N° d'ordre:

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

POUR OBTENIR

Le Grade de Docteur ès-Sciences Naturelles

PAR

René SCRIBAN

1re THÈSE

LES PROTIDES DE L'ORGE DU MALT ET DU MOÛT

2^{me} THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 14 Décembre 1951, devant la Commission d'examen.

MM. HOCQUETTE.

BOULANGER WATERLOT HEIM de BALZAC Président

Examinateur

LILLE

IMPRIMERIE MOREL & CORDUANT 11, Rue des Bouchers

1951

UNIVERSITÉ DE LILLE

FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen :

M. LEFEBURE, Professeur de Chimie Appliquée et Chimie de la houille.

Assesseur :

M. ROUELLE, Professeur de Physique et Électricité industrielles.

Doyen honoraire:

M. PRUVOST.

Professeurs honoraires:

MM. BÉGHIN, CAU, CHATELET, CHAUDRON, CHAZY, DOLLE, FLEURY, CAMBIER, JOUNIAUX, MAZET, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, SWYNGEDAUW, WIEMANN.

Maître de Conférences honoraire :

M. QUINET.

Professeurs :

MM. Arnoult, Radiotechnique générale.

CHAPELON, Analyse supérieure et Calcul des probabilités.

Corsin, Paléobotanique.

DECARRIÈRE, Chimie et Physico-chimie industrielles.

DEHORNE, Zoologie générale et appliquée.

DUPARQUE, Géologie et Minéralogie.

Hocquette, Botanique générale et appliquée.

KAMPE DE FÉRIET, Mécanique des Fluides.

Lelong, Mécanique rationnelle et Mécanique expérimentale.

Mme Lelong, Calcul différentiel et intégral.

MM. MICHEL, Chimie minérale.

NORMANT, Chimie générale et Chimie organique.

Roig, Physique générale.

WATERLOT, Géologie houillère.

Professeurs sans chaire :

MM. CORDONNIER, Physique.

DECUYPER, Mathématiques appliquées.

Deloffre, Chimie agricole et Botanique P.C.B.

HEIM DE BALZAC, Zoologie.

SAVARD, Chimie générale.

Maîtres de Conférences :

MM. Bonte, Géologie appliquée. Deнors, Physique industrielle.

MILE DELWAULLE, Chimie P.C.B.

MM. DREYFUSS, Géologie.

FOURNIER, Physique.

MARTINOT-LAGARDE, Mécanique des Fluides.

Chef du Secrétariat :

Mme BOUCHEZ.

A MES JUGES

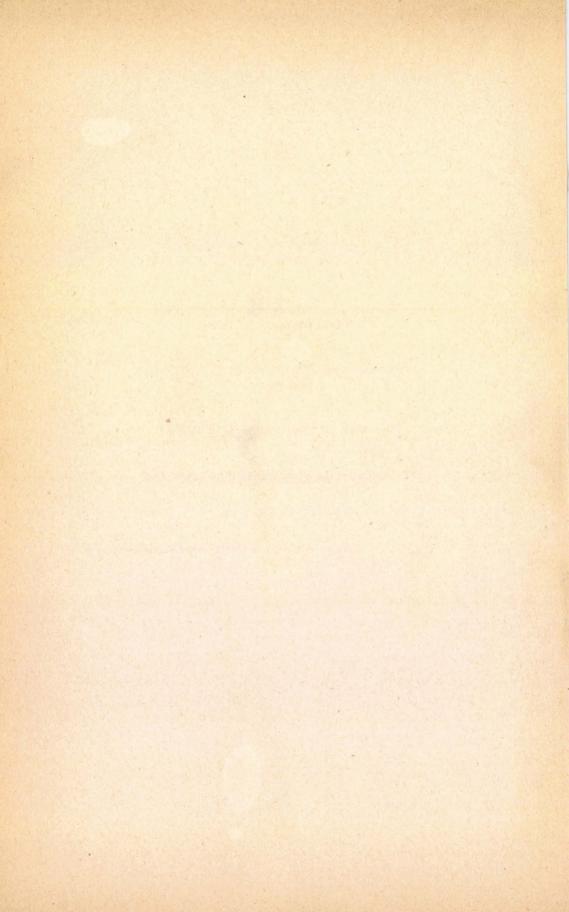
Monsieur le Professeur HOCQUETTE Mon Président de Thèse

Monsieur le Professeur BOULANGER Mon Maitre

Monsieur le Professeur WATERLOT

MONSIEUR LE PROFESSEUR HEIM DE BALZAC

En très respectueux hommage.



PREMIÈRE THÈSE

Les Protides de l'Orge, du Malt et du Moût

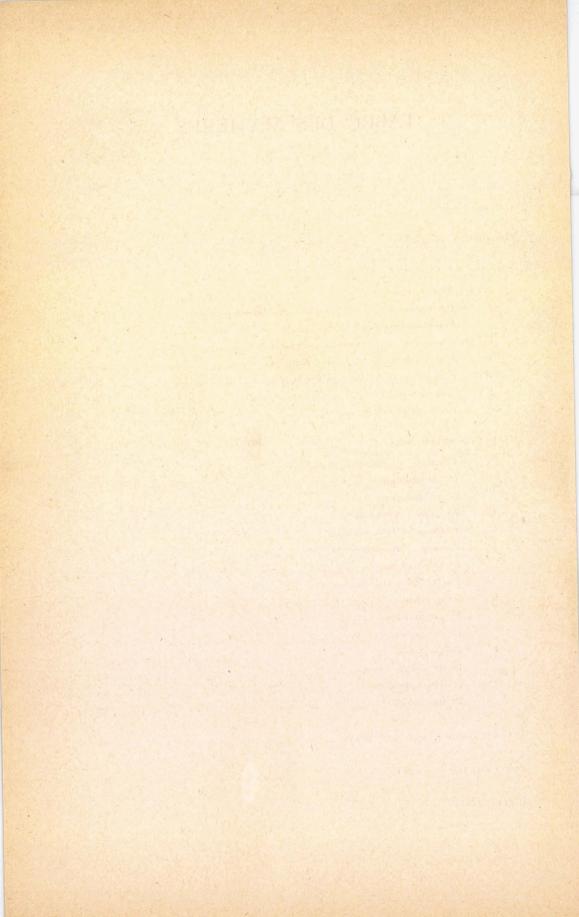
Travail du Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lille.

(Professeur P. BOULANGER).

how up to their obs, by to hele exhibits 201

TABLE DES MATIÈRES

	PAGES
Introduction	9
Historique général	13
TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES :	
A – Bilans azotés	15
B - Extraction des acides aminés et des polypeptides	18
Fractionnement des acides aminés et des polypeptides	20
C - Extraction de la fraction « albumines-globulines »	21
D - Extraction de la fraction « Hordéine »	22
E - Extraction de la fraction « Glutéline »	23
F - Chromatographie de partage sur papier	24
G - Electrophorèse différentielle	28
	20
RÉSULTATS PERSONNELS:	
A - Fraction « albumines-globulines »	
1º au maltage	31
2º au brassage	37
B - Fraction « Glutéline »	42
C - Fraction « Azote résiduel »	45
D - Fraction « Hordéine »	46
1º Orge et malt	47
2º Troubles au brassage	56
E - Amino-acides	9.6
1º au maltage	62
2º au brassage	72
F - Polypeptides	75
1º de l'orge	77
2º des radicelles	80
3º du moût	85
	0.0
Interprétation des résultats	91
	-
Conclusions générales	107
	207
Bibliographie	109



AVANT-PROPOS

L'industrie de la Malterie et de la Brasserie est intéressée par le problème des matières azotées de l'orge et du malt, en raison de leur influence prépondérante sur les qualités organoleptiques et la stabilité colloïdale des bières.

Nous avons entrepris l'étude préalable des constituants azotés de l'orge afin de rassembler des renseignements précis sur les protides dont nous devions suivre l'évolution au cours de la fabrication du malt et de la bière. Les techniques biophysiques et biochimiques les plus récentes (électrophorèse différentielle, chromatographie de partage sur papier, fractionnement sur résines à échange d'ions) nous ont permis d'aborder favorablement cette étude et de préciser la destinée, au cours du maltage et du brassage, de quelques fractions protidiques de l'orge, en particulier des acides aminés, des polypeptides et de l'hordéine.

Au terme de ce travail, nous tenons à remercier notre Ma**î**tre, M. le Professeur P. Pruvost, Doyen Honoraire de la Faculté des Sciences de Lille; MM. les Professeurs P. Corsin et G. Waterlot, qui nous ont initié à la recherche scientifique dans une atmosphère vraiment familiale.

Notre reconnaissance va à notre Ma**î**tre, M. le Professeur P. Boulanger, qui en nous accueillant avec sa grande et délicate bienveillance dans son Laboratoire de Chimie Biologique, ne nous a ménagé ni ses conseils ni ses encouragements; qu'il trouve ici l'expression de toute notre gratitude.

Nous remercions M. le Professeur Driessens, Directeur de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, qui a bien voulu mettre à notre disposition un Etablissement remarquable par son organisation et les grandes facilités de travail qu'il fournit aux chercheurs. Nous remercions également M. le Professeur J. Swyngedauw de sa bienveillante hospitalité dans le Service d'Electrophorèse de cet Institut.

Notre gratitude ira tout particulièrement à notre camarade le Docteur Gérard BISERTE, auquel nous lient bien des souvenirs communs. Sa grande expérience de la chromatographie de partage a permis de mener à bien la réalisation des recherches entreprises; qu'il trouve ici le témoignage de toute notre amitié.

Nous remercions aussi nos camarades Louis Masse, Jean Montreuil et Roger Osteux de leur précieuse et amicale collaboration.

Nous saluons respectueusement la mémoire de M. R. Guillemet, Directeur du Laboratoire de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales, qui nous avait toujours témoigné son intérit et sa sollicitude.

Nous remercions M. J. Raux, Directeur Honoraire de l'Ecole de Brasserie de Nancy et M. Y. Deux, Professeur de Malterie-Brasserie de l'Ecole Nationale des Industries Agricoles, de leurs conseils et de leurs encouragements.

Enfin, nos remerciements vont aussi ;

- A la Société Générale de Brasserie et Malterie, en la personne de son Administrateur-Directeur Général, M. Marcel Riff, notre beau-père, pour sa grande expérience de l'industrie brassicole qu'il met largement à notre disposition;
- A la Société des Malteries Franco-Belges, en la personne de M. André Watrelot, son Président-Directeur Général;
- A la Société de la Brasserie de l'Espérance, en la personne de M. René Hatt, son Président-Directeur Général,

auxquels nous sommes reconnaissant de la confiance qu'ils ont bien voulu nous témoigner, des facilités de travail qu'ils nous ont accordées et qui, tous trois, montrent une profonde compréhension des relations qui doivent unir industrie et recherche scientifique.

Enfin, nous tenons à remercier M^{1les} J. Dehove, G. Delescluse et C. Bachy pour leur collaboration technique et dévouée.

INTRODUCTION

L'orge doit subir des transformations profondes avant d'être utilisable comme matière première dans la fabrication de la bière.

Au maltage, après avoir trempé et aéré le grain, on réalise un début de germination qui déclenche, au niveau du scutellum et de l'assise protéique, des sécrétions diastasiques (cellulase ou cytase, amylases, protéinases...). Ces diastases diffusent et solubilisent partiellement les réserves glucidiques et protéiques de l'albumen, permettant ainsi une « désagrégation » de l'orge. Les produits de dégradation s'acheminent vers l'embryon — siège d'un intense métabolisme — qui se développe en donnant plumule et radicelles. La germination est alors interrompue par un séchage à la touraille, lorsque les modifications de l'orge et les diastases secrétées sont suffisantes pour faciliter au brassage une dissolution complète des réserves du malt qui donneront un extrait fermentescible par la levure.

Au brassage, la farine de malt est donc extraite à l'eau chaude. Sous l'action favorable de la température, les phénomènes de protéolyse et de saccharification sont accélérés et ils achèvent de cette façon les transformations enzymatiques du maltage. L'extrait aqueux — séparé de la drêche — donne le moût ; il est soumis à une ébullition en présence de houblon, qui donne lieu à une précipitation de matières azotées. Dans le procédé classique de fabrication, le moût est ensuite refroidi au bac refroidissoir, puis au réfrigérant Baudelot, où il abandonne respectivement « gros trouble », puis « trouble fin ». Le moût est enfin ensemencé par de la levure qui y trouvera sels minéraux, mono- et di-saccharides, acides aminés, polypeptides, facteurs de croissance nécessaires à son métabolisme.

COMPOSITION CHIMIQUE DE L'ORGE ET DU MALT

La composition chimique moyenne de l'orge et du malt, d'après Hopkins et Krause (1947) [1] (1) est la suivante (en p. 100 de matière sèche) :

⁽¹⁾ Les chiffres en italique et entre crochets indiquent l'ordre d'apparition des références bibliographiques dans le texte.

	ORGE	MALT
Amidon	63	58
Cellulose	4,8	6
Pentosanes (1)	9	9
Mono - et Disaccharides (2)	2	9
Lipides	2,8	2,5
Protéines.		
Leucosine, amino-acides, polypeptides	0,4	1 -
Edestine	3,1	5
Hordéine	3,6	2
Glutéline	2,9	2
Substances minérales (3)	2,9	2,5
Substances diverses (tannins, phytine (4), vita-	-	
mines (5)	4,2	

La teneur en substances protéiques est donc faible, puisqu'elle ne représente environ que la dixième partie en poids du grain.

ANATOMIE SOMMAIRE DU GRAIN D'ORGE ET LOCALISATION DES PROTÉINES ET DES ENZYMES PROTÉOLYTIQUES

L'examen d'une coupe longitudinale du grain d'orge (6) (VAN LAER, 1942) [7]: microphotographie) permet de distinguer:

- enveloppe externe, péricarpe puis testa (paroi - Les téguments : hémiperméable);
- l'endosperme (7) : cellules à aleurone (assise protéique) ; (s. str. albumen) subaleurone (première couche de cellules renfermant de l'amidon);

amande farineuse constituée de cellules à parois minces bourrées de granules d'amidon noyés dans un réseau protéique (tissu interstitiel);

(7) Nous utilisons le terme d'endosperme, habituellement employé dans la littérature brassicole : sensu stricto, il s'agit de l'albumen.

⁽¹⁾ PREECE (1950) (2). (2) MONTREUIL et SCRIBAN (1951) (3).

⁽³⁾ JACOBS (1944), DE CLERCK (1948) (4). (4) SANDEGREN (1948) (5). (5) NORRIS (1950) (6).

⁽⁶⁾ Comme tous les grains de Graminées, le grain d'orge est un caryopse, c'est-à-dire un fruit du type akène, dont la paroi (péricarpe) est soudée intimement

- — le germe :

plumule, tige et radicelle en liaison avec l'endosperme par la couche épithéliale du scutellum. Le scutellum joue un rôle important dans les échanges nutritifs entre germe et réserves de l'endosperme et dans le métabolisme de la plantule.

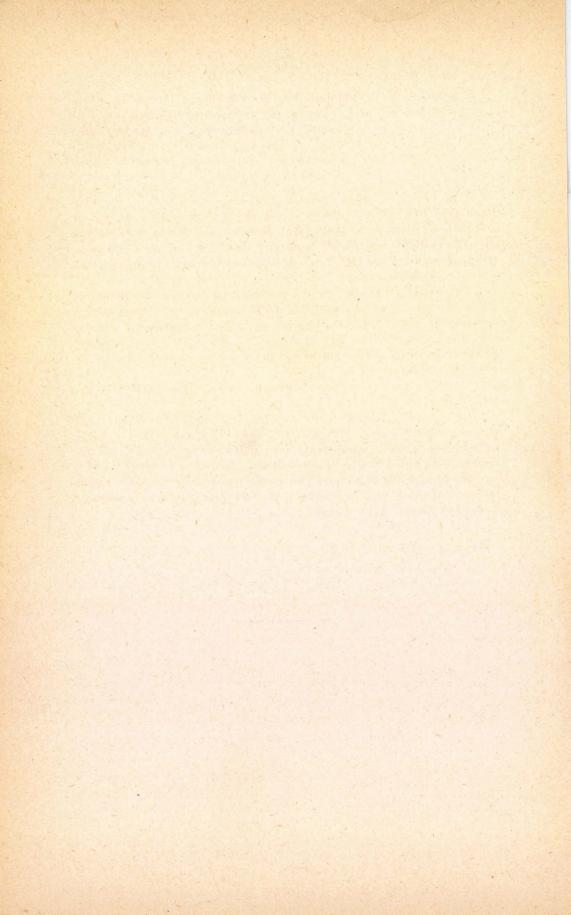
Dans l'assise protéique on admet l'existence d'hordéine, de glutéline (Hopkins, 1947; Luers, 1949, a) [8], de globulines (Saverborn et coll. 1944; Danielsson, 1949) [9]. L'hordéine contribue à la formation de la matière protéique fondamentale des grains d'aleurone (Guilliermond, 1941) [10]. Les cellules à aleurone sont riches en protéinases et peptidases (Engel et Heins, 1947) [11].

Le tissu interstitiel de l'endosperme contient albumines et globulines (HOPKINS, loc. cit.). MASSART (1946) [12] a examiné des coupes microscopiques de grain d'orge traitées par une solution d'urée à 30 p. 100 qui dissout hordéine et glutéline; la libération des grains d'amidon du tissu interstitiel amène l'auteur à admettre la présence de ces substances protéiques dans ce tissu.

L'endosperme est très pauvre en protéinases et peptidases (Engel, loc. cit.).

La couche épithéliale du scutellum est riche en dipeptidases (LINDERSTROM-LANG et HOLTER, 1932; PETT, 1935) [13]. Le germe est également riche en dipeptidases, en particulier dans la région subterminale de la radicelle (LINDERSTROM-LANG, loc. cit.; ENGEL, loc. cit.).

Des études histochimiques plus complètes seraient nécessaires pour une connaissance plus approfondie de la localisation des substances protéiques dans le grain d'orge.



HISTORIQUE GÉNÉRAL

La première étude systématique des protides de l'orge a été réalisée par Osborne en 1895 [14]. D'après leurs caractères de solubilité, il a défini les constituants suivants :

- Une albumine, la *leucosine* (0,3 p. 100 en mat. protéiques, sur matière sèche).
- Une ou plusieurs « protéoses » mal caractérisées, solubles dans l'eau.
- Une globuline, l'édestine, soluble dans les solutions salines CINa à 10 % (1,95 p. 100 m.s.).
- Une prolamine, l'hordéine, soluble dans l'alcool froid à 75¢ (4 p. 100 m.s.).
- Une *glutéline*, soluble dans les alcalis et acides dilués (4,5 p. 100 m.s.).

En 1896, Osborne et Campbell [15] ont procédé à une étude analogue sur le malt et ont décrit les constituants azotés suivants :

- Une albumine, la leucosine (1,5 p. 100 de mat. sèche).
- Trois « protéoses » solubles dans l'eau.
- Une globuline, la « *bynedestin* » soluble dans les solutions salines (1,29 p. 100 m.s.).
- Une prolamine, la « bynin » soluble dans l'alcool à 75c (1,25 p. 100 m.s.).
- Une glutéline, soluble dans les alcalis et acides dilués (3,8 p. 100 m.s.).

En conclusion de leur monographie, les auteurs admettent qu'au cours de la germination, l'édestine et l'hordéine de l'orge ont été remplacées par d'autres protéides, la « bynedestin » et la « bynin », plus riches en carbone et plus pauvres en azote.

Brown (1907) [16] a identifié pour la première fois dans l'extrait aqueux du malt, des acides aminés ou dérivés, l'acide aspartique, l'asparagine, la tyrosine et la leucine.

En 1928, Bishop [17] a publié une importante étude dans laquelle il reprend la classification d'Osborne, l'adapte à l'analyse industrielle et précise les conditions d'extraction des différentes fractions protéiques.

Il distingue dans l'azote total :

 Une fraction azote-sel-soluble (par trois extractions successives par SO₄ K₂ à 5 p. 100): acides aminés, peptides, albumine, globuline.

- Une fraction azote-alcool-soluble (par trois extractions successives par l'alcool éthylique à 70°, bouillant à 82° C): hordéine.
- Une fraction azote résiduel : glutéline.

Les deux premières fractions sont dosées par la méthode de Kjeldahl, la troisième simplement calculée par différence.

A la suite de nombreuses analyses d'orges de variétés différentes, BISHOP a découvert et défini le principe de régularité de la composition azotée du grain; pour des échantillons d'une même variété, mais différemment riches en azote, la teneur en glutéline reste constante par rapport à l'azote total, tandis que le taux d'hordéine croît avec la teneur en azote et que le pourcentage d'azote-sel-soluble décroît.

En 1929 (a) continuant ses travaux sur le malt, Bishop [18], abandonne les dénominations d'Osborne (1896) [19], de « bynedestin », de « bynin » et ne conserve que les termes de leucosine, édestine, hordéine

et glutéline.

La première étude systématique sur l'évolution des fractions protéiques de l'orge au cours du maltage est celle de Візнор (1929, b) [20]. Elle établit que l'azote total ne varie pratiquement pas au cours du maltage (malt avec ses radicelles). En utilisant le fractionnement azoté qu'il avait mis au point (BISHOP, 1928-1929, a) [21], l'auteur a montré que, dans l'azote-sel-soluble, les variations de la fraction « albumineglobuline-protéoses » étaient peu sensibles. Bishop a précisé également le comportement des protéines de « réserve » de l'orge — hordéine et glutéline — qui sont protéolysées rapidement, du troisième au sixième jour de germination, et donnent des produits de dégradation groupés sous le nom de « non-protein-nitrogen». Vers la fin de la germination, la glutéline serait l'objet d'une « resynthèse » dans l'embryon et il s'établirait ensuite un équilibre entre la protéolyse des constituants azotés de l'endosperme et la « resynthèse » dans l'embryon. Après le touraillage, les proportions relatives de constituants azotés varient très légèrement pour les malts pâles.

D'autres travaux (Takahashi et Shirahama, 1931-32; Fink et Kunisch, 1937; Massart, 1946) [22], viennent dans l'ensemble confirmer

l'intéressante étude de Bishop sur le maltage.

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

Nous avons étudié différentes fractions protéiques de l'orge et suivi leur évolution au cours du maltage et du brassage.

Nous avons identifié les acides aminés libres et les amides correspondantes, ainsi que les polypeptides, par fractionnement sur résines à échange d'ions et chromatographie de partage sur papier. Nous avons soumis la fraction sel-soluble « albumines-globulines » et la fraction alcool-soluble « hordéine » à l'analyse électrophorétique, et leurs hydrolysats à l'analyse chromatographique. Nous avons tenté d'isoler dans la fraction « glutéline » des composants dont nous avons analysé les hydrolysats par chromatographie.

A. — BILANS AZOTÉS

Avant d'entreprendre une étude particulière des différentes fractions, nous avons essayé d'établir un bilan azoté complet de l'orge et du malt étudiés. Nous avons adopté, après divers essais, la méthode suivante :

« Orge Aurore »

1º Extraction et fractionnement de l'azote-sel-soluble.

200 g. de farine d'orge « Aurore » finement moulue (Scriban, 1949) [23], sont soumis à trois extractions successives en chambre froide, chaque fois par 800 ml de CINa M/1 tamponné à pH 7 par du phosphate de sodium (Quensel, 1942) [24]; on dose l'azote ainsi extrait. La solution est précipitée par six volumes d'acétone, et centrifugée à 0° C. L'azote est dosé dans la phase liquide: il correspond à un mélange d'aminoacides et de polypeptides. Le précipité est repris par l'eau distillée et on dose l'azote de la solution; celle-ci est dialysée pendant trois jours contre du tampon phosphatique de pH 7. On centrifuge le précipité qui s'est formé, on le sèche sous pression réduite et on détermine son taux d'azote (1). La phase liquide est, après dosage de l'azote, dialysée de nouveau, cette fois contre de l'eau distillée, pendant trois jours. On centrifuge le précipité formé et on le sèche sous pression réduite; on dose l'azote dans ce précipité, ainsi que dans la phase liquide surnageante.

⁽¹⁾ Nous avons constaté que ce précipité était riche en phosphore (à l'aide de la méthode d'Allen, 1940) (25).

2º Extraction et fractionnement de l'azote-alcool-soluble.

Le résidu de la première opération est soumis à trois extractions par 800 ml d'alcool à 70°, sous agitation, puis à l'ébullition à reflux. On filtre à chaud et on dose l'azote de la solution. Celle-ci est ensuite amenée par de l'alcool absolu à la concentration de 85° et maintenue à la température de — 10° C pendant huit jours. On centrifuge le précipité d'hordéine, on le sèche sous pression réduite, on le pèse et on dose l'azote ; on détermine également l'azote de la phase liquide.

3º Extraction et fractionnement de l'azote-glutéline.

Sur le culot de la dernière extraction alcoolique, on effectue trois extractions successives à froid par KOH N/5 (dans l'alcool à 45¢, on filtre et on dose l'azote de la solution. La « glutéline » est précipitée par le sulfate de magnésium à demi-saturation, on sèche le précipité, on le pèse et on y dose l'azote. Ici encore, on dose aussi l'azote de la phase liquide.

Le culot final de farine est séché sous pression réduite, pesé et soumis à un dosage d'azote.

Résultats

Au départ : 200 g. de farine d'orge : humidité 6,99 p. 100 (soit 186 g. de substance sèche) azote total 1,72 p. 100 de substance sèche.

 Azote-sel-soluble :
 549 mg (17,15 p. 100 de l'azote total).

 Azote-alcool-soluble :
 1.121 mg (35,1 p. 100 de NT).

 Azote-glutéline :
 392,5 mg (12,3 p. 100 de NT).

 Azote « résiduel » :
 85 mg (26,8 p. 100 de NT).

a) Fractionnement de l'azote-sel-soluble.

Départ : 549 mg d'azote.

Précipitation à l'acétone : Précipité, 356 mg

Phase liquide, 192 mg (35 p. 100).

Précipité après dialyse (pH 7) : Précipité, 128 mg Phase liquide, 171 mg

Phase liquide après dialyse contre

l'eau distillée : Précipité (globulines), 18,8 mg

Phase liquide (albumines), 135 mg

Fraction de l'azote non récupéré: 13,6 p. 100.

b) Fractionnement de l'azote-alcool-soluble.

Départ : 1.121 mg d'azote.

Précipité: 747 mg (« hordéine »).

Phase liquide alcoolique : 262 mg Fraction de l'azote non récupéré : 10 p. 100.

c) Fractionnement de l'azote-glutéline.

Départ : 392,5 mg d'azote.

Précipité : 28 mg (« glutéline »).

Phase liquide : 309 mg Fraction de l'azote non récupéré : 14 p. 100.

d) Azote « résiduel ».

101,3 g. de farine à 0,84 p. 100 d'azote, soit 851 mg d'azote.

Au total 2.913 mg d'azote sont retrouvés sur 3.200 mg et le déficit global atteint 9 p. 100. Celui-ci s'explique par la longueur et la multiplicité des manipulations (précipitations, centrifugations, filtrations).

Les résultats de ce bilan diffèrent sensiblement de ceux que donne le fractionnement classique selon Bishop (1928) [26]. Ils font ressortir la valeur relative de cette dernière méthode en ce qui concerne la fraction azote-glutéline.

Nous avons également établi un bilan azoté complet du malt correspondant à l'orge étudié.

Malt « Aurore »

1º Extraction et fractionnement de l'azote-sel-soluble.

200 g. de farine de malt finement moulu sont soumis à trois extractions successives en chambre froide, chaque fois par 800 ml de NaCl M/1, tamponné à pH 7 par du phosphate de sodium; on dose l'azote ainsi extrait. La solution est précipitée par six volumes d'acétone et centrifugée à 0° C. L'azote est dosé dans la phase liquide; il correspond à un mélange d'amino-acides et de polypeptides. Le précipité est repris par l'eau distillée et on dose l'azote de la solution obtenue.

2º Extraction de l'azote-alcool-soluble.

Le résidu de la première opération est soumis à trois extractions par 800 ml d'alcool à 70c, sous agitation, puis à l'ébullition à reflux. On filtre à chaud et on dose l'azote de la solution.

3º Extraction et fractionnement de l'azote-glutéline.

Sur le culot de la dernière extraction alcoolique, on effectue trois extractions successives à froid par KOH $\rm N/5$ dans l'alcool à 45c, on centrifuge et on dose dans l'azote de la solution. Le culot final de farine est séché sous pression réduite, pesé et soumis à un dosage d'azote.

Résultats

Au départ : 200 g. de farine de malt : humidité 4,5 p. 100 (soit

191 g. de substance sèche); azote total, 1,62 p. 100 de substance sèche, soit en tout 3,094 mg d'azote.

Azote-sel soluble: 1.570 mg (50,7 p. 100 de l'azote total).

 Azote-alcool-soluble :
 637 mg (20,6 p. 100 de NT).

 Azote-glutéline :
 84,8 mg (2,74 p. 100 de NT).

 Azote « résiduel » :
 86,7 mg (26 p. 100 de NT).

Fractionnement de l'azote-sel-soluble.

Départ : 1.570 mg d'azote.

Précipitation à l'acétone : Précipité, 534 mg

Phase liquide, 1.036 mg (66 p. 100).

Au total, on retrouve l'azote initial à 4,76 p. 100 près. Les résultats de ce bilan s'approchent davantage des moyennes données par le fractionnement selon BISHOP.

B. — EXTRACTION DES ACIDES AMINÉS ET DES POLYPEPTIDES

La chromatographie de partage sur papier exige une solution chromatographique pratiquement exempte de sels minéraux. En effet, la présence d'ions Na+ et Cl— par exemple, de vitesses de migration (Rf) différentes suivant les solvants utilisés (Westall, 1948) [27], détermine un « effet-sels » (Consden et coll., 1944) [28]. L'ion chlore provoque la formation d'une bande opalescente dans la partie supérieure du chromatogramme (zone acide) et d'autre part la présence de l'ion sodium dans la région inférieure (zone basique) ne permet pas de révéler facilement le glycocolle, la thréonine, l'alanine et la tyrosine (Boulanger et Biserte, 1950) [29].

