

N° d'ordre : 931

50376

1981

178

UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE I

50376

1981

178

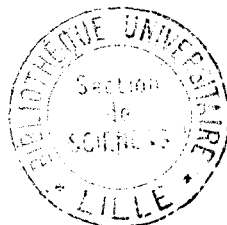
T H E S E

présentée
pour obtenir
le titre de Docteur 3ème Cycle
en BIOCHIMIE APPLIQUEE

par

Gérard CUVELLIER

ETUDES SUR L'EAU DE TREMPE EN MALTERIE : MISE AU POINT D'UN TRAITEMENT PHYSICO-CHIMIQUE D'EPURATION ET RECHERCHE SUR LES INHIBITEURS DE CROISSANCE DE L'ORGE



Soutenu le Vendredi 20 Novembre 1981, devant la Commission d'Examen

Président : J. MONTREUIL

Rapporteur : R. SCRIBAN

Examineur : J. VASSEUR

Invité : R. LAVARDE

AVANT-PROPOS

Il nous est particulièrement agréable de trouver ici une occasion d'exprimer notre profond respect et notre gratitude à Monsieur René SCRIBAN, Professeur, titulaire de la Chaire de Malterie-Brasserie, Eaux et Boissons Gazeuses à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires (ENSIA) (Département de Biotechnologie) à Douai.

Nous ne saurions lui exprimer assez notre reconnaissance pour avoir facilité notre tâche en nous prodiguant ses conseils judicieux et nous avoir fait bénéficier de ses enseignements, de son expérience et de son admirable esprit d'organisation.

Nous adressons toute notre gratitude à Monsieur Jean MONTREUIL, Professeur de Chimie Biologique à la Faculté des Sciences et Techniques de Lille pour son enseignement et les encouragements qu'il nous a dispensés et l'honneur qu'il nous fait en acceptant la présidence de ce Jury.

Notre reconnaissance s'adresse également à Messieurs J. VASSEUR, Docteur ès Sciences au Laboratoire de physiologie végétale de l'USTL et R. LAVARDE, Ingénieur à l'Agence de Bassin Artois-Picardie, qui nous font l'honneur de juger ce travail.

Nous remercions Monsieur Max BENARD, Chef du Laboratoire de contrôle et de recherche à l'ENSIA, des conseils qu'il nous a prodigués et des discussions fructueuses que nous avons eues.

Nous tenons à exprimer nos remerciements :

- à Monsieur DUBUIS du Ministère de l'Environnement ;
- à Monsieur VERNIER, Directeur de l'Agence de Bassin Artois-Picardie ;
- à Monsieur MICHELON de l'Agence Nationale pour la Valorisation de la Recherche, à Lille.

pour l'intérêt qu'ils portent à nos travaux

- à Monsieur TREYSSAC, Directeur Général de la Société ERPAC,
Messieurs OGER et CHEVALLOT pour leur collaboration lors de l'étude des
traitements de l'eau ;

- à la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et
Technique pour son appui financier.

Que soient également remerciées, Madame PRINGUET pour sa
collaboration efficace lors des dosages en chromatographie liquide haute
performance, Madame SLOMOWICZ et Madame CARLIER qui a réalisé l'impression
de ce Mémoire avec sa minutie habituelle.

P L A N

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION	
GENERALITES	3
1 - L'ORGE : ESPECES ET ANATOMIE	4
1.1. LES ENVELOPPES	5
1.2. L'ALBUMEN	6
1.3. L'EMBRYON	6
2 - LES DIFFERENTES ETAPES DE LA MALTERIE	6
2.1. LE TREMPAGE	6
2.2. LA GERMINATION	7
2.3. LE TOURAILLAGE	7
3 - ORIGINE DE LA POLLUTION DE L'EAU	8
4 - L'EPURATION BIOLOGIQUE	9
5 - L'EPURATION PHYSICO-CHIMIQUE	10

PREMIERE PARTIE :

MISE AU POINT D'UN TRAITEMENT D'EPURATION PHYSICO-CHIMIQUE

1 - PARAMETRES DE MESURE	12
--------------------------	----

1.1. LES MATIERES EN SUSPENSION	12
1.2. LES MATIERES OXYDABLES	12
1.3. AUTRES PARAMETRES	12
 2 - RESULTATS	 13
2.1. PREMIERS ESSAIS	13
2.2. ESSAIS COMPLEMENTAIRES	18
 3 - CONCLUSIONS	 29

DEUXIEME PARTIE :

LA RECHERCHE DES INHIBITEURS DE GERMINATION
DANS L'EAU DE TREMPE ET L'ORGE

1 - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES PRINCIPAUX INHIBITEURS	32
2 - LES ACIDES PHENOLIQUES	38
2.1. MATERIEL ET METHODES	40
2.1.1. <i>Choix de la technique d'analyse et recherche d'un programme d'élution</i>	41
2.1.2. <i>Extraction des acides phénoliques</i>	47
2.1.2.1. <i>Extraction à l'acétate d'éthyle</i>	48
2.1.2.2. <i>La démixtion</i>	48
2.1.2.3. <i>Comparaison des deux techniques</i>	48
2.1.2.4. <i>Méthode définitive</i>	53
2.1.3. <i>Répétabilité et étalonnage</i>	54
2.2. RESULTATS	59
2.3. DISCUSSION - CONCLUSION	71

TROISIEME PARTIE :

RELATION ENTRE ACIDES PHENOLIQUES - PHYTOHORMONES ET DORMANCE

1 - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	77
1.1. DEFINITIONS	77
1.2. ACIDE ABSCISSIQUE	79
1.3. ACIDE β INDOLYL ACETIQUE	83
2 - DOSAGE DES ACIDES ABSCISSIQUE ET β INDOLYL ACETIQUE	85
2.1. MATERIEL ET METHODES	86
2.1.1. <i>Programme d'élution</i>	86
2.1.2. <i>Extraction des phytohormones</i>	89
2.1.3. <i>Etude de la répétabilité</i>	92
2.2. DOSAGE DANS LES EAUX DE TREMPE	93
2.3. L'ACIDE ABSCISSIQUE INHIBITEUR DE GERMINATION	97
3 - DISCUSSION - CONCLUSION	99
3.1. AMELIORATION DE L'EXTRACTION	99
3.2. LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE, ETAPE INTERMEDIAIRE	100
3.3. DOSAGE DE L'ACIDE ABSCISSIQUE DANS L'ORGE	101
CONCLUSIONS GENERALES	107
ANNEXES	110
BIBLIOGRAPHIE	119

INTRODUCTION

Dans le cadre des activités de recherches de la Chaire de Malterie-Brasserie à l'ENSIA, une série d'études a été entreprise depuis 1977 sur le thème général du recyclage des eaux de trempes en malterie.

Si le problème de l'alimentation en eau de son usine a toujours préoccupé le malteur, qu'il s'agisse de la qualité ou de la quantité, le problème des eaux résiduaires, de leur traitement et l'étude de leur recyclage a été abordé plus récemment. Généralement, les eaux résiduaires rejoignent la rivière, ou se mêlaient plus anonymement aux effluents urbains (LAVARDE, 1978). Le nombre restreint de publications scientifiques et techniques comportant une étude détaillée et surtout quantitative des composants de l'eau de trempes et de son pouvoir inhibiteur sur l'embryon de l'orge témoigne du peu d'intérêt porté jusqu'à présent à ces problèmes.

L'eau et l'énergie sont devenues, au seuil de la nouvelle décennie deux préoccupations importantes pour l'industriel. Un effort important pour la préservation du milieu est en cours, mais même si les eaux de forage demeurent les plus intéressantes sur le plan industriel, certaines eaux utilisées comme matière première pour la fabrication de produits élaborés nécessitent des traitements de préparation poussés (BOULENGER, 1980).

