricts des brasseurs qui incluent, entre autres, la teneur en protéines des orges. Parallèlement à la qualité technologique des orges, leur qualité sanitaire (présence ou non d'insectes et de moisissures, résidus éventuels de produits phytosanitaires et de mycotoxines) doit être contrôlée dans un souci de sécurité alimentaire. Le degré de contamination ou de colonisation du grain est en relation avec les conditions de culture, de stockage et de traitement.

1.1. Le marché de la filière en France

La qualité de l'orge et du malt est un enjeu majeur dans l'économie française. La France est le 2^{ème} plus gros exportateur d'orge (3,6 millions de tonnes), le premier pays exportateur de malt (1,5 millions de tonnes) (plus de 80 % de sa production de malt livrés dans plus de 110 pays) et le 9^{ème} producteur de houblon (580 tonnes). Cela représente une économie de filière de 12 milliards d'euros qui emploie plus de 70 000 personnes (2016).

De ce fait une vigilance toute particulière est mise sur le maintien de la qualité de la matière première.

1.2. Description des procédés de maltage et de brassage

Culture aux champs

Dans le monde, il existe plusieurs centaines de variétés d'orges de brasserie, adaptées aux conditions locales. On retrouve principalement deux types d'orge : les orges d'hiver et les orges de printemps. Parmi les céréales, les orges sont les plus sensibles à l'excès d'eau, occasionnant un déficit d'oxygène au niveau des sols, qui affecte la croissance des cultures. Les conditions climatiques lors du cycle végétatif des orges jouent un rôle déterminant sur la germination avant récolte. L'orge de printemps, possédant un cycle végétatif relativement court, est l'une des céréales nécessitant le moins d'intrants (engrais, produits phytopharmaceutiques).

Maltage

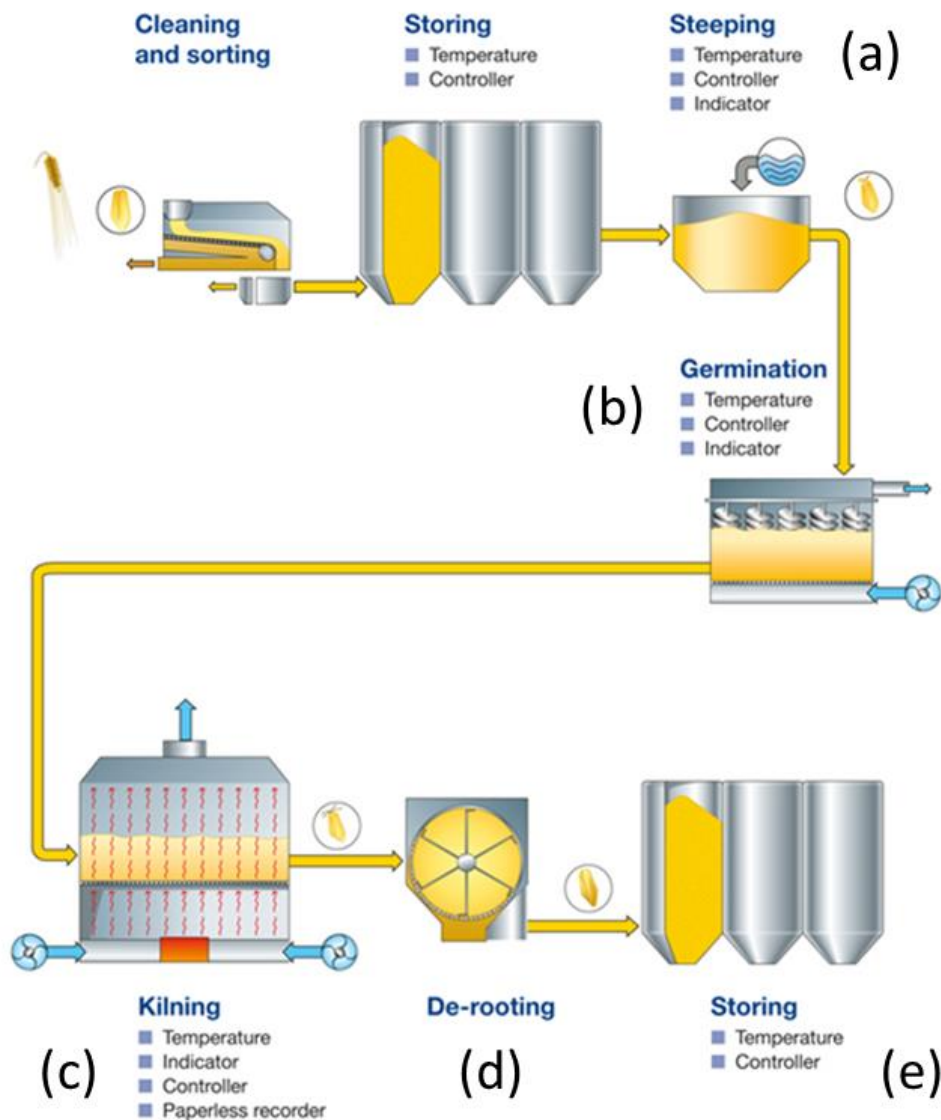


Figure 1. Schéma récapitulatif du procédé de maltage (<http://www.malt.ie>)

L'opération de maltage (Figure 1) consiste à transformer l'orge en malt pour permettre la bonne extraction de l'amidon, la production d'azote aminés libre et de molécules aromatiques au cours de trois étapes : la trempé (a), la germination (b) et le touraillage (c). Ces étapes de maltage ne sont à l'heure actuelle plus réalisées par les brasseries, des malteries indépendantes réalisant ces premières transformations au niveau des zones de production agricole. Le maltage a pour but de développer dans l'orge toutes les enzymes nécessaires pour le brassage. De plus, il doit donner au grain sa friabilité pour permettre un broyage optimal en brasserie. Le maltage donne à l'orge un arôme plus ou moins développé en fonction de la température de séchage (Hudson

1986). Par contre, lors du maltage, on observe la germination des spores de moisissures, la croissance de mycélium et une multiplication de levures et de bactéries.

La première étape, la trempe (a) consiste en une suite d'immersions du grain chacune entrecoupée de périodes d'aération. Le but de cette étape est de fournir à l'orge toute l'eau (humidité de 42 à 46 %) et l'oxygène nécessaire à l'initiation de la germination. Cette étape dure 40 heures à une température de 20 °C. Cette opération est importante parce qu'elle permet de laver les grains (dissolution de substances comme les mycotoxines et les pesticides) et de réduire la charge bactérienne et fongique (Douglas and Flannigan 1988).

L'étape suivante est la germination (b). Le grain humide est stocké dans un germoir où il est constamment en mouvement afin qu'il ne pourrisse pas, arrosé et maintenu à une température entre 15 et 20 °C. La germination fait sortir les radicules des grains. C'est au cours de cette étape que le grain développe son pouvoir diastasique qui correspond à la production d'enzymes hydrolytique lors de la croissance des radicules. Cette étape dure entre 4 et 8 jours. Le grain germé est désormais appelé malt vert, il renferme jusqu'à 45 % d'humidité. Cette étape, avec la trempe, est critique pour le malteur à cause de la grande humidité combinée à des températures (12 – 15 °C) qui permettent la croissance des moisissures et de certaines bactéries.

Les grains sont ensuite transférés dans la touraille pour subir un touraillage (c). C'est un immense four où l'on va sécher les grains d'orge. Cette étape permet au grain de trouver sa coloration. Il restera environ 30 heures dans la touraille, à une température de 45 °C. Ensuite, on chauffe intensément les grains pendant environ 5 heures à diverses températures selon le niveau de torréfaction que l'on veut obtenir. Après le touraillage, le grain ne contient plus que 4 à 5 % d'humidité, ce qui le rend apte à une conservation en silo de plusieurs mois.

Les grains subissent un dégermage (d) et les grains non germés sont éliminés. Ensuite, les grains vieillissent deux à trois semaines avant de servir pour le brassage (e).

Brassage

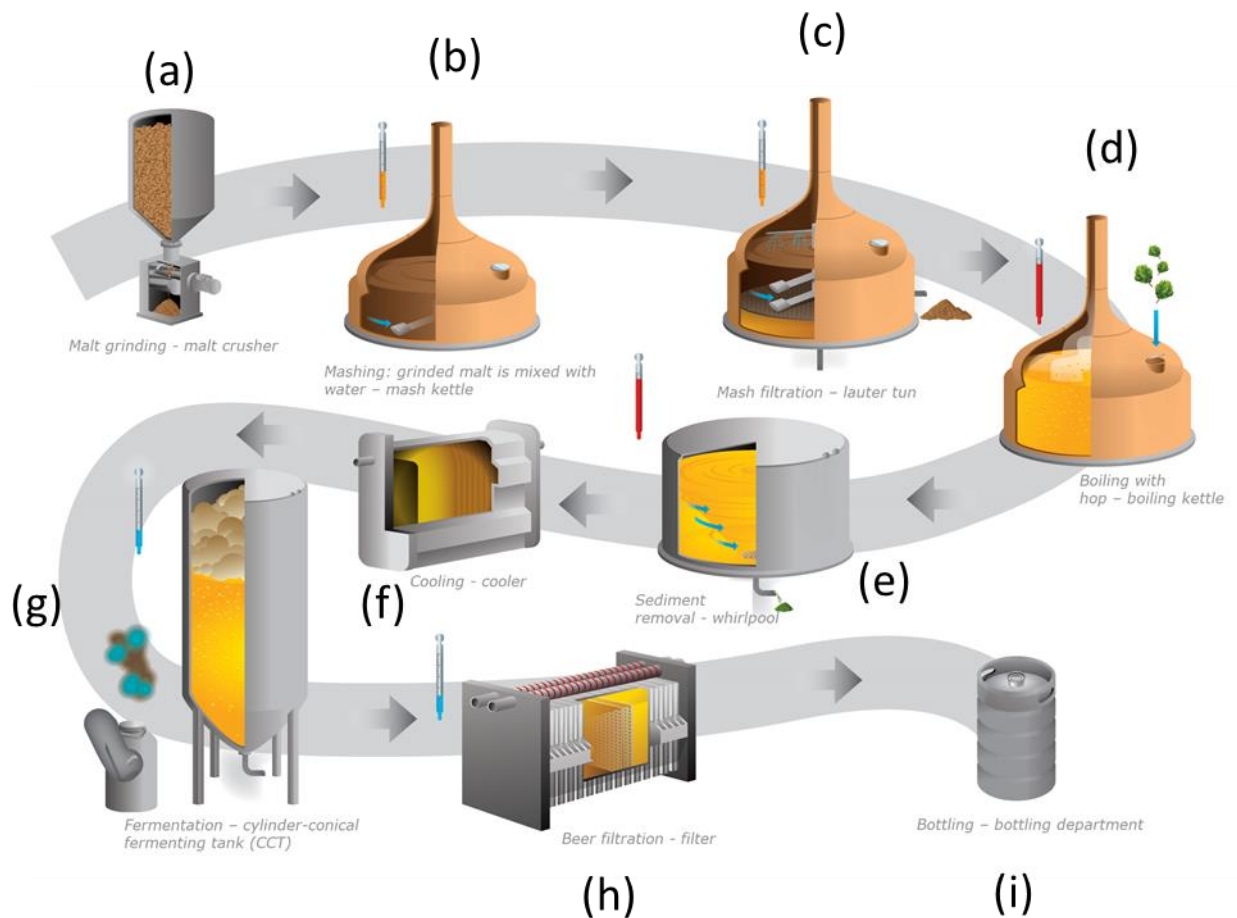


Figure 2. Schéma récapitulatif du procédé de brassage (<http://eng.baltika.ru>)

La première étape dans le processus brassicole (Figure 2) est la préparation d'un moût fermentescible. Cela commence par le concassage (a) pendant lequel le malt et tout autre extrait solide est broyé en une farine grossière appelée grist. Cette farine est mise en suspension dans de l'eau puis chauffée pour permettre la dégradation de l'amidon et enfin la phase de séparation ou clarification qui permet de retirer la phase solide du moût, les drèches, pour obtenir un moût limpide.

La masse de malt à peser est calculée pour produire un moût avec une teneur en glucides recherchée par le brasseur (soit 12 °Plato équivalents à 120 g de glucides / L d'extrait). Le concassage est effectué pour réduire la taille des grains afin d'améliorer le rendement d'extraction de l'amidon. Un compromis est recherché sur la taille des particules. Si la taille est

trop grande, la libération d'amidon sera limitée et de ce fait la dégradation enzymatique sera insuffisante et si elle est trop petite, cela entraîne une mauvaise séparation du moût lors de la filtration et donc des problèmes de colmatage.

Pendant le brassage (b), le grist est mis en suspension dans de l'eau puis chauffé, c'est l'étape d'empattage. De nombreux composants du moût sont produits au cours de cette étape. Ils sont le résultat de réactions entre les enzymes provenant du malt et les différents substrats en solution. Cela est rendu possible par l'environnement aqueux et la présence d'une combinaison appropriée de pH, de température et d'ions. Pour obtenir des glucides fermentescibles, il faut pouvoir dégrader l'amidon. Le brassage se fait à différents paliers de température.

Vers 45-50 °C, les protéines du malt non solubles se transforment en acides aminés, par l'action combinée de l'eau et des enzymes (protéinases et peptidases) qui sont réactivées, ce palier est appelé palier protéolytique et dure entre 15 et 30 minutes. Il permet d'éliminer les protéines responsables du trouble de la bière mais peut nuire à la bonne tenue de la mousse.

Entre 60 °C et 65 °C, le palier de saccharification ou palier amylolytique permet la formation de sucres fermentescibles grâce à la dégradation de l'amidon. La bêta-amylase décompose l'amidon en brisant la chaîne moléculaire et les dextrines par leurs extrémités, créant ainsi des sucres fermentescibles (du dextrose et du maltose). Cette action a lieu en combinaison avec l'alpha-amylase qui décompose les chaînes d'amidon par le centre, la bêta-amylase ne pouvant s'attaquer qu'à leurs extrémités. Cette étape dure en moyenne 30 minutes.

Entre 68 °C et 75 °C, le palier de saccharification permet cette fois la formation de sucres non fermentescibles. La bêta-amylase se dénature, ne laissant plus que l'alpha-amylase en action qui décompose l'amidon en brisant la chaîne moléculaire par son centre, créant ainsi des dextrines, sucres non fermentescibles. Ce palier dure en moyenne 30 minutes.

Au-delà de 78 °C, c'est le palier d'inhibition des enzymes ou « mash out », d'une durée moyenne de 10 minutes. En détruisant les enzymes, on permet au brassin de conserver son équilibre acquis précédemment et de solubiliser les sucres, améliorant ainsi le rendement du brassage, et facilitant le rinçage des drêches (enveloppes solides des grains). Il vaut mieux ne pas dépasser les 80 °C, au risque de solubiliser l'amidon et de troubler la bière, et d'extraire les tanins des drêches conférant de l'astringence à la bière.

Le brassage terminé (c), le brasseur se trouve en présence d'un mélange appelé maische qui contient du moût et les drêches. Il va maintenant falloir filtrer le moût et le récupérer. La

maische est déversée dans une cuve-filtre où une couche de drêches relativement épaisse, appelé gâteau, se forme à la surface du filtre. L'aspect intéressant de cette étape est que la couche de drêches va former un véritable filtre naturel qui permettra de filtrer le moût. Le concassage du malt est donc une étape très importante. En effet, une mouture trop fine colmate le filtre en profondeur. Au contraire, si la mouture est trop grosse, le moût récolté sera trouble et la filtration ne sera pas optimale. Une fois le moût récolté, on le fait repasser à travers la cuve-filtre jusqu'à ce qu'il ne soit plus trouble.

Toutefois, les drêches contiennent toujours du moût. Afin de récupérer le maximum de matières solubles, les drêches sont lavées avec de l'eau préalablement chauffée à 80 °C. La quantité d'eau pour le lavage des drêches peut représenter plus du tiers de l'eau totale que contient la bière ; il est donc évident que cette eau doit être prise en compte lors de l'élaboration de recettes. Après cette étape, il n'y a plus d'eau rajoutée dans la future bière. Lorsque les drêches ont été lavées, elles peuvent être valorisées en alimentation animale.

Le moût clarifié est ensuite transféré vers la cuve d'ébullition (d) pour subir un traitement thermique. La cuve d'ébullition permet de stériliser le moût et d'inactiver toutes les enzymes du malt avant qu'il soit refroidi et transféré vers la cuve de fermentation. Le houblon est ajouté à cette étape et joue un rôle aromatique et aseptisant. Les humulènes du houblon sont isomérisés durant cette étape. Les variétés de houblon nécessitant une isomérisation à haute température (houblon d'amertume) sont ajoutées en début d'ébullition alors que les houblons aromatiques sont ajoutés en fin d'ébullition. Certains compromis sont nécessaires entre les besoins d'isomérisation (permettant de développer l'amertume) et les pertes potentielles de composés impliqués dans le profil aromatique de la bière. Les polyphénols provenant du houblon et du malt réagissent avec les protéines pour former des composés insolubles qui précipitent. Cette réaction est appelée « cassure chaude ». Ce gel, plus dense que le moût, est éliminé par séparation centrifuge ou 'whirlpool' (e). Les hautes températures favorisent d'autres réactions chimiques comme la réaction de Maillard. C'est une réaction entre les glucides réducteurs et les amines qui forment des mélanoïdes contribuant à la couleur de la bière. L'ébullition permet aussi de concentrer le moût.

Fermentation et conditionnement

Le moût clarifié est ensuite refroidi (f) par l'intermédiaire d'un échangeur thermique puis transféré vers la cuve de fermentation (g) où il est oxygéné etensemencé la plupart du temps avec une levure des genres *Saccharomyces*. La fermentation des levures permettra la

dégradation des glucides et leur transformation en dioxyde de carbone, alcools et composés aromatiques. Les acides aminés dégradés vont aussi participer au profil aromatique de la bière.

Il existe 2 types de fermentation en fonction des bières que l'on veut obtenir :

• la fermentation basse

Les bières obtenues par fermentation basse ont un goût de houblon et de malt. Elles sont en moyenne moins fruitées et moins alcoolisées que les bières de fermentation haute, mais plus chargées en dioxyde de carbone. La levure la plus couramment employée est *Saccharomyces uvarum* (anciennement *Saccharomyces carlsbergensis*). Ce type de fermentation dure de 7 à 10 jours entre 4 et 12 °C.

La faible température requise par le procédé a l'avantage de protéger la bière contre le développement microbien. Les bières obtenues par fermentation basse ont une durée de conservation supérieure à celles obtenues par fermentation haute. En revanche, les levures dites basses produisent moins d'alcool que les hautes, parce que leur métabolisme est ralenti par l'alcool qu'elles produisent. La fermentation basse est suivie d'une phase de garde qui dure quelques semaines. Cela vaut aux bières de fermentation basse le nom usuel de *Lager* (de *lagern*, stocker en allemand).

• la fermentation haute

La fermentation haute permet d'obtenir des teneurs élevées en alcool (la levure haute n'est « pas ralentie » en présence d'alcool) ainsi que des arômes complexes. Les bières ainsi produites sont généralement moins concentrées en dioxyde de carbone que les bières de fermentation basse. La levure « haute » couramment utilisée est *Saccharomyces cerevisiae*. La fermentation a lieu durant 3 à 8 jours à une température de 15 à 25 °C. Une bière obtenue par fermentation haute est couramment appelée *Ale*, notamment au Royaume-Uni. Au niveau de cette étape, on retrouve souvent des levures sauvages, comme contaminants d'altération.

Les contaminations proviennent essentiellement de cuves mal nettoyées, avec un développement de levures sauvages et de bactéries lactiques. Après fermentation, la bière est transférée dans des cuves pour filtration (h), stockage puis dans des fûts ou des bouteilles en verre (i).

1.3. Points critiques de la filière

Il y a quatre points critiques : la culture, la germination, la fermentation et le conditionnement (figure 3).

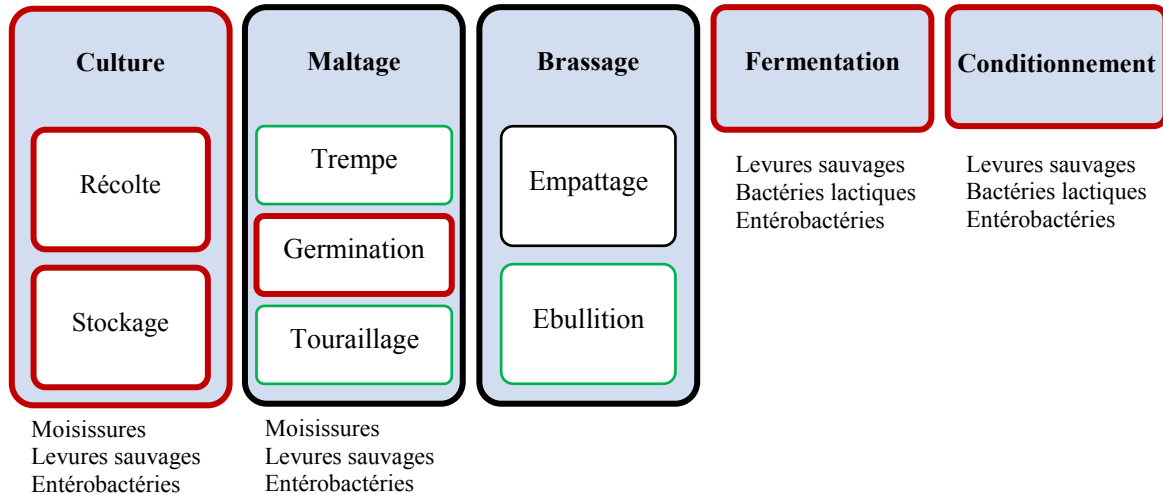


Figure 3. Diagramme des étapes principales du procédé de culture de l'orge, maltage et brassage avec mise en évidence des points critiques (rouge). Les différents contaminants sont précisés pour chaque étape.

Au niveau de la culture au champ, l'orge est contaminée essentiellement par des moisissures et des levures sauvages au cours de la culture, pendant la récolte et le stockage. Ces contaminations entraînent des pertes de rendement de culture et la contamination des grains par des mycotoxines représente un risque sanitaire alimentaire (au niveau humain avec la bière et chez les animaux avec les drèches).

Ensuite, le maltage a un rôle positif grâce à la trempe (p. 18). Cette opération permet de laver les grains et d'éliminer une grande partie de la flore fongique mais aussi les mycotoxines. Par contre, la germination conduit à une reprise de croissance des moisissures avec un risque de libération de mycotoxines. Par contre, l'étape de touraillage permet de détruire les microorganismes mais a peu d'effet sur les mycotoxines, généralement thermostables.

Pendant l'étape de brassage, l'ébullition permet de prévenir une nouvelle contamination.

La fermentation est ensuite une étape critique surtout si les équipements de fermentation ont été mal nettoyés ou s'il y a un temps de rupture entre ces deux étapes. Les bactéries lactiques, les entérobactéries et les levures sauvages se retrouvent dans un milieu riche en nutriments et rentrent en compétition avec la levure de procédés.

Enfin, lors du conditionnement, il y a des risques de contaminations croisées lors du passage de la cuve de garde ou de bière filtrée à des fûts ou des bouteilles (entérobactéries, bactéries lactiques). Dans le cas de l'utilisation de bouteilles consignées, elles sont d'abord pasteurisées, mais cela ne suffit pas toujours à éliminer la flore d'altération et des souches potentiellement pathogènes comme des coliformes peuvent se développer.

1.4. Problématiques de la filière

1.4.1. Exigences qualitatives de la matière première

Les exigences qualitatives se retrouvent à tous les niveaux de la filière. Face à l'ensemble des critères requis par la filière, l'agriculteur doit répondre à un certain nombre d'exigences. Après le choix d'une variété brassicole, les conditions de semis sont déterminantes pour la bonne implantation des orges de brasserie. Ensuite, il est nécessaire de gérer la fertilisation azotée afin de cibler la teneur en protéines, paramètre essentiel pour le brasseur. La récolte doit s'effectuer à maturité physiologique complète et éviter tout mélange de variétés lors du transport et du stockage. Ensuite, les orges doivent répondre à un ensemble d'indices (agronomique, fonctionnel) et à des tests en malterie.

Toute cette matière première doit ainsi suivre un cahier des charges très strict délivré par les malteurs et brasseurs pour maintenir une qualité d'orge et de malt optimale et exempt au maximum de composés pouvant altérer le produit.

1.4.2. Altération de la matière première

Les acteurs de la filière sont très sensibles à l'altération de la matière première que l'on peut classer en deux catégories : les problématiques sanitaires qui auront un impact sur la santé du consommateur (produits phytosanitaires, mycotoxines ou encore métaux lourds) et des problématiques technologiques qui auront un effet sur la production et l'image du produit (problème de filtration, de fermentation et de giclage).

Mycotoxines

Le tableau suivant regroupe les mycotoxines les plus souvent retrouvées sur les céréales (tableau 1).

Tableau 1. Tableau récapitulatif des principales moisissures retrouvées sur les céréales (d'après <http://www.fao.org/wairdocs/x5008e/x5008e01.htm>)

Mycotoxine	Céréales	Moisissures source
Déoxynivalenol (DON) Nivalenol (NIV)	Blé, maïs, orge	<i>Fusarium graminearum</i>
		<i>Fusarium crookwellense</i>
		<i>Fusarium culmorum</i>
Zéaralénone	Blé, maïs	<i>Fusarium graminearum</i>
		<i>Fusarium culmorum</i>
		<i>Fusarium crookwellense</i>
Ochratoxine A	Blé, maïs	<i>Aspergillus ochraceus</i>
		<i>Penicillium verrucosum</i>
Fumonisine B1	Maïs	<i>Fusarium moniliforme</i>
Aflatoxine B ₁ , B ₂	Maïs, cacahuètes	<i>Aspergillus flavus</i>
Aflatoxine B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Maïs, cacahuètes	<i>Aspergillus parasiticus</i>

Les espèces de *Fusarium* des régions tempérées ont été rapportées comme étant les souches les plus toxigènes. Elles produisent des mycotoxines comme les trichothécènes, les fusarines, les moniliformines, les zéaralénones, les fumonisines et de l'ochratoxine comme certaines espèces d'*Aspergillus*. Plusieurs de ces mycotoxines ont été associées à des maladies humaines et animales et peuvent résister au procédé de maltage. De plus, les trichothécènes comme le déoxynivalénol (DON), sont des inhibiteurs de levures dans les procédés de fermentation de la bière et affectent aussi la synthèse des enzymes lors du maltage.

Giclage

La contamination de l'orge par les mycotoxines n'est pas la seule préoccupation des malteurs et des brasseurs. Le giclage (gushing selon la dénomination anglo-saxonne), est un phénomène de génération de mousse plus ou moins intense pouvant apparaître lors de l'ouverture d'une bouteille de bière, sans agitation exagérée et induire, ainsi une perte jusqu'à 80 % du volume. Ce phénomène est très difficilement quantifiable. A l'heure actuelle il n'existe que quelques techniques, peu précises, permettant d'estimer ce potentiel. Cette partie sera développée dans la partie 2 de ce chapitre.

Floculation précoce des levures

Les brasseurs font parfois face au problème de floculation précoce de levure (PYF), signifiant que les levures de bière sédimentent prématurément au fond de la cuve de fermentation conduisant à une fermentation incomplète et des faux goûts (autolyse des levures). Ce phénomène est suspecté provenir de la présence de moisissures dans l'orge (MacIntosh *et al.*

2014). La dissociation des arabinoxylanes par des enzymes fongiques peut aussi aboutir à la formation de facteurs incitant le PYF. La tendance au PYF augmente quand l'orge est contaminée avec *F. graminearum* et *F. culmorum* alors que le traitement de l'orge par des fongicides pendant la période de croissance la réduit (Justé *et al.* 2011).

2. Le phénomène de giclage dans la bière

Le giclage est un phénomène de surmoussage de la bière ayant lieu lors de l'ouverture de la bouteille. Il en résulte une perte de liquide ayant un impact négatif sur le produit et l'image de la brasserie. A l'heure actuelle, peu d'informations concrètes sont connues sur les acteurs et les composés impliqués dans ce phénomène. Ce phénomène a lieu en général selon un cycle décennal mais depuis 2007 on observe une accélération avec des crises tous les deux ans. Cela pose de nombreux problèmes aux acteurs de la filière. On peut néanmoins distinguer deux types de giclage, selon les composés impliqués, le primaire et le secondaire.

Le giclage primaire se produit lorsque le brasseur utilise du malt contaminé par des champignons filamenteux (appartenant aux genres *Fusarium*, *Nigrospora*, *Aspergillus*, *Penicillium* ou encore *Stemphylium*). La littérature a montré qu'il est potentiellement dû à des protéines excrétées par les moisissures appelées hydrophobines (Askolin *et al.* 2001; Sarlin 2012; Shokribousjein *et al.* 2011; Linder *et al.* 2005; Sarlin *et al.* 2012). Le giclage secondaire est quant à lui une forme moins problématique de giclage qui peut être plus facilement maîtrisée. Il est induit par différentes formes de troubles, des ions métalliques, des cristaux d'oxalate de calcium, des résidus de produits de nettoyage, un excès de gaz dans les bières lors de l'embouteillage (Sarlin *et al.* 2005), des extraits isomérisés de houblon, des adjuvants de filtrations ou la surface interne de la bouteille qui favoriseraient la formation de bulles (Garbe *et al.* 2009).

Une combinaison des giclages primaire et secondaire ou d'autres facteurs que ceux décrits précédemment pourrait être envisagée car des phénomènes autres que ceux visualisés avec les hydrophobines ont pu être observés.

2.1. Facteurs impliqués dans le giclage primaire

2.1.1. Contaminants microbiologiques en lien avec le phénomène de giclage

La variété et l'origine des microorganismes isolés de l'environnement brassicole sont relativement bien définies, en dehors des contaminations émergentes. Ils sont constitués de contaminants des champs et de première transformation (maltage) regroupant essentiellement des moisissures et des levures sauvages.

Au niveau des champignons filamenteux, on retrouve surtout des moisissures dites ‘de stockage’ qui contaminent les céréales au champ et se développent lors des phases de stockage des grains d’orge. Ce sont les premiers contaminants que l’on retrouve dans la filière. Parmi les moisissures de stockage on trouve essentiellement les genres *Fusarium*, *Microdochium* et *Aspergillus*.

Le genre *Fusarium*

Cycliquement, les grains d’orge ont été affectés par le *Fusarium* head blight (FHB) principalement causé par *Fusarium graminearum*, entraînant des pertes de rendement dépendant des années (entre 10 et 30 % en France) et une baisse de la qualité des grains (teneur en protéine, friabilité, taille). Deux espèces de *Fusarium* responsables du FHB sont *F. culmorum* et *F. graminearum* pouvant aussi provoquer des pourritures du plant d’orge, des racines jusqu’à la couronne. Deux autres espèces de *Fusarium*, *F. poae* et *F. avenaceum*, peuvent aussi entraîner des retards de croissance et des pertes de rendement.

Le genre *Microdochium*

D’autres genres de moisissures sont impliqués dans le FHB. Dans le genre *Microdochium*, *Microdochium nivale* et *Microdochium majus* sont les espèces les plus retrouvées en tant que contaminant de grains. L’identification morphologique et moléculaire des espèces isolées de grains infectés montre que *M. nivale* est l’espèce dominante (63,5 %). Elle se retrouve donc sur 88,8 % des champs infectés. Cette espèce est plus fréquemment rencontrée dans les climats tempérés du nord-ouest de l’Europe (Parry *et al.* 1995 ; Xu *et al.* 2005). *M. nivale* n’est pas une espèce toxigène mais peut-être responsable d’une réduction de la germination (74 % de réduction comparé à un grain non traité) et entraîner des pertes de rendement jusqu’à 28 % (Simpson *et al.* 2000). On connaît l’impact de *M. nivale* sur les grains d’orge mais il n’existe aucune étude sur son rôle dans le giclage de la bière. Avec des années à risque de giclage dû à l’augmentation de la contamination, il est essentiel d’avoir plus d’informations sur le rôle de *M. nivale* dans le giclage de la bière.

2.1.2. Composés potentiellement impliqués dans le giclage

Les hydrophobines

Fonction des hydrophobines

Les hydrophobines sont des protéines extracellulaires de surface excrétées par les moisissures. Leurs fonctions biologiques sont assez diverses mais, pour l'essentiel, elles permettent l'adhésion et la croissance aérienne des moisissures en surface des plantes et au niveau des interfaces air-eau. Ces protéines ont aussi été identifiées comme induisant un giclage dans la bière (Sarlin *et al.* 2005, 2007 ; Zapf *et al.* 2007 ; Shokribousjein *et al.* 2011).

Un modèle a été proposé pour la formation des structures aériennes fongiques par Wösten (Wösten 2001) (Figure 4).

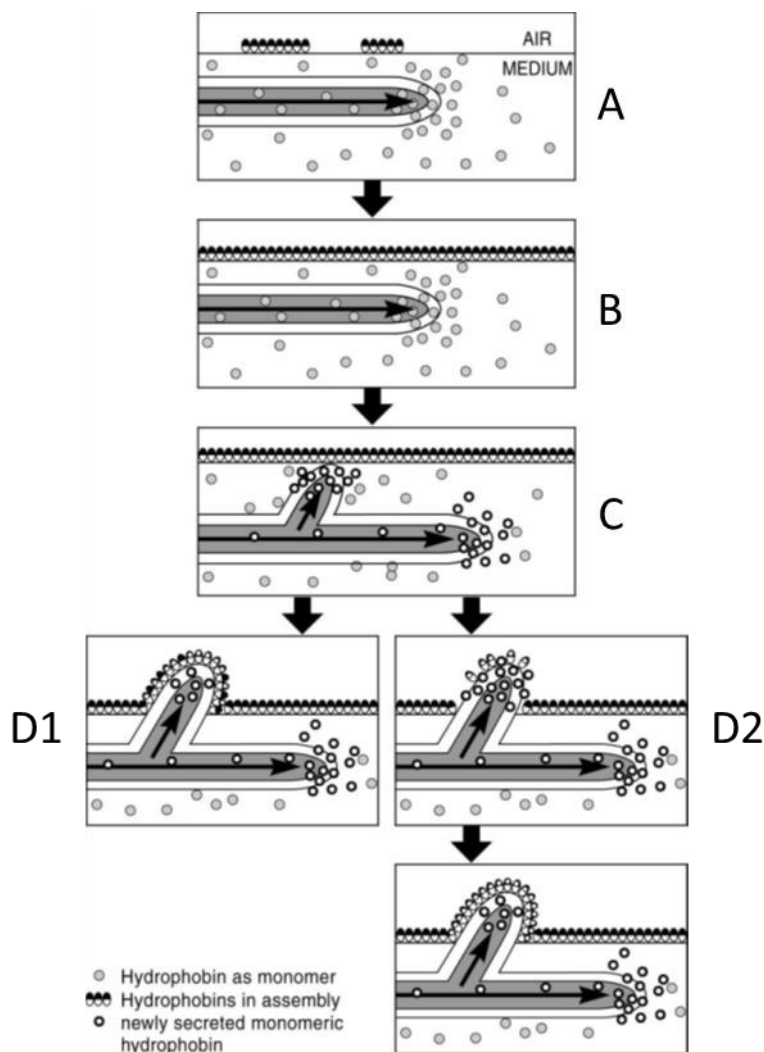


Figure 4. Représentation du rôle des hydrophobines dans la croissance aérienne des hyphes en environnement aqueux (Wösten 2001).

Après qu'un mycélium en phase aqueuse se soit formé, le champignon sécrète dans le milieu des hydrophobines monomériques (A). Ces monomères s'auto-assemblent à l'interface liquide-air en une membrane amphiphile provoquant une diminution de la tension superficielle de l'eau (B). Lors de sa croissance, l'hyphe (C), élément végétatif filamenteux formant le mycélium, peut ainsi étirer la membrane sans la rompre en y intercalant des hydrophobines sous forme de monomères de sorte qu'il n'y ait pas de contact avec l'air (D1). Alternativement les hyphes cassent la membrane d'hydrophobines pour permettre à la paroi cellulaire de rentrer en contact avec l'air (D2). Les hydrophobines sécrétées en surface des hyphes s'auto-assemblent à l'interface cellule-air. Le côté hydrophile de film fait face à la paroi cellulaire hydrophile alors que son côté hydrophobe est exposé à l'air.

Le film d'hydrophobines couvrant les hyphes a aussi un rôle de protection contre l'humidité et la dessiccation. Il permet aussi une meilleure dissémination des spores pouvant ainsi causer des problèmes respiratoires aux personnes sensibles (Linder 2009). La couche d'hydrophobines a aussi un rôle nutritif car elle couvre les structures aériennes et empêche la dispersion des éléments nutritifs dans le milieu permettant ainsi leur assimilation par le mycélium. Les hydrophobines permettent aussi le passage unidirectionnel de petites molécules (jusqu'à 10 kDa) du côté hydrophobe au côté hydrophile et empêche le passage de molécules s'étendant de 300 à 10 000 Da du côté hydrophile. Cela pourrait avoir un rôle significatif pour la croissance fongique (Linder *et al.* 2005).

Structure des hydrophobines

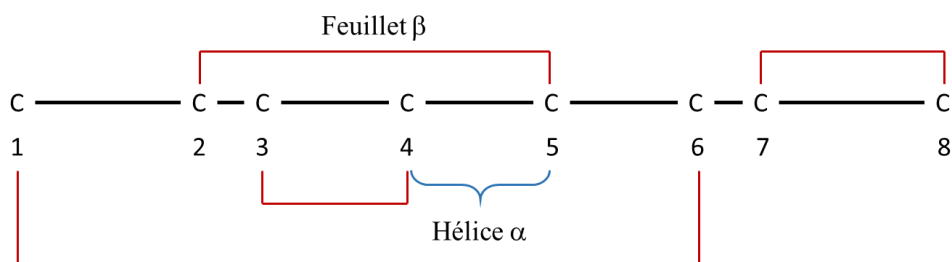


Figure 5. Arrangement spatial des 8 résidus de cystéine dans une hydrophobine (Linder 2009).

Les hydrophobines sont des protéines ayant un arrangement spatial particulier avec des acides aminés hydrophobes, hydrophiles et neutres incluant des résidus de type cystéine (Figure 5). Ces résidus sont reliés entre eux par des ponts disulfure (1-6, 2-5, 3-4, 7-8). Ces liens entre les

résidus 1 et 6, 3 et 4 et 7 et 8 (chez *Trichoderma reesei*) forment deux feuillets β et le lien entre les résidus 4 et 5 forme une hélice α . Il est important de noter que les hydrophobines sont des protéines très résistantes à la dénaturation thermique (même à 90 °C) (Linder 2009).

Classification des hydrophobines

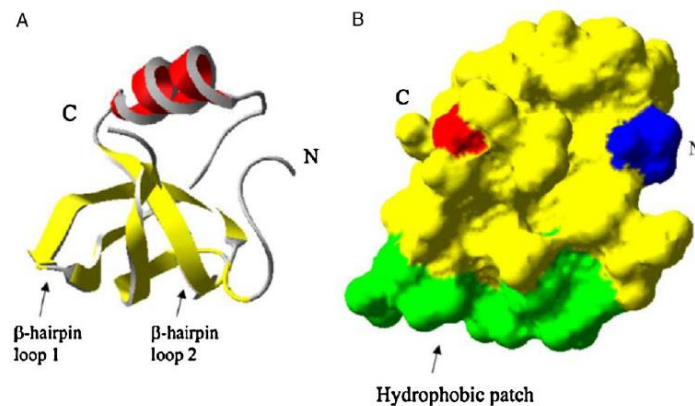


Figure 6. Représentation tridimensionnelle d'une hydrophobine HFBII de *Trichoderma reesei* (Linder *et al.* 2005)

Basées sur la comparaison des propriétés de solubilité et de séquence, les hydrophobines ont été divisées en deux classes : la classe I et la classe II (Linder *et al.* 2005; Sarlin *et al.* 2005). Les hydrophobines de classe I sont solubles dans les acides forts, comme l'acide trifluoroacétique (TFA), l'acide formique et sont encore fonctionnelles après retrait de l'acide (Linder *et al.* 2005; Szilvay *et al.* 2007). Les hydrophobines de classe II (figure 6) sont solubles en solution aqueuse, comme dans de l'éthanol (60 %) (Kisko *et al.* 2008) ou dans le laurylsulfate de sodium chaud (SDS 2 %) (Hektor and Scholtmeijer 2005; Lumsdon *et al.* 2005; Scholtmeijer *et al.* 2001). Les différences de propriétés sont dues à la différence de structure tertiaire. Les hydrophobines de classe II ont une partie hydrophobe qui est faite de 2 feuillets β comprenant seulement des acides aminés aliphatiques (Linder 2009) et une partie hydrophile qui inclut une hélice α . Les hydrophobines de classe I sont semblables à la classe II mais sans hélice α (Kallio *et al.* 2007) et avec plus d'acides aminés et de diversité dans les séquences des acides aminés (Linder *et al.* 2005).

Comparaison entre les deux classes

Les différences de structure entre les deux classes sont à l'origine de propriétés différentes dues aux variations des séquences des acides aminés. La classe I a plus d'acides aminés (100-125 résidus) que la classe II (50-100 résidus) (Hektor and Scholtmeijer 2005) et est plus hydrophobe (Linder *et al.* 2005). L'hydrophobie de la classe Ib (classe produite par des basidiomycètes comme *Puccinia Hordei*) est plus élevée que celle de classe Ia (produite par les ascomycètes comme *Claviceps Purpurea* responsable de la maladie de l'ergot) et celle de classe II. Les niveaux de production des hydrophobines de classe II sont plus élevés que pour la classe I et leur purification est plus facile (Linder *et al.* 2005). Les protéines de la classe I ont plus de feuillets β que la classe II ce qui les rend plus stables (Hektor et Scholtmeijer 2005). Les hydrophobines de classe II ont plus tendance à gicler et mousser que la classe I, mais les protéines de classe I adhèrent davantage aux surfaces que la classe II (Linder 2009). Lors de l'association aux interfaces air-eau, les protéines de la classe I montrent des changements de la structure secondaire, mais aucun changement de structure secondaire des protéines de la classe II n'a été observé (Kisko *et al.* 2008). L'épaisseur des films d'interface de la classe I est plus élevée que ceux de classe II (10 nanomètres et quelques nanomètres, respectivement) (Kisko *et al.* 2008). La classe I ne contient pas d'hélice α et la séquence entre les cystéine 4 et 5 est plus courte (Kallio *et al.* 2007).

Hydrophobines et giclage de la bière

Ces hydrophobines, produites en surface des grains, peuvent être mises en évidence trois semaines après contamination et sont produites tout au long de la croissance de l'orge (Sarlin *et al.*, 2007). Les hydrophobines peuvent être aussi produites lors du maltage à l'étape de trempage et de germination où l'on observe une prolifération des moisissures. Des seuils 10 fois plus élevés en hydrophobines ont été retrouvés sur du malt par rapport au seuil initial quantifié sur l'orge. Si la concentration relative en hydrophobines sur malt est de 100 % seulement 10 % se retrouvent dans la bière finie (figure 7).

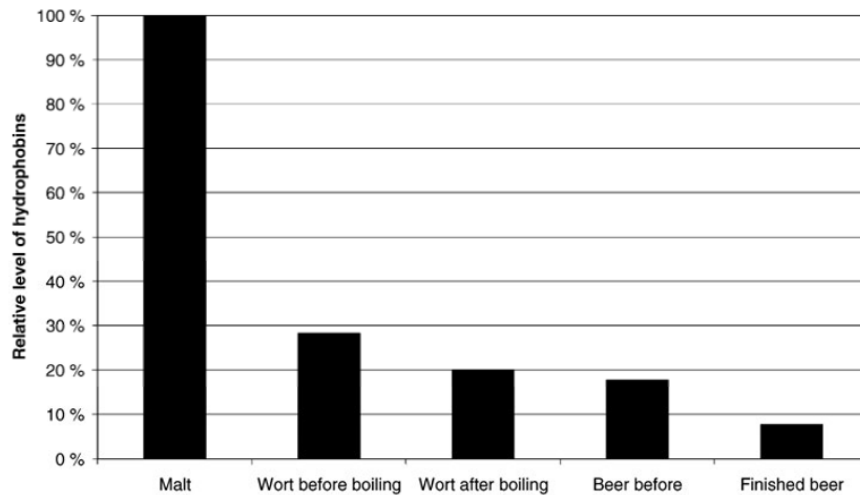


Figure 7. Quantité relative d'hydrophobines à différentes étapes de brassage. La concentration en hydrophobines est mesurée par dosage ELISA (Sarlin *et al.* 2007).

Cette différence peut s'expliquer par l'élimination de la fraction solide contenant une grande partie des hydrophobines (elles ne seront pas dissociées de l'enveloppe du grain lors de l'empâtage). Cette hypothèse est confirmée par une diminution de plus de 70 % des hydrophobines après l'empâtage (Figure 7).

La concentration requise pour obtenir du giclage va être dépendante de la moisissure mais un seuil de 1 mg/mL est suffisant (Garbe *et al.* 2009 ; Sarlin *et al.* 2005). Il y a un consensus sur le mécanisme supposé du phénomène de giclage dans les boissons carbonatées (Fischer 2001; Deckers *et al.* 2010, 2011 ; Sahu *et al.* 2006 ; Draeger 1996). Des molécules tensio-actives telles que les hydrophobines auraient la propriété de stabiliser les bulles de CO₂ par agglomération à l'interface gaz-liquide des bulles. Les bulles stabilisées auraient ensuite tendance à se concentrer dans le col de la bouteille et une libération brutale de pression lors du décapsulage de la bouteille provoquerait leur rupture brutale et une libération d'énergie intense. Cette énergie permettrait la nucléation simultanée d'autres bulles, leur croissance et un giclage apparaîtrait instantanément (Deckers *et al.* 2010, 2011). Ce mécanisme est appelé nano-bombe et sera développé dans le paragraphe 2.2 p.28.

Les protéines de stress (ns-LTPs)

Sans compter les hydrophobines de classes II produites par les contaminants de l'orge, une molécule typique produite par le plant d'orge, en réponse à une agression externe, a de nombreuses similitudes avec les hydrophobines au regard de ses propriétés pouvant induire le giclage (Hippeli et Elstner, 2002). Il s'agit des protéines non spécifiques de transfert de lipide (ns-LTP) qui semblent avoir pour rôle le transfert des lipides dans les cellules (Chasan 1991)

dû à la présence d'une cavité hydrophobe. Les protéines de transfert de lipide d'orge (LTP's) sont des albumines thermostables et protéase-résistantes présentes dans la bière, où elles participent à la formation et à la stabilité de la mousse de bière. Elles sont solubles dans l'eau, abondantes dans la couche à aleurone et l'endosperme du grain d'orge, avec des poids moléculaires de 9 kDa (ns-LTP1) et 7 kDa (ns-LTP2) et un point isoélectrique de 9,0 (Chasan 1991 ; Sossountzov *et al.* 1991 ; Kader 1997 ; Dubreil *et al.* 1998 ; Jégou *et al.* 2000 ; Gorjanović *et al.* 2005). La LTP1 de l'orge ne présente aucune propriété moussante néanmoins celle retrouvée dans la bière présente des propriétés tensio-actives. Cette modification de propriété est liée aux glycosylations formées par les réactions de Maillard lors du maltage, d'acylation lors de l'empattage, et du déploiement structurel lors du brassage (Figure 8).