En premier lieu, nous avons essayé l'extraction des acides aminés de l'orge par l'eau distillée (Biserte et Scriban, 1949) [30], mais ce procédé n'a pas donné satisfaction en raison de la présence de sels minéraux (de potassium, de magnésium, de sodium). Nous avons donc soumis les extraits aqueux à la technique de dessalage de Consden (Consden et coll., 1947 [31]: dessaleur à cathode de mercure); les essais ont été rapidement abandonnés, en raison des mauvais résultats obtenus.

Dans une autre série d'expériences, nous avons extrait les aminoacides et polypeptides de l'orge (Biserte et Scriban, 1949) [32], par l'acétone chlorhydrique qui donne de bons résultats dans l'étude du plasma sanguin (Boulanger et Biserte, 1949) [33]. Ce solvant, assez médiocre pour les acides aminés, présente l'avantage de précipiter les protéines et de ne pas extraire pratiquement de sels minéraux.

100 g. de farine sont traités par 500 ml d'acétone redistillée, addi-

tionnée de 1 p. 100 d'acide chlorhydrique pur (v/v). Le mélange est soumis à une agitation de deux heures en chambre froide.

Après centrifugation, la phase liquide est concentrée sous pression réduite à 40° C dans un ballon de Claisen. Le résidu est repris en milieu chlorhydrique dilué et traité trois fois à l'éther sulfurique pour délipidation. On évapore le résidu sous pression réduite au dessicateur pour éliminer complètement l'acide chlorhydrique, le résidu sec étant repris plusieurs fois à l'eau distillée et évaporé de nouveau vingt-quatre à trente-six heures).

Nous avons observé que la délipidation à l'éther sulfurique entraînait des acides aminés et qu'il était nécessaire de laver l'éther utilisé par de l'eau acidulée jointe ensuite au résidu à dessécher.

L'acétone chlorhydrique nous a donné des chromatogrammes présentant quelques anomalies, sous la forme de taches allongées de RF mal défini, dans le système butanol/acide acétique. Nous avions pensé tout d'abord que ces taches correspondaient à des petits polypeptides (BISERTE et SCRIBAN, 1949) [34], mais après récupération et hydrolyse, ceci n'a pu être confirmé; il s'agissait donc certainement d'artéfacts dûs à une déminéralisation et une délipidation incomplètes.

Nous avons tenté ensuite une délipidation préliminaire de la farine d'orge par l'éther sulfurique, suivie d'une extraction acétonique. Nos chromatogrammes n'ont pas été sensiblement améliorés et, d'autre part, des acides aminés comme la valine et la leucine ont été entraînés.

Nous avons ainsi été amenés à mettre au point la technique suivante qui nous a donné toute satisfaction (BISERTE et SCRIBAN, 1950 a, b, 1951, a) [35]:

— 200 ml d'eau distillée et 100 g. de farine finement broyés sont dialysés sous agitation mécanique contre deux fois 700 ml d'eau distillée ; l'opération est conduite en chambre froide pendant vingt-quatre heures, en présence d'une petite quantité de toluène.

Dans le cas de l'orge germée, nous prenons un poids de farine équivalent en matière sèche aux 100 g. de farine d'orge non germée. Le broyage s'effectue de la façon suivante : l'orge germée est congelée pendant vingt-quatre heures par la neige carbonique, puis broyée dans un moulin préalablement refroidi de la même manière. Pour le moût, on dialyse deux litres de l'échantillon par fractions de 300 ml pour 1.400 ml d'eau distillée.

Le dialysat est ensuite concentré sous pression réduite à 40° C, jusqu'à un volume de 100 ml. On le soumet à un fractionnement sur résine à échange de cations (*Permutite 50* (1); ceci permet un dessalage efficace de la solution et assure la réalisation de chromatogrammes corrects.

La Permutite 50 est une résine polystyrène-sulfonée dont les groupements actifs SO₃H échangent leur ion H + contre les cations miné-

⁽¹⁾ Des Établissements Phillips et Pain.

raux de la solution étudiée. Les colonnes de fractionnement ont un diamètre de 16 mm. et une hauteur de 25 à 30 cm. La résine est passée auparavant sur deux tamis, l'un de 30, l'autre de 50.

Les différentes opérations s'échelonnent ainsi (Boulanger, Biserte et Scriban, 1950) [36] :

- Régénération de la colonne par HCl 2N, 500 ml;
- Lavage de la colonne par l'eau distillée jusqu'à résistivité constante (1 M Ω) du liquide effluent;
- Passage de la solution à désioniser (50 ml en moyenne) à raison de 10 ml en sept ou dix minutes;
- Lavage de la colonne par 200 à 400 ml d'eau distillée. Lorsque les glucides sont abondants, le lavage est réalisé par l'eau acidulée à pH 5,5 par CH₃CO₂H (HULME et ARTHINGTON, 1950) [37];
- Passage de NH₄OH N puis, après réaction positive à la phénolphtaléine à la sortie de la colonne, passage de NH₄OH 0,3 N.

Au moment du passage du « front » de l'ammoniaque, les acides aminés et les petits peptides sont déplacés en totalité et on recueille 50 ml environ de liquide que l'on concentre sous pression réduite avant chromatographie unidimensionnelle. Ils constituent la fraction I.

Fractionnement des acides aminés et des polypeptides.

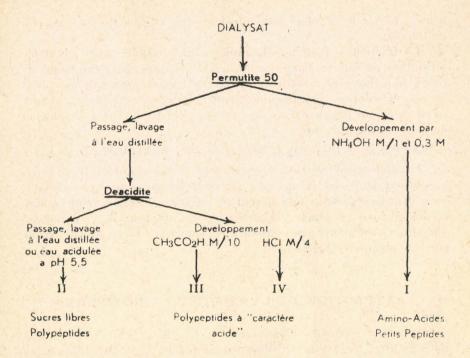
Après passage du dialysat concentré sur la colonne de *Permutite 50*; le liquide de lavage à l'eau distillée contient de nombreux glucides et des polypeptides. Les glucides ont été étudiés par chromatographie de partage sur papier selon la méthode de Partridee (1948) [38] et ont fait l'objet de publications préliminaires (Montreuil et Scriban, 1951, a, b) [39].

L'élution de la colonne par l'ammoniaque donne la fraction I comprenant acides aminés et petits peptides, comme nous l'avons défini plus haut.

Les composés polypeptidiques et les glucides, qui n'ont pas été fixés sur la *Permutite 50*, sont ensuite fractionnés par une résine à échange d'anions, la *Deacidite*. Les colonnes de *Deacidite* sont au préalable régénérées par CH₃CO₂Na N/4, puis lavées à l'eau distillée jusqu'à résistivité constante du liquide effluent.

Le passage sur Deacidite et le lavage à l'eau distillée permet d'isoler une fraction II contenant les polypeptides et les glucides. La colonne est alors éluée par l'acide acétique M/10, qui donne une fraction III, et ensuite par l'acide chlorhydrique M/4, qui donne une fraction IV (Partridge et Brimley, 1949) [40]; les fractions III et IV renferment des polypeptides à caractère acide.

L'ensemble de ces opérations est résumé dans le schéma suivant :



C. — EXTRACTION DE LA FRACTION « ALBUMINES-GLOBULINES »

L'extraction de l'« azote-sel-soluble» se fait, en général, par des solutions de CINa à 10 p. 100 (Osborne, 1895) [41], par SO₄K₂ à 5 p. 100 (Bishop, 1928; Urion et Lejeune, 1940; Kent et Macheboeuf, 1949) [42], et plus récemment, dans les travaux suédois, par CINa M/1 tamponné à pH 7 (Quensel, 1942) [43].

Des essais préliminaires nous ont montré que les quantités d'azote soluble extraites par ces différentes solutions salines sont sensiblement équivalentes, ce qui est conforme aux observations de Bishop (1928), Chabot (1937), Urion et coll. (1944, c) [44].

Comme les travaux les plus récents et les plus complets sur les albumines et globulines de l'orge ont été réalisés en Suède, nous avons donné la préférence à la méthode d'extraction de QUENSEL, ce qui nous a permis des comparaisons plus intéressantes.

La composition de la solution d'extraction utilisée est la suivante : CINa M/1 — PO₄Na₂H 0,06 M — PO₄Na H₂ 0,04 M de pH 7; elle est additionnée de 0,1 p. 100 de BrO₃K pour inactiver les enzymes protéolytiques (Sandegren, 1949) [45] et de traces de thymol comme antiseptique (Chabot, 1937) [46].

100 g. de farine sont extraits par 600 ml de solution chlorurée avec agitation mécanique en chambre froide pendant vingt-quatre

heures. L'extrait est alors filtré plusieurs fois et recueilli sous un peu de toluène.

La fraction « albumines-globulines » est précipitée à 70 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium, à pH 7. Après une demi-heure de repos, le mélange est centrifugé, le précipité est recueilli, dissous dans un peu de solution chlorurée additionnée d'un peu de toluène, et mis en dialyse sous pression dans un tube de cellophane contre la solution de composition suivante :

CINa 0,2 M — PO₄ Na₂ H 0,03 M — PO₄ Na H₂ 0,02 M, de pH 7

La dialyse est poursuivie en chambre froide pendant trois jours, la solution de dialyse étant renouvelée trois fois par jour. Après dialyse, on centrifuge le contenu du dialyseur ; le précipité contenant du phosphore et des glucides est écarté ; la phase liquide, solution d'« albumines-globulines», est colorée assez fortement en brun rouge foncé, probablement par des pigments végétaux.

D. - EXTRACTION DE LA FRACTION « HORDEINE »

Plusieurs méthodes d'extraction de l'hordéine ont été proposées dans la littérature. Elles se différencient par le degré alcoolique de la solution utilisée et par le fait que l'extraction a lieu soit à froid, soit à l'ébullition à reflux.

Nous avons expérimenté ces différentes méthodes. Le degré alcoolique de la solution d'extraction varie, en général, de 60¢ (Quensel, Svedberg, 1937) [47], à 75¢ (Osborne, 1895) [48], en passant par 70¢ (Таканаян, 1927; Візнор, 1928) [49]. Entre 30¢ et 60¢, il est évident que la solubilité de l'hordéine augmentant, la quantité d'azote-alcool-soluble disssous croît également (Rose et Anderson, 1936) [50]. Il est certain que, de 70¢ et 75¢, la solution alcoolique extrait à froid sensiblement la même quantité d'azote-alcool-soluble et que l'on est bien à l'optimum de solubilité à froid de l'hordéine (Osborne, 1924; Снавот, 1942) [51].

La différence essentielle entre les méthodes proposées réside surtout dans la température d'extraction.

L'extraction sous ébullition à reflux proposée par Bishop (1928) [52] pour son fractionnement azoté, désormais classique en Brasserie, a été inspirée par des travaux sur la gliadine du blé. Effectivement, l'alcool bouillant extrait deux fois plus d'azote que l'alcool froid. Comme le remarquent Bishop (loc. cit.), Luers et Geiger (1935) [53], il n'est pas douteux que des constituants azotés distincts de l'hordéine, lécithines ou phosphatides, dont on connait la présence dans l'orge, et probablement des constituants non azotés, soient extraits en même temps. Aussi, à partir d'extraits alcooliques d'orge, nous avons préparé des fractions « hordéine » par précipitation, en amenant le titre à 85c

et en maintenant la solution à — 20° C (Scriban, 1950) [54]. Les « hordéines » ainsi obtenues avaient une faible teneur en azote (de 8,35 à 11,75 p. 100) et une très faible teneur en acide glutamique — déterminée par la méthode de Gale (1945) [55] — (de 0 à 1,27 p. 100 en poids sec alors que l'hordéine pure en contient de 30 à 40 p. 100). Ces analyses confirmaient donc la présence d'éléments étrangers à l'hordéine. En conséquence, nous avons abandonné l'extraction à chaud de Bishop pour adopter la méthode d'Osborne et Clapp (1907) [56], du moins lorsqu'il s'agissait d'une étude de l'hordéine proprement dite.

Nous décrirons de nouveau cette technique. 100 g. de farine sont extraits directement en présence de 600 ml d'alcool éthylique à 70c à la température du laboratoire sous agitation mécanique. Après filtration la liqueur est évaporée sous pression réduite à 50° C en ballon de Claisen jusqu'à un volume de 50 ml environ; elle a un aspect sirupeux et une couleur rouge. On la verse dans un litre d'eau distillée glacée, additionnée de 0,1 g. de ClNa. Après quarante-huit heures de précipitation en glacière, on décante et on centrifuge. La phase liquide rejetée contient les substances plus ou moins solubles à la fois dans l'eau et l'alcool (acides aminés libres, tannins, sucres, pigments colorés). En raison de sa très faible solubilité dans l'eau (0,02 p. 100 — BISHOP, 1928) [57], et surtout dans l'eau glacée, la perte en hordéine est négligeable au cours de cette phase de purification.

Le précipité est lavé trois fois à l'eau distillée glacée, centrifugé, puis dissous dans un volume minimum d'alcool à 70c et versé dans un litre d'alcool absolu glacé. Après quarante-huit heures de précipitation, le liquide est décanté et centrifugé. Le précipité d'hordéine est déshydraté par trois lavages successifs et macérations dans l'alcool absolu suivis d'un traitement à l'éther sulfurique, et enfin desséché au dessicateur.

L'hordéine pure a l'aspect d'une poudre d'un blanc neigeux.

E. - EXTRACTION DE LA FRACTION « GLUTELINE »

L'étude de cette fraction est très délicate, en raison des caractères très particuliers de solubilité de la « glutéline ».

Nous avons écarté toute extraction alcaline à chaud, car elle hydrolyse partiellement les protéines restantes de l'orge. Rose et Anderson (1936) [58] ont montré en effet que des extractions par NaOH 0,5 N dans de l'alcool à 70¢, à 82° C peuvent déterminer l'hydrolyse des groupements amidés.

Osborne (1895) [59] a traité la farine d'orge par des solutions de potasse diluée ; il a été gêné par la gélification des gommes qui rend la filtration ou la centrifugation difficiles. Il n'a pu isoler de fractions pures de glutélines.

Nous avons essayé la méthode de Csonka et Jones (1927) [60], adaptée par Bishop (1928) [61]. Après extraction de l'azote-sel-soluble et de l'azote-alcool-soluble, la farine est extraite par KOH N/5 additionnée de 45 p. 100 d'alcool. Après filtration, la solution est précipitée par SO₄ Mg à demi-saturation. Le précipité est décanté, centrifugé, lavé à l'eau distillée à l'alcool absolu et à l'éther, enfin desséché dans le vide. Les analyses données dans le bilan azoté (p. 17) sont significatives. Après trois extractions on est loin d'extraire tout l'azote restant dans la farine, et le sulfate de magnésium ne précipite que 7 p. 100 de l'azote extrait. Toutefois, la fraction « glutéline » préparée à partir de cette méthode est relativement riche en azote total (10 et 9,1 p. 100).

Nous avons aussi expérimenté HCl N/5 (Chabor, 1942) [62], et précipité la « glutéline » en neutralisant l'extrait par la soude jusqu'à pH 7. La fraction a été purifiée comme précédemment.

Enfin, nous avons appliqué une autre méthode de Csonka et Jones (1929) [63]. La farine séparée du son est traitée directement par NaOH à 0,2 p. 100 dans l'alcool à 50 p. 100. L'extrait est neutralisé jusqu'à pH 6,8 par HCl; après lavage à l'eau acidulée et à l'alcool, le précipité est dissous dans NaOH à 0,2 p. 100 et fractionné par SO 4 (NH 4)2 jusqu'à 3 p.100 de saturation pour la fraction α , puis jusqu'à 18 p. 100 de saturation pour la fraction β . Après purification, l' α -glutéline contenait 11,8 p. 100 d'azote total et la β -glutéline 15,1 p. 100. Nous avons vérifié qu'après 18 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium, il n'y avait plus de précipitation. Les proportions relatives d' α et de β -glutéline correspondent à celles indiquées par les auteurs (nous avons trouvé sept fois plus d' α que de β -glutéline).

Ces méthodes d'extraction sont insuffisantes; elles emploient des solvants acides ou alcalins qui, même dilués, peuvent déterminer des hydrolyses. Elles extraient des fractions protéiques mal définies, dont l'étude est à reprendre entièrement.

F. - CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR PAPIER

Cette méthode expérimentale a été décrite pour la première fois en 1944, par Gordon, Martin, Synge et Consden [64]. Nous l'avons utilisée en raison de sa simplicité, de sa précision et surtout de la possibilité d'opérer sur de faibles quantités de matière ; en outre, elle permet, en une seule opération, de se faire une idée assez exacte du « pool » d'amino-acides libres d'une orge, d'un moût ou des acides aminés constitutifs d'un hydrolysat protéique ; c'est là un très grand avantage.

Nous rappellerons brièvement le principe de cette méthode récente. Contrairement à la chromatographie classique, elle ne fait pas appel à des phénomènes d'adsorption sélective sur les substances pulvérulentes, mais au « partage » des corps à séparer entre deux solvants, dans

lesquels leurs solubilités sont inégales. Elle se rapproche à cet égard du procédé dit d'extraction à contre-courant, où deux phases liquides, peu ou non miscibles, circulent en sens inverse ; les substances dissoutes dans l'une étant extraites par l'autre d'autant plus facilement et rapidement que leur solubilité dans ce second solvant est plus grande. Dans la chromatographie de partage, l'artifice expérimental consiste à remplacer les deux phases mobiles par une phase stationnaire (qui est presque toujours la phase aqueuse) et une phase mobile (constituée généralement par un solvant organique).

Dans la chromatographie sur papier, c'est l' « humidité » du papierfiltre qui joue le rôle de phase stationnaire, la phase mobile étant représentée par le solvant organique ou un mélange de solvants organiques saturé d'eau.

Les amino-acides et les polypeptides sont séparés grâce à leur coefficient de partage différent entre ces deux phases liquides. Pour un solvant donné et des conditions expérimentales identiques, on caractérise chaque amino-acide par un coefficient appelé RF:

$$R_F = \frac{\text{déplacement de la bande de corps dissous}}{\text{déplacement du front du liquide}}$$

Pour de plus amples détails sur la méthode et la bibliographie nous renvoyons aux revues générales de Boulanger et Biserte (1950) [65] et de Clegg (1950) [66].

Au cours de notre travail, nous avons utilisé le papier Whatman no 1 et comme solvants : le phénol saturé d'eau en atmosphère ammoniacale, le mélange butanol/acide acétique/eau et l'alcool benzylique.

Le phénol saturé d'eau s'obtient en agitant dans une ampoule à décanter du phénol avec un excès d'eau; on laisse décanter longtemps et la couche de phénol saturé d'eau est soutirée. L'atmosphère d'ammoniaque (3 p. 100) est destinée à neutraliser l'acide chlorhydrique pouvant encore exister dans un hydrolysat. Le mélange butanol/acide acétique (Partridge, 1948) [67], se prépare de la façon suivante; dans une ampoule à décanter, on verse 40 ml de n-butanol purifié par distillation et déshydraté, et 10 ml d'acide acétique purifié par cristallisation. Après agitation, on ajoute 50 ml d'eau distillée et on agite énergiquement. On laisse décanter une demi-journée et on récupère la couche supérieure homogène.

A la fin de la chromatographie, le papier est séché à l'étuve vers 100-105° C et révélé par la ninhydrine (hydrate de tricétohydrindène) à 0,1 p. 100 dans le butanol saturé d'eau. Le chromatogramme est développé rapidement à l'étuve entre 80 et 100° C; lorsqu'il y a de petits polypeptides, le temps de chauffage doit être plus long. La lecture du chromatogramme se fait immédiatement en lumière transmise et on affecte alors chaque tache d'un coefficient estimé d'après l'intensité de coloration et la surface des taches révélées à la ninhydrine, La concentration relative de la proline ne peut être appréciée en raison de sa

couleur jaune caractéristique. Pour chaque chromatogramme on peut ainsi établir un tableau des proportions relatives des différents acides aminés ou dérivés de ceux-ci (glutamine, asparagine...).

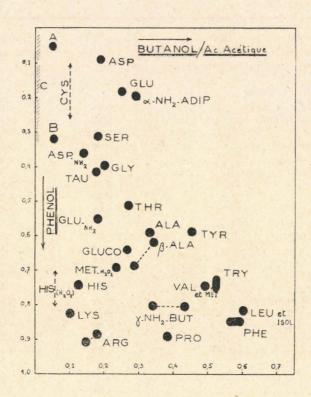
Nous ne présentons pas de chromatographies en une dimension, car elles ne nous servent, en général, qu'à « dégrossir » le travail et à déterminer en particulier la quantité de solution étudiée à mettre en œuvre. Les chromatographies en deux dimensions ont été réalisées avec le système butanol/acide acétique/eau et phénol/ammoniaque (3 p. 100). La figure schématique n° 1 donne la carte des acides aminés dans ce système de solvants, que nous avons employé couramment. Le tableau correspondant I, ci-dessous, donne les RF des différents acides aminés ou dérivés, que nous avons rencontrés au cours de notre travail.

La valeur des RF dans le butanol/acide acétique sont assez variables suivant la température de l'expérience et le vieillissement de la solution butanol/acide acétique. Le RF, d'une façon générale, n'a pas une valeur absolue; il varie suivant le papier, la température de la cuve à chromatographie, la concentration des produits à séparer...; seule, la répartition relative des taches étudiées par « lecture à vue » est constante.

Les possibilités de l'analyse chromatographique sont plus limitées en ce qui concerne les polypeptides. En raison de leur poids moléculaire plus élevé, il est difficile de les séparer dans les systèmes de solvants habituellement employés pour les amino-acides. La réaction à la ninhydrine n'est pas très sensible avec les polypeptides, aussi doit-on en utiliser beaucoup plus (1 à 5 mg) que dans le cas des amino-acides (10 à 100 µg d'amino-acides). Le repérage des taches de polypeptides sur les chromatogrammes est délicat. Il se fait en lumière de Wood, qui donne aux taches de polypeptides une fluorescence bleutée ou jaunâtre caractéristique. Leur élution, après découpage sur le chromatogramme, est réalisée selon la méthode de Consden (1947) [68].

L'étude des hydrolysats protéiques s'effectue de la façon suivante : 10 mg de substance (1 à 2 mg d'azote) sont hydrolysés en tube scellé à 100° C, pendant vingt-quatre heures, en présence d'acide chlorhydrique 6 N. L'acide chlorhydrique est ensuite chassé, par évaporation sous pression réduite, pendant deux jours et le résidu est repris par 0,1à 0,2 ml d'eau distillée. L'étude chromatographique est réalisée à partir de 10, 20, 30 µl, etc., de cette solution. La sensibilité de la méthode chromatographique permet de déceler 5 µg d'amino-acide (1).

⁽¹⁾ Les nombreuses chromatographies de ce travail ont été réalisées dans le Service de Biochimie de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, sous la direction de G. Biserte et avec la collaboration technique de M¹¹º J. Dehove; nous les remercions tout particulièrement.



 $\it Fig.$ 1, — Carte des acides aminés dans le système butanolacide acétique et phénol (NH $_3$ 3 p. 100).

 $\begin{array}{c} T_{ABLEAU} \quad I \\ \\ R_F \quad des \quad amino-acides \quad ou \quad dérivés \quad dans \quad le \quad système \\ \\ Butanol/acide \quad acétique \quad et \quad Phénol \quad (NH_3 \quad 3 \quad p. \quad 100) \end{array}$

-AMINO-ACIDES OU DÉRIVÉS	Phénol (NH ₃) 3 p. 100	Butanol acide acétique
Dérivés de cystine :		
A = Acide cystéique	0.05	0.05
B = Lanthionine	0.32	0.05
C	0 à 0.32	0,00
Acide aspartique	0.09	0.19
Acide glutamique		0.25
Acide z-amino-adipique	0,20	0,30
Sérine	0,31	0,18
Glycocolle	0,40	0,20
Taurine	0,41	0,18
Thréonine	0,50	0,27
Asparagine	0,35	0,14
Glutamine	0,55	0,18
Alanine	0,58	0,32
Tyrosine	0,58	0,45
β - Alanine	0,61	0,34
Valine et Méthionine	0,74	0,49
Tryptophane	0,74	0,52
Leucine — Isoleucine	0,80	0,60
Phénylalanine	0,89	0,58
Acide y - amino-butyrique	0,79	0,43
Méthionine-sulfone	0,68	0,26
Histidine	0,73	0,13
Lysine	0,81	0,10
Arginine	0,88	0,17
Proline	0,87	0,38
La Companya Caraca Cara		in the Table

G. - ÉLECTROPHORÈSE DIFFÉRENTIELLE

Le dispositif optique d'enregistrement que nous employons et qui a été décrit par Swyngedauw et Masse (1945) [69], repose sur un principe identique à celui de Philpot-Svensson; les variations des gradients de concentration se traduisent en surface sombre sur un fond clair au niveau du plan d'enregistrement. La courbe ainsi dessinée présente autant d'accidents qu'il y a de constituants électrophorétiquement différents dans le mélange protéique étudié. On peut aussi suivre le phénomène d'électrophorèse par un dispositif automatique d'enregistrement photographique.

Par l'électrophorèse différentielle, on peut préciser :

- Le nombre de groupes de protéines « électrochimiquement » semblables : il est égal à celui des sommets sur le cliché d'électrophorèse ;
- La vitesse de chaque groupe, pour des conditions expérimentales données (pH, temps, champ électrique...);
- La concentration des différentes fractions (intégration des courbes);
- Le degré d'homogénéité : à un sommet aigu correspondent des molécules protéiques électriquement semblables, à un sommet étalé correspond certainement un mélange complexe de protéines.

Néanmoins, une fraction protéique qui se révèle électrophorétiquement homogène ne peut être considérée à priori comme tout à fait pure. Pour cela, il faut qu'elle se révèle homogène aussi vis-à-vis d'autres critères de pureté, le critère de E.J. Cohn (1925) [70], par exemple (1).

Préparation de la solution protéique.

On dialyse en général la solution protéique contre du tampon phosphate M/30 de pH 7,8 et de force ionique $\mu=0,094$, ou contre du tampon phosphate M/22,5 de pH 7 et de force ionique $\mu=0,1$. La dialyse a lieu en chambre froide pendant quarante-huit heures, jusqu'à équilibre ionique. La solution est ensuite centrifugée, puis on prélève 2 à 5 ml suivant la cellule d'électrophorèse utilisée.

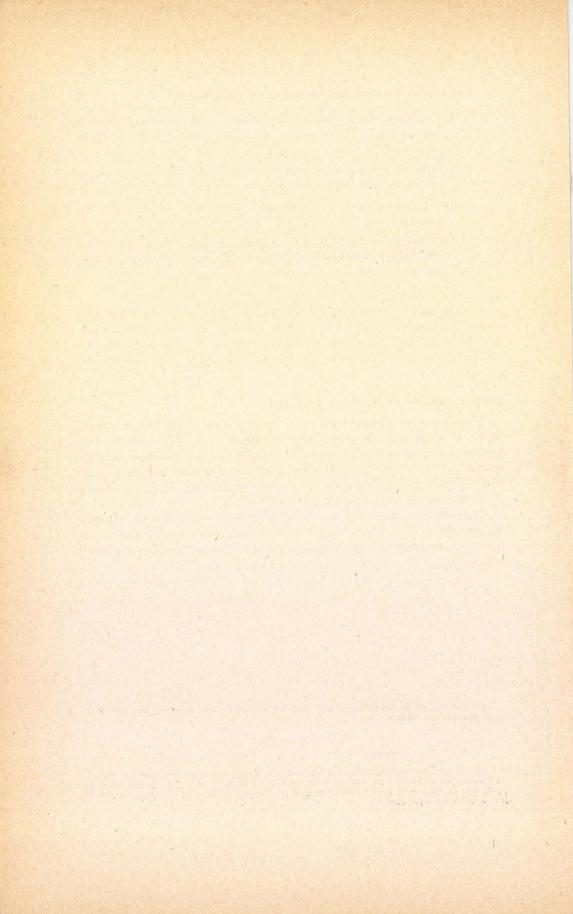
Les électrophorèses (2) ont été conduites avec une intensité moyenne de courant de 2 à 8 mA. Elles ont été enregistrées optiquement en frontières ascendantes et descendantes sur film ou plaques panchromatiques.

$$\label{eq:special} \log \ S = \beta - Ks \ \mu$$

$$\mu = \text{force ionique.} \qquad Ks = * \text{ salting-out constant } *.$$

⁽¹⁾ Le log. de la solubilité d'une protéine doit être une fonction linéaire de la force ionique du milieu :

⁽²⁾ Toutes les électrophorèses de ce travail ont été réalisées par le service d'Électrophorèse de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, sous la direction du Prof. Ag. L. Masse et avec la collaboration technique de M¹¹ G. Delescluse. Nous les remercions sincèrement.



RÉSULTATS PERSONNELS

A. — FRACTION « ALBUMINES-GLOBULINES »

I. - Maltage.

Historique. — La fraction azote-sel-soluble de Bishop (1928) [71], comprend acides aminés, polypeptides, « protéoses », globulines, albumines.

L'individualité de cette fraction azotée, extraite par SO₄K₂ à 5 p. 100 a été mise nettement en évidence par Rose et Anderson (1936) [72]. Elle a été étudiée quantitativement; les conditions d'augmentation du taux d'extraction en fonction de la finesse de mouture ont été précisées par Bang (1930), Urion et Golovtschenko (1940), Scriban (1949) [73]; d'autre part, l'influence des différents facteurs (température, pH, concentration et nature de la salinité) sur la quantité d'azote-sel-soluble extrait, a fait l'objet de travaux de Urion et coll., (1944) [74].

L'étude qualitative de l'azote-sel-soluble a été entreprise au moyen d'agents de fractionnement physique (chaleur) ou chimiques (Cl₂ Zn, SO₄Mg, CCl₃CO₂H, etc...), par Osborne et Campbell (1896), Brown (1907), Schjerning (1914), Bishop (1928, 1929, a), Urion et Lejeune (1940) [75]. Ces méthodes anciennes ont donné des résultats arbitraires en raison de leur brutalité et des dénaturations qu'elles produisent.