Les différentes activités humaines qui utilisent l'eau la rejettent après usage, modifiée dans son état physique et chimique, chargée de diverses substances qui la rendent plus ou moins impropre à d'autres usages et perturbent le milieu naturel (LAVARDE, 1980). Un des problèmes les plus importants créés par la pollution est la diminution du taux d'oxygène dans les rivières, ce qui nuit à la vie. Ceci s'explique par le fait que les matières rejetées s'oxydent et que des microorganismes se nourrissant des déchets consomment de l'oxygène (ZAUCHE, 1981). Il est très rare qu'une pollution ait pour origine l'intention de nuire. La pollution vient essentiellement de ce que l'éviter coûte cher ; qu'il s'agisse d'un coût d'attention ou d'un coût financier. Les Agences de Bassin ont une politique de promotion de la lutte contre la pollution par une incitation financière "*qui pollue paie*". Des redevances calculées sur les flux de pollution rejetés et sur les volumes d'eau prélevés sont versées aux agences ; le produit de ces redevances aidant industriels et collectivités locales à mettre en place des installations de lutte contre la pollution et d'économies d'eau.

Le suivi de la qualité des eaux superficielles effectué depuis 1971 a montré que les efforts réalisés pour lutter contre la pollution représentée par les matières oxydables, en suspension et toxiques, commençaient à porter leurs fruits. En règle générale, la teneur en oxygène dissous des rivières s'est accrue depuis 1974, la demande biologique et chimique en oxygène ayant diminué. Il apparaît cependant que pour de nombreuses rivières, les facteurs limitant leur qualité deviennent les composés de l'azote et le phosphore dont les teneurs ont par contre augmenté au cours de cette même période (Anonyme, 1981).

Les mesures prises ont donc permis une réduction notable de la pollution avec le désir dans un second temps de conduire à une économie d'eau par réutilisation éventuelle des eaux épurées.

Le recyclage des eaux résiduaires est possible dans tous les cas où l'eau est utilisée pour le refroidissement, le lavage et lorsque moyennant des dépenses relativement faibles, on peut par un traitement approprié la rendre à nouveau "*propre*" pour l'usage prévu (MEINCK, 1977).

Si on veut recycler l'eau de trempe en malterie, il faut en connaître la composition en ses différents constituants et leur rôle essentiel sur le déroulement de la germination.

La première étape de notre étude consistait à étudier les possibilités de recyclage des eaux de trempe après un traitement de type physico-chimique destiné à réduire autant que possible la quantité de matières organiques présentes dans ces eaux qui, dans l'optique d'un recyclage, pourraient favoriser un développement de microorganismes et à enlever ou neutraliser les inhibiteurs de germination.

La seconde partie de ce travail avait pour but d'isoler et de quantifier dans ces eaux les principaux composés inhibiteurs afin de rendre compte de leur potentiel respectif d'inhibition et de leur devenir pendant le traitement physico-chimique d'épuration.

GENERALITES



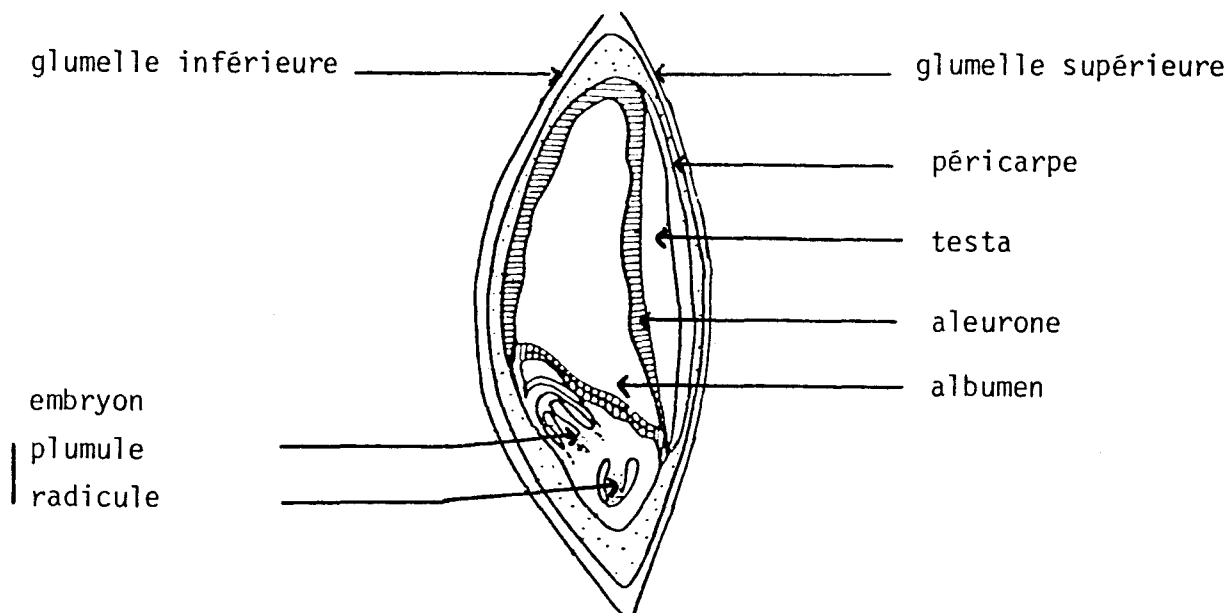
Afin de situer cette étude sur le recyclage des eaux de trempage dans la technologie de la malterie et ses possibles répercussions économiques ; il peut s'avérer utile, en premier lieu de résumer brièvement les différentes étapes qui de l'orge nous conduisent au malt. La malterie est une industrie qui transforme l'orge sélectionnée, aux caractéristiques botaniques, biologiques et biochimiques bien déterminées, en malt ; matière première essentielle dans la fabrication de la bière.

Dans le contexte mondial, la malterie française avec une production de 1 046 610 Tonnes de malt en 1980 (Bios, 1981) se situe au 4ème rang des pays producteurs ; toutefois, par le chiffre de ses exportations, elle est le premier exportateur mondial (748 000 Tonnes, soit 71,5 % de sa production).

1 - L'ORGE : ESPECES ET ANATOMIE

Les orges brassicoles appartiennent essentiellement à deux grandes espèces ; les orges à deux rangs et les orges à six rangs. Les orges à deux rangs sont généralement des orges de printemps (2RP) et les orges à six rangs des orges d'hiver (6RH) mais il existe quelques variétés d'orge à deux rangs d'hiver (2RH) et à six rangs de printemps (6RP) (ROUILLER, 1979). Une des particularités intéressantes de l'orge est d'être un grain vêtu, c'est-à-dire que les glumelles adhèrent au grain et ne s'en séparent pas au battage. Une coupe longitudinale laisse ainsi apparaître trois parties principales :

- les enveloppes ;
- l'albumen ;
- le germe.



Coupe schématique longitudinale
d'un grain d'orge (d'après BISHOP)

1.1. LES ENVELOPPES

Elles sont constituées de plusieurs membranes qui sont de l'extérieur vers l'intérieur :

- les glumelles, adhérentes dans le cas de l'orge ;
- le péricarpe, ces deux enveloppes entourent complètement le grain ;
- le testa qui n'entoure pas le germe et jouera un rôle important à la trempé : c'est un tissu héli-perméable, donc imperméable aux sels en solution dans l'eau.

Ces enveloppes sont nécessaires à la protection de l'embryon pendant la germination et à la filtration suivant l'empâtage au brassage. Elles contiennent cependant des substances qui pourront se révéler nuisibles à la qualité de la bière. HARRIS et RICKETTS (1958) ont extrait surtout à partir du péricarpe un grand nombre de polyphénols et d'acides phénoliques. Ces polyphénols, solubles dans l'eau et les alcalis possèdent des propriétés astringentes et vont jouer un rôle dans le goût et la stabilité colloïdale

de la bière (DE CLERCK, 1962 - VAN CRAENENBROECK, 1981 a, 1981 b - MULKAY, 1981 - ERBER, 1981).