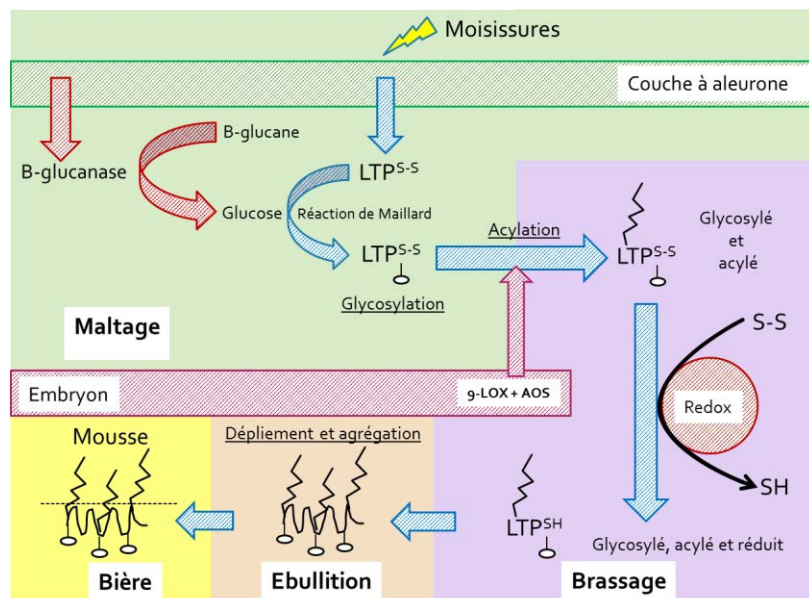


Figure 8. Modifications structurales des LTPs lors du maltage et du brassage de l'orge (d'après Perrocheau *et al.* 2006).

La stabilité structurale des LTPs de l'orge et des LTPs du malt glycosylé après chauffage a été analysée. Quelles que soient les modifications, acylation et glycosylation, les LTPs de l'orge sont des protéines très stables pouvant résister à des températures jusqu'à 100 °C. La dénaturation thermique se produit seulement à l'aide d'un agent réducteur. En présence de sulfite de sodium, les formes acylées des LTPs de l'orge et du malt ont montré une stabilité à la chaleur plus élevée que la forme non acylée. Par contre, la glycosylation n'a pas ou peu d'effet sur la dénaturation thermique. Toutes ces modifications permettent aux ns-LTPs d'acquérir des propriétés moussantes (Perrocheau *et al.* 2006). Il est présumé que le giclage se produit lorsque le niveau de ns-LTP1 dépasse une valeur seuil (Gorjanović *et al.* 2007).

Cependant, (Hippeli et Hecht 2009) ont détecté des quantités inférieures de ns-LTP1 dans des bouteilles de bière présentant du giclage comparées à des bières non giclantes de la même marque (Hippeli et Hecht 2009 ; Lutterschmid 2011). En outre, il a été montré que les ns-LTPs n'étaient pas les inducteurs du giclage (Zapf *et al.* 2007 ; Lutterschmid 2011) mais pouvaient en revanche réduire le volume de giclage induit par des hydrophobines de la classe II (Lutterschmid 2011).

Les polyphénols

Les composés phénoliques représentent un groupe de composés chimiques caractérisés par la présence d'au moins une unité de phénol. Ils sont classés selon le type et le nombre de sous-composants phénoliques actuels. Les polyphénols sont généralement divisés en catégories : les tannins hydrolysables et les ellagitannines, ou les phénylpropanoïdes flavonoïdes (flavones, flavonols, flavanols, flavanones, proanthocyanide). Selon le type de bière, jusqu'à 80 % des polyphénols de la bière sont extraits du malt, le reste provient du houblon. Plusieurs classes de composés phénoliques ont été trouvées dans la bière : les phénols simples, les dérivés d'acide benzoïque, les acides cinnamiques, coumariques, chalcones, flavanones, flavones, flavan-3-ols, proanthocyanidines, alpha-acides, acides iso-alpha ainsi que divers autres composés. La teneur finale en polyphénols de la bière dépend en grande partie de la pratique de brassage et de la matière première. Les monomères de flavan-3-ol et les oligomères de proanthocyanide suscitent l'attention de par leur rôle dans la saveur, la mousse, la couleur et les qualités colloïdales de la bière. Jusqu'à présent au moins 8 monomères de flavan-3-ol (incluant les glycosides et les gallates), 7 dimères et 3 trimères (procyanidés, prodelphinidines) ont été identifiés dans la bière. Une autre classe de flavonoïdes, les flavonols, suscite également l'attention due à leur rôle dans la chélation des métaux.

Les polyphénols ont aussi été décrits comme étant potentiellement impliqués dans le giclage de la bière. Une bonne corrélation ($R^2 = 0,89$) a été trouvée entre la teneur en polyphénols de la bière et le giclage (Müller *et al.* 2010) (Figure 9).

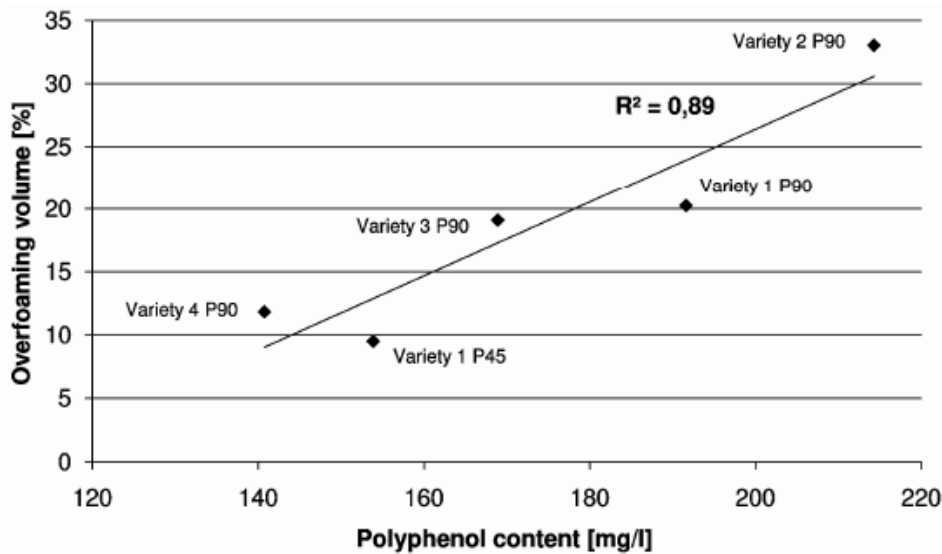


Figure 9. Corrélation entre la teneur en polyphénols (mg/L) et le volume de giclage (%) dans 5 essais différents de brassage (Müller *et al.* 2010).

2.2. Théorie sur le giclage – les nano-bombes

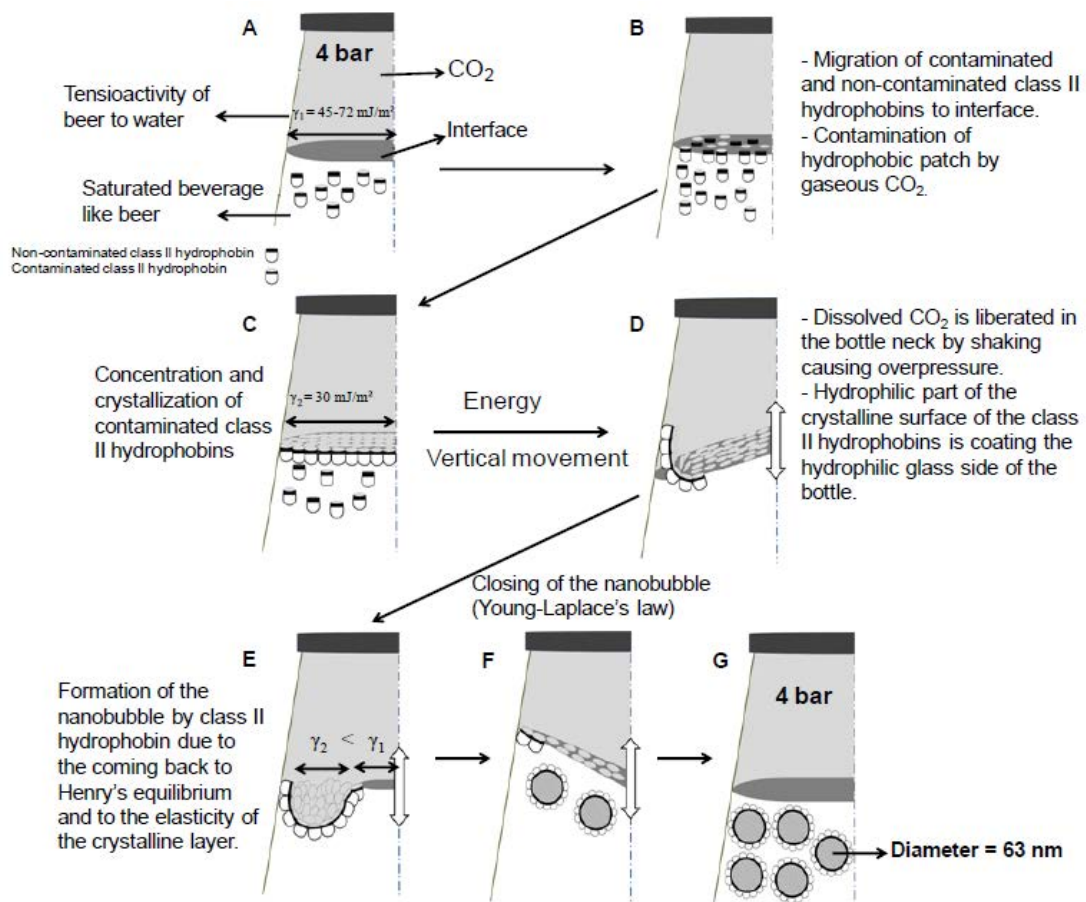


Figure 10. Représentation des différentes étapes de formation des nano-bulles de CO_2 stabilisé par des hydrophobines (Deckers *et al.* 2011, 20).

Il a été suspecté que le giclage primaire observé dans les boissons carbonatées pourrait provenir de la capacité des hydrophobines de classe II à stabiliser le CO₂ gazeux. L'explication sur la formation et la stabilisation des bulles n'a jamais été vraiment décrite et seule l'équipe de Guy Derdelinckx (Center for Food and Microbial Technology, Leuven) propose un modèle physique réaliste de la formation de ce phénomène (Deckers *et al.* 2011) (figure 10).

Le phénomène peut être séparé en deux parties : (1) la formation de structures appelées nanobulles et (2) leur rupture lors du décapsulage qui provoque une désolubilisation brutale du CO₂ dissous et la formation abondante de mousse.

Interaction dioxyde de carbone et hydrophobines

Il est important de noter que le dioxyde de carbone est un composé essentiel au giclage dans la bière. Sans CO₂ il ne peut pas y avoir de giclage. Quand un liquide carbonaté est fermé hermétiquement un équilibre thermodynamique a lieu entre la pression partielle de CO₂ dans la phase gazeuse au-dessus du liquide et la concentration en CO₂ dans le liquide.

Au vu des propriétés du CO₂ et des hydrophobines ainsi que leur possible interaction, les hydrophobines auraient la capacité de stabiliser le CO₂ sous forme de nano-bulle. Tout d'abord, seulement 30 % des hydrophobines présentes dans le malt sont transférées dans le moût et uniquement 10 % se retrouvent dans la bière (Sarlin *et al.* 2007). Cette concentration serait suffisante pour induire du giclage. Les hydrophobines s'associent au CO₂ lors de la recarbonation ou d'une refermentation de la bouteille. Grâce à leurs propriétés de surface, elles vont migrer à l'interface gaz-liquide de la bouteille. Elles vont ensuite s'associer au CO₂ pur présent au niveau du col de la bouteille. Si la concentration en hydrophobines est suffisante pour atteindre la concentration critique, elles vont ensuite s'associer à cette interface (air / eau) sous forme d'une monocouche cristalline (Cox *et al.* 2007 ; Szilvay *et al.* 2007) (Figure 11).

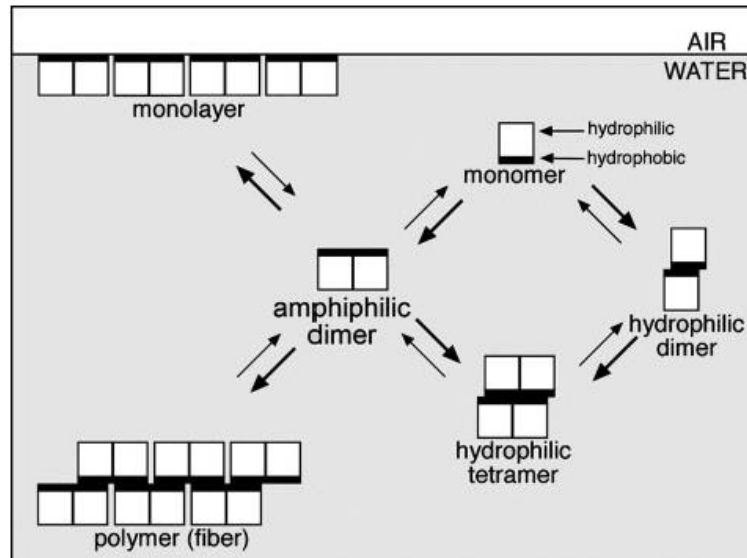


Figure 11. Représentation schématique de l'association des hydrophobines en milieu aqueux et à l'interface air / eau (Kallio *et al.* 2007)

Formation des nano bulles

Après la formation de cette structure, si une énergie suffisante est apportée au système (agitation lors du transport par exemple), cela va entraîner un échange gazeux entre le liquide et la phase gazeuse mais aussi l'attraction de la partie hydrophile du verre avec le pôle hydrophile de la monocouche (Qin *et al.* 2007). La partie hydrophile agit comme un point d'ancrage pour la formation des nano-bulles. Pour revenir à l'équilibre, le gaz va se re-dissoudre à l'endroit où la tension de surface est la plus faible. Initialement, la tension de surface est de 45 (bière) – 72 (eau pure) mJ/m² et elle se réduit à 30 mJ/m² en présence d'hydrophobines. A cause de cette réduction et à l'élasticité de la monocouche formée par les protéines, les molécules de CO₂ vont s'accumuler dans cette structure. Finalement, une bulle stabilisée par du CO₂ va se refermer grâce aux forces latérales qui s'exercent (forces de Young-Laplace). Cette loi de Young-Laplace relie la courbure locale à l'interface entre deux milieux et à la différence de pression entre ces deux milieux. Elle est notée comme suit :

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{R}$$

Où ΔP est la différence de pression, γ est la tension de surface et R le rayon de la sphère.

Théorie des nano-bombes

Après formation des nano-bulles, le phénomène de giclage peut être décomposé en cinq étapes : décapsulation de la bouteille, rupture et explosion des nano-bulles, nucléation, moussage et dégazage. Dans des bouteilles fermées, la stabilisation des nano-bulles de CO₂ gazeux par une couche cristalline d'hydrophobines isole ce CO₂ de la bière. La pression interne de ces nano-bulles est semblable à la pression à l'intérieur de la bouteille (aux environs de 4 bars) et ces nano-bulles pressurisées seraient responsables du giclage primaire lors du décapsulation de la bouteille. Quand la bouteille est ouverte, la pression est libérée. La baisse de la pression de 4 à 1 bar provoque la dilatation du gaz et donc l'éclatement de la nano-bulle (Yount *et al.* 1984 ; Liger-Belair et Villaume 2011). Cette explosion fournit l'énergie exigée pour la nucléation et la désolubilisation du CO₂ dissous et peut être comparée au dégazage qui se produit quand un choc est donné sur une bouteille de bière ouverte (Lubetkin 2003). La bulle résultant de l'explosion, contenant une concentration élevée de CO₂ gazeux, se développera par diffusion du CO₂ dissous présent dans la bière (Hepworth *et al.* 2003 ; Blatteau *et al.* 2006 ; Yang *et al.* 2007 ; Liger-Belair *et al.* 2008 ; Stuart et Craig 2010). Pendant qu'elles montent à la surface, les bulles vont grossir et attirer des protéines ce qui crée ce surmoussage (Polidori *et al.* 2009). Si le liquide présent dans la bouteille est dégazé à la pression atmosphérique, des nanobulles stabilisées par des films de hydrophobines se reformeront avec un diamètre égal au diamètre critique d'une bulle de CO₂ à la pression atmosphérique (100 nm) (Deckers *et al.* 2011).

2.3. Méthodes de mise en évidence du giclage

De par la complexité du phénomène et la multiplicité des facteurs jouant sur le giclage il existe peu de méthodes fiables et reproductibles pour évaluer l'activité giclante de la matière première. On retrouve néanmoins deux voies de mise en évidence de ce phénomène : une basée sur la quantification du pouvoir giclant d'une matière première et l'autre reposant sur les métabolites indirects témoins de la contamination fongique.

2.3.1. Méthode de quantification préventive du giclage

La détection préventive du pouvoir giclant de la matière première (orge/malt) permet de minimiser les risques de giclage dans le produit fini. C'est dans cette optique que des tests prédictifs du pouvoir giclant des matières premières ont été développés. On retrouve actuellement deux méthodes basées sur la quantification du surmoussage d'un échantillon : la méthode Carlsberg modifiée (Vaag *et al.* 1993) et le test Weihenstephaner (Donhauser *et al.* 1990).

Le protocole Carlsberg modifié consiste à produire un extrait aqueux à partir de malt et de l'incuber dans une bouteille de bière ou d'eau gazeuse. Les bouteilles sont ensuite remises sous agitation pendant 3 jours et décapsulées à température ambiante.

Le test de Weihenstephaner se rapproche plus de la production en brasserie car le moût est porté à ébullition, carbonaté puis embouteillé. La mise en agitation et le décapsulage est identique à ceux du test Carlsberg modifié. La reproductibilité du test est un facteur problématique de la filière. De nombreux paramètres physiques (carbonatation de l'échantillon ou de la bouteille de bière, température) vont aussi avoir une influence sur le giclage. De plus, l'opérateur qui prépare les extraits et qui met en œuvre le test de giclage peut considérablement modifier les résultats passant de l'absence de giclage à un giclage important.

Des différences significatives peuvent être observées sur ces tests avec des malts qui sont giclage positif avec le test Weihenstephaner et négatif avec la méthode Carlsberg modifiée. Cette différence est sûrement due à la dilution occasionnée lors de l'incubation de l'extrait dans l'eau gazeuse (Christian *et al.* 2010). L'autre problème de ces méthodes est qu'un giclage observé sur le malt ne va pas nécessairement produire une bière ayant des propriétés giclantes. Cette différence provient en grande partie de la transformation que le moût va subir pendant le processus de brassage qui pourrait avoir une influence sur le giclage.

En raison des problèmes de giclage après la récolte de 2007 en Allemagne, des recherches ont été intensifiées pour améliorer les méthodes de détermination du giclage. Sachant que la fiabilité de la méthode Carlsberg modifiée est connue pour être problématique, des essais ont été réalisés en collaboration avec différents laboratoires en Allemagne. En coopération avec les brasseurs intéressés, des malteurs et des instituts de recherche allemands ont mis à plat la méthode pour identifier les points critiques. Ces variations ont été expliquées par le MEBAK (Mittleuropäische Brautechnische Analysenkommision). Le protocole de mesure du giclage peut être interprété de différentes manières, qui peuvent conduire à des résultats qui vont différer considérablement d'un laboratoire à l'autre. Les points critiques du protocole analytique, concernant autant l'équipement de laboratoire que les étapes de processus, ont été énumérés et discutés par Rath (2009). Des essais inter-laboratoires ont prouvé qu'un équipement de laboratoire uniforme et l'application d'un même protocole permet une amélioration des résultats. L'évaluation du risque de giclage sur le malt est une préoccupation majeure des brasseurs et des malteurs. Néanmoins, les instituts de recherche et les laboratoires ne semblent pas avoir de données concrètes pour décrire les relations entre le potentiel giclage détecté sur le malt (extrait de malt) et le giclage de la bière. Cependant, la seule solution pour

limiter ce problème est l'application de ce protocole de prévention du giclage. Tant que des méthodes plus fiables ne seront pas disponibles, les essais préventifs de giclage demeureront un outil important pour estimer ce risque sur le malt.

2.3.2. Marqueurs de la contamination fongique

Comme présenté dans le paragraphe 2.1.1 p. 21, les moisissures sont impliquées dans le phénomène de giclage. Des méthodes ont été développées pour quantifier de manière précise les moisissures et de doser leurs métabolites en tant que marqueur indirect du giclage.

2.3.2.1. Quantification des moisissures

Par la biologie moléculaire

La biologie moléculaire a permis de comprendre que les méthodes d'identification des micro-organismes, traditionnellement fondées sur le phénotype des différents individus (capacité à dégrader tel ou tel substrat), n'étaient pas toujours fiables, puisque les résultats pouvaient varier dans le temps (perte d'une fonction métabolique, acquisition d'une résistance...). Des outils analytiques permettent d'étudier directement le matériel génétique des micro-organismes et non leur phénotype. Cette technique est ainsi devenue indispensable pour une meilleure appréciation des populations microbiennes d'un environnement donné.

Ces nouvelles techniques ne se substituent nullement aux méthodes traditionnelles dont elles constituent le complément indispensable. A partir de là, plusieurs méthodes ont donc été développées pour discriminer et/ou identifier les micro-organismes par l'analyse de l'ADN ou d'une partie de celui-ci. Ainsi, l'hybridation ADN/ADN (Martini et Kurtzman 1985) permet de comparer l'ADN génomique d'une espèce inconnue avec celui d'une espèce connue, l'électrophorèse en champ pulsé pour séparer des molécules d'ADN plus grandes que les techniques habituelles (< 50 kb) ou encore la quantification en temps réel pour étudier les phytopathogènes (Schena *et al.* 2004). Beaucoup de méthodes dérivent aujourd'hui de la réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction ou PCR).

La PCR

La réaction PCR permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Au cours de la réaction P, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

Pour avoir répllication d'un ADN double brin, il faut respecter trois étapes :

- dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin,
- borner et amorcer la répllication de la séquence à amplifier à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques,
- réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire.

A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin.

Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. Pour effectuer ces transitions de température, les microtubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable : un thermocycleur. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur.

La réaction PCR est extrêmement rapide et ne dure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles).

La suite de la manipulation consiste à utiliser des amorces spécifiques à chaque type de microorganismes pour pouvoir amplifier des fragments de d'ADN et identifier précisément les souches.

Polymorphisme de taille des fragments de restriction (RFLP)

Le produit de PCR est, en fonction du fragment étudié, soumis à une digestion enzymatique spécifique. Le résultat de cette action enzymatique permet de différencier les souches les unes des autres en obtenant des fragments discriminatifs de faible taille moléculaire.

Amplification aléatoire de l'ADN (RAPD)

La RAPD repose sur la PCR avec des amorces de séquences arbitraires capables de s'hybrider en divers points du génome. Une seule amorce oligonucléotidique arbitraire d'une longueur d'environ 10 nucléotides est utilisée pour l'amplification de segments aléatoires d'ADN génomique et génère un profil caractéristique composé d'ADN courts de différentes longueurs. Il est également possible de combiner deux oligonucléotides ou davantage (RAPD multiplex) dans une seule PCR afin de produire des profils RADP plus fiables pour le typage des souches. Les profils RAPD sont caractéristiques des souches, leur fiabilité et leur pouvoir de discrimination dépendent des amorces.

Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)

Une digestion de l'ADN génomique est effectuée avec des enzymes de restriction à sites rares de coupures. La totalité du génome est fragmentée en un nombre de fragments permettant une lecture facile et une différenciation claire entre les souches. Des cellules bactériennes de cultures fraîches sont recueillies par centrifugation et immobilisées dans des blocs d'agarose. La lyse de la cellule et la restriction de l'ADN génomique sont réalisées dans les blocs afin que l'ADN soit uniquement fragmenté de façon spécifique par l'enzyme et non de façon aléatoire par des effets mécaniques. Les blocs de gel sont ensuite déposés sur le gel d'agarose et les fragments séparés par l'électrophorèse PFGE.

PCR quantitative

La PCR quantitative en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Cette technologie exploite une propriété inhérente à la PCR : plus il y a de molécules cibles à l'origine, plus le nombre de cycles d'amplification nécessaires pour atteindre un nombre déterminé de molécules amplifiées sera réduit. Autrement dit, le nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence atteigne une valeur seuil est inversement corrélé au nombre de molécules cibles à l'origine. Étant donné qu'elle utilise généralement des systèmes en tubes fermés et que la quantification ne requiert aucune manipulation post-amplification, les problèmes de contamination post-PCR par les amplicons sont significativement réduits. Le processus complet est automatisé du début à la fin rendant cette technologie très performante pour des applications d'analyses à grande échelle. En comparaison avec la PCR semi-quantitative, elle permet d'obtenir une grande précision de calcul, une standardisation des expériences et une meilleure sensibilité.

La spectroscopie en proche infrarouge (SPIR)

La spectroscopie en proche infrarouge est une technique analytique basée sur le principe d'absorption des rayonnements infrarouges par la matière organique. Cette absorption étant liée à la composition chimique des échantillons, une estimation peut être faite en mesurant l'absorption de lumière par l'échantillon. Cette mesure est réalisée avec un spectromètre en transmission (par mesure de la lumière au travers d'un échantillon fin) soit par réflexion (en mesurant la lumière réfléchiée par un échantillon épais). Cette technique présente de nombreux avantages car elle est rapide, non destructive, ne nécessite pas une grande quantité d'échantillon et est peu onéreuse. Le spectre obtenu est caractéristique d'un échantillon car il regroupe des

informations (quantité et caractéristiques) de chacun de ces constituants organiques (protéines, matières grasses, fibres, etc.).

Cette richesse d'information constitue l'avantage et l'inconvénient de l'analyse SPIR ; beaucoup d'informations sont présentes dans un spectre, mais il faut faire appel à des méthodes statistiques complexes qui vont permettre de relier les spectres et les analyses chimiques. Il s'agit de la phase de calibration qui fournit des équations spécifiques d'un paramètre chimique pour une matière première donnée.

La spectroscopie en proche infrarouge a été utilisée pour quantifier les moisissures par une prédiction de la chitine, un polymère de la glucosamine constituant de la paroi cellulaire. Les spectres sont collectés à partir de foin contaminé par des moisissures. Les concentrations en chitines sont comprises entre 75 et 710 $\mu\text{g/g MS}$ et sont similaires au taux retrouvé dans d'autres produits contaminés. Un spectre de glucosamine commerciale a permis de mettre en place une équation pour prédire efficacement la teneur en moisissures présentes dans le foin. Cette technique peut aussi être appliquée pour la détection des métabolites produits par les moisissures mais avec une phase développement de base de données de calibration qui pourrait être lourde et coûteuse mais aussi peu applicable en cas de crise.

2.3.2.2. Quantification des hydrophobines

Dosage par la méthode ELISA

L'analyse par immunosorbance par enzyme liés (ELISA) est une méthode de dépistage immunologique basée sur les réactions spécifiques entre les antigènes et les anticorps correspondants. Le nombre de ces réactions est proportionnel à la quantité d'antigènes dans un échantillon et est mesuré suite à une réaction enzymatique qui va induire une coloration (Figure 12).

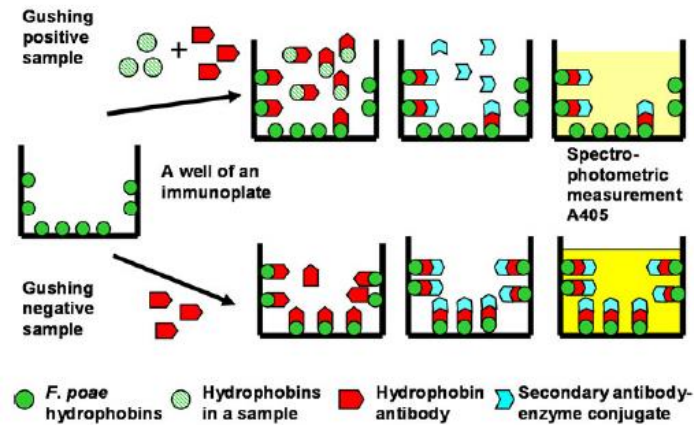


Figure 12. Représentation schématique de l'ELISA développé pour la détection des hydrophobines (Sarlin 2012).

Les anticorps polyclonaux de l'hydrophobine FpGUSH (*Fusarium poae*) ont été produits chez les lapins en injectant la préparation contenant les hydrophobines dans un muscle au cours de la période d'immunisation de quatre mois. La spécificité des anticorps a été analysée par Western blot. Dans cette analyse immunologique, les anticorps polyclonaux de FpGUSH ont réagi uniquement avec leur propre antigène et non avec les hydrophobines isolées de *Trichoderma reesei* et *Nigrospora*. Ce résultat indique que les hydrophobines de *T. reesei* et *Nigrospora* sont différentes de FpGUSH à tel point qu'elles ne pourraient pas être détectées avec des mêmes anticorps polyclonaux. Cependant, le giclage de la bière est considéré comme étant généralement provoqué par des espèces de *Fusarium* (Haikara 1980 ; Schwarz *et al.* 1996), ce qui justifie l'utilisation des anticorps d'hydrophobines de *F. poae* pour la prévision du potentiel de giclage de l'orge et du malt. En plus de son propre antigène, les anticorps produits à partir de l'hydrophobine FpGUSH peuvent réagir avec d'autres protéines de l'orge et du malt. Lors de l'analyse ELISA, les hydrophobines de l'orge ou des extraits de malt vont concurrencer les hydrophobines FpGUSH fixées dans les puits de la plaque en tant qu'accepteurs des anticorps polyclonaux de FpGUSH. Dans le cas d'un échantillon giclage positif, les anticorps spécifiques de FpGUSH vont réagir avec les hydrophobines présentes dans l'échantillon plutôt qu'avec les hydrophobines FpGUSH fixées sur la plaque. Plus la concentration en hydrophobines dans un échantillon est élevée, plus la concentration en anticorps spécifiques est faible ce qui, après liaison d'un anticorps conjugué et addition du substrat avec l'enzyme, entraîne une coloration plus faible. Cela signifie qu'une valeur basse d'absorbance correspond à une concentration élevée en hydrophobines dans un échantillon. Afin de faciliter l'interprétation des résultats, le niveau d'hydrophobines a été exprimé en valeurs inverses

d'absorbance (1/Abs). Cet ELISA a été utilisé pour évaluer les niveaux en hydrophobines de *Fusarium* dans des orges naturellement et artificiellement infectées par des souches de *Fusarium* et dans les malts correspondants. La concentration en hydrophobines dans un échantillon a été estimée en utilisant une courbe de calibration réalisée à partir de standards de concentrations connues en FpGUSH dans un extrait de malt giclage négatif. Les niveaux d'hydrophobines quantifiés par ELISA ont été comparés aux résultats de giclage. Une corrélation a été trouvée entre la concentration en hydrophobines et le potentiel giclage du malt. Il a été observé que le risque de giclage était important si la valeur d'1/Abs du malt dépasse 1,7, correspondant à une concentration en hydrophobines de 250 µg/g. Tous les échantillons de malt avec des valeurs d'1/Abs de 2,5 ou plus élevées, correspondent à des concentrations en hydrophobines égales ou supérieures à 500 µg/g et avec un giclage très important. Ces résultats ont suggéré que l'analyse de la teneur en hydrophobines pourrait être employée pour la prévision du risque de giclage du malt. Une analyse sur orges a aussi été réalisée mais seule une corrélation entre le giclage et la teneur en hydrophobines a été trouvée sur des orges très fortement contaminées par *Fusarium*. C'est probablement la production supplémentaire d'hydrophobines pendant le procédé de maltage, qui pourrait expliquer des niveaux plus bas en hydrophobines détectées dans les orges comparées à ceux des malts correspondants. Les études précédentes soutiennent également cette conclusion (Haikara 1983 . Néa ; Munar et Sebre 1997 ; Schwarz *et al.* 1996). Néanmoins, la multiplicité des souches contaminantes de l'orge et la diversité des hydrophobines produites limitent l'utilisation cette méthode. En effet, sans une recherche et un développement régulier d'anticorps correspondant aux souches émergentes, cette méthode ne peut pas être assez réactive et ce délai pourrait poser problème en cas de crise sanitaire sur les orges.

Analyse par diffusion dynamique de la lumière

L'analyse par diffusion dynamique de la lumière (DLS) permet l'évaluation du diamètre hydrodynamique de particules présentes en suspension dans un échantillon. Selon les études réalisées par Deckers (2007), des structures spécifiques au giclage, les nano-bombes, pourraient être détectées dans des échantillons à giclage positif. Une étude a été engagée en combinant le test de potentiel Carlsberg modifié et l'analyse par DLS. Dans cette étude, un moût a été produit (selon la méthode EBC) pour extraire les hydrophobines des grains et standardiser autant que possible les paramètres opératoires. Comme d'après Garbe *et al.* (2007), dans le test Carlsberg modifié, seule la fine mouture a été retenue car elle permet les résultats les plus reproductibles. Pour analyser l'orge (giclante ou non), la mouture a été mélangée avec du malt giclage négatif

pour éviter des problèmes de filtration qui ont lieu lorsque l'orge est utilisée sans ajout d'enzyme à cause de la gélatinisation de l'amidon à 63 °C (Briggs *et al.* 2004). Des moûts de malts giclage positif et négatif ont été mélangés pour obtenir différents niveaux de contamination. Comme le dioxyde de carbone est un prérequis indispensable au giclage (Pellaud 2002 ; Deckers *et al.* 2011), de l'eau carbonatée a été ajoutée pour mettre en contact les hydrophobines avec le CO₂ pour favoriser la formation de nanostructures stabilisées par le CO₂. L'analyse par DLS et la détection de particules d'un diamètre approximatif de 100 nm sont utilisées pour confirmer la présence d'hydrophobines dans le moût obtenu à partir des grains analysés (Deckers *et al.* 2011). Pour les échantillons utilisés, seulement 5 % de grains contaminés suffisent pour induire du giclage et pour former des nanobulles stabilisées détectable par DLS. Les résultats obtenus ici montrent qu'une méthode prédictive pour analyser le giclage des orges et des malts est directement envisageable sur la matière première. Néanmoins, les procédés de maltage et de brassage sont différents et pourraient avoir un impact sur le niveau d'hydrophobines. Comme montré par Sarlin *et al.* (2007), le niveau d'hydrophobines augmente lors du maltage et diminue lors du brassage (seulement 10 % des hydrophobines présentes dans le malt se retrouvent dans la bière). Il est supposé qu'une concentration minimale d'hydrophobines est nécessaire pour avoir du giclage (Sarlin *et al.* 2005). Un échantillon d'orge giclage négatif pourrait donc devenir positif à cause d'une augmentation du niveau d'hydrophobines lors du maltage et un malt giclage positif pourrait produire une bière giclage négatif à cause de la réduction des hydrophobines lors du brassage.

2.3.2.3. Quantification des mycotoxines

Les mycotoxines sont des composés chimiques toxiques, produits par certains champignons. Il existe de nombreux composés de cette sorte, mais seul un nombre limité se retrouve régulièrement dans l'alimentation humaine ou animale tels que les céréales. Étant donné que les mycotoxines sont produites par les champignons, elles sont retrouvées dans les récoltes affectées par les moisissures, même lorsque la contamination ne semble que superficielle. Des méthodes d'analyse des mycotoxines ont été mises en place pour les identifier et les quantifier (par ELISA ou CLHP) et pour les relier au phénomène de giclage.

D'après Sarlin *et al.* (2005), aucune relation n'a été trouvée entre la présence des mycotoxines et la présence des hydrophobines dans la bière. De ce fait, il n'est pas possible de prédire le giclage dans la bière en fonction de la présence des mycotoxines seules ou accompagnées par

des hydrophobines (Sarlin *et al.* 2007). Par contre, le giclage de la bière pourrait être un signal pour le consommateur concernant la présence probable de mycotoxines (Sarlin *et al.* 2005).

Par ELISA, aucune connexion n'a été trouvée entre les résultats de dosage des hydrophobines et les teneurs en déoxynivalenol (DON) des malts. Cette observation implique que la production d'hydrophobines et de DON ne sont pas nécessairement liées entre elles. Il a également été déclaré que la formation de DON et les facteurs de giclage pourraient être indépendants l'un de l'autre (Munar et Sebree 1997). Une comparaison a également été faite entre la teneur en DON du malt et son potentiel giclage. De nouveau, aucune corrélation entre ces deux paramètres n'a été trouvée. Ceci est contradictoire avec les résultats de (Schwarz *et al.* 1996) qui ont trouvé une corrélation forte entre le niveau de DON et le potentiel de giclage du malt produit à partir d'échantillons nord-américains d'orge. La plupart des échantillons analysés dans cette étude ont été produits en Finlande. Il a été indiqué que les teneurs en DON des orges finlandaises étaient plus basses. Par exemple, pendant les saisons de 1995-1999, tous les échantillons commerciaux finlandais d'orge à malter étudiés contenaient moins de 96 µg de DON/kg d'orge. Il a été rapporté que *Fusarium avenaceum* communément retrouvées dans les grains finlandais est incapable de produire du DON (Nielsen *et al.* 2011). Au contraire, un producteur fort de DON, *Fusarium graminearum*, a été considéré comme l'espèce prédominante de *Fusarium* dans les orges nord-américaines. Il a été estimé que 67-82 % des cultures d'orge à malter produites dans la région du Midwest supérieur des Etats-Unis avaient été souillées avec la DON (gamme 600-60 000 µg/kg) en 1993-1996.

Concrètement, seule une teneur très élevée en mycotoxines pourrait être un indicateur d'une forte présence fongique et donc d'un possible risque de giclage sur la matière première.

3. Production, extraction et purification de composés impliqués dans le giclage

3.1. Production par fermentation liquide

Souches utilisées pour la production des hydrophobines

Les espèces de *Fusarium*, *Nigrospora* ou encore *Trichoderma* sont les producteurs les plus actifs des hydrophobines que l'on trouve dans la bière et sont responsables du giclage (Sarlin *et al.* 2005). Les souches de *Fusarium* isolées sur l'orge dépendent de la localisation géographique et du climat. Aux Etats-Unis, au Canada, en Chine et dans le sud et l'est de l'Europe, *F. graminearum* prédomine, alors que le *F. culmorum* est plus important en Europe du Nord (Garbe *et al.* 2009).

On retrouve dans la littérature, des productions d'hydrophobines à partir de souches naturellement productrices et des souches modifiées par mutagenèse. De nombreuses études utilisent *Trichoderma reesei* comme producteur d'hydrophobines pour ces taux de production et sa facilité de croissance. Néanmoins cette espèce n'est pas une moisissure contaminante de la filière orge-malt-bière et n'est pas nécessairement le meilleur modèle pour l'analyse des composés impliqués dans le giclage. D'autres moisissures comme *Fusarium poae* et *Nigrospora*, présentes sur l'orge naturellement contaminée, sont aussi utilisées pour produire des hydrophobines.

Systèmes de production

On retrouve surtout des productions en flasque et en bioréacteur. Les souches sont d'abord propagées dans des boîtes de Pétri avec des milieux adaptés puis mises en culture en bioréacteur essentiellement en fed-batch par induction de la production des hydrophobines par le galactose ou le glucose. Le mycélium ou le milieu de culture est ensuite utilisé pour extraire les hydrophobines.

3.2. Extraction des hydrophobines

3.2.1. Extraction par tampons aqueux

Les hydrophobines sont extraites par mise en contact du mycélium dans un tampon contenant du tris-HCl + SDS ou encore de l'eau ultrapure. Une agitation est mise en place pour faciliter l'extraction et la solubilisation des hydrophobines dans le tampon.

3.2.2. Extraction par bullage de CO₂

Le fractionnement par bullage de CO₂ des composés est une méthode de séparation absorbative pour concentrer les composés tensio-actifs dilués et dissous dans de l'eau (Maruyama *et al.* 2006). Cette technique facilement accessible a été étudiée dans de nombreux domaines tels l'ingénierie chimique/biochimique, la chimie analytique, et le traitement des eaux résiduaires (Maruyama *et al.* 2007). En principe la forte nature amphiphile des protéines et des enzymes, de par leurs groupes polaires et apolaires, leur permet d'être préférentiellement adsorbées à l'interface gazeuse liquide. Le fractionnement par bullage de CO₂ peut être employé pour séparer et concentrer de telles protéines (Aksay et Mazza 2007). L'adsorption à l'interface gaz-liquide dans ce système abaisse la tension superficielle et favorise la formation de bulles. D'ailleurs, les molécules forment un film élastique autour des bulles augmentant la stabilité de la mousse (Linke *et al.* 2005). La mousse enrichie est alors collectée. L'augmentation de la

concentration en protéines dans la mousse est due à l'effet combiné de l'adsorption et du drainage de la mousse. Cette adsorption apparaîtra seulement lorsque les bulles montent vers la surface du liquide (Bhattacharjee *et al.* 1997). Cette technique est simple et permet de baisser significativement les coûts de récupération et de purification des protéines (Tseng *et al.* 2006). L'origine de cette idée vient du phénomène de giclage car les hydrophobines ont une affinité très forte avec le CO₂ (Deckers *et al.* 2010 ; Shokribousjein *et al.* 2011). Ce phénomène a conduit les chercheurs à considérer que le CO₂ pourrait être un gaz plus efficace et plus spécifique pour le fractionnement des tensioactifs que l'air, particulièrement ceux hydrophobes tels que les hydrophobines. Puisque le CO₂ est moins polaire que l'air, les hydrophobines seraient attirées par les bulles de CO₂ plus efficacement que par les bulles d'air.

Le système de fractionnement est composé d'une colonne en verre de 52 mm de diamètre (Figure 13). Pour buller efficacement, le CO₂ est injecté au travers d'un fritté. La mousse est ensuite collectée en sortie de colonne. Le débit, le rapport hauteur de liquide sur la taille de colonne aussi bien que la taille des pores du fritté ont été optimisés pour améliorer le système de fractionnement de mousse par CO₂ (Khalesi *et al.* 2013).

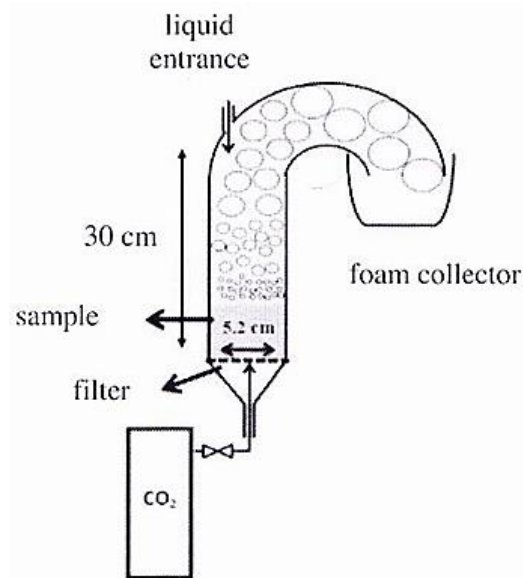


Figure 13. Système de fractionnement par bullage de CO₂ (Khalesi *et al.* 2013).

La quantification des hydrophobines par micro spectrophotomètre a révélé que le milieu de culture avant fractionnement contenait une concentration en hydrophobines de 25 ± 2 mg/L. Après fractionnement, la teneur en hydrophobines a atteint un seuil de 115 ± 8 mg/L. Ce qui conduit à un enrichissement volumique égal à 4,6. Le pourcentage de matière sèche dans le

milieu de culture était de $5,75 \pm 0,96$ g/L alors que celui de la mousse était égal à $7,62 \pm 0,55$ g/L, soit une augmentation de 33 % de la matière sèche. Ces résultats confirment une amélioration de la purification des hydrophobines par rapport à la matière sèche. Dans l'échantillon, avant fractionnement la pureté est de 0,43 % par rapport à la matière sèche alors qu'après fractionnement, elle atteint 1,5 % soit une augmentation d'un facteur 3,5. Il semblerait que l'affinité forte des hydrophobines avec le CO₂ liée à la zone hydrophobe présente permettrait de séparer efficacement les hydrophobines d'un échantillon complexe. Le système de fractionnement par bullage de CO₂ est un système efficace pour extraire les hydrophobines mais aussi de les pré-purifier avant une étape de séparation chromatographique.

3.2.3. Purification par chromatographie d'interactions hydrophobes

La chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH) sépare les protéines en fonction de leur caractère hydrophobe, et est souvent utilisée comme une étape intermédiaire dans un système de purification. Les protéines sont liées à une phase stationnaire dans un tampon de force ionique élevée et, par conséquent, la CIH peut typiquement être réalisée immédiatement après la chromatographie par échange d'ions, sans échange de tampon ou de dilution nécessaire. La CIH est aussi couramment réalisée après une précipitation au sulfate d'ammonium, une procédure qui peut être utilisée pour éliminer rapidement les protéines par précipitation de certaines des protéines avec du sel. Elle est parfois applicable dans les premières étapes d'un procédé de purification ou en tant qu'étape finale pour l'élimination d'impuretés présentes avec la protéine d'intérêt.

Après production du mycélium en bioréacteur, une extraction de ce dernier a été réalisée avec un tampon tris-HCl (pH 7,5) contenant 1 % de SDS (Deckers *et al.* 2011). Le SDS a ensuite été précipité par du KCl 2 M et éliminé par centrifugation. La concentration en sulfate d'ammonium et le pH de l'extrait ont été ajustés à 0,6 M et 7,5, respectivement, et l'extrait (5 L) a été injecté dans une colonne phényl sépharose 6 FF équilibrée avec 100 mM de Tris/HCl, pH 7,5, contenant du sulfate d'ammonium 2 M. La majeure partie des hydrophobines HFBI a été éluée avec de l'eau après un gradient constant de tampon d'équilibration à 20 mM de Tris/HCl pH 7,5. Les fractions contenant les hydrophobines ont été mises en commun (4,6 L). Une partie de la fraction (3 x 200 mL) a été ensuite purifiée par chromatographie liquide d'échange d'ions pour séparer les différentes formes d'hydrophobines.

Les extraits ainsi obtenus contiennent un pigment jaune provenant du mycélium comme expliqué par (Nakari-Setälä *et al.* 1996). Le retrait de 78 % de SDS par la précipitation au KCl

n'a pas entraîné de perte d'hydrophobines. Une partie importante des hydrophobines a été éluée à l'eau par CIH avec la colonne phényl-séparose 6FF. Les fractions obtenues contenaient 1,8 g d'hydrophobines correspondant à 28 % de la teneur initiale en hydrophobines. L'analyse par SDS-PAGE a montré que la solution d'hydrophobines ne contenait pas de protéines contaminantes.

3.2.4. Purification par chromatographie de phase inverse

De par leurs propriétés hydrophobes, la séparation par chromatographie en phase inverse est très intéressante pour purifier les hydrophobines (Khalesi *et al.* 2013).

Un extrait brut de mycélium de moisissure (extraction réalisée avec du tris-HCl pH 9 + SDS) a été filtré sur un filtre hydrophile en polyestersulfone (millipore) et chargé (0,5 mL) sur une colonne en phase inverse (résine source 15RPC). L'éluion a été faite avec un gradient constant d'ACN (de 0 à 60 % en 20 min) contenant 0,1 % de TFA à un débit de 1 mL/min et a été suivie par détection UV à 215 et à 280 nm. La séparation chromatographique a été effectuée sur un système ÄKTA en basse pression.

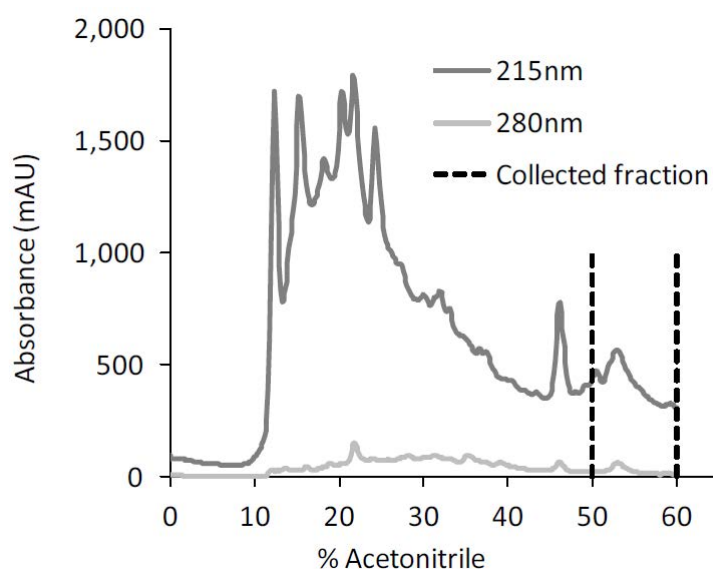


Figure 13. Chromatogramme de l'extrait brut obtenu à partir du mycélium de *Trichoderma reesei* (Khalesi *et al.* 2013).