Les techniques modernes d'ultracentrifugation, d'électrophorèse, de polarographie ont permis de faire des progrès importants dans la connaissance des albumines et des globulines de l'orge et du malt.

Dès 1937, QUENSEL et SVEDBERG [76] ont observé l'hétérogénéité de la fraction « albumines-globulines » de l'orge soumise à l'ultracentrifugation. Poursuivant ses recherches sur la globuline (édestine) de l'orge, QUENSEL (1942) [77] a mis au point un fractionnement de l'extrait chloruré sodique d'orge par le sulfate d'ammonium, contrôlé par ultracentrifugation à 68.000 tours/minutes. Quatre constituants ont été identifiés :

- Précipité jusqu'à 15 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium : β-globuline;
- Précipité entre 40 et 70 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium : α -, δ -, γ globuline.

Voici quelques caractéristiques de ces constituants :

α - globuline,	poids moléculaire :	26.000	pH_i	=5	
β - globuline,		100.000 ?		= 4,9	
γ - globuline,	The state of the s	166.000		= 5,7	
δ - globuline,		300.000 ?	-	= ?	10

Entre 15 et 40 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium, QUENSEL montre l'existence d'une fraction mal définie, qui n'a pas été étudiée en détail.

Des recherches analogues ont été effectuées sur les autres céréales, blé, riz, avoine (Saverborn, Danielsson et Syedberg, 1944; Danielsson, 1949) [78]; elles ont montré que l'orge était la seule céréale contenant de la β -globuline. Parmi les quatre constituants de la globuline de l'orge, c'est elle qui est la plus riche en soufre, soit 1,94 p. 100 (Sandegren, 1947) [79]. La γ -globuline est localisée dans l'embryon, tandis que l' α et la β -globuline se rencontrent principalement dans les cellules à aleurone; l'endosperme contiendrait peu de globulines (Saverborn et coll., loc. cit.).

L'albumine de l'orge, ou leucosine, a été examinée également à l'ultracentrifugation. Quensel (1941) [80] croyait que la leucosine était polydispersée, mais en réalité la fraction qu'il avait préparée contenait encore des globulines. Danielsson et Sandegren (1947) [81] ont perfectionné la technique de fractionnement de Quensel (1942) [82]; ils ont purifié soigneusement l'albumine par fractionnements répétés, au sulfate d'ammonium à 70 p. 100 en saturation, et des dialyses successives contre l'eau distillée. Ces auteurs ont démontré que l'albumine de l'orge et celle du malt avaient la même constante de sédimentation, qu'elles étaient homogènes et identiques; le poids moléculaire de l'albumine serait de 54.000 (Danielsson, 1948; in Lundin, 1949) [83]. Danielsson et Sandegren (loc. cit.) ont montré que l'activité de la β-amylase était liée à l'albumine de l'orge et que l'activité des α - et β-amylases était liée à l'albumine du malt.

L'évolution des constituants de l'édestine de l'orge a été suivie au cours du maltage (Saverborn, et coll., 1944) [84]. L' α -globuline diminue légèrement, la γ - globuline beaucoup plus et la δ - globuline disparait complètement ; la β - globuline, au contraire, ne subit aucune modification.

Quensel et Svedberg (1937) [85] ont soumis, les premiers, la fraction « albumines-globulines » de l'orge à l'électrophorèse différentielle. L'extrait chloruré d'orge est soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium ; le précipité est dissous dans un tampon phosphate de pH 8 et dialysé contre ce même tampon. Deux composants principaux ont été observés ; l'un d'entre eux est immobile. Les auteurs admettent après une électrophorèse séparative la présence d'hydrates de carbone dans l'extrait ; ceux-ci peuvent accompagner des constituants protéiques

au cours de leur migration électrophorétique et ils constituent, en grande partie, le composant de vitesse électrophorétique nulle.

Kent et Macheboeuf (1949) [86] ont séparé, de l'azote-sel-soluble de l'orge, un précipité A relativement pauvre en azote et riche en phosphore (1,25 p. 100); la solution, traitée par le sulfate d'ammonium à la concentration de 22,5 p. 100, à 0° C et pH 5,5, donne un précipité qui, soumis à l'électrophorèse, apparaît constitué par un composant principal homogène B (85 p. 100) et un composant mineur b, moins mobile et également homogène (15 p. 100). Il reste en solution une fraction C, pauvre en azote, qui représente une proportion importante du poids initial et qui n'a pas été étudiée.

L'étude électrophorétique de la fraction « albumines-globulines » de l'orge vient d'être reprise par Ayrapaa sous la direction du Dr Brohult aux Laboratoires L.K.B. de Stockholm. Cette fraction est encore plus complexe qu'on ne l'admettait jusqu'à présent : albumines et globulines sont électrophorétiquement très hétérogènes (résultats non publiés).

Sandegren (1949), Sandegren et coll. (1949) [87], ont étudié la leucosine, l'édestine et la β - globuline au moyen de la polarographie. Ces protéines ont en effet une activité polarographique résultant de la présence de groupes — SH et — S-S — dans leur molécule (présence de cystéine et de cystine).

Au Laboratoire de Carlsberg, la chromatographie de partage sur colonne d'amidon, selon la méthode de Moore et Stein, a été employée dans l'étude de la β-globuline. La composition en acides aminés de l'hydrolysat de cette fraction, isolée par la méthode de Quensel, a été étudiée par Jensen (1951) [88]; la β-globuline est riche en acide glutamique et proline (communication orale du Dr Trolle, Juin 1951).

Résultats expérimentaux

a) - Orge.

Etude électrophorétique. — On prépare la fraction « albumines-globulines » d'une orge « Aurore » à partir d'un extrait chloruré, selon la méthode de Quensel (p. 21), et on dialyse contre tampon phosphate de pH 7, jusqu'à équilibre ionique.

L'électrophorèse différentielle a lieu en frontières descendantes (1) à pH 7. L'enregistrement se fait en lumière rouge sur plaque panchromatique, après vingt à trente minutes de pose, en raison de la coloration brunâtre de la solution. Le diagramme d'électrophorèse (Fig. 2 a) montre après deux-cent-quatre-vingt-cinq minutes de passage du courant, la

⁽¹⁾ Avec le dispositif d'électrophorèse que nous utilisons, l'enregistrement photographique ne peut s'opérer que sur une seule branche de la cellule. Il nous est donc impossible de réaliser simultanément les diagrammes des frontières descendantes et ceux des frontières ascendantes.

présence de deux composants (A') et (B'). Le composant A' a une mobilité $\mu = 4.3 \times 10^{-5}$ cm/s/v/cm (champ électrique H = 2.52 v/cm; intensité I = 7,8 mA), il représente 75 p. 100 de la totalité du diagramme (1). Le composant B' est complexe et se sépare en B'2 immobile et B'1 de vitesse très faible. L'aspect étalé de ces fractions sur le diagramme d'électrophorèse laisse deviner un certain degré d'hétérogénéité.

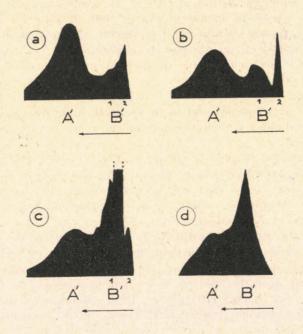


Fig. 2. — Diagrammes d'électrophorèse de la fraction albumines-globulines » à pH 7 (frontières descendantes).

a) Orge « Aurore ».

 b) Orge au cinquième jour de germination.
 c) Moût, après protéolyse à 60° C.
 d) Moût houblonné après le réfrigérant Baudelot (à pH 7, 8).

Elude chromatographique. - L'étude chromatographique des hydrolysats de la fraction « albumines-globulines», dans le système butanol/ acide acétique et phénol (NH3 3 p. 100) révèle la présence des aminoacides suivants : dérivés de la cystine, acide aspartique, acide glutamique,

⁽¹⁾ Lorsqu'on décompose le diagramme d'électrophorèse, on attribue au composant A', le sommet A' et la moitié du palier entre les sommets A' et B'.

sérine, glycocolle, thréonine, alanine, tyrosine, valine, phénylalanine, leucine, proline, histidine, lysine, arginine. Il faut noter la teneur relativement élevée en arginine et en dérivés de la cystine, caractéristique des globulines végétales (Bonner, 1950) [89].

b) Orge en germination. —

Un échantillon d'orge « Aurore » au cinquième jour de germination a été utilisé pour préparer une fraction « albumines-globulines » qui a été soumise à l'électrophorèse différentielle, à pH 7 (H = 2,4 v/cm ; I = 6 mA). Le diagramme d'électrophorèse (Fig. 2 b) montre la présence de deux composants A' et B', après trois-cent-quinze minutes de passage du courant. Le composant A' a une mobilité $\mu=4,3\times10^{-5}$ cm/s/v/cm, et ne représente plus que 66 p. 100 de la totalité des protéines, ce qui correspond à une diminution notable par rapport au composant A' de l'orge non germée. Le composant B' est encore complexe : B'2 est toujours immobile, tandis que le composant B'1, de vitesse faible, devient plus important. On a donc observé une légère évolution de la fraction « albumines-globulines » au maximum de la protéolyse pendant la germination.

En conclusion, nous pouvons affirmer que la fraction « albumines-globulines » de l'orge est électrophorétiquement hétérogène ; nos résultats sont en accord avec ceux de Quensel et Svedberg (1937) [90], et de Ayrapaa (voir p. 33). L'existence de composants B'₁ et B'₂ de vitesse électrophorétique faible ou nulle, laisse supposer la présence de dérivés polysaccharidiques ou glucoprotétiques.

Comme le remarquaient Quensel et Svedberg (loc. cit.) les variations des diagrammes d'électrophorèse observées au cours de la germination sont d'une interprétation très délicate. L'augmentation du composant peu rapide B'₁ permettrait de supposer un enrichissement en polysaccharides de l'extrait chloruré de l'orge en germination. Quant à la légère diminution de la vitesse du composant A', elle peut être expliquée au moins partiellement par l'effet retardateur du composant B'₁ devenu plus important.

c) Etude chromatographique de l'hydrolysat de β - globuline. —

La fraction β-globuline du malt (Quensel, 1942) [91] a été préparée au départ d'un malt « Aurore ». Nous avons utilisé la méthode de Quensel modifiée par Sandegren et coll. (1949) [92]. L'extrait chloruré est précipité par le sulfate d'ammonium à 15 p. 100 en saturation, neutralisé à pH 7; le précipité obtenu est purifié par plusieurs précipitations successives au sulfate d'ammonium à 15, puis 7,5 p. 100 en saturation. Il est enfin dialysé contre de l'eau distillée. Le précipité obtenu représente la β-globuline et on la soumet à une hydrolyse acide.

L'hydrolysat de β-globuline est soumis à la chromatographie bidi-

mensionnelle dans le système butanol/acide acétique et phénol (NH³ 3 p. 100).

Le tableau II indique les proportions relatives des différents acides aminés et la Fig. 3 le chromatogramme de l'hydrolysat de β-globuline.

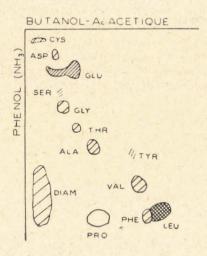


Fig. 3. — Chromatogramme semi-schématique de l'hydrolysat de β - globuline.

TABLEAU II

Proportions relatives des amino-acides de l'hydrolysat de β-globuline

AMINO-ACIDES	S			
Dérivés de la cystine			++	
Acide aspartique			3	
Acide glutamique			7	
Sérine		1	+	
Glycocolle			2	
Thréonine			2	
Alanine			5	
Tyrosine		12 2	2	
Valine		TO RE	5	
Leucines			10	
Phénylalanine			+	
Proline		1	++	The state of
Acides diaminés		 1	1	

La β-globuline est riche en leucine, acide glutamique et proline. Il est intéressant de constater la richesse relative en dérivés de cystine et de la rapprocher de la teneur élevée en soufre (1,94 p. 100, Sandegren, 1947) [93]. Nos résultats sont comparables à ceux de Trolle (voir Jensen, 1951) [94].

II. - Brassage.

Historique. — Les protéines vraies du moût ne sont pas dialysables et ont un poids moléculaire supérieur à 10.000 ou 15.000 (« true protein » de Візнор, 1944, 1951) [95]; elles représentent environ 1 р. 100 de l'azote total du moût non houblonné. Elles ont été l'objet de nombreux travaux en raison de leur importance dans la stabilité colloïdale de la bière.

Une fraction, dite « globuline », non coagulable par la chaleur, sensible au froid, est précipitée du moût au tiers de saturation en sulfate d'ammonium (sans correction de pH). Elle a été étudiée par Hartong (1937), Hopkins, Amphlett et Berridge (1941, 1949) et Johnston (1948) [96].

Une fraction, dite « albumine », coagulable par la chaleur, est précipitée du moût saturé en sulfate d'ammonium. Elle a été étudiée par Hartong, Hopkins et coll., Johnston (loc. cit.).

Quensel et Svedberg (1937) [97] ont préparé, à partir d'un moût, une fraction précipitée par saturation en sulfate d'ammonium et l'ont dialysée contre tampon chloruré à pH 7. Cetté fraction a été soumise à l'ultracentrifugation. Le diagramme de sédimentation est voisin de celui obtenu à partir de l'extrait chloruré d'orge ; il montre que la fraction est polydispersée et qu'elle a subi les effets de la protéolyse du brassage.

Les quatre constituants de l'édestine de l'orge, définis par Quensel, ont été recherchés dans le moût par ultracentrifugation. La β-globuline s'est révélée le seul constituant stable durant le brassage; après ébullition de deux heures, elle subit une dégradation (Saverborn et coll. 1944) [98] et les produits qui en résultent, d'un poids moléculaire de 30.000, contribuent à la formation du « trouble au froid » de la bière (Sandegren, 1947) [99]. Sandegren (1949) [100] considère, en effet, qu'il ne reste pratiquement plus de globulines vraies dans un moût après ébullition et filtration; pour cet auteur, sa fraction « albumine » non dialysable, hydrosoluble, n'est pas constituée par l'albumine du malt ou de l'orge, mais par des composés de poids moléculaires élevés (10 à 40.000) d'origines diverses. Il a étudié cette fraction par polarographie ou par ultracentrifugation (Sandegren, 1947; Sandegren et Saverborn, 1949) [101].

Il faut signaler enfin qu'il existe encore dans le moût des fractions de poids moléculaire plus faible qui constituent la majeure partie de l'azote (60 p. 100 environ). Elles ont été très peu étudiées jusqu'à présent (Bishop, 1949, 1951; Johnston, 1948) [102].

Résultats expérimentaux

Nous avons étudié les fractions protéiques non dialysables d'un moût, en utilisant la technique d'électrophorèse différentielle. Le moût a été prélevé après le stade de protéolyse à 60° C et n'a été ni houblonné, ni bouilli.

Afin de pouvoir comparer nos résultats à ceux des travaux antérieurs, nous avons eu recours aux techniques classiques de précipitation au sulfate d'ammonium décrites dans les études de Hartong (1937) [103] et de Johnston (1948) [104].

Nous avons précipité du moût la fraction « albumines-globulines » par saturation totale en sulfate d'ammonium puis débarrassé le précipité du sulfate d'ammonium par dialyse sous pression, contre une solution chlorurée sodique 0,2 M, tamponnée à pH 7 et fréquemment renouvelée. Après dialyse à pH 7, contre tampon phosphate, jusqu'à équilibre ionique, la solution est soumise à l'électrophorèse, en frontières descendantes (H = 2,16 v/cm, I = 7,6 mA). Le diagramme d'électrophorèse montre, après trois-cent-quinze minutes de passage du courant, deux fractions distinctes, de mobilité différente (Fig.~2~c). Le composant A', le plus rapide, a une vitesse $\mu = 4.~10^{-5}$ cm/s/v/cm; il représente 37 p. 100 de la totalité du mélange. Le composant B'₁ est très lent (0,6. 10^{-5} cm/s/v/cm) et parait complexe. Quant au composant B'₂, qui a une vitesse nulle, il représente certainement une fausse-frontière.

Le comportement électrophorétique de la fraction « albumines-globulines » du moût, non houblonné, est donc comparable au comportement de la fraction correspondante de l'orge (Fig. 2 c et Fig. 2 a). Le composant A' a diminué très nettement et c'est le composant B'₁ de vitesse très lente, qui est devenu le constituant principal après le brassage (Tableau III). La mobilité de A' a diminué également ; mais cette variation peut aussi s'expliquer par un effet retardateur dû à l'importance de B'₁ (voir p. 35).

En vue de préciser la nature de ces divers constituants, nous avons alors, à partir du moût précédemment étudié, séparé successivement les précipités suivants :

« Relargages » successifs du moût

Précipité obtenu par saturation au tiers . . . (Fig. 4 nº 2)
Puis, sur la phase liquide restante : précipité obtenu par saturation au demi (Fig. 4 nº 3)
Enfin, sur la phase liquide restante : précipité obtenu par saturation totale (Fig. 4 nº 4)

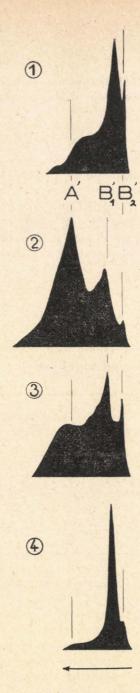


Fig.~4. — Diagrammes d'électrophorèse de la fraction albumines-globulines » de moût non houblonné, à pH 7,8 (frontières descendantes).

1 - Fractions précipitées par saturation tolale en sulfate d'ammonium.
 2 - Fractions précipitées par saturation au tiers en sulfate

d'ammonium.

3 - Fractions précipitées par saturation au demi relargage au tiers).

4 - Fractions précipitées par saturation totale (après relargage au demi).

Les précipités sont déharrassés du sulfate d'ammonium comme précédemment. Les solutions sont dialysées contre tampon phosphate, à pH 7,8 jusqu'à équilibre ionique.

Les électrophorèses ont été conduites avec une intensité moyenne de courant, de 4,2 mA, et enregistrées optiquement en frontières descendantes. Après trois cents minutes de passage du courant, les diagrammes obtenus (Fig. 4) montrent la présence des composants A', B'1, B'2. Sur la Fig. 4 les traits fins verticaux matérialisent les points d'égale vitesse de migration électrophorétique. Le Tableau III indique les proportions relatives des fractions A' et B' (= B'1 + B'2) dans ces divers « relargages », ainsi que celles, à titre de comparaison, des fractions A' et B' du précipité obtenu après saturation totale au sulfate d'ammonium (Fig. 4, $n^{\rm o}$ I).

TABLEAU III
Électrophorèse de fractions azote-sel-soluble de moût
non houblonné

MOÛT après le stade à 60° C	Fraction A' en p. 100	Fraction B' en p. 100 (= B' 1 + B' 2)
1. Saturation totale en sulfate d'ammonium	33	67
 Saturé au tiers	68 40,2 10,5	32 59,8 89,5

Le composant B'₁, de vitesse très lente, devient le composant principal après le brassage.

Sur la Fig. 4, nº 2, la fraction A' est de beaucoup la plus importante. Par ses caractères de précipitation, elle doit donc s'apparenter aux globulines; elle comprend probablement la β-globuline de Quensel complètement précipitée à 15 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium et retrouvée intacte par ultracentrifugation dans le moût non houblonné (Saverborn et coll., 1944) [105].

Sur la Fig.~4, $n^o~3$, cette fraction A' diminue nettement et sur la Fig.~4, $n^o~4$, elle devient insignifiante (Tableau III). Nous sommes donc bien en présence d'une fraction protéique complexe, à caractère de globuline.

Au contraire, la fraction B'₁ s'individualise et s'enrichit progressivement au cours des « relargages » successifs ; son constituant principal

a les caractères de précipitation d'une albumine souillée en (2) et (3) par des constituants apparentés aux globulines. Il est possible que la fraction B', par sa vitesse électrophorétique faible, s'apparente à la fraction D de Johnston (1948) [106]. En effet, cette fraction D est précipitée à saturation en sulfate d'ammonium; elle n'est pas dialysable et serait associée à des polysaccharides. Enfin, les produits de dégradation des protéines du malt non dialysables et précipitables par le sulfate d'ammonium, qui ont été trouvés dans le moût et la bière par Sandegren (1947-1949) [107], doivent, eux aussi, participer à la constitution des fractions A' et B'. Nous n'avons pu encore les localiser avec précision dans l'un ou l'autre de ces constituants.

La signification de la fraction B'₂, dont la vitesse de migration est nulle, reste délicate. Il peut s'agir d'une fausse-frontière, mais notons toutefois qu'elle disparait après ébullition en chaudière (Fig. 2, d).

Enfin, après cet essai d'interprétation, nous avons suivi l'évolution de la fraction « albumines-globulines » du moût sur un prélèvement à la sortie du réfrigérant Baudelot (Fig. 2, d). Après houblonnage et ébullition en chaudière, refroidissement au « bac » et au réfrigérant, la fraction B' paraît plus homogène et diminue légèrement de 67 à 62 p. 100. Cela semble correspondre à la formation de la « cassure » et du dépôt du gros trouble au bac refroidissoir, riche en matières protéiques coagulées.

En conclusion, la fraction « albumines-globulines » du moût se révèle électrophorétiquement hétérogène et son comportement s'apparente à celui de la fraction correspondante de l'orge. Le composant A' conserve sensiblement la même vitesse électrophorétique. Seule la répartition relative des deux composants A' et B' se modifie de façon nette et continue au maltage et surtout au brassage; la protéolyse, entre 50 et 60° C, pourrait en être la cause.

Il est difficile, pour le moment, de préciser la nature exacte des fractions dont nous venons d'exposer l'évolution. Seule, l'électrophorèse séparative permettrait de les isoler et de préciser leur identité. L'étude de la fraction protéique non dialysable du moût est très délicate par suite de la présence certaine de polysaccharides. Ces polysaccharides — on les a appelés arbitrairement « maltodextrines » dans la littérature — sont plus abondants dans le moût que dans l'orge. Les températures de brassage sont très favorables au dédoublement des grosses molécules glucidiques qui représentent, en dehors de l'amidon, 15 p. 100 du poids du malt. Les constituants glucidiques, ou des composés glucoprotéiques, doivent se trouver dans la fraction B'; enfin, des composés de poids moléculaire de 10.000 à 40.000 — et ils doivent être abondants — sont également présents, mais n'ont fait l'objet d'aucune étude systématique.

Désormais, une étude sur le moût devrait abandonner les termes

d'albumine ou de globuline, qui n'ont un sens bien précis que, seulement, dans le cas de l'orge et du malt. Nous proposons de distinguer dans le moût deux fractions:

- A. Fraction azotée non dialysable (« water soluble non dialysable nitrogen compounds » de Sandegren (1949) = fraction « albumine » de Sandegren.) [108].
- B. Fraction azotée dialysable (polypeptides, acides aminés).

B. — FRACTION « GLUTELINE »

Nous avons étudié par chromatographie de partage sur papier, les hydrolysats des diverses fractions protéiques, préparées suivant les méthodes d'extraction de l'azote « glutéline » décrites précédemment.

Les extractions ont été réalisées à partir de farine d'orge « Aurore ». Les chromatographies en deux dimensions ont été faites dans le

Les chromatographies en deux dimensions ont été faites dans le système butanol/acide acétique et phénol (NH₃ 3 p. 100).

1º Extraction selon la méthode de CSONKA (1927) -BISHOP (1928) [109].

Après avoir éliminé l'azote-sel-soluble et l'azote-alcool-soluble suivant la technique de Bishop (bilan azoté, p. 16), nous avons extrait l'azote « glutéline » et isolé deux fractions : la première contient 10,08 p. 100 d'azote total et la seconde 9,13 p. 100. Après hydrolyse totale, la chromatographie en deux dimensions permet d'établir les proportions relatives des amino-acides constituants.

Tableau IV

Proportions relatives des amino-acides d'hydrolysats de fractions « glutéline »

AMINO-ACIDES F	raction 1	Fraction 2
Acide aspartique	1	1
Acide glutamique	10	8
Sérine	5	4
Glycocolle	5	5
Thréonine	1	1
Alanine	3	3
Tyrosine	1.0	1/2
Valine	4	3
Leucine	8	8
Phénylalanine	5	5
Proline	+	+
Histidine	2	2
Lysine	2	2
Arginine	2	1/2

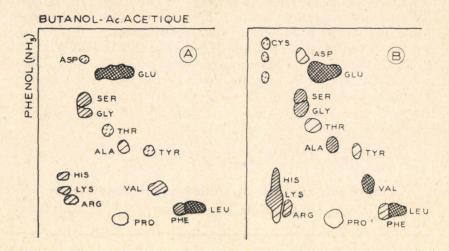


Fig. 5. — Chromatogrammes semi-schématiques d'hydrolysats.

A — De glutéline.

B - d'α - glutéline.

La Fig. 5, A représente le chromatogramme semi-schématique de l'hydrolysat de la fraction I.

On remarque que les fractions I et II, extraites successivement, ont la même composition en acides aminés. Tous les amino-acides sont représentés, mais il y a lieu de noter l'abondance en acide glutamique et leucine (Scriban, 1949) [110]; cette richesse est également retrouvée dans la gluténine du blé (Bonner, 1950) [111] et la glutéline du maïs (Thomas, 1946) [112]. Par contre, dans les fractions « glutéline » d'orge, il y a relativement moins de tyrosine que dans le blé. Les dérivés de la cystine n'ont pas été clairement mis en évidence. Le tryptophane, sans doute présent comme dans les autres glutélines, n'a pu être révélé dans les chromatogrammes, car il est détruit par l'hydrolyse acide.

2º Extraction directe selon la méthode CSONKA et JONES (1929) [113].

Nous avons examiné l' α - et la β -glutéline préparées directement à partir de la farine d'orge « Aurore » (voir p. 24).

L' α -glutéline contient 11,8 p. 100 d'azote total et la β -glutéline 15,1 p. 100 d'azote total. La composition en acides aminés des hydrolysats de ces fractions est donnée dans le Tableau V, colonnes A et B.

La Fig. 5, B représente le chromatogramme de l'hydrolysat d' α -glutéline.

A titre de comparaison, nous avons en outre isolé, par la même méthode, une α-glutéline à partir de la même farine préalablement débarrassée de l'azote-sel-soluble et de l'azote-alcool-soluble. La composition de l'hydrolysat est donnée dans le Tableau V, colonne C.

Nous retrouvons les mêmes acides aminés, mais les dérivés de la cystine sont nettement présents. Nous remarquons que l' α - et la β -glutéline (colonnes A et B) sont pratiquement identiques et que leur distinction, fondée sur des caractères différents de précipitation, semble bien arbitraire.

Tableau V Proportions relatives des amino-acides d'hydrolysats d' α et de β -glutéline

AMINO-ACIDES	Α α -glutéline	B β -glutéline	C α -glutéline
Dérivés de cystine. Acide aspartique Acide glutamique Sérine Glycocolle Thréonine Valine Tyrosine Alanine. Phénylalanine Leucine Proline	+ 4 15 8 8 8 4 8 3 10 3 12	+ 4 15 8 8 6 7 2 10 3	+ 5 25 8 8 2 8 1 8 3 -12
Histidine	8	8 6 6	3 4 4

D'autre part, comparées aux fractions isolées précédemment (Tableau IV, Fig. 5), elles sont également riches en acide glutamique et leucine. La teneur en acides diaminés est légèrement plus forte ; elle s'accorde avec les analyses de Csonka et Jones (1929) [114], bien que la plus forte proportion d'arginine ne soit pas confirmée.

Enfin, la comparaison entre les α-glutélines (colonnes A et C), extraites directement ou non, laisse apparaître une grande analogie dans les résultats; on note simplement une plus grande richesse en acide glutamique. Le mode d'extraction n'a donc pas d'influence prépondérante sur l'individualité de la fraction préparée. Nous pensons que les différentes fractions protéiques isolées de l'azote « glutéline » de l'orge sont très voisines les unes des autres. Elles sont toutes carac-

térisées par leur solubilité dans les acides ou bases diluées, par leur richesse en acide glutamique et leucine, et sont donc bien apparentées à la gluténine du blé et aux glutélines du riz et du maïs.

Comme nous l'avons montré dans le bilan azoté, la totalité de l'azote « alcali-soluble » extrait n'est pas retrouvée à la fin des précipitations. L'azote non précipité représente sans doute une autre fraction protéique assimilable à une glutéline et peut-être à une faible quantité d'hordéine alcool-soluble.

L'examen de l'hydrolysat d'une fraction « glutéline » isolée du malt, n'indique, en fin de germination, aucune modification notable dans la composition en acides aminés.

En résumé, nous croyons que la fraction azote « glutéline » de Bishop (1928) [115], est plus complexe qu'on ne le pense généralement. Son étude est rendue difficile en raison des caractères très particuliers de solubilité qui peuvent entraîner, dans leur application au cours des extractions, des modifications de structure qui ne seraient pas négligeables; une communication orale du Dr Bishop nous l'a confirmé pleinement.

Un travail systématique, qui ne laisse pas d'être ingrat et difficile serait indispensable; il pourrait s'inspirer de travaux similaires réalisés sur le blé ou le maïs. Ainsi Colvin et Mac Calla (1949) [116], ont extrait le gluten du blé par des solutions de salicylate de sodium 0,1 ou 0,5 M; les solutions de gluten, soumises à l'électrophorèse, se sont révélées homogènes. D'autres agents d'extraction ont été essayés: par exemple, l'acide formique 0,01 M, pour le « gluten » de riz et d'orge (Cunningham et Anderson, 1950) [117]; enfin des solutions d'agents détergents (dodécylbenzène-sodium-sulfonate, alkyl-benzène-sodium-sulfonate) ont été employées avec succès pour le gluten de blé (Foster, 1949) [118] ou les protéines du maïs (Foster, Yang et Yui, 1950) [119].