1.2. L'ALBUMEN

Il constitue l'amande ou le noyau. C'est un amas de cellules à parois constituées de glucanes, d'hémicellulose, de polypeptides contenant des grains d'amidon soudés entre eux par un *ciment protéique* assurant la dureté et la compacité du grain.

1.3. L'EMBRYON OU LE GERME

C'est le siège des activités vitales du grain, en particulier grâce aux enzymes.

2 - LES DIFFERENTES ETAPES DE LA MALTERIE

L'orge de sélection récoltée est séchée si nécessaire, de façon à ce que son humidité soit comprise entre 12 et 15 % puis stockée. Après un nettoyage et un calibrage, elle subit successivement :

- une phase de trempage ;
- une phase de germination ;
- un touraillage.

2.1. Le Trempage

L'orge est introduite dans des cuves à fond conique (30-50 T) ou à fond plat (150-200 T), où pendant 50 à 55 heures elle va acquérir une humidité suffisante pour le maltage. Ce trempage amène l'humidité de 12-15 % à environ 45 % ; il ranime l'activité métabolique de l'embryon et de l'assise protéique. La méthode traditionnelle utilisée se caractérise par les points suivants :

- entre 2 renouvellements consécutifs, on laisse le grain sans eau ; c'est-à-dire à découvert ;
- on injecte périodiquement, dans le grain sous eau, de l'air comprimé, de façon à faciliter la respiration par l'apport d'oxygène ;
- on aspire le gaz carbonique issu de la respiration, pendant les périodes à découvert.

Selon la composition saline de l'eau utilisée, la nature et la quantité de substances dissoutes au cours de ce trempage peuvent être très différentes. C'est ainsi que des eaux renfermant du bicarbonate de calcium pourront extraire des enveloppes des substances indésirables tels que les tanins. On utilise généralement 4 à 6 m³ d'eau par tonne d'orge mise en trempage ; une malterie produisant annuellement 60 000 Tonnes de malt consommera donc environ 420 000 m³ d'eau.

2.2. La Germination

Le mécanisme de cette germination industrielle contrôlée est qualitativement identique à celui de la germination naturelle.

On assiste à un développement des activités enzymatiques de l'orge qui opère ainsi sa désagrégation physique et chimique.

La désagrégation physique traduit le changement de structure du grain qui devient friable alors que la désagrégation chimique témoigne des modifications des substrats biochimiques complexes de l'orge. A ce stade le grain est appelé malt vert.

2.3. Le Touraillage

Il a pour but :

- d'amener le malt vert de 45 à 4,5 % d'humidité afin d'assurer sa conservation et son transport ;
- de poursuivre, au début du touraillage la désagrégation en favorisant l'action des enzymes en milieu peu hydraté (glucanases, protéases, amylases) ;

- d'aromatiser le malt et de fixer sa couleur (formation de mélanoidines).

Le touraillage dure en moyenne 20 à 22 heures (touraille à 1 plateau) ou 44 heures (touraille à 2 plateaux).

3 - ORIGINE DE LA POLLUTION DE L'EAU

Le grain trié est trempé (en plusieurs trempes) pour lui faire absorber de l'eau ; ces diverses eaux de trempes étant rejetées sauf la dernière qui peut servir au "décuvage", c'est-à-dire à l'entraînement vers les aires de germination. Les effluents proviennent donc essentiellement du trempage (vidange des cuves) et sont produits de manière intermittente ; la présence de plusieurs cuves de trempage peut cependant atténuer ce phénomène. L'eau est destinée avant tout à être absorbée par l'orge, on pouvait donc théoriquement envisager la suppression des rejets en n'apportant au grain que la quantité d'eau strictement nécessaire à sa germination et ceci en réalisant une aspersion des grains et non plus un trempage. Il convient alors de remarquer que dans ce cas, les composants de l'orge qui se sont solubilisés subsistent sur l'enveloppe du grain, or il est maintenant admis que si lors du trempage l'eau apporte au grain l'humidité qui doit déclencher la germination, elle sert aussi à extraire des substances qui empêchent la germination de se dérouler normalement (COOK, 1952 a).

Ce procédé ne peut alors être utilisé qu'avec une aspersion excédentaire qui conduit à une réduction de moitié de la pollution (LAVARDE, 1980 b) mais risque d'entraîner des irrégularités de germination avec pour conséquences des défauts d'homogénéité du malt préjudiciables à son utilisation en brasserie et donc à sa commercialisation.

De très nombreux pays exigent désormais que les effluents industriels, notamment les eaux de trempes de malteries, soient traités avant le rejet à la rivière (REYNOLDS, 1966). Cette importance grandissante des charges liées aux eaux résiduaires, le coût de l'eau, expliquent que le recyclage de l'eau, lorsqu'il est possible devient de plus en plus intéressant à condition toutefois qu'il ne présente pas de risque pour la qualité du produit fini : les différents impératifs impliquent d'étudier les moyens industriels et économiques

d'épuration de l'eau mais aussi de tester son pouvoir inhibiteur rémanent qui interdirait son recyclage.

Mis à part le problème d'une irrégularité de rejets qui nécessite l'installation de capacité tampon, on peut considérer que les effluents de malterie se caractérisent par une absence presque totale d'éléments minéraux toxiques, une présence de matières organiques et une forte proportion d'éléments biodégradables s'épurant facilement par les procédés traditionnels (LAVARDE, 1980 b).

Le but étant de réaliser un recyclage des eaux, il est nécessaire de déterminer les répercussions du procédé d'épuration choisi (biologique ou physico-chimique) sur la physiologie du grain d'orge et notamment sur ses aptitudes à la germination industrielle puis sur la qualité brassicole du malt ainsi obtenu.

4 - L'ÉPURATION BIOLOGIQUE

Sur le plan technique, il est actuellement possible de répondre pratiquement à toutes les exigences qui pourraient être formulées quant au degré d'épuration des eaux rejetées dans le milieu. Sur le plan pratique, certaines options particulièrement coûteuses réduisent les choix disponibles.

Le traitement biologique des eaux résiduelles consiste à faire dégrader la pollution organique par des bactéries et à séparer ensuite celles-ci de l'eau ainsi épurée. Le problème du recyclage des eaux de trempes épurées biologiquement a fait l'objet d'une première étude (CUELLIER, 1980). Les recyclages qui étaient effectifs dans une malterie et avaient été testés dans un autre établissement à un taux de 30 puis de 45 % n'ont pas semblé poser de problèmes particuliers, tant au niveau de la vitesse de piquage du grain d'orge que de la qualité finale du malt. Les mesures réalisées ont cependant mis en évidence la grande variabilité des rejets liée aux vidanges des trempes successives mais aussi aux différentes variétés et provenances d'orges utilisées.

4 - L'EPURATION PHYSICO-CHIMIQUE

Pour permettre la séparation d'une suspension colloïdale dans des conditions de vitesse satisfaisante, sous l'influence de la pesanteur, il est nécessaire de rassembler les colloïdes pour constituer des particules nettement plus importantes.

La transformation de la suspension par des moyens artificiels est la résultante de deux actions différentes et complémentaires :

- une coagulation qui correspond à une déstabilisation des particules colloïdales obtenues par neutralisation des charges le plus souvent négatives (DEGREMONT, 1978 ; LE GRAND L., 1976) réparties à leur surface. Le produit utilisé est appelé coagulant.