Des pics distincts ont été détectés aux longueurs d'onde 215 et 280 nm entre 50- 60 % ACN (Figure 14). Différentes fractions ont été analysées par MALDI-TOF avec une matrice CHCA. La comparaison des poids moléculaires mesurés avec ceux prévus des hydrophobines HFBI (7.533 Da) a suggéré que les hydrophobines sont présentes dans les fractions éluées entre 50 et 60 % d'ACN (53 %) (Neuhof *et al.* 2007).

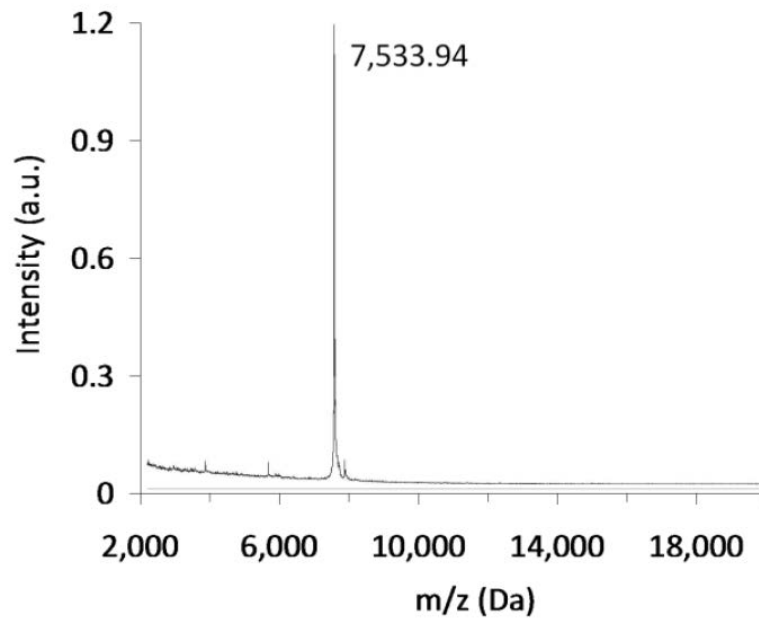


Figure 14. Spectre de MALDI-TOF de la fraction éluée à 53 % d'ACN (Figure 13) (Khalesi *et al.* 2013).

Les hydrophobines obtenues sont apparemment pures car aucune autre molécule n'a été détectée par MALDI-TOF (Figure 14). La molécule éluée à 53 % d'ACN et ayant le même poids moléculaire que l'hydrophobine HFBI a été identifiée par séquençage des acides aminés en N-terminal. L'ordre suivant où X représente l'acide aminé non identifié, a été obtenu : XXXNGNVXPPGL et a été comparé à la séquence connue de HFBI. Bien que les trois premiers et le huitième acides aminés, représentés par X, n'aient pu être identifiés, une recherche par BLAST (Altschul *et al.* 1997) n'a fourni qu'un seul résultat : l'hydrophobine HFBI de *T. reesei*.

4. Conclusion :

Cette bibliographie a présenté différentes techniques utilisées actuellement pour l'extraction et la purification de composés tels que les hydrophobines. Nous allons réaliser un travail sans nécessairement rechercher les hydrophobines mais des composés avec des propriétés proches. Pour cela, nous allons travailler sur deux matières premières distinctes : du malt industriel présentant ou non une activité giclante et de l'orge artificiellement contaminée par des moisissures.

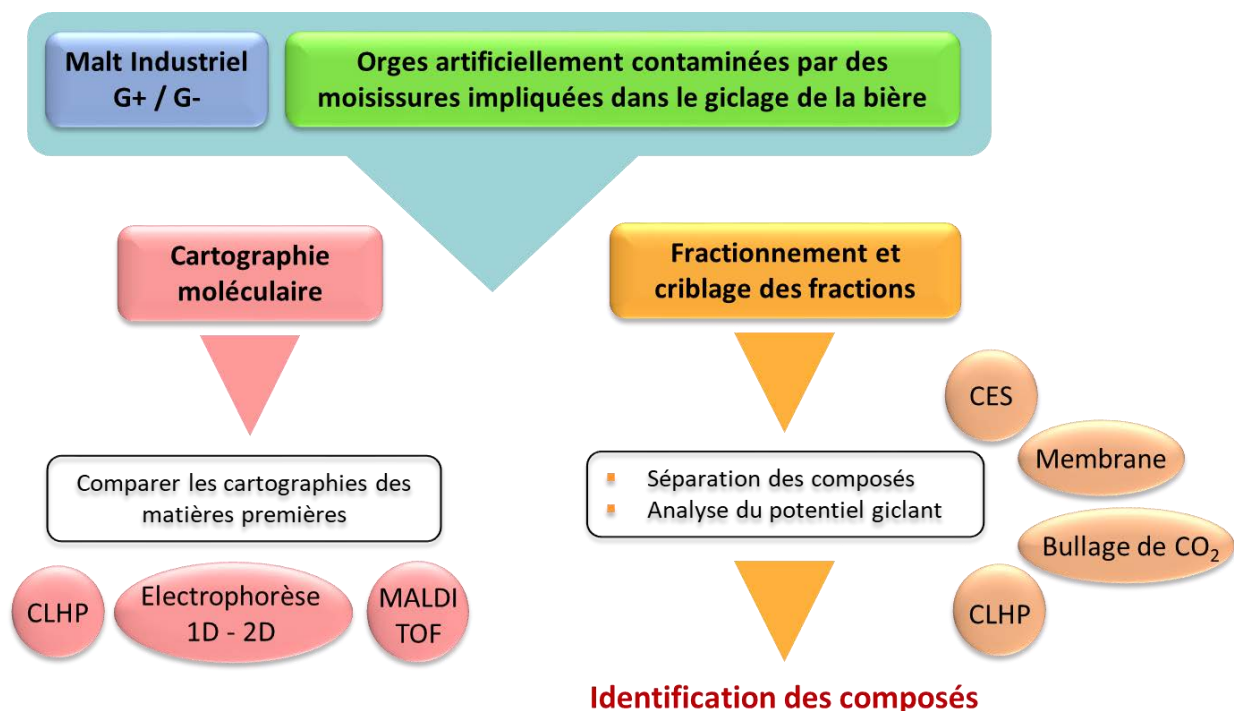


Figure 15. Stratégie de recherche développée sur le malt industriel et l'orge artificiellement contaminée.

Un travail de préparation de la matière première sera initié selon le test Carlberg modifié pour le malt et selon la littérature pour l'orge avec une extraction solide / liquide (Figure 15). Des essais sur différentes moisissures impliquées dans le giclage seront entrepris pour quantifier le giclage des extraits obtenus. Enfin nous mettrons en œuvre les différentes techniques de fractionnement utilisées pour la purification des hydrophobines (phase inverse, bullage de CO₂). Nous mettrons aussi en œuvre des techniques de séparation selon la taille pour aussi permettre de réduire la complexité de l'échantillon (exclusion stérique, membranes). Cela permettra d'obtenir des fractions qui pourront être caractérisées selon des techniques analytiques plus conventionnelles (chromatographie, électrophorèse, dosage colorimétrique).

Chapitre 2 : **Matériel et méthodes**

SOMMAIRE

1. Matériel.....	57
1.1. Réactifs pour analyse et dosage.....	57
1.2. Réactifs pour électrophorèses.....	57
1.3. Matrices pour spectrométrie.....	57
1.4. Standards.....	57
1.5. Matériel pour analyse et dosage.....	58
1.6. Electrophorèse.....	58
1.7. Chromatographie liquide haute performance.....	58
1.8. Chromatographie basse pression.....	58
1.9. Spectrométrie de masse.....	59
1.10. Séparation membranaire.....	59
2. Matière première.....	59
2.1. Malt.....	59
2.1.1. Origine.....	59
2.1.2. Préparation des extraits de malt.....	59
2.2. Orge artificiellement contaminée.....	59
2.2.1. Souches utilisées.....	59
2.2.2. Préparation des orges artificiellement contaminées.....	60
• Préparation de l'orge.....	60
• Préparation des souches.....	60
• Contamination de l'orge.....	60
2.2.3. Production d'extraits à partir d'orges artificiellement contaminées.....	60
3. Méthodes analytiques.....	61
3.1. Détermination du potentiel giclage.....	61
3.1.1. Préparation des extraits.....	61
3.1.2. Incubation des extraits.....	61
3.1.3. Détermination du giclage.....	62
3.2. Dosage et analyse des protéines.....	62
3.2.1. Quantification de l'azote par Kjeldhal.....	62
3.2.2. Analyse des protéines par chromatographie liquide de phase inverse.....	62
3.2.3. Analyse protéomique par gel d'électrophorèse.....	63
3.2.3.1. SDS-PAGE en tampon tris-tricine.....	63

3.2.3.2.	Gel d'électrophorèse bidimensionnelle.....	64
3.2.3.3.	Récupération et digestion des spots de protéines.....	66
3.2.3.4.	Dessalage des échantillons.....	67
3.2.4.	Spectrométrie de masse.....	67
3.2.4.1.	MALDI-TOF.....	67
3.2.4.2.	Peptide mass fingerprint (PMF).....	68
3.3.	Dosage des polyphénols totaux.....	68
3.4.	Dosage et analyse des glucides totaux.....	68
4.	Fractionnement de la matière première.....	69
4.1.	Séparation des protéines.....	69
4.1.1.	Purification des protéines par chromatographie d'exclusion stérique.....	69
4.1.2.	Purification des protéines par séparation membranaire.....	70
4.2.	Séparation de la fraction polyphénolique libre.....	71
4.3.	Séparation selon les propriétés de stabilisation de la mousse.....	71
4.3.1.	Analyse de la fraction giclante.....	71
4.3.2.	Fractionnement par formation de mousse au passage d'un fritté.....	72
4.3.3.	Fractionnement par bullage de CO ₂	72
4.4.	Séparation selon les propriétés hydrophobes.....	73
4.4.1.	Fractionnement par chromatographie de phase inverse.....	73
4.4.1.1.	Analyse des extraits par chromatographie en phase inverse.....	73
4.4.1.2.	Fractionnement avec une colonne semi-préparative.....	73
4.5.	Analyse par diffusion dynamique de la lumière.....	74
Annexes	75

1. Matériel

1.1. Réactifs pour analyse et dosage

Acide sulfurique 95 %	Fisher scientific	Illkirch-Graffenstaden
Acide acétique	Sigma Aldrich	Saint-Quentin Fallavier
Anthrone	Carlo Erba	Val de Reuil
Carboxymethylcellulose	Sigma Aldrich	Saint-Quentin Fallavier
EDTA	Sigma Aldrich	Saint-Quentin Fallavier
Citrate ferrique ammoniacal vert	Flucka	Villeurbanne
Ammoniaque	Sigma Aldrich	Saint-Quentin Fallavier
NaOH 32 %	VWR	Strasbourg
NaOH 1 N	VWR	Strasbourg
Acide borique	Sigma Aldrich	Saint-Quentin Fallavier
Bleu de bromothimol	Sigma Aldrich	Saint-Quentin Fallavier
Acide chlorhydrique 37 %	Carlo Erba	Val de Reuil
Dioxyde de titane	Applichem Panreac	Darmstadt
Acétonitrile	Fischer scientific	Illkirch-Graffenstaden
Acétone	Carlo Erba	Val de Reuil

1.2. Réactifs pour électrophorèses

Acrylamide/bis (30 % T, 2,6 % C)	Biorad	Marnes-la-coquette
Dodécylsulfate de sodium	Sigma Aldrich	Saint-Quentin Fallavier
Tris Base	Fischer Scientific	Illkirch-Graffenstaden
Glycerol	VWR	Strasbourg
Bleu de bromophénol	Biorad	Marnes-la-coquette
Glycine	Biorad	Marnes-la-coquette
β -mercaptoethanol	Biorad	Marnes-la-coquette
Dithiotréitol	Biorad	Marnes-la-coquette
Iodoacétamide	Biorad	Marnes-la-coquette
Urée	Biorad	Marnes-la-coquette
Ampholyte Bio-lyte 3/10	Biorad	Marnes-la-coquette
Huile minéral	Sigma Aldrich	Saint-Quentin Fallavier

1.3. Matrices pour spectrométrie

Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA)	Laser biolabs	Manchester
Acide sinapinique (SA)	Laser biolabs	Manchester
Acide dihydroxy benzoïque (DHB)	Laser biolabs	Manchester

1.4. Standards

D-glucose anhydre	Fisher scientific	Illkirch-Graffenstaden
Transferrine	Sigma Aldrich	Saint-Quentin Fallavier
Sérum d'Albumine Bovin	Sigma Aldrich	Saint-Quentin Fallavier
Precision plus protein standard	Biorad	Marnes-la-coquette

Polypeptides protein standard	Biorad	Marnes-la-coquette
-------------------------------	--------	--------------------

1.5. Matériel pour analyse et dosage

Balance	Sartorius	Aubagne
Centrifugeuse	Beckman Coulter Aventi	Nyon
Plaques chauffantes	Velp scientifica	Usmate Velate
Erlenmeyer en verre	Fisherbrand	Illkirch-Graffenstaden
Eprouvettes 250 mL	Fisherbrand	Illkirch-Graffenstaden
Papier filtre plissé	Fisherbrand	Illkirch-Graffenstaden
Encapsuleuse	La société du bouchon couronné	Viry-chatillon
Bain thermostaté VWB18	VWR	Strasbourg
Agitateur va-et-vient	Edmond Bulher	Hechingen
Eprouvette en verre	Fisherbrand	Illkirch-Graffenstaden
Spectrophotomètre	Varian	Buc
Fioles jaugées	Fisherbrand	Illkirch-Graffenstaden
Mineralisateur 2020 digestor	FOSS	Nanterre
Kjeltec 2460 et 8400	FOSS	Nanterre
Balance analytique	Sartorius	Aubagne
Concentrator plus	Eppendorf	Montesson
Innova 44 incubator plus	New Brunswick scientific	Edison

1.6. Electrophorèse

Protean IEF cell	Biorad	Marnes-la-coquette
BioRad Mini Protean tetracell	Biorad	Marnes-la-coquette
Powerpac basic	Biorad	Marnes-la-coquette
IPG-Strip 3-10	Biorad	Marnes-la-coquette
Zip tip C4	Milipore	Molsheim

1.7. Chromatographie liquide haute performance

Chaîne LC20 avec injecteur automatique, détecteur à barrettes de diodes et réfractomètre différentiel	Shimadzu	Noisiel
Logiciel d'acquisition et traitement LC solution	Shimadzu	Noisiel
Colonne C3 Zorbax stableBond 300 Å 250 x 2,1/21,2 mm, 5 µm	Chromoptic	Villejust
Collecteur de fraction FRC 10A	Shimadzu	Noisiel, France
Colonne C3 Vydac 214 TP 300 Å 250 x 2,1/21,2 mm, 5 µm	Grace	Columbia, Maryland

1.8. Chromatographie basse pression

Gel sephadex G25	GE Healthcare	Vélizy-Villacoublay
Gel phényl sepharose 6 FF	Ge Healtcare	Vélizy-Villacoublay

1.9. Spectrométrie de masse

MALDI-TOF Axima performance	Shimadzu analytical	Marne La Vallée
Plaques de dépôt	Kratos	Manchester

1.10. Séparation membranaire

Millipore Proscale	Merck Millipore	Molsheim
Cogent μ scale	Merck Millipore	Molsheim
Membrane 5 kDa 0,11 m ²	Merck Millipore	Molsheim
Membrane 5 kDa 88 cm ²	Merck Millipore	Molsheim
Membrane 30 kDa 0,11 m ²	Merck Millipore	Molsheim
Membrane 30 kDa 88 cm ²	Merck Millipore	Molsheim

2. Matière première

2.1. Malt

2.1.1. Origine

Les essais de cette thèse ont été réalisés à partir de deux malts industriels :

- un malt industriel provoquant un giclage avéré noté malt G+
- un malt industriel n'induisant pas de giclage noté malt G-

2.1.2. Préparation des extraits de malt

Les extraits de malt sont préparés selon le protocole Carlsberg modifié (Vaag *et al.* 1993).

Une masse de 100 g de malt est pesée et versée dans un mixeur auquel est ajoutée 400 mL d'eau distillée. Les grains sont ensuite broyés pendant 1 minute à vitesse maximum. Le broyat de grains est centrifugé pendant 10 minutes à 10.000 x g. La fraction liquide est ensuite portée à ébullition et concentrée jusqu'à obtenir 200 mL d'extrait. L'extrait est ensuite filtré sur papier filtre pour retirer la « cassure protéique » et le filtrat est récupéré. L'extrait ainsi obtenu est refroidi avant stockage ou quantification du giclage.

2.2. Orge artificiellement contaminée

2.2.1. Souches utilisées

Des souches de moisissures sauvages de *Microdochium nivale*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium graminearum* et *Alternaria sp.* ont été fournies par l'IFBM. Ces souches ont été isolées de malts industriels gushing positif et conservé dans de l'huile minérale stérile à 5 °C.

2.2.2. Préparation des orges artificiellement contaminées

- Préparation de l'orge

Une masse de 100 g d'orge CELLAR (utilisée en tant que contrôle par le CBMO : Comité Bière Malt Orge) est pesée dans une bouteille en verre d'un litre. Un volume de 100 mL d'eau distillée est ajouté dans la bouteille à l'aide d'une burette graduée puis le mélange est homogénéisé. La bouteille est ensuite stérilisée par autoclavage puis refroidie pour êtreensemencée.

- Préparation des souches

Les souches sont conservées sous forme de mycéliums dans des microtubes contenant de l'huile minérale stérile à 5 °C +/- 3 °C.

A l'aide d'une oëse, un implant du champignon est déposé sur un milieu gélosé à base de pomme de terre et de dextrose (PDA). Les boîtes sont placées à 22 °C pendant 7 jours pour que le champignon reprenne son développement. Lorsque le mycélium a envahi toute la surface de la boîte de Pétri, la souche est prête à être déposée sur l'orge.

- Contamination de l'orge

A l'aide d'un scalpel stérilisé à l'éthanol puis à la flamme, un implant du champignon (environ 1 cm sur 1 cm) est découpé puis placé sur l'orge de manière à recouvrir une grande partie de la surface des grains d'orge. Les boîtes sont incubées à l'étuve à 22 °C pendant 10 jours.

2.2.3. Production d'extraits à partir d'orges artificiellement contaminées

L'objectif ici est d'extraire les composés produits et/ou dégradés en surface des grains d'orges par les moisissures. Au lieu de broyer la matière première, une extraction en surface est réalisée sur les orges contaminées (exemple d'orge artificiellement contaminée en Figure 17 ce qui permet de réduire la complexité de l'échantillon.



Figure 17. Exemple d'orge artificiellement contaminée par *F. tricinctum*.

Les composés présents en surface des grains d'orge ont été extraits avec de l'eau ultrapure sous agitation à 150 rpm (Innova 44) à température ambiante. L'extrait est ensuite centrifugé à 8000 x g pour récupérer le surnageant.

Le potentiel giclage des souches est déterminé pour chaque extrait.

3. Méthodes analytiques

3.1. Détermination du potentiel giclage

3.1.1. Préparation des extraits

Pour le malt voir § 2.1.2. p. 59.

Pour l'orge artificiellement contaminée voir § 2.2.3. p. 60

3.1.2. Incubation des extraits

Trois bouteilles d'eau gazéifiées (Perrier®) ou de bière de 33 cL (Heineken®) (conservées à basse température entre 2 - 4 °C) sont utilisées par échantillon.

Un volume de 50 mL d'eau gazéifiée ou de bière est remplacé par 50 mL d'extrait de malt ou d'orge. Un moussage est provoqué pour chasser l'air du col en tapant légèrement sur les bouteilles avec le décapsuleur. Les bouteilles sont ensuite encapsulées dès que la mousse atteint le goulot. Les bouteilles sont ensuite pasteurisées à 60 °C pendant 25 mn puis refroidies à température ambiante pendant 15 mn et dans de l'eau froide pendant 15 mn. Les bouteilles refroidies sont ensuite incubées sur un agitateur va-et-vient à 60 rpm pendant 3 jours à température ambiante.

3.1.3. Détermination du giclage

A la fin de l'incubation, les bouteilles sont pesées puis laissées au repos pendant 10 mn. Elles sont ensuite retournées 3 fois en 10 secondes puis laissées au repos pendant 30 secondes. Elles sont enfin ouvertes de manière rapide et repesées si un giclage est observé. La différence entre les poids initial et final permet de déterminer le volume expulsé.

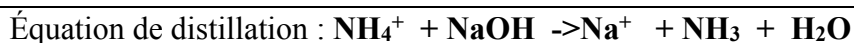
3.2. Dosage et analyse des protéines

3.2.1. Quantification de l'azote par Kjeldhal

La quantification des protéines est réalisée selon la méthode EBC 9.9.1.

La première étape consiste en la minéralisation des protéines en azote minéral. Introduire 5 mL de l'échantillon liquide dans un tube puis ajouter 20 mL d'H₂SO₄ concentré et le catalyseur (K₂SO₄ et Cu₂O₄). Le tube est minéralisé pendant 2 heures à 420 °C.

Après la minéralisation, l'échantillon est distillé avec de la soude concentrée à 40 % (p/v). Cette étape permet de transformer les ions ammonium en ammoniac.



En présence d'acide borique à 4 % (p/v), la quantité d'ammoniac est ensuite titrée par une solution d'acide sulfurique à 0,02 M. L'indicateur coloré de fin de dosage est le rouge de méthyle.

La quantité d'azote totale de chaque échantillon peut être calculée selon la formule suivante :

$$TN = \frac{[\text{H}_2\text{SO}_4] \times (V_{\text{essai}} - V_{\text{blanc}}) \times M_N}{V_{\text{échantillon}}}$$

Où V_{essai} et V_{blanc} sont les volumes équivalents d'acide sulfurique de l'échantillon et du blanc (mL) ; $[\text{H}_2\text{SO}_4]$ est la concentration en acide sulfurique ; M_N est la masse molaire de l'azote ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) et $V_{\text{échantillon}}$ est le volume d'échantillon (mL)

3.2.2. Analyse des protéines par chromatographie liquide de phase inverse

L'analyse des protéines est effectuée par chromatographie liquide haute performance sur une colonne de phase inverse C4. La chaîne CLHP comprend deux pompes délivrant un gradient de concentration en acétonitrile de 0-100 % et un passeur automatique (volume d'injection de 1 à 100 μL). La phase mobile est constituée d'eau, d'acétonitrile (ACN) et d'acide

trifluoroacétique (TFA). 50 µL d'échantillon à analyser sont injectés dans la colonne. Les analyses sont réalisées à 35 °C et à un débit de 0,2 mL / mn. L'élution est réalisée avec deux gradients (solvant A et B, Tableau 1) avec une durée de 65 mn. Le profil appliqué est le même que présenté dans le tableau 1. La détection est effectuée à l'aide d'une barrette de diodes réglée sur 280 et 325 nm.

Tableau 2. Solvants et gradient utilisés lors de l'élution en chromatographie de phase inverse.

Solvant	Eau (%)	Acétonitrile (%)	Acide trifluoroacétique (%)
A	100	0	0,1
B	0	100	0,1

Etape	Temps (mn)	% A	% B
1	0	100	0
2	65	0	100
3	70	0	100
Rééquilibrage	15	100	0

3.2.3. Analyse protéomique par gel d'électrophorèse

3.2.3.1. SDS-PAGE en tampon tris-tricine

Le poids moléculaire des protéines présentes dans les échantillons est déterminé par électrophorèse SDS-PAGE en conditions réductrices. Le but de l'électrophorèse est de séparer des protéines chargées à travers un gel d'acrylamide soumis à un champ électrique. Le SDS est un détergent anionique qui, en présence d'un agent dénaturant comme le β-mercaptoéthanol (dénaturation par rupture des ponts disulfure), va conférer une charge globale négative à toutes les protéines. La distance de migration sera donc fonction uniquement du poids moléculaire de la protéine.

Le gel d'électrophorèse qui permet la séparation est un gel de polyacrylamide à 15 %. Le gel de migration est constitué d'un mélange de 5 mL d'acrylamide/bisacrylamide (30 : 0,8 %), 3,3 mL de tampon tricine 3X, 800 µL de glycérol, 900 µL d'eau osmosée, 50 µL d'APS 10 % (p/v) et 14 µL de NNN'N' – tétraméthyléthylènediamine (TEMED). Un gel de concentration à 4 % est ensuite coulé par-dessus pour permettre aux échantillons de se positionner sur une même ligne avant d'être discriminé dans le gel de séparation. Pour ce gel, 0,8 mL

d'acrylamide/bisacrylamide (30 : 0,8 %), 2 mL de tampon tricine (Annexes 1.2. p 75), 3,2 mL d'eau, 30 μ L d'APS 10 % (p/v) et 8 μ L de TEMED sont mélangés.

Les échantillons sont préparés dans un tampon de dépôt contenant du bleu colloïdal (Annexes 1.1. p. 75). Ce dernier est un colorant ionisé qui permet de suivre l'avancement de l'électrophorèse. Avant la migration, les échantillons sont chauffés pendant 5 mn à 95 °C et 10 μ L sont alors déposés dans les puits du gel. Des standards d'électrophorèse sont utilisés pour déterminer le poids moléculaire des protéines séparées.

La migration est réalisée à une intensité de 10 mA pour le gel de concentration et à 20 mA pour le gel de migration avec un système BioRad Mini Protean Tetracell. Le tampon cathode est versé dans la cuve à gel (Annexes 1.4. p 75) et le tampon anode dans la cuve principale (Annexes 1.3. p. 75).

Après migration, le gel est fixé et coloré au bleu colloïdal (Annexes 1.5. p. 75) puis décoloré dans la solution 1 de décoloration pendant 30 mn puis placé dans la solution 2 jusqu'à visualisation des protéines (Annexes 1.6. p.72). Le gel peut ensuite être conservé dans une solution d'acide acétique à 5 %.

3.2.3.2. Gel d'électrophorèse bidimensionnelle

- Préparation des échantillons

Les protéines sont préalablement quantifiées par Kjeldhal pour déposer 1 mg de protéines par IPG-strip.

Les protéines sont précipitées avec de l'acide trichloroacétique (40 %) v/v dans la glace pendant 30 mn puis centrifugées à 13.000 x g pendant 20 mn à 4 °C. Après centrifugation, l'acide est retiré à la pipette et le culot est repris dans 300 μ L d'acétone, « vortexé » puis centrifugé à 13.000 x g pendant 20 mn à 4 °C. Cette étape de lavage est répétée au minimum deux fois pour éliminer les sels et les autres composés interférents encore présents dans l'échantillon. L'acétone est ensuite retiré et le culot est séché au Speedvac[®] pendant 10 mn.

Le culot est repris dans 500 μ L de tampon de lyse (Annexe 1.7. p. 76) contenant du DTT (5 mg.mL⁻¹ ajoutés extemporanément dans le tampon de lyse). La solubilisation se fait pendant 2h sans agitation à température ambiante. Après réhydratation, 2,5 μ L d'ampholyte sont ajoutés et 150 μ L d'échantillon sont déposés en 3 fois dans la plaque de réhydratation des strips (concentration finale de 300 μ g de protéines). L'IPG-strip, retiré de sa protection plastique, est déposé délicatement au niveau de l'échantillon sans appuyer pour éviter la formation de bulles.

Elle est ensuite recouverte d'huile minérale pour éviter l'évaporation et la cristallisation de l'urée. La réhydratation se fait pendant 8 à 10 h.

- Migration selon la première dimension

Après une nuit de réhydratation, l'IPG-strip est récupéré, débarassé de l'huile à immersion et déposé dans le bac d'isoélectrofocalisation. Des filtres en papiers imbibés d'eau ultrapure sont déposés au niveau des électrodes pour éviter la déshydratation des strips. Les bandelettes sont enfin recouvertes d'huile minérale pour éviter l'évaporation et le système est mis sous tension. Les protéines migrent dans le gel avec une tension appliquée finale de 20.000 v.h⁻¹ jusqu'à une valeur de pH correspondant à leur point isoélectrique (pI) où l'équilibre des charges est atteint. A la fin de la migration, les IPG-strips peuvent être stockés à - 20 °C dans des falcons (plastique contre plastique) en attendant la deuxième dimension.

Rampe de montée en voltage : Rapide ΔV
Longueur du gel : 7 cm (dépend du strip)
Température de focalisation : 20°C
S1 : 250 V 00:15
S2 : 4000 V 02:00
S3 : 4000 V 20 000 Vhours
S4 : 500 V (si migration la nuit, permet d'éviter la diffusion des spots)

- Equilibration des strips

L'étape d'équilibration permet de saturer les IPG-strips en SDS (étape nécessaire à la 2^{ème} dimension). Cette étape d'équilibration est réalisée au dernier moment, après que le gel de séparation soit coulé.

Après migration, les IPG-strips sont retirés du support d'hydratation à l'aide de pinces puis égouttés sur du papier absorbant afin d'éliminer l'huile.

Chaque IPG-strip est délicatement placé dans un tube type falcon et mis en contact avec une première solution d'équilibration contenant du DTT (Annexes 1.8. p. 77) sous faible agitation (5 rpm) pendant 10 mn. Les tubes sont par la suite vidés et les IPG-strips sont mis en contact d'une 2^{ème} solution d'équilibration contenant de l'Iodoacétamide (Annexes 1.8. p. 77) sous faible agitation pendant 10 mn.

Après équilibration, les IPG-Strips sont égouttés puis utilisés immédiatement pour séparer les protéines selon leur poids moléculaire.

- Migration selon la deuxième dimension

Le gel est réalisé selon le protocole § 3.2.3.1 p 63 mais seul le gel de séparation est réalisé. L'IPG-strip est déposé contre le gel de séparation et un espaceur est placé pour pouvoir déposer un standard de marqueur de taille. Un gel d'agarose (Annexes 1.9. p. 77) est coulé pour recouvrir le strip. Après solidification, les gels sont installés dans les cassettes et la migration est réalisée à une intensité de 50 mA avec le système BioRad Mini Protean Tetracell. Le tampon cathode (Annexes 1.4. p. 75) est versé dans la cuve à gel et le tampon anode dans la cuve principale (Annexes 1.3. p. 75).

Après migration, le gel est fixé et coloré comme pour la SDS-PAGE (§ 3.2.3.1.p. 64).

3.2.3.3. Récupération et digestion des spots de protéines

- Lavage des spots

Les spots d'intérêt sont excisés en minimisant la quantité de gel avec un scalpel nettoyé à l'éthanol. Les gels sont ensuite déposés dans un Eppendorf® et redécoupés avec le scalpel pour favoriser la pénétration de la trypsine dans les mailles du gel.

Les spots découpés sont lavés à deux reprises avec 5 Vol d'une solution de lavage (50 % ACN / 50 % eau) pendant 15 mn sous agitation à température ambiante. Cette étape permet d'éliminer le bleu de coomassie et le SDS qui inhibe l'activité de la trypsine. Un lavage à l'ACN 100 % pendant 10 mn est ensuite réalisé, puis le surnageant est éliminé. Un tampon de bicarbonate d'ammonium 100 mM pH 8 (79 mg de NH_4HCO_3 dans 10 mL d'eau) est préparé.

Les gels sont ensuite recouverts d'une solution à 10 mM de DTT (15 mg dans 10 mL de tampon NH_4HCO_3) et incubés à 56 °C pendant 45 mn à 56 °C. Cette étape permet de réduire les ponts disulfures. Après incubation, le surnageant est remplacé par une solution d'iodoacétamide (1 mg d'iodoacétamide dans 100 μL de tampon NH_4HCO_3 100 mM) qui est incubé à température ambiante dans le noir. Une nouvelle étape de lavage à l'ACN 50 % puis 100 % est réalisée pour éliminer le DTT et l'iodoacétamide résiduel.

- Digestion trypsique

Le gel est réhydraté dans le tampon de digestion NH_4HCO_3 100 mM (pH 8) contenant de la trypsine à 8 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de sorte que les morceaux de gels soient recouverts. L'Eppendorf® est incubé dans de la glace pendant 45 min, afin de laisser la trypsine diffuser au travers du gel.

Ensuite, le tampon de digestion est remplacé par un tampon NH_4HCO_3 sans trypsine et l'Eppendorf® est incubé à 37 °C pendant la nuit. Après digestion, les échantillons sont centrifugés à 10.000 x g pendant 20 mn et le surnageant est collecté pour être dessalé.

3.2.3.4. Dessalage des échantillons

Des pointes Zip-tip millipore (C18) sont utilisées pour dessaler et concentrer les échantillons.

- Equilibration

Un volume de 10 µL de solution de réhydratation (100 % ACN) est aspiré puis refoulé. Cette étape est répétée deux fois. Un volume de 10 µL de solution d'équilibration (0,1 % TFA) est aspiré puis refoulé.

- Adhésion (bind) et lavage

Les protéines et peptides sont accrochés sur la résine par une succession d'aspirations et de refoulements (3-7 fois) dans l'échantillon à dessaler. Un volume de 10 µL de solution de lavage (0,1 % TFA dans de l'eau) est ensuite aspiré pour refoulé dans la poubelle. Cette étape est répétée une fois.

- Elution des peptides / protéines

Un volume de 1 à 4 µL de solution d'élution (50 % d'ACN et 0,1 % TFA) est déposé dans un Eppendorf® de 0,5 mL. La solution d'élution est aspirée puis refoulée au moins trois fois avec la Zip-Tip tout en évitant d'aspirer de l'air.

3.2.4. Spectrométrie de masse

3.2.4.1. MALDI-TOF

La spectrométrie de masse par MALDI –TOF est une technique qui permet l'analyse directe de composés inclus dans une matrice. Ces composés vont être désorbés et ionisés grâce à un laser puis entraînés vers l'analyseur.

- Dépôt sur plaque

La matrice CHCA (acide α -cyano-hydroxy cinnamique) est utilisée pour l'analyse des échantillons d'extrait de moisissures et l'acide sinapinique est employé pour les extraits de malt (Annexe 2.2. p. 78).

Le dépôt est réalisé selon la méthode sandwich (Dong *et al.* 2009). Un volume de 0,5 µL de matrice est déposé sur la plaque puis 0,5 µL de l'échantillon et enfin 0,5 µL de matrice.

3.2.4.2. Peptide mass fingerprint (PMF)

L'analyse par PMF a été réalisée par le laboratoire Alphalyse (Danemark). Un blanc d'autoprotéolyse de la trypsine est réalisé pour se focaliser sur les peptides de la protéine analysée. L'identification des protéines est effectuée par une recherche de profil peptidique dans des banques de séquences en utilisant le moteur de recherche MASCOT (Matrix science, Londres, Grande - Bretagne). La masse expérimentale des protéines est déterminée en comparant les masses obtenues avec la base de données de NCBI. La carbamidométhylation est prise en compte comme une modification fixe des cystéines. L'identification est réalisée avec une tolérance peptidique de 60 ppm et une tolérance de masse de 0,7 Da.

3.3. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode EBC 9.11.

A l'aide d'une pipette, introduire 10 mL d'échantillon et 8 mL de réactif CMC/EDTA (Annexes 3.1. p. 79) dans une fiole jaugée de 25 mL. Ajouter 0,5 mL de réactif ferrique (Annexes 3.2. p. 79) puis 0,5 mL d'ammoniaque 25 % (13,38 mol). Le volume est complété à 25 mL avec de l'eau. L'absorbance est mesurée à 600 nm après 10 mn. Un blanc est réalisé sans le réactif ferrique.

Le résultat est calculé selon la formule suivante :

$$P = A * 820 * F$$

où P est la teneur en polyphénol (mg/L) ; A est l'absorbance à 600 nm et F est le facteur de dilution (2).

3.4. Dosage et analyse des glucides totaux

La teneur en glucides totaux est quantifiée selon la méthode EBC 9.26.

L'échantillon est préalablement dilué au 250^{ème} (2 mL dans 500 mL). Un volume de 3 mL d'échantillon (d'eau distillé pour le blanc ou de glucose pour le standard) est introduit dans un tube à essai. Le tube est ensuite refroidi entre 2 et 4 °C. Le réactif à l'antrone (Annexes 3.3. p. 79) est lui aussi refroidi. 10 mL de ce réactif est ajouté dans le tube tout en mélangeant vigoureusement. Le tube est placé immédiatement dans un bain à 95 +/- 0,5 °C et le laisser

pendant 20 mn. Après traitement, le tube est rapidement refroidi à 20 °C et l'absorbance est mesurée à 625 nm.

Formule :

$$TC = \frac{A_e}{A_{glc}} * \frac{4}{1000} * D$$

où TC est la concentration en glucides totaux (% m/v); A_e est l'absorbance de l'échantillon; A_{glc} est l'absorbance du glucose et D est la dilution de l'échantillon.

4. Fractionnement de la matière première

4.1. Séparation des protéines

4.1.1. Purification des protéines par chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique permet la séparation des molécules selon leur différence de taille. Cette séparation s'effectue au travers d'un gel constitué de particules sphériques poreuses inertes. Cette technique permet de séparer les petits composés comme les sels d'un groupe de molécules plus grandes comme les protéines. Ce procédé est appliqué pour purifier les protéines des extraits de malt après une étape de précipitation au sulfate d'ammonium.

- Précipitation au sulfate d'ammonium

L'extrait de malt (200 mL) est produit selon le protocole Carlsberg modifié (§ 2.1.2. p. 59). Du sulfate d'ammonium à une saturation de 70 % (m/V) (94,28 g) est ajouté à l'extrait pour faire précipiter les protéines. La solution est agitée pendant 30 min à température ambiante avec un barreau aimanté. L'échantillon est ensuite centrifugé à 9.000 x g pendant 30 mn à température ambiante. Le culot est finalement repris dans du tris-HCL pH 9 (Annexe 2.1. p. 78) avec un facteur de concentration de 2.

- Dessalage en chromatographie d'exclusion stérique

Le culot solubilisé est injecté (86,89 mL) et élué avec de l'eau osmosée sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique (868 mL) contenant un gel Sephadex G-25. L'éluion des composés est effectuée à un débit de 40 mL/mn⁻¹ avec un système de chromatographie basse pression AKTA[®]. La détection des protéines est réalisée à l'aide d'un détecteur UV à 280 nm pour les protéines/polyphénols et 325 nm pour les polyphénols.

Les fractions (40 mL) contenant les protéines sont rassemblées et le potentiel giclage de cette fraction protéique est déterminé. Un bilan de matière ainsi qu'une analyse par CLHP et SDS-PAGE sont réalisés.

4.1.2. Purification des protéines par séparation membranaire

La filtration membranaire est une opération qui consiste à séparer des composés à travers une membrane selon leur taux de rétention (capacité de la membrane à retenir ces composés). Cette technique de séparation a comme avantage de préserver les propriétés fonctionnelles des composés séparés. Deux types de séparation existent : le continu et le discontinu (aussi appelé diafiltration). La diafiltration (Figure 18) est une mise en œuvre qui s'apparente à une extraction. Cela consiste à remplacer, dans le rétentat, le perméat qui s'écoule à travers la membrane par une solution définie par l'opérateur. Nous choisissons de séparer l'extrait par diafiltration car elle permet d'éliminer jusqu'à plus de 99 % les composés inférieurs au seuil de coupure de la membrane. La diafiltration consiste à remplacer par alimentation, dans notre échantillon (le rétentat), le perméat qui s'écoule au travers de la membrane. Cette alimentation est ici faite en eau.

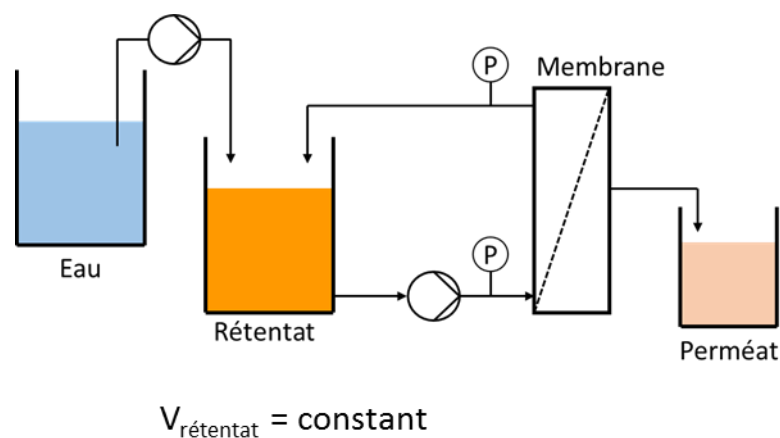


Figure 18. Schéma du principe de la diafiltration.

L'extrait de malt G⁺ et G⁻ est produit selon le protocole Carlsberg modifié (§ 2.1.2. p. 59) et l'extrait de surface d'orge est obtenu selon le protocole établi (§ 2.2.3. p. 60).

Les différents extraits sont diafiltrés grâce à un système de filtration Millipore Proscale. La diafiltration est effectuée à l'aide d'une membrane de 5 kDa et d'une membrane de 30 kDa jusqu'à atteindre 8 dia-volumes. Les perméats sont ensuite concentrés à un facteur volumique de 8 (FCV8). Un bilan de matière est réalisé en début et fin de la diafiltration (dosage des

glucides, protéines, polyphénols et mesure de la matière sèche) et le giclage est quantifié sur les rétentats et perméats.

Un témoin de recirculation est réalisé sur l'extrait giclage positif et le giclage est déterminé tous les 2 dia-volumes. Cela permet d'évaluer l'impact du procédé sur le giclage.

4.2. Séparation de la fraction polyphénolique libre

Un extrait de malt G+ et un G- sont préparés selon le protocole Carlsberg modifié (§ 2.1.2. p. 59). La polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) est préalablement réhydratée dans de l'extrait de malt pour atteindre des concentrations finales de traitement à 50 et 200 g/hL (convention brassicole). L'ensemble des étapes est illustré dans la Figure 19. Les extraits sont mis en contact avec la PVPP réhydratée concentré à 50 (2) et 200 g/hL (3) sous agitation par barreau magnétique pendant 30 mn. Les échantillons sont ensuite filtrés sur un disque de diamètre de pores 0,45 µm pour éliminer la PVPP.

Un dosage des polyphénols totaux est effectué avant et après traitement. Le potentiel giclage est mesuré sur l'ensemble des échantillons. Un témoin de filtration sans traitement à la PVPP (4) est aussi analysé en giclage.

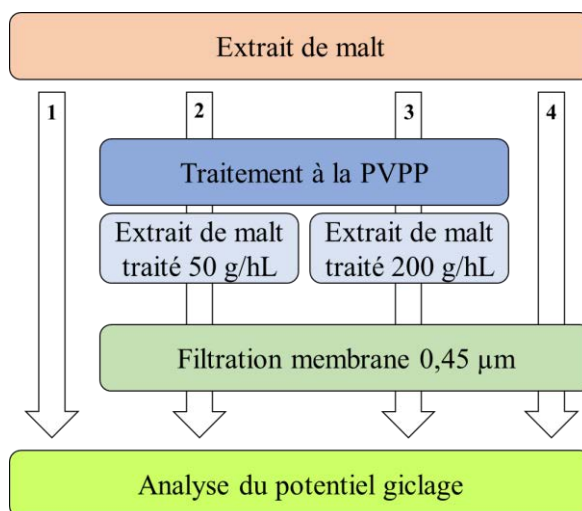


Figure 19. Schéma des expériences servant à éliminer les polyphénols libres.

4.3. Séparation selon les propriétés de stabilisation de la mousse

4.3.1. Analyse de la fraction giclante

Préparation de l'extrait de malt selon le protocole Carlsberg modifié (§ 2.1.2. p. 59). L'extrait est incubé dans du Perrier et les bouteilles sont décapsulées après 3 jours d'agitation. Du sulfate

d'ammonium à une saturation de 70 % (94,28 g) est ajouté à la fraction giclée pour faire précipiter les protéines. La solution est agitée pendant 30 mn à température ambiante avec un barreau aimanté. L'échantillon est ensuite centrifugé à 9.000 x g pendant 30 mn à température ambiante. Le culot est finalement repris dans de l'eau (volume initial) et analysé en SDS-PAGE et CLHP de phase inverse.

4.3.2. Fractionnement par formation de mousse au passage d'un fritté

L'extrait de malt (100 mL) G+ et G- est produit selon le protocole décrit en § 2.1.2. p. 59. Le système de formation de mousse consiste en une fiole d'Erlenmeyer surmonté par un système de filtration avec un fritté. Le montage est relié à une pompe à vide. L'extrait de malt G+ et G- est passé au travers du fritté. La mousse produite (75 mL) est solubilisée dans 1 mL de tris-HCl pH 9 puis centrifugée à 9.000 x g pendant 15 mn. L'échantillon est ensuite analysé par CLHP.

4.3.3. Fractionnement par bullage de CO₂

Les extraits de malt sont préparés selon les protocoles décrits en § 2.1.2. p. 59. Le liquide (150 mL) est introduit dans la colonne et du CO₂ gazeux est injecté au travers d'un filtre de 15-40 µm à un débit de 3 L/mn⁻¹ (Figure 20). La mousse produite est recueillie dans un collecteur et un bilan de matière est réalisé (matière sèche, protéines, glucides, polyphénols). Une analyse par SDS-PAGE, CLHP et MALDI-TOF est aussi réalisée.



Figure 20. Système de fractionnement par bullage de CO₂.

4.4. Séparation selon les propriétés hydrophobes

4.4.1. Fractionnement par chromatographie de phase inverse

4.4.1.1. Analyse des extraits par chromatographie en phase inverse

Les extraits de malt sont produits selon le protocole Carlsberg modifié (§ 2.1.2. p. 59) et les extraits de surface sont produits selon le protocole § 2.2.3. p. 60.

L'analyse s'effectue par chromatographie liquide haute performance sur colonne de phase inverse (C4 4,6 x 250 mm, 300 Å). La phase mobile est constituée d'eau, d'ACN et de TFA. Un volume de 100 µL d'échantillon est injecté dans la colonne. Les analyses sont réalisées à 35 °C et à un débit de 0,2 mL / mn. L'élution est réalisée avec deux gradients sur une durée de 65 min. La détection est effectuée à l'aide d'une barrette de diodes focalisée sur 280 et 325 nm.

- Vérification de la séparation des protéines

Les échantillons sont collectés lors de l'élution et un total de 12 fractions est recueilli.

Le fractionnement des protéines est vérifié par analyse en SDS-PAGE. 100 µL d'un extrait non concentré sont injectés à 6 reprises dans la colonne. Les 12 fractions collectées sont complètement évaporées au Speedvac® pendant 6 h puis reprises dans le tampon d'échantillon SDS-PAGE. Les fractions sont ensuite analysées sur des gels d'acrylamide 15 % et colorées au bleu de Coomassie (G 250).

4.4.1.2. Fractionnement avec une colonne semi-préparative

Seul l'extrait de surface d'orge artificiellement contaminée a été fractionné en conditions semi-préparatives. Une étape de concentration est nécessaire et les glucides présents en plus grande quantité dans l'extrait de malt ne permettent pas de réaliser la concentration des échantillons. L'analyse a été réalisée sur une colonne C3 semi-préparative (Zorbax 21,2 x 250 mm, 300 Å).

Une validation sur une colonne C3 analytique (Zorbax 4,6 x 250 mm, 300 Å) a d'abord été effectuée pour valider la séparation de l'extrait de surface d'orges artificiellement contaminées. Un dimensionnement a été ensuite fait pour déterminer les nouvelles conditions opératoires à mettre en place afin d'être dans les mêmes conditions de débit et d'injection d'échantillon. Pour cela il faut garder la même vitesse d'élution et le même rapport entre le volume injecté et le volume de la colonne.

$$\text{Vitesse d'élution} = \text{débit d'élution/surface de la colonne} = \frac{0,2.4}{0,46^2.\pi} = 1,2034 \text{ cm/mn.}$$

Ce qui nous fait avec la colonne de 21,2 mm, à un débit d'élution de :

$$\frac{1,2034 \cdot 2,12^2 \cdot \pi}{4} = 4,24 \text{ mL/mn.}$$

$$\text{Rapport } V_{\text{inj}}/V_{\text{colonne}} = \frac{0,14}{0,46^2 \cdot \pi \cdot 25} = 0,024$$

Le volume d'échantillon à injecter par série est donc de : $= \frac{0,46^2 \cdot \pi \cdot 25}{4} = 2,12 \text{ mL.}$

Un échantillon concentré 25X est injecté dans la colonne et toutes les fractions (22) sont analysées en SDS-PAGE et en potentiel giclage.