C. - FRACTION « AZOTE-RÉSIDUEL »

Les extractions successives à froid par la potasse ou l'acide chlorhy-drique n'extraient pas complètement l'azote de la farine d'orge. Dans le culot final d'extraction, nous avons trouvé à l'analyse jusqu'à 0,84 p. 100 d'azote total, ce qui représente 36 p. 100 de l'azote total de la farine étudiée. Nous avons appelé azote « résiduel », l'azote non extractible par les solvants habituels.

L'hydrolysat d'un échantillon moyen de ce culot résiduel a été examiné en chromatographie bi-dimensionnelle (Tableau VI).

TABLEAU VI

Proportions relatives des amino-acides de l'hydrolysat d'azote « résiduel »

AMINO-AC	H)E	s		N The state of the
Acide aspartique. Acide glutamique Sérine Glycocolle Thréonine Alanine Tyrosine Valine Phénylalanine Leucine Acides aminés Proline					5 7 1/2 1 1/2 5 1 6 2 7 2 ?

On observe la plupart des acides aminés avec prépondérance d'acide glutamique, de valine et de leucine.

Cette investigation sommaire nous renseigne peu sur cette fraction protéique. Elle représente sans doute des protéines dénaturées, mais également des protéides de structure mal connue (« native protein », « retained protein », Lugg, 1949) [120], du cytoplasme cellulaire.

D. - FRACTION « HORDEINE »

Historique. — OSBORNE (1895), OSBORNE et CAMPBELL (1896) [121], ont défini l'hordéine et la bynin, prolamines de l'orge et du malt. Pour ces auteurs, la bynin qui contient 1 p. 100 de moins d'azote et 1 p. 100 en plus de carbone que l'hordéine, représente un protéide nouveau remplaçant l'hordéine au cours de la germination.

En collaboration avec Gilbert (1906), puis Clapp (1907), Osborne [122], a étudié la composition en amino-acides de l'hydrolysat d'hordéine préparée selon la méthode décrite précédemment (p. 23). Cet hydrolysat contient douze acides aminés et en particulier 36,35 p. 100 d'acide glutamique, 13,73 p. 100 de proline, 5,67 p. 100 de leucine et 5,03 p. 100 de phénylalanine. Osborne et ses collaborateurs n'ont pu mettre en évidence le glycocolle et la lysine.

L'hordéine a continué d'être l'objet de nombreuses recherches en raison du rôle important qu'elle joue au cours de la germination.

Successivement Kraft (1910), Luers (1919, 1922) [123] et à leur suite Bishop (1928) [124], ont combattu l'opinion d'Osborne et Campbell, après étude de la composition chimique de l'hydrolysat d'hordéine et de bynin (azote ammoniacal, azote aminé, azote des acides diaminés). Ils ont admis une similitude (Kraft), puis une identité de ces deux corps; pour eux, l'hordéine du malt est le vestige de l'hordéine de l'orge, non attaqué par la protéolyse durant la germination. Il faut cependant noter des variations sensibles dans les résultats d'analyse de l'azote total, de l'azote ammoniacal, de l'acide glutamique par exemple, d'un auteur à l'autre.

Takahashi et Shirahama (1927, 1931) [125] ont étudié particulièrement la fraction hordèine de l'orge au cours du stockage et de la germination. En particulier, au maltage, la composition chimique des hydrolysats varie lentement; l'azote aminé et amidé croît tandis que l'azote diaminé décroît. Pour ces auteurs, la « bynin » est une hordèine « dénaturée », apparaissant progressivement au cours de la germination; elle est le résultat d'une évolution continue.

Des recherches ont été entreprises récemment sur l'hordéine de l'orge. Quensel et Svedberg (1937) [126] ont montré que l'hordéine est monodispersée à l'ultracentrifugation; son poids moléculaire est de 27,500.

Par contre, Wallis (1950, 1951) [127] n'a pu isoler, partant de solutions d'hordéine dans le dioxane aqueux, de fraction pure à caractères bien définis; il a mis en évidence l'hétérogénéité de l'hordéine (au moins quatre constituants) par l'étude des caractères de solubilité et a confirmé nos résultats (BISERTE et SCRIBAN, 1950, a, b) [128].

Au brassage, le trouble fin (Kühltrub) a été l'objet d'interprétations très diverses. Luers et coll. (1924, 1949, a) [129] l'apparentent aux produits résultant de la dégradation de l'hordéine; Hartong (1937) [130] l'assimile par contre à sa « globulose », produit de dédoublement de la globuline associée au tannin; Van Laer (1942) [131] y voit un complexe de l'hordéine avec le tannin du houblon. Enfin, Johnston (1948, 1950) [132] décèle dans la fraction protéique du trouble fin, 50 p. 100 de protéine O et 50 p. 100 de protéine T et C. Dans une étude préliminaire (Scriban, 1950) [133] nous avons montré que la fraction alcool-soluble du trouble fin était constituée partiellement d'une substance protéique analogue, sinon identique, à l'hordéine.

Résultats expérimentaux

I. - Orge et malt.

Des fractions d'hordéine d'orge « Aurore » ont été préparées à partir de l'orge non germée, de l'orge aux cinquième et huitième jours de germination, et enfin, après touraillage, avec le malt dégermé.

Étude chromatographique

Les hydrolysats de ces fractions ont été soumis à la chromatographie bi-dimensionnelle dans le système butanol/acide acétique et phénol (NH₃ 3 p. 100).

Le Tableau VII donne la composition en amino-acides des hydrolysats d'hordéine correspondant aux échantillons définis antérieurement.

Tableau VII

Proportions relatives des amino-acides des hydrolysats d'hordéine

AMINO-ACIDES	Orge Aurore	Orge Huitième jour	Malt Aurore
Dérivés de cystine	3 5	1 2	1,
Acide glutamique	30	30	30
Sérine	6	4	6
Thréonine	6	5	3 7
Valine	7	7	8
Phénylalanine	2 10	3 10	4 10
Proline	abondante	abondante 2	abondante 4
Lysine	4.	4	3
Anguino		4	

La Fig 6 représente le chromatogramme semi-schématique d'un hydrolysat d'hordéine d'orge.

Le tryptophane détruit à l'hydrolyse acide n'a pu être mis en évidence.

La chromatographie uni-dimensionnelle dans l'alcool benzylique nous a permis de séparer la méthionine (RF = 0,17) et la valine (RF = 0,11) confondues dans le système de solvants précédents ; de mème, nous avons séparé l'isoleucine (RF = 0,18) de la leucine (RF = 0,21).

Les analyses chromatographiques complètent celles que nous avions provisoirement présentées (Biserte et Scriban, 1949) [134]; elles se différencient nettement des résultats préliminaires obtenus en chromatographie uni-dimensionnelle par Kent et Macheboeuf (1949) [135].

Si nous comparons nos résultats à ceux d'Osborne et Clapp (1907) [136], nous confirmons l'absence d'hydroxyproline et la richesse en acide glutamique, proline et leucine — caractéristique des prolamines

(Osborne, 1924) [137] — par contre, nous mettons en évidence la présence de glycocolle, de thréonine, de méthionine, d'acide aspartique, de sérine et de lysine.

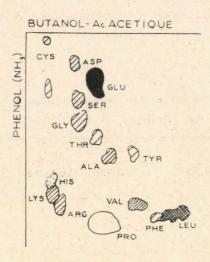


Fig. 6. — Chromatogramme semi-schématique d'hordéine d'orge.

Les résultats du Tableau VII laissent entrevoir la stabilité relative de la composition en amino-acides de l'hordéine au cours du maltage, bien que cette fraction soit l'objet d'une protéolyse intense. Il est possible que ce fait soit expliqué par une structure moléculaire semblable à celle de la zéine (Laine, 1944) [138], c'est-à-dire l'existence de deux chaînes identiques, parallèles, liées par des groupes — S-S — se clivant par groupes équivalents sous l'action des enzymes.

Il était intéressant de comparer le comportement de l'hordéine de l'orge à celui de la gliadine de blé et de la zéine du maïs, pendant la germination. Des échantillons de blé et de maïs ont donc été germés pendant huit jours et nous en avons extrait alors la gliadine et la zéine.

Nous avons préparé ces prolamines par la méthode d'Osborne et Clapp à partir d'échantillons bruts et germés (extraction par l'alcool à 70c, précipitation dans l'eau distillée, reprise dans l'alcool à 70c pour la gliadine et à 92c pour la zéine (Osborne, 1924) [139].

Echantillons étudiés :

Gliadine. — Blé non germé : 16,5 p. 100 d'azote total. — Blé huitième jour : 14,09 p. 100 — Zéine: — Maïs non germé: 12,8 p. 100 d'azote total. — Maïs huitième jour: 12,2 p. 100 —

Les hydrolysats de chaque échantillon ont été examinés en chromatographie bi-dimensionnelle.

Le Tableau VIII représente la composition en amino-acides des différents hydrolysats.

Tableau VIII

Proportions relatives des amino-acides d'hydrolysats
de gliadines et de zéines

AMINO-ACIDES	Gliadine	Gliadine huitième jour	Zéine	Zéine huitième jour
Dérivés de cystine	2	1		
Acide aspartique	4	6	8	8
Acide glutamique	20	20	20	20
Sérine	8	10	10	15
Glycocolle	8	10	8	. 8
Thréonine	4	3	6	5
Alanine	7	6	10	10
Tyrosine	2	3	4	5
Valine	8	8	8	10
Phénylalanine		3	4	5
Leucine	12	15	20	18
Proline	abond.	abond.	abond.	abond.
Histidine	4	5	3	4
Lysine	2	2	2	1
Arginine	2	5	3	4

Dans la zéine du maïs non germé, il y a plus d'acide aspartique, d'alanine et de tyrosine que dans la gliadine du blé; par contre, en comparant ces prolamines avec l'hordéine (Tableau VII), on remarque qu'elles sont plus pauvres en acide glutamique. Ces observations sont conformes aux analyses données par Thomas (1946) et Bonner (1950) [140].

Enfin, la germination n'apporte vraiment aucune modification notable dans la composition en amino-acides de ces trois prolamines : hordéine, gliadine et zéine. Comme nous le disions précédemment, leurs structures moléculaires doivent être assez régulières et voisines l'une de l'autre (Laine, loc. cit.).

La richesse de l'hordéine en acide glutamique nous a incité à suivre l'évolution du taux de cet amino-acide au cours de la germination.

La collaboration de R. Osteux nous a permis de doser l'acide L (+)

glutamique par la méthode de Gale (1945) [141], dont voici le principe : on mesure à l'appareil de Warburg la quantité de CO₂ dégagé par la glutamo-décarboxylase de *Clostridium Welchii SR 12*, type A agissant sur l'acide glutamique, à pH 4,5 et à 37,5° C. 100 mg d'hordéine sont hydrolysés en présence de 3 ml d'acide chlorhydrique pur pendant sept heures, à 135° C; le filtrat est repris dans 20 ml et on effectue le dosage avec le dispositif de Warburg sur 1 ml; on dose également l'azote total de l'hydrolysat (OSTEUX, 1951) [142].

Le Tableau IX présente les résultats obtenus sur les échantillons d'orge « Aurore » soumis au maltage ; nous avons calculé le rapport

N de l'acide glutamique

N. total de l'hordéine

Nous avons mentionne à la fin du Tableau, à titre de comparaison, les résultats anciens d'Osborne et Clapp (1907) [143] et ceux de Kraft (1910) [144] sur l'hordéine de l'orge ou du malt.

TABLEAU IX

Composition en acide glutamique d'hydrolysats d'hordéine

ECHANTILLONS	NT en p. 100	NT hydro- lysat	Acide gluta- mique en p. 100	N Acide gluta- mique en p. 100	N ac. glut. NT hordéine
Orge « Aurore »	17,07	12,4	28,76	2,74	0,160
Orge cinquième jour	14,4	11,53	25,28	2,41	0,167
Orge huitième jour	15,6	12,43	28,48	2,71	0,174
Malt « Aurore »	16,8	13	34,12	3,24	0,193
Osborne et Clapp (1907) Orge.	17,21		36,35	3,46	0,201
Orge .	16,7		32,9	3,13	0,187
Kraft (1910) Malt	14,2	A. S. 20	28,04	2,67	0,188

L'examen des résultats d'analyses est très intéressant. Malgré les variations appréciables des taux d'azote total et d'acide glutamique, N ac. glutamique

le rapport ______ reste du même ordre de grandeur ;

NT de l'hordéine

mais dans notre série continue d'échantillons, ce rapport croît légèrement

durant le maltage. Pour Takahashi et Shirahama (1931) [145], le taux d'amino-acides dicarboxyliques de l'hordéine croît au détriment des acides diaminés au cours du métabolisme de la germination. Cette interprétation semble au moins justifiée pour les variations positives de l'acide glutamique que nous avons décrites. Ces variations trop faibles ne peuvent évidemment être observées sur les chromatogrammes.

Étude électrophorétique

Cette étude s'est révélée difficile en raison des caractères très particuliers de solubilité des prolamines. Nous nous sommes inspirés de travaux modernes sur la gliadine du blé (Schwert et coll., 1944; Laws et France, 1948) [146] et sur la zéine (Scallet, 1947) [147].

Le tampon acide acétique — acétate de sodium, de pH 3,5 et de force ionique 0,01 (Schwert, loc. cit.) ne nous a pas donné satisfaction. D'autre part, des mélanges acide acétique/éthanol à différentes concentrations et à pH 3,5 ont conduit à des diagrammes anormaux et non interprétables, par suite probablement des variations de température de la solution pendant le passage du courant.

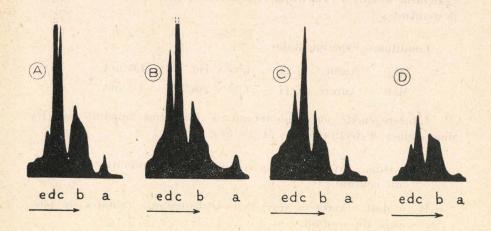
Nous avons finalement obtenu les meilleurs résultats avec l'acide acétique M/1 ou 2/3 M à pH 2,4 ou 2,5. On dissout 300 mg d'hordéine dans 5 ml d'acide acétique et on dialyse quarante-huit heures contre de l'acide de même molarité jusqu'à équilibre ionique (BISERTE et SCRIBAN, 1950, a) [148].

Les électrophorèses ont été conduites en frontières ascendantes et descendantes à pH 2,5.

Frontières ascendantes. -

Les enregistrements photographiques ont été faits après quarantecinq minutes de passage du courant. Voici les intensités du courant relatives à chaque échantillon : orge : 2,8 mA — orge cinquième jour : 2,2 mA — orge huitième jour : 2,9 mA — malt : 2,2 mA.

Sur les diagrammes d'électrophorèse (Fig. 7) on distingue au moins cinq groupes distincts de composants a, b, c, d, e. Le Tableau X présente les proportions relatives des principaux composants.



 $Fig. \ 7. \ - \ {\rm Diagrammes} \quad {\rm d'\'electrophor\`ese} \quad {\rm d'hord\'eines} \\ (\textit{fronli\`eres} \quad \textit{ascendantes}).$

Orge « Aurore ». Orge au cinquième jour de germination. Orge au huitième jour de germination. Malt « Aurore ».

TABLEAU X

Électrophorèse de fractions « hordéine » au maltage (Frontières ascendantes)

ECHANTILLONS	b p. 100	p. 100	c + d p. 100	c + d
Orge « Aurore » (Fig. 7 A)	30,6	26	57,8	45
Orge cinquième jour (Fig. 7 B) .	29,8	32,8	56	59,5
Orge huitième jour (Fig. 7 C)	23,8	39	59,5	65,5
Malt « Aurore » (Fig. 7 D)	42,8	29	43,5	67

Les composants b et e sont eux-mêmes hétérogènes.

Frontières descendantes. —

Des échantillons d'hordéine d'orge et de malt « Aurore » ont été

également soumis à l'électrophorèse différentielle, à pH 2,5 en frontières descendantes.

Conditions expérimentales :

— Orge « Aurore » : H = 4,55 v/cm I = 4,6 mA.

— Malt « Aurore » : H = 4.32 v/cm I = 4.2 mA.

L'hétérogénéité électrophorétique de l'hordéine apparaît sur les diagrammes d'électrophorèse de la Fig. 8.

A = Orge « Aurore » après cent-quatre-vingt minutes de passage du courant ;

B = Malt « Aurore » après deux-cent-quarante minutes de passage du courant.

On distingue au moins cinq groupes de composants t, u, v, x, y. Les composants t, u, y, sont hétérogènes.

Le Tableau XI présente les vitesses électrophorétiques des différents composants et leurs proportions relatives.

Les diagrammes en frontières ascendantes (Fig. 7) et en frontières descendantes (Fig. 8) présentent une grande analogie, mais en raison des conditions expérimentales différentes, nous n'établirons aucune correspondance entre les divers composants électrophorétiques.

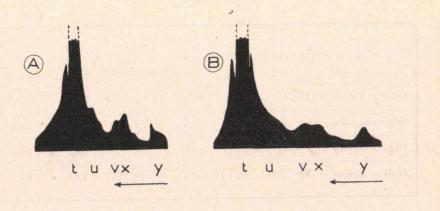


Fig. 8. — Diagrammes (frontières descendantes).

d'électrophorèse d'hordéines

A - Orge « Aurore ».

B - Malt . Aurore .

Tableau XI Électrophorèse de fractions « hordéine » au maltage (Frontières descendantes)

in the state of the	ECHANTILLONS	t	u	v	x	у
Orge	Mobilité 10-3 cm/s/v/cm.	7,37	5,85	4,06	3,3	0,8 ?
Fig. 8 A	p. 100.	t +		v +	x = ,3	8,5
Malt	Mobilité. 10-5 cm/s/v/cm.	7,2	6	4	3,2	0,58
Fig. 8 B	p. 100.	t +		v +		8,3

L'examen du Tableau XI montre que la protéolyse du maltage n'a pas d'influence sur la mobilité électrophorétique des différents composants.

En frontières ascendantes, les variations sont les plus sensibles pour les constituants principaux c et d; ici, en frontières descendantes dans des conditions expérimentales différentes, il ne nous est pas possible de mettre en évidence des variations analogues dans la fraction complexe t.

Discussion des résultats.

Dans cette série d'expériences, il apparaît tout d'abord un fait nouveau : l'hétérogénéité électrophorétique de l'hordéine. Cette constatation (BISERTE et SCRIBAN, 1950) [149], vient compléter celles de SCHWERT et de SCALLET sur la gliadine et la zéine ; les trois prolamines du blé, du maïs et de l'orge sont toutes trois électrophorétiquement hétérogènes.

Un comportement particulier de l'hordéine se manifeste cependant; elle est la seule prolamine monodispersée à l'ultracentrifugation (QUENSEL et SVEDBERG, 1937) [150] alors que la gliadine (KREJCI et SVEDBERG, 1935) [151] et la zéine (WATSON et coll., 1936) [152] sont polydispersées. Il est possible que les constituants de l'hordéine aient tous un poids moléculaire très voisin de 27.500 et ne puissent être distingués à l'ultracentrifugation.

Nous observons d'autre part au maltage une évolution continue des cinq constituants électrophorétiques a, b, c, d, e, en frontières ascendantes; cette évolution est très nette pour les constituants c et d (Tableau X) qui sont modifiés sensiblement au cours de la germination. Le touraillage, en particulier la protéolyse vers 40° C au « premier plateau » de la touraille, semble atteindre profondément le comportement électrophorétique de l'hordéine. Cette évolution lente et continue est en faveur de la thèse de Takahashi (1931) [153]. Il faut noter que la mobilité des divers composants électrophorétiques ne se modifie pas au cours du maltage.

Il est enfin intéressant de regrouper différentes observations. On sait que les prolamines, substances protéiques de réserve des grains de céréales, sont pour la plus grande part localisées dans l'assise protéique du grain, riche en cellules à aleurone. Ces substances azotées contribuent, avec les globulines, à la formation de la matière protéiqué fondamentale des grains d'aleurone (Guilliermond et Mangenot, 1941) [154]. Des recherches cytochimiques récentes de Engel et Heins (1947) [155], ont montré que la protéinase et les dipeptidases de l'orge sont localisées principalement dans la couche à aleurone et un peu dans le subaleurone; l'endosperme ne contient qu'une infime quantité d'enzymes protéolytiques.

On comprend ainsi la dégradation enzymatique intense et rapide que subit l'hordéine dans cette assise du grain et les modifications profondes au maltage, mises en relief par l'électrophorèse différentielle.

L'analyse chromatographique sera un précieux instrument d'investigation dans l'étude des amino-acides libérés de l'hordéine, par la protéolyse de la germination.

II. — Troubles au brassage.

Nous avons abordé l'étude du « gros trouble » et du « trouble fin » en dirigeant particulièrement nos recherches sur la fraction azote-alcoolsoluble et la fraction azote-résiduel.

« Gros Trouble »

Le gros trouble (Heisstrub) ou « trouble grossier » est assimilé habituellement à un complexe albumine-tannin (Van Laer, 1942) [156]. Luers et Wiedemann (1924) [157] l'ont étudié comparativement au trouble fin. Le gros trouble étudié contenait 10,13 p. 100 m.s. d'azote total et ils ont dosé les différentes formes d'azote à l'appareil de Van Slyke; ils concluent que le gros trouble se distingue nettement du trouble fin, mais qu'il est impossible de l'apparenter à une protéine définie du malt. Johnston (1948) [158] a trouvé 9 p. 100 d'azote total et 13 p. 100 de résine de houblon dans le gros trouble. Dans la fraction protéique, il a retrouvé sa protéine O ou « oxyprotéine » provenant de

la protéine C, à caractères d'albumine, oxydée au cours du refroidissement du moût.

Nous avons prélevé les échantillons de gros trouble au bac refroidissoir, juste à la fin de la réfrigération du moût. L'échantillon étudié contient 6,15 p. 100 d'azote total. Il est débarrassé de l'azote-sel-soluble par trois extractions successives au chlorure de sodium M/1, tamponné à pH 7. Le résidu est alors soumis à trois extractions à froid par l'alcool éthylique à 70° . L'extrait concentré sous pression réduite à 50° C est précipité dans l'eau distillée glacée. Après décantation, le précipité est centrifugé, dissous dans un peu d'alcool à 70° et précipité de nouveau dans l'alcool absolu glacé. Après centrifugation, il est lavé à l'alcool absolu, puis à l'éther, et desséché au dessicateur (méthode d'Osborne et Clapp, 1907) [159]. On obtient une fraction alcool-soluble pauvre en azote (3,08 p. 100 m.s. d'azote total).

Le résidu solide des extractions alcooliques, desséché sous vide, contient 10,2 p. 100 m.s. d'azote total. Il représente la fraction la plus riche en azote que nous avons dénommée « azote-résiduel ».

Le gros trouble brut, la fraction alcool-soluble et la fraction résiduelle ont subi l'hydrolyse totale par l'acide chlorhydrique. Les hydrolysats ont été soumis à la chromatographie bi-dimensionnelle dans le système butanol-acide acétique et phénol (NH₃). Le Tableau XII donne la liste des acides aminés trouvés dans les trois fractions avec leurs proportions relatives (Fig. 9, B, C).

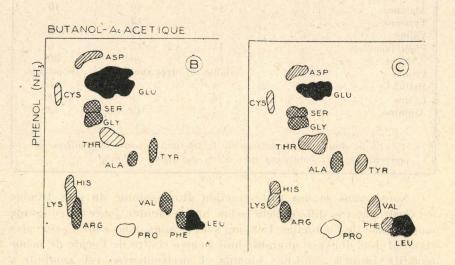


Fig. 9. — Chromatogrammes semi-schématiques d'hydrolysats de « gros trouble ».

B - Fraction alcool-soluble.

C - Fraction résiduelle.

L'examen des chromatogrammes montre la richesse relative de la fraction alcool-soluble du gros trouble en acide glutamique, proline, leucine et tyrosine, et son analogie avec les chromatogrammes d'hordéine pure. Cette fraction contient 1,16 p. 100 en poids sec d'acide glutamique; en raison de la pauvreté de cette fraction en azote total, il est difficile d'interpréter convenablement ce résultat.

TABLEAU XII

Proportions relatives des amino-acides d'hydrolysats de « gros trouble »

Dérivés de cystine	4	STATE AND PARTY.	
Acide aspartique	4		The state of the state of
Acide aspartique		4	5
Acide glutamique	8	7	7
Sérine	20	40	20
Glycocolle	10	10	10
diyooone	10	10	10
Thréonine	8	4	8
Alanine	10	10	10
Tyrosine	6	12	7
Valine	6	12	8
Phénylalanine	15	15	6
Leucine	18	20	20
Proline	abondante	très abondante	abondante
Histidine	4	6	6
Lysine	6	8	8
Arginine			

⁽¹⁾ Etant donné les variations de la teneur en azote, les chiffres ne peuvent être ici comparés que dans une même colonne.

Nous avons soumis cette fraction alcool-soluble du gros trouble à l'électrophorèse différentielle selon une technique jugée satisfaisante dans l'étude de l'hordéine. 1500 mg sont dissous dans 5 ml d'acide acétique M/1 et dialysés quarante-huit heures contre de l'acide de même molarité jusqu'à équilibre ionique. L'électrophorèse est conduite à pH 2,5 sous un potentiel de 400 V et une intensité moyenne de courant de 2,9 mA; l'enregistrement photographique a lieu en frontières descendantes. Le diagramme d'électrophorèse après quatre-vingt-dix minutes de passage du courant (Fig. 10) montre l'hétérogénéité électrophorétique de la fraction alcool-soluble du « gros trouble »; elle présente un cons-

tituant à vitesse de migration plus lente. Il est délicat d'interpréter ce diagramme d'électrophorèse en raison de la pauvreté en azote de cette fraction du « gros trouble » et de la présence probable de constituants non protéiques de poids moléculaire élevé, apparentés aux tannins; en effet, un chromatogramme en une dimension dans le système butanol/acide acétique a montré la présence d'acide gallique.

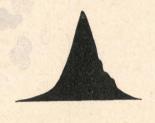


Fig. 10. — Diagramme d'électrophorèse de la fraction alcool-soluble du « gros trouble » (frontières descendantes).

Il est possible que la fraction alcool-soluble du « gros trouble » soit constituée partiellement par des éléments correspondants du trouble fin, qui sont adsorbés pendant le refroidissement par le gros trouble et ne font pas partie intégrante de celui-ci.

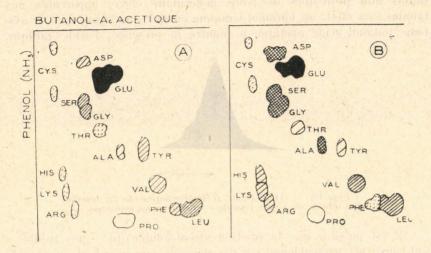
La fraction azote-résiduel, beaucoup plus riche en azote (63 p. 100 de matières protéiques) est riche en acide glutamique, leucine, alanine et glycocolle (Tableau XII, C et Fig. 9 C). Comme Luers et Wiedemann (1924) [160], il nous a été impossible de l'assimiler à une protéine définie du malt. Elle semble donc constituée d'une protéine dénaturée, dérivant probablement de l'albumine du malt coagulée en partie lors de l'ébullition en chaudière. Elle est analogue à la protéine O du moût que Johnston (1948) [161] a retrouvée dans le gros trouble.

« Trouble fin »

A la sortie du réfrigérant Baudelot, le moût est centrifugé en enceinte refroidie à la vitesse de 6.000 tours/minute. Le trouble fin recueilli est ensuite l'objet d'un traitement identique à celui décrit plus haut pour le « gros trouble ».

La fraction azote-alcool-soluble du trouble fin contient 14,4 p. 100 m.s. d'azote total et la fraction azote-résiduel 14 p. 100 m.s. d'azote total. D'autres essais ont donné par exemple 16 p. 100 d'azote total pour la première fraction et 12,2 p. 100 pour la seconde. A l'opposé de celle du « gros trouble », la fraction alcool-soluble du trouble fin est très riché en azote (nous avons trouvé de 85 à 100 p. 100 de mat. protéique dans les échantillons).

L'hydrolysat total de ces fractions est soumis à l'analyse chromatographique en deux dimensions, toujours dans le même système de solvants (Fig. 11, A, B). Le Tableau XIII résume les résultats.



- Chromatogrammes semi-schématiques d'hydrolysats de « trouble fin »

Fraction azote alcool-soluble. Fraction résiduelle.

TABLEAU XIII Proportions relatives des amino-acides d'hydrolysats de « trouble fin »

AMINO-ACIDES	A (1) Fraction Azote- alcool-soluble	B Fraction Azote résiduel
Dérivés de cystine	5 30 7	1 10 25 12 15
Thréonine	3 1 10 1 1 3 1 10 10 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	3 12 3 12
Phénylalanine	abondante	3
Lysine		6

⁽¹⁾ Etant donné les variations de la teneur en azote, les chiffres ne peuvent être ici comparés que dans une même colonne.

La fraction alcool-soluble du trouble fin est riche en acide glutamique, tyrosine, leucine et proline. Comme nous l'avions décrit dans une note préliminaire (Scriban, 1950) [162], l'analogie des chromatogrammes de cette fraction du trouble fin et de ceux de l'hordéine, dans leur composition et dans l'intensité relative des différentes taches d'amino-acides, est remarquable (comparer Tableau VII, Fig. 6 et Tableau XIII, A et Fig. 11, A).

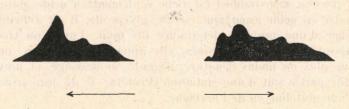


Fig.~12. — Diagrammes d'électrophorèse de la fraction azote alcool-soluble du « trouble fin »,

La proportion d'acide glutamique, déterminée par la méthode de Gale, dans la fraction alcool-soluble du « trouble-fin » est de 26,3 p. 100 du poids sec ; le rapport :

N ac. glutamique

N total Trouble

est égal à _____ soit 0,174. Le taux relativement élevée d'acide 14,4

glutamique et la valeur de ce rapport concordent parfaitement avec les résultats de dosages effectués sur les hordéines pures d'orge et de malt (Tableau IX). Ces résultats complètent ceux des analyses de Luers (1922, et coll., 1924) [163] et confirment la grande similitude de la fraction alcool-soluble du trouble fin et de la prolamine de l'orge ou du malt.