- une agglomération des particules "déchargées" mises en contact les unes avec les autres constituant la floculation qui conduit à la formation de flocons ou flocs, capables d'être séparés dans une phase ultérieure du traitement. Les produits favorisant la formation du floc sont les flocculants. La floculation est d'autant meilleure que la coagulation préalable a été efficace.

La séparation solide-liquide du floc formé et de l'eau peut se faire par filtration, par flottation ou par simple décantation. La flottation peut être naturelle ou provoquée et provenir alors de la fixation artificielle de bulles d'air aux particules à éliminer, leur donnant ainsi, une masse volumique moyenne inférieure à celle de l'eau.

Aucune règle ne permet de prévoir quel coagulant, flocculant ou quelle association donnera le meilleur résultat et il est toujours nécessaire de procéder à différents essais en laboratoire.

PREMIERE PARTIE :

MISE AU POINT D'UN TRAITEMENT
D'EPURATION PHYSICO-CHIMIQUE

*Nul ne connaît la valeur de l'eau
jusqu'à ce que le puits tarisse*

B. FRANKLIN

La mise au point d'un traitement physico-chimique ne peut se faire que par l'essai de différents coagulants, flocculants, de leur association sur les effluents à traiter et l'observation des résultats obtenus sur les différents paramètres dont la mesure permet de caractériser le niveau de pollution et l'efficacité de l'épuration.

1 - PARAMETRES DE MESURE

1.1. MESURE DES MATIERES EN SUSPENSION

Les matières décantables sont celles qui se déposent dans un liquide au repos pendant un temps conventionnellement fixé à 2 heures. Les matières totales en suspension (MES) sont déterminées par filtration sur disque en fibre de verre Whatman GF/C et séchage à 105°C jusqu'à poids constant.

1.2. LES MATIERES OXYDABLES

On dose la quantité d'oxygène dissous nécessaire pour oxyder chimiquement toute la matière polluante contenue dans l'eau. L'oxydation au dichromate de potassium en milieu sulfurique permet de chiffrer la demande chimique en oxygène (DCO) qui représente la quantité d'oxygène en mg. l^{-1} nécessaire pour oxyder les matières organiques, les sels minéraux oxydables de l'échantillon. Elle est déterminée par la méthode normalisée AFNOR NF. T 90.101 (annexe n°1).

La mesure de l'oxydation des seules matières organiques biodégradables est donnée par la quantité d'oxygène consommée à 20°C, à l'obscurité pendant 5 jours ; c'est la demande biologique en oxygène (DBO_5). Bien que les eaux de trempes contiennent des microorganismes, toutes les mesures ont été effectuées après ensemencement des effluents par des bactéries.

1.3. AUTRES PARAMETRES

Une taxation de l'azote organique et du phosphore rejetés par les

effluents industriels est en cours d'élaboration, les composés phosphorés, l'azote total et les nitrates ont fait l'objet de détermination.

Ces données analytiques permettant d'évaluer la pollution de l'eau ont été complétées par le dosage du calcium, magnésium, des chlorures, sulfates et des composés phénoliques totaux.

L'action des inhibiteurs présents dans l'eau de trempage a été visualisée par des tests de germination (COOK, 1952 b) réalisés d'abord sur des semences de laitues puis sur de l'orge.

Nous avons utilisé les semences de laitue qui germent dans nos conditions opératoires (Annexe n° 2) en 42 heures et permettent d'extrapoler à l'orge puisqu'il a été constaté que (VAN LAER, 1947) :

- . les substances de l'orge peuvent inhiber sa propre germination ;
- . la germination de l'orge est ralentie par des substances provenant d'autres semences ;
- . l'orge elle-même contient des substances qui peuvent arrêter la germination et la croissance d'autres plantes.

2 - RESULTATS

2.1. PREMIERS ESSAIS

Dans le but de tester les différents traitements, la quasi totalité des manipulations se sont effectuées sur place, dans la malterie, sur des eaux de première trempage qui sont les plus sales et d'odeur désagréable ; et sur les eaux de deuxième trempage.

L'efficacité d'un grand nombre de traitements de coagulation - flottation faisant appels à des réactifs divers dont :

- les polyélectrolytes (utilisés seuls ou par deux) ;
- l'acide sulfurique ou phosphorique, suivi d'une floculation au polyélectrolyte ;
- la chaux ;
- les tripoly et hexamétaphosphates ;

- les lignosulfites ;
- les sels de fer et d'aluminium

a été étudiée sur les eaux de première et deuxième trempe d'orge Sonja (2RH). Les différents traitements ont été appliqués, à des concentrations variables à 3 échantillons de 1ère trempe et deux prélèvements de 2ème trempe (Tableaux I A et I B).

En complément, des tests ont été réalisés, pour évaluer l'incidence d'un traitement complémentaire au charbon actif et de la recirculation d'une fraction des boues. Dans tous les cas, en raison de la structure et des propriétés des flocons formés, la clarification s'est faite par aéroflottation à l'air dissous.

Seule l'utilisation de sulfate d'alumine ou de chlorure ferrique, complétée par de la chaux et un polyélectrolyte, a permis d'obtenir une floculation satisfaisante et reproductible, conduisant à la formation de flocons bien formés et se séparant facilement par aéroflottation.

Les meilleurs résultats, sur le plan de l'élimination des matières organiques, ont été obtenus dans les conditions suivantes :

- sulfate d'alumine ou chlorure ferrique aux doses respectives de : 2 000 et 1 500 ppm pour les eaux de 1ère trempe
- 1 500 et 1 000 ppm pour les eaux de 2ème trempe.

Les ions Al^{+++} et Fe^{+++} se rassemblent au voisinage des colloïdes présents de polarité généralement négative. Les produits de solubilité de l'hydroxyde d'aluminium et de l'hydroxyde ferrique sont très faibles, 10^{-33} et 10^{-38} respectivement vers 20°C, ces hydroxydes précipitent donc immédiatement et entraînent les matières en suspension.

- chaux 1 000 ppm
- polyélectrolyte ERPAFLOC SAV 15 ppm
- flottation à l'air dissous (4 bars)

Les meilleurs résultats enregistrés sont les suivants (Tableau II)

Analyses	1	1A	1B	1C	3	3A	5	5A	5B	5C
pH	5,3	6,4	7,4	10,5	5,0	6,6	5,1	7,2	7,3	6,84
Polyphénols totaux mg/l	62,5	26	33	37	58	29	72	24	23	27
% Inhibition										
Chlorures Cl ⁻ mg/l	84	1000	76	26	87	975	88	1210	911	1210
Phosphates P ₂ O ₅ mg/l	100	0	0	0	100	0	50	0	0	0
Calcium Ca ⁺⁺ mg/l	60	384	312	430	68	412	64	592	284	556
Magnésium Mg ⁺⁺ mg/l	34	24	22	6	19	24	33	35	24	26
Sulfates SO ₄ ⁻⁻⁻ mg/l	64	60	870	950	65	81	68	61	54	60
Azote α-aminé mg/l	25	21	26	25	30	24	26	23	19	21

TABLEAU I A
 ESSAIS D'EPURATION
 (Orge 2RH Sonja - Eau de 1ère trempe)



Analyses	2	2A	2B	2C	4	4A	4B
pH	6,5	6,9	8,0	10,9	6,5	6,8	8,6
Polyphénols totaux mg/l	27	10	11	16	26	8	8
% Inhibition							
Chlorures Cl ⁻ mg/l	48	640	51	25	41	872	48
Phosphates P ₂ O ₅ mg/l	20	0	0	0	10	0	0
Calcium Ca ⁺⁺ mg/l	68	324	246	448	68	396	228
Magnésium Mg ⁺⁺ mg/l	24	50	18	8	31	56	25
Sulfates SO ₄ ⁻ mg/l	44	38	616	1132	39	44	638
Azote α-aminé mg/l	3,5	4,8	4,5	4,4	1	1,5	2,2