- Mesure du potentiel giclage des fractions obtenues

150 mL d'extrait de surface sont nécessaires pour réaliser l'analyse de giclage. Les fractions obtenues après 3 fractionnements sont concentrées pour éliminer l'ACN puis le volume est complété à 150 mL pour pouvoir les incuber dans les bouteilles.

4.5. Analyse par diffusion dynamique de la lumière

Chaque échantillon est transféré dans une cellule de mesure et l'analyse particulière est déterminée par DLS avec un Zetasizer Nano (Malvern Instrument, Grande-Bretagne). Trois mesures consécutives (1 mn) ont été effectuées pour chaque échantillon. Un indice de réfraction de 1,48 (l'indice de réfraction de la silice) a été utilisé. Il s'agit d'un indice communément utilisé pour l'analyse des protéines. Cette valeur peut varier entre 1,35 et 1,6 (Vörös 2004). La taille est calculée par le logiciel Malvern (Malvern instruments SA, Grande-Bretagne) en utilisant l'équation de Stoke-Einstein. Les résultats sont analysés comme décrit par Deckers (2013).

Annexes**Annexes 1. Solutions et tampons d'électrophorèse****1.1. Tampon de solubilisation SDS-PAGE – 10 mL (conditions réductrices)**

	Concentration finale	Quantité
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	0,1 M	2 mL
SDS	10 % (p/v)	1 g
Glycérol	50 % (v/v)	5 mL
β -mercaptoéthanol	2 % (v/v)	0,2 mL
Bleu de Coomassie colloïdal (G250)	0,2 % (p/v)	400 μ L d'une solution à 5 %
Eau déminéralisé	Qsp 10 mL	

1.2. Tampon Tricine 3 X – 150 mL

	Concentration finale	Quantité
Tris base (Trizmabase) (M= 121 g/mol)	3M	54.45 g
SDS	0.3%	450 mg
HCl	Ajuster à pH 8.4	
	Qsp 150 mL	

1.3. Tampon Anode 10 X – 250 mL

	Concentration finale	Quantité
Tris base (Trizmabase) (M= 121 g.mol ⁻¹)	1 M	30,25 g
HCl	225 mM	56,2 mL de HCl 1M
	pH = 8,9	
Eau déminéralisé	Qsp 250 mL	

1.4. Tampon Cathode 10 X – 250 mL

	Concentration finale	Quantité
Tris base (Trizmabase) (M= 121 g.mol ⁻¹)	1 M	30,25 g
Tricine (M = 179.2 g.mol ⁻¹)	1 M	44.8 g

SDS	1 % (p/v)	2,5 g
Eau déminéralisé		Qsp 250 mL

Mesurer le pH (idéalement 8.25) mais ne pas l'ajuster

1.5. Solution de coloration – 250 mL

	Concentration finale	Quantité
Ethanol	50 % (v/v)	30,25 g
Acide acétique	10 % (v/v)	44,8 g
Bleu de Coomassie colloïdal (G250)	1% (p/v)	2,5 g
Eau déminéralisé		Qsp 250 mL

1.6. Solution de décoloration – 250 mL

Solution 1	Concentration finale	Quantité
Ethanol	40 % (v/v)	500 mL
Acide acétique	10 % (v/v)	100 mL
Eau déminéralisé		Qsp 1 L
Solution 2		
Acide acétique 96 %	5 %	50 mL
Eau déminéralisé		Qsp 1 L

1.7. Tampon de lyse / réhydratation (2D)

	Concentration finale	Quantité
Urée		5,8 g
Eau		6 mL
CHAPS		0,5 g
Pointe de cône de bleu de bromopéhnol		
DTT (extemporanément)	5 mg / mL	

1.8. Solution d'équilibration DTT ou iodoacétamide

	Concentration finale	Quantité
Tris-HCl pH 8,8	50 mM	10 mL
Urée	6 M	72,07 g
Glycérol	30 % (v/v)	69 mL
SDS	2 % (p/v)	4 g
Bleu de bromophénol	0,002 % (w/v)	400 µL d'une solution à 1%
Eau déminéralisé		Qsp 200 mL

Ajouter extemporanément 100 mg DTT/ 10 mL et 250 mg d'iodoacétamide / 10 mL

1.9. Gel d'agarose

	Concentration finale	Quantité
Agarose	1 %	30,25 g
Tampon d'électrophorèse 1X		Qsp 30 mL

1.10. Tampon d'électrophorèse 1X

	Concentration finale	Quantité
Tris-base	25 mM	30,3 g
Glycine	192 mM	144 g
SDS	0,1 % (p/v)	10 g
Eau déminéralisé		Qsp 1 L

1.11. Tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 – 60 mL

	Concentration finale	Quantité
Tris base (M= 121 g.mol ⁻¹)	0,5 M	6 g
HCl 6 M	Ajuster à pH 6,8	
Eau déminéralisé	Qsp 60 mL	

Annexes 2. Solutions et tampons divers

2.1. Tampon Tris-HCl pH9 – 150 mL

	Concentration finale	Quantité
Tris base (M= 121 g.mol ⁻¹)	0,1 M	54,45 g
HCl 6 M		Ajuster à pH 9
Eau déminéralisé		Qsp 200 mL

Ajouter 1 % de SDS soit 1,5 g dans 150 mL pour la solution d'extraction des souches

2.2. Matrice CHCA

	Concentration finale	Quantité
Acide α -cyano-hydroxy cinnamique	0,05 % (p/v)	5 mg
Acétonitrile	33 %	330 μ L
Ethanol	33 %	330 μ L
Acide formique	0,3 %	0,3 μ L
Eau déminéralisé		Qsp 1 mL

2.3. Matrice SA

	Concentration finale	Quantité
Acide sinapinique	0,40 % (p/v)	40 mg
Acétonitrile	60 %	330 μ L
Méthanol	35 %	330 μ L
Acide formique	0,3 %	0,3 μ L
Eau déminéralisé		Qsp 1 mL

Annexes 3. Solutions pour dosages

3.1. Solution de CMC /EDTA – 500 mL

	Concentration finale	Quantité
Carboxyméthylcellulose	1 % (p/v)	5 g
EDTA	0,2 %	2 g
Eau		Qsp 500 mL

3.2. Réactif ferrique – 100 mL

	Concentration finale	Quantité
Citrate ferrique ammoniacal vert (16 % fer)	3,5 % (p/v)	3,5 g
Eau		Qsp 100 mL

3.3. Réactif à l'anthrone

	Concentration finale	Quantité
Acide sulfurique	72,25 % (v/v)	850 mL d'une solution à 85 %
Anthrone	0,1 %	1 g
Eau		Qsp 1 L

Chapitre 3 :

Fractionnement d'extraits de malt industriel

SOMMAIRE

1. Introduction	82
2. Analyse de la fraction protéique d'extraits de malt	83
2.1. Analyse des protéines selon leurs propriétés hydrophobes	83
2.2. Analyse de la fraction giclante d'un extrait de malt	87
2.3. Fractionnement par formation de mousse au travers d'un fritté.....	90
2.4. Fractionnement par bullage de CO ₂	91
3. Rôle des protéines dans le phénomène du giclage	94
3.1. Purification de la fraction protéique par chromatographie d'exclusion stérique.....	94
3.2. Purification des protéines par fractionnement membranaire	103
4. Influence de la fraction polyphénolique libre sur le giclage	111
5. Conclusion.....	115

1. Introduction

Le malt est une matière première complexe produite à partir d'orge qui a subi les différentes étapes du maltage (trempage, germination et touraillage). Il est constitué essentiellement de glucides (78-83 % dont 63-65 % d'amidon), de protéines (9-12 %) et enfin de lipides, de polyphénols et de minéraux. Pour analyser ces composés, un extrait de malt aqueux a été produit selon la méthode Carlsberg modifiée (Vaag *et al.* 1993). Un extrait de malt est un broyat de malt en milieu aqueux qui a été porté à ébullition. Cette méthodologie permet de produire facilement une solution qui aura ou non des propriétés giclantes selon le malt utilisé. Pour étudier l'influence des composés sur le giclage, nous nous sommes intéressés à deux classes de composés, les protéines et les polyphénols libres. D'après la littérature, les protéines ont été suspectées comme étant impliquées dans le phénomène de giclage. Certaines études mettent en avant le haut pouvoir giclant de protéines fongiques ; il s'agit notamment des hydrophobines ou encore des protéines de stress produites par l'orge comme les protéines de transfert de lipides (les LTP's). Ces dernières peuvent acquérir, lors des différentes étapes du brassage, des propriétés moussantes (Jégou *et al.* 2000). Les polyphénols, de par leur capacité à se lier aux protéines (Aron et Shellhammer 2010), peuvent également jouer un rôle dans le phénomène du giclage (Müller *et al.* 2010), et peuvent aussi être responsables de troubles dans la bière plus ou moins réversibles.

Afin d'étudier le rôle de ces molécules, nous nous sommes intéressés, dans cette partie, au fractionnement d'extraits de malt avec pour objectif de réduire la complexité de la matière première pour faciliter son analyse et d'isoler une ou plusieurs fractions pour ensuite mesurer leur activité giclante. Pour ce faire, différentes approches peuvent être utilisées, il va s'agir de séparer les différents constituants et étudier leur influence sur le giclage. Concernant la fraction protéique, on retrouve dans la littérature des techniques de séparation selon la taille des molécules (par exclusion stérique ou par voie membranaire) qui permettent de séparer et de purifier les protéines tout en préservant leurs propriétés. Nous nous sommes proposé d'étudier la possibilité de purifier les protéines de l'extrait de malt selon ces techniques. Puis nous étudierons l'influence de la fraction phénolique sur le giclage. En brasserie, la diminution de la teneur en polyphénols se fait par l'ajout d'additif de synthèse comme la polyvinylpyrrolidone (PVPP). Nous traiterons un extrait de malt giclage positif avec cet additif puis nous « quantifierons » le giclage. Enfin les protéines seront séparées selon leurs propriétés de stabilisation de la mousse ou selon leur caractère hydrophobe. Tous ces

fractionnements doivent permettre d'atteindre un premier objectif de décomplexation la matière contenue dans un malt industriel et de déterminer les fractions ou types de molécules giclantes.

2. Analyse de la fraction protéique d'extraits de malt

La formation de mousse est une propriété essentielle de la bière car c'est la première chose que les consommateurs perçoivent. Ce sont essentiellement les protéines et notamment les composés de haut poids moléculaires qui participent à la production et à la stabilisation de la mousse, (Bamforth 1985). Dans un extrait de malt, les albumines et les hordéines vont grandement participer à la formation et à la stabilisation de la mousse (Kapp et Bamforth 2002). L'objectif de cette partie est de voir si l'on peut fractionner les échantillons et extraire des composés d'intérêt (dont des protéines) ayant des propriétés moussantes et/ou des propriétés de stabilisation de la mousse. Nous allons donc fractionner les échantillons pour extraire les protéines de l'extrait de malt selon leurs propriétés hydrophobes et leurs propriétés de formation et de stabilisation de la mousse.

2.1. Analyse des protéines selon leurs propriétés hydrophobes

La fraction protéique du malt est très complexe et la multiplicité des bandes en SDS-PAGE ne permet pas d'identifier les protéines présentes. Pour obtenir un aperçu plus précis des protéines présentes dans un extrait de malt, elles seront d'abord isolées par précipitation au sulfate d'ammonium puis séparées selon leur caractère hydrophobe par chromatographie d'interactions hydrophobes.

Précipitation de la fraction protéique de l'extrait de malt par du sulfate d'ammonium

Une première étape de précipitation des protéines a été réalisée avec du sulfate d'ammonium. Un extrait de malt giclage positif a été produit. L'échantillon a été ensuite saturé avec 70 % de sulfate d'ammonium puis homogénéisé pendant 30 mn. L'extrait a été centrifugé à 9.000 x g pendant 30 mn puis les culots ont été remis en suspension dans de l'eau distillée. Un trouble a été observé dans le culot resuspendu qui n'est pas éliminé après centrifugation. Ce trouble peut être dû :

- au pH qui n'est pas adapté à la solubilisation du culot protéique,
- à la force ionique trop faible,
- à la concentration en protéines trop importante,
- à des interactions protéines / polyphénols.

Nous avons donc étudié l'influence du pH sur la solubilisation du culot après précipitation au sulfate d'ammonium dans une gamme de pH de 3 à 10 en le reprenant dans le volume initial. Nous avons utilisé un tampon carbonate 0,1 M (pH 9-10), un tampon phosphate 0,1 M (pH 6-

8) et un tampon acétate 0,1 M (pH 3-5) et nous avons ensuite observé la solubilisation du culot (Figure 21).

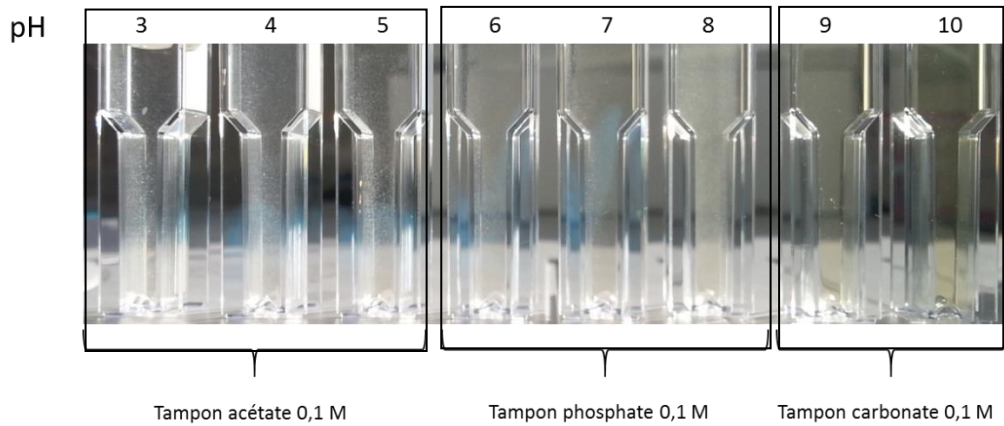


Figure 21. Solubilisation du culot protéique après précipitation au sulfate d'ammonium dans un tampon acétate 0,1 M (pH 3-5), phosphate 0,1 M (6-8) et carbonate 0,1 M (9-10).

Les premiers résultats visuels montrent que le tampon carbonate 0,1 M à pH 9 et à 10 permet de bien solubiliser les protéines précipitées au préalable par le sulfate d'ammonium. En plus du tampon carbonate, nous avons employé un autre tampon utilisé dans la littérature, un tampon tris-HCl pH 9 0,1 M, permettant l'extraction et la solubilisation des hydrophobines (Askolin *et al.* 2001). Nous avons repris les culots protéiques dans les deux tampons en concentrant la fraction protéique 1 fois, 2 fois et jusqu'à 4 fois la concentration initiale de l'extrait de malt (respectivement 1X, 2X et 4X dans la figure 22).

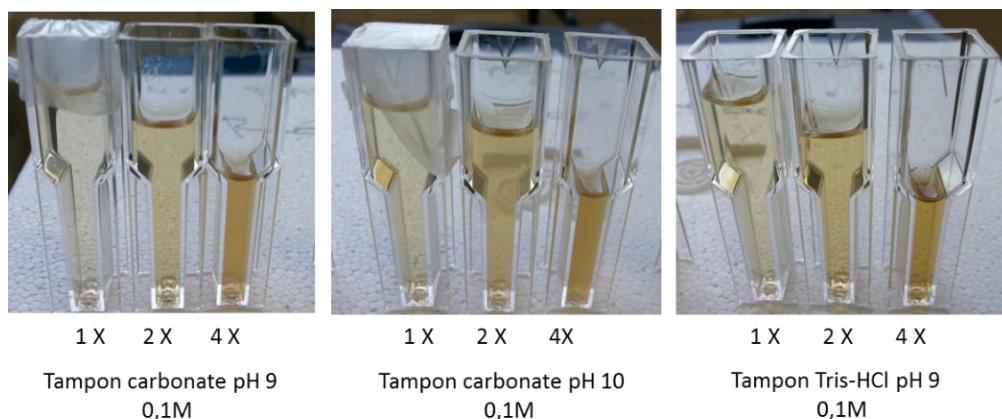


Figure 22. Solubilisation des culots protéiques concentrés d'un facteur 1,2 et 4 avec du tampon carbonate pH 9 et 10 ainsi qu'un tampon tris-HCl pH 9.

Nous pouvons voir que le tris-HCl pH 9 permet de bien solubiliser le culot protéique. Comme on peut le voir dans la Figure 22, la fraction protéique est très colorée probablement à cause des polyphénols associés aux protéines et aux polyphénols libres encore présents après précipitation au sulfate d'ammonium.

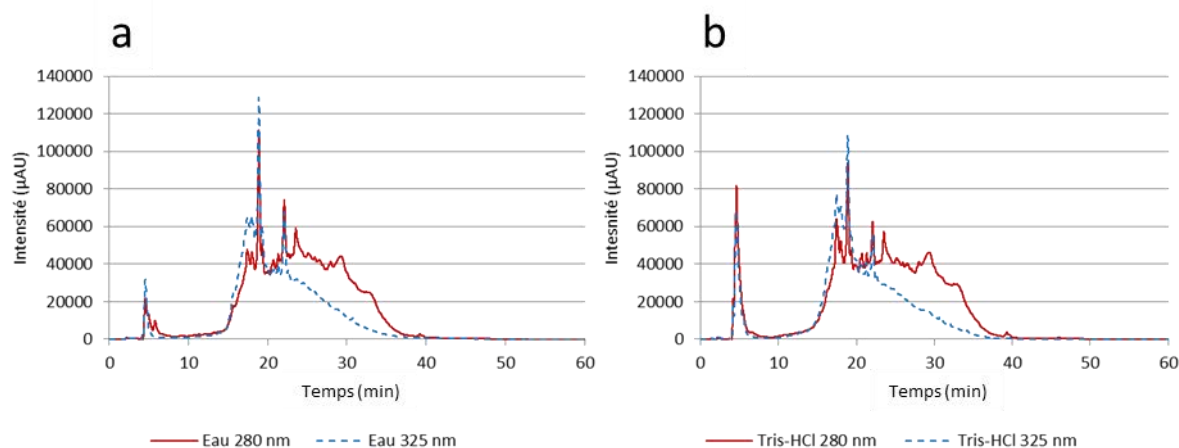


Figure 23. Comparaison de la solubilisation du culot protéique avec de l'eau distillée (a) et du tris-HCl pH 9 (b) par chromatographie de phase inverse (C4). L'analyse est effectuée sur une colonne C4 et l'élution est réalisée avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 100 % en 60 mn.

Une analyse par chromatographie en phase inverse a été réalisée sur colonne C4 pour comparer la solubilisation du culot avec de l'eau distillée et du tris-HCl pH 9 (Figure 23). L'élution a été réalisée avec un gradient constant d'acétonitrile de 0 à 100 %. A 280 nm, nous observons une absorbance qui est supérieure à celle à 325 nm de 20 mn jusqu'à 40 mn.

L'analyse à 325 nm semble montrer que les polyphénols sont plus présents dans l'extrait de malt repris dans le tris-HCl comme observé dans le volume mort (5 mn). Un léger trouble a été observé dans la fraction protéique reprise dans de l'eau ce qui nous permet de conclure que le tris-HCl pH 9 est le tampon le mieux adapté pour remettre en suspension le maximum d'éléments du culot protéique. Ce tampon est souvent utilisé pour la solubilisation de protéines très hydrophobes, comme les hydrophobines, qui semblent générer du giclage dans la bière.

Fractionnement des protéines par chromatographie en phase inverse

Pour étudier plus en détail la séparation des protéines lors de l'élution, un fractionnement a été réalisé par chromatographie en phase inverse qui permet de séparer selon les propriétés hydrophobes des molécules.

Un extrait de malt giclage positif a été produit et les protéines ont été précipitées avec une saturation de 70 % de sulfate d'ammonium pendant 30 mn. Le culot a été repris dans du tris-HCl pH 9 à un facteur de concentration de 4. Les protéines ont ensuite été fractionnées par chromatographie en phase inverse C4. Les fractions ont été collectées (12 fractions) à partir de 10 mn jusqu'à 40 mn d'élution soit toutes les 2,5 mn. Seules les fractions avec un signal en SDS-PAGE sont montrées.

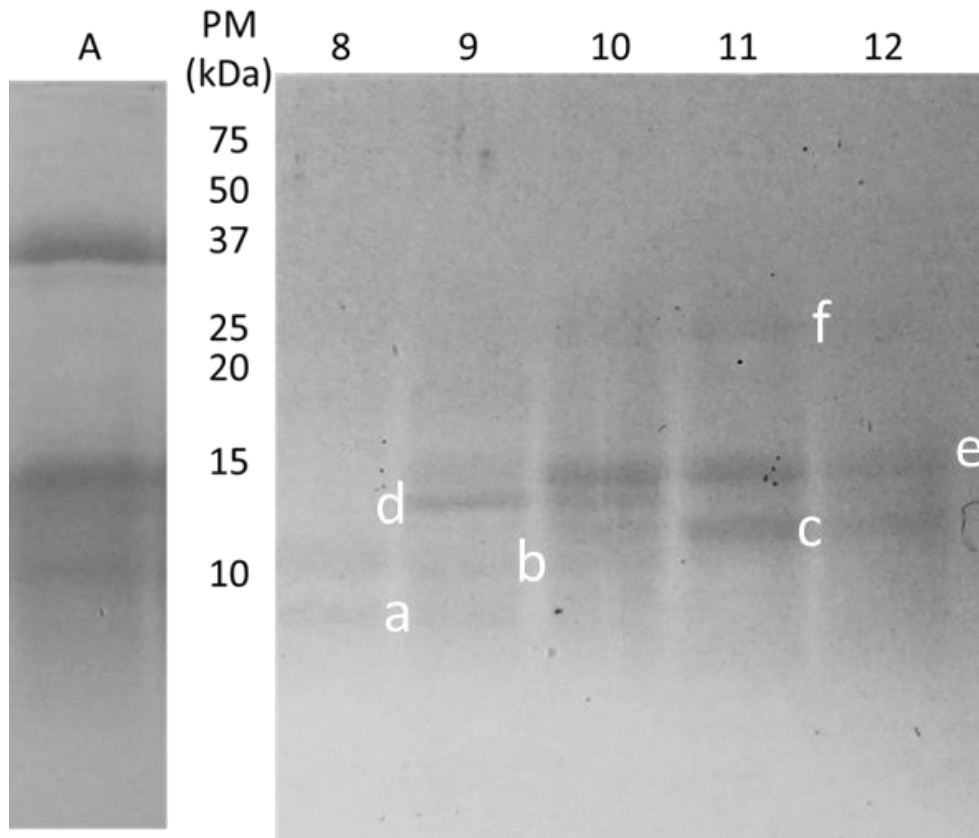


Figure 24. Analyse de la taille des protéines précipitées par le sulfate d'ammonium et concentrées d'un facteur 4 de l'extrait de malt G⁺ (A) et des fractions issues de la chromatographie en phase inverse (8, 9, 10, 11, 12). La séparation est faite par SDS-PAGE sur un gel à 15 % d'acrylamide en conditions réductrices et révélées par une coloration au bleu de Coomassie G250.

En comparant les fractions et le profil avant fractionnement, nous observons une bonne séparation des protéines avec des masses bien définies (Figure 24). Nous notons que les protéines sont situées dans les fractions 8 à 12. Les protéines séparées ont des masses comprises entre 8,3 et 27 kDa. Nous distinguons des protéines à 8,3 (a), 10,3 (b) et 11,9 kDa (c) correspondant à des LTP's, des protéines de stress produites par l'orge. Ensuite des protéines à 13 (d) et 15 kDa (e) correspondent à des précurseurs de thionines (α et β -thionines) excrétés par l'orge en défense lors de la propagation des moisissures à sa surface. Enfin la bande

protéique à 25 kDa (f) peut correspondre à la famille des hordéines (glycoprotéines de la famille des prolamines présentes dans l'orge et le malt). Par contre, la bande protéique intense à 37 kDa n'apparaît pas dans les profils. Cette bande est peut-être retenue par la colonne ou une dissociation a lieu lors de l'élution ce qui pourrait expliquer sa disparition. Ces résultats montrent que la fraction protéique est éluée entre 20 et 40 mn ce qui correspond à une concentration d'ACN comprise entre 40 et 60 %.

Conclusion

Une analyse du giclage des fractions éluées est difficilement envisageable à grande échelle car cela oblige à une étape de concentration pour envisager de fractionner l'échantillon. Une concentration est nécessaire mais les sels encore présents dans l'échantillon risquent d'inhiber le giclage. Une étape de purification par chromatographie d'exclusion stérique va être entreprise pour analyser plus spécifiquement la fraction protéique (partie 3.1).

2.2. Analyse de la fraction giclante d'un extrait de malt

Les extraits de malt naturellement contaminés permettent d'obtenir un important giclage (80 g). Nous avons voulu savoir si la fraction expulsée lors du décapsulage de la bouteille était différente de la fraction encore présente dans la bouteille après ouverture. L'objectif de cette étude a été de visualiser une/des différence(s) de profil entre la fraction expulsée et la fraction restant dans la bouteille. Ceci a conduit à vérifier si les fractions giclantes sont enrichies en composés pouvant présenter des capacités giclantes.

Un extrait de malt G+ (giclage positif) a été incubé dans du Perrier® pour éviter les interférences dues aux protéines de la bière. Les bouteilles ont été mises en agitation pendant 3 jours à 60 rpm à température ambiante. Les bouteilles ont ensuite été ouvertes selon la méthode Carlsberg et la fraction giclante a été collectée. Un même volume a été prélevé dans la bouteille ouverte et un témoin d'extrait G+ mélangé avec du Perrier® a été également réalisé (sans les 3 jours d'agitation). Toutes les fractions ont été ensuite saturées avec 70 % de sulfate d'ammonium puis le culot protéique a été récupéré après une centrifugation à 9.000 x g pendant 30 mn. Le culot a été repris dans le volume initial avec du tris-HCl pH 9. Les échantillons ont été analysés par chromatographie de phase inverse (C4) et par SDS-PAGE.

Résultats

Le témoin (extrait de malt incubé dans du Perrier® sans agitation), la fraction giclée (fraction expulsée à l'ouverture de la bouteille) et la fraction Perrier® (fraction restant dans la bouteille après expulsion du liquide) sont analysés par chromatographie (Figure 25) et par SDS-PAGE (Figure 26).

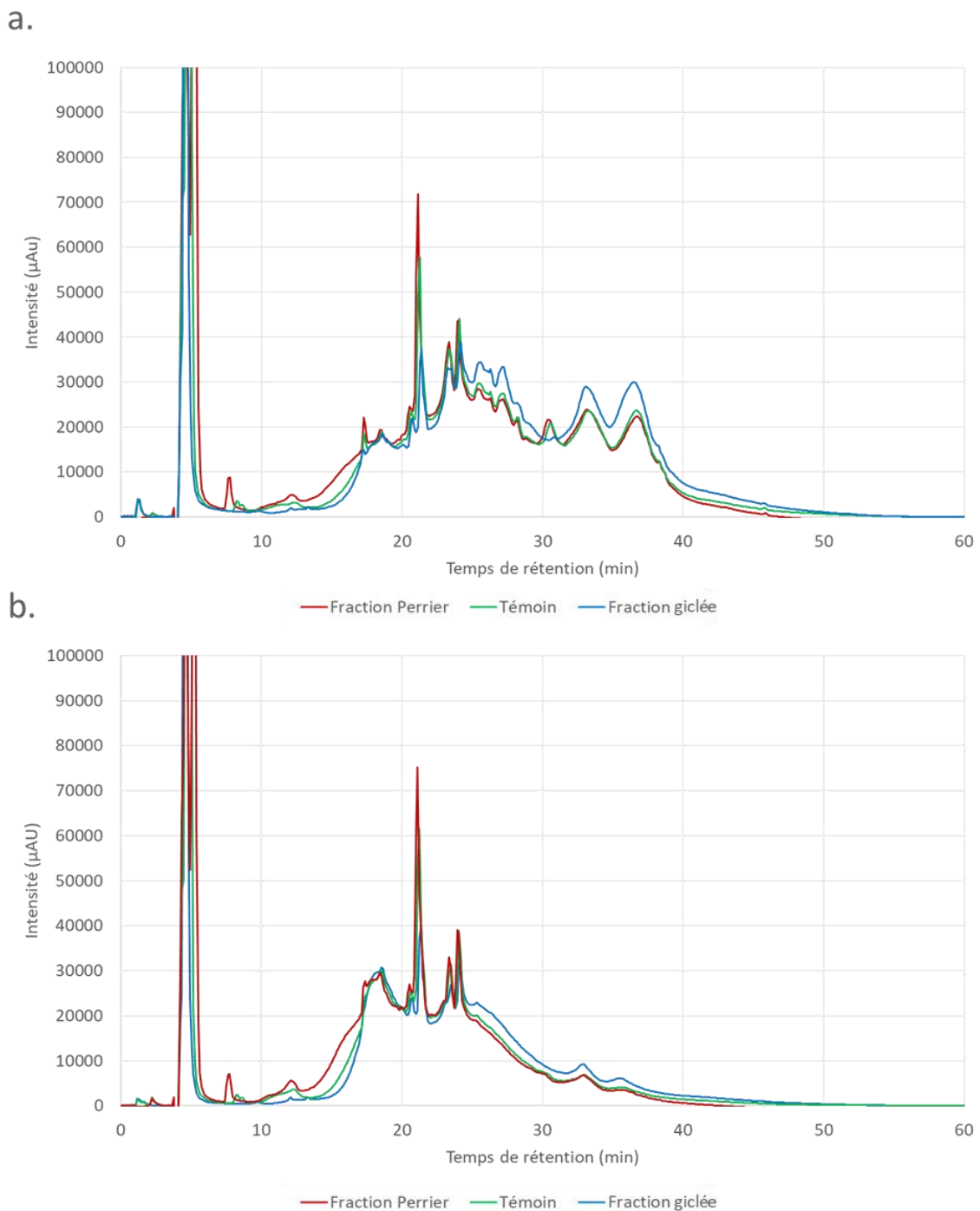


Figure 25. Analyse par chromatographie de phase inverse (C4) avec un gradient d'ACN de 0-100 % d'un témoin (extrait de malt dans du Perrier®); de la fraction giclée après ouverture d'une bouteille de Perrier® et la fraction Perrier restant dans la bouteille. L'analyse a été mesurée à 280 (a) et 325 nm (b).

Un pic à 31 mn (Figure 25a.) semble être présent dans le témoin et la fraction restant dans la bouteille de Perrier®. L'analyse par SDS-PAGE (figure 26) montre la présence de protéines à 10, 15 et 37 kDa mais ne montre pas de modifications du profil protéique entre la fraction giclée et la fraction restante dans la bouteille. Il ne semble pas y avoir d'enrichissement de la fraction protéique.

Le profil d'absorbance à 325 nm montre un enrichissement pour la fraction giclée. Les profils sont similaires entre la fraction non expulsée et le témoin.

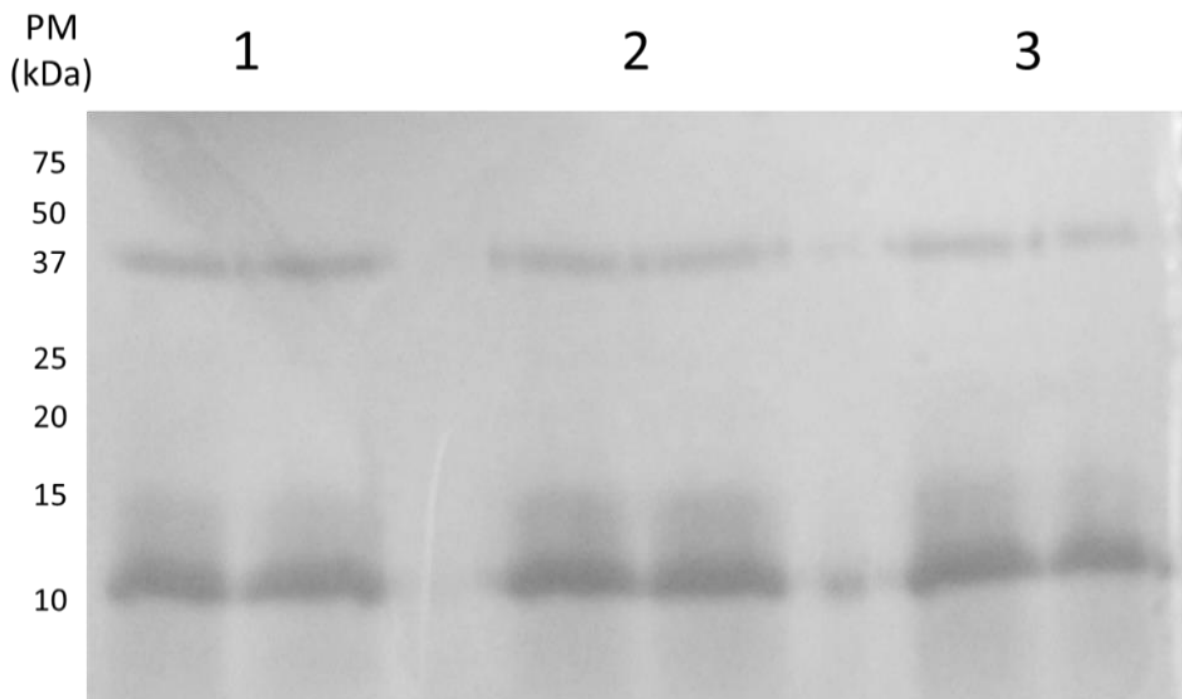


Figure 26. Analyse par SDS-PAGE du témoin (1), de la fraction giclée (2) et de la fraction Perrier® (3). Les protéines sont séparées par un gel à 15 % d'acrylamide en condition réductrice et visualisées par une coloration au bleu de Coomassie G250. Les fractions ont été dupliquées.

Conclusion

La comparaison entre les différentes fractions ne permet pas de visualiser de nouvelles informations sur des composés ayant des propriétés moussantes. En effet, il n'y a pas de différence entre les fractions expulsées lors du décapsulage et la fraction restante dans la bouteille. L'entraînement de la phase liquide est trop important pour permettre de concentrer les composés giclants et pour visualiser une différence. Il semble nécessaire de mettre en place un système de production et de récupération de mousse pour augmenter l'extraction des composés stabilisant la mousse.

2.3. Fractionnement par formation de mousse au travers d'un fritté

Il a été montré, dans la littérature (Shokribousjein *et al.* 2011), que certains composés de la bière ont des propriétés de stabilisation de la mousse. L'objectif est de produire de la mousse et d'analyser les composés récupérés. Les protéines d'intérêt présentent des capacités/propriétés de stabilisation de la mousse. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes penchés sur la production de mousse pour concentrer les composés d'intérêt. Ces molécules ont des propriétés de stabilisation des interfaces gaz / liquide, on va donc les rechercher dans des mousses artificiellement obtenues par bullage.

Production de mousse

Un volume de 100 mL d'extrait giclage positif ou négatif (G+ ou G-) a été passé au travers d'un fritté et le liquide a été rapidement retiré pour ne récupérer que la mousse (70 mL). La mousse a été centrifugée avec 1 mL de tris-HCl 0,1 M (pH 9) à 9000 xg pendant 30 mn. La suspension a été ensuite analysée par chromatographie en phase inverse (C4) (figure 27).

Résultats

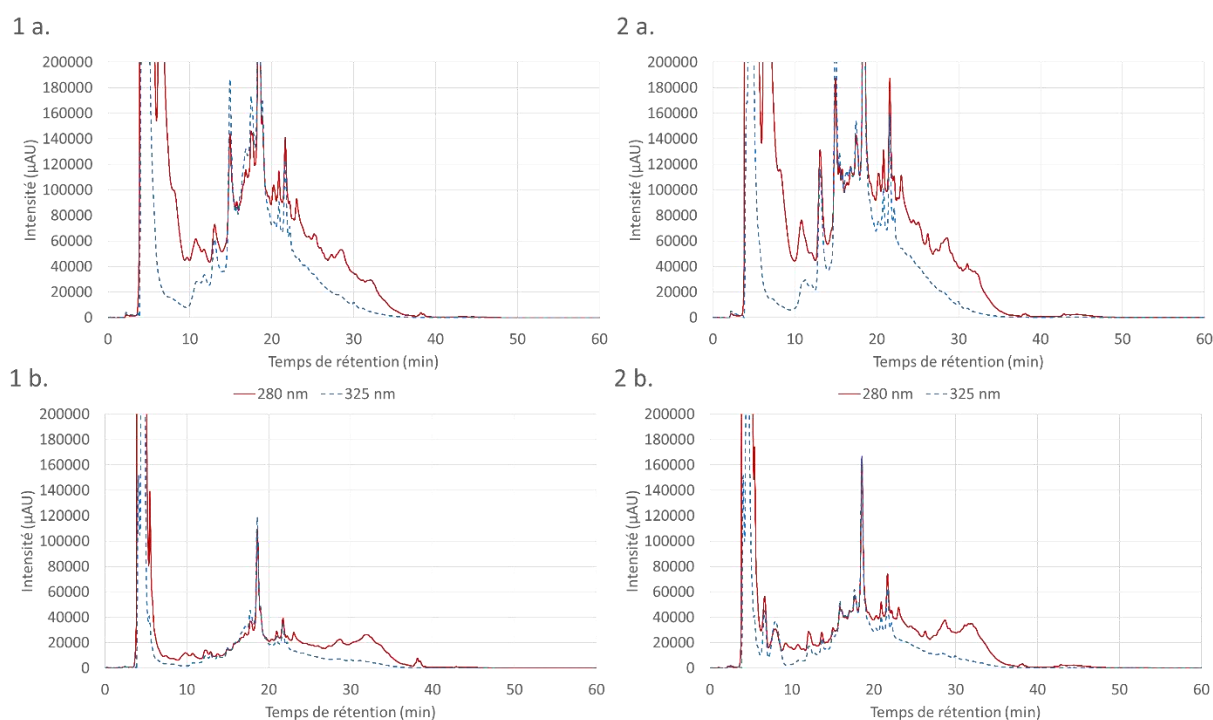


Figure 27. Analyse par chromatographie de phase inverse (C4) avec un gradient d'ACN de 0-100 % en 60 mn des extraits G+ (1 a.), de la mousse G+ (1 b.), des extraits G- (2 a.) et de la mousse (2 b.).

A 280 nm, nous observons un enrichissement entre 30 et 40 mn dans la mousse (1b et 2b) par rapport à la fraction polyphénolique (325 nm) mais nous n'observons pas de différences entre les échantillons G+ et G-. Il semble aussi y avoir un enrichissement d'un composé à 38 et à 43 mn. Néanmoins, ces éléments se retrouvent tous les deux dans les extraits et ne semblent pas avoir d'impact sur le giclage.

Conclusion

Le fractionnement par formation de mousse ne permet pas, dans nos conditions, d'identifier clairement des composés susceptibles d'être impliqués dans le phénomène de giclage.

2.4. Fractionnement par bullage de CO₂

Le fractionnement par bullage de CO₂ est une méthode de séparation par adsorption pour enrichir en composés actifs dilués et dissous dans l'eau (Maruyama *et al.* 2006). L'origine de cette idée vient du phénomène de giclage car les hydrophobines ont une affinité très forte avec le CO₂ (Deckers *et al.* 2011; Shokribousjein *et al.* 2011). Ce phénomène a conduit les chercheurs à considérer que le CO₂ pourrait être un gaz plus efficace et plus spécifique pour le fractionnement des tensioactifs que l'air, particulièrement ceux présentant des caractères hydrophobes telles les hydrophobines. Puisque le CO₂ est moins polaire que l'air, les hydrophobines seraient attirées par les bulles de CO₂ plus efficacement que par les bulles d'air.

Le système de fractionnement est composé d'une colonne en verre. Pour buller efficacement, le CO₂ est injecté au travers d'un fritté. La mousse est ensuite collectée en sortie de colonne. Le débit, le rapport hauteur de liquide sur la taille de colonne et la taille des pores du fritté ont été optimisés pour améliorer le système de fractionnement de mousse.

Ces techniques ont été étudiées dans de nombreux domaines comme l'ingénierie chimique / biochimique, la chimie analytique ou le traitement des eaux usées. Cette méthodologie est basée sur les propriétés amphiphiles naturelles de certaines protéines qui leur permettent d'être adsorbées aux interfaces gaz / liquide. Ces molécules forment un film élastique autour des bulles en augmentant la stabilité de la mousse (Linke *et al.* 2005).

Au vu de la possibilité d'extraction, nous allons dans cette partie voir si nous pouvons extraire de façon préférentielle des composés avec de grandes capacités moussantes et pouvant participer au giclage.

Résultats

Dans le but d'extraire des composés ayant une grande affinité avec le CO₂, un système de fractionnement de mousse a été utilisé. Des extraits de malt giclage positif et négatif ont été fractionnés avec la colonne de bullage de CO₂. Une analyse par chromatographie liquide en phase inverse a été mise en œuvre pour comparer les profils protéiques entre les fractions brutes et les fractions enrichies. L'absorbance a été mesurée à 280 et 325 nm (Figure 28).

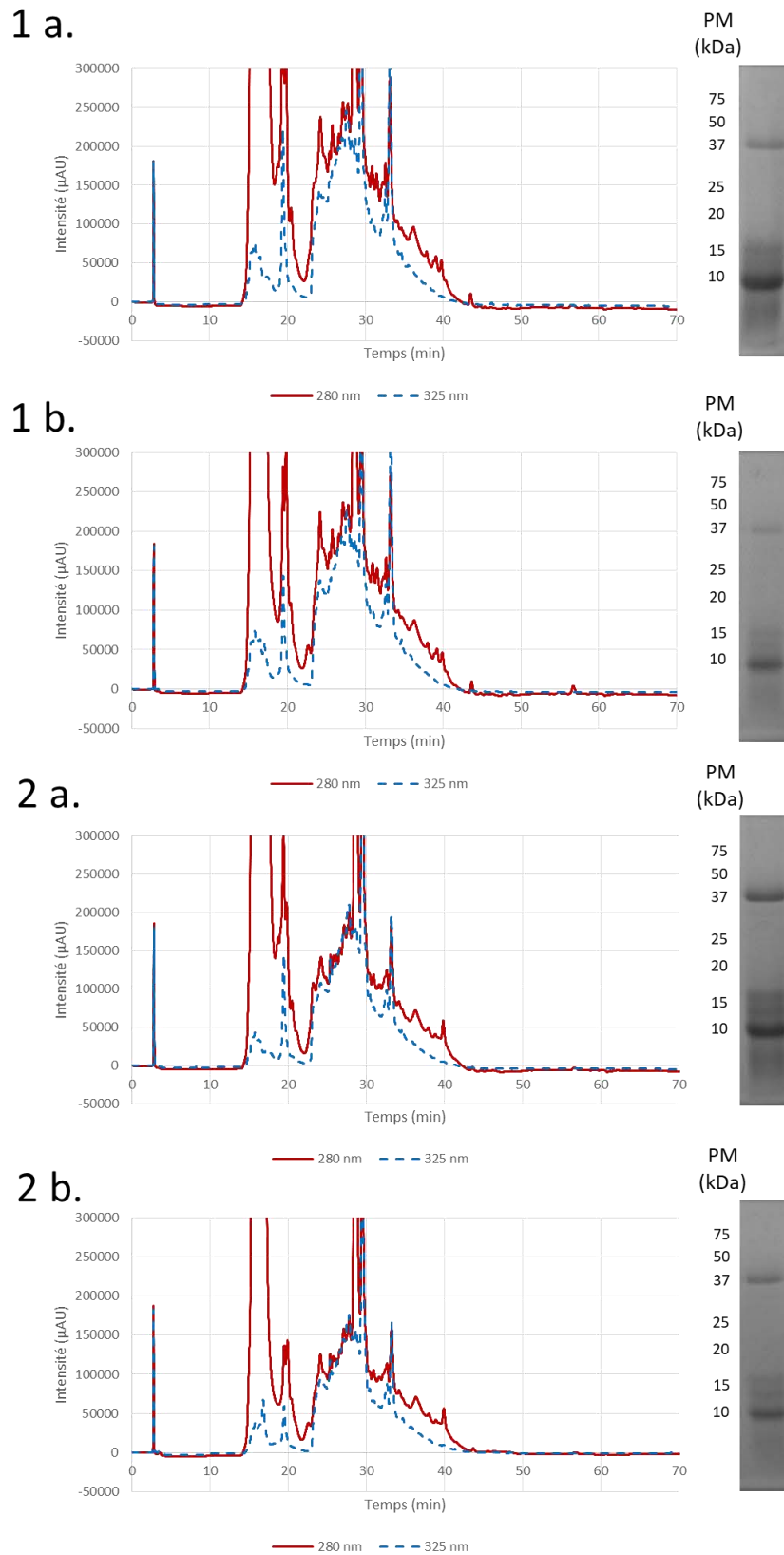


Figure 28. Analyse par chromatographie de phase inverse (C4) avec un gradient d'ACN de 0-100 % et par SDS-PAGE en conditions réductrices des extraits G⁺ (1 a.), de l'extrait enrichi G⁺ (1 b.), de l'extrait G⁻ (2 a.) et de l'extrait G⁻ enrichi (2 b.). Les fractions enrichies ont été collectées après fractionnement par bullage de CO₂. Les protéines (préalablement concentrées d'un facteur 20) sont séparées sur un gel à 15 % d'acrylamide en condition réductrice et visualisées par une coloration au bleu de Coomassie G250.

Une baisse de l'absorbance est observée après fractionnement par bullage. Il n'y a pas de modifications du profil en CLHP (Figure 9) et les profils des extraits restent complexes. Il n'y a pas de différences entre les échantillons G+/G- et visuellement pas d'enrichissement en protéines. L'analyse par SDS-PAGE montre une baisse d'intensité des bandes et aucun enrichissement.

Conclusion

Le fractionnement avait pour but de réduire la complexité de l'extrait tout en concentrant des composés ayant une grande affinité avec le CO₂. Mais aucune différence notable après fractionnement de nos extraits n'a été observée. Cela peut s'expliquer par le fait que les protéines du malt sont présentes en plus grande quantité dans l'extrait. En effet, lors de l'injection de CO₂, la mousse est produite en trop grande quantité et entraîne une grande partie de la fraction liquide. Cette technique pourrait être applicable sur des fractions préalablement purifiées et montrant des propriétés giclantes.

3. Rôle des protéines dans le phénomène du giclage

L'objectif de cette étude a été de savoir si la fraction protéique issue d'un extrait de malt giclage positif avait un rôle dans le giclage de la bière. Pour cela nous avons mis en œuvre deux techniques de purification. Premièrement, une purification par exclusion stérique de la fraction protéique d'un extrait de malt précipité par du sulfate d'ammonium. Cela a pour but d'éliminer les sels et les polyphénols résiduels. Deuxièmement, un fractionnement par voie membranaire doit permettre de séparer les composés selon un seuil de coupure défini et maintenir les propriétés des protéines. Les fractions ainsi obtenues peuvent alors être analysées pour étudier le rôle des protéines dans le giclage de la bière.

3.1. Purification de la fraction protéique par chromatographie d'exclusion stérique

La purification par exclusion stérique est une méthode simple et rapide permettant de séparer les petits composés (comme les sels ou les polyphénols libres) d'un plus grand mélange de composés comme les protéines ou les polysaccharides. Par conséquent, elle est très employée pour le dessalage d'un échantillon ou encore les changements de tampon. Elle est souvent utilisée dans la littérature comme étape intermédiaire de purification avant analyse. De mise en œuvre aisée, elle permet de préserver l'activité des composés purifiés.