Nous avons essayé de compléter cette étude comparée du trouble fin et de l'hordéine en utilisant la technique d'électrophorèse qui nous avait révélé d'une part l'hétérogénéité de l'hordéine; d'autre part son évolution électrophorétique au cours de la germination.

Par une technique identique à celle décrite précédemment pour le « gros trouble », l'examen électrophorétique en frontières ascendantes et descendantes de la fraction alcool-soluble du trouble fin a été réalisé ; la Fig. 12 présente les deux diagrammes d'électrophorèse (après quatre-vingt-dix minutes de passage courant, I = 3,6 mA en fr. desc.).

Cette fraction est électrophorétiquement hétérogène, comme l'hordéine, dont on retrouve au minimum les cinq constituants en frontières ascendantes. Une comparaison rigoureuse avec les diagrammes d'hordéine d'orge ou de malt est évidemment délicate; toutefois, quand on examine la série complète des diagrammes d'électrophorèse (Fig. 7 et 12), depuis l'orge jusqu'au trouble fin, en passant par l'orge en germination et le malt, on est convaincu de l'évolution électrophorétique constante de cette fraction protéique alcool-soluble. Elle semble être l'objet de modifications profondes de structure, aussi bien au maltage qu'au brassage, tout en conservant une certaine stabilité dans sa composition en amino-acides.

La fraction azote-résiduel est riche également en acide glutamique et en outre en acide aspartique, sérine, glycocolle. Il est difficile de la rapprocher d'une protéine déterminée du malt. Lorsqu'on considère sa composition en acides aminés, elle apparaît comme un mélange protéique plus ou moins dénaturé, dégradé au brassage, et provenant en grande partie soit d'une globuline (Protéine T. de Johnston), soit aussi d'une glutéline ou de l'hordéine.

E. - AMINO-ACIDES

(Fraction I, voir schéma p. 21)

I. - Au maltage.

Nous avons suivi l'évolution des acides aminés libres d'une orge « Aurore », au cours de son maltage, réalisé dans les conditions industrielles par les *Malteries Franco-Belges*, à Prouvy (1). Des échantillons ont été prélevés aux premier, troisième, quatrième, cinquième, sixième et huitième jours de germination après touraillage et dégermage. Les échantillons ont été conservés à une température de — 20° C pour éviter toute altération et arrêter le processus de germination. Nous avons également étudié les radicelles obtenues après dégermage du malt.

L'extraction et le fractionnement des amino-acides et des polypeptides ont été conduits selon la méthode exposée précédemment (p. 20). Les analyses chromatographiques des fractions I ont été réalisées dans le système habituel, butanol/acide acétique et phénol (NH₃ 3 p. 100).

Le Tableau XIV et les chromatogrammes semi-schématiques de la Fig. 14 récapitulent la composition en amino-acides des échantillons d'orge « Aurore » aux différents stades du maltage.

Orge « Aurore »

Avant maltage, nous trouvons dans une orge (Fig. 13, A) la plupart des amino-acides. La méthode de fractionnement que nous avons employée nous a permis de compléter largement nos premiers résultats (BISERTE et SCRIBAN, 1949) [164].

⁽¹⁾ Nous remercions vivement M. Couvreur, Directeur de l'usine de Prouvy, des Malteries Franco-Belges, pour sa bienveillante hospitalité, ainsi que M. Simon, Chef de Fabrication, qui a veillé particulièrement à la conduite du maltage des couches en cours d'étude.

TABLEAU XIV

Proportions relatives des amino-acides libres de dialysats d'échantillons d'orge « Aurore » aux différents stades du maltage

AMINO-ACIDES ou DÉRIVÉS	Orge	1er jour	gme jour	5me jour	6me jour	8me jour	Malt
Andrew Texture	Fig. 13 A	Fig. 13 B	Fig. 13 C	Fig. 13 D		Fig. 13 E	Fig. 13 F
The state of the state of	1 E 2		training (" Julan E	HKR1 - A	Production of the	7.00
Dérivés de cystine	1	?	?	?	1	2	1
Acide aspartique	7	1	4	6	5	2	6
Acide glutamique	8	1	2	5	6	6	8
Acide a -aminoadipique .	+		10 10 10 10 10	red wheel	Acres -		
Sérine	5	2	3	6	6	5	4
Glycocolle	9	2	3	6	6	5	5
Thréonine	* 3	1	2	3	4	5	2
Alanine	10	8	12	12	10	12	8
Tyrosine	1	2	2	3	3	3	1
Valine	6	3	9	10	10	10	9 .
Tryptophane				matter to	+	+	+
Phénylalanine	2	1	3	5	5	5	2
Leucines	8	5	10	14	10	10	7
Acide γ -aminobutyrique	9	4	4	8	10	12	7
Proline	présente	Ne + hit	abond.	tr. abond	abond.	abond.	abond.
Histidine	3	1	1	3	4	5	3
Lysine	2	3	5	6	8	9	4
Arginine	2	1	1	3	3	5	3
Asparagine	2	? -	1	2	3	5	1
Glutamine	?	?	?	2	3	5	1
Méthionine	?	+	+	+	+	+	
β -Alanine	1	?	?	1 .	?	?	?
Section 1 1 - Install a least 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	- 1 PAP 3 F.						

Il y a lieu de noter l'absence de glutamine et de tryptophane. L'alanine est particulièrement abondante. La recherche de la méthionine et sa séparation de la valine en chromatographie unidimensionnelle dans le sytème alcool benzylique n'a pas donné de résultats probants.

Nos résultats sont confirmés par les recherches chromatographiques préliminaires de Mac Leod (1951) et de Ljungdahl et Sandegren (1950) [165], dont les méthodes d'extraction sont très différentes de la nôtre; toutefois, nous n'avons pu mettre en évidence comme eux la glutamine dans l'orge non germée. Il est possible qu'elle existe néanmoins, mais vraisemblablement en petite quantité. Notre méthode de préparation des liquides biologiques en vue de leur étude chromatographique comporte, en effet, un temps « brutal » qui est l'évaporation

sous pression réduite, à 35-40° C, en milieu légèrement ammoniacal. Étant donné la grande labilité de la glutamine, il est possible que celle-ci soit transformée partiellement en acide glutamique. L'asparagine au contraire est beaucoup plus stable.

Il est intéressant de relever la présence de β-alanine et d'acide α-aminoadipique (l'acide α-aminoadipique libre vient d'être trouvé dans les grains de maïs (Windsor, 1951) [166]. De même, il est important de signaler la découverte de l'acide γ-aminobutyrique dans l'orge Biserte et Scriban (1950) [167], pressentie par Mac Leod (loc. cit.) et confirmée par Ljungdahl et Sandegren (loc. cit.). L'acide γ-aminobutyrique a d'ailleurs été signalé dans d'autres végétaux : la pomme de terre (Steward et coll., 1949) [168], la pomme (Hulme et Arthington, 1950) [169], et la betterave (Westall, 1950) [170].

Nous avons essayé de mettre en évidence la glucosamine. Cet amino-glucide est retenu par la Permutite 50 et se trouve dans la fraction I avec les amino-acides. Nous avons donc recherché la glucosamine sur les chromatogrammes bi-dimensionnels de la fraction I. Partridge (1948) [171] utilise à cet effet un réactif spécifique à l'acétylacétone-paradiméthyl-aminobenzaldéhyde, qui révèle l'emplacement des amino-glucides sous la forme d'une tache rose. L'emploi de ce réactif ne nous a pas donné entière satisfaction. Nous avons donc employé la réaction classique que donnent les glucides aminés avec le réactif à la ninhydrine (solution à 0,1 p. 100 dans le butanol) sous la forme d'une coloration violacée (voir Montreuil et Scriban, 1951, b) [172]; en même temps, nous avons réalisé des chromatogrammes de contrôle avec un témoin de glucosamine.

Cet amino-glucide n'a pu être mis en évidence dans l'orge ni dans le malt. L'acétyl-glucosamine a été également recherchée. Nous avons étudié au préalable avec un témoin, son comportement sur les colonnes de résines à échange d'ions. L'acétyl-glucosamine n'est pas adsorbée par la Permutite 50, ni par la Deacidite. Elle se trouve dans la fraction II avec les glucides libres. Un témoin de cet amino-glucide se révèle au phtalate ou à l'oxalate d'aniline et donne une tache marron sur les chromatogrammes uni-dimensionnels dans le butanol/acide acétique. Cette tache marron se situe entre les taches roses du xylose (Rf = 0,28) et du ribose (Rf = 0,31). Enfin, le réactif suivant : urée 5 g., H Cl 2N 20 ml., alcool à 95° 80 ml., donne, après chauffage du chromatogramme à 110° C pendant vingt minutes, une tache rose, nettement fluorescente en lumière de Woop.

L'acétylglucosamine n'a pu être mise en évidence dans les dialysats d'orge ou de malt.

Nous avons comparé la composition de l'orge en amino-acides libres à celle du blé et du maïs. Nous avons utilisé le même mode d'extraction et de fractionnement. Les dialysats, après passage sur colonne de *Permutite 50* et élution ammoniacale de la colonne, donnent une

fraction I soumise à la chromatographie bi-dimensionnelle dans le système butanol/acide acétique et phénol (NH₃ 3 p. 100).

Le Tableau XV donne la composition en amino-acides des dialysats d'orge, de blé et de maïs.

TABLEAU XV

Proportions relatives des amino-acides libres de dialysats d'orge, de blé et de maïs

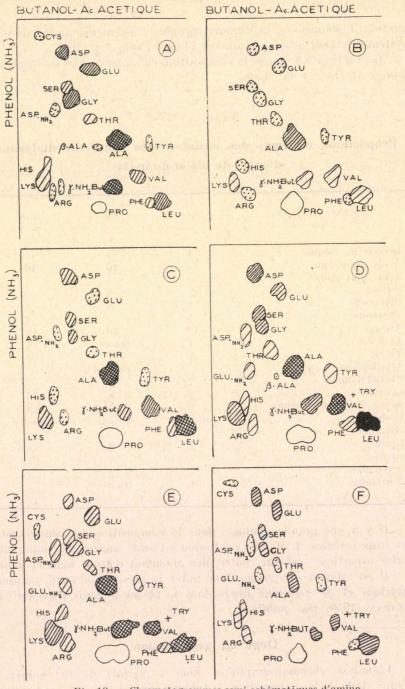
AMINO-ACIDES	Orge	Blé	Maïs
Dérivés de cystine	1	1	
Acide aspartique	7	10	10
Acide glutamique	8	4	7
Sérine	5	4	5
Glycocolle	9	6	7
Thréonine	3	3 202	2
Alanine	10	10	8
Tyrosine	1	traces	1
Valine	6	7	6
Tryptophane		présent	
Phénylalanine	2	+	+
Leucines	8	6	3
Acide γ -aminobutyrique	9	5	8
Proline	présente	présente	présente
Histidine	3	2	2
Lysine	2	3	4
Arginine	2	2	1
Asparagine	2	. 2	2
β-Alanine	1	traces	1

Il y a une grande analogie dans la composition en amino-acides des trois céréales. L'alanine est toujours l'acide aminé prépondérant ; l'acide aspartique est par contre plus abondant dans le maïs et le blé.

Il est intéressant également de noter la présence d'acide γ-aminobutyrique et de β-alanine libres dans le blé et le maïs (BISERTE et SCRIBAN, 1950, non publié).

Orge en germination

L'analyse chromatographique nous a permis de déterminer, à chaque stade de la germination, le tableau général du « pool » d'amino-acides et de leurs dérivés en équilibre dynamique avec les protéines du grain, et de reconstituer le « film » de leur dégradation au cours du maltage.



 $Fig.\ 13.$ — Chromatogrammes semi-schématiques d'aminoacides libres de dialysats.

		Orge « Aurore ».		ALL CONTRACTOR	791	150	ARMS - HOLD
В	4	Orge « Aurore »,	au				germination.
C	_		au	troisième	jour	de	germination.
D	1	A	au	cinquième	jour	de	germination.
E	_	The state of the s	au	huitième	jour	de	germination.
F	-	Malt « Aurore ».					

Premier jour (Fig. 13, B). Après le stade de la trempe, on observe un appauvrissement du grain en amino-acides libres, particulièrement en acide aspartique et en acide glutamique. Cette observation confirme et précise les résultats de Schild (1935) [173] sur la diminution de l'azote soluble et de l'azote aminé au cours du trempage. Nous avons alors examiné l'eau d'une cuve de trempage, à la fin du premier stade de la trempe d'une orge. Un litre a été soumis au fractionnement sur Permutite 50 et la fraction I (acides aminés libres) a été soumise à la chromatographie bi-dimensionnelle. On observe les acides aminés suivants : acide aspartique (+), acide glutamique (+), glycocolle (+), thréonine (+), alanine (+), acides diaminés (+). Ces acides aminés libres de l'orge ont donc été dissous au cours de la trempe.

Troisième jour (Fig. 13, C). — Une protéolyse active commande et libère des quantités importantes d'amino-acides; on observe de nouveau l'asparagine et il y a augmentation très nette du taux de l'alanine, de la valine, de la leucine, de la lysine, et surtout de la proline.

Quatrième jour. — Augmentation considérable de l'asparagine, de l'histidine, de l'acide γ -aminobutyrique, de la leucine; on voit apparaître le tryptophane, mis en évidence par la réaction colorée au p-diméthylaminobenzaldéhyde, et un composé inconnu situé à la droite de la tache de la proline et qui présente une coloration bleutée caractéristique à la réaction à la ninhydrine (ce composé a également été trouvé dans des dialysats d'orge non germée).

Cinquième jour (Fig. 13, D). — On est au maximum de la protéolyse ; apparition de la glutamine. La richesse en acide aspartique et en leucine est grande.

Sixième jour. — Diminution de l'acide aspartique et de la leucine ; réapparition de dérivés de la cystine ; la teneur en acides diaminés, en asparagine et en glutamine continue à augmenter. La proline est toujours abondante. Présence de tryptophane.

Huitième jour (Fig. 13, E). — On n'observe pas de composés nouveaux mais on note encore la diminution de l'acide aspartique. Le traitement par H_2O_2 fait apparaître une tache intense, de Rf 0,06 dans le butanol /acide acétique et de Rf 0,7 dans le phénol (NH₃), tandis que la zone des acides diaminés diminue d'intensité. Le traitement par H_2O_2 modifie donc le comportement chromatographique des acides aminés, en particulier de l'histidine (voir Fig. 1). Ce dédoublement des acides diaminés est inexpliqué actuellement.

Après hydrolyse totale, on constate évidemment la disparition de la glutamine et de l'asparagine. On observe d'autre part un phénomène curieux dont on ne connait pas l'explication chimique : la rotation de la tache de l'acide \gamma-aminobutyrique autour de la tache de la proline

(voir Fig. 1). Voici les RF de l'acide γ -aminobutyrique avant et après hydrolyse totale :

Avant hydrolyse: Rf (but.) = 0.43

RF (ph.) = 0.79

Après hydrolyse: RF (but.) = 0.33

RF (ph.) = 0.79

En conclusion, d'après l'ensemble de nos résultats, la teneur en amino-acides augmente nettement du troisième au cinquième jour de germination. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Moritz et Fuller (1926), de Schild (1935) [174], sur les variations de l'azote aminé au maltage. Il en résulte que la protéolyse est vraiment effective dès le troisième jour de germination et atteint son maximum au cinquième jour; ceci cadre avec les résultats de Massart (1946) [175], qui a mesuré la brusque élévation du pouvoir protéolytique de l'orge du troisième au cinquième jour de germination.

Il est intéressant de constater qu'au cours de la germination l'alanine est abondante et que sa concentration a une relative stabilité. D'autre part, il apparaît en quantités importantes des composés comme l'asparagine, la glutamine, l'acide γ-aminobutyrique et la β-alanine, qui peuvent être considérés comme des stades intermédiaires du métabolisme protidique. Enfin, il faut signaler, au cinquième jour de la germination, la teneur élevée en proline et leucine qui sont des constituants essentiels de l'hordéine — protéine de réserve activement dégradée pendant la germination ; il faut cependant remarquer la teneur relativement faible en acide glutamique, alors que cet amino-acide prédomine dans l'hordéine ; nous verrons plus loin la signification de ce fait.

On sait que la fraction I (schéma p. 21) est susceptible de contenir de petits peptides « neutres ». Leur taux dans l'orge doit être faible, puisqu'on ne décèle pas de taches anormales sur les chromatogrammes. Comme ces petits peptides sont susceptibles d'avoir un comportement chromatographique « voisin » de ceux des amino-acides qui les constituent — un peptide riche en leucine a des Rf proches de ceux de la leucine — il est indispensable, après hydrolyse totale, d'examiner l'aspect général des chromatogrammes et de le comparer au précédent. Nous n'avons pu observer de modifications appréciables de l'intensité des différentes taches d'amino-acides sauf pour l'acide aspartique et la \(\beta-alanine et nous sommes donc bien en présence d'une fraction I très pauvre en peptides. Cette constatation conduit à penser que l'hydrolyse — et la synthèse — des molécules protéiques du grain se fait selon un processus extrêmement rapide, grâce à la présence d'un système protéinasique très actif, sur lequel nous reviendrons.

Malt

Les amino-acides du malt (Fig. 13, F) sont ceux que l'on trouve dans l'orge avant le premier stade du touraillage. La chromatographie

unidimensionnelle dans le solvant butanol/alcool benzylique, en atmosphère chargée de HCN, permet de séparer nettement la phénylalanine du groupe des leucines; il existe de l'isoleucine (rapport isoleucine/leucine = 0,5) mais il ne semble pas y avoir de méthionine comme l'ont observé aussi Ljungdahl et Sandegren (1950) [176]. La présence de tryptophane a été confirmée par la réaction positive au p-diméthylaminobenzaldéhyde.

Il ne paraît pas se produire de modifications qualitatives importantes au cours du touraillage de l'orge germée; on peut noter toutefois une diminution sensible de la teneur en tyrosine, alanine, leucine et phénylalanine, asparagine et glutamine. Ce phénomène peut s'expliquer en partie par la participation de la tyrosine, de la leucine et de la phénylalanine à la formation des « mélanoïdines » (Luers, 1949, b) [177], et à l'instabilité relative des amides, comme l'asparagine et la glutamine, à la température élevée correspondant au « coup de feu » du touraillage (85° C).

Nos résultats complètent les travaux préliminaires de Brown (1907), de Ljungdahl et Sandegren (loc. cit.) [178].

Il est intéressant de voir le malt contenir presque tous les aminoacides « indispensables » , que nous retrouverons dans le moût et plus tard dans la bière et qui sont : la lysine, le tryptophane, l'histidine, la phénylalanine, la leucine, l'isoleucine, la thréonine, la valine, l'arginine.

Radicelles

Le germe et, en particulier, les radicelles se développent rapidement lors de la germination. Leur croissance est surveillée et freinée en ralentissant la respiration pour éviter une freinte trop importante au cours de la fabrication (3 à 5 kgs de radicelles pour 100 kgs de malt touraillé).

Les radicelles contiennent en moyenne 30 p. 100 d'azote total, dont près de la moitié est soluble dans l'eau (Luers, 1949, a) [179]. Hashitani (1924) [180] a montré que les radicelles contenaient des protéines solubles dans ClNa à 10 p. 100 (du groupe globulines) et dans KOH à 0,25 p. 100 (du groupe glutélines); à la suite de Brown et coll. (1906) [181], il a trouvé également de l'asparagine, des bases : adénine, choline, de la bétaïne, et un alcaloïde : l'hordénine, très abondante (3 p. 100). Cet alcaloïde, uniquement localisé dans la région subterminale des radicelles, joue un rôle inconnu; sa synthèse à partir de la tyrosine et de la tyramine semble probable (RAOUL, 1937) [182]. Les radicelles contiennent de nombreuses vitamines (A, B, D, E) et probablement de l'acide pantothénique (Norris, Hubbart, 1950) [183].

Les tissus du germe sont édifiés à partir des substances de réserve de l'endosperme qui, après amylolyse ou protéolyse, sont dégradés en éléments assimilables (oses simples, amino-acides, peptides) traversant ensuite le scutellum. En particulier, à la fin du huitième jour de germination, on ne trouve plus que 64,6 p. 100 d'azote total dans l'endosperme

mais 36,4 p. 100 d'azote émigré dans l'embryon (Van Laer, 1942) [184]. Une analyse comparée des différentes fractions azotées (en p. 100 d'azote total) dans les germes d'orge et de malt est significative (Rose et Anderson, 1936) [185].

	Germe d'orge	Germe de malt
Azote non protéique	16	22
Azote soluble dans l'eau	28	15
Azote soluble dans SO4 K2 à 5 p. 100. Azote - alcool - soluble (alcool à 70c	7	4
chaud)	6	5
Résidu	43	54

L'azote non protéique croît de 27 p. 100 et le résidu (azote « glutéline » et « protéines de structure ») croît de 20 p. 100.

Dans le germe, les éléments assimilables participent au métabolisme respiratoire et contribuent à l'édification rapide de nouveaux tissus, Le développement rapide des radicelles laisse supposer qu'elles sont le siège d'un métabolisme intense ; aussi, nous avons essayé d'étudier la composition en amino-acides et en polypeptides de ce matériel de choix, afin de saisir les chaînons intermédiaires de ce métabolisme.

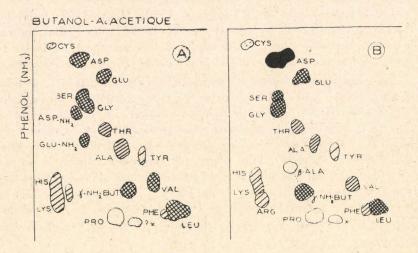
Le dialysat de 50 g. de radicelles, préalablement broyées, est fractionné sur résines à échange d'ions.

La fraction I est examinée en chromatographie bi-dimensionnelle dans le système butanol/acide acétique et phénol (NH₃ 3 p. 100).

Tableau XVI
Proportions relatives des amino-acides d'un dialysat de radicelles de malt avant et après hydrolyse totale

de l'adicelles de lliait availt	1 0	
AMINO-ACIDES	Dialysat (Fig. 14 A)	Dialysat après hydrolyse totale (Fig. 14 B)
Dérivés de cystine	1	1
Acide aspartique		20
Acide glutamique		10
Sérine		10
Glycocolle	10	10
Thréonine	8	8
Alanine		8
Tyrosine		4
Valine		8
Acide γ -aminobutyrique	14	14
Phénylalanine	5	18
Leucines	18	
Proline	très abondante	abondante
Histidine		15
Lysine		Special Reality of the
Arginine	4	4
Asparagine		0
Glutamine		0
β -alanine		présente

Le Tableau XVI et la Fig. 14, A donnent la composition en aminoacides et dérivés du dialysat de radicelles. La deuxième colonne donne les amino-acides de cette fraction après hydrolyse totale (Fig. 14, B).



 ${\it Fig.}\,14.$ — Chromatogrammes semi-schématiques d'aminoacides libres de radicelles.

 Dialysat de radicelles (fraction 1).
 Dialysat de radicelles (après hydrolyse totale). (Pour la tache bleue x, voir page 71).

Signalons en outre une tache anormale (x) qui donne une coloration bleue à la réaction à la ninhydrine et qui se situe au voisinage de la proline et de l'acide γ-aminobutyrique; cette tache a été observée également au cours de la germination (voir p. 67).

Il faut remarquer la richesse en acide aspartique, en acide γ-aminobutyrique, en leucines, en asparagine et en proline.

La présence d'acide γ-aminobutyrique est expliquée par l'existence d'une glutamo-décarboxylase, mise récemment en évidence par BEEVERS, (1951) [186], dans les radicelles d'orge. Cet enzyme doit avoir un rôle actif pendant la germination et le premier stade du touraillage car une quantité importante d'acide glutamique participe au métabolisme azoté. La glutamo-décarboxylase est détruite à partir de 50° C, au touraillage. Signalons qu'elle a été trouvée également dans les racines de radis (Hasse et Schumacher, 1950) [187] et le rye-grass (Synge, 1951) [188]; on l'a découverte aussi dans le tissu cérébral (in Boulanger, 1951,b) [189].

L'abondance d'asparagine et de glutamine a été signalée par (Willis, 1951) [190]. Cet auteur a étudié la synthèse des amino-acides dans les radicelles excisées d'orge, cultivées sur des solutions minérales ; la glutamine en particulier, et son homologue l'asparagine, jouent dans le métabolisme intermédiaire un rôle très important que nous examinerons ultérieurement.

Sur une orge au sixième jour de germination, nous avons excisé les germes et avons séparé radicelles et plumules. L'analyse chromatographique nous a montré que les plumules sont plus pauvres en aminoacides ; en particulier, on n'y trouve pas ou peu de proline.

L'hydrolyse totale de la fraction I du dialysat de radicelles (Tableau XVI, Fig.~14 b) fait apparaître la β -alanine; elle renforce un peu la tache de l'acide glutamique et très nettement la tache de l'acide aspartique, dont une partie provient de l'asparagine hydrolysée.

En conséquence, à côté des amino-acides de la fraction I, il peut exister aussi de petits peptides riches en acide aspartique. La présence de β -alanine peut s'expliquer par l'hydrolyse de l'acide pantothénique (α , γ -dihydroxy- β , β '-diméthylbutyryl- β -alanide), vitamine du groupe B et facteur de croissance. Cet acide pantothénique est en effet plus abondant dans le germe (dans une graminée comme le sorgho, il y a deux à cinq fois plus d'acide pantothénique dans le germe que dans l'endosperme (Hubbart, 1950) [191]. L'évolution de ce facteur de croissance au cours du maltage et du brassage a été étudiée par Norris (1950) [192]. Il y en a 4 μ g/g. dans l'orge et 5,5 μ g/g. dans le malt.

II. - Au brassage.

Les amino-acides et les peptides (« Simple nitrogen compounds » — Bishop, 1951) [193], représentent 35 à 40 p. 100 de l'azote total du moût.

Des échantillons de moût ont été prélevés à différents stades du brassage et ont été soumis à un fractionnement sur résines à échange d'ions.

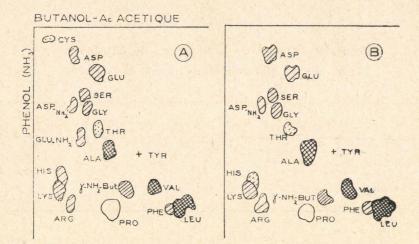
La fraction I est soumise à la chromatographie bi-dimensionnelle dans le système butanol-acide acétique et phénol (NH₃ 3 p. 100).

Les résultats suivants ont été obtenus sur un échantillon de moût après protéolyse à 60° C (Moût 60, Fig. 15, A) et un échantillon de moût prélevé au bac refroidissoir (Moût bac, Fig. 15, B).

Les chiffres du Tableau XVII représentent les proportions relatives des amino-acides.

La séparation de la leucine, de l'isoleucine et de la phénylalanine a été effectuée par chromatographie unidimensionnelle dans le solvant butanol/alcool benzylique, en atmosphère chargée de HCN (Tableau XVIII). Par cette technique il n'a pas été possible de mettre en évidence la méthionine.

Après chromatographie unidimensionnelle dans le butanol/acide acétique, le réactif d'Ehrlich (p-diméthylaminobenzaldéhyde) a permis de confirmer la présence de tryptophane dans les moûts « 50 », « 60 » et au bac refroidissoir.



 $Fig.\,15.$ — Chromatogrammes semi-schématiques d'amino-acides libres de dialysats de moûts.

A – Moût après la protéolyse à 60° C. B – Moût houblonné au bac refroidissoir.

TABLEAU XVII

Proportions relatives des amino-acides libres du moût

AMINO-ACIDES	A: Moût 60	B: Moût bac
Dérivés de cystine		0
Acide aspartique	5	5
Acide glutamique	5	3
Sérine		5
Glycocolle	5	5
Thréonine	2	2
Alanine	10	10
Tyrosine	traces	traces
Valine	10	10
Ac. γ-aminobutyrique	9	9
	12	12
Histidine		2
Lysine	6	6
Arginine	3	3
Asparagine	9	9
Proline	abondante	abondante
	assiraanio	abolidante

TABLEAU XVIII

Rapports relatifs de la leucine, de l'isoleucine et de la phénylalanine dans le moût

AMINO-ACIDES	A: Moût 60	B: Moût bac
Isoleucine	1,5 3 1	1,5 3 1

En résumé, nous avons décelé dans la fraction I du moût la présence certaine de 17 amino-acides et de 3 de leurs dérivés (asparagine, glutamine, acide γ-aminobutyrique). Après ébullition du moût nous avons observé la disparition de la glutamine et des dérivés de la cystine, dont la stabilité est relativement faible.

Nous avons retrouvé ainsi dans le moût tous les amino-acides libres du malt ou leurs dérivés, en notant toutefois une plus grande richesse en alanine, valine, leucine, phénylalanine et en asparagine et glutamine.

Dans l'ensemble, nos résultats sont comparables à ceux de Barton-Wright (1949), de Ljungdahl et Sandegren (1950) [194]. Comme ces derniers auteurs, nous n'avons pu mettre en évidence la méthionine, dont Barton-Wright a révélé l'importance dans le métabolisme de la levure. La disparition de la glutamine après ébullition du moût n'est peut-être pas complète, car une très faible concentration de cette amide ne peut être révélée sur nos chromatogrammes.

Des moûts, après protéolyse à 50° C et après réfrigération complète, ont aussi été examinés et n'ont rien révélé de particulier par rapport aux résultats décrits ci-dessus.

Au cours de l'étude de la fraction I, les chromatogrammes n'ont pas présenté de taches de RF anormaux susceptibles d'être attribuées à de petits peptides. Toutefois on ne peut conclure absolument à l'absence de petits peptides, car ceux-ci ne sont décelables en chromatographie qu'à forte concentration.