TABLEAU I B

ESSAIS D'EPURATION

(Orge 2RH Sonja - Eau de 2ème trempe)



	Eau de 1ère Trempe			Eau de 2ème Trempe		
	Eau brute	Eau traitée au chlorure ferrique	Rendement %	Eau brute	Eau traitée au chlorure ferrique	Rendement %
pH	7	7		6,8	7,4	
MES mg/l	286	< 10	> 96	153	< 10	> 93
DCO mg/l	3146	1806 (1)	42	1010	735 (2)	27
DBO ₅ mg/l	1330	375	72	830	275	67
Nt mg/l	90	23	74	62	14	77
P mg/l	50	5	90	< 0,5	< 0,5	-

(1) avec du sulfate d'alumine : 2090 mg/l

(2) avec du sulfate d'alumine : 740 mg/l

TABLEAU II - EPURATION PHYSICO-CHIMIQUE DES EAUX DE PREMIERE ET DEUXIEME TREMPE
(orge 2RH Sonja)

Le charbon actif (200 ppm, avec un temps de contact d'une heure) n'augmente pas les rendements d'épuration de DCO ni de DBO₅. On note qu'il est cependant possible de réduire de 50 % les consommations en réactifs, en recyclant 50 % des boues formées par les essais au sulfate d'aluminium et au chlorure ferrique.

Les polyphénols diminuent, quelque soit le traitement, de manière appréciable ; plus de 50 % sur les eaux de première trempe et les rendements d'épuration sont acceptables puisque supérieur à 40 % pour la DCO et aux environs de 70 % pour la DBO₅ sur les eaux les plus chargées. Ces résultats encourageants dans l'optique d'une simple opération d'épuration des eaux se sont trouvés tempérés par les tests physiologiques de germination nécessaires pour le recyclage. L'inhibition engendrée par les premières eaux non traitées s'est révélée très faible et donc peu significative, 4 à 5 % d'inhibition par rapport au témoin, ce qui correspond, pour ce type d'effluent, à un caractère

inhibiteur particulièrement faible. Nous avons systématiquement observé, avec les échantillons "épurés", un très net ralentissement de l'élongation de la racine principale (Figure 1) ; visible même par rapport aux tests effectués avec les effluents non traités. Ce surprenant freinage est beaucoup moins net cependant avec un conditionnement à la chaux, un coagulant minéral $Al_2(SO_4)_3$ ou $FeCl_3$ et le charbon actif (échantillons 5b et 5c). C'est d'ailleurs avec ce type de conditionnement que les rendements d'épuration étaient les plus élevés.

Il paraît dans l'immédiat difficile de détecter la cause de cette nouvelle inhibition consécutive aux différents traitements. Les modifications de pH enregistrées ne sont pas gênantes sauf pour les échantillons 1c et 2c, où le pH s'élève à 10,5 et 10,8, mais cette augmentation pourrait se corriger aisément si nécessaire.

Certains traitements entraînent aussi des surcharges ioniques qui peuvent se révéler défavorables à la germination. La teneur en calcium augmente ainsi de 60 mg/l dans la première sous-eau à 500 et parfois 600 mg/l ; de même les sulfates dont la concentration maximale enregistrée a été de 1130 mg/l soit environ 40 fois plus que dans l'eau utilisée pour la mise en trempe.

Afin d'essayer de remédier à ce nouveau problème soulevé par l'apparition lors du traitement d'une inhibition de croissance, les essais en laboratoire se sont poursuivis en travaillant le plus possible sur des eaux de première trempe présentant un caractère inhibiteur fortement marqué ; en testant d'autres réactifs notamment le polychlorure d'aluminium, l'aluminate de soude ; en remplaçant dans la limite du possible les ions Ca^{++} et SO_4^{--} respectivement par Na^+ et Cl^- qui ne possède pas un caractère inhibiteur fortement prononcé.

2.2. ESSAIS COMPLEMENTAIRES

Une étude comparative a pu être réalisée rapidement à partir d'une eau de première trempe d'orge à 6 Rangs d'hiver (6RH) afin de déterminer l'influence des ions sulfates, chlorures, sodium et calcium (Tableaux III et IV).



Première sous-eau (2RH)



Après épuration

Figure n° 1 - INHIBITION DUE AU TRAITEMENT



Analyses	lère sous-eau	Sulfate d'alumine 1000 ppm avec		Chlorure ferrique 2000 ppm avec	
		Chaux 500 ppm	Soude 300 ppm	Chaux 1000 ppm	Soude 700 ppm
pH	6,01	7,09	6,92	4,50	6,70
Polyphénols totaux mg/l	68	35,5	35,5	34	32
% Inhibition	10	6	6	4	8
Chlorures Cl ⁻ mg/l	65	60	67	397	400
Phosphates P ₂ O ₅ mg/l	100	0	0	0	0
Calcium Ca ⁺⁺ mg/l	56	224	56	372	56
Magnésium Mg ⁺⁺ mg/l	16	17	17	26	24
Sulfates SO ₄ ⁻⁻ mg/l	16	942	1027	427	434
Azote α-aminé mg/l					

TABLEAU III

EFFETS DES IONS CALCIUM ET SODIUM SUR LE TRAITEMENT
(Orge 6RH Nympe - Eau de lère trempé)



	Eau de trempe	Traitement au sulfate d'alumine 1000 ppm avec		Traitement au Chlorure ferrique 2000 ppm avec	
		chaux 500 ppm	soude 300 ppm	chaux 1000 ppm	soude 700 ppm
pH	6,8	7,4	7	6,6	6,5
DCO mg/l	3160	2360 25 %	2360 25 %	1940 39 %	1980 37 %
% inhibition:	10	6	6	4	8

TABLEAU IV - INFLUENCE DES IONS SUR L'EFFICACITE DU TRAITEMENT

Le résultat est médiocre sur le plan de l'enlèvement de l'inhibition, ce qui confirme les essais précédents mais il n'apparaît pas, à travers les quelques tests réalisés, de différences notables entre l'utilisation des ions Ca^{++} et Na^+ considérés en principe comme moins inhibiteurs.

Une série de nouveaux traitements a été entreprise afin de concilier l'épuration physico-chimique et l'épuration "*physiologique*", sur une eau de première trempe d'une orge à 6 Rangs d'hiver possédant un pouvoir inhibiteur de 55 %.

Une première sélection parmi les traitements possibles s'est faite à partir de la demande chimique en oxygène, de sa diminution en fin de traitement ainsi que des tests de germination et de l'analyse chimique des eaux traitées (Tableaux V et VI).

	Eau brute	Eau traitée			
		Polychlorure d'aluminium (1)	Sulfate d'alumine (2)	FeCl ₃ (3)	Polyélectrolyte ERPAFLOC 115 (4)
pH	6,5	6,8	8,2	7,8	6,5
DCO mg/l	1216	560 54 %	520 57 %	560 54 %	648 47 %
% inhibition	55	0	17	17	18

TABLEAU V - EFFICACITE DE DIFFERENTS TRAITEMENTS

(1) Polyélectrolyte d'aluminium 0,5 cm³/l
 Soude 120 mg/l
 ERPAFLOC SAV 3 mg/l

(2) Sulfate d'alumine 500 mg/l
 Chaux 200 mg/l
 ERPAFLOC SAV 3 mg/l

(3) FeCl₃ 500 mg/l
 Chaux 200 mg/l
 ERPAFLOC SAV 3 mg/l

(4) D'autres polyélectrolytes ont été étudiés, et parmi ceux-ci l'ERPAFLOC 115, à la dose de 20 ppm s'est révélé avoir une bonne action floculante comparable aux traitements précédents ; l'eau traitée conservait cependant un pouvoir inhibiteur non négligeable de 18 % (Tableau V).