Pour analyser le giclage de la fraction protéique, les sels d'ammonium encore présents dans le culot doivent être à présent éliminés parce qu'ils pourraient modifier les protéines et avoir une influence sur leur activité giclante. En effet, les sels vont favoriser l'agrégation de certaines protéines, comme les hydrophobines, de façon irréversible (Kisko *et al.* 2008). La fraction protéique a été préalablement précipitée avec du sulfate d'ammonium puis dessalée en chromatographie d'exclusion stérique (CES).

Dessalage par chromatographie d'exclusion stérique

Deux nouveaux extraits ont été produits, l'un à partir d'un malt giclage positif (G+) et l'autre à partir d'un malt giclage négatif (G-). Les protéines de l'extrait ont été précipitées par du sulfate d'ammonium (saturation à 70 %) et le culot a été repris après centrifugation dans du tampon tris-HCl pH 9 0,1 M avec un facteur 2,77 pour prendre en compte la dilution lors de l'élution en CES. La suspension protéique (86,4 mL) a ensuite été dessalée par chromatographie d'exclusion stérique. L'absorbance a été mesurée à 280 et 325 nm et la conductivité a été suivie pour identifier le pic de sel (Figures 29 et 30).

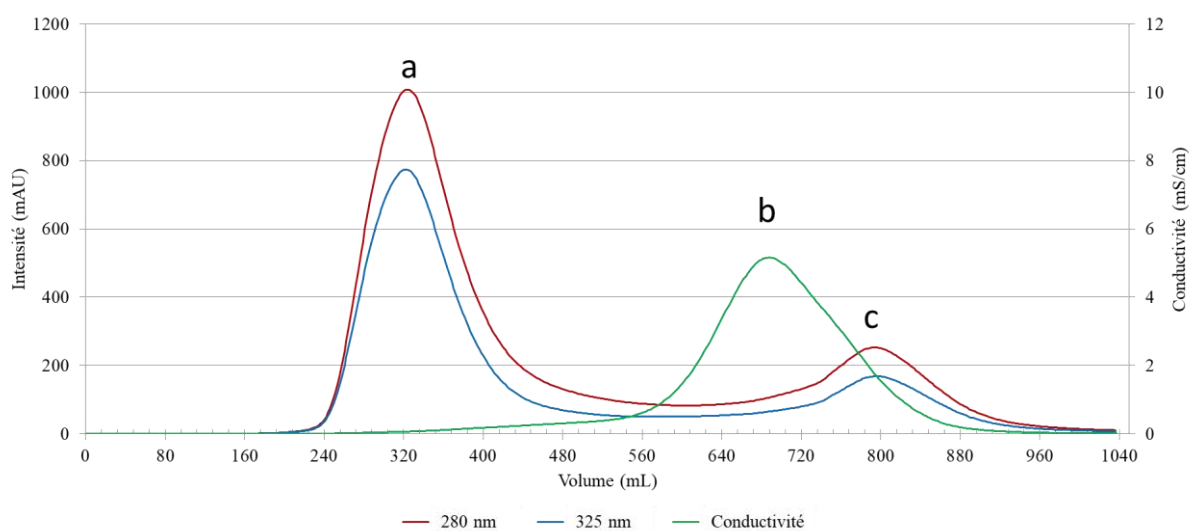


Figure 29. Analyse par chromatographie d'exclusion stérique en gel G25 des protéines de l'extrait de malt G+ après précipitation au sulfate d'ammonium. L'élution est réalisée avec de l'eau. L'absorbance est mesurée à 280 et 325 nm et la conductivité est suivie lors de l'élution.

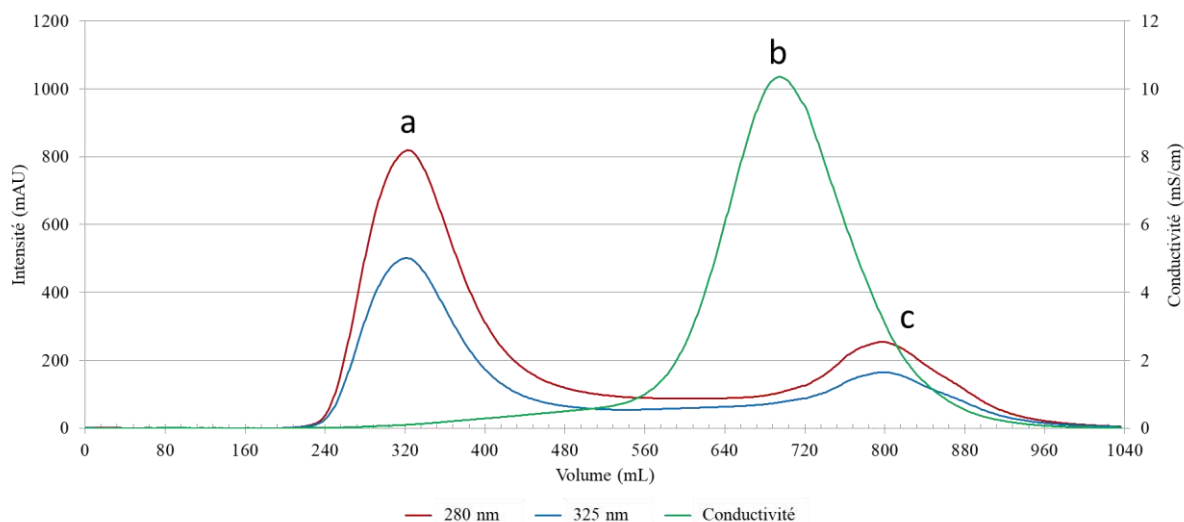


Figure 30. Analyse par chromatographie d'exclusion stérique en gel G25 des protéines de l'extrait de malt G- après précipitation au sulfate d'ammonium. L'éluion est réalisée avec de l'eau. L'absorbance est mesurée à 280 et 325 nm et la conductivité est suivie lors de l'éluion.

Les Figures 29 et 30 laissent apparaître un même profil entre les protéines de l'extrait G+ et celles de l'extrait G-. On dénombre trois pics dont un premier (a) élué de 240 mL jusqu'à 480 mL et un deuxième (b) correspondant aux sels. Enfin, le dernier pic (c) est élué de 680 mL jusqu'à 840 mL. Ce dernier correspond aux peptides et polyphénols libres. Les polyphénols semblent plus présents dans l'extrait de malt G+ comme le montre l'absorbance obtenue à 325 nm avec un rapport protéines / polyphénols de 0,74 pour l'extrait G+ (Figure 29) et de 0,60 pour l'extrait G- (Figure 30).

Les fractions correspondant aux pics (a) et (c) de l'extrait de malt G+ et G- ont été collectées tous les 40 mL (de 240 à 480 mL et de 680 à 880 mL) (Figure 31) et analysées par SDS-PAGE pour vérifier la présence de protéines (Figure 32 extrait G+ et Figure 33 extrait G-).

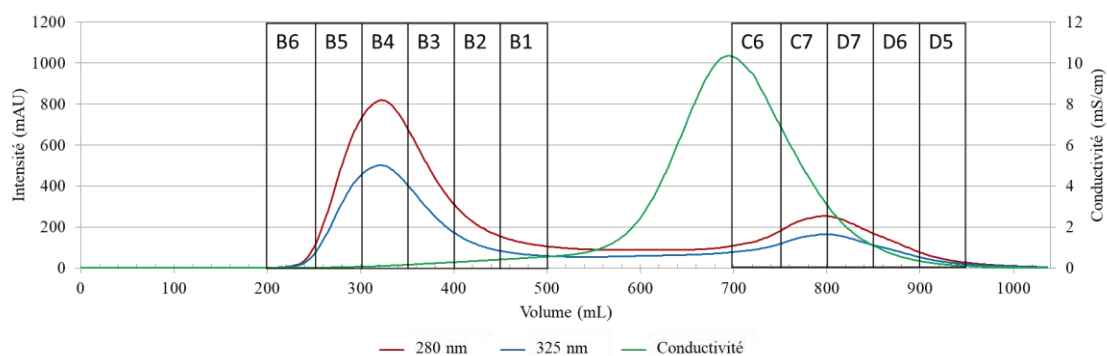


Figure 31. Représentation de la collecte des fractions lors de l'éluion réalisée avec de l'eau. L'absorbance est mesurée à 280 et 325 nm et la conductivité est suivie lors de l'éluion.

Selon les Figures 32 et 33, les protéines se situent majoritairement dans les fractions B5 à B2 (pic a) et ont été dessalées comme le suggère la présence du pic de sels (b) qui apparaît dans la fraction C6 sur le profil de CES. Il n'y a pas de séparation des protéines entre elles et il ne semble pas y avoir de différences de composition notables entre les profils G+ et G-. L'absence de protéines dans le deuxième pic (fractions C7 - D7 - D6) nous conduit à penser qu'elle ne contient que des polyphénols libres.

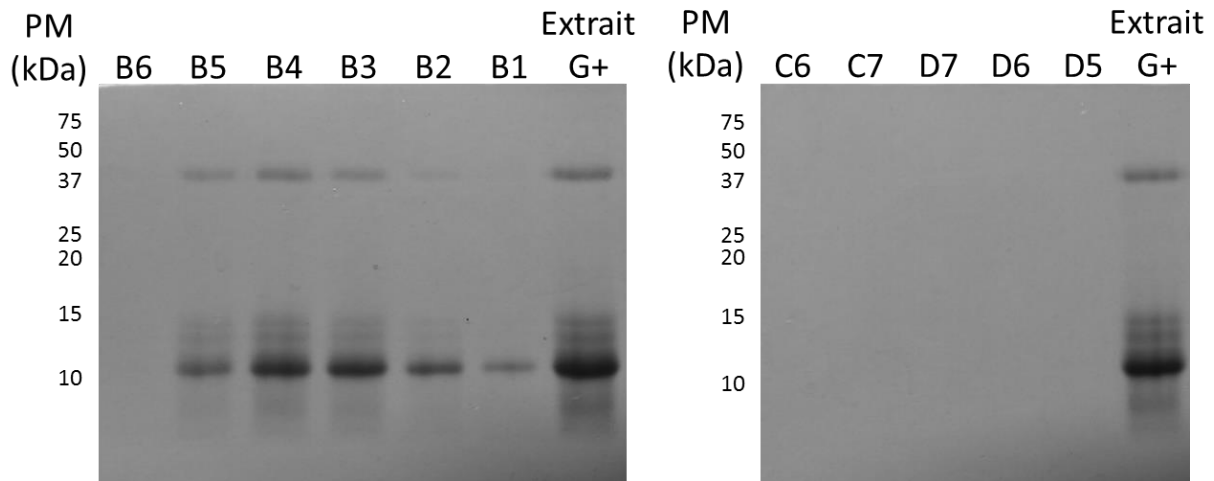


Figure 32. Analyse par SDS-PAGE des fractions issues du fractionnement en CES de l'extrait de malt G+. Les fractions B6-B1 correspondent au pic a et les fractions C6-D5 au pic c de la figure 29. Les protéines (préalablement concentrées d'un facteur 20) sont séparées sur un gel à 15 % d'acrylamide en condition réductrice et visualisées par une coloration au bleu de Coomassie G250.

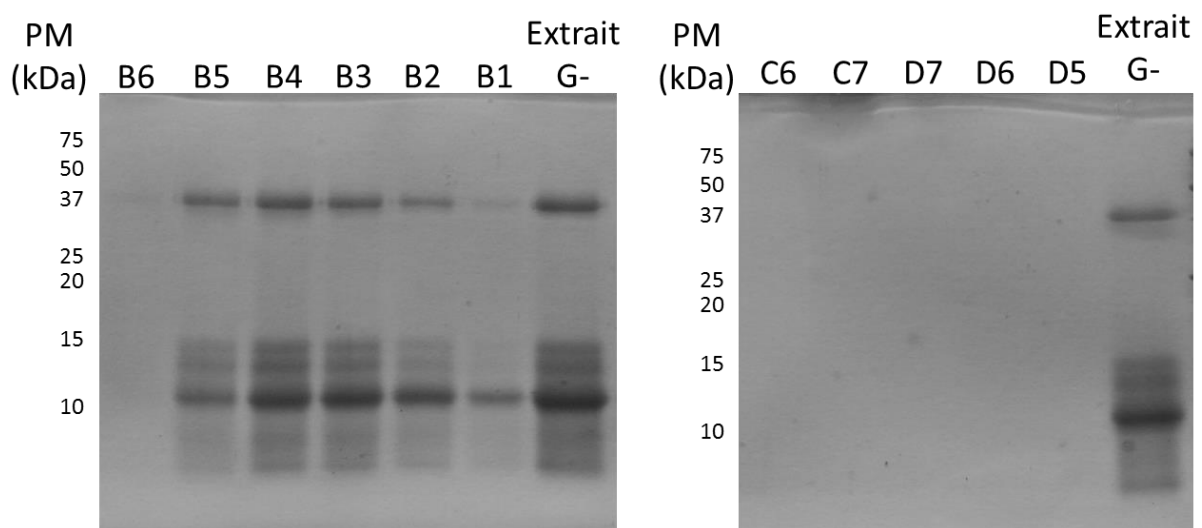


Figure 33. Analyse par SDS-PAGE des fractions issues du fractionnement en CES de l'extrait de malt G-. Les fractions B6-B1 correspondent au pic a et les fractions C6-D5 au pic c de la Figure 30. Les protéines (préalablement concentrées d'un facteur 20) sont séparées sur un gel à 15 % d'acrylamide en condition réductrice et visualisées par une coloration au bleu de Coomassie G250.

Les profils SDS-PAGE sont similaires entre l'extrait G+ et G-. Nous observons une protéine à 11 kDa correspondant aux LTP's, des protéines de stress présentes en grande quantité dans le malt et des protéines à 13 et 14 kDa correspondant à des précurseurs de thionines (α et β -thionines) excrétés par l'orge en défense lors de la propagation des moisissures à sa surface. Enfin nous observons une bande protéique à 37 kDa pouvant être une protéine Z (Jin *et al.* 2013 ; Østergaard *et al.* 2002 ; Perrocheau *et al.* 2005).

Une analyse par CLHP a été réalisée sur l'extrait brut G + (Figure 34 1a) et G- (figure 35 1a), sur la fraction protéique après précipitation au sulfate d'ammonium (figure 34 2a et 35 2 b) et sur la fraction protéique après dessalage en CES (fractions B5 à B1) (Figure 34 3a et 35 3b). En parallèle, la concentration en azote et la matière sèche des échantillons ont été quantifiées pour définir la pureté (Figure 36). Pour chaque échantillon, une analyse des protéines a été réalisée par SDS-PAGE. Une dilution de l'échantillon ayant lieu lors de la séparation, la fraction protéique précipité a été concentrée avant injection d'un facteur de 2,77.

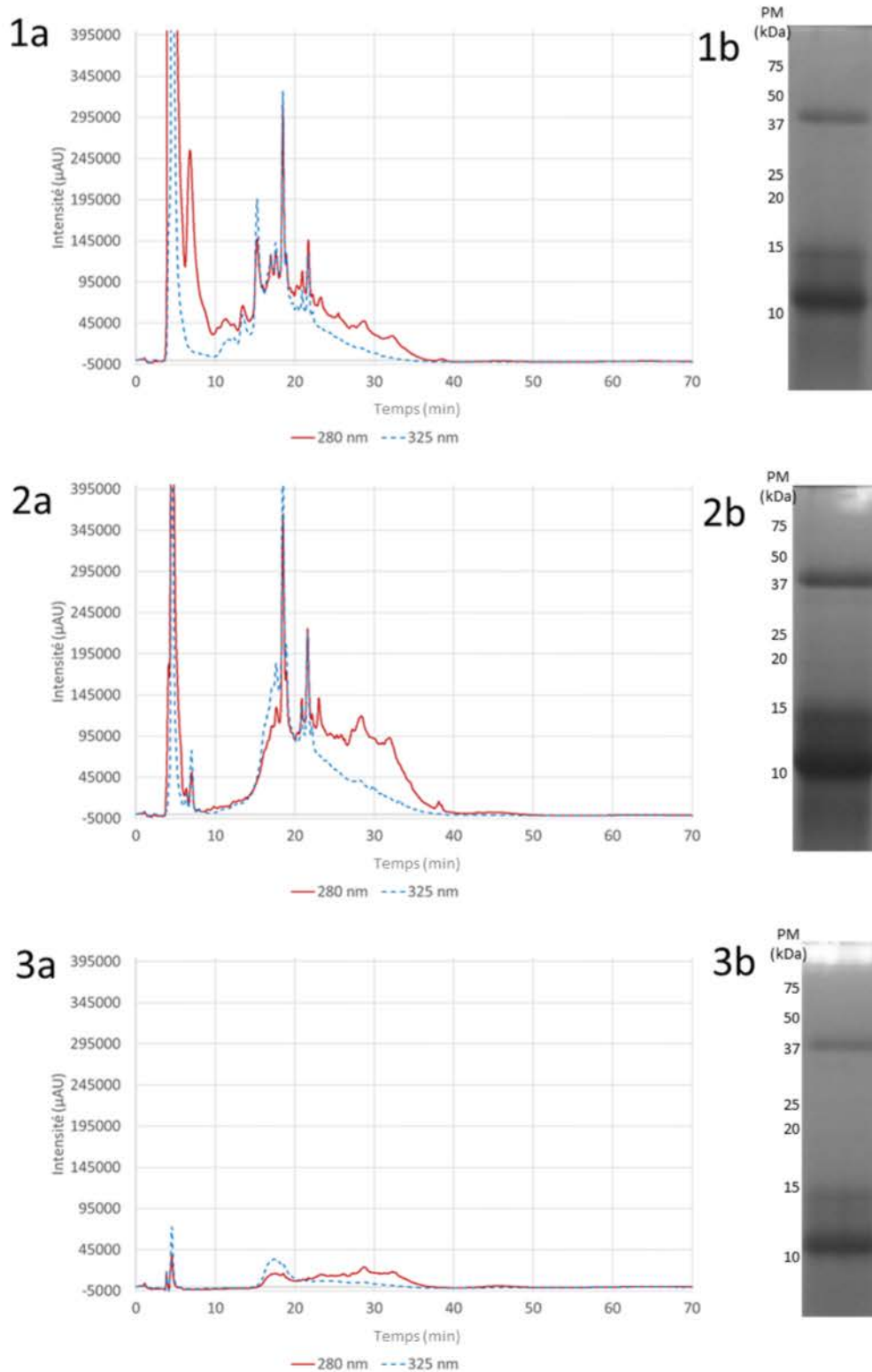


Figure 34. Analyse des protéines par chromatographie en phase inverse (C4) avec un gradient d'ACN de 0-100 % (a) et SDS-PAGE (b) d'extrait de malt G+ (1), d'extrait de protéines précipitées au sulfate d'ammonium et reconcentrées 2,77 fois (2) et du pool protéique issu de chromatographie d'exclusion stérique (3). L'analyse est effectuée sur une colonne C4 et l'éluion est réalisée avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 100 % en 60 mn. Les protéines (préalablement concentrées d'un facteur 20) sont séparées sur un gel à 15 % d'acrylamide en conditions réductrice et révélées par une coloration au bleu de Coomassie G250.

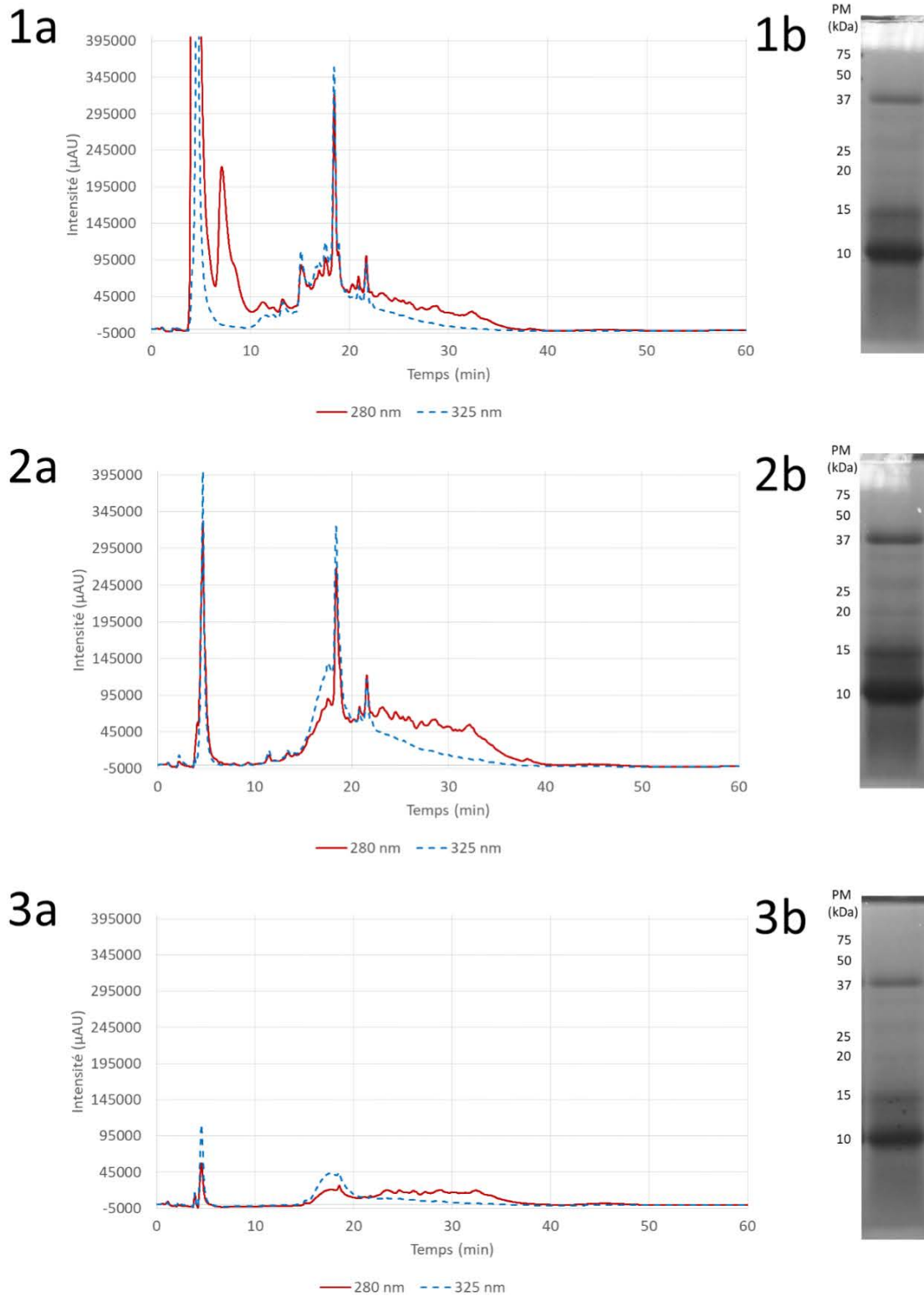


Figure 35. Analyse des protéines par chromatographie en phase inverse (C4) avec un gradient d'ACN de 0-100 % (a) et SDS-PAGE (b) d'extrait de malt G- (1), d'extrait de protéines précipitées au sulfate d'ammonium et reconcentrées 2,77 fois (2) et du pool protéique issu de chromatographie d'exclusion stérique (3) L'analyse est effectuée sur une colonne C4 et l'élution est réalisée avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 100 % en 60 mn. Les protéines (préalablement concentrées d'un facteur 20) sont séparées sur un gel à 15 % d'acrylamide en conditions réductrice et révélées par une coloration au bleu de Coomassie G250.

Nous observons une nette diminution de la complexité de l'extrait de malt (Figures 34 et 35 3a) validée par la diminution de la matière sèche (Figure 36). La fraction polyphénolique libre a été bien réduite comme visualisé à 5 mn, par chromatographie (Figures 34 et 35 3a). La matière sèche a été réduite en passant de 48,14 et 50,78 g/L pour l'extrait G+ et G- à 1,3 et 1,2 g/L. La fraction protéique a été réduite mais la pureté des protéines a augmenté passant de 15 à 75 %. Par analyse SDS-PAGE, on note une diminution de l'intensité des bandes entre l'extrait brut (figure 34 et 35 1b) et le pool protéique (Figures 34 et 35 3b) démontrant une perte de protéines mais il ne semble pas y avoir de différences notables de profil protéique.

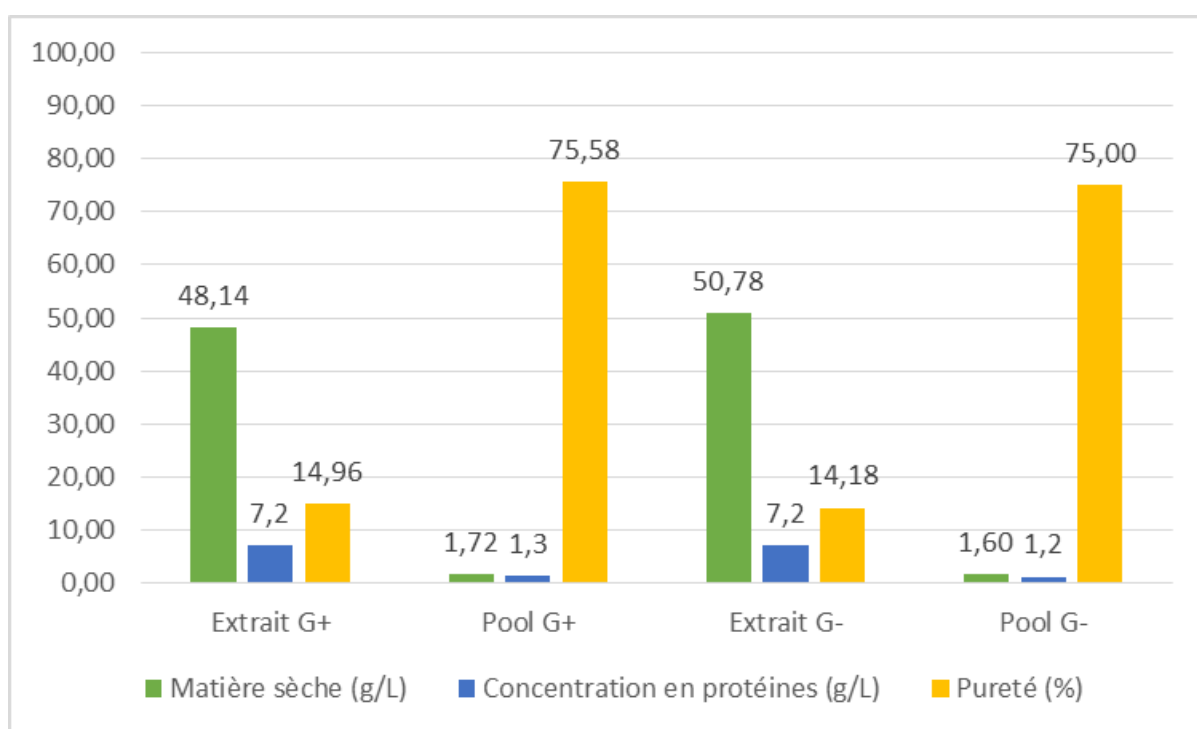


Figure 36. Histogramme de la matière sèche, de la concentration en protéine et de la pureté en protéines des extraits G+/G- et des pools protéiques G+/G- issus de CES.

Au vu de l'augmentation de la pureté de notre fraction protéique et de la diminution de sa complexité, une analyse selon la méthode Carlsberg a été réalisée pour mesurer l'activité giclante de la fraction protéique purifiée (Figure 37).

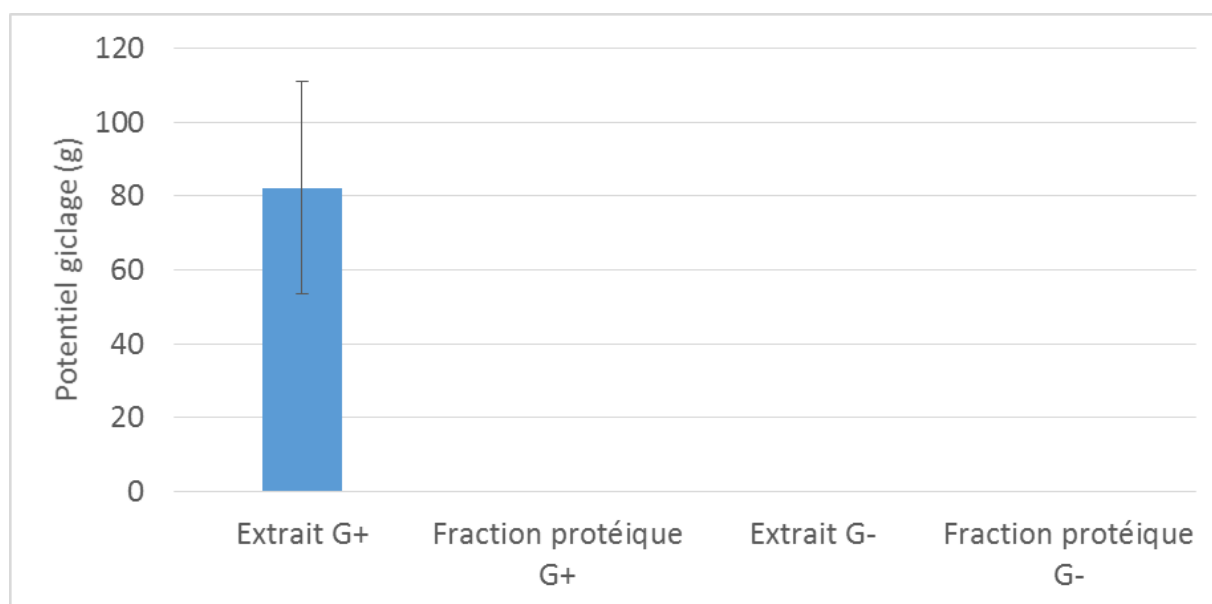


Figure 37. Quantification du giclage d'extraits de malt G+/G- et des fractions protéiques G+ / G- obtenues après dessalage par chromatographie d'exclusion stérique.

Alors que l'extrait de malt G+ induit un giclage, il est à noter une absence de giclage provoquée par la fraction protéique correspondante. Cela peut être dû à une concentration en protéines trop faible ou encore à l'absence de composé(s) de nature différente indispensable(s) au phénomène. De plus, la précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium peut modifier la conformation des protéines et donc leur activité. Concernant le rapport polyphénols / protéines, il est maintenu entre l'extrait brut et la fraction protéique purifiée (respectivement égal à 0,74 et 0,73).

Conclusion

Nous observons une perte du giclage après précipitation des protéines et dessalage par CES. Plusieurs hypothèses ressortent de ces résultats ; (1) les étapes de purification affectent le potentiel giclage et spécifiquement la précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium, (2) les protéines seules ne seraient pas impliquées dans le giclage, (3) leur concentration est trop faible au terme du procédé de purification pour induire un giclage observable. Concernant l'implication des polyphénols, une possibilité de traitement de l'extrait pour retirer seulement la fraction polyphénolique libre pourrait s'avérer une voie de recherche intéressante. Cela permettrait de valider l'hypothèse qu'une synergie entre les protéines et les polyphénols peut déclencher le phénomène de giclage.

3.2. Purification des protéines par fractionnement membranaire

L'échec de la préservation du potentiel giclage après précipitation de la fraction protéique au sulfate d'ammonium et sa purification par CES nous conduit à envisager une autre voie de fractionnement de l'extrait de malt. Pour cela, nous avons utilisé une méthode de fractionnement par filtration membranaire qui permet de maintenir les propriétés des composés et de diminuer la complexité de l'extrait. Cette technique conduit à séparer les composés selon le seuil de coupure de la membrane. Nous avons choisi de travailler en diafiltration pour éliminer au maximum les composés interférents. Le mode diafiltration est une mise en œuvre qui consiste à remplacer, dans le rétentat (l'échantillon), le perméat qui s'écoule à travers la membrane par une solution de composition définie par l'opérateur. La diafiltration sera réalisée sur l'extrait de malt G+ avec deux seuils de coupure, 5 et 30 kDa. Ces seuils de coupure ont été choisis parce qu'un composé potentiellement impliqué dans le giclage de la bière possède un poids moléculaire supérieur à 5 kDa. Nous voulons ici éliminer les peptides et les petits composés, ainsi que les sels et maintenir les composés de cette gamme de masses (5-30 kDa) dans le rétentat.

Fractionnement sur une membrane de 5 kDa en mode diafiltration

Une première étape de fractionnement sur 5 kDa a été initiée pour voir si les composés inférieurs à 5 kDa, potentiellement les hydrophobines, passent au travers de la membrane ou bien sont retenus. Le même protocole a été appliqué à des extraits de malt G+ et G-. Un ensemble de 8 diavolumes a été mis en œuvre pour purifier les composés au-dessus de 5 kDa. Cet ensemble de diavolumes permet d'éliminer 99 % des composés ayant une taille inférieure au seuil de coupure. Un témoin de recirculation (recyclage du perméat dans le rétentat) a été réalisé pour vérifier que les contraintes de cisaillement n'influent pas sur le potentiel giclage de l'extrait de malt. Le rétentat a été analysé pour son potentiel giclage et le perméat obtenu a préalablement été concentré à l'évaporateur rotatif (30 °C et 30 mbar) d'un facteur 8 avant d'analyser le giclage (contre un témoin négatif de bière (sans extrait de malt)). Un bilan de matière a été dressé en quantifiant les protéines, les glucides et les polyphénols totaux. Les résultats de giclage sont présentés dans la Figure 38 et la quantification de la matière première dans la Figure 39.

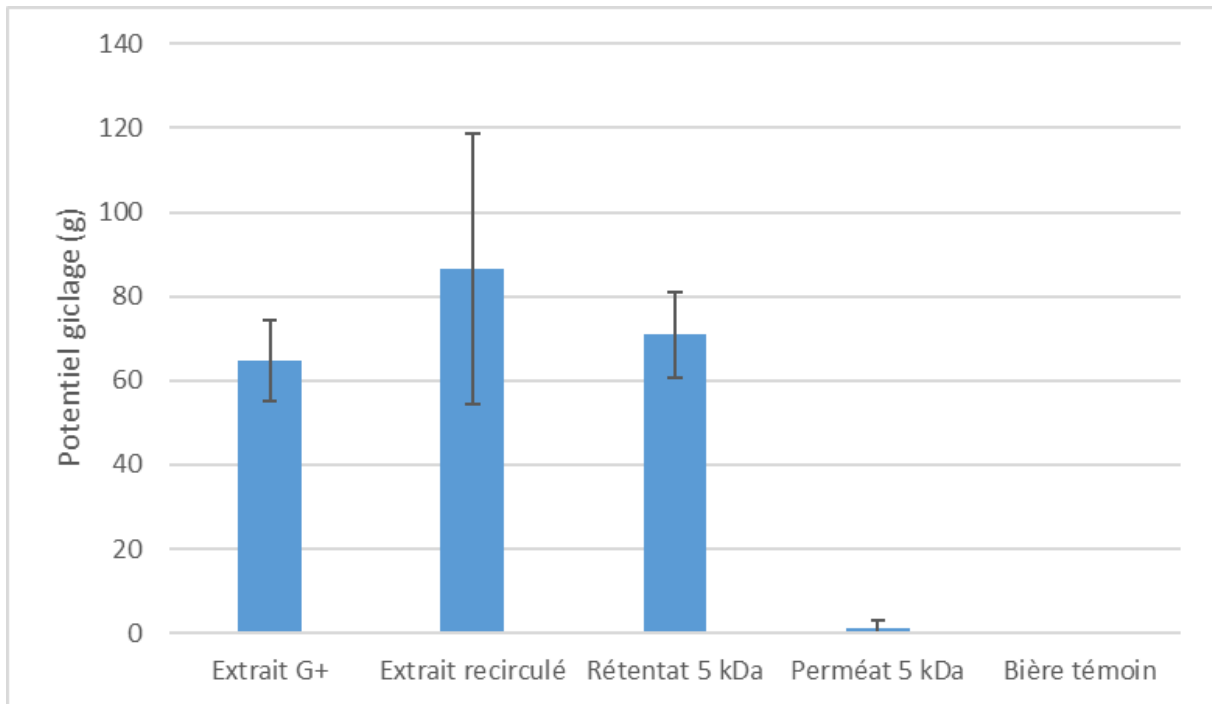
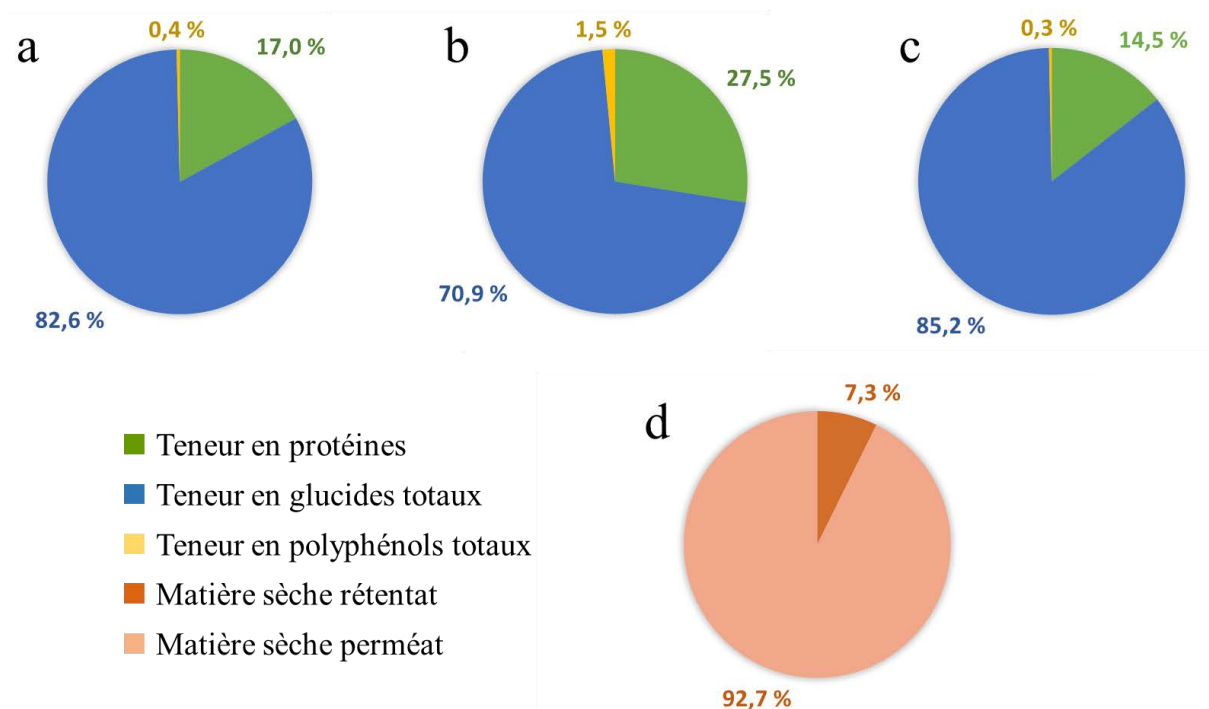


Figure 38. Quantification du giclage selon la méthode Carlsberg modifiée dans de la bière de l'extrait de malt, de la fraction supérieure (rétentat) et inférieure (perméat) à 5 kDa et d'un témoin de bière négatif. Ces échantillons ont été obtenus après une diafiltration de 8 diavolumes avec de l'eau ultrapure sur une membrane de 5 kDa.

Initialement un giclage de 62 g est obtenu avec l'extrait de malt G+ dans la bière. Nous observons que la recirculation de l'extrait dans le système de filtration sans la membrane n'entraîne pas de modification significative du giclage (85 g). Nous pouvons voir que les composés retenus par la membrane (supérieurs à 5 kDa) présentent un pouvoir giclant de l'ordre de 70 g. Quant à eux, le perméat et le témoin de bière négatif ne présentent pas de pouvoir giclant. D'après ces résultats, les composés de taille supérieure à 5 kDa provenant d'un extrait de malt G+ semblent impliqués dans le giclage de la bière. Pour voir l'évolution des différents constituants de l'extrait, les protéines, les glucides et les polyphénols ont été dosés (Figure 39).



	Matière sèche (g)	Protéines (g)	Glucides totaux (g)	Polyphénols totaux (mg)
Extrait G+	126,1	21,500 ± 0,009	104,200 ± 0,001	485 ± 4
Rétentat 5 kDa	8,8	2,100 ± 0,009	5,400 ± 0,001	117 ± 4
Perméat 5 kDa	112,1	15,900 ± 0,009	94,100 ± 0,001	367 ± 4

Figure 39. Bilans de matière (protéines, glucides totaux, polyphénols sur 2 L d'échantillons) de l'extrait de malt G+ (a), du rétentat 5 kDa (b) et du perméat 5 kDa (c) après fractionnement sur une membrane de 5 kDa. La matière sèche (d) a été mesurée sur le rétentat et le perméat.

Une grande quantité de la matière sèche est constituée de glucides totaux soit près de 83 % dans l'extrait brut (a) (en grande partie de l'amidon natif). Cette méthode de fractionnement permet de réduire la complexité de la matière première (réduction de 93 % de la matière sèche) tout en préservant l'activité giclante dans le rétentat 5 kDa (b). Les protéines représentent 17 % du rétentat 5 kDa et les polyphénols libres sont présents sous forme de traces. Concernant le perméat (c), on y retrouve la plus grande quantité de glucides totaux avec plus de 85 % de la masse totale.

Pour étendre l'appréciation des composés, les différentes fractions (extrait de malt, rétentat 5 kDa et perméat 5 kDa) ont été analysées par chromatographie en phase inverse et par SDS-PAGE (Figure 40).

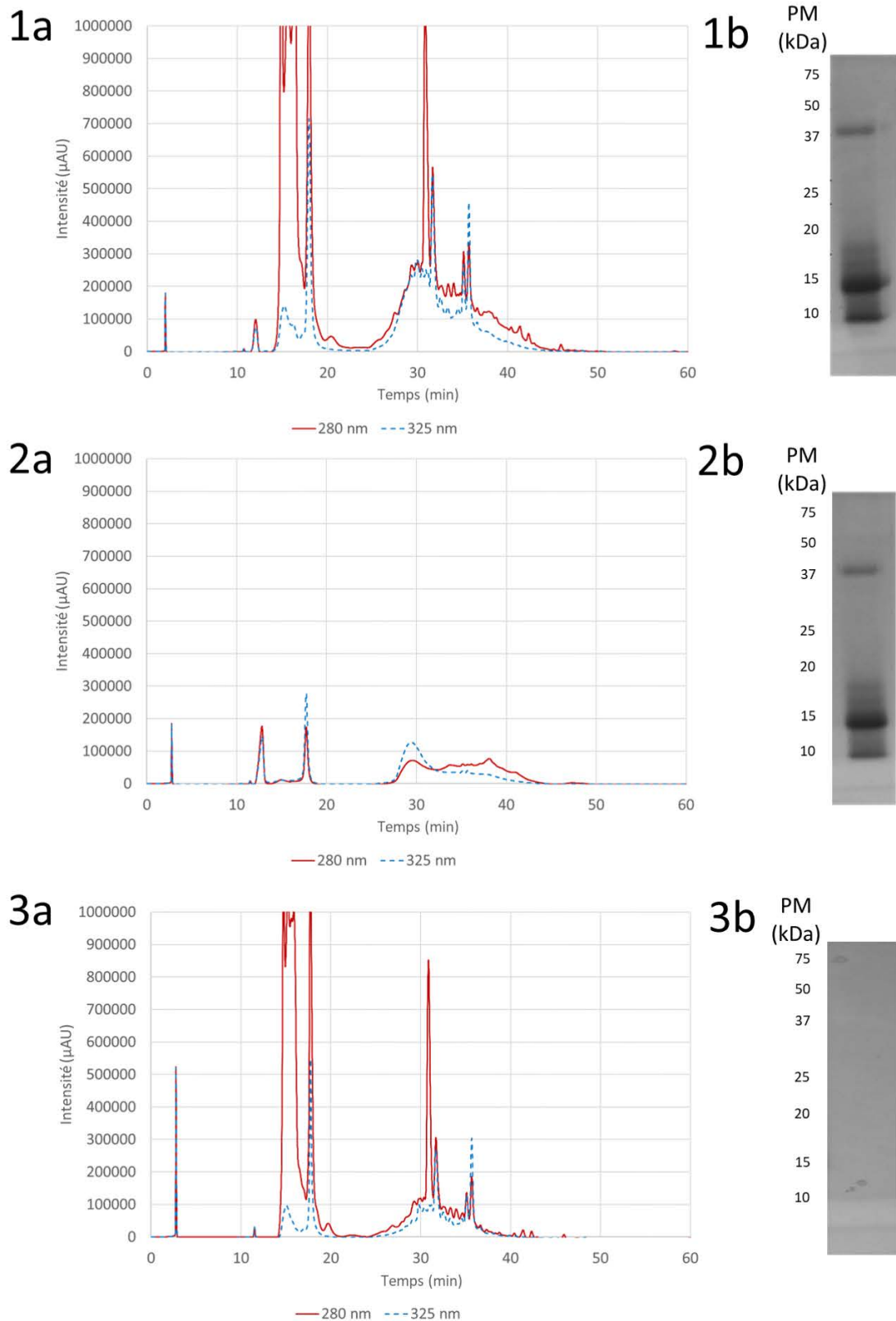


Figure 40. Analyse des protéines par chromatographie de phase inverse (C4) avec un gradient d'ACN de 0-100 % (a) et SDS-PAGE (b) d'extrait de malt G+ (1), de rétentat 5 kDa (2) et de perméat 5 kDa (3) après fractionnement sur une membrane de 5 kDa. L'analyse est effectuée sur une colonne C4 et l'éluion est réalisée avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 100 % en 60 mn. Les protéines (préalablement concentrées d'un facteur 20) sont séparées sur un gel à 15 % d'acrylamide en conditions réductrice et révélées par une coloration au bleu de Coomassie G250.

En comparant l'extrait brut et le rétentat 5 kDa, il ne semble pas y avoir de pertes au niveau protéique comme observé sur les profils de SDS-PAGE (1b et 2b) mais néanmoins, il y a une nette diminution des composés détectables à 280 et 325 nm par chromatographie (1a comparé à 2a). Le profil chromatographique de l'extrait brut (1a) est proche du perméat 5 kDa (3a) mais la fraction protéique est inexistante dans le profil SDS-PAGE (3b). En comparant les résultats obtenus précédemment sur la fraction protéique en CES (Figures 34-35 3a) et le rétentat 5 kDa (Figure 40 2a), il est à noter que le profil en CLHP est très similaire à celui observé sur le pool protéique après dessalage. Cela renforce l'hypothèse émise que les sels ont pu jouer un rôle dans l'inhibition du giclage (présence de sels ou modification de la conformation des protéines).

Conclusion

Selon le fractionnement sur 5 kDa, des composés de taille supérieure à 5 kDa semblent impliqués dans le giclage. La complexité de la matière a été réduite de l'ordre de 93 % tout en préservant un giclage de 70 g dans le rétentat. La teneur en protéines a été augmentée pour atteindre 27,5 % dans le rétentat mais la fraction glucidique représente encore 71 % de la masse totale.

Fractionnement sur une membrane de 30 kDa en mode diafiltration

Pour aller plus loin, la diafiltration a été poursuivie en fractionnant l'extrait de malt G+ avec une membrane de 30 kDa. De la même façon qu'avec une membrane de 5 kDa, la diafiltration a été mise en jeu jusqu'à 8 diavolumes. Le rétentat a été analysé en giclage et le perméat a été concentré 8 fois avant d'être analysé. Un témoin positif d'extrait brut de malt giclage positif et un témoin négatif de bière (bière sans échantillon) ont été analysés en giclage. Les résultats de giclage sont présentés dans la Figure 41 et la quantification de la matière première dans la Figure 42.