En conclusion, nous insisterons sur la présence dans le moût d'acide glutamique, d'acide aspartique, d'asparagine, particulièrement assimilables par la levure (Barton-Wright, loc. cit.; Thorne, 1950) [195].

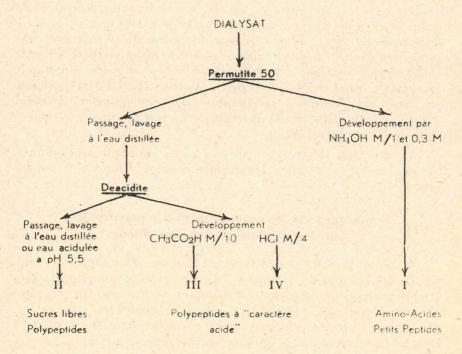
Enfin, la richesse du moût en leucines et en phénylalanine, la présence de tyrosine, sont des faits intéressants. En effet, pendant la fermentation, ces acides aminés participent au métabolisme de la levure et, après désamination, donnent, outre l'ammoniaque source d'azote pour la levure, des alcools caractéristiques par leur odeur et leur saveur,

appelés « fusel oils » (alcools isoamyliques pour les leucines, β-phényléthanol pour la phénylalanine et alcool phénylpropylique pour la tyrosine). Les « fusel oils » jouent un rôle important dans le moût où ils peuvent devenir des inhibiteurs de croissance de la levure (Thorne, loc. cit.) [196]; dans la bière ils participent à la constitution du parfum, mais certains d'entre eux sont capables de diminuer la stabilité de la mousse (Sandegren et Saverborn, 1949) [197].

Une étude systématique de moûts brassés à partir d'orges sélectionnées de variétés et d'origines diverses, puis fermentés à l'aide de plusieurs espèces ou races de levures, serait susceptible d'apporter quelques éclaircissements sur les facteurs conditionnant le parfum et les qualités organoleptiques d'une bière.

F. - POLYPEPTIDES

Nous rappellerons, dans le schéma suivant, le fractionnement des polypeptides sur colonnes de résines à échange d'ions (*Permutite 50*, *Deacidite*) utilisé dans la présente étude.



La fraction peptidique I a été étudiée dans le chapitre précédent avec les amino-acides libres.

L'étude de la fraction II, très riche en glucides libres, est difficile. Pour éliminer ces sucres, nous avons effectué, en général, une hydrolyse totale par l'acide chlorhydrique 6 N. L'hydrolysat est repassé sur colonne

de Permutite 50, de façon à éliminer les substances gênantes : les acides aminés libérés sont seuls retenus.

L'élution de la colonne de *Deacidite* s'effectue au moyen d'acide acétique M/10 et l'acide chlorhydrique M/4, utilisée par Partridge et Brimley (1949) [198]. Nous avons essayé de fractionner les polypeptides par cette méthode (Fractions III et IV).

Partridge et Brimley ont observé que l'acide acétique déplaçait l'acide glutamique de la colonne de Deacidite, le passage de l'acide glutamique coıncidant avec le « front » de l'acide acétique ; de même, l'acide chlorhydrique déplace l'acide aspartique, le passage de l'acide aspartique coïncidant avec le « front » de l'acide chlorhydrique. La séparation parfaite de ces acides est délicate en raison du type de résine que nous utilisons (Deacidite, de grain 25/50 après deux passages aux tamis), et du modèle simplifié de colonne que nous mettons en œuvre. Il est donc fréquent de trouver un certain chevauchement dans l'élution de ces amino-acides ; le développement de la colonne par l'acide acétique déplace la majeure partie de l'acide glutamique, mais on observe aussi un léger déplacement de l'acide aspartique et inversement. Ce qui se produit pour les amino-acides purs, se reproduit naturellement à un degré plus marqué pour les polypeptides. On peut donc dire que le développement à l'acide acétique déplace des polypeptides contenant une proportion élevée d'acide glutamique et que le développement à l'acide chlorhydrique entraîne des polypeptides riches en acide aspartique. Le chevauchement des fractions polypeptidiques III et IV est inévitable en raison des conditions expérimentales de développement (grosseur, des grains de Deacidite, vitesse d'élution par rapport à la vitesse d'échange hauteur de la colonne, etc...).

Les fractions III et IV, riches en acides aminés dicarboxyliques, ont un comportement chromatographique voisin de celui de ces aminoacides.

Remarques sur le comportement des polypeptides sur les colonnes à échange d'ions

La Permutite 50 (Fraction I) retient tous les acides aminés et seulement quelques peptides « neutres » dans lesquels le groupement NH2 semble avoir gardé intactes ses possibilités de fixation. On rencontre peu de polypeptides « biologiques » dans la fraction II. Par contre, dans les hydrolysats pepsiques de la chymotrypsine (Boulanger et Biserte, sous presse) cette fraction est très riche en peptides.

Les fractions III et IV, à « caractère acide » sont des polypeptides « biologiques » riches en acide glutamique. Il semble que ces polypeptides, éléments de synthèse, soient, en grande partie, constitués d'acide glutamique et d'alanine, amino-acides d'une importance capitale dans la transamination.

I. - Polypeptides de l'orge

Un dialysat de 200 g. de farine d'orge « Aurore » est soumis au fractionnement sur colonnes de résines à échange d'ions. La quantité de farine utilisée est double de celle qui est nécessaire pour l'étude des amino-acides, de façon à obtenir une quantité suffisante des différentes fractions.

Etude de la Fraction III.

Le chromatogramme bi-dimensionnel de la fraction III montre la présence de trois taches « chromatographiquement » distinctes (Fig. 16, a).

 $Tache \ A: \ RF \ (but.) = 0.07 \ RF \ (phénol) = 0.08$ $Tache \ B: \ RF \ (but.) = 0.13 \ RF \ (phénol) = 0.24$ $Tache \ C: \ RF \ (but.) = 0.11 \ RF \ (phénol) = 0.3 à 0.43$

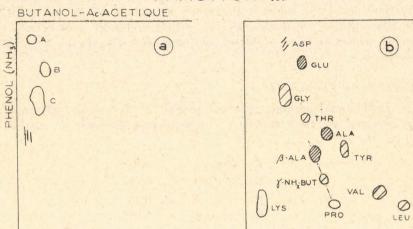
La chromatographie bi-dimensionnelle de l'hydrolysat de la fraction III montre la présence des amino-acides suivants (Tableau XIX, (Fig. 16, b).

TABLEAU XIX

Proportions relatives des amino-acides de l'hydrolysat des fractions polypeptidiques III et IV du dialysat d'orge « Aurore »

AMINO-ACIDES	Hydrolysat Fraction III	Hydrolysat Fraction IV
Acide aspartique Acide glutamique Sérine Glycocolle Thréonine Alanine Tyrosine Valine Leucines Acides diaminés Proline Acide γ-aminobutyrique β-Alanine	6 3 2 6 2 3 3 2 + 2	8 30 6 10 10 3 5 —

FRACTION III



FRACTION IV

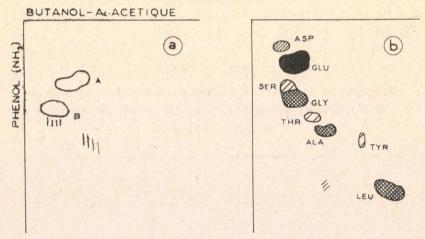


Fig. 16. — Chromatogrammes semi-schématiques des fractions polypeptidiques III et IV du dialysat d'orge « Aurore ».

Fraction III

- a) avant hydrolyse totale.b) après hydrolyse totale.

Fraction IV

- a) avant hydrolyse totale.b) après hydrolyse totale.

La fraction polypeptidique III de l'orge est riche en acide glutamique, alanine et β -alanine; elle contient de l'acide γ -aminobutyrique et des acides diaminés. L'abondance de β -alanine combinée est remarquable : elle laisse supposer la présence d'acide pantothénique, facteur de croissance, sans doute, lié à cette fraction polypeptidique.

L'examen du chromatogramme de l'hydrolysat de la fraction III montre que le Rf de l'acide γ -aminobutyrique et de la β -alanine sont anormaux. Nous avons déjà signalé les effets de l'hydrolyse totale sur les Rf de l'acide γ -aminobutyrique (voir page 68); il en est de même pour son homologue inférieur la β -alanine. En chromatographie bi-dimensionnelle, après hydrolyse totale, les taches de la β -alanine et de l'acide γ -aminobutyrique se placent sur une même droite par rapport à la tache de la proline. Voici les Rf de la β -alanine et de l'acide γ -aminobutyrique avant et après hydrolyse totale (voir Fig.~1).

B-alanine :

Avant hydrolyse totale : Rr (but.) = 0.34Rr (phénol) = 0.61Après hydrolyse totale : Rr (but.) = 0.29Rr (phénol) = 0.68

Acide y-aminobutyrique:

Avant hydrolyse totale : RF (but.) = 0.43RF (phénol) = 0.79Après hydrolyse totale : RF (but.) = 0.33RF (phénol) = 0.79

Ces faits sont observés surtout dans l'étude chromatographique des liquides biologiques et ne sont pas expliqués.

Etude de la Fraction IV.

La chromatographie bi-dimensionnelle montre la présence de deux taches « chromatographiquement » distinctes (Fig. 16, a).

 $Tache\ A: \ RF\ (but.) = 0,17 \ RF\ (phénol) = 0,29 \ Tache\ B: \ RF\ (but.) = 0,11 \ RF\ (phénol) = 0,38$

Il existe également des plages du chromatogramme qui se révèlent faiblement à la ninhydrine; elles peuvent traduire la présence de polypeptides. Dans la fraction IV, les taches bien repérables, riches en acide glutamique par exemple, peuvent être constituées, en partie, par de l'acide glutamique libre. Après élution à l'acide chlorhydrique de cette fraction, l'évaporation assez longue à 40° C amène, en effet, une

concentration croissante en acide chlorhydrique et, par suite, peut entraîner une hydrolyse des polypeptides.

FRACTION II

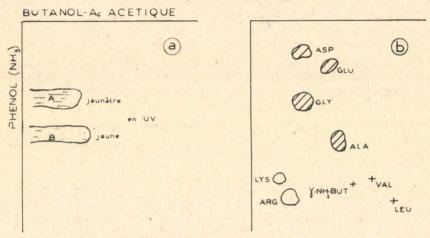


Fig. 17. — Chromatogrammes semi-schématiques de la fraction polypeptidique II du dialysat de radicelles.

a) avant hydrolyse totale.b) après hydrolyse totale.

La chromatographie bi-dimensionnelle de l'hydrolysat de la fraction polypeptidique IV montre la présence des amino-acides représentés (Fig. 16, b, et Tableau XIX, deuxième colonne). Cette fraction est riche en acide glutamique, glycocolle et alanine. On note l'absence d'acides diaminés. L'abondance d'acide glutamique permet de supposer l'existence de radicaux glutamylglutamique. Il est probable que ces polypeptides sont localisés dans le germe ; en effet, l'étude des radicelles nous montrera qu'elles sont très riches en ces fractions.

La présence de β -alanine suggère encore celle de l'acide panto-thénique.

Nous avons examiné l'hydrolysat de l'ensemble des fractions II, III, IV dans une orge « Aurore » le cinquième jour de germination et dans le malt correspondant. La chromatographie bi-dimensionnelle montre la présence des amino-acides énumérés ci-dessus et, en particulier, l'abondance d'acide glutamique et d'alanine.

II. — Polypeptides des Radicelles.

Les radicelles, siège d'un métabolisme intense, sont un matériel de choix pour l'étude des polypeptides.

Etude de la Fraction II.

Le chromatogramme en deux dimensions de la fraction II, riche en glucides, montre la présence de deux taches principales A et B, de RF différents de ceux des amino-acides courants (Fig. 17, a):

 $Tache\ A: \ RF\ (but.) = 0 \ a \ 0,20$ RF (phénol) = 0,36 $Tache\ B: \ RF\ (but.) = 0 \ a \ 0,20$ RF (phénol) = 0,56

La chromatographie bi-dimensionnelle de l'hydrolysat de cette fraction II fait apparaître de nombreux amino-acides (Tableau XX, Fig. 17, b).

Ces polypeptides sont donc constitués essentiellement d'acide aspartique, d'acide glutamique et surtout de glycocolle et d'alanine. On a relevé également dans cette fraction la présence de taurine.

Etude de la Fraction III.

Le chromatogramme bi-dimensionnel de la fraction III montre la présence de trois taches principales « chromatographiquement » distinctes (Fig. 18, a).

 $Tache\ A$:
 RF (but.)
 =
 0,18

 RF (phénol)
 =
 0,15

 $Tache\ B$:
 RF (but.)
 =
 0,26

 RF (phénol)
 =
 0,24

 $Tache\ C$:
 RF (but.)
 =
 0,18

 RF (phénol)
 =
 0,41

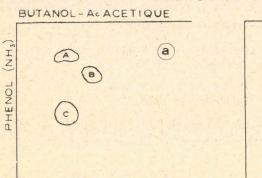
La chromatographie bi-dimensionnelle révèle les acides aminés suivants dans l'hydrolysat de la fraction III (Tableau XX, Fig. 18, b). Il faut noter la richesse en acide glutamique et aussi en glycocolle. L'acide glutamique prédomine dans la constitution de ces polypeptides « acides ». Les acides diaminés sont absents. Dans d'autres essais, l'aspect chromatographique que nous venons de décrire se retrouve dans les chromatogrammes de la fraction IV (voir page 76).

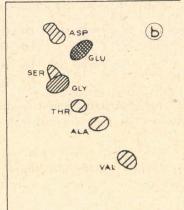
Etude de la Fraction IV.

Sur le chromatogramme de la fraction IV, on distingue deux taches A et B dont les Rr sont voisins de ceux de l'acide aspartique et de l'acide glutamique. On décèle également d'autres zones C, D, E, F, G, (Fig. 18, a). Ces taches sont bien visibles en lumière de Wood.

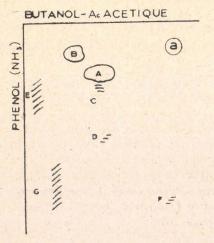
L'hydrolysat de cette fraction IV est soumis à la chromatographie bi-dimensionnelle montre des amino-acides nombreux (Tableau XXI, Fig. 18, b). Cette fraction est caractérisée par l'abondance de l'acide

FRACTION III





FRACTION IV



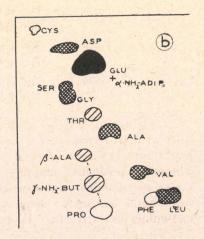


Fig. 18. — Chromatogrammes semi-schématiques des fractions polypeptidiques III et IV du dialysat de radicelles.

Fraction III

- a) avant hydrolyse totale.b) après hydrolyse totale.

Fraction IV

- a) avant hydrolyse totale.b) après hydrolyse totale.

glutamique et la présence d'acide γ-aminobutyrique et de β-alanine combinés.

TABLEAU XX

Proportions relatives des amino-acides des hydrolysats des fractions polypeptidiques II et III de dialysat de radicelles

AMINO-ACIDES	Hydrolysat Fraction II	Hydrolysat Fraction III
Acide aspartique Acide glutamique Sérine Glycocolle Thréonine Alanine Valine Leucine et phénylalanine Acide γ-aminobutyrique Lysine Arginine	4 traces traces traces traces	3 10 3 6 3 3 2 —

TABLEAU XXI

Proportions relatives en amino-acides des hydrolysats de la fraction polypeptidique IV et de ses constituants

AMINO-ACIDES	Hydrol. Fract. IV	Hydrol.	Hydrol. B	Hydrol. C	Hydrol. D	Hydrol. E	Hydrol.
Dérivés de cystine	10 20 + 10 10 6 12 12 12 4 12	+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++	+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++	+++++	+ ++++ +++ +++ +++ +++ +++	++++	· + + + + + +

Sur une série de cinq chromatogrammes, réalisés dans des conditions identiques, nous avons « récupéré » les zones A, B, C, D, E, G (Fig. 18, a) par repérage et découpage en lumière de Wood, et par élution selon la méthode de Consden (1947) [199]. L'éluat de chaque tache, ou zone, est hydrolysé et soumis à la chromatographie bi-dimensionnelle (Tableau XXI). Un témoin, prélevé dans une zone du chromatogramme située en dehors des taches énumérées et où il n'y à certainement pas de polypeptides, a été également hydrolysé et chromatographié; on y a trouvé de très faibles traces d'acide aspartique, d'acide glutamique, de glycocolle, d'alanine, de valine, de leucine.

Voici les RF des taches « récupérées » :

Tache A: RF (but.) 0.23 RF (phénol) 0,26 Tache B: RF (but.) 0.15 RF (phénol) = 0.15Zone C: RF (but.) 0.15 RF (phénol) = 0.37Zone D: RF (but.) = 0.20RF (phénol) = 0.58RF (but.) 0 Zone E: RF (phénol) = 0.10 à 0.50RF (but.) = 0Zone G: R_F (phénol) = 0,63 à 1

- A. Il est riche en acide glutamique et en glycocolle; il est surtout caractérisé par la présence d'acide γ -aminobutyrique et d'acide α -aminoadipique. La présence de ces deux acides est très curieuse; on sait, depuis peu, que l'acide α -aminoadipique peut être un constituant de certaines protéines (Windsor, 1951) [200].
- B.— C'est probablement un polypeptide du type aspartylglutamique ou glutamylaspartique.
- C. C'est probablement un polypeptide du type glutamylgly-cocolle ou glycylglutamique.
- D. Ce constituant est riche en acide glutamique et contient de la β-alanine.

Le constituant E est voisin de C et de G. Le constituant F contient de la leucine et de la proline.

La présence constante d'alanine dans ces fractions est intéressante car cet acide aminé intervient dans les réactions de transamination. On sait que, dans les dialysats d'orge, l'alanine libre varie peu au cours du maltage.

L'acide glutamique est abondant dans les protéines de « réserve » (hordéine, et même glutéline) protéolysées au maltage. Il est retrouvé

constamment dans ces polypeptides de la protéosynthèse du germe dont il est un chaînon dominant; on sait combien son rôle est très important dans le métabolisme intermédiaire des acides aminés.

La fraction III (ou IV) est probablement une fraction polypeptidique « anabolique », car elle contient de l'acide γ -aminobutyrique et de la β -alanine combinés.

III. - Polypeptides du moût.

Nous avons fractionné le dialysat d'un moût prélevé après protéolyse à 60° C (BISERTE et S**C**RIBAN, 1951, b) [201].

Etude de la Fraction II.

Elle est très riche en glucides (Montreuil et Scriban, 1951, b) [202]. Nous avons pu en éliminer la plus grande partie grâce à la technique suivante. La solution aqueuse concentrée de la fraction II est extraite deux fois à la collidine; la phase aqueuse restante est ensuite extraite par le mélange butanol/acide acétique/eau (4/1/5) et c'est la phase butanol qui, après concentration, est soumise à la chromatographie bi-dimensionnelle; nous avons pu identifier trois taches distinctes.

La chromatographie de l'hydrolysat de cette fraction montre la présence d'acide aspartique, d'acide glutamique, de glycocolle et d'alanine.

Etude de la Fraction III.

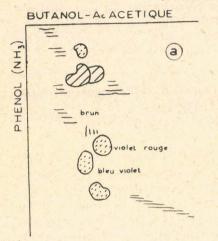
Le chromatogramme bi-dimensionnel de la fraction III montre la présence de cinq taches principales « chromatographiquement » distinctes (Fig. 19, a):

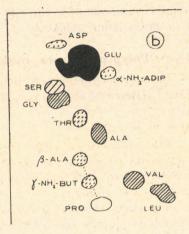
> Tache A: RF (but.) = 0.23RF (phénol) = 0.14Tache B: RF (but.) = 0.25Rr (phénol) = 0.24Tache C: RF (but.) = 0.29RF (phénol) = 0.58Tache D: RF (but.) = 0.25RF (phénol) = 0.62Tache E: RF (but.) = 0.28RF (phénol) = 0.76

La Fig. 19, a reproduit les résultats et le Tableau XXII indique les proportions relatives des amino-acides de l'hydrolysat total de la fraction III.

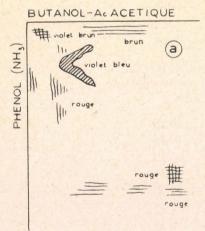
Ces polypeptides de la fraction III sont riches en acide glutamique et d'autre part, complètement exempts d'acides diaminés. Ils contiennent de l'acide α -aminoadipique, de l'acide γ -aminobutyrique et de la β -alanine.

FRACTION III





FRACTION IV



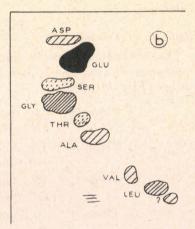


Fig. 19. — Chromatogrammes semi-schématiques des fractions polypeptidiques III et IV du dialysat de moût « 60 ».

Fraction III

- avant hydrolyse totale. après hydrolyse totale.

Fraction IV

- avant hydrolyse totale. après hydrolyse totale.

TABLEAU XXII

Proportions relatives des amino-acides de l'hydrolysat de la fraction polypeptidique III d'un dialysat de moût

AMINO-ACIDES	
Acide aspartique. Acide glutamique Acide α -aminoadipique Sérine Glycocolle Thréonine Alanine Valine Leucine β -Alanine Acide γ -aminobutyrique Proline	+ 30 1 5 6 1 6 6 6 2 (bleue) 2 (jaune)

Etude de la Fraction IV.

Le chromatogramme bi-dimensionnel de la fraction IV montre la présence d'une tache principale violet-bleu et de huit taches moins distinctes (Fig. 19, a).

Tache principale : RF (but.) =
$$0.17$$

RF (phénol) = 0.19 à 0.38

Cette tache principale a des RF voisins de ceux de l'acide glutamique.

Le Tableau XXIII et la Fig. 19, b, montrent la composition en amino-acides de l'hydrolysat de la fraction IV.

La fraction polypeptidique IV est caractérisée par sa richesse en acide glutamique et en glycocolle. Elle contient de l'acide aspartique et un peu de sérine.

TABLEAU XXIII

Proportions relatives des amino-acides de l'hydrolysat de la fraction polypeptidique IV d'un dialysat de moût

Acide aspartique	6	
Acide glutamique		
Acide gratamique	30	
Sérine	2	
Glycocolle	8	
Thréonine	1	
Alanine	6	
Valine	6	
Leucine	7	
Tache non identifiée	5	

Discussion des résultats.

Il est extrêmement intéressant de comparer les fractions polypeptidiques de l'orge, des radicelles, du moût et même celles de la bière (BISERTE et SCRIBAN, non publié).

La fraction polypeptidique II, qui accompagne les glucides libres, n'est pas très abondante. On y trouve l'acide aspartique, l'acide glutamique, le glycocolle et l'alanine. Elle est retrouvée dans la bière finie.

Les fractions polypeptidiques « acides », III et IV, sont vraiment caractéristiques par leur composition chimique et leur individualité. Elles renferment de nombreux polypeptides. Ces fractions sont rencontrées dans l'orge non germée, comme dans le moût et la bière finie ; la permanence de leur structure est remarquable. Ces deux fractions sont riches en acides aminés dicarboxyliques, surtout en acide glutamique.

L'une de ces deux fractions, en général la fraction III, est riche en glycocolle, alanine, valine, leucine; mais elle se caractérise par la présence d'acide α -aminoadipique (homologue supérieur de l'acide glutamique), de β -alanine, d'acide γ -aminobutyrique et par l'absence totale d'acides diaminés. L'isolement et l'élution des taches de polypeptides sur les chromatogrammes, réalisés dans le cas favorable des radicelles, nous a permis d'élucider leur composition en amino-acides. L'acide α -aminoadipique et l'acide γ -aminobutyrique se trouvent dans le polypeptide « A » (Fig. 18, a), riche en acide glutamique. La β -alanine se trouve, par contre, dans le polypeptide « D », riche en acide glutamique. mais aussi en sérine, glycocolle, alanine. On peut supposer que l'acide γ -aminobutyrique, homologue supérieur de la β -alanine est le constituant d'une substance présentant quelque analogie

avec l'acide pantothénique. L'acide pantothénique « témoin » se retrouve dans la fraction de développement à l'acide acétique M/10 des colonnes de Deacidite; en chromatographie bi-dimensionnelle, il présente une réaction négative à la ninhydrine.

La dernière fraction polypeptidique est particulièrement riche en acide glutamique, glycocolle et alanine ; il n'y a pas d'acides diaminés. On retrouve donc à peu près les mêmes acides aminés que dans la fraction précédente, sauf l'acide α -aminoadipique, l'acide γ -aminobutyrique et la β -alanine.

Block (1951) [203] vient de trouver également, dans le lait pasteurisé, des peptides riches en acide glutamique, glycocolle et alanine et qui ne contiennent pas d'acides diaminés.

Les fractions polypeptidiques à caractères « acides » sont constituées à n'en point douter des polypeptides de la protéosynthèse du germe ; elles semblent avoir « capté » électivement l'acide glutamique. Cette richesse relative rappelle plus l'hordéine — protéine de « réserve » — que les protéines « cytoplasmiques » édifiées dans le germe, pauvres, en acide glutamique et riches en acides diaminés. Miertinen (1951) [204] a étudié la synthèse des peptides de la levure Torulopsis utilis, à partir d'acides aminés ou de sels ammoniacaux ajoutés aux solutions nutritives ; il a remarqué également que la composition des peptides était proche de celle de l'ensemble des amino-acides libres de la levure et non de celle des protéines synthétisées dans la cellule.

La protéolyse du brassage n'atteint pas les fractions polypeptidiques du malt qui passent intactes dans le moût. La fermentation par Saccharomyces cerevisiae ne les modifie pas profondément, mais des éléments nouveaux apparaissent (BISERTE et SCRIBAN, non publié).

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Au terme de ce travail, il apparaît que le maltage, et en particulier la germination, ont vraiment un rôle prépondérant par les modifications profondes apportées dans les fractions protéiques de l'orge et par la libération de constituants azotés de poids moléculaires relativement faibles.

Une distinction s'impose immédiatement entre les protéines « cytoplasmiques » et les protéines « de réserve » du grain, dont les destinées au maltage, aussi bien qu'au brassage sont toutes différentes.

Les protéines « cytoplasmiques », albumines et globulines, dont le taux reste sensiblement uniforme dans l'orge au maltage (BISHOP, 1929, b) [205], ont un comportement électrophorétique relativement constant. D'ailleurs, leur étude par ultracentrifugation (Saverborn et coll., 1944; Sandegren, 1947) [206] a également révélé une certaine stabilité. Des recherches plus approfondies, mais certainement très délicates, ayant recours simultanément aux méthodes d'électrophorèse différentielle et séparative, et de relargage, permettraient sans doute de fractionner davantage ces protéines complexes en leurs constituants et de suivre leur évolution éventuelle. Il n'en reste pas moins vrai que ces protéines, intégrées au cytoplasme vivant du grain, participent à son équilibre et à sa continuité.

Les protéines « de réserve », hordéine et glutéline, ont une toute autre évolution. Nous avons simplement effleuré l'étude de la glutéline et montré que cette fraction était plus complexe qu'on ne l'admet généralement. Une étude comparable à celles que l'on a réalisées sur les glutélines du blé et du maïs, en utilisant des détergents cationiques comme solvants et l'électrophorèse différentielle comme technique analytique, permettrait d'éviter les inconvénients de solvants « dénaturants », comme les acides et les bases employés jusqu'ici, et de déterminer sans doute les modifications de cette fraction durant le maltage.

L'étude de l'hordéine a présenté un vif intérêt, car il nous a été possible de suivre son évolution et de la comparer à celle des amino-acides et des peptides libérés au cours de la germination. Nous avons vu dans notre historique que de nombreux auteurs, et en particulier BISHOP (1929, b) [107], avaient mis en relief la correspondance étroite entre la diminution rapide de l'azote-hordéine, fraction principalement dégradée au germoir (diminution de 50 p. 100) et l'augmentation de

l'azote soluble. L'examen des diagrammes de maltage de Візног est particulièrement suggestif.

Considérons l'orge à maturité : la majeure partie de l'hordéine est concentrée dans les grains d'aleurone de l'assise protéique et l'on sait que cette prolamine représente, à elle seule, 30 à 40 p. 100 de l'azote total du grain. Les grains d'aleurone ne sont que d'anciennes vacuoles ayant emmagasiné des réserves, en particulier des réserves azotées, vacuoles qui se sont progressivement subdivisées et déshydratées au cours de la maturation de la graine. Engel et Heins (1947) [208] ont montré d'autre part que la protéinase (du type catheptase) et les dipeptases de l'orge sont principalement localisées dans les cellules à aleurone. Nous avons donc, dans le même tissu, à la fois la substance protéique de réserve et les enzymes protéolytiques correspondants.

Le germe est à l'état de vie latente comme le reste de la graine et il représente environ 2 à 3 p. 100 du poids du grain. Détaché avec précaution du grain, il est capable d'une vie autonome sur des endospermes étrangers ou sur des solutions nutritives (Brown et Morris, 1890) [209]; on peut le considérer réellement comme un « parasite » vivant sur la graine. La culture de germes excisés sur des solutions de différents glucides (Brown et Morris, loc. cit.) ou de diverses substances azotées (Brown et coll., 1906) [210], ont mis en évidence la valeur nutritive du saccharose et de l'asparagine assimilés électivement par l'embryon. Ces études sont malheureusement anciennes et les techniques biochimiques de l'époque ne permettaient pas de suivre le métabolisme des substances nutritives absorbées. Tout récemment, l'emploi des isotopes, en particulier de l'azote lourd N¹⁵ a permis d'étudier le métabolisme azoté de germes d'orge excisés (Willis, 1951) [211]. On sait désormais que le germe cultivé sur des solutions de phosphate d'ammonium marqué avec N¹⁵ réalise d'abord une synthèse active de glutamine, puis une synthèse lente d'asparagine; les acides α-aminés formés et les protéines in situ ou de synthèse contiennent tous de l'azote N15. Il est donc probable que les amides des amino-acides dicarboxyliques jouent un rôle important dans le métabolisme protidique. Enfin, la formation de glutamine serait associée au métabolisme glucidique de la respiration; en effet, la formation d'acide glutamique puis de glutamine à partir d'acide α-cétoglutarique est possible et elle permet une réserve d'ammoniaque et même d'énergie.