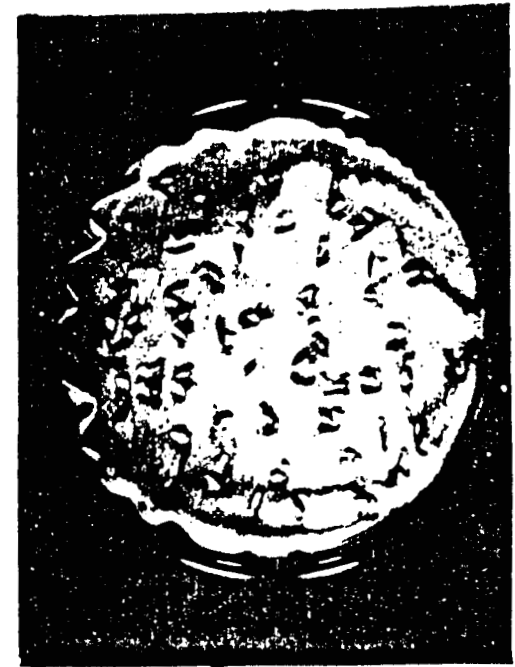
De ces expérimentations, il ressort que le traitement au polychlorure d'aluminium est de loin le plus performant ; il est un des rares à lever totalement l'inhibition tout en conservant une action floculante et un rendement d'épuration comparables aux traitements précédents (Figure 2).



Témoin



première sous-eau (6RH)



eau après traitement

Fig 2 Influence du traitement sur la germination



On peut noter pour mémoire, les excellents résultats obtenus par le traitement n° 6 (Tableau VI). Il en résulte une eau de très faible composition minérale, parfaitement limpide et dénuée de pouvoir inhibiteur ; le traitement n'a cependant pas été retenu pour une application industrielle car outre sa grande complexité, il est d'un prix de revient excessivement élevé.

Nous avons ensuite cherché, d'une part, à optimiser le traitement au polychlorure d'aluminium ; puis à vérifier ses performances sur des eaux de diverses provenances et ayant donc des caractéristiques différentes de celle sur laquelle il avait été mis au point. Cette optimisation du traitement s'est faite avec des doses croissantes de polychlorure d'aluminium. La chaux a finalement été remplacée par de la soude et la séparation des floccs s'est faite facilement par aéroflottation à l'air dissous (Tableaux VII et VIII).

L'inhibition est totalement levée avec une dose de 0,5 cm³/l de polychlorure d'aluminium, les rendements d'épuration en DCO et DBO₅ étant pour cet essai supérieurs à 50 %. Sur une eau de trempe ayant subi ce traitement (polychlorure d'aluminium 0,5 cm³/l, soude 120 mg/l et flocculant 3 mg/l) nous avons testé l'incidence de la recirculation des boues. Un tel procédé permet évidemment de réduire légèrement les doses de réactifs mais présente par contre l'inconvénient de maintenir une inhibition résiduelle de quelques pour cent.

Ce type d'épuration a fait l'objet de plusieurs vérifications sur des eaux de trempe en provenance d'une malterie intéressée par ces études, afin surtout de déterminer son action sur des orges de variétés différentes qui produisent des effluents de compositions chimiques variées et de charges polluantes fort diverses (Tableaux IX, X, XI).

Analyses	lère sous-eau	polychlorure d'aluminium 1	sulfate d'alumine 2	FeCl ₃ 3	polyélectrolyte: ERPAFLOC 115	6
pH	6,65	6,35	7,15	7,60	6,40	8,15
Polyphénols totaux mg/l	58	15	18	11	17	0,5
% Inhibition	55	0	17	17	18	0
Chlorures Cl ⁻ mg/l	60	111	70	164	115	102
Phosphates P ₂ O ₅ mg/l	50	0	10	2	50	0
Calcium Ca ⁺⁺ mg/l	48	52	50	44	64	30
Magnésium Mg ⁺⁺ mg/l	24	24	18	17	-	35
Sulfates SO ₄ ⁻⁻ mg/l	29	48	58	42	24	45
Azote α-aminé mg/l	8					

TABLEAU VI
EFFICACITE DE DIFFERENTS TRAITEMENTS
(Orge 6RH Gerbel - Eau de lère trempé)



	Eau traitée			Eau traitée avec recirculation des boues 50 %		
	Polychlorure d'aluminium cm ³ /l	Soude mg/l	Floculant SAV mg/l	0,2	0,5	0,7
Eau brute	60	120	3	60	120	120
	3	3	3	3	3	3
			Rendt.			
pH	6,5	6,8	6,8	6,8	6,8	6,9
MEST mg/l	300	10	10	10	10	10
DCO mg/l	1 216	632	560	632	560	544
DBO ₅ mg/l	640	310	310	310	310	51,5 %
NTK mg/l	60	32	32	32	32	47 %
Inhibition	55 %	12	0	12	0	0
						Rendt
						6,9
						524
						57 %

TABLEAU VII
OPTIMISATION DU TRAITEMENT



Polychlorure d'aluminium cm ³ /l	0,2	0,5	0,7	1	Recirculation
Soude mg/l	60	120	220	220	des boues
Floculant SAV mg/l	3	3	3	15	50 %
<hr/>					
Analyses					
pH	6,9	7,0	7,2	7,15	7,0
Polyphénols totaux mg/l	18,5	17,7	13	13	16
% Inhibition	12	0	0	0	4
Chlorures Cl ⁻ mg/l	74	113	149	156	113
Phosphates P ₂ O ₅ mg/l	12,5	10	2	0	5
Calcium Ca ⁺⁺ mg/l	48	48	44	40	48
Magnésium Mg ⁺⁺ mg/l	22	23	17	15	19
Sulfates SO ₄ ⁻ mg/l	43,2	37	53	24	41
Azote α-aminé mg/l					

TABLEAU VIII
OPTIMISATION DU TRAITEMENT D'EPURATION
(Orge 6RH Gerbel - Eau de lère trempe)



		Eau traitée			
	Eau brute orge 2RH	Polychlorure d'aluminium cm ³ /l	1	1,5	2
		Soude mg/l	200	250	250
		Floculant SAV mg/l	15	15	15
				Rendit	Rendit
pH	5,3		7,5	7,7	7,5
MEST mg/l	320		< 10	< 10	> 95 % : < 10
DCO mg/l	2 000		1 660	1 540	23 % : 1 380 31 %
DBO ₅ mg/l	1 020			710	30 % :
NTK mg/l	83			54	35 % :
Inhibition	6 %		-	0	0

TABLEAU IX - POLLUTION ET TRAITEMENT D'UNE ORGE A 2RH
(trempe : 156 T d'orge dans 80 m³ d'eau)

		Eau traitée	
	Eau brute	Polychlorure d'aluminium cm ³ /l	2
		Soude mg/l	200
		Floculant SAV mg/l	15
			Rendit
pH	7		7,5
MEST mg/l	300		< 10 > 95 %
DCO mg/l	3 000		2 400 20 %
Inhibition	19 %		0

TABLEAU X - POLLUTION ET TRAITEMENT D'UNE ORGE A 2RH
(Trempe : 172 T d'orge dans 60 m³ d'eau)



		Eau traitée	
	Eau brute	Polychlorure d'aluminium cm ³ /l	2
		Soude mg/l	150
		Floculant SAV mg/l	5
			Rendt
pH	6,8		6,8
DCO mg/l	3 160		2 140
Inhibition	10 %		0
			32 %

TABLEAU XI- POLLUTION ET TRAITEMENT D'UNE ORGE A 6RH
(Trempe : 164 Tonnes d'orge dans 70 m³ d'eau)

Lors de ces tests, toutes les germinations se sont déroulées normalement, preuve que le profil de traitement adopté permet de lever totalement l'inhibition de germination. Il faut rappeler que ces traitements ont été pratiqués sur les eaux de première trempe qui sont de loin les plus chargées en matières polluantes et inhibitrices ; les rejets étant intermittents, une capacité tampon entraînera une diminution de la concentration de chaque paramètre témoin de la pollution.