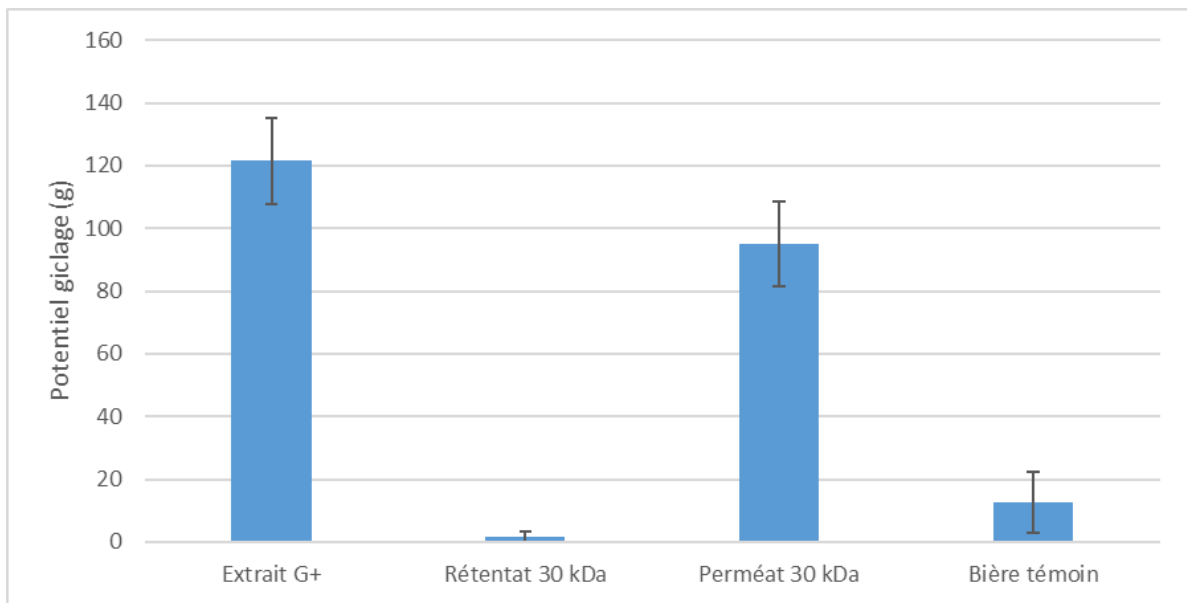


Figure 41. Quantification du giclage selon la méthode Carlsberg modifiée dans de la bière de l'extrait de malt, de la fraction supérieure (rétentat) et inférieure (perméat) à 30 kDa et d'un témoin de bière négatif. Ces échantillons ont été obtenus après une diafiltration de 8 diavolumes avec de l'eau ultrapure sur une membrane de 30 kDa.

Initialement un giclage de 120 g est obtenu avec l'extrait de malt G+ dans la bière. Un important pouvoir giclant est observé dans le perméat 30 kDa (95 g). D'après les résultats, le rétentat 30 kDa quant à lui ne présente pas de pouvoir giclant. Des composés de taille inférieure à 30 kDa semblent être impliqués dans le giclage. On peut en conclure que des composés ou une combinaison de composés présents entre 5 et 30 kDa semblent favoriser le phénomène de giclage. Un bilan de matière de l'azote total, des glucides totaux et des polyphénols a été effectué (Figure 42).

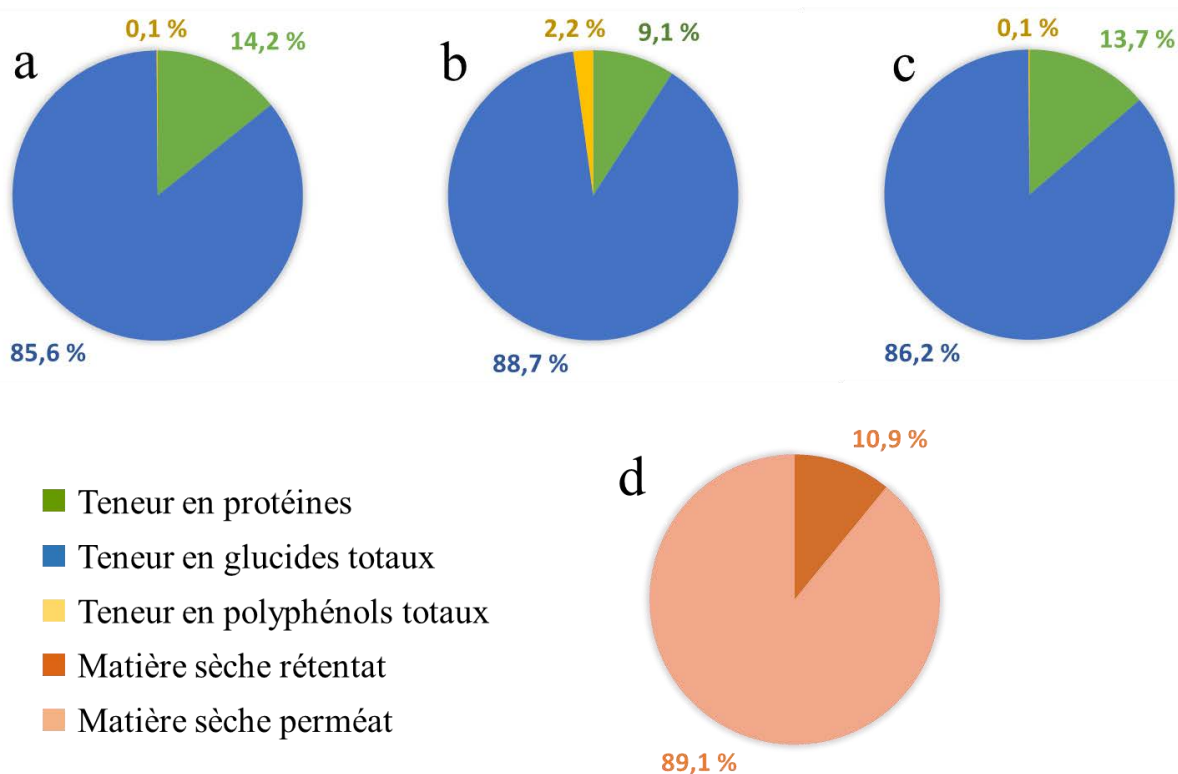


Figure 42. Bilans de matière (protéines, glucides totaux, polyphénols sur 2 L d'échantillons) de l'extrait de malt G+(a), du rétentat 30 kDa (b) et du perméat 30 kDa (c) après fractionnement sur une membrane de 30 kDa. La matière sèche (d) a été mesurée sur le rétentat et le perméat.

Le bilan de matière montre que le fractionnement permet de réduire la complexité de la matière première (réduction de 11 % de la matière sèche) tout en préservant l'activité giclante du perméat. Les échantillons sont constitués principalement de glucides, de l'ordre de 86 % dans l'extrait de malt, 89 % dans le rétentat et 86 % dans le perméat 30 kDa. Les protéines quant à elles ne représentent qu'une petite fraction (13,7 %) du perméat 30 kDa de l'extrait de malt. Il est à noter une nette diminution du taux de protéines dans le rétentat 30 kDa. Pour étendre l'appréciation des composés, les différentes fractions (extrait de malt, rétentat 30 kDa et perméat 30 kDa) ont été analysées par chromatographie en phase inverse et par SDS-PAGE (Figure 43).

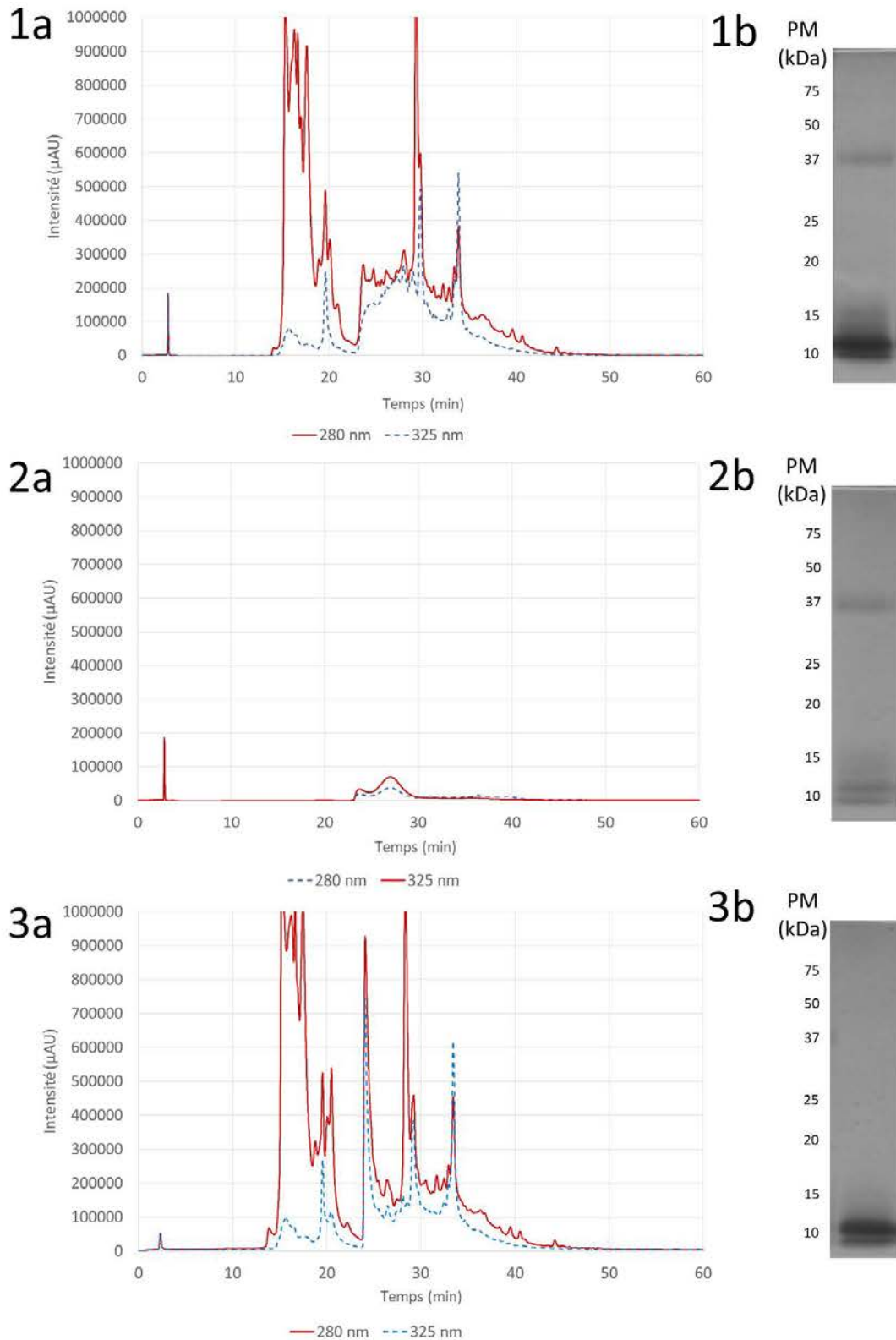


Figure 43. Analyse des protéines par chromatographie de phase inverse (C4) avec un gradient d'ACN de 0-100 % (a) et SDS-PAGE (b) d'extrait de malt G+ (1), de rétentat 30 kDa (2) et de perméat 30 kDa (3) après fractionnement sur une membrane de 30 kDa. L'analyse est effectuée sur une colonne C4 et l'élution est réalisée avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 100 % en 60 mn. Les protéines (préalablement concentrées d'un facteur 20) sont séparées sur un gel à 15 % d'acrylamide en conditions réductrice et révélés par une coloration au bleu de Coomassie G250.

En comparant l'extrait brut et le rétentat 30 kDa (1a et 2a), on observe une nette diminution des composés détectables à 280 et 325 nm par chromatographie ainsi que par SDS-PAGE (1b et 2b) et seule la protéine à 37 kDa est encore présente dans le rétentat 30 kDa. Le profil chromatographique de l'extrait brut (1a) est proche du perméat 30 kDa (3a) mais uniquement la protéine à 10 kDa est présente dans le profil SDS-PAGE (3b). Le reste des protéines de l'extrait est observable dans le perméat 30 kDa. Le profil à 325 nm montre que le perméat, comme l'extrait brut, contient beaucoup de composés phénoliques. Ces résultats sont cohérents avec ceux attendus, car ils montrent que les composés supérieurs à 30 kDa ont bien été retenus par la membrane.

Conclusion

Selon le fractionnement sur 30 kDa, des composés de taille inférieure à 30 kDa semblent impliqués dans le giclage. Le composé à 37 kDa (détecté par SDS-PAGE) ne semble pas participer au phénomène de giclage.

Conclusion globale sur le fractionnement membranaire :

La séparation membranaire a été réalisée sur un extrait de malt giclage positif. Cette technique a permis de séparer les composés présents dans les extraits de malt sur une gamme de travail allant de 5 à 30 kDa. Les résultats ont montré que les composés compris entre 5 et 30 kDa semblent avoir un potentiel giclage. Néanmoins, la concentration trop faible des protéines présentes dans les échantillons limite nos conclusions. De ce fait, seules certaines protéines sont identifiables.

4. Influence de la fraction polyphénolique libre sur le giclage

Dans cette étude nous nous sommes focalisés sur les polyphénols totaux. Les analyses par chromatographie (Figures 29 et 30) ont montré que la fraction polyphénolique est un peu plus importante dans l'extrait de malt G+ en comparaison avec l'extrait G- (0,4 % contre 0,1 % de la masse totale). Dans le même sens, la fraction protéique obtenue après fractionnement par CES (Figure 37) n'avait plus de potentiel giclage alors que les polyphénols libres avaient été retirés.

Nous avons donc vérifié si l'élimination des polyphénols libres d'un extrait de malt G+ avait un impact sur son pouvoir giclant.

Traitement de l'extrait de malt G+ par la polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)

Un extrait de malt G+ a été produit puis mis en contact avec de la PVPP pendant 30 mn sous agitation magnétique. Le choix de la concentration à 50 et 200 g/hL correspond à des taux couramment utilisés en brasserie. La PVPP a été ensuite retirée par filtration sur une membrane de 0,45 µm. Différents témoins ont été réalisés pour vérifier que le passage au travers de la membrane ne modifiait pas le pouvoir giclant de l'extrait G+.

Le potentiel giclage de chaque extrait a été quantifié (Figure 44).

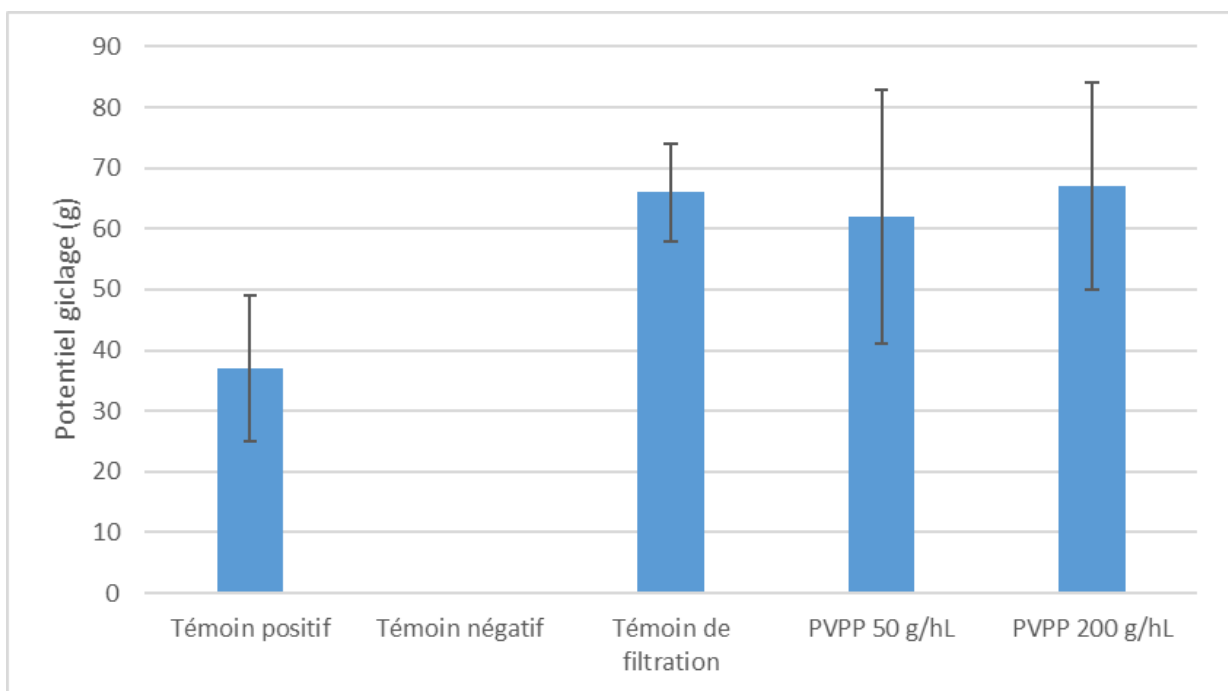


Figure 44. Quantification du giclage après traitement de l'extrait de malt avec 50 g et 200 g/hL de PVPP. Un témoin positif (extrait de malt G+) non traité, un témoin de filtration et enfin un témoin négatif (bière sans échantillon) ont été analysés.

Une analyse par SDS-PAGE a été réalisée pour vérifier s'il y avait une perte de protéines ou pas (Figure 45).

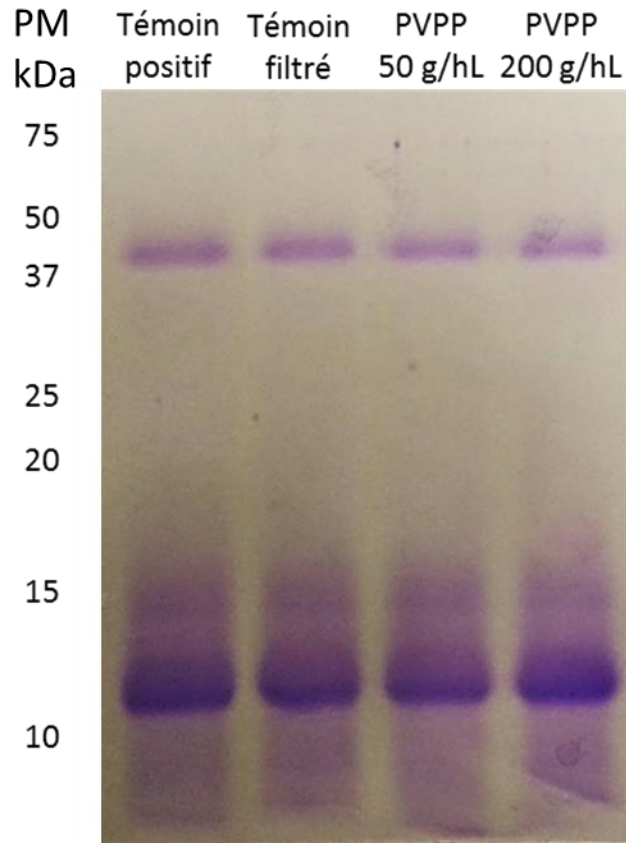


Figure 45. Analyse des protéines (préalablement concentrées) par SDS-PAGE après traitement de l'extrait de malt à la PVPP. Les protéines sont séparées par un gel à 15 % d'acrylamide en condition réductrice et révélées par une coloration au bleu de Coomassie G250.

Ainsi que le fait apparaître le profil en SDS-PAGE de la Figure 45, les masses sont similaires entre l'extrait G⁺ et les extraits de malt traités. Nous observons une protéine à 11 kDa pouvant correspondre aux LTP's, des protéines de stress présentent en grande quantité dans le malt et des protéines à 13 et 14 kDa qui sont probablement des précurseurs de thionines (α et β -thionines) excrétés par l'orge en défense lors de la propagation des moisissures à sa surface. Enfin nous observons une bande protéique à 37 kDa pouvant être une protéine Z.

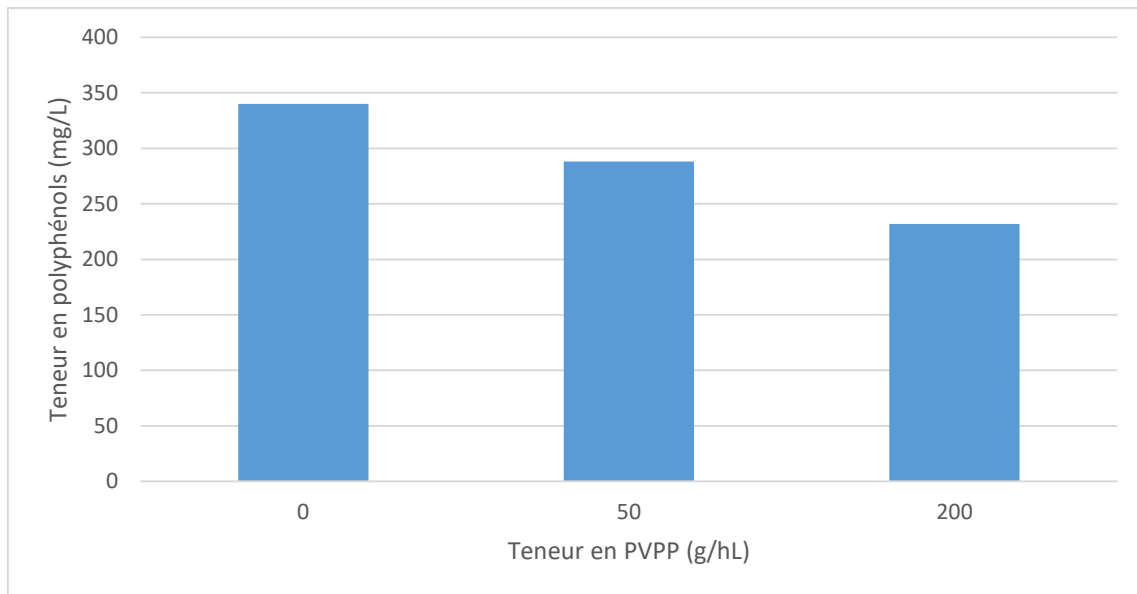


Figure 46. Evolution de la concentration en polyphénols totaux d'un extrait de malt industriel après un traitement à la PVPP à différentes concentrations pendant 1h sous agitation magnétique. Le dosage a été effectué selon la méthode EBC 9.26.

La quantification des polyphénols (Figure 46) montre qu'il y a une élimination des polyphénols libres de 15 % après un traitement à 50 g / hL et une élimination de 30 % de la teneur en polyphénols libre de l'extrait avec 200 g / hL. Cette élimination est faible comparée avec ce qui est observé en brasserie jusqu'à 70 % des polyphénols éliminés. Néanmoins, l'analyse du potentiel giclage des différentes fractions (Figure 44) montre que cette réduction de 1 / 3 de la charge polyphénolique n'a pas d'influence sur le pouvoir giclant de l'extrait. En effet, au vu des barres d'erreur, le potentiel giclage est de 60 g quel que soit le traitement contre 50 g pour l'extrait de malt brut.

Conclusion

Une étude a montré que les polyphénols pourraient avoir un impact sur le phénomène de giclage (Müller *et al.* 2010). Une corrélation élevée a été trouvée entre l'augmentation de la teneur en polyphénols dans la bière et le giclage. D'après nos résultats, les polyphénols libres ne semblent pas acteurs du mécanisme induisant ce phénomène.

5. Conclusion

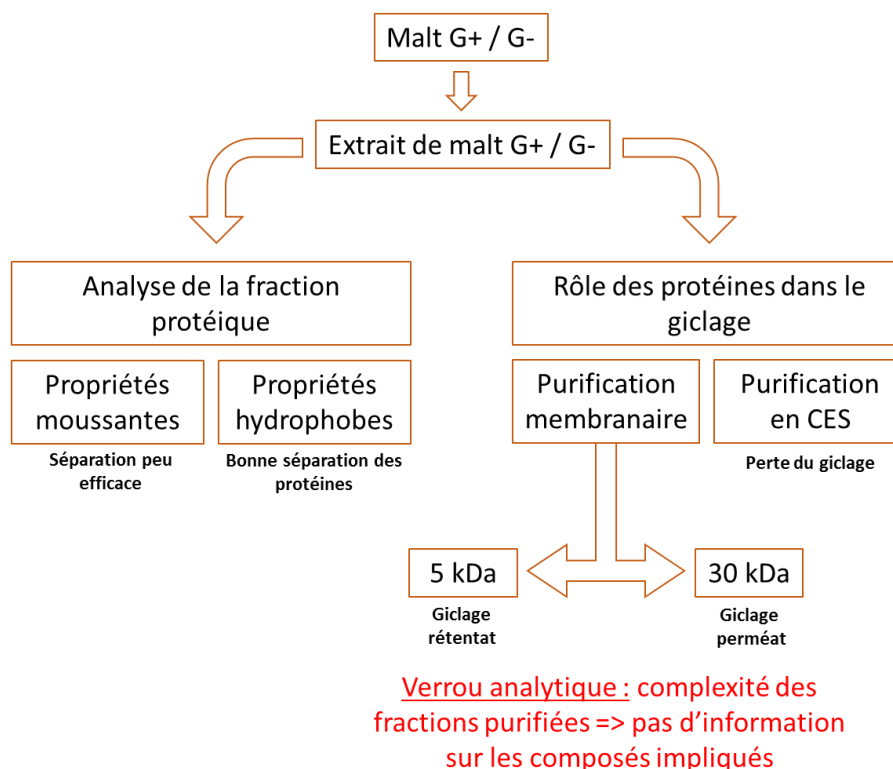


Figure 47. Schéma récapitulatif des expérimentations sur les extraits de malt.

L'extrait de malt est une matière très complexe de par la présence de composés nombreux et variés. Les différentes techniques mises en place pour fractionner la matière première ont permis de donner des informations intéressantes sur la taille des composés présents dans la matière première (Figure 47). Les techniques de précipitation par le sulfate d'ammonium n'ont pas permis de maintenir l'activité du pool protéique même après élimination des sels par chromatographie d'exclusion stérique. Seul le fractionnement membranaire a donné des résultats intéressants avec un maintien du potentiel giclage après diafiltration et une réduction de la complexité de la matière première spécialement pour des composés de taille supérieure à 5 kDa (90 %). Mais le manque de signal en chromatographie analytique et en SDS-PAGE limite l'analyse plus poussée des extraits. Une étape de fractionnement supplémentaire en phase inverse est pertinente au vu des résultats obtenus mais une étape de concentration est nécessaire pour appliquer nos conditions à la colonne. Dans l'optique de concentrer l'extrait de malt G+ pour le fractionner en chromatographie de phase inverse, des essais de lyophilisation de l'extrait ont été mis en œuvre. A l'issue de la remise en suspension de l'extrait de malt, l'activité giclante

n'a pas été préservée. Dans le même cadre, la concentration par évaporation sous vide a été tentée mais l'omniprésence des glucides limite nos capacités de concentration. Il serait judicieux d'éliminer la fraction glucidique de l'extrait ou encore de la réduire pour permettre sa concentration.

Comme précisé dans la bibliographie, il a été montré que la contamination fongique est en partie responsable du giclage dans la bière. Des analyses par PCR ont été réalisées pour définir la charge fongique de notre malt G+. La majorité des filamenteux présents en surface de l'orge appartiennent au genre *Fusarium* (*tricinctum* et *graminearum*) et au genre *Microdochium* (*nivale* et *majus*). Au vu de ces données une nouvelle stratégie a été mise en place en travaillant sur de l'orge artificiellement contaminée par des souches pures. L'objectif sera de pouvoir extraire et fractionner les composés en surface de la matière première en se focalisant sur les composés produits et/ou dégradés en surface de l'orge par les microorganismes.

Chapitre 4 :

Fractionnement d'orges artificiellement contaminées par des moisissures

SOMMAIRE

1. Introduction.....	119
2. Sélection de moisissures impliquées dans le giclage.....	120
3. Influence de la concentration en azote total sur le potentiel giclage	123
4. Séparation des composés par séparation membranaire.....	125
4.1. Fractionnement sur une membrane de 5 kDa en mode diafiltration.....	125
4.2. Fractionnement sur une membrane de 30 kDa en mode diafiltration.....	129
5. Fractionnement des composés selon leur caractère hydrophobe	134
6. Identification des protéines dans la fraction giclante	139
7. Analyse de la fraction giclante par diffusion dynamique de la lumière.....	143
8. Conclusion	145

1. Introduction

Le giclage primaire de la bière est connu pour être induit par l'infection fongique du grain d'orge lors de la culture aux champs. Certaines études suggèrent une relation entre moisissures et giclage. La littérature a montré l'influence de certains contaminants comme le genre *Fusarium* ou encore *Microdochium*. Dans des études récentes, la prévalence de *F. tricinctum* et de *M. nivale* augmente lors des années à giclage ce qui a conduit à identifier ces microorganismes comme des promoteurs du giclage dans la bière.

En parallèle, des auteurs (Sarlin *et al.* 2005, 2007 ; Zapf *et al.* 2007 ; Shokribousjein *et al.* 2011) ont montré que certaines protéines amphiphiles produites par les moisissures appelées hydrophobines, sont capables d'induire du giclage dans de l'eau carbonatée ou de la bière. Ces protéines ont la capacité de former des structures aux interfaces gaz / liquide pour favoriser la croissance des moisissures en milieu aqueux mais aussi en surface de grains d'orge. Cette capacité provient de leurs propriétés hydrophobes et hydrophiles qui favorisent leur agrégation pour former des nanostructures avec du CO₂ appelé nanobombes.

L'IFBM a travaillé avec de l'orge contaminée artificiellement et a montré qu'en réalisant un brassin avec ce type d'orge, il est possible de produire de la bière avec des propriétés giclantes. A partir de cette matière première maîtrisée (souche pure) et fortement contaminée, nous allons nous intéresser aux composés produits en surface de l'orge.

L'objectif de ce chapitre est d'étudier l'extraction de composés giclants à partir d'orges artificiellement contaminées, de les fractionner et de les isoler pour pouvoir les identifier. Une première étape de sélection de souches sera initiée par extraction en surface avec de l'eau ultrapure d'orges contaminées et la mesure de la capacité giclante. Nous travaillerons avec des moisissures identifiées par l'IFBM comme étant impliquées dans le phénomène de giclage. Puis en partant de cet extrait de surface, une première étape de fractionnement sera initiée par voie membranaire avec un traitement équivalent à celui observé sur l'extrait de malt. Cela permettra de comparer les deux matières premières quant à la fraction giclante. Une autre méthode de fractionnement par chromatographie en phase inverse sera aussi étudiée. Enfin, les fractions giclantes seront caractérisées pour identifier les composés pouvant présenter des propriétés de giclage.

2. Sélection de moisissures impliquées dans le giclage

Des composés en surface de l'orge artificiellement contaminée par *F. tricinctum*, *M. nivale*, *F. graminearum* et *Alternaria sp.* ont été extraits avec de l'eau ultrapure avec un ratio solide / liquide de 1 : 2 (m/v). Un extrait de surface d'orge stérilisée a été également analysé. La Figure 48 montre l'activité giclante de 5 extraits aqueux mesurés dans la bière selon le protocole Carlsberg modifié. Un témoin de bière négatif est aussi analysé.

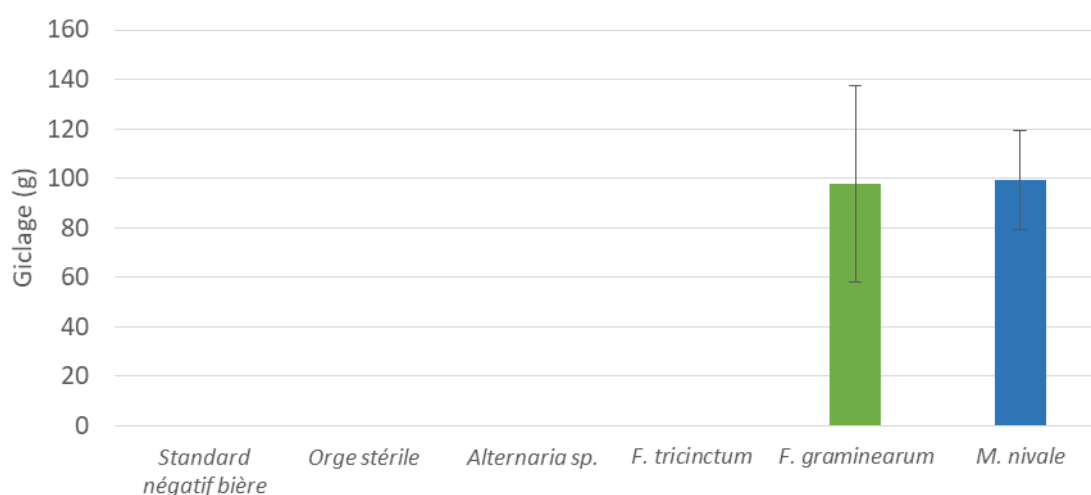


Figure 48. Quantification du giclage après extraction de composés à l'eau ultrapure en surface d'orge artificiellement contaminée par *Alternaria sp.*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium graminearum* et *Microdochium nivale* selon le protocole Carlsberg modifié dans de la bière après 3 jours d'agitation (n = 3).

La Figure 48 montre une très nette activité giclante de l'extrait de surface aqueux de *M. nivale* et *F. graminearum* (respectivement 100 g et 97 g de liquide giclé) alors que l'extrait de surface d'*Alternaria sp.* et de *F. tricinctum* ainsi que les deux contrôles (extrait de surface d'orge stérilisée et standard négatif de bière) ne présentent pas de potentiel giclant. Lors de leur propagation sur l'orge, les moisissures vont excréter différentes molécules pour dégrader la surface du grain, améliorer leur adhésion et faciliter la croissance du mycélium. Certaines protéines, comme les hydrophobines, qui ont des propriétés giclantes, ont un rôle lors de la propagation du mycélium à l'interface air / liquide en diminuant les tensions de surface et en améliorant leur adhésion à la surface du grain d'orge (Whiteford et Spanu 2002). Une première étape de caractérisation des molécules de l'extrait est réalisée en dosant la quantité d'azote dans les extraits de surface de moisissures.

Le Tableau 3 montre la teneur en azote total mesuré par Kjeldhal sur les extraits de surface d'orges stériles et artificiellement contaminées.

Tableau 3. Concentration en azote après l'extraction solide / liquide de l'orge contaminée par des moisissures. L'azote a été quantifié par la méthode Kjeldhal.

Souche	Concentration en azote (mg/L)
<i>M. nivale</i>	171,0 ± 9
<i>F. tricinctum</i>	188,8 ± 9
<i>F. graminearum</i>	131,2 ± 9
<i>Alternaria sp.</i>	124,8 ± 9
Orge stérile	32,0 ± 9

Comme attendu, l'orge stérile a la plus basse concentration en azote total. Pour les autres extraits, la teneur en azote total est faible. Seuls les composés présents en surface de l'orge, produits en faibles quantités, sont extraits. Nous pouvons observer une diversité de concentrations selon les souches avec un maximum à 188,5 mg/L pour *F. tricinctum* et un minimum à 124,8 mg/L pour *Alternaria sp.*. Les différences observées entre les moisissures pourraient provenir de leur capacité à produire des protéines et à dégrader la surface de l'orge pour améliorer la disponibilité des protéines intracellulaire (Ward et Moo-Young 1989). Nous pouvons constater que l'activité giclante ne semble pas corrélée avec la teneur en azote. L'extrait de *F. tricinctum* qui a la plus haute teneur en azote (188,8 g) ne présente pas de giclage. Quant à *M. nivale* qui contient 23 % d'azote en plus que *F. graminearum*, il montre le même potentiel giclant que ce dernier.

Pour étudier le profil protéique de chaque souche, les extraits de surface ont été analysés par SDS-PAGE (Figure 49).

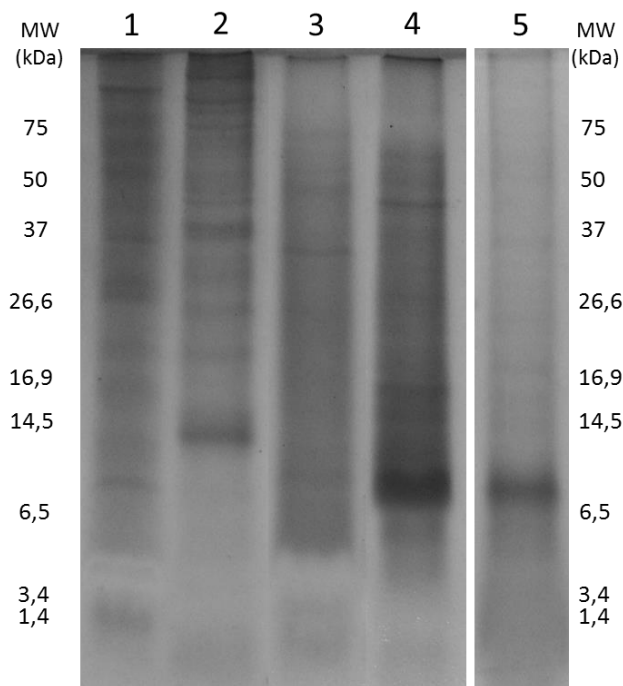


Figure 49. Analyse par SDS-PAGE d'extrait de surface d'orges artificiellement contaminées par des moisissures. *Fusarium tricinctum* (1), *Alternaria sp.* (2), *Fusarium graminearum* (3), *Microdochium nivale* (4). Un extrait d'orge stérile a été utilisé comme témoin (5). Les protéines ont été séparées en conditions réductrices sur un gel à 15 % d'acrylamide puis colorées au bleu de Coomassie G250.

La Figure 49 représente les résultats en SDS-PAGE des extraits aqueux d'orges artificiellement contaminées et des extraits aqueux d'orges stérilisées. Des protéines avec des poids moléculaires compris entre 6 et 75 kDa et au-delà sont observées dans chaque extrait. Néanmoins, les profils protéiques semblent différents d'un microorganisme à l'autre. Sans informations complémentaires, il est difficile de discriminer les protéines provenant des moisissures de celles de l'orge. Des protéines, allant de 8 à 15 kDa, correspondant à la gamme de masses des hydrophobines sont observées dans l'extrait de *M. nivale*. Malheureusement, elles sont aussi présentes dans l'extrait d'orges stérilisées. Les protéines provenant de l'orge sont bien mieux référencées dans la littérature que les protéines de *Microdochium nivale* ou *Fusarium*. Les protéines avec des tailles comprises entre 8 et 15 kDa pourraient correspondre à des protéines de stress appelées ns-LTPs et celles proches de 15 kDa sont probablement des précurseurs de thionines (α / β -thionines) excrétées lors de l'infection fongique du grain d'orge. Enfin, les protéines de PM allant de 30 et 40 kDa pourraient être des hordéines et/ou des protéines Z.

La suite de l'étude s'est focalisée sur la purification des composés produits par *M. nivale* à la surface de l'orge. Actuellement ce champignon ne présente pas de problème sanitaire majeur pour la santé humaine comme le genre *Fusarium*. Il est néanmoins impliqué dans la fusariose des céréales et spécialement de l'orge. De plus, la prévalence de la contamination de l'orge par *M. nivale* est en augmentation constante depuis 2013 et inquiète les acteurs de la filière orge - malt - bière. C'est pourquoi, il est intéressant d'étudier cette espèce en détail et d'évaluer son potentiel giclage.

Conclusion

Cette étude a permis de montrer que des composés excrétés et/ou dégradés par les moisissures en surface des grains sont capables, selon les filamenteux, de produire du giclage dans la bière. La méthode de production de ces composés et son extraction par de l'eau sont plus proches de ce qui est retrouvé dans la nature que ce qui est montré dans la littérature. Les composés sont produits dans un but de colonisation du grain d'orge par les moisissures ce qui se retrouve au niveau du champ. Nous avons observé que *M. nivale* et *F. graminearum* sont aptes à produire et/ou dégrader des composés ayant des propriétés giclantes. Inversement, *F. tricinctum* et *Alternaria sp.* ne conduisent pas à du giclage. Par contre, un autre phénomène est observé entre un extrait de *F. tricinctum* et un extrait de malt G-. Lorsque ces deux extraits sont portés à ébullition ensemble puis incubés dans la bière, un potentiel giclage apparaît (données non montrées). Cela pourrait signifier que des modifications de protéines de *F. tricinctum* avec des composés de l'extrait de malt (voir ns-LTP) ont lieu lors de l'ébullition.

3. Influence de la concentration en azote total sur le potentiel giclage

Avant de poursuivre les expérimentations, nous avons voulu savoir si le giclage était dépendant de la concentration en azote. En effet, la teneur en azote que l'on retrouve dans les extraits n'est pas corrélée au giclage. Pour cela, nous sommes partis de l'extrait brut de *M. nivale* et nous avons incubé quatre volumes différents dans des bouteilles de bière (50, 10, 1 et 0,1 mL) avec une concentration initiale en azote de 142 mg/L.

Ces volumes ont été incubés en triplicats dans des bouteilles de bière selon le protocole Carlsberg modifié et le potentiel giclage a été mesuré (Figure 3).

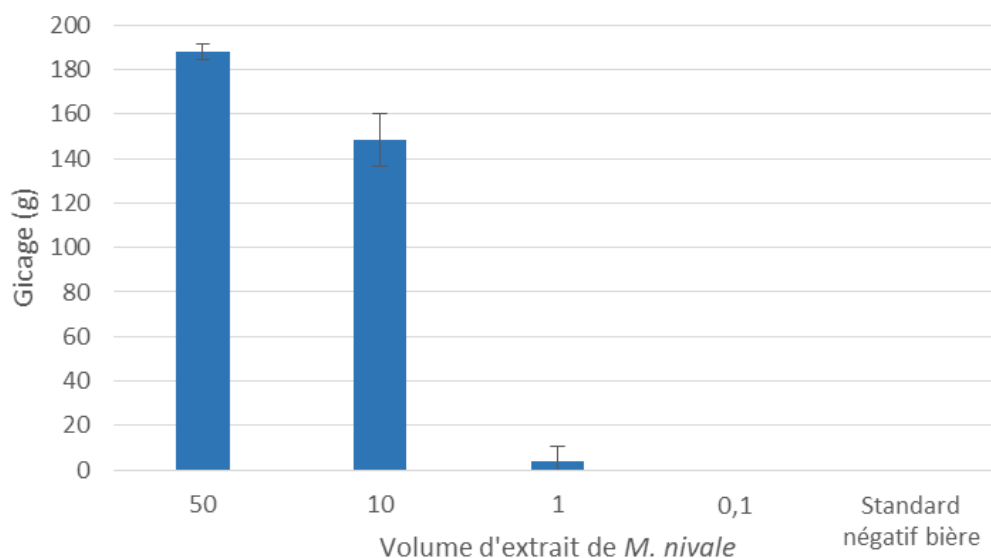


Figure 50. Influence de la quantité d'azote de l'extrait de *M. nivale* sur le potentiel giclage dans la bière.

Comme observé dans la Figure 50, une faible concentration en azote suffit pour obtenir du giclage. En comparant la concentration en azote des autres moisissures, on peut conclure que le giclage est dépendant de la souche et non de la teneur en azote. Dans la littérature, Deckers (2013) a montré que 240 μg d'hydrophobine (HFBI) de *Trichoderma reesei* a une activité giclante de 400 g dans 1 L d'eau carbonatée. De la même façon, Khalesi (2015) a montré que 226 μL de mousse contenant 26 μg d'HFBIII a un pouvoir giclant de 120 g dans 1 L. Ces résultats montrent qu'une faible quantité de composés giclants peut être suffisante pour induire le phénomène de giclage dans une boisson carbonatée.

Conclusion

Cette étude montre qu'une faible concentration en azote est suffisante pour induire du giclage. La teneur en azote ne peut pas être corrélée au giclage, il est souche dépendant comme montré avec *M. nivale*. Il est donc difficile de standardiser la matière première sur la concentration en azote et les composés impliqués dans le giclage sont probablement présents en très faibles quantités.

Nous allons donc regarder l'influence des différents composés (glucides, polyphénols et protéines) sur le giclage par la mise en œuvre d'une stratégie de fractionnement qui commencera par une séparation membranaire.

4. Séparation des composés par séparation membranaire

Les résultats observés sur l'extrait de malt, nous ont conduit à appliquer cette technique à l'orge artificiellement contaminée. Un extrait de surface a été produit à partir de ce type d'orge contaminée par *M. nivale*. Cette extraction a été réalisée avec de l'eau ultrapure sous une agitation de 150 rpm (Innova 44, New Brunswick). Une diafiltration a été effectuée sur cet extrait avec deux seuils de coupure, 5 et 30 kDa. Ces seuils de coupure ont été choisis car un composé potentiellement impliqué dans le giclage de la bière a un poids moléculaire supérieur à 5 kDa et inférieur à 30 kDa. Nous voulons ici éliminer les peptides, les petits composés ainsi que les macromolécules et maintenir les composés de cette gamme de PM dans le rétentat et comparer ces résultats avec ceux obtenus avec l'extrait de malt G+.

4.1. Fractionnement sur une membrane de 5 kDa en mode diafiltration

Une première étape de fractionnement sur 5 kDa a été initiée pour voir si des composés inférieurs à 5 kDa, potentiellement des hydrophobines, traversent la membrane ou bien sont retenues. Une étape de diafiltration a été initiée sur l'extrait de surface de *M. nivale*. Un ensemble de 8 diavolumes a été mis en place pour purifier les composés au-dessus de 5 kDa. Le rétentat a été analysé pour son potentiel giclage et le perméat obtenu a été préalablement concentré à l'évaporateur rotatif (30 °C et 30 mbar) d'un facteur 8 avant d'analyser le giclage. Un bilan de matière a été réalisé en dosant les protéines, les glucides et les polyphénols. La Figure 51 permet de visualiser les résultats de quantification du giclage.

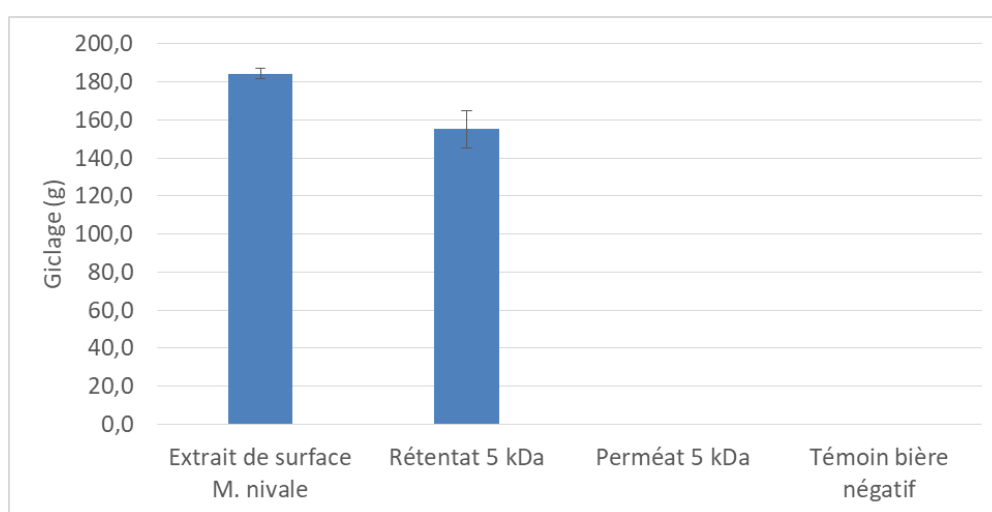
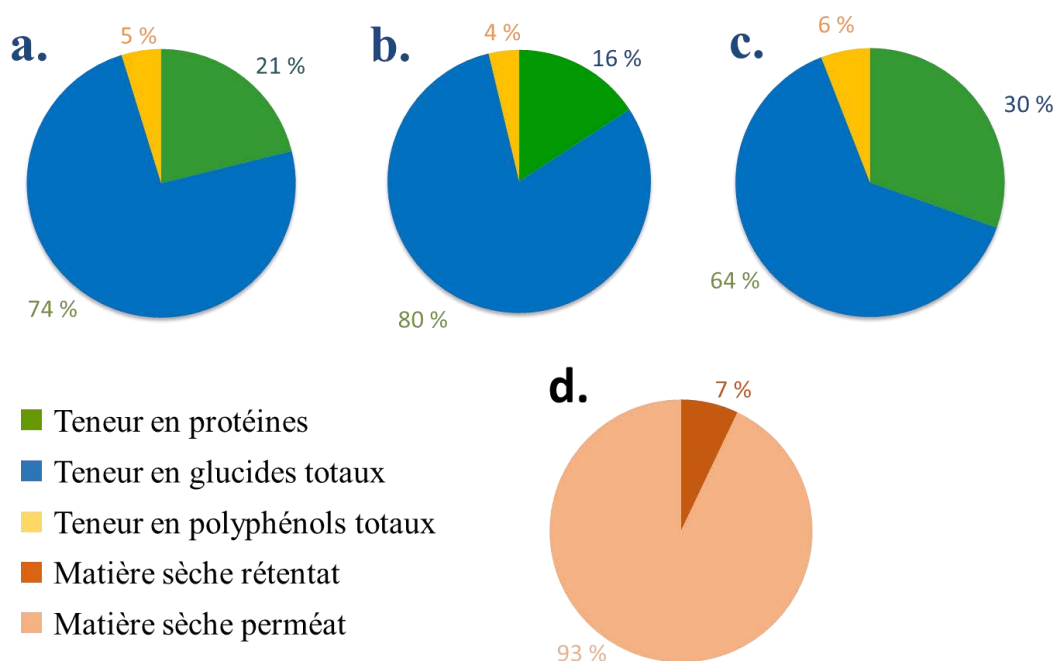


Figure 51. Quantification du giclage sur les extraits de malt et les fractions (rétentat et perméat) obtenues après fractionnement membranaire sur une membrane de 5 kDa. Ces échantillons ont été obtenus après une diafiltration de 8 diavolumes avec de l'eau ultrapure sur une membrane de 5 kDa.