Considérons maintenant le germe dans les conditions normales de développement. Au maltage, à la fin de la germination, le poids du germe représente 10 à 15 p. 100 du poids total du grain, soit 5 p. 100 environ pour les radicelles et le reste pour l'embryon et la plumule; sa croissance est donc très appréciable. Dans l'orge non germée, le germe représente environ 5 p. 100 de l'azote total du grain; à la fin de la germination, il en contiendra 35 à 40 p. 100 dont 3 à 5 p. 100 en moyenne dans les radicelles, éliminées à la fin du maltage. Comme l'azote total

du grain ne varie pratiquement pas au maltage, il est évident qu'une importante migration azotée a lieu entre l'endosperme et l'embryon.

Les protéines « de réserve », hordéine et glutéline, ont donc été « solubilisées » et acheminées en partie dans l'embryon. L'hordéine ne subit aucune « resynthèse » dans le germe (analyses de Rose et Anderson, 1936) [212], tandis que la glutéline semble se reformer, au moins en partie (Rose, loc. cit.; Bishop, 1929, b) [213]. En conséquence, l'augmentation de l'azote soluble dans l'orge germée provient exclusivement de la protéolyse de la glutéline (pour 30 p. 100 dans l'augmentation) et surtout de l'hordéine (pour 70 p. 100, Hopkins et Krause, Bishop) [214].

Ces considérations nous permettent le rapprochement suivant : avant la germination, dans l'orge brute, nous trouvons une fraction hordéine et des protéinases en « réserve » dans l'assise protéique, puis, en fin de germination, nous constatons une solubilisation importante de l'azote hordéine (50 p. 100) qui participe pour 70 p. 100 dans l'augmentation de l'azote soluble et dont la moitié migre dans le germe. Un métabolisme protidique intense peut seul expliquer un tel bouleversement dans la graine et c'est le germe, élément vivant et actif, qui en est le promoteur.

Au maltage, le grain se développe dans des conditions un peu spéciales :

- A l'obscurité (la photosynthèse n'intervient pas, ou peu) ;
- Sans apports nutritifs extérieurs : le germe utilisera uniquement les réserves de l'endosperme ; on a simplement fourni l'humidité et l'oxygène, indispensables pour faire passer la graine de la vie latente à la vie active ;
- Une température que l'on maintient artificiellement, suivant les cas, entre 15 et 25° C en moyenne, assez loin de la température optimum d'action des différentes diastases.

Le germe va manifester sa vie active par une respiration maximum aux troisième et cinquième jours de germination (0,436 mg. de CO₂ par heure, dégagé par gramme d'orge sèche au troisième jour de germoir à 15° C (Van Laer, 1942) [215] et accompagné d'un dégagement de chaleur (4.000 calories environ pour 100 kgs d'orge sèche au cinquième jour de germination). Dans la germination industrielle, le gaz carbonique peut s'accumuler dans les couches de grains, entre les périodes de « retourne » et il est susceptible de créer une légère anaérobiose.

Le germe est en relation avec les réserves de l'endosperme par la protubérance du scutellum. Les cellules palissadiques de l'épiderme du scutellum sont directement en contact avec l'endosperme (microphotographie n° 3, Van Laer, loc. cit.) [216]; elles renferment de fines granulations et un noyau bien visible. Leur évolution cytologique au cours de la germination a été étudiée par Brown et Morris (1890) [217]; elle est caractérisée par une abondante multiplication

des granulations cytoplasmiques et le novau cesse d'être visible. Reed (1904) [218], Horning et Petrie (1927) [219] ont observé une abondance de mitochondries dans l'épithélium du scutellum de blé, de maïs et d'orge en germination; ils admettaient que les mitochondries jouaient un rôle important dans la sécrétion des enzymes. A l'heure actuelle on peut simplement affirmer que le scutellum et son épithélium sont le siège d'une grande activité diastasique. Les études précises de ENGEL et Bretschneider (1947) [220] prouvent qu'il est impossible d'établir une relation précise entre le nombre des mitochondries et l'activité diastasique. Le scutellum est enfin caractérisé par sa fonction d'absorption, de tissu perméable et actif, permettant des échanges réversibles entre embryon et endosperme. La germination de l'orge va se manifester par une protéolyse intense des protéines « de réserve », la formation d'amides (asparagine et glutamine) la libération et un métabolisme intermédiaire actif d'acides aminés, une protéosynthèse, le tout en liaison énergétique intime avec le métabolisme glucidique de la respiration.

Nous rappellerons brièvement les processus généraux du métabolisme de l'azote chez les végétaux et les différents enzymes correspondants, découverts dans l'orge. Nous pourrons ensuite interpréter nos résultats à la lumière de ces faits. Nous examinerons donc successivement les phénomènes de :

- Protéolyse :
- Formation d'amides :
- Désamination oxydative et transamination;
- Décarboxylation ;
- Protéosynthèse.

Ces divers phénomènes sont en liaison étroite et s'interpénètrent dans la vie de la graine.

La protéolyse

L'orge renferme une protéinase découverte par Hopkins (1929) [221], étudiée, entre autres, par Linderstrom-Lang et Sato (1929) [222]. La protéinase de l'orge est localisée principalement dans les cellules à aleurone et le germe, surtout dans le scutellum (Schade, 1937; Engel et Heins, loc. cit.) [223]. Cette protéinase hydrolyse la gélatine à pH 4,9, l'édestine à pH 4,3, l'albumine d'œuf à pH 4,6. La protéinase de l'orge présente une grande analogie avec la papaïne et les cathepsines.

L'orge germée contient aussi deux peptidases définies par Sato (1931) [224] une leucylglycine-peptidase (peptidase I) qui a un pH optimum de 8,6, et une alanyl-glycine-peptidase (peptidase II) qui a un pH optimum de 7,8. La distribution de ces enzymes a été étudiée par LINDERSTROM-LANG et HOLTER (1932) et EULER et SJOMAN (1933) [225]. Elles sont abondantes dans la couche à aleurone,

mais leur activité est la plus importante dans la région subterminale des radicelles et principalement dans la couche épithéliale du scutellum.

La chromatographie sur papier nous a permis de réaliser un véritable « film » du « pool » des amino-acides de l'orge pendant sa germination. Nous assistons à une libération vraiment explosive d'amino-acides entre le troisième et le sixième jour de germoir, malgré le développement déià appréciable des radicelles et de la plumule. Tous les acides aminés sont représentés et évoluent avec les amides, asparagine et glutamine : seule la quantité d'alanine semble constante. Nous avons en outre découvert la présence d'acide γ-aminobutyrique et de β-alanine; l'acide γ-aminobutyrique croît lentement jusqu'à la fin de la germination. Ce processus « explosif » correspond bien au maximum de l'activité protéolytique mise en évidence par Massart (1946) [226] et à la localisation histologique des protéines « de réserve » et des protéinases. Il y a peu de petits peptides dans notre fraction I, autrement dit la protéolyse de la glutéline et surtout de l'hordéine, par la protéinase de l'assise protéique, semble obéir à la règle du « tout ou rien » de Tiselius (1939) [227]. La protéinase attaque l'une après l'autre les molécules d'hordéine et les amène d'emblée au stade de petits peptides, scindés à leur tour par les peptidases I et II. On ne saisit pas de produits de simplification intermédiaires et en tout cas, si ces étapes existent, elles sont franchies très rapidement.

L'hordéine non hydrolysée conserve une composition constante en amino-acides; seule l'électrophorèse nous permet de suivre les modifications moléculaires de cette fraction protéique, dont les constituants électrophorétiques c et d (en frontières ascendantes) évoluent d'une façon continue au maltage. Il est extrêmement intéressant de comparer la scission enzymatique de l'hordéine dans l'orge germée à l'hydrolyse expérimentale de la zéine, prolamine du maïs (LAINE, 1944) [228].

Laine a soumis la zéine à une hydrolyse pepsique, depuis deux heures jusqu'à cinquante-deux jours. La fraction non hydrolysée se comporte bien comme de la zéine pure et si les grosses molécules ne sont pas absolument intactes, les fragments insolubles sont assez gros pour avoir la même composition en amino-acides que la zéine initiale. En sept jours, le poids moléculaire de la zéine passe de 40.000 à 26.000 et des groupes -SH apparaissent au cours de l'hydrolyse. L'existence de demi-molécules liées initialement par des groupes — S-S — paraît probable. L'hydrolyse pepsique semble suivre le schéma suivant :

Zéine	Demi- molécule	Octopeptides	Tétrapeptides	Tripeptides et Amino-acides
PM: 40.000	PM: 26.600 7 jours	PM: 773 dès 2 heures d'hydrolyse		PM: 324 50 jours

La zéine est très riche en acide glutamique (28,6 p. 100, LAINE). Lors de l'hydrolyse pepsique, les tétrapeptides obtenus comportent une molécule terminale de glutamine. On peut les représenter schématiquement de la façon suivante :

$$- G - M - X - M -$$

G = glutamine

M = radical d'amino-acide mono-aminé monocarboxylique

X = radical d'amino-acide

La molécule de zéine contiendrait ainsi une molécule d'acide glutamique tous les quatre acides aminés, l'acide glutamique étant sous la forme de son amide. La présence de glutamine a été prouvée également pour la gliadine du blé (Damodaran et coll., 1932) [229], et, de l'hydrolysat pepsique de la gliadine, Nakashima (1926) [230] a isolé un tétrapeptide riche en acide glutamique et en glutamine.

L'étroite parenté des prolamines, protéines de « réserve » des céréales, dans leur composition en acides aminés (Bonner, 1950) [231] dans leur hétérogénéité électrophorétique (voir page 55) et dans leur fonction physiologique, est évidente.

Il est vraisemblable que la structure de l'hordéine est analogue à celle de la zéine, mise en évidence par Laine. Nous observons de fait une continuité dans la composition en amino-acides de l'hordéine non hydrolysée, au cours de la protéolyse du maltage. Sans aucun doute, cette observation est un aspect de la règle du « tout ou rien » de Tiselius et écarte l'idée d'une hydrolyse simultanée et progressive de l'ensemble des molécules d'hordéine.

La fraction non hydrolysée a un poids moléculaire toujours élevé; elle subit une évolution électrophorétique caractéristique; deux composants c et d diminuent particulièrement au maltage. Nous avons aussi relevé une légère augmentation du taux d'acide glutamique par rapport à l'azote total pendant la germination.

Deux hypothèses peuvent être proposées pour tenter d'expliquer ces faits. L'hordéine non hydrolysée manifeste une certaine transformation, ou « dénaturation », pendant l'hydrolyse enzymatique, comme la caséine par exemple (Hoover et Kokes, 1947; in Boulanger, 1951, a) [232]. Dans la deuxième hypothèse, les différents composants de l'hordéine sont peut-être inégalement riches en acide glutamique et plus ou moins sensibles à l'attaque enzymatique. La diminution continue des composants électrophorétiques c et d, facilement protéolysés et sans doute plus pauvres en acide glutamique, amènerait un remaniement quantitatif des fractions et une légère augmentation de la teneur en acide glutamique.

Cette conception de l'évolution de l'hordéine rejoindrait ainsi celle

de Takahashi (1931) [233]; cet auteur considérait l'hordéine du malt (ou bynin) comme une hordéine « dénaturée » apparaissant progressivement au cours de la germination.

En conclusion, l'hordéine du malt est bien le reste de l'hordéine d'orge après le maltage; les comportements chimiques des deux protéines sont très voisins. Seule l'analyse électrophorétique nous a permis de reconnaître une évolution constante de la molécule d'hordéine au maltage en accord avec les observations modernes sur le mode d'action des protéinases. Les thèses de Luers (1919) et de Takahashi (1931) [234], qui semblaient s'opposer et s'exclure mutuellement, entrent tout naturellement dans le cadre de nos observations et se complètent l'une l'autre. L'hydrolyse de l'hordéine est désormais l'exemple d'une destruction enzymatique in vivo obéissant, avec quelques restrictions peut-être, à la règle du « tout ou rien » de Tiselius.

Nous avons vu que la protéolyse de l'hordéine et de la glutéline devait libérer normalement une grande quantité d'acide glutamique (ou de glutamine); l'hordéine comporte 30 p. 100 d'acide glutamique (Osborne et Gilbert, 1906) [235] et la glutéline 25 p. 100 environ, probablement comme les glutélines du blé ou du maïs (Bonner, 1950) [236]. En fait, parmi les acides aminés libres de l'orge germée, l'acide glutamique ne prédomine pas particulièrement; il est donc employé ou mis en réserve selon des réactions particulières du métabolisme protidique.

Formation d'amides

La germination des graines s'accompagne d'une formation importante d'asparagine et de glutamine, dont une partie provient de l'hydrolyse enzymatique des réserves protéiques de l'endosperme (Chibnall, 1939) [237]. L'origine et le rôle de ces amides sont encore obscurs et ont été l'objet de nombreuses théories.

La formation d'amides dans l'orge a suscité quelques travaux récents (Yemm, 1949, 1950, et Mac Kee, 1950) [238]. La glutamine semble se former dans les conditions normales de croissance de la plante, tandis que l'asparagine, amide plus stable, deviendrait abondante lors d'un jeûne prolongé à l'obscurité; dans ce cas, selon Boussingault (voir Chibnall, loc. cit.) l'accumulation d'asparagine éviterait une intoxication de la plante par l'ammoniaque assimilée en excès.

Mac Kee relève une accumulation d'asparagine et la présence de glutamine dans l'orge, germée vingt jours sur des solutions de sels d'ammonium; par contre, Hoagland (1944, in Yemm, 1949) [239] a trouvé beaucoup de glutamine dans les racines excisées d'orge cultivées sur solution nutritive; ceci est conforme aux observations de Willis (1951) [240].

La chromatographie des dialysats d'orge nous a montré la présence certaine d'asparagine dans l'orge non germée; Mac Leod (1951), LJUNGDAHL et SANDEGREN (1951) [241] y ont aussi trouvé la glutamine.

Pendant la germination, nous avons observé une augmentation continue de l'asparagine et surtout de la glutamine, jusqu'au huitième jour de la germination (Fig. 13); à ce stade, les quantités des deux amides sont sensiblement équivalentes. Dans les radicelles, siège d'une protéosynthèse et d'une respiration actives, nous avons observé une concentration particulièrement élevée de ces deux amides surtout de l'asparagine (Fig. 14, A): ce qui semble s'accorder avec les conditions de « jeûne relatif » imposées à la graine (Yemm, 1949) [242]. Il est évident qu'au germoir, les amides ne proviennent pas d'une synthèse à partir d'éléments minéraux assimilés (nitrates ou sels d'ammonium) comme dans les essais de Mac Kee ou de Willis. Pendant la germination de l'orge, il y a donc production d'asparagine et de glutamine en quantités à peu près équivalentes.

La glutamine provient en grande partie de la protéolyse de l'hordéine, car l'acide glutamique, très abondant, doit se trouver sous la forme de son amide comme dans la zéine. Mais il est vraisemblable qu'une certaine proportion d'acide aspartique et d'acide glutamique contribue à la synthèse d'amides correspondantes, grâce à l'apport d'ammoniaque libérée au cours de la protéolyse des réserves. La réaction :

exige 3.460 calories par molécule. Cette énergie est fournie par la respiration par l'intermédiaire de l'adénosine triphosphate (Speck et Elliot, in Rautanen, 1948) [243]. On connait dans l'orge germée une asparaginase (Chibnall et Grown, 1926; in Chibnall, 1939) [244], catalysant la réaction:

Asparagine + H₂O ≠ Acide aspartique + NH₃

Signalons que les amides ne sont pas capables de transamination (Virtanen et Laine, 1938; in Rautanen, 1948) [245].

Enfin, la protéolyse dans la graine s'accompagne d'un métabolisme glucidique intense. La respiration du germe est à l'origine de la production d'acide pyruvique et des autres acides α-cétoniques du cycle de Krebs (Chibnall, Bonner, loc. cit.) [246]. On passe aisément de l'acide α-céto-glutarique à l'acide glutamique en présence d'ammoniaque et de glutamodéhydrase, puis de l'acide glutamique à l'acide aspartique par transamination, et ensuite aux amides correspondantes. Les expériences de Willis (loc. cit.) [247] avec de l'azote lourd N¹⁵ sont une précieuse indication sur cette origine possible de la glutamine. L'énergie libérée par la respiration ne manque pas et elle est, à chaque instant, disponible pour le métabolisme azoté.

Il est évident que la perte d'acides aminés et d'albumine au trempage (Fig. 13 A et B) — l'eau dissolvant une quantité appréciable d'azote soluble (Van Laer, 1942) [248] — doit être compensée par une synthèse d'amino-acides grâce à cette participation du métabolisme glucidique.

En conclusion, il apparait qu'asparagine et glutamine constituent une réserve, un « volant » d'ammoniaque d'acides aminés dicarboxyliques et d'acides α-cétoniques correspondants, dont le rôle capital dans le métabolisme intermédiaire et la protéosynthèse est bien établi (Théorie de Mothes, 1940; in Rautanen, loc. cit. et Archibald, 1945) [249]. La glutamine occuperait de la sorte une position-clé dans les rapports entre métabolisme protidique et métabolisme glucidique.

Désamination oxydative et Transamination

La désamination des acides aminés des plantes est une réaction capitale du métabolisme azoté. Jusqu'à présent, seule une glutamodéhydrase a été identifiée dans les plantes supérieures (Bonner, loc. cit.) [250].

La désamination oxydative de l'acide glutamique procède en deux temps :

Acide glutamique + glutamodéhydrase oxydée

α-iminoglutarique + glutamodéhydrase réduite;

Acide α -iminoglutarique + H₂O \Rightarrow Acide α -cétoglutarique + NH₂.

Cette déhydrase a comme codéhydrase le coenzyme I, qui sert d'accepteur d'hydrogène.

La désamination oxydative établit un équilibre entre NH₃, acides α-cétoniques et acide glutamique. L'excès de coenzyme I, sous sa forme réduite permet la synthèse d'acide glutamique à partir de l'acide α-cétoglutarique provenant du métabolisme glucidique par exemple. L'emploi des isotopes a montré la réalité de cette réaction et les acides dicarboxyliques, principalement l'acide glutamique, sont parmi les premiers produits de synthèse (Mac Vicar et Burris, 1948, in Bonner) [251].

La transamination chez les plantes (Braunstein, 1947) [252] comporte deux réactions bien établies à l'heure actuelle chez les végétaux supérieurs :

- 1º Acide glutamique + acide pyruvique ≠ Acide α-cétoglutarique + Alanine;
- 2º Acide glutamique + acide oxalacétique # Acide α-cétoglutarique + Acide aspartique

Elles sont catalysées par deux glutamoaminophérases différentes.

Léonard et Burris (1947) [253] ont étudié l'activité de la glutamoaminophérase (réaction 2) de plusieurs variétés d'orges américaines. Ce sont les graines en germination et spécialement les radicelles, qui ont la plus grande activité transaminasique. Cette activité croît jusqu'au troisième ou au cinquième jour de germination, puis reste constante.

SMITH et WILLIAMS (1951) [254] ont étudié les phénomènes de transamination dans les embryons de quelques céréales. Au cinquième

jour de germination, l'orge présente une activité transaminasique glutamique-oxalacétique maximum, quinze fois plus grande que celle de l'orge non germée, tandis que l'activité transaminasique glutamique-pyruvique n'est que neuf fois plus élevée. Parmi les céréales, l'orge est la plus riche en glutamo-aminophérase catalysant la réaction 2 de transamination.

Il est intéressant d'observer sur nos chromatogrammes (Fig. 13) jusqu'au maximum de la protéolyse, une augmentation très nette de l'acide aspartique libre, malgré une augmentation parallèle de l'asparagine, ce qui coïnciderait avec une diminution de l'acide glutamique libre. Cette observation serait en accord avec une transamination active, suivant la réaction (2). Les essais de Folkes (1951) [255] auraient montré que l'embryon, sans apport extérieur d'azote, est capable de faire la synthèse d'acide aspartique, d'alanine, de lysine, d'arginine au cours de la germination et, dans une plus faible mesure, de glycocolle, d'isoleucine, de tryptophane et de thréonine. 90 p. 100 de l'azote utilisé dans ces synthèses seraient dérivés de l'acide glutamique, de la glutamine et de la proline. On sait, par l'emploi d'isotopes, que la proline est oxydée in vivo et qu'elle peut donner de l'acide glutamique (Schoenheimer, 1944, in Boulanger, 1949) [256]; comme l'hordéine est assez riche en proline (13 p. 100 de son poids) il v a là une source supplémentaire d'acide dicarboxylique. Jusqu'à présent, aucun enzyme catalysant ces réactions n'a pu être mis en évidence.

Albaum et Cohen (1943) [257] ont suivi l'activité de la glutamo-aminophérase (réaction 2) dans des embryons d'avoine germée à l'obscurité. La transamination devance la protéosynthèse et son intensité ne serait pas liée aux tissus de croissance dans lesquels la protéosynthèse est active, mais à l'activité physiologique des tissus. Il est donc vraisemblable que l'épithélium du scutellum de l'orge germée présente une grande activité de transamination. Smith et Williams (loc. cit.) [258] ont souligné également une production de transaminases plus rapide que la synthèse protéique dans les embryons de céréales germées. Enfin, les travaux récents (Pearsall, 1949) [259] ont mis en évidence un nombre limité et choisi d'amino-acides dans les tissus en état de croissance; l'acide glutamique est toujours présent en quantité prépondérante. L'hordéine, très riche en acide glutamique, constituerait une réserve de cet acide pour les besoins de la transamination.

L'acide α-aminoadipique qui accompagne certaines fractions polypeptidiques est l'homologue supérieur de l'acide glutamique. L'emploi d'isotopes a permis tout récemment de découvrir l'origine de cet aminoacide (Borsook, 1948, in Boulanger, 1949) [260]. L'acide α-aminoadipique prend naissance dans le métabolisme intermédiaire de la lysine, par désamination oxydative au niveau du groupe ε-NH₂; par transamination en présence d'acide pyruvique, cet acide peut conduire à l'alanine. Il est intéressant de signaler la présence de l'acide α-aminoadipique dans une protéine hydrosoluble du grain de maïs; on ne l'a

pas trouvé cependant dans les hydrolysats de zéine et de gliadine (Windsor, 1951) [261].

En conclusion, la transamination fait des acides dicarboxyliques, abondants dans l'orge, le pivot de la synthèse des acides aminés. Selon Braunstein, 50 à 65 p. 100 des acides aminés ont leur azote qui passe par le stade acide glutamique au cours de leur métabolisme. La transamination permettrait un « remaniement » des acides aminés résultant de la protéolyse des réserves de l'endosperme, avant leur intégration dans la protéosynthèse de l'embryon.

Décarboxylation

Dans l'orge germée, la présence d'acide \(\gamma\)-aminobutyrique libre est indiscutable. Durant la germination, la quantité de cet acide croît lentement; dans les radicelles, il devient très abondant et on le retrouve plus tard dans le malt et le moût. Il est difficile de se prononcer sur la signification physiologique de cet acide, récemment découvert dans les végétaux supérieurs.

Beevers (1951) [262] a signalé la présence d'une glutamodécarboxylase dans les radicelles d'orge, à l'exclusion d'une aspartodécarboxylase ou d'autres enzymes analogues. Selon toute vraisemblance, l'acide γ-aminobutyrique de l'orge a son origine dans une décarboxylation de l'acide glutamique, suivant la réaction :

Acide glutamique --> Acide γ-aminobutyrique + CO2

Quel est le sens de cette décarboxylation? Il demeure obscur. L'acide γ-aminobutyrique intervient-il dans le métabolisme intermédiaire des acides aminés selon un processus encore inconnu? On peut formuler une hypothèse proposée dans l'ouvrage de Bonner pour les plantes supérieures et par Boulanger (1951, b) [263], pour le métabolisme cérébral.

Chez les bactéries, les décarboxylases représentent un mécanisme de régulation de l'acidité du milieu et permettent une « résistance à l'acidification ». Ainsi la glutamodécarboxylase de *Cl. Welchii* a un pH optimum d'action inférieur ou égal à 5 ; l'acide glutamique, de pHi 3,22, est transformé par *Cl. Welchii* en acide γ-aminobutyrique, de pHi 7,2 environ, ce qui a pour effet une élévation du pH du milieu.

Or, des expériences de Van Laer et Lombaers (1921) [264], ont montré que le développement d'embryons d'orge, cultivés sur des solutions de saccharose tamponnées à des pH variant de 2 à 10, était maximum dans la zone de pH 5 à 6; des extraits aqueux d'orge germée montrent d'autre part un pH régulièrement voisin de 6, de telle sorte que la germination de l'orge et la vie de l'embyon paraissent incompatibles avec un pH nettement acide.

Pendant la protéolyse « explosive » des premiers jours de germination, une quantité considérable de glutamine et d'acide glutamique

est libérée. Nous avons vu que l'acide glutamique était intégré dans les protéines, transaminé et transformé en amide. Cette dernière transformation est réversible ; elle requiert la présence d'ammoniaque ; comme la graine vit sur elle-même et qu'elle n'a aucun apport extérieur de sels d'ammonium, il est probable que la formation d'amides à partir de l'acide glutamique est limitée à un certain moment par la quantité d'ammoniaque disponible. Il est donc possible que l'excès d'acide glutamique provoque alors l'intervention de la glutamodécarboxylase, afin de maintenir un pH constant voisin de 6 dans la graine et surtout dans le germe. L'augmentation progressive de l'acide γ-aminobutyrique libre au cours du maltage (Fig. 13) se trouverait ainsi expliquée. L'existence d'acide γ-aminobutyrique libre, dans l'orge non germée, peut trouver son origine dans un processus analogue, accompagnant le transfert intensif de l'azote de la plante vers la graine, à la fin de la période végétative.

La présence d'acide γ -aminobutyrique combiné dans les fractions polypeptidiques « acides » est très curieuse ; cet homologue supérieur de la β -alanine serait-il lui aussi, un constituant d'un facteur de croissance analogue à l'acide pantothénique ?

L'absence d'aspartodécarboxylase n'est pas encore rigoureusement démontrée. En effet, la β -alanine est indispensable à la synthèse de l'acide pantothénique (α , γ -dihydroxy β , β '-diméthylbutyryl — β -alanide). Chez les végétaux, la biogénèse du radical α , γ -dihydroxy — β , β '-diméthylbutyrique aurait lieu à partir de la valine et de l'acide aspartique selon Kuhn et Wieland (1942) [265]. On ne voit pas d'autre source possible de β -alanine que la décarboxylation de l'acide aspartique.

Protéosynthèse

A la fin de la germination, le germe a quintuplé son poids. L'embryon contient uniquement des albumines et des globulines, peut-être aussi des glutélines, mais d'une composition chimique toute différente des glutélines de l'endosperme (Rose et Anderson, 1936) [266].

Dans l'embryon, la composition chimique des albumines et des globulines est voisine de celle des protéines correspondantes de l'endosperme (OSBORNE, 1924) [267]; ces protéines sont riches en leucine et en arginine et pauvres en acide glutamique.

La protéolyse des réserves azotées de l'endosperme, le remaniement des acides aminés par désamination-amination et transamination— l'acide glutamique étant le « chef de file » de ce métabolisme—font que le germe édifie ses protéines cytoplasmiques à partir de proportions d'amino-acides différentes de celles qui lui sont fournies. La protéosynthèse n'est donc pas simplement le phénomène inverse de la protéolyse. Elle se réalise selon un processus extrêmement rapide.

La conception du « métabolisme azoté continuel » (« continuing metabolism » de Borsook et Keighley, 1935) [268], peut être appliquée

au métabolisme intense du germe. Un échange incessant — par hydrolyse et synthèse — existe entre les acides aminés de la protéolyse et les protéines « cytoplasmiques » de l'embryon : un équilibre « dynamique » (Schoenheimer, in Boulanger, 1949) [269] est réalisé entre ces aminoacides d'une part, les protéines « de réserve » et les protéines « cytoplasmiques » d'autre part.

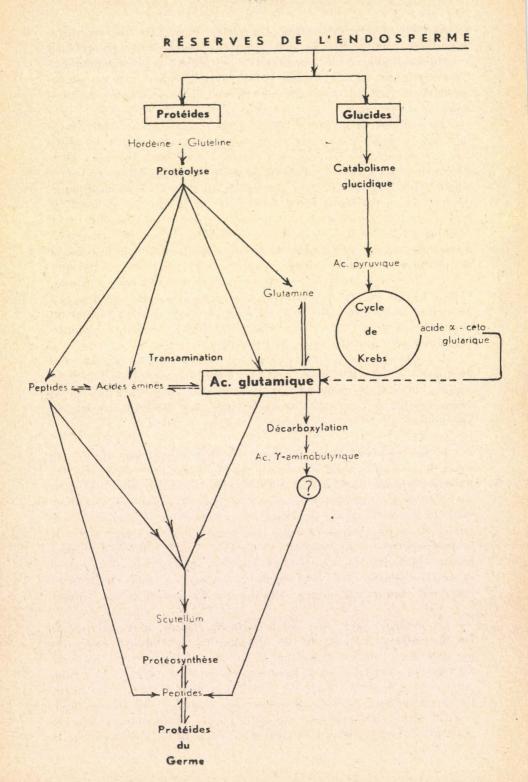
La synthèse de peptides dans le germe ne fait aucun doute, aussi bien dans la plumule que dans les radicelles ; le germe est riche en peptidases et en facteurs de croissance, comme l'acide pantothénique. Dans les fractions III et IV du dialysat de radicelles (Fig. 18) on ne trouve aucun acide diaminé ; le seul témoin en est l'acide α -aminoadipique, produit du métabolisme intermédiaire de la lysine. La richesse en acides dicarboxyliques et en leurs produits de décarboxylation est caractéristique. Elle montre l'importance de l'acide glutamique, provenant de la protéolyse de l'endosperme ou de la transamination dans la synthèse des peptides, et la participation éventuelle de l'acide γ -aminobutyrique.