3 - CONCLUSIONS

Seul un traitement des eaux de trempe au polychlorure d'aluminium et à la soude, suivi d'une clarification par flottation à l'air dissous, permet de lever totalement l'inhibition alors qu'une partie de celle-ci subsiste avec des traitements plus conventionnels : sulfate d'alumine, chlorure ferrique ou polyélectrolyte.

Le traitement au polychlorure d'aluminium présente l'avantage supplémentaire, comparativement aux traitements de coagulation-floculation classiques, de produire un peu moins de boues de flottation. La recirculation

de ces boues de flottation, si elle permet de réduire légèrement les doses de réactifs, à par contre l'inconvénient de maintenir une inhibition résiduelle de quelques pour-cent.

Les résultats obtenus en laboratoire ont paru suffisamment encourageants pour envisager l'étape suivante c'est-à-dire la mise en place d'une unité pilote dans une malterie. Il faudra alors adapter, à partir du traitement que nous venons de déterminer, les concentrations optimales des différents réactants afin de les adapter aux effluents issus des variétés d'orges mises en trempé. L'opération d'épuration terminée, il sera nécessaire d'évaluer les conséquences du recyclage de l'eau sur la germination et la qualité finale du malt mais aussi de suivre le déroulement des cycles d'épurations ultérieurs afin de prévenir toute concentration de produits inhibiteurs de la germination ou plus simplement gênants pour le processus même d'épuration.

DEUXIEME PARTIE :

LA RECHERCHE DES INHIBITEURS
DANS L'EAU DE TREMPER ET L'ORGE

*If you can look into the seeds of time
And say which grain will grow and which will not ...*

MACBETH

La trempe peut se définir comme le processus qui prépare l'embryon à une croissance normale. De fait, la germination commence avec l'imbibition ce qui permet selon EVENARI (1957) de distinguer quatre phases :

- 1) la phase d'imbibition ;
- 2) la phase d'activation avec développement des mécanismes permettant à l'embryon de commencer sa croissance ;
- 3) la phase de mitose ;
- 4) la phase de germination. Le germe perce l'embryon (piquage) et à ce stade, les processus de croissance et de germination se rejoignent.

Cette conception de la germination conduit à définir les inhibiteurs comme des substances pouvant freiner ou bloquer à l'un de ces différents stades le processus de germination et en conséquence le phénomène de croissance.

Il n'est cependant pas démontré (COME, 1970) que les inhibitions de germination et les inhibitions de croissance, donc de la phase ultime soient régies par deux mécanismes identiques.

1 - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES PRINCIPAUX INHIBITEURS

Dès 1857, l'hypothèse d'une inhibition de germination de l'orge due à la formation d'une couche muqueuse de bactéries à la surface du grain avait été émise.

Effectivement, des effets bénéfiques ont été observés (GILBERT, 1954) avec de nombreux germicides : les plus efficaces étant l'acide péra-cétique et le chlorure mercurique. L'inhibiteur filtrable, paraît être une exotoxine agissant directement sur l'orge plutôt que par une stimulation de la croissance bactérienne.

On a également remarqué (GABER, 1969) que l'effet inhibiteur d'eau en excès, sur la germination de grains sensibles à l'eau, peut être surmonté par l'addition d'antibiotiques comprenant nécessairement un anti-fongique et un antibactérien.

Les acides organiques (acides malique, citrique, acétique) sont inhibiteurs par eux-mêmes et non seulement par leur effet acidifiant (COME, 1967). Chacun d'eux étant inhibiteur, leur action peut devenir synergique lorsqu'ils sont en mélange. Selon COOK (1953), une partie de l'activité inhibitrice totale peut-être attribuée à l'acide acétique qui proviendrait des microorganismes. L'effet sur la germination d'une série d'homologues et d'analogues de l'acide acétique montre un même degré d'activité lorsque la molécule présente le groupement CH_2-COOH . Les effets des acides malonique, pyruvique et succinique sont moindres alors que les acides isobutyrique et phénylacétique montrent une grande activité inhibitrice.

Les études ont montré que de nombreuses propriétés de l'inhibiteur correspondent à celles de sel organique de haut poids moléculaire (GILBERT, 1954).

COOK (1952 c) a mis en évidence des oses libres dans l'eau de trempe, parmi lesquels le galactose, le glucose, l'arabinose, le fructose, le xylose et le rhamnose. Il est important de préciser, pour la qualité ultérieure du malt que la présence de glucose ou de maltose dans le milieu inhibe fortement la production d' α -amylase, enzyme essentielle en brasserie.

CRABB et KIRSOP (1970) ont déterminé dans des embryons d'orges dénudés une activité inhibitrice non associée aux composés phénoliques ; 75 % de cette activité sont constitués par des hydrates de carbone parmi lesquels le saccharose et le raffinose. Des tests effectués avec ces oses, séparés et ensemble, montrent qu'ils inhibent la germination dans des conditions de sensibilité à l'eau et sont probablement responsables de l'activité inhibitrice de l'extrait d'embryon.

La sensibilité à l'eau est une répercussion de l'incapacité de l'embryon à surmonter les effets de substances inhibitrices dans des conditions de faible concentration en oxygène.

On a parfois signalé que les acides aminés pouvaient exercer une fonction inhibitrice de la germination. L'étude détaillée des fractions inhibitrices des caryopses immatures de blé a montré que la proline est le principal inhibiteur présent dans ces caryopses (COME, 1970). La proline et l'hydroxyproline prises séparément sont des inhibiteurs de germination, mais en association et en quantités égales, elles n'ont plus d'action inhibitrice.

De nombreux acides aminés ont été séparés et identifiés par chromatographie sur papier : Glycine - Leucine - Isoleucine - Lysine - Phénylalanine - Histidine - Proline - Tyrosine - Sérine - Valine - Alanine - Arginine - Acides aspartique et glutamique.

La libération d'acides aminés libres et d'autres composés pendant le trempage semble indiquer que c'est un phénomène important ; 1 % d'azote de l'orge étant ainsi perdu ; il n'est d'ailleurs pas impossible, d'après URQUHART (1953) que des peptides soient aussi présents. L'action freinante de la papaïne et l'effet stimulateur du bromate de potassium, qui est un inhibiteur des protéases, accrédite la thèse d'une inhibition de germination qui serait due en partie à l'accumulation de produits intermédiaires de la protéolyse.

L'élimination du grain vers le milieu extérieur d'acides aminés libres, de sucres simples rend possible la croissance de microorganismes, ce qui expliquerait la présence d'acide acétique dans les trempes et notamment le fait qu'il ne soit pas détecté pendant les quatre premières heures du trempage.

L'examen de l'orge en germination, après avoir trempé dans des solutions de coumarine, montre que la racine primaire apparaît normalement mais que son élongation et le développement des racines secondaires sont inhibés (KIRSOP, 1959). Il est intéressant de noter que dans le grain ainsi traité à la coumarine, les activités amylasiques ont tendance à augmenter.

La présence d'un groupement lactone et d'un cycle benzénique serait nécessaire à la fonction inhibitrice qui, en revanche se trouverait réduite en présence d'ions calcium.

VAN SUMERE (1958) par chromatographie sur papier a montré la présence de coumarines et de phénols dans les pailles d'orges. Outre la coumarine, l'herniarine, l'esculétine et la scopolétine étaient aussi présentes alors que les acides hydroxybenzoïque, vanillique, protocatéchique, syringique, O-hydroxycinnamique, caféique, férulique, sinapique et chlorogénique étaient décelés.