Initialement un giclage important de 184 g est obtenu avec l'extrait de surface de *M. nivale* dans la bière. Nous pouvons voir que des composés retenus par la membrane (supérieurs à 5 kDa) présentent un pouvoir giclant de 155 g. Quant au perméat et au témoin de bière, ils sont sans effet giclant. D'après ces résultats, des composés de taille supérieure à 5 kDa provenant d'un extrait de *M. nivale* semblent impliqués dans le giclage de la bière. On observe les mêmes résultats qu'avec le fractionnement de l'extrait de malt G+ sur une membrane de 5 kDa. Un giclage de 120 g a été obtenu sur le rétentat 5 kDa de l'extrait de malt G+. Des composés de masses similaires à ceux rencontrés dans l'extrait de malt G+ pourraient avoir un rôle dans le giclage. Pour voir l'évolution des différents composés de l'extrait de surface de *M. nivale*, les protéines, les glucides totaux et les polyphénols ont été dosés (Figure 52).



	Matière sèche (mg/L)	Protéines (mg/L)	Glucides totaux (mg/L)	Polyphénols totaux (mg/L)
Extrait <i>M. nivale</i>	708	210 ± 9	740 ± 1	50 ± 4
Rétentat 5 kDa	48	16 ± 9	64 ± 1	4 ± 4
Perméat 5 kDa	642	210 ± 9	440 ± 1	20 ± 4

Figure 52. Bilan de matière (protéines, glucides totaux, polyphénols et matière sèche) de l'extrait de surface d'orge artificiellement contaminé par *M. nivale* (a), du rétentat 5 kDa (b) et du perméat 5 kDa (c) après fractionnement sur une membrane de 5 kDa. La matière sèche du rétentat et du perméat est illustrée dans le camembert d.

L'extrait brut (a) est constitué pour sa plus grande partie de glucides (74 %), de protéines (21 %) et de polyphénols (5 %). Le fractionnement membranaire permet de réduire la complexité de la matière première (réduction de 93 % de la matière sèche) tout en préservant l'activité glicante dans le rétentat 5 kDa (b). Les glucides représentent une grande partie du rétentat 5 kDa (80 %) et le reste est constitué de protéines (16 %) et de polyphénols libres (4 %). Le perméat (c), quant à lui, contient plus de protéines que le rétentat avec 30 % de la matière sèche totale.

Pour aller plus loin, les différentes fractions (extrait de surface de *M. nivale*, rétentat 5 kDa et perméat 5 kDa) ont été analysés par chromatographie de phase inverse et par SDS-PAGE (figure 53 respectivement 1a, 2a, 3a et 1b, 2b et 3b). Pour visualiser les protéines en SDS-PAGE, les échantillons ont été concentrés 40 fois.

En comparant l'extrait brut (1a) et le perméat (3a), il ne semble pas y avoir de différences notables de profils, seule l'intensité est plus importante dans l'extrait brut (1a). Concernant le rétentat 5 kDa (2a), on observe une diminution de la complexité de l'échantillon avec une absence de pics. Par SDS-PAGE nous observons l'existence de tailles variées de protéines. Dans l'extrait brut (1b), nous avons un large spectre de poids moléculaires de 8 à 117 kDa avec une intensité plus marquée à 6,5, 8, (ns-LTP), 14,85 (précurseurs d' α / β -thionines), 19,3, 25,1, 29,8 (hordéines), 45,8, 52,7, 66 et 85 kDa. Des bandes équivalentes sont observées dans le rétentat (2b) mais les bandes sont moins intenses. Dans le perméat (3b), la fraction protéique est faible mais il y a présence de bandes intenses à 6,5 et 85 kDa. En comparant l'extrait brut et le rétentat 5 kDa, une nette diminution de la complexité de l'extrait est apparue par chromatographie. Le profil chromatographique est assez proche entre l'extrait brut et le perméat 5 kDa mais les profils protéiques en SDS-PAGE sont très différents. Nous supposons que les composés (avec une absorbance élevée à 280 nm entre 10 et 20 mn) vus dans le profil CLHP ne sont pas des protéines.

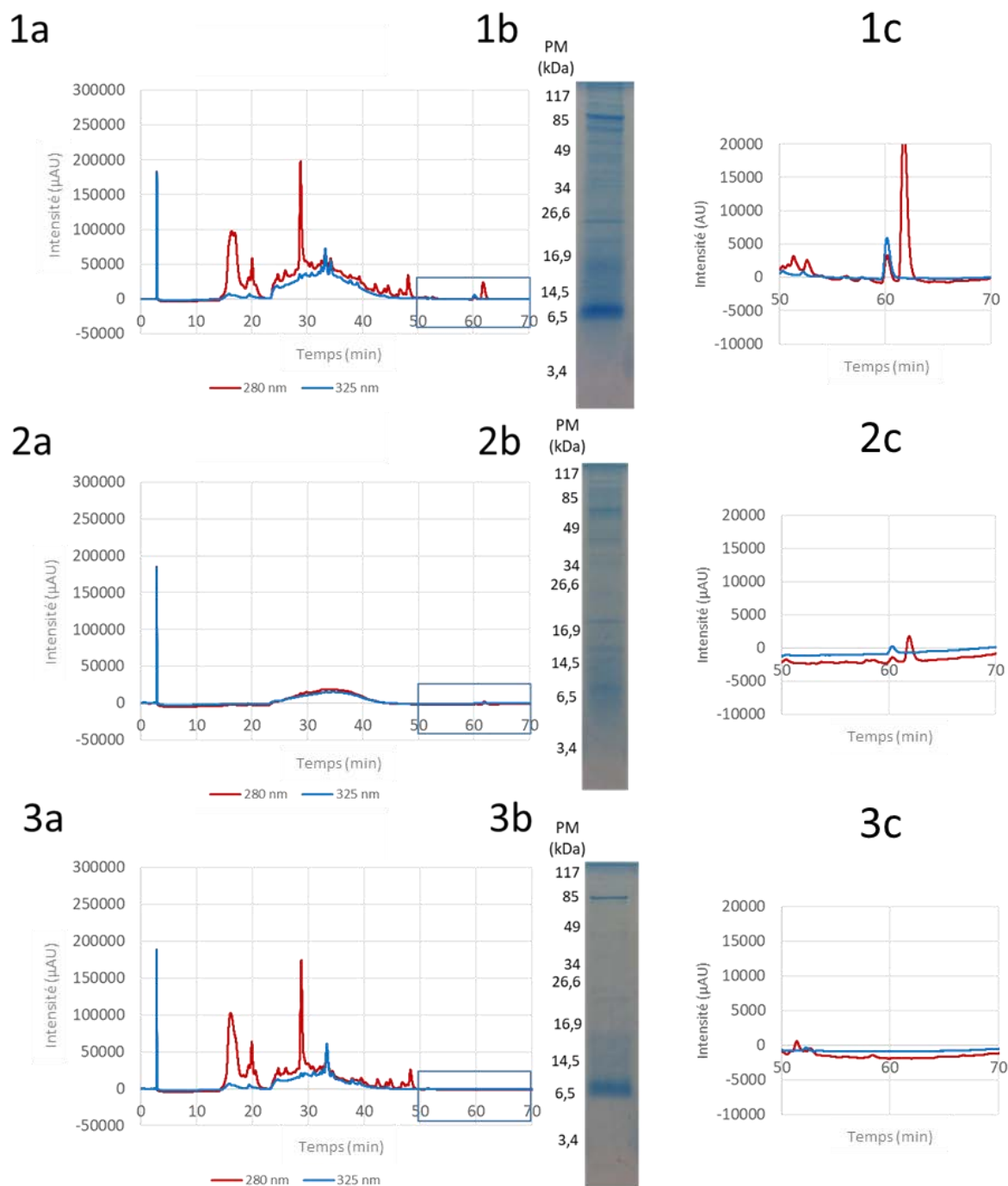


Figure 53. Analyse des protéines par chromatographie de phase inverse (a) et SDS-PAGE (b) d'extrait de *M. nivale* (1), de rétentat 5 kDa (2) et de perméat 5 kDa (3) après fractionnement sur une membrane de 5 kDa. L'analyse est effectuée sur une colonne C4 et l'éluion est réalisée avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 100 % en 60 mn. Les protéines sont séparées sur un gel à 15 % d'acrylamide en condition réductrice et visualisées par une coloration au bleu de Coomassie G250. Un agrandissement du chromatogramme est présenté en 1c, 2c et 3c.

En comparant l'extrait brut (1a) et le perméat (3a), il ne semble pas y avoir de différences notables de profils, seule l'intensité est plus importante dans l'extrait brut (1a). Concernant le rétentat 5 kDa (2a), une diminution de la complexité de l'échantillon est notable à travers une

absence de pics. Par SDS-PAGE nous observons l'existence de tailles variées de protéines. Dans l'extrait brut (1b), nous avons un large spectre de poids moléculaires de 8 à 117 kDa avec une intensité plus marquée à 6,5, 8, (ns-LTP), 14,85 (précurseurs d' α / β -thionines), 19,3, 25,1, 29,8 (hordéines), 45,8, 52,7, 66 et 85 kDa. Des bandes équivalentes sont observées dans le rétentat (2b) mais les bandes sont moins intenses. Dans le perméat (3b), la fraction protéique est faible mais il y a présence de bandes intenses à 6,5 et 85 kDa. En comparant l'extrait brut et le rétentat 5 kDa, une nette diminution de la complexité de l'extrait est apparue par chromatographie. Le profil chromatographique est assez proche entre l'extrait brut et le perméat 5 kDa mais les profils protéiques en SDS-PAGE sont très différents. Nous supposons que les composés (avec une absorbance élevée à 280 nm entre 10 et 20 mn) vus dans le profil CLHP ne sont pas des protéines. Ces composés absorbent à 280 et 325 nm (pour le premier pic) et à 280 nm (pour le deuxième). Ces composés sont très hydrophobes et pourraient avoir des propriétés proches des hydrophobines (surtout pour le deuxième pic).

Conclusion

Selon le fractionnement sur 5 kDa, des composés de taille inférieure à 5 kDa semblent impliqués dans le giclage. L'approche suivie a permis de réduire la complexité de la matière de l'ordre de 93 % tout en préservant un giclage important de 155 g dans le rétentat (contre 184 g dans l'extrait brut). L'absorbance à 280 nm ne nous permet pas de visualiser des composés mais, néanmoins, des pics situés à 60 mn (composés très hydrophobes) apparaissent dans les échantillons giclants. Ces résultats sont proches de ceux observés sur l'extrait de malt G+. Des composés de PM similaires à ceux observés sur l'extrait de malt pourraient être impliqués dans le giclage.

4.2. Fractionnement sur une membrane de 30 kDa en mode diafiltration

La diafiltration a été poursuivie en fractionnant avec une membrane de 30 kDa. De la même façon qu'avec la membrane de 5 kDa, la diafiltration a été augmentée jusqu'à 8 volumes. Le rétentat a été analysé en giclage et le perméat a été concentré 8 fois avant d'être analysé. Le giclage a été mesuré dans la bière. Un standard de bière et un extrait de surface de *M. nivale* ont été également analysés. Les résultats sont rassemblés dans la Figure 54. Un pouvoir giclant élevé est observé dans le rétentat 30 kDa (100 g) ce qui est différent du fractionnement de

l'extrait de malt où le giclage a été observé dans le perméat 30 kDa. D'après les résultats obtenus, le perméat 30 kDa ne présente pas de pouvoir giclant. Des composés supérieurs à 30 kDa semblent être impliqués dans le giclage. Une agrégation de composés de petit poids moléculaire peut expliquer qu'elle soit retenue par la membrane et qu'un giclage soit observé avec le rétentat.

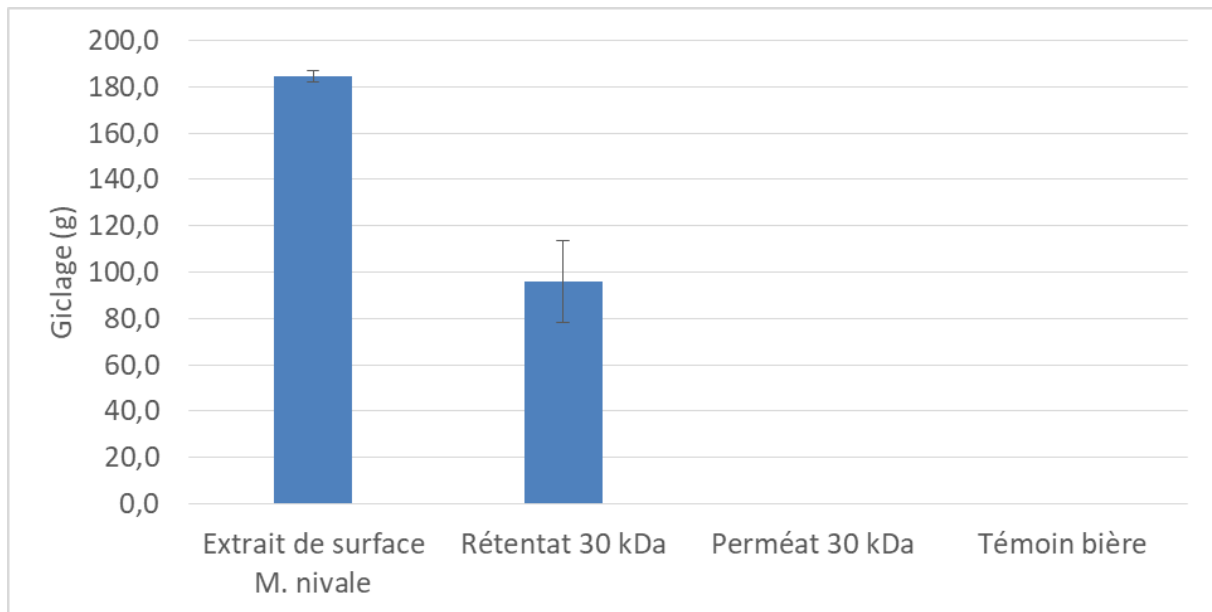
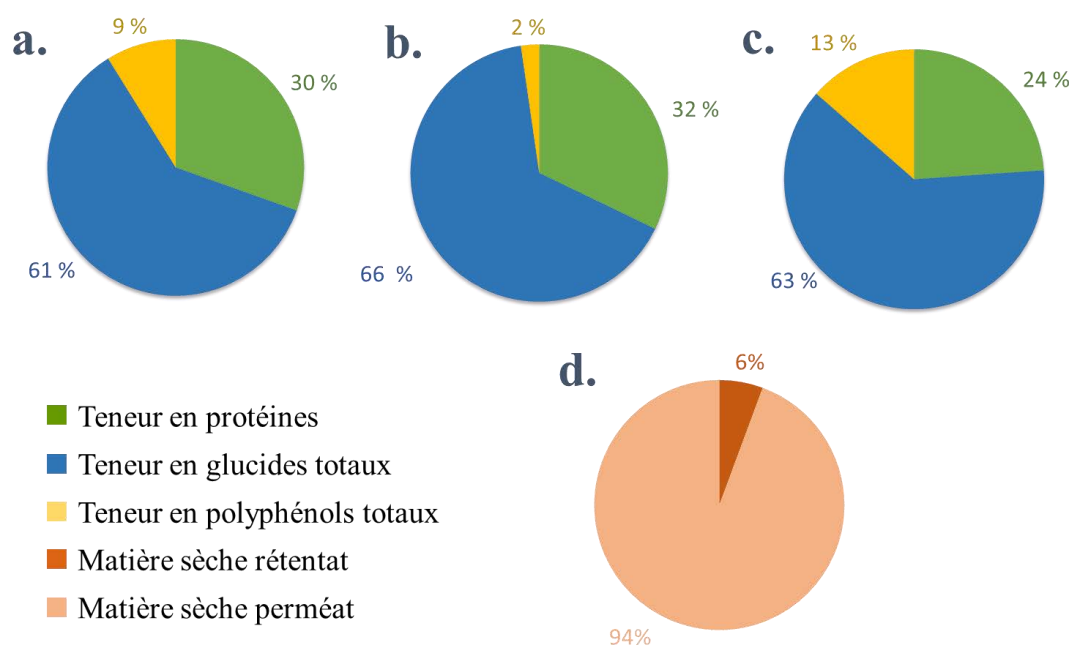


Figure 54. Quantification du giclage sur les extraits de malt et les fractions (rétentat et perméat) obtenues après fractionnement membranaire sur une membrane de 30 kDa. Ces échantillons ont été obtenus après une diafiltration de 8 diavolumes avec de l'eau ultrapure sur une membrane de 30 kDa.

Pour suivre l'évolution des différents composés dans l'extrait de surface, le perméat et le rétentat, les protéines, les glucides totaux et les polyphénols ont été dosés (Figure 55).



	Matière sèche (mg/L)	Protéines (mg/L)	Glucides totaux (mg/L)	Polyphénols totaux (mg/L)
Extrait <i>M. nivale</i>	900	160 ± 9	330 ± 1	120 ± 4
Rétentat 30 kDa	68	65 ± 9	130 ± 1	4 ± 4
Perméat 30 kDa	568	360 ± 9	210 ± 1	63 ± 4

Figure 55. Bilan de matière (protéines, glucides totaux, polyphénols et matière sèche) de l'extrait de surface d'orge artificiellement contaminée par *M. nivale* (a), du rétentat 30 kDa (b) et du perméat 30 kDa (c) après fractionnement sur une membrane de 30 kDa. La matière sèche du rétentat et du perméat est illustrée sur le graphique d.

Une grande quantité de la matière sèche de l'extrait de surface (a) est constituée de glucides totaux 61 % (en grande partie de l'amidon non hydrolysé), de protéines 30 % et de polyphénols 9 %. Cette méthodologie de fractionnement permet de réduire la complexité de la matière première (réduction de 94 % de la matière sèche) (d) tout en préservant l'activité giclante du rétentat. Dans le rétentat (b), les glucides représentent 66 % de la matière sèche et les protéines 32 %.

En poursuivant notre démarche, une analyse par chromatographie de phase inverse et une SDS-PAGE a été réalisée sur l'extrait de malt, le rétentat et le perméat 30 kDa (Figure 56 respectivement 1a, 2a, 3a et 1b, 2b et 3b). Pour visualiser les protéines en SDS-PAGE, les échantillons ont été concentrés 40 fois.

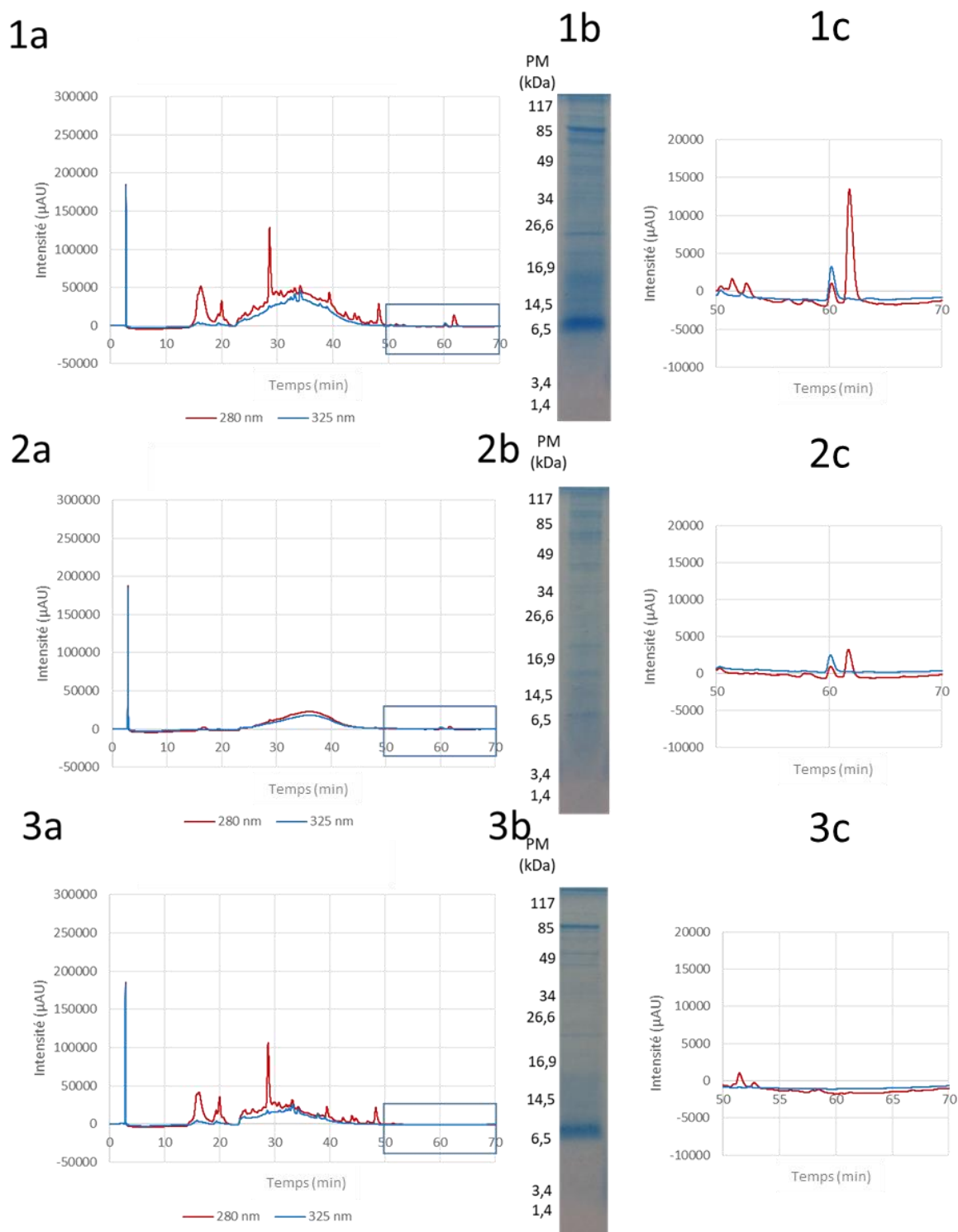


Figure 56. Analyse des protéines par chromatographie de phase inverse (a) et SDS-PAGE (b) d'extrait de *M. nivale* (1), de rétentat 30 kDa (2) et de perméat 30 kDa (3) après fractionnement sur une membrane de 30 kDa. L'analyse est effectuée sur une colonne C4 et l'éluion est réalisée avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 100 % en 60 mn. Les protéines sont séparées sur un gel à 15 % d'acrylamide en condition réductrice et visualisées par une coloration au bleu de Coomassie G250. Un agrandissement du chromatogramme est présenté en 1c, 2c et 3c.

En comparant l'extrait brut (1a) et le rétentat 30 kDa (2a), il apparaît néanmoins une nette diminution de la complexité de l'extrait par chromatographie en phase inverse ; il en est de même par SDS-PAGE. Seule la protéine à 37 kDa est encore présente dans le rétentat. Le reste des protéines de l'extrait est visible dans le perméat 30 kDa. Néanmoins, un profil chromatographique assez proche apparaît entre l'extrait brut et le perméat 30 kDa qui contiennent encore beaucoup de composés phénoliques. Ces résultats sont cohérents avec ceux que l'on pouvait attendre ; ainsi, les composés supérieurs à 30 kDa ont bien été retenus par la membrane. Deux composés présents dans l'extrait brut (Figure 56 1c) et le rétentat (Figure 56 2c) sont absents dans le perméat (figure 9 3c). On retrouve les mêmes pics après 60 mn, présents seulement dans les échantillons giclants (extrait brut et rétentat 5 et 30 kDa).

Conclusion

Selon le fractionnement sur une membrane de 30 kDa, des composés de taille supérieure à 30 kDa semblent impliqués dans le giclage. Nous observons un résultat inverse à celui rencontré avec l'extrait de malt G+. Il peut être supposé que l'orge artificiellement contaminée est bien plus chargée en composés giclants que l'extrait de malt. Les composés potentiellement impliqués dans le giclage sont sûrement produits en plus grande quantité sur l'orge infestée. Des études (Kallio *et al.* 2007) ont montré que les hydrophobines s'associent préférentiellement entre elles lorsque leur concentration dans le milieu augmente sensiblement et forment différentes structures, des dimères jusqu'à la monocouche. Une dissociation de ces multimères peut avoir lieu dans la bière ce qui explique que l'on ait un giclage dans le rétentat 30 kDa. Des composés inférieurs à 30 kDa sont visibles lors de l'analyse du rétentat par SDS-PAGE. Cela renforce l'idée qu'une association de composés a lieu et que ces structures soient retenues par la membrane à 30 kDa. Comme dans les fractions giclantes sur le fractionnement 5 kDa, des pics situés à 60 mn (composés très hydrophobes) apparaissent.

Conclusion sur le fractionnement membranaire

Ce fractionnement, comme celui effectué sur l'extrait de malt, a apporté des informations très intéressantes sur les composés impliqués dans le giclage. A l'inverse de l'extrait de malt, des composés supérieurs à 30 kDa semblent impliqués dans le giclage. Néanmoins, comme observé dans le rétentat de 30 kDa par SDS-PAGE, des composés inférieurs à 30 kDa sont présents dans

l'échantillon. Cela peut s'expliquer par une dissociation de structures ayant une taille supérieure à 30 kDa sous l'action d'une dénaturation thermique et du traitement au β -mercaptoéthanol). Ces composés, étant en plus grande concentration, pourraient avoir un comportement proche des hydrophobines et donc se multimériser et s'assembler. Il est à noter que, comme les hydrophobines, ce sont des composés très hydrophobes et qu'ils peuvent avoir, comme montré avec l'extrait de malt, un PM proche de celui des hydrophobines. De plus, des pics correspondant à des composés très hydrophobes sont observés par chromatographie dans les échantillons giclants (extrait brut et rétentat 5 et 30 kDa). Cela renforce l'hypothèse que ces composés très hydrophobes présents dans nos échantillons pourraient avoir des propriétés giclantes.

Cette méthodologie de fractionnement par membrane a permis de réduire fortement la complexité de l'extrait de surface en terme de quantité de matière (jusqu'à 95 % avec la membrane de 5 kDa). De plus, en comparant les profils de chromatographie 30 kDa avec ceux de 5 kDa, les mêmes pics sont observés à 60 mn dans les rétentats giclants. Ces composés pourraient être impliqués dans le giclage.

Néanmoins, les composés (glucides, protéines et polyphénols) constituant l'extrait ne sont pas isolés. Une méthode de fractionnement plus spécifique des composés doit alors être mise en œuvre pour mieux les séparer et quantifier leurs éventuelles activités giclantes.

5. Fractionnement des composés selon leur caractère hydrophobe

Dans l'optique d'identifier les composés impliqués dans le giclage dans les extraits de surface, une première étape de fractionnement par chromatographie de phase inverse a été réalisée. L'objectif de cette étape a été de réduire la complexité de l'extrait et de séparer ses constituants (pas uniquement les protéines mais aussi les glucides totaux et les polyphénols) selon leurs propriétés et étudier leur potentiel giclage.

Les molécules impliquées dans le giclage ont probablement de fortes propriétés interfaciales et sont très hydrophobes. Par conséquent, le fractionnement sera effectué par chromatographie en phase inverse pour séparer les composés selon leur hydrophobie. La Figure 57 présente le profil de CLHP de l'extrait de surface d'orge contaminée par *Microdochium nivale*.

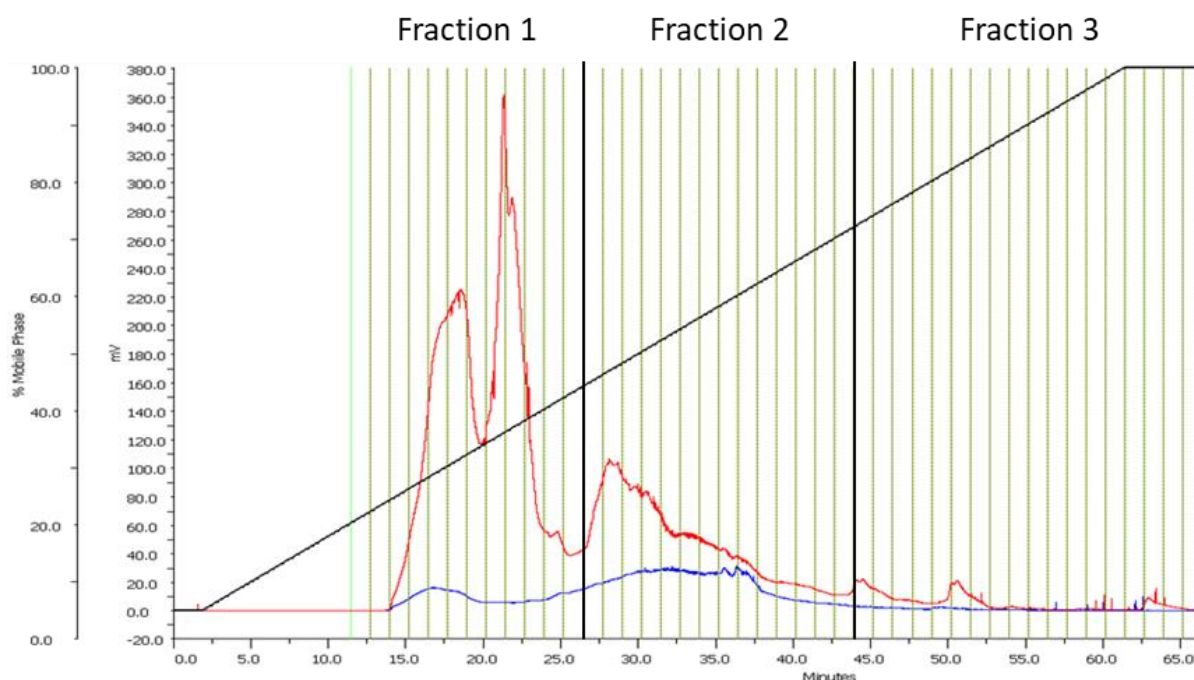


Figure 57. Fractionnement d'extrait de *M. nivale* par chromatographie de phase inverse sur une colonne Zorbax C3. L'élution a été réalisée avec un gradient d'ACN de 5 à 100 % (en noir). L'absorbance est mesurée à 280 (en rouge) et 325 nm (en bleu).

Le profil protéique à 280 nm fait apparaître trois pics ayant une absorbance élevée entre 14 et 37,5 mn. Les polyphénols libres sont suivis à 325 nm. Figure 10, deux pics entre 15 et 20 mn et entre 25 et 37,5 mn sont observés.

Selon ces résultats, le profil peut être séparé en trois fractions pour étudier leur giclage. Une première avec une absorbance élevée à 280 nm et une faible hydrophobie, une deuxième avec une absorbance moyenne à 280 nm et hydrophobie moyenne et une troisième avec une faible absorbance à 280 nm et une importante hydrophobie des composés élués. Le potentiel giclage de chaque fraction a été quantifié et les résultats sont réunis dans la Figure 58.

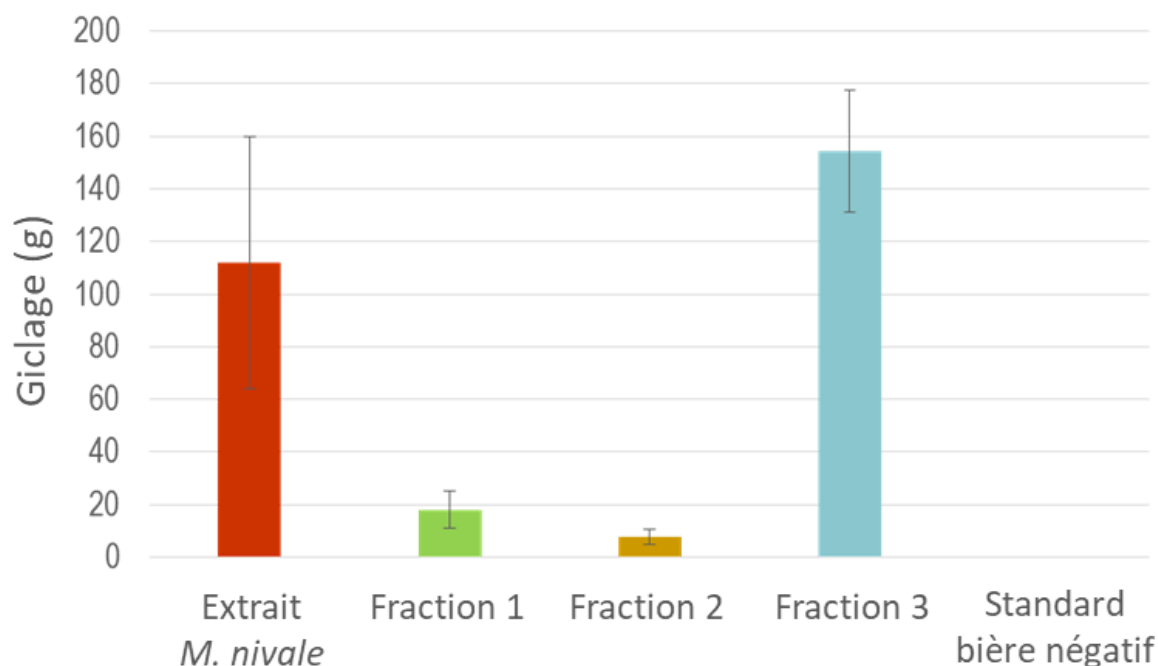


Figure 58. Analyse du potentiel giclage des différentes fractions obtenues après séparation par chromatographie en phase inverse de l'extrait de surface d'orge contaminée par *M. nivale*. Le giclage a été quantifié selon le protocole Carlsberg modifié dans la bière après 3 jours d'agitation à 60 rpm (n=3).

Comme cela pouvait être supposé, un haut potentiel giclage (115 g) est observé avec un extrait de surface d'orge contaminée par *M. nivale*. Au niveau des fractions, seule la fraction 3 a une activité giclante significative (155 g). Selon les propriétés de la colonne, nous pouvons conclure que les composés présentant une activité giclante ont un caractère hydrophobe important (élution à partir de 70 % d'ACN), une faible absorbance à 280 nm et aucune absorbance à 325 nm.

Pour avoir une meilleure caractérisation des fractions, la concentration en azote, polyphénols et glucides a été quantifiée. Ici, l'objectif a été de savoir lesquels de ces composés pourraient présenter un potentiel giclant. Le Tableau 4 récapitule la teneur en azote, en polyphénols et en glucides de chaque échantillon.

Tableau 4. Quantification de l'azote, des glucides et des polyphénols dans l'extrait brut et les fractions définies dans la Figure 57 (volume de chaque échantillon : 150 mL).

Echantillons	Quantité d'azote (mg)	Quantité de glucides (mg)	Quantité de polyphénols (mg)
Extrait brut	104 ± 9	66 ± 4	24 ± 1
Fraction 1	82 ± 9	36 ± 4	2,5 ± 1
Fraction 2	13,5 ± 9	0 ± 4	5 ± 1
Fraction 3	8,5 ± 9	0 ± 4	2 ± 1

Les différences entre les teneurs initiales et finales des glucides et des polyphénols pourraient s'expliquer par une rétention de ces composés dans la pré-colonne. La plus importante concentration en azote et en glucides est observée dans la fraction 1. Cette teneur en azote semble liée à l'intensité importante observée sur le profil CLHP à 280 nm (Figure 57). De la même façon, la teneur en polyphénols est corrélée avec le profil à 325 nm avec une intensité plus importante (5 mg) observée dans la fraction 2 comparativement à la fraction 1. La fraction 3, celle qui gicle, contient la plus faible teneur en azote et en polyphénols. Selon la quantification des polyphénols (Tableau 4) seulement 40 % de la fraction polyphénolique sont récupérés après fractionnement. Cette fraction perdue pourrait être retenue par la colonne et serait éluée lors du lavage. Ces résultats suggèrent que les glucides ne sont pas impliqués dans le phénomène de giclage. Comme cela a été déjà présenté dans le Tableau 3, le giclage ne peut pas être corrélé avec la teneur en azote et la réduction du taux de polyphénols ne semble pas affecter son activité. Pour étudier le profil protéique, les fractions ont été analysées par SDS-PAGE (Figure 59).

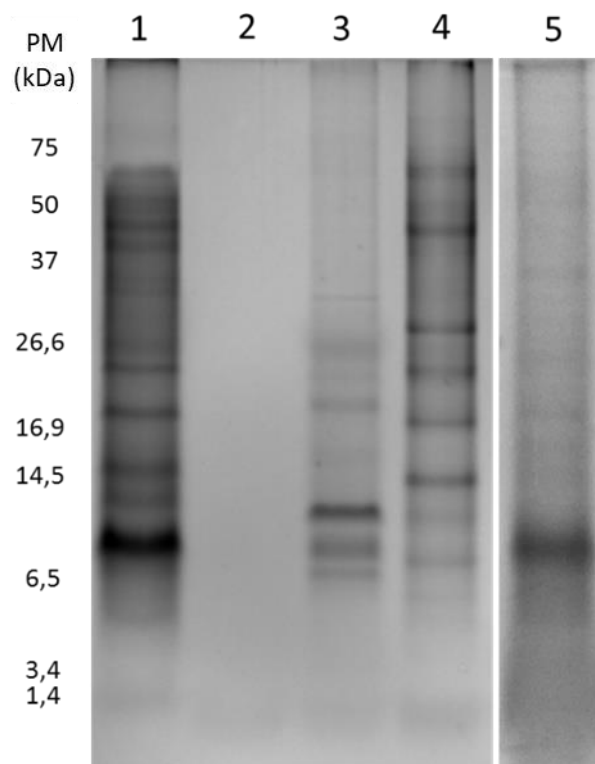


Figure 59. Analyse par SDS-PAGE de l'extrait brut (1), la fraction 1 (2), la fraction 2 (3) et la fraction 3 (4) obtenue après fractionnement par chromatographie en phase inverse. Un extrait de surface d'orge a aussi été analysé (5). Les protéines sont séparées sur un gel d'acrylamide à 15 % en conditions réductrices puis colorées avec du bleu de Coomassie G250.

La Figure 59 montre le profil protéique de chaque fraction (2, 3, 4) comparé à l'extrait brut (1) et à l'extrait d'orge stérile (5). Il n'y a pas de protéines visibles dans la fraction 1 (2) par SDS-PAGE. Nous pouvons supposer que la fraction 1 est composée de très petits peptides invisibles sur le gel de SDS-PAGE. Une faible partie des protéines est visualisée dans la fraction 2 (3) avec des poids moléculaires de 6,8, 8,6, 10,8, 19,9, 24,2 et 34 kDa. Dans la fraction 3 (4), nous observons un large spectre de poids moléculaires de 6,1 à 66 kDa mais avec une intensité plus importante pour les bandes à 6,1, 8, 11,3, 14,85, 19,3, 25,1, 29,8, 45,8, 52,7 et 66 kDa. Un certain nombre de bandes de *M. nivale* est observé dans l'extrait de surface d'orge stérile.

Selon ces résultats, la première fraction contient une grande concentration de petits peptides, de polyphénols et de glucides. La seconde fraction regroupe des protéines de faible poids moléculaire avec une grande absorbance à 280 nm et une grande concentration de polyphénols libres (fraction 2). Enfin, la dernière fraction (3) contient une faible part de polyphénols et de protéines de tailles variables et présentant un haut caractère hydrophobe.

Au vu de ces résultats, les protéines sont fortement suspectées d'être impliquées dans le phénomène de giclage. Au regard des résultats de la littérature, des protéines comme des hydrophobines ont des poids moléculaires et des propriétés (hydrophobie élevée) proches de celles observés en CLHP et SDS-PAGE (Kallio *et al.* 2007).

Conclusion

Nous avons pu séparer les constituants entre eux. Les glucides sont peu retenus par la colonne et sont élués au début du profil. De même, une grande quantité des polyphénols est élue hors de la fraction giclante. Enfin, nous avons pu montrer qu'une partie de la fraction protéique semble impliquée dans le giclage.

Nous allons mettre en œuvre une méthodologie d'isolement des protéines par gel 2D pour ensuite permettre leur identification.

6. Identification des protéines dans la fraction giclante

Le fractionnement par chromatographie en phase inverse a permis de réduire la complexité de l'extrait de surface de *M. nivale* et d'identifier une fraction avec des propriétés giclantes. A cette étape, l'objectif est d'isoler les protéines de la fraction giclante et de pouvoir les identifier d'après les bases de données existantes. Pour améliorer la séparation des protéines, une électrophorèse bidimensionnelle doit être mise en œuvre et les spots protéiques isolés seront alors digérés par la trypsine et analysés en spectrométrie de masse.

La Figure 60 présente l'analyse en gel bidimensionnel de la fraction giclante (colonne 4, Figure 59) de l'extrait de surface de *M. nivale*. Cet extrait contient un grand nombre de protéines sur une gamme de pI entre 3 et 7.

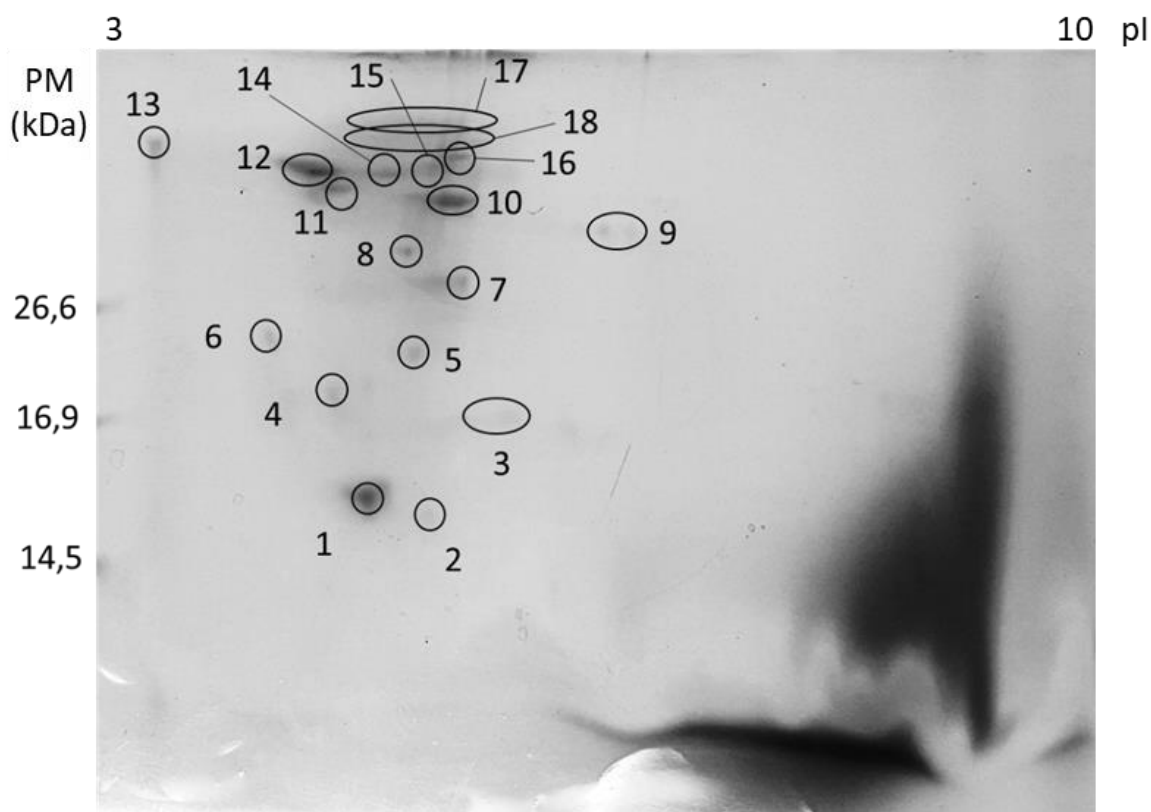


Figure 60. Sélection des spots d'intérêt après analyse en électrophorèse bidimensionnelle de la fraction giclante d'un extrait de surface de *M. nivale* après fractionnement en chromatographie de phase inverse. Les protéines sont séparées sur une IPG strip de pI 3-10 pour la première dimension et sur un gel d'acrylamide à 15 % pour la deuxième dimension. Les protéines sont colorées avec du bleu de Coomassie G 250.

L'identification des protéines d'extrait de surface de *M. nivale* isolé sur gel 2D est reliée à des informations de séquence dans les bases de données. La base de donnée NCBI nr (mise à jour le 10 mai 2017) est utilisée car elle contient la plus grande collection de séquences protéiques, avec notamment 13.281 séquences du genre *Microdochium* dont 13.170 de *Microdochium bolleyi* qui est l'espèce de *Microdochium* la plus étudiée.

En combinant l'analyse des spots par MALDI-TOF et en recherchant dans la base de données, un certain nombre de protéines a été identifié. De bons spectres ont été obtenus pour les 18 spots : 11 ont donné un résultat significatif dans la base de données avec, pour certains, plusieurs résultats. 8 protéines ont été identifiées comme appartenant au genre *Microdochium*. 7 identifications ont donné des résultats pour d'autres moisissures. Et seulement, 7 spots, malgré les bons signaux en MALDI-TOF, n'ont pas trouvé de correspondance. Le manque d'étude sur *Microdochium* pourrait expliquer sa relative absence dans les bases de données. Les résultats d'identification sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 5. Protéines provenant de la fraction giclante (figure 13) identifiées par MALDI-TOF et peptide mass fingerprint.