Les fractions III et IV renferment donc en abondance alanine, valine, leucine et acide glutamique, indispensables à la synthèse des albumines et des globulines de l'embryon. Seule la fraction II contient des acides diaminés et en particulier l'arginine, abondante dans les globulines végétales (BONNER, 1950) [270].

La β-alanine se rencontre dans les hydrolysats des peptides des fractions I et III. Elle entre peut-être dans la constitution d'un petit peptide, et certainement dans celle de l'acide pantothénique. Nous avons résumé, en un tableau schématique, les différents aspects du métabolisme protidique au cours du maltage (p. 104).

Si les transformations des fractions azotées sont importantes au cours de la germination, il n'en est pas de même au touraillage. On n'observe aucune modification notable dans les acides aminés et dans les fractions protéiques plus complexes (albumines, globulines, glutéline). Seule l'hordéine, par son évolution électrophorétique continue, semble l'objet d'une protéolyse favorisée par l'élévation de température de la première partie du touraillage. Certains acides aminés (tyrosine, leucine, phénylalanine) participent sans aucun doute à la formation de « mélanoïdines » ; ces transformations et leurs conditions mériteraient une étude chromatographique détaillée qui n'a pas encore été réalisée.

Le brassage, quelle que soit la méthode utilisée, se caractérise par une dégradation importante des glucides. La protéolyse n'est certes pas négligeable, mais ne revêt pas l'ampleur qu'elle avait au maltage. Au terme du brassage, on se trouve en présence de drêche — à raison. de 20 à 30 kgs en matière sèche pour 100 kgs de malt utilisé — et de moût, La drêche renferme une forte proportion d'azote, 4 p. 100 environ, non solubilisée au brassage; par suite, l'azote du moût ne représente plus que le tiers environ de l'azote total du malt. Les protéines de la



drêche sont constituées probablement par des vestiges de glutéline, d'hordéine, non hydrolysées, d'azote « résiduel » de nature mal précisée et par des albumines et des globulines dénaturées par la chaleur. Il serait intéressant de les étudier systématiquement.

L'extrait sec du moût contient approximativement :

- 90 p. 100 de glucides;
- 5 p. 100 de matières azotées ;
- 3 p. 100 de matières minérales.

Devant la confusion qui règne dans la terminologie en usage pour les fractions de l'azote du moût et l'ignorance actuelle que nous avons de l'origine de la plupart d'entre elles, il est plus prudent de distinguer dans l'azote total du moût, deux fractions, selon la classification que nous avons proposée (voir p. 42). Cette classification, toute provisoire, n'est qu'un instrument de travail.

Nous distinguons dans l'azote total du moût (houblonné ou non). :

- A. Fraction azotée non dialysable.
- B. Fraction azotée dialysable (polypeptides, acides aminés).

Après la protéolyse du brassage, la fraction dialysable du moût représente environ 40 p. 100 de l'azote total.

Dans la fraction A, non dialysable du moût, le précipité obtenu après saturation totale en sulfate d'ammonium, dialysé contre tampon pH 7 et soumis à l'électrophorèse différentielle, se révèle électrophorétiquement hétérogène comme la fraction « albumines-globulines » du malt. Son comportement électrophorétique est assez voisin, mais le composant B', de mobilité faible, est devenu important. Il est difficile de préciser l'identité de ces constituants électrophorétiques.

Les fractions protéiques coagulées à l'ébullition en chaudière, ou précipitées au cours du refroidissement du moût, contiennent une fraction « résiduelle » insoluble, riche en acide glutamique, en alanine et glycocolle, dont il est délicat de préciser l'origine, sans doute multiple.

Il est intéressant de retrouver dans le « trouble fin » une fraction « alcool-soluble », dont l'analogie avec l'hordéine ne laisse aucun doute. Le comportement électrophorétique de cette fraction du « trouble fin » prouve que l'hordéine a subi au brassage une protéolyse active, tout en conservant la même composition en amino-acides, en particulier son taux en acide glutamique, selon la règle du « tout ou rien » de Tiselius. Malgré ses caractères particuliers de solubilité, une faible partie de l'hordéine non hydrolysée peut donc se dissoudre dans le moût chaud contenant des sels minéraux (Bishop, 1928, p. 105) [271]. En résumé, on peut considérer la fraction « alcool-soluble » du « trouble fin » comme le terme ultime de l'évolution de l'hordéine de l'orge au cours du maltage et du brassage.

On admet habituellement une augmentation de l'azote « complexe » du moût (précipité par SO₄Zn, SO₄Mg — « complex nitrogen compounds »

de Bishop, 1951) [272] au brassage (de Clerck, 1948; Hopkins et Krause, 1947) [273]. Cet azote provient surtout de la protéolyse, dans des conditions relativement favorables (50° et 60° C environ), de la fraction « albumines-globulines ». Parmi les produits de dégradation, certains, provenant de l'albumine, ont été mis en évidence dans le moût et la bière. Ils ne sont pas dialysables et sont précipités par le sulfate d'ammonium (Sandegren, 1947) [274]; ces composés ont un poids moléculaire de 5 à 10.000 et ils interviennent favorablement dans la formation et la stabilité de la mousse (Sandegren et Saverborn, 1949) [275]. La 3-globuline, très résistante à la protéolyse du brassage donne également à l'ébullition du moût des produits de décomposition d'un poids moléculaire voisin de 30.000, qui contribuent à la formation du « trouble au froid » (Sandegren, 1947) [276]. Tous ces composés ne sont pas dialysables, en raison de leur poids moléculaire élevé, et ils sont précipités par le sulfate d'ammonium ; ils accompagnent notre fraction A. non dialysable, du moût. Cette fraction renferme donc des constituants azotés — et des polysaccharides — qui ont une grande influence sur les qualités organoleptiques et le « mousseux » de la bière. Nos connaissances sont très limitées sur cette fraction complexe.

Dans la fraction B dialysable du moût, les fractions polypeptidiques que nous avons étudiées ne peuvent être situées exactement dans la classification, d'ailleurs provisoire, de Bishop (1951) [277]. Elles ont une très grande analogie avec les fractions correspondantes du malt ou des radicelles. Elles proviennent soit uniquement du malt (endosperme et embryon) et sont alors le fruit de la protéolyse et de la protéosynthèse pendant la germination, soit également de la protéolyse du brassage. De toute manière, les fractions polypeptidiques « acides » III et IV, par la présence dans leur molécule d'acide γ -aminobutyrique, de β -alanine, d'acide α -aminoadipique, semblent devoir tirer leur origine surtout de la protéosynthèse de l'embryon et non de la protéolyse du brassage. La levure sera capable de transformer ces fractions polypeptidiques au cours de la fermentation (BISERTE et SCRIBAN, non publié).

La fraction « acides aminés — petits peptides » ne subit pas de changements au brassage. L'action des dipeptidases est négligable en raison de la faible teneur du malt touraillé en ces enzymes et des conditions défavorables du brassage (pH acide et température supérieure à 50° C). L'étude de cette fraction est très intéressante pour suivre ultérieurement le métabolisme azoté de la levure (Saccharomyces cerevisiae) pendant les différents stades de la fermentation.

edificação e de la presenta forma de <u>la collidade de la F</u>ederación de la presenta de la collectiva de la Propessa Las partes de la Collectiva de la Collectiv

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

material river and impure resident the med to the street in the

Nous avons décelé dans l'orge, le malt et le moût, la présence de 19 amino-acides libres, d'asparagine, de glutamine, et signalé pour la première fois, la présence d'acide γ-aminobutyrique et d'acide α-aminoadipique *libres*.

Nous avons utilisé une méthode de fractionnement des polypeptides par les résines à échange d'ions (Permutite 50 et Deacidite). Les petits peptides « neutres » (Fraction I) sont rares. D'autres peptides (Fraction II) accompagnent la fraction « glucides libres ». Des polypeptides à caractère « acide » ont été mis en évidence (Fractions III et IV) ; ils se caractérisent par leur richesse en acide glutamique, la présence lans leur molécule d'acide γ -aminobutyrique, de β -alanine, d'acide α -aminoadipique combinés, et l'absence d'acides diaminés.

Il est vraisemblable qu'aux polypeptides « acides » se joint l'acide pantothénique, facteur de croissance indispensable. La présence d'un facteur de croissance nouveau, contenant l'acide γ-aminobutyrique, homologue supérieur de la β-alanine, peut être envisagée.

La chromatographie de partage sur papier nous a permis de suivre l'évolution des différents amino-acides libres et de leurs dérivés au cours du maltage. Le maximum de la protéolyse est atteint au cinquième jour de germination. L'existence d'une protéinase très active, du type catheptase, amène « d'emblée » les molécules de protéines « de réserve » (hordéine et glutéline) à l'état d'amino-acides. Les petits peptides (Fraction I) doivent exister en petite quantité, car ils ne sont pas décelables sur les chromatogrammes. L'acide glutamique, constituant principal de l'hordéine, joue un rôle capital dans le métabolisme protidique de la germination. La protéolyse libère des quantités importantes de cet amino-acide et de son amide, la glutamine. L'acide glutamique et l'ammoniaque peuvent être mis en réserve sous forme de glutamine.

Désamination et transamination réalisent un « remaniement » des acides aminés libérés par la protéolyse des réserves protéiques de l'endosperme. Le groupement — NH2 de la plupart d'entre eux passe probablement par le stade d'acide glutamique, au cours de leur métabolisme intermédiaire, avant leur « intégration » dans la protéosynthèse de l'embryon. Le métabolisme azoté est en relation intime avec le métabolisme glucidique de la respiration.

L'existence d'acide γ-aminobutyrique libre et d'une glutamodécarboxylase laisse supposer un mécanisme de « résistance à l'acidification ». Il serait mis en jeu, au cours de la germination, par la libération massive d'acide glutamique dont l'excès subirait une décarboxylation.

La protéosynthèse dans le germe est très active; elle ne consiste pas simplement en un phénomène inverse de la protéolyse. Elle se caractérise par la formation de fractions polypeptidiques « acides ».

Nous avons suivi l'évolution de l'hordéine, principale protéine « de réserve » de l'orge, au cours du maltage et du brassage. Nous avons montré que l'hordéine est une protéine électrophorétiquement hétérogène comme les autres prolamines, zéine et gliadine.

La protéolyse active de l'hordéine est sensiblement conforme à la règle du « tout ou rien » de Tiselius et peut être comparée à l'hydrolyse expérimentale de la zéine étudiée par Laine. La protéinase de l'orge attaque l'une après l'autre les molécules d'hordéine et les amène presque d'emblée au stade d'acides aminés. On ne saisit pas de produits de simplification intermédiaires, ou tout au moins, si ces étapes existent, elles sont franchies très rapidement. L'hordéine non hydrolysée conserve une composition relativement constante en amino-acides. L'évolution continue du comportement électrophorétique de l'hordéine montre que certains constituants sont plus facilement attaqués par l'enzyme protéolytique. La fraction « alcool-soluble » du « trouble fin » peut-être considérée comme le terme ultime de l'évolution de l'hordéine de l'orge au cours du maltage et du brassage.

Les protéines « cytoplasmiques » (albumines et globulines) de l'orge sont électrophorétiquement hétérogènes. Elles conservent une certaine stabilité dans leur comportement électrophorétique au maltage et au brassage, mais doivent être accompagnées de polysaccharides.

En conclusion, les transformations les plus profondes de l'azote protéique de l'orge sont réalisées par les processus de protéolyse et les réactions du métabolisme intermédiaire protidique au cours de la germination; les effets du brassage sont, au contraire, beaucoup plus limités.

The second secon

BIBLIOGRAPHIE

Albaum, H.G. et Cohen, P.P. — J. biol. Chem., 1943, 149, 19 [257]. Allen, R.J.L. — Biochem. J., 1940, 34, 858 [25]. ARCHIBALD, R.M. - Chem. Rev., 1945, 37, 161 [249]. BANG, H. — J. Inst. Brewing, 1930, 36, 381 [73].
BARTON-WRIGHT, E.C. — Eur. Brew. Convention, 1949, tome 1, 19 [194, 195].
BEEVERS, H. — Biochem. J., 1951, 48, 132 [186, 262]. BISERTE, G. et SCRIBAN, R. — Eur. Brew. Convention, 1949, et Petit J. Brass., 1949, nº 2, 246, 414 [30, 32, 34, 134, 164]. BISERTE, G. et SCRIBAN, R. - a: Congr. Intern. techn. et chim. ind. Agric. Compterendu VIIIe Congrès, Bruxelles, 1950, 1, 534 [35, 128, 148, 149, 167]. b: Bull. Soc. Chim. Biol., 1950, 32, 959 [35, 128, 149, 167]. BISERTE, G. et SCRIBAN, R. - a: Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33, 114 [35]. b: Eur. Brew. Convention, 1951 (sous presse) [201]. Візнор, L.R. — J. Inst. Brewing, 1928, 34, 101, [17, 21, 26, 42, 44, 49, 52, 57, 61, 71, 75, 109, 115, 124, 271]. Bishop, L.R. — **a**: *J. Inst. Brewing*, 1929, **35**, 316 [17, 21, 75]. — **b**: *J. Inst. Brewing*, 1929, **35**, 323 [20, 205, 207, 213, 214]. BISHOP, L.R. — J. Inst. Brewing, 1944, 50, 224 [95].
BISHOP, L.R. — J. Inst. Brewing, 1949, 55, 147 [102].
BISHOP, L.R. — Wallerstein Lab. Commun., 1951, 14, 7 [95,102, 193, 272, 277].
BLOCK, R.J. — J. dairy Sci., 1951, 34, 1 [203].
BONNER, J. — Plant Biochemistry, Academic Press Ed., New-York, 1950 [89, 111, 140, 231, 236, 246, 250, 251, 270]. Borsook, H. et Keighley, G.L. - Proc. Roy. Soc. (London), 1935, 118 B. 488 [268]. HOULANGER, P. — Exp. ann. Bioch. méd., 1949, 10, 193 [256, 260, 269].
BOULANGER, P. — a: Exp. ann. Bioch. méd., 1951, 12, 179 [232]. — b: Exp. ann. Bioch. méd., 1951, 13, 119 [189, 263].
BOULANGER P. et BISERTE, G. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1949, 31, 696 [33].
BOULANGER, P. et BISERTE, G. — Exp. ann. Bioch. méd., 1950, 11, 53 [29, 65]. BOULANGER, P., BISERTE, G. et SCRIBAN, R. - Congr. Intern. tech. et chim. ind. agr., Compte-rendu VIIIe Congrès, Bruxelles, 1950, tome II, 38 [36]. BRAUNSTEIN, A.E. — Adv. Prot. Chem., 1947, **3**, 1 [252].
BROWN, H. — J. Inst. Brewing, 1907, **13**, 394 [16, 75, 178].
BROWN, H.T. et Morris, G.H. — J. Chem. Soc., 1890, **57**, 458 [209, 217].
BROWN, H.T., ESCOMBE, F., McMullen, A. et Millart, J.H. — Trans. Guiness Res. Lab., 1906, 1, 166 [181, 210]. Chabot, G.L. — Bull. Ass. anciens élèves Inst. sup. Fermentation, Gand, 1937, 38, 243 [44, 46]. CHABOT, G.L. et GAEREMYNCK, G. - Ann. Soc. Brass. Enseignement Profess., Gand, 1942, 2e Mémoire [51, 62]. CHIBNALL, A.C. - Protein Metabolism in the Plant. Yale Univ. New-Haven, 1939 [237, 244, 246]. Clegg, D.L. — Analyt. Chem., 1950, 22, 48 [66]. Cohn, E.J. — Physiol. Reviews, 1925, 5, 349 [70].

COLVIN, J.R. et McCalla, A.G. — Can. J. Research, 1949, 27 C, 103 [116]. Consden, R., Gordon, A.H. et Martin, A.J.P. — Biochem. J., 1944, 38, 224

CSONKA, F.A. et JONES, D.B. - J. Biol. Chem., 1927, 78, 321 [60, 109].

Consden, R., Gordon, A.H. et Martin, A.J.P. - Biochem. J., 1947, 41, 590

[28, 64].

[31, 68, 199].

CSONKA, F.A. et JONES, D.B. — J. Biol. Chem., 1929, 82, 17 [63, 113, 114]. Gunningham, D.K. et Anderson, J.A. — Cereal Chem., 1950, 27, 344 [117] Damodaran, M., Jaaback, G. et Chibnall, A.C. — Biochem. J., 1932, 26, 1704 [229].

DANIELSSON, C.E. - Biochem. J., 1949, 44, 387 [9, 78].

DANIELSSON, C.E. et SANDEGREN, E. — Acta Chem. Scand., 1947, 1, 917 [81]. DE CLERCK, J. — Cours de Brasserie, tomes 1 et 11, Van Linthout Ed., Louvain, 1948 [4, 273].

ENGEL, Chr., et Heins, J. - Biochem. et Biophys. Acta, 1947, 1, 190. [11,

155, 208, 223].

ENGEL, Chr. et Bretschneider, L.H. — Biochim. et Biophys. Acta, 1947, 1, 357 [220].

EULER, H.V. et Sjoman, B. — Biochem. Z., 1933, 264, 237 [225].

FINK, H. et KUNISCH, G. - Woch. schr. Brau., 1937, 54, 193-305 et 365 [22]. FOLKES, B.F. - Biochem. J., 1951, 49, XXVII [255].

FOLKES, B.F. — Biochem. J., 1951, 48, 1411 [105].

FOSTER, J.F. — J. Phys. Colloid. Chem., 1949, 53, 175 [118].

FOSTER, J.F., YANG, J.T. et YUI, N.Y. — Cereal Chem., 1950, 27, 477 [119].

GALE, E.F. — Biochem. J., 1945, 39, 46 [55, 141].

Guilliermond, A. et Mangenot, G. — Précis de Biologie Végétale, Masson, éd. Paris, 1941 [10, 154].

Hartong, B.-D. — Woch. schr. Brau., 1937, 54, 33 [96, 103, 130].

Hashitani, Y. — J. Coll. agr. Hokkaido Imp. Univ., 1924, 14, 1 [180].

HASSE et Schumacher. — Chem. Ber., 1950, 83, 68 [187].
HOPKINS, R.H. — Biochem., J. 1929, 23, 1022 [221].
HOPKINS, R.H., AMPHLETT, P.H. et BERRIDGE, N.T. — J. Inst. Brewing, 1941, 47, 10 [96].

HOPKINS, R.H. et BERRIDGE, N.T. - J. Inst. Brewing, 1949, 55, 306 [96]. HOPKINS, R.H. et KRAUSE, B. - Biochemistry applied to Malting and Brewing,

Allen and Unwin, Ed., Londres, 1947 [1, 8, 214, 273].

HORNING, E.S. et Petrie, A.H.K. — Proc. Roy. Soc. (London) 1927, 102 B,

188 [219]. Hubbart, J.E., Hall, H.H. et Earle, F.R. — Cereal Chem., 1950, 27, 415 [183, 191].

HULME, A.C. et ARTHINGTON, W. - Nature (London) 1950, 165, 716 [37, 169]. JACOBS, M.B. - The Chemistry and Technology of Food, Interscience Publ., New-York, 1944 [4].

JENSEN, R. - 1951 (sous presse) [88, 94].

JOHNSTON, J.H.St. - J. Inst. Brewing, 1948, 54, 305 [96, 102, 104, 106, 132, 158, 1617

JOHNSTON, J.H.St. - J. Inst. Brewing, 1950, 56, 232 [132].

Kent, N. et Macheboeuf, M. — Eur. Brew. Convention, 1949, tome 1, 1 [42, 86, 135]. Kraft, W. — Z. g. Brauwesen, 1910, 16, 193 [123, 144].

Krejci, L. et Svedberg, T. — J. Am. Chem. Soc., 1935, 57, 946 [151]. Kuhn, R. et Wieland, T.H. — Ber. Chem. Ges., 1942, 75, 121 [265].

LAINE, T.A. - Ann. Acad. Sci. Fennicae, Ser. A., 1944, no 1-12, 1 [138, 228].

LAWS, D.W. et France, W.G. — Cereal Chem., 1948, 25, 231 [146].

LEONARD, M.J.K. et Burris, R.H. — J. Biol. Chem., 1947, 170, 701 [253].

LINDERSTROM-LANG, K. et SATO, M. — Compte-rend. trav. Lab. Carlsberg. Sér.

chim., 1929, 17, 1 [222].

LINDERSTROM-LANG, K. et HOLTER, H. — Compte-rend. Trav. Lab. Carlsberg.

Sér. chim., 1932, 19, 1 [13, 225].

LJUNGDAHL, L. et SANDEGREN, E. — Acta Chem. Scand., 1950, 4, 1150 [165]

176, 178, 194, 241].

Luers, H. — Biochem. Z., 1919, 96, 116 [123, 234]. Luers, H. — Biochem. Z., 1922, 133, 603 [123, 163].

Luers, H. — a: Die Proteine im Werdegang des Bieres, Verlag Hans Carl, Nurnberg, 1949 [8, 129, 179]. — b: Brewers Digest, 1949, 24, 41 [177]. Luers, H. et Geiger, O. — Woch. schr. Brau., 1935, 52, 193 [53]. Luers, H. et Wiedemann, C. — Z. g. Brauwesen, 1924, 6, 33 [129, 157,

160, 1637. Lugg, J.H.W. - Adv. Prot. Chem., 1949, 5, 229 [120].

LUNDIN, H. - Eur. Brew. Convention, 1949, tome II, 229 [83].

MAC KEE, H.S. — Aust. J. Sci. Res., 1950, **3 B**, 474 [238]. MAC LEOD, A.M. — J. Inst. Brewing, 1951, **57**, 163 [165, 241]. MASSART, L. - Fermentatio, 1946, no 1-3, 1 et no 4-6, 23 [12, 22, 175, 226]. MIETTINEN, J.K. - Acta Chem. Scand., 1951, 5, 962 [204]. MIRETTINEN, J.R. — Acta Chem. Scand., 1951, 5, 962 [204].

MONTREUIL, J. et Scriban, R. — a: Petit J. Brass., 1951, no 2, 345, 373.

b: Petit J. Brass., 1951, no 2, 360, 671 [3, 39, 172, 202].

MORITZ, F.E.B. et FULLER, D.H.F. — J. Inst. Brewing, 1926, 32, 269 [174].

NAKASHIMA, R. — In Ber. Ges. Physiol., 1926, 37, 76 et 1928, 44, 31 [230].

NORRIS, F.W. — Wallerstein Lab. Commun., 1950, 13, 141 [6, 183, 192].

OSBORNE, T.B. — J. Am. Chem. Soc., 1895, 17, 539 [14, 41, 48, 59, 121].

OSBORNE, T.B. — The Vegetable Proteins, Longmans Green et Co, éd., Londres 1924 [51, 137, 139, 267]. OSBORNE, T.B. et CAMPBELL, G.F. - J. Am. Chem. Soc., 1896, 18, 542 [15, 19, 75, 121]. ORNE, T.B. et Clapp, S.H. — Am. J. Physiol., 1907, 19, 117 [56, 122, 136, OSBORNE, T.B. 143, 159]. OSBORNE, T.B. et GILBERT, R.D. — Am. J. Physiol., 1906, 15, 333 [122, 235]. OSTEUX, R. - L'acide D-glutamique des protéines des tissus sains et néoplasiques. Thèse, Lille, 1951 [142]. PARTRIDGE, S.M. — Biochem, J., 1948, 42, 238 [38, 67, 171].

PARTRIDGE, S.M. et Brimley, R.C. — Biochem. J., 1949, 44, 513 [40, 198].

PÉARSALL, W.H. — Endeavour, 1949, 8, 99 [259].

PETT, L.B. — Biochem. J., 1935, 21, 1898 [13]. PREECE, I.A. et Ashworth, A.S. — J. Inst. Brewing, 1950, 56, 33 [2]. QUENSEL, O. - 1941, non publié [80]. Quensel, O. - Inaugural Dissertation, Uppsala, 1942 [24, 43, 77, 82, 91]. QUENSEL, O. et SVEDBERG, T. - Compte-rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim., 1937, 22, 441 [47, 76, 85, 90, 97, 126, 150]. RAOUL, Y. - Ann. Fermentations, 1937, 3, 129-193 et 385 [182] RAUTANEN, N. — Ann. Acad. Sci. Fennicae, Sér. A, 1948, nº 33, 1 [243, 245, 249]. REED, H.S. — Ann. Botany, 1904, 18, 267 [218]. Rose, R.C. et Anderson, J.A. — Can. J. Research, 1936, 14 G, 109 [50, 58, 72, 185, 212, 266].
SANDEGREN, E. — Eur. Brew. Convention, 1947, tome 1, 28 [79, 93, 99, 101, 107, 206, 274, 276]. Sandegren, E. — J. Inst. Brewing, 1948, 54, 200 [5]. Sandegren, E. - Eur. Brew. Convention, 1949, tome 1, 78 [45, 87, 100, 107, 108]. Sandegren, E. et Saverborn, S. — Rev. Intern. Brass. Malt., 1949, nº 1 et 2, 37 [101, 197, 275]. Sandegren, E., Suominen, H.S. et Ekstrom, D. — Acta Chem. Scand., 1949, 3, 1027 [87, 92]. SATO, M. - Compte-rend. trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim., 1931, 19, 1 [224]. SAVERBORN, S., DANIELSSON, C.E. et SVEDBERG, T. - Svensk. Kem. Tid., 1944, 56, 75 [9, 78, 84, 98, 105, 206]. SCALLET, B.L. — J. Am. Chem. Soc., 1947, 69, 1602 [147]. SCHADE, A.L. - Commun. Sc. Practice Brewing, Wallerstein Lab., 1937, 1, 13 [223]. Schild, E. — Woch. schr. Brau., 1935, 52, 321 [173, 174]. Schjerning, H. — Compte-rend. trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim., 1914, 11, 45 [75], SCHWERT, G.W., PUTNAN, F.W. et BRIGGS, O.R. — Arch. Biochem., 1944, 4. 371, [146].
SCRIBAN, R. — Brasserie, 1949, 31, 83 et Ind. agric. et alim., 1949, nº 3-4, 133 [23, 73].

Scriban, R. — Bull. Soc. Bot, Nord, 1949, 2, 116 [110]. Scriban, R. — Brasserie, 1950, 43, 121 [54, 133, 162].

SMITH, B.P. et WILLIAMS, H.H. — Arch. Biochem., 1951, 31, 366 [254, 258] STEWARD, F.C., THOMPSTON, J.F. et DENT, C.E. — Science, 1949, 110, 439 [168].

SWYNGEDAUW, J. et MASSE, L. — Compte-rend. Acad. Sciences, 1945, 222, 517 [69].

SYNGE, R.L.M. - Biochem, J., 1951, 48, 429 [188].

TAKAHASHI, E. et SHIRAHAMA, K. - J. Faculty Agr. Hokkaido Imp. Univ., 1927

21, 43 [49, 125].

Takahashi, E. et Shirahama, K. — J. Faculty Agr. Hokkaido Imp. Univ., 1927
21, 43 [49, 125].

Takahashi, E. et Shirahama, K. — J. Faculty Agr. Hokkaido Imp. Univ., 1931-1932, 30, 119 [22, 125, 145, 153, 233, 234].

Thomas, P. — Manuel de Biochimie, Masson, éd., Paris, 1946 [112, 140].

Thorne, R.S.W. — Wallerstein Lab. Commun., 1950, 13, 319 [195, 196].

Tiselius, A. et Eriksson-Quensel, I.B. — Biochem. J., 1939, 33, 1752 [227]

Urion, E. et Golovtschenko, V. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1940, 22, 203 [73].

Urion, E. et Lejeune, G. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1940, 22, 214 [40, 75].

Urion, E., Lejeune, G. et Colovtschenko, V. — a: Bull. Soc. Chim. Biol., 1944, 26, 221 et 303 [74].

1944, 26, 221 et 303 [74]. URION, E., LEJEUNE, G. et COLLIN, M. — b : Bull. Soc. Chim. Biol., 1944, 26, 310 [74].

URION, E., LEJEUNE, G. et THIEC, J. - c: Bull. Soc. Chim. Biol., 1944, 26, 316 [44, 74]. VAN LAER, M.H. — La Chimie des fermentations, Masson, éd., Paris, 1942

[7, 131, 156, 184, 215, 216, 248].

VAN LAER, M.H. et LOMBAERS, R. - Compte-rend. Soc. Biol., 1921, 85, 1115 [264]. Wallis, R.G. - Congr. int. tech. et chim. ind. agr., Compte-rend. VIIIe Con-

grès, Bruxelles, 1950, tome 1, 535 [127].

Wallis, R.G. — J. Inst. Brewing, 1951, 57, 86, [127].

Watson, C.G., Arrhenius, S. et Williams, J.W. —
137, 322 [152]. - Nature (London), 1936,

WESTALL, R.G. — Biochem. J., 1948, 42, 249 [27].
WESTALL, R.G. — Nature (London), 1950, 165, 717 [170].
WILLIS, A.J. — Biochem. J., 1951, 49, xxvII [190, 211, 240, 247].
WINDSOR, E. — J. Biol. Chem., 1951, 192, 595 [166, 200, 261].
YEMM, E.W. — New Phytologist, 1949, 48, 315 [238, 239, 242].
YEMM, E.W. — Proc. Royal Soc. (London), 1950, 186 B, 632, [238].

SECONDE THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

- I. LES FAILLES ÉPICRÉTACÉES DE L'ARTOIS.
- II. LES MIGRATIONS DES POISSONS.

Vu et approuvé : Lille, le 6 Décembre 1951 Le Doyen :

H. LEFEBVRE.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER : Lille, le 6 Décembre 1951 Le Recteur de l'Académie de Lille : M. SOURIAU.