Spot	Protéines identifiées	Nom	Poids moléculaire (Da)	Organisme
1	Eliciting plant response protein (Epl1)	G9IS53_HYPAT	14,591	<i>Hypocrea atroviridis</i>
2	Pas d'identification	x	x	x
3	Ricin B lectin domain containing protein	A0A136J0G2_9PEZI	17,587	<i>Microdochium bolleyi</i>
4	Pas d'identification	x	x	x
5	Pas d'identification	x	x	x
6	Pas d'identification	x	x	x
7	Pas d'identification	x	x	x
8	Aspartic peptidase domain containing protein	A0A136J0L6_9PEZI	43,224	<i>Microdochium bolleyi</i>
9	Aerobic respiration control arch	A0A0L1HGI6_9PLEO	231,327	<i>Stemphylium lycopersici</i>
10	Arylsulfatase	A0A136JFZ4_9PEZI	64,826	<i>Microdochium bolleyi</i>
11	Protéine non caractérisé	D7M0_TUBMM	93,582	<i>Tuber melanosporum</i>
	Putative glycoside hydrolase	M7TJ59_EUTLA	103,994	<i>Eutypa lata</i>
	Family 31 glycosyl hydrolase	A0A136J0S1_9PEZI	104,913	<i>Microdochium bolleyi</i>
12	Putative glycoside hydrolase family 31	M7TJ59_EUTLA	103,994	<i>Eutypa lata</i>
	Transposase IS4 family protein (fragment)	R8AW23_9ALTE	32,233	<i>Marinobacter lipolyticus</i>
13	Pas d'identification	x	x	x
14	Diphtamide biosynthesis protein 1	A0A136JN4_9PEZI	92,807	<i>Microdochium bolleyi</i>
15	Pas d'identification	x	x	x
16	Arylsulfatase	A0A136JFZ4_9PEZI	64,826	<i>Microdochium bolleyi</i>
17	β -glucosidase	A0A136JBN6_9PEZI	90,151	<i>Microdochium bolleyi</i>
	DegP2 peptidase	Q1GW67_SPHAL	40,012	<i>Sphingopyxis alaskensis</i>
18	Glyoxal oxidase like protein	A0A136JFM6_9PEZI	114,801	<i>Microdochium bolleyi</i>

Les protéines identifiées incluent des enzymes impliquées dans le métabolisme comme les glycosides hydrolases (k, l) qui hydrolysent le lien glycosidique entre deux hydrates de carbone ou plus et la β -glucosidase (q) qui permet la dégradation des parois cellulaires de l'orge. Des enzymes comme l'arylsulfatase (j, p) sont impliquées également dans le métabolisme des lipides. D'autres protéines sont impliquées dans la modification structurale de protéines, telle la protéine de biosynthèse de la diphtamide (n) qui est impliquée dans la voie de la biosynthèse peptidyle-diphtamide ainsi que des peptidases aspartiques (h) qui sont des protéases qui activent une molécule d'eau liée à un ou plusieurs résidus d'aspartate pour la catalyse de leurs substrats peptidiques. D'autres protéines intéressantes comme la glyoxal oxydase (r) sont impliquées dans le développement cellulaire, pour maintenir la morphologie des cellules et la croissance du mycélium. En comparant ces résultats avec les standards d'électrophorèse, quelques protéines ont des poids moléculaires plus élevés que prévu. Le poids moléculaire observé d'une

protéine peut différer de son poids moléculaire prévu pour un certain nombre de raisons biologiques. La masse d'une protéine peut être augmentée par des modifications post-traductionnelles, comme la glycosylation, l'ubiquitination, et la sumoylation. D'autre part, la masse peut être diminuée par des épissures et des clivages endoprotéolytiques. De plus, les sous-ensembles protéiques peuvent modifier la migration, incluant des groupements fortement acides, fortement basiques, et les protéines riches en arginine. Toutes les modifications peuvent changer la mobilité électrophorétique et le poids moléculaire final des protéines sur le gel.

En comparant les protéines identifiées aux propriétés des protéines potentiellement impliquées dans le giclage, un spot très intéressant (1) est ressorti. Il s'agit du spot 1 qui est une élicitase (Ep11). Cette protéine est un membre de la famille des cerato-platanines que l'on retrouve chez des champignons filamenteux pathogènes et non pathogènes tels qu'*Aspergillus nidulans* et *Neurospora crassa*. Les membres de cette famille de protéines sont impliqués dans la morphogénèse de la paroi cellulaire des moisissures. Au vu de cette fonction, il a été suggéré que les cerato-platanines pourraient avoir un rôle semblable à celui des hydrophobines. (Boddi *et al.* 2004). Ces auteurs ont montré que l'Ep11 contient des domaines hydrophobes ainsi que des domaines hydrophiles avec quatre résidus de cystéine. De plus, l'hydrophobine HFBI d'*Hypocrea jecorina*, impliquée dans le développement des hyphes, a un profil amphiphile semblable à celui de l'Ep11 d'*H. atroviridis* bien que l'Ep11, selon son modèle d'acides aminés, ne soit pas exactement une hydrophobine. En raison de ses propriétés et spécificités, cette protéine pourrait être un promoteur de giclage dans la bière.

Conclusion

Les résultats obtenus sur l'identification montrent la présence d'un composé ayant des propriétés identiques aux hydrophobines. Des études (Kallio *et al.* 2007 ; Kisko *et al.* 2008, 2009) ont montré que les hydrophobines s'associent préférentiellement entre elles lorsque leur concentration dans le milieu augmente sensiblement et forment différentes structures, sous forme de dimères voire sous forme de fibres. Une dissociation de ces multimères peut avoir lieu dans la bière, ce qui explique que l'on ait un giclage dans le rétentat 30 kDa. Des composés inférieurs à 30 kDa sont visibles lors de l'analyse du rétentat par SDS-PAGE. Cela renforce l'idée qu'une association de composés a lieu et que ces structures, de l'ordre de 34 kDa, soient retenue par la membrane à 30 kDa.

7. Analyse de la fraction giclante par diffusion dynamique de la lumière

Les hydrophobines sont des protéines avec des propriétés giclantes qui ont la capacité de s'auto assembler à l'interface gaz/liquide pour former des nanobulles appelées nanobombes détectable par DLS. Ces nanostructures ont un diamètre estimé de 100 nm. L'analyse particulaire par DLS est un outil très intéressant pour analyser des échantillons et les discriminer en terme de diamètre de particules (Nuter et Harms 2009 ; Christian *et al.* 2011 ; Deckers 2011). Cependant, cette technique a été décrite comme méthode alternative de détection précoce sur giclage dans des boissons carbonatées et plus spécialement dans la bière. En accord avec les propriétés des composés observées en termes de taille et de caractère hydrophobe proche des hydrophobines, les fractions giclantes et non giclantes obtenues après fractionnement ont été analysées pour identifier des structures spécifiques impliquées dans le giclage (Figure 61).

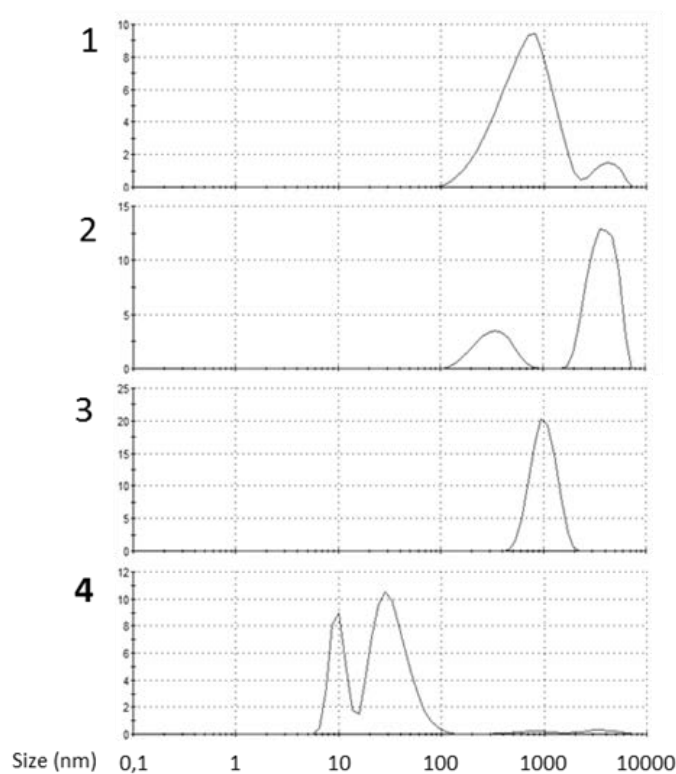


Figure 61. Profil de DLS de l'extrait brut (1), de la fraction 1 (2), de la fraction 2 (3) et de la fraction 3 (4) obtenue après fractionnement en chromatographie de phase inverse d'un extrait de surface de *M. nivale*.

Des structures entre 100 et 10.000 nm sont observées dans l'extrait et la fraction 1 (Figure 61) qui pourrait être des macromolécules comme les glucides. Des structures intéressantes, proches de 10 et 40 nm et absentes dans les fractions non giclantes, pourraient être impliquées dans le

giclage. Cela conduit à penser que des protéines provenant de l'extrait de surface d'orge contaminée par *M. nivale* avec des propriétés giclantes pourraient être capables de former des structures spécifiques. Comme les Epl 1 sont des protéines avec des propriétés similaires à celles des hydrophobines, il est probable que ces structures, de plus petite taille, pourraient être responsables du phénomène de giclage.

Conclusion

Des structures entre 10 et 40 nm ont été trouvées dans les extraits giclants. Ce sont des structures plus petites que celle formées par les hydrophobines mais d'après nos résultats, des protéines appelées Epl 1, présentes dans nos échantillons pourraient former ce type de structures.

8. Conclusion

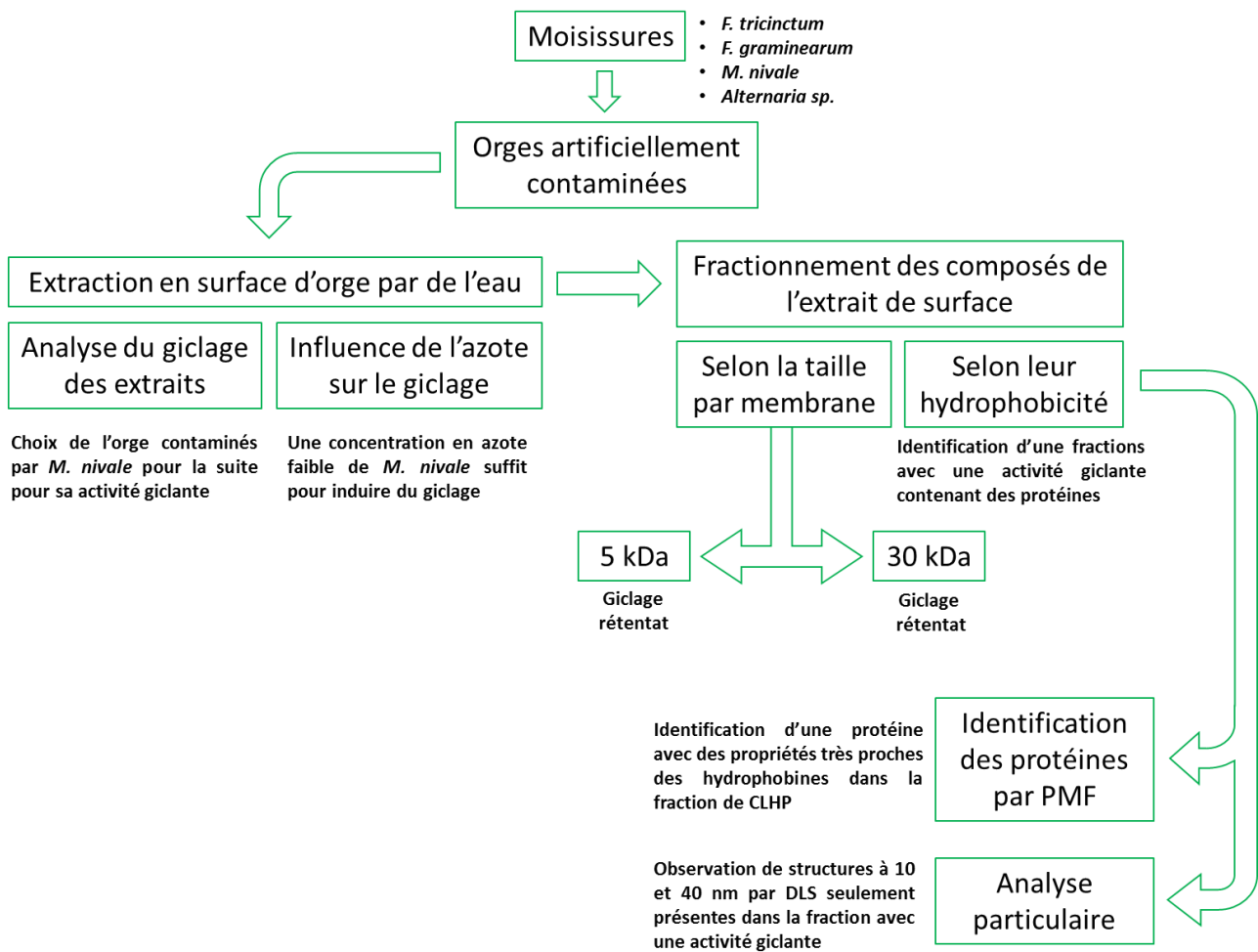


Figure 62. Schéma récapitulatif des expérimentations sur l'orge artificiellement contaminée.

La contamination fongique a été suspectée comme étant impliquée dans le giclage primaire de la bière. Pour aller plus loin, nous nous sommes intéressés aux composés produits et/ou dégradés par les moisissures en surface d'orges artificiellement contaminées. Pour cela nous avons mis en place une stratégie d'extraction aqueuse en surface d'orge pour récupérer plus spécifiquement les composés de surface et ainsi réduire la complexité de l'extract. Différentes souches ont été étudiées pour sélectionner celle avec l'activité giclante la plus importante. Suite à cette sélection, une première étape de fractionnement par membrane, ayant donné des résultats prometteurs sur le malt, a été appliquée sur ces extraits de surface. Il est intéressant de noter, qu'à l'inverse du malt, les composés supérieurs à 30 kDa ont montré une activité giclante. En comparant ces résultats avec les propriétés des hydrophobines, il a été suspecté qu'en grande concentration, elles ont la capacité de s'associer entre elles pour former des multimères qui pourraient être retenus par la membrane.

Néanmoins cette technique n'a pas permis de mieux séparer les composés et les extraits restent encore assez complexes (présence de glucides, protéines et polyphénols dans les fractions). Pour améliorer la séparation, nous avons mis en œuvre une séparation par chromatographie en phase inverse. Trois fractions ont été définies : la première contenant les glucides et de très petits peptides, la deuxième contenant des protéines de faible poids moléculaire avec une hydrophobie moyenne et une troisième fraction contenant des protéines de masse variable ayant une haute hydrophobie. Cette dernière fraction présente une activité giclante importante. Les protéines, avec un caractère hydrophobe élevé, sont fortement supposées être impliquées dans le giclage.

Pour identifier les protéines présentes dans cette fraction, une électrophorèse 2D a été mise en œuvre et les spots de protéines ont été analysés par PMF. Toutes les protéines identifiées sont produites par les moisissures durant leur propagation et la colonisation du grain. Dans la fraction giclante, une protéine très intéressante a été identifiée (Epl1 de la famille des cératoplatanine) avec des propriétés (haute hydrophobie) et une structure proche des hydrophobines.

Pour caractériser plus en détails ces fractions, une analyse par DLS a été mise en œuvre. Elle a permis de mettre en évidence des structures à 10 et 40 nm dans la fraction giclante. Nous retrouvons donc des structures différentes de celles observées par Deckers (2013). Tout ceci est cohérent avec le fait que des protéines proches des hydrophobines avec les mêmes propriétés interfaciales pourraient avoir la capacité de former des structures caractéristiques du giclage. Néanmoins, il est nécessaire, pour la compréhension et l'identification finale du ou des composés impliqués dans le giclage, d'appliquer la même méthodologie à d'autres matières premières et plus spécialement sur du malt industriel naturellement contaminé.

Conclusion générale **et perspectives**

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

a. Conclusion

Le giclage est un phénomène de surmoussage dans la bière sans agitation vigoureuse préalable qui a lieu lors du décapsulage de la bouteille. Il en résulte une perte de matière qui a un impact au niveau de l'image du brasseur. Les acteurs de la filière, malteurs et brasseurs, sont donc très sensibles à l'altération de la matière première qui pourrait conduire au giclage.

A l'heure actuelle, il n'existe que très peu d'informations sur l'origine du giclage tant au niveau chimique que physique. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à ce problème en se fixant un objectif : identifier le ou les composés responsables du phénomène de giclage. Pour cela, nous avons travaillé sur deux types de matières premières (du malt industriel et de l'orge artificiellement contaminée) sur lesquelles une stratégie de fractionnement et de caractérisation de fractions a été appliquée. Nous avons mis en œuvre des techniques de séparation selon la taille et les propriétés physico-chimiques des molécules.

Etude à partir du malt

Un premier travail a été initié sur des extraits de malt présentant ou non des activités giclantes. L'objectif était de comparer ces deux matières premières et d'essayer de visualiser des différences entre elles avec différentes méthodes de fractionnement et de purification. Une première analyse de la fraction protéique après précipitation au sulfate d'ammonium a été réalisée. Les sels ont été éliminés par chromatographie d'exclusion stérique puis la fraction protéique a été analysée en giclage. Il en est ressorti plusieurs hypothèses à savoir que les protéines ne sont peut-être pas actives seules ou encore que le sulfate d'ammonium avait modifié la structure des protéines du malt et inhibé l'activité giclante. Par ailleurs, les protéines, précipitées au sulfate d'ammonium, ont été séparées par chromatographie de phase inverse. Une bonne séparation des protéines a été observée. Cette stratégie est intéressante mais comme le sulfate d'ammonium risque de modifier la structure des protéines, il apparaît nécessaire de travailler directement sur un extrait de malt brut. Néanmoins, la présence importante de glucides dans l'extrait, qui doit être concentré, ne permet pas d'injecter l'échantillon sans traitement préalable. Une autre méthodologie devra être mise en place pour limiter l'extraction des glucides dans ce mode opératoire.

Nous avons ensuite mis en œuvre une méthodologie d'extraction des protéines basée sur la formation de mousse qui a déjà été appliquée avec succès sur les hydrophobines (Khalessi *et al.*

2013). Ces protéines vont favoriser les interactions et participer à la formation de la mousse. Nous avons donc séparé les constituants de l'extrait avec différentes méthodes de production de mousse. La fraction expulsée lors de l'ouverture de la bouteille a d'abord été étudiée pour voir si des différences apparaissaient avec celle restant dans la bouteille : résultat négatif. La comparaison avec un extrait G- conduit au même résultat. Une première étape de fractionnement a été réalisée en formant de la mousse au travers d'un fritté. Les mousses d'extrait G+ et G- ont ensuite été comparées entre elles mais aussi avec les extraits bruts. La présence d'un composé concentré dans les deux fractions de mousse en comparaison aux extraits bruts a été observée mais c'est le cas dans les deux extraits G+ et G-. Pour améliorer le fractionnement, nous avons ensuite utilisé l'affinité des hydrophobines avec le CO₂ pour essayer d'extraire plus spécifiquement des composés possédant ces mêmes propriétés. Pour cela, une colonne de bullage par injection de CO₂ a été utilisée pour former de la mousse. Aucune différence notable n'a été observée et nous avons mis en place le fractionnement des molécules selon leur taille.

Nous avons mis en œuvre un fractionnement par voie membranaire qui présente l'avantage d'être une technique plus douce qui maintient les propriétés des composés. Deux seuils de coupure ont été utilisés : un seuil à 5 kDa pour maintenir les composés comme les hydrophobines avec des poids moléculaires entre 7 et 15 kDa et un seuil à 30 kDa pour être sûr de les éliminer. L'analyse giclage sur les fractions supérieures (rétentat) et inférieures (perméat) au seuil de coupure a montré que des composés présentant une activité giclante sont compris entre 5 et 30 kDa. La complexité de l'échantillon a été bien réduite avec une élimination de près de 95 % de la matière sèche. Toutefois, on retrouve encore des glucides, des protéines et des polyphénols et il est difficile de conclure sur leur participation au phénomène de giclage de façon isolée. Par la suite, la fraction polyphénolique libre d'un extrait G+ a été retirée grâce à un traitement à la PVPP. Le retrait de 30 % de cette fraction n'a pas eu d'influence sur le giclage. Ce qui nous conduit à conclure que les polyphénols libres ne sont probablement pas impliqués de manière significative dans le giclage.

Les résultats sur le traitement d'extrait de malt nous ont finalement permis de savoir que les composés impliqués dans le giclage ont une taille comprise entre 5 et 30 kDa et que les polyphénols ne semblent pas impliqués dans ce mécanisme. Néanmoins, les fractions obtenues sont encore complexes et nous ne savons pas dans quelle mesure les protéines ou les glucides présents dans les fractions giclantes sont impliqués dans le giclage. Nous avons donc décidé de

travailler sur une autre matière première contaminée par des moisissures identifiées comme étant à l'origine du giclage, de par la production de certains composés.

Etude à partir de l'orge contaminée

Comme cela a été expliqué précédemment, les moisissures sont fortement suspectées comme étant impliquées dans le giclage. Nous nous sommes donc intéressés à l'analyse d'orge artificiellement contaminée par des souches pures de moisissures caractérisées par l'IFBM. Dans l'objectif de se focaliser essentiellement sur les composés produits par les moisissures en surface de l'orge et/ou produits par l'orge en réponse à une attaque fongique, nous avons mis en place une extraction solide / liquide d'orge contaminée par différentes moisissures : *M. nivale*, *F. tricinctum*, *F. graminearum* et *Alternaria sp.*. Cette extraction aqueuse en surface a également permis de réduire la complexité de l'échantillon avec l'obtention d'extraits possédant des propriétés giclantes pour *M. nivale* et *F. graminearum*. L'orge contaminée par la souche de *M. nivale* a ensuite été étudiée plus en détails au cours de ce travail.

A partir de cet extrait de surface giclant, nous avons appliqué le même protocole de fractionnement membranaire qu'avec l'extrait de malt. Des membranes de 5 et 30 kDa ont été utilisées. Contrairement à l'extrait de malt, seuls les composés supérieurs à 30 kDa présentaient un potentiel giclant. Ceci a conduit à deux hypothèses ; soit il pouvait s'agir de composés différents de ceux observés sur l'extrait de malt, soit ces composés se trouvaient sous forme agrégée et étaient retenus par la membrane de 30 kDa. En comparant ces résultats avec les propriétés des hydrophobines, il a été montré que ces dernières ont tendance à s'associer entre elles pour former des structures di, tri ou tétramériques quand elles sont présentes en forte concentration (Kisko *et al.* 2009, 2008 ; Kallio *et al.* 2007).

Cet extrait de surface d'orge est moins complexe que l'extrait de malt. Nous avons donc pu appliquer le fractionnement selon les propriétés hydrophobes des composés pour identifier des fractions giclantes. L'extrait a été concentré puis fractionné par chromatographie de phase inverse. Trois fractions différentes ont été identifiées : une première fraction contenant les glucides, des petits peptides et des polyphénols, une deuxième contenant des protéines (de faible poids moléculaire) mélangées à des polyphénols et enfin une dernière fraction contenant des protéines de plus haut poids moléculaire ainsi qu'une faible quantité de polyphénols. L'analyse giclage de ces fractions a montré que seule la fraction 3 avait une activité giclante. Cela prouvait que les protéines extraites avaient une activité giclante et que les glucides n'étaient pas impliqués dans le phénomène.

Afin d'atteindre l'objectif central qui était d'identifier le ou les composés à l'origine du phénomène de giclage, une dernière étape de séparation des protéines a été réalisée par électrophorèse 2D. Cela a permis d'améliorer la séparation et d'isoler des protéines d'intérêt. Les spots obtenus ont été excisés et analysés en spectrométrie de masse par MALDI-TOF après digestion trypsique. L'analyse par Peptide Mass Fingerprint a montré que les protéines présentes dans la fraction 3 giclante étaient des protéines excrétées par les moisissures lors de la colonisation du grain. Parmi elles, il apparaît des enzymes de dégradation des parois comme la bêta-glucosidase ou intégrées dans le métabolisme glucidique comme la glycoside hydrolase. D'autres protéines sont impliquées dans le développement cellulaire comme la glyoxal oxydase.

On retrouve donc plusieurs protéines dans cette fraction, dont l'une d'entre elles, qui n'est pas une hydrophobine, a particulièrement suscité notre intérêt. Il s'agit ici de l'Epl1, une cératoplatanine, une protéine amphiphile qui est produite par les moisissures pour faciliter l'adhésion sur les surfaces solides ou à la surface des liquides en diminuant les tensions de surface. Cette protéine a une masse de 15 kDa et a la capacité de s'auto-assembler, comme les hydrophobines. Cela pourrait expliquer le giclage du rétentat 30 kDa de l'extrait de surface car une protéine proche de 15 kDa est présente dans le rétentat. La dénaturation de ces structures par SDS-PAGE pourrait expliquer le fait que l'on ne puisse pas visualiser de composés à 30 kDa.

Actuellement, il s'agit de suppositions quant au rôle de l'Epl1 sur le giclage. Néanmoins, les propriétés proches de celles des hydrophobines et le fait qu'elle soit retrouvée dans la fraction giclante (obtenue par CLHP de phase inverse) et qu'elle soit potentiellement présente dans le rétentat 30 kDa giclant (par fractionnement membranaire) font d'elle un bon candidat comme marqueur prédictif du giclage.

Enfin, il est intéressant de noter que des structures entre 10 et 40 nm ont été trouvées dans la fraction giclante contenant les Epl1. De la même manière que les hydrophobines sont capables de former des structures de 100 nm, les « composés identifiés » avec des propriétés giclantes pourraient former des structures similaires mais de tailles différentes.

b. Perspectives

L'objectif principal d'identification de la ou des molécules traceurs du phénomène a été atteint. Un corollaire à ce travail est en cours pour définir et mettre en place un test rapide de criblage

des lots de matière première pour suivre l'évolution de composés impliqués dans le giclage. Pour répondre à cet objectif, une stratégie à court et long terme est en cours de développement.

A court terme : application de la méthodologie à d'autres matières premières

La méthodologie d'extraction en surface / fractionnement et de recherche de molécules impliquées dans le giclage est fonctionnelle. Elle devra être appliquée à du malt industriel G+. Cela permettra de concentrer les composés en présence des glucides et d'isoler une fraction giclante. Les analyses par gel 2D seront ensuite effectuées pour identifier les composés extraits. L'analyse sur l'orge contaminée par les autres moisissures (*Alternaria sp.*, *F. tricinctum* et *F. graminearum*) devra également être effectuée. Cela permettra de voir si les molécules extraites sont identiques pour toutes les moisissures et si la protéine Epl1 est aussi présente. A défaut, cela permettra de s'orienter vers d'autres composés présents et identifiés par giclage et PMF.

A moyen terme : purification du/des composés avec une activité giclante

Pour le développement d'un test ELISA, la ou les protéines impliquées dans le giclage devront être purifiées. Une séparation en CES pourra être effectuée sur la fraction giclante de CLHP pour réduire le nombre de candidats en testant les nouvelles fractions obtenues en giclage.

A long terme : développement d'un test de criblage rapide des matières premières

A partir des informations recueillies sur les différentes matières premières, un test de criblage de type ELISA pourra être mis en place. Cet objectif impliquera toutefois une longue et lourde démarche expérimentale.

Références **bibliographique**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Aksay S. et G. Mazza. 2007. Optimization of protein recovery by foam separation using response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 79 (2) :598–606.
- Altschul S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST, PSI-BLAST :A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25 (17) :3389–3402.
- Aron P. M., T. H. Shellhammer. 2010. A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability. *Journal of the Institute of Brewing* 116 (4) :369–80.
- Askolin S., T. Nakari-Setälä, M. Tenkanen. 2001. Overproduction, purification, and characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57 (1-2) :124–30.
- Bamforth C. W. 1985. The foaming properties of beer. *Journal of the Institute of Brewing* 91 (6) : 370–83.
- Bhattacharjee S., R. Kumar, K. S. Gandhi. 1997. Prediction of separation factor in foam separation of proteins. *Chemical Engineering Science, Festschrift for Professor M. M. Sharma*, 52 (24) :4625–36.
- Blatteau J.-E., J.-B. Souraud, E. Gempp, A. Boussuges. 2006. Gas nuclei, their origin, and their role in bubble formation. *Aviation, Space, and Environmental Medicine* 77 (10) :1068–76.
- Boddi S., C. Comparini, R. Calamassi, L. Pazzagli, G. Cappugi, A. Scala. 2004. Cerato-platanin protein is located in the cell walls of ascospores, conidia and hyphae of *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *Platani*. *FEMS Microbiology Letters* 233 (2) :341–46.
- Briggs D E, C. Boulton, P. Brookes, S. Rogers. 2004. *Brewing science and practice*. Woodhead publishing limited and CRC press, LLC cambridge.
- Chasan R. 1991. Lipid Transfer Proteins : Moving molecules ? *The Plant Cell* 3 (9) :842–43.
- Christian M., J. Titze, V. Ilberg F. Jacob. 2010. New cognitions on gushing in the wort production process and in quantifying the gushing potential of malt. *Cerevisia* 35 (2) :35–37.
- Christian M., J. Titze, V. Ilberg F. Jacob. 2011. Novel perspectives in gushing analysis: a review. *Journal of the Institute of Brewing* 117 (3) :295–313.
- Cox A., R. Cagnol, F. Andrew B. Russell, M. J. Izzard. 2007. Surface properties of class II hydrophobins from *Trichoderma Reesei* and influence on bubble stability.” *Langmuir* 23 (15) :7995–8002.
- Deckers S. (2013). Modeling and biophysical characterisation of primary gushing mechanism in beer. Dissertation. Katholieke Universiteit Leuven.
- Deckers S, K. Gebruers, G. Baggerman, Y. Lorgouilloux, J. Martens, J. Delcour, C. Michiels, G. Derdelinckx. 2010. Primary gushing of over-carbonated beverages: Mechanism and new detection method. Phd Symposium, Leuven, Belgium.

- Deckers S. 2011. Dynamic light scattering (DLS) as a tool to detect CO₂-hydrophobin structures and study the primary gushing potential of beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* (69) :144-149.
- Donhauser S., A. Weideneder, W. Winnewisser, E. Geiger. 1990. Test zur ermittlung der gushingneigung von rohfrucht, malz, wärze und bier. *Brauwelt International* 130 :1317–20.
- Douglas P. E. et B. Flannigan. 1988. A microbiological evaluation of barley malt production. *Journal of the Institute of Brewing* 94 (2) :85–88.
- Draeger M. 1996. Physical observations on the subject of gushing. *Brauwelt International* (Germany), no. 136 :259–64.
- Dubreil L., S. Méliande, H. Chiron, J.-P. Compoint, L. Quillien, G. Branlard, D. Marion. 1998. Effect of puroindolines on the breadmaking properties of wheat flour. *Cereal Chemistry* 75 (2) :222–29.
- Fischer S. 2001. Blasenbildung von in flüssigkeiten gelösten gasen. Dissertation. Technische Universität München.
- Garbe L. A., P. Schwartz, A. Ehmer. (2009) Beer Gushing, in *Handbook of alcoholic beverages series, Beer, a quality perspective* (Bamforth, Charles, W., Russell, I., Stewart, G), 1st ed. 185–212, Chapter 6, Elsevier Ltd.
- Garbe L. A., R. Nagel, M. Rauschmann, M. Lamers, A. Ehmer, R. Tressl. 2007. Correlation of deoxynivalenol, hydrophobins and gushing. *Proceeding of the 31st European Brewing Convention Congress*, CD-ROM edition, Venice, Italy.
- Gorjanović S., E. Spillner, M. V. Beljanski, R. Gorjanović, M. Pavlović, G. Gojgić-Cvijanović. 2005. Malting barley grain non-specific lipid-transfer protein (ns-LTP): importance for grain protection. *Journal of the Institute of Brewing* 111 (2) :99–104.
- Gorjanović S., M. V. Beljanski, M. Gavrović-Jankulović, G. Gojgić-Cvijović, M. D. Pavlović, F. Bejosano. 2007. Antimicrobial activity of malting barley grain thaumatin-like protein isoforms, S and R. *Journal of the Institute of Brewing* 113 (2) :206–12.
- Haikara A. 1980. Relationship between malt and beer. *Proceeding of the European Brewery Convention Congress*, Helsinki, Finland, 251–258.
- Haikara A. 1983. Malt and beer from barley artificially contaminated with fusarium in the field. *Proceeding of the 13th European Brewery Convention Congress*, London, UK, 401-408
- Hektor H. J., et K. Scholtmeijer. 2005. Hydrophobins: proteins with potential. *Current Opinion in Biotechnology* 16 (4) :434–39.
- Hepworth N. J., J. W. R. Boyd, J. R. M. Hammond, J. Varley. 2003. Modelling the effect of liquid motion on bubble nucleation during beer dispense. *Chemical Engineering Science* 58 (17) :4071–84.
- Hippeli S., et D. Hecht. 2009. The role of Ns-LTP1 and proteases in causing primary gushing. *Brauwelt International* 27 (1) :30-34.
- Hippeli S., et E. F. Elstner. 2002. Are hydrophobins and/or non-specific Lipid Transfer Proteins responsible for gushing in beer? New hypotheses on the chemical nature of gushing inducing factors. *Zeitschrift fur naturforschung* (57c) :1–8.

- Hudson O. P. 1986. "Malting technology." *Journal of the Institute of Brewing* 92 (2): 115–22.
- Jégou S., J. P. Douliez, D. Mollé, P. Boivin, D. Marion. 2000. Purification and structural characterization of LTP1 polypeptides from beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (10) :5023–29.
- Jin Z., Y.-W. Mu, J.-Y. Sun, X.-M. Li, X.-L. Gao, J. Lu. 2013. Proteome analysis of metabolic proteins (pI 4-7) in barley (*Hordeum vulgare*) malts and initial application in malt quality discrimination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (2) :402–9.
- Justé A., S. Malfliet, M. Lenaerts, L. De Cooman, G. Aerts, K. Willems, B. Lievens. 2011. Microflora during malting of barley: overview and impact on malt quality. *Journal of brewing science* (64) :22-31.
- Kader J.-C. 1997. Lipid-Transfer Proteins: a puzzling family of plant proteins. *Trends in Plant Science* 2 (2) :66–70.
- Kallio J. M., M. B. Linder, J. Rouvinen. 2007. Crystal structures of hydrophobin hfbii in the presence of detergent implicate the formation of fibrils and monolayer films. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (39) :28733–39.
- Kapp G. R. et C. W. Bamforth. 2002. The foaming properties of proteins isolated from barley. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82 (11) :1276–81.
- Khalesi M. 2015. Upscaling the high-grade purification of hydrophobin HFBII from *Trichoderma reesei* for carbonated beverages purpose. Dissertation. Katholieke Universiteit Leuven.
- Khalesi M., T. Venken, S. Deckers, J. Winterburn, Z. Shokribousjein, K. Gebruers, H. Verachtert, J. Delcour, P. Martin, G. Derdelinckx. 2013. A novel method for hydrophobin extraction using CO₂ foam fractionation system. *Industrial Crops and Products* 43 (May) :372–77.
- Kisko K., G. R. Szilvay, E. Vuorimaa, H. Lemmetyinen, M. B. Linder, M. Torkkeli, R. Serimaa. 2009. Self-assembled films of hydrophobin proteins HFBI and HFBII studied in situ at the air/water interface. *Langmuir* 25 (3) :1612–19.
- Kisko K., G. R. Szilvay, U. Vainio, M. B. Linder, R. Serimaa. 2008. Interactions of hydrophobin proteins in solution studied by small-angle X-ray scattering. *Biophysical Journal* 94 (1) :198–206.
- Liger-Belair G. et S. Villaume. 2011. Losses of dissolved CO₂ through the cork stopper during champagne aging: toward a multiparameter modeling." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (8) :4051–56.
- Liger-Belair G., G. Polidori, P. Jeandet. 2008. Recent advances in the science of champagne bubbles. *Chemical Society Reviews* 37 (11) :2490–2511.
- Linder M. B. 2009. "Hydrophobins: Proteins That Self Assemble at Interfaces." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 14 (5) :356–63.
- Linder M. B., G. R. Szilvay, T. Nakari-Setälä, M. E. Penttilä. 2005. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 29 (5) :877–96.
- Linke D., H. Zorn, B. Gerken, H. Parlar, R. G. Berger. 2005. Foam fractionation of exo-lipases from a growing fungus (*Pleurotus sapidus*). *Lipids* 40 (3) :323–27.

- Lubetkin S. D. 2003. Why is it much easier to nucleate gas bubbles than theory predicts ?
Langmuir 19 (7) :2575–87.
- Lumsdon S. O., J. Green, B. Stieglitz. 2005. Adsorption of hydrophobin proteins at hydrophobic and hydrophilic interfaces. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 44 (4) :172–78.
- Lutterschmid Georg. 2011. “Surface-Active Proteins from *Fusarium* Spp. and Their Role in Gushing in Carbonated Beverages”. Dissertation. München, Technische Universität München.
- MacIntosh A. J., A. MacLeod, A. D. Beattie, E. Eck, M. Edney, B. Rossnagel, R. A. Speers. 2014. Assessing the effect of fungal infection of barley and malt on premature yeast flocculation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 72 (1) :66–72.
- Martini A. V. et C. P. Kurtzman. 1985. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of *saccharomyces sensu stricto*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 35 (4) :508–11.
- Maruyama H., A. Suzuki, H. Seki, N. Inoue. 2006. Enrichment in axial direction of aqueous foam in continuous foam separation. *Biochemical Engineering Journal* 30 (3) :253–59.
- Maruyama H., H. Seki, A. Suzuki, N. Inoue. 2007. Batch foam separation of a soluble protein. *Water Research* 41 (3) :710–18.
- Müller M. P., F. Schmid, T. Becker, M. Gastl. VÉRIFIER 2010. Impact of different hop compounds on the overfoaming volume of beer caused by primary gushing. *Journal of the Institute of Brewing* 116 (4) :459–63.
- Munar M. J. et B. Sebree. 1997. Gushing - a malsters view. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 55 :119–22.
- Nakari-Setälä T., N. Aro, N. Kalkkinen, E. Alatalo, M. Penttilä. 1996. Genetic and biochemical characterization of the trichoderma reesei hydrophobin HFBI. *European Journal of Biochemistry* 235 (1-2) :248–55.
- Neuhof T., R. Dieckmann, I. S. Druzhinina, C. P. Kubicek, T. Nakari-Setälä, M. Penttilä, H. von Döhren. 2007. Direct identification of hydrophobins and their processing in trichoderma using intact-cell MALDI-TOF MS. *FEBS Journal* 274 (3) :841–52.
- Nielsen L. K., J. D. Jensen, G. C. Nielsen, J. E. Jensen, N. H. Spliid, I. K. Thomsen, A. F. Justesen, D. B. Collinge, L. N. Jørgensen. 2011. *Fusarium* head blight of cereals in Denmark: species complex and related mycotoxins. *Phytopathology* 101 (8) :960–69.
- Nuter C. et D. Harms. 2009. Particle measurement in beverages - a new tool for a statement on gushing. Abstract. 32nd congress of European Brewing convention, Hamburg, Germany.
- Østergaard O., S. Melchior, P. Roepstorff, B. Svensson. 2002. Initial proteome analysis of mature barley seeds and malt. *Proteomics* 2 (6) :733–39.
- Parry D. W., P. Jenkinson, L. McLeod. 1995. *Fusarium* Ear Blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant Pathology* 44 (2) :207–38.
- Pellaud J. 2002. Gushing : state of the art. *Cerevisia* 27 :189–205.
- Perrocheau L., B. Bakan, P. Boivin, 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) :3108–13.

- Perrocheau L, H. Rogniaux, P. Boivin, D. Marion. 2005. Probing heat-stable water-soluble proteins from barley to malt and beer. *Proteomics* 5 (11) :2849–58.
- Polidori G., P. Jeandet, G. Liger-Belair. 2009. Bubbles and flow patterns in champagne. *American Scientist* 97 :294–301.
- Qin M., S. Hou, L. Wang, X.-Z. Feng, R. Wang, Y.-L. Yang, C. Wang, L. Yu, B. Shao, M.-Q. Qiao. 2007. Two methods for glass surface modification and their application in protein immobilization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 60 (2) :243–49.
- Rath F. 2009. Gushing in 2008—trailing the ‘modified carlsberg test. *Brauwelt International*, no. 27 :26–29.
- Sahu K. K., Y. Hazama, K. N. Ishihara. 2006. Gushing in canned beer: the effect of ultrasonic vibration. *Journal of Colloid and Interface Science* 302 (1) :356–62.
- Sarlin T., A. Vilpola, E. Kotaviita, J. Olkku, A. Haikara. 2007. Fungal hydrophobins in the barley-to-beer chain. *Journal of the Institute of Brewing* 113 (2) :147–53.
- Sarlin T., T. Nakari-Setälä, M. Linder, M. Penttilä, A. Haikara. 2005. Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. *Journal of the Institute of Brewing* 111 (2) :105–11.
- Sarlin T., T. Kivioja, N. Kalkkinen, M. B. Linder, T. Nakari-Setälä. 2012. Identification and characterization of gushing-active hydrophobins from *Fusarium graminearum* and related species. *Journal of Basic Microbiology* 52 (2) :184–94.
- Sarlin T. 2012. “Detection and characterisation of *Fusarium* hydrophobins inducing gushing in beer.” Dissertation. Department of Biotechnology and Chemical Technology, VTT technical center of finland
- Schena L., F. Nigro, A. Ippolito, D. Gallitelli. 2004. Real-time quantitative PCR :a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 110 (9) :893–908.
- Scholtmeijer K., J. Wessels, H. Wösten. 2001. Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56 (1-2) :1–8.
- Schwarz P. B., S. Beattie, H. H. Casper. 1996. Relationship between *Fusarium* infestation of barley and the gushing potential of malt. *Journal of the Institute of Brewing* 102 (2) :93–96.
- Shokribousjein Z., S. Deckers, K. Gebruers, Y. Lorgouilloux, G. Baggerman, H. Verachtert, J. A. Delcour. 2011. Hydrophobins, beer foaming and gushing. *Cerevisia* 35 (4) :85–101.
- Simpson D. R., H. N. Rezanoor, D. W. Parry, P. Nicholson. 2000. Evidence for differential host preference in *Microdochium nivale* var. *majus* and *Microdochium nivale* var. *nivale*. *Plant Pathology* 49 (2) :261–68.
- Sossountzov L., L. Ruiz-Avila, F. Vignols, A. Jolliot, V. Arondel, F. Tchang, M. Grosbois, F. Guerbette, E. Miginiac, M. Delseny. 1991. Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene. *The Plant Cell* 3 (9) :923–33.
- Stuart V. et J. Craig. 2010. Very small bubbles at surfaces—the nanobubble puzzle. *Soft Matter* 7 (1) :40–48.

- Szilvay G. R., A. Paananen, K. Laurikainen, E. Vuorimaa, H. Lemmetyinen, J. Peltonen, M. B. Linder. 2007. Self-assembled hydrophobin protein films at the air-water interface: structural analysis and molecular engineering. *Biochemistry* 46 (9) :2345–54.
- Tseng H., L. Pilon, G. R. Warrier. 2006. Rheology and convective heat transfer of colloidal gas aphrons in horizontal mini-channels. *International Journal of Heat and Fluid Flow* 27 (2) :298–310.
- Vaag P., R. Preben, A. D. Knudsen, S. Pedersen, E. Meiling. 1993. A simple and rapid test for gushing tendency in brewing materials. *Proceedings of European Brewing Convention, 24th Congress, Oslo, Oxford University Press, USA.* 155–162.
- Ward O. P. et M. Moo-Young. 1989. “Enzymatic degradation of cell wall and related plant polysaccharides.” *Critical Reviews in Biotechnology* 8 (4) :237–74.
- Whiteford J. R. et P. D. Spanu. 2002. Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. *Molecular Plant Pathology* 3 (5) :391–400.
- Wösten H. A. 2001. Hydrophobins: Multipurpose proteins. *Annual Review of Microbiology* 55 : 625–46.
- Xu X.-M., D. W. Parry, P. Nicholson, M. A. Thomsett, D. Simpson, S. G. Edwards, B. M. Cooke. 2005. Predominance and association of pathogenic fungi causing fusarium ear blight in wheat in four european countries. *European Journal of Plant Pathology* 112 (2) :143–54.
- Yang J., J. Duan, D. Fornasiero, J. Ralston. 2007. Kinetics of CO₂ nanobubble formation at the solid/water interface. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP* 9 (48) :6327–32.
- Yount D. E., E. W. Gillary, D. C. Hoffman. 1984. A microscopic investigation of bubble formation nuclei. *Acoustical Society of America Journal* 76 (November) :1511–21.
- Zapf M. W., S. Theisen, S. Rohde, F. Rabenstein, R. F. Vogel, L. Niessen. 2007. Characterization of AfpA, an Alkaline Foam Protein from cultures of *Fusarium culmorum* and its Identification in infected Malt. *Journal of Applied Microbiology* 103 (1) :36–52.

Résumé

Le giclage de la bière est un phénomène de surmoussage qui a lieu lors de l'ouverture de la bouteille. Ce phénomène va être dépendant des conditions de développement du grain d'orge, la matière première de la bière, et notamment des conditions climatiques. Ces dernières années, le phénomène est observé de manière plus fréquente, et les techniques actuelles, comme la méthode Carlsberg, ne prédisent qu'un risque potentiel de giclage de la matière première avec une importante incertitude. Un test de criblage rapide de la matière première permettant l'identification de facteurs responsables du giclage est donc primordiale pour détecter précocement le risque de ce phénomène. Néanmoins, un manque d'informations et de recul sur les composés impliqués dans le giclage limite le développement de méthodes de prédiction rapide du risque. L'objectif principal de cette étude est d'identifier un ou des composés pouvant être à l'origine du phénomène de giclage de la bière. L'étude a été réalisée sur différents malts industriels présentant un risque giclage ou non et des orges artificiellement contaminées par des moisissures.

Les extraits de malt obtenus sont des mélanges éminemment complexes. Ils ont été fractionnés par des procédés appropriés selon les propriétés de leurs constituants : par la taille, les propriétés moussantes et l'hydrophobie. Une réduction de la complexité de l'extrait a été nécessaire et obtenue par des techniques de séparation membranaire. Néanmoins, les macromolécules tels les glucides, les protéines et les polyphénols n'ont pas pu être isolées par ce procédé. La séparation par chromatographie de phase inverse a permis d'obtenir de bonnes informations sur la diversité des protéines présentes dans l'extrait mais l'analyse du potentiel giclage en aval reste limitée.

Pour simuler des conditions réelles « comme au champ », une contamination artificielle de l'orge suivie d'une extraction en surface ont été réalisées. Le potentiel giclage des molécules issues de cette extraction a ensuite été analysé. Une purification de phase inverse a permis d'isoler une fraction concentrant les propriétés giclantes. Cette fraction contient des protéines très hydrophobes qui semblent être impliquées dans le giclage. L'identification des protéines après séparation en gel bidimensionnel a montré que ces protéines proviennent de la moisissure. Une protéine avec des propriétés proches des hydrophobines (hydrophobie et taille comparables) appelée Epl 1 a été identifiée et pourrait être un bon candidat responsable du giclage de la bière.

En conclusion, la méthodologie développée dans la thèse a permis d'acquérir une meilleure connaissance des composés produits par les moisissures en surface d'orge et est applicable à d'autres orges contaminées ainsi qu'à du malt industriel.

Mots-clés : moisissures ; giclage ; malt ; orge ; protéine ; fractionnement

Abstract

Beer gushing is an explosive over-generation of foam following the opening of a bottle. It is highly dependent on barley growing and harvesting climatic conditions and has been observed more frequently over the past years. Current technics, such as the modified Carlsberg test, only provide informations on a predictive gushing potential of malt with a large uncertainty. A rapid screening test on raw material leading to the identification of actual factor(s) responsible for the gushing is consequently highly required by the brewing industry. But a lack of informations about the compounds involved in gushing limits the development of such a technic. The initial goal of this study was to identify the compounds involved in beer gushing. This approach has been applied to industrial malts presenting gushing potential or not and artificially contaminated barleys in order to set a procedure to isolate compounds which may trigger gushing.

In a first time, malt extracts, which are complex mixtures, have been produced and fractionated according to the properties of compounds such as their size, their foaming capacity or hydrophobicity. A good reduction of complexity of sample has been obtained after membrane filtration. Nevertheless, compounds like carbohydrates, proteins and polyphenols could not have been separated. Besides, separation by hydrophobicity has provided good information about the diversity of proteins but the analysis of their gushing potential remains difficult.

Afterwards, in order to investigate the production of compounds by fungus at the surface of barley simulating real field crop production conditions, an artificial contamination was achieved and surface extraction with ultrapure water has been performed. Extracted molecules have been screened for their gushing activity. Thus, a purification of molecules by reverse phase chromatography allowed to isolate a gushing fraction from the surface extract. This fraction, which concentrates the gushing properties, is composed by proteins with high hydrophobicity which may be involved in gushing. This fraction was analyzed more in depth with a 2DE, and led to the identification of proteins all produced by fungus family. Among them, a protein called Epl1 appears to be of interest and could be a good candidate thanks its properties closed to hydrophobins (size and hydrophobicity)

In conclusion, this methodology is developed to acquire a better knowledge about compounds produced by fungi at the surface of barley as well as to some industrial malt.

Keywords: mould; gushing; malt; barley; proteins; fractionation