Nombre de ces produits influent très fortement sur la germination de l'orge ; la coumarine et l'acide férulique paraissant particulièrement actifs.

La répartition des acides cinnamiques dans le règne végétal est très générale, mais des travaux récents ont mis en évidence la présence fréquente, dans les tissus de plusieurs acides dérivés de l'acide benzoïque. La chromatographie sur papier des fractions acides éthéro-solubles des eaux de trempe a montré la présence d'acides phénoliques et notamment d'acide vanillique (COOK, 1954) qui, à une concentration de 1/1500 possède une activité inhibitrice spécifique sur la croissance des racines.

Après hydrolyse, MASSART (1959) a trouvé plus d'acides phénoliques que par extraction directe des racines et des péricarpes d'orge, ce qui laisse prévoir une structure liée des composés entre-eux. En 1963, les acides phénols ont fait l'objet d'un travail de la part de URION (1963) qui, à l'aide d'une chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de polyamide isole :

- . les acides vanillique, syringique, férulique et parahydroxybenzoïque sous forme libre ;

- . les acides vanillique, férulique, chlorogénique et syringique qui interviennent dans les hétérosides et sont détectés après hydrolyse acide ;

- . l'extrait basique donne les acides vanillique, syringique, parahydroxybenzoïque, sinapique, férulique et caféique qui sont engagés dans des esters.

On remarque que l'acide paracoumarique n'est pas mis en évidence alors que DADIC (1980) lui attribue, ainsi qu'à l'acide férulique, le rôle d'inhibiteur de la germination de l'orge. Des travaux plus récents font aussi apparaître quelques divergences quant à la composition qualitative des acides phénoliques. SMART en 1979 note l'absence d'acide paracoumarique avec une chromatographie sur couche mince de l'extrait éthéré, alors que SLOMINSKI en 1980 le met particulièrement en évidence mais en revanche, ne distingue après extraction par l'éthanol ni l'acide chlorogénique, ni l'acide caféique.

Un dosage sur une bière commerciale (KENYHERCZ, 1977) montre la présence entre autres des acides paracoumarique et caféique mais l'auteur indique que le spectre des acides phénoliques reflète la composition du houblon et non celle du malt.

MAC MURROUGH (1980) avec la chromatographie liquide à haute pres-

sion signale que pour la brasserie, les acides phénoliques les plus significatifs contenus dans l'orge sont les acides caféique, paracoumarique, férulique, syringique et vanillique.

De très nombreux auteurs reconnaissent aux acides phénoliques une action sur la germination mais les diverses expérimentations entraînent des interprétations quelque peu divergentes.

Considéré, en effet par certains auteurs comme un inhibiteur, l'acide caféique pourrait à faible concentration stimuler la germination de l'orge (LETHAM, 1978), alors que d'autres chercheurs concluent à son absence dans le grain d'orge.

Une gradation du pouvoir inhibiteur des acides phénoliques tendrait à attribuer à la structure conformationnelle de la molécule la responsabilité de cette inhibition, ce qui semble infirmé par les travaux de DATTA (1978) d'une part et l'essai d'interprétation de l'inhibition de la germination par COME (1967) d'autre part.

DATTA avance l'idée que la configuration structurale de la molécule n'est pas reliée à son action physiologique et réfute l'hypothèse de HESS (1968) selon laquelle la présence de deux groupements OH en position ortho est nécessaire pour qu'un composé phénolique soit doué d'une activité biologique.

Selon COME (1967), les enveloppes de graines de POMMIER sont riches en composés phénoliques qui s'oxydent facilement, l'inhibition serait alors due essentiellement à l'absorption, par ces substances phénoliques, d'une grande partie de l'oxygène qui pénètre par dissolution ; la quantité d'oxygène atteignant l'embryon est alors trop faible pour assurer sa germination (Figure n° 3).

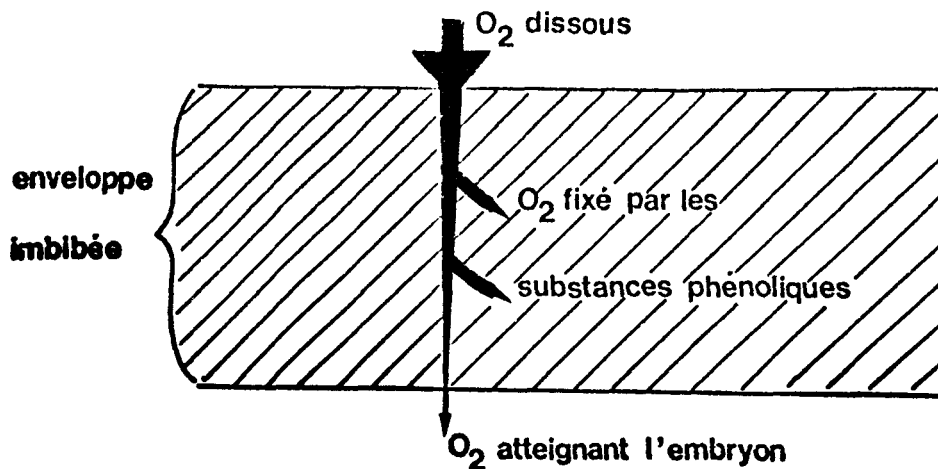


Figure n°3 - SCHEMA D'INTERPRETATION DE L'INHIBITION DE GERMINATION PAR LES ACIDES PHENOLIQUES (d'après COME)

Les enveloppes imbibées étant très peu perméables à l'oxygène qui ne peut les traverser que par dissolution dans l'eau d'imbibition, alors qu'il est lui-même assez peu soluble dans l'eau, l'approvisionnement de l'embryon en oxygène, déjà limité, sera encore diminué par la plus ou moins grande épaisseur des enveloppes.

De ces études en résumé peu nombreuses, il apparaît que des acides phénoliques différents peuvent être mis en évidence dans l'orge et à fortiori dans des eaux de trempes ; les causes de ces variations sont multiples.

Les procédés d'extraction et de purification sont parfois très longs et nécessitent des chromatographies de partage liquide-liquide, sur gel et enfin sur couche mince qui peuvent parfois entraîner des pertes importantes. Indépendamment des méthodes de travail, la matière première elle-même semble responsable de ces divergences.

Nous avons déjà remarqué la grande variabilité des eaux de première trempé en fonction de la variété de l'orge ; il semble même selon le rapport des recherches technologiques et scientifiques du CBM (1959) que la salissure de l'eau de trempé varie du simple au double non seulement en fonction de la variété de l'orge mais aussi selon la provenance géographique du lot traité et même selon l'endroit de prélèvement de l'échantillon dans un même champ.

Il faut ajouter comme facteur supplémentaire de la variabilité que la teneur en acides phénoliques n'est pas stable mais varie en fonction de la durée de stockage du grain.

Les acides phénoliques paraissent jouer un rôle important dans l'inhibition de la germination et agissent très souvent en synergie avec les coumarines. Après avoir déterminé un traitement industriel d'épuration de l'eau de trempé permettant son recyclage, nous nous sommes attachés à la détection qualitative et quantitative des acides phénoliques dissous dans l'eau de trempé, à leur dosage dans l'eau épurée dans le but de leur attribuer sélectivement la responsabilité entière ou partielle des inhibitions constatées.

2 - DOSAGE DES ACIDES PHENOLIQUES

La chromatographie sur papier puis sur couches minces a été et demeure une méthode de choix pour séparer et identifier les acides phénoliques usuellement rencontrés dans les plantes (SEIKEL, 1964). Les quantités importantes d'acides phénoliques libres et libérés après hydrolyses acide et alcaline rendent cette méthode très attractive pour l'étude des végétaux (STAHL, 1969 ; SWAIN et *al.*, 1963 ; THALLER, 1963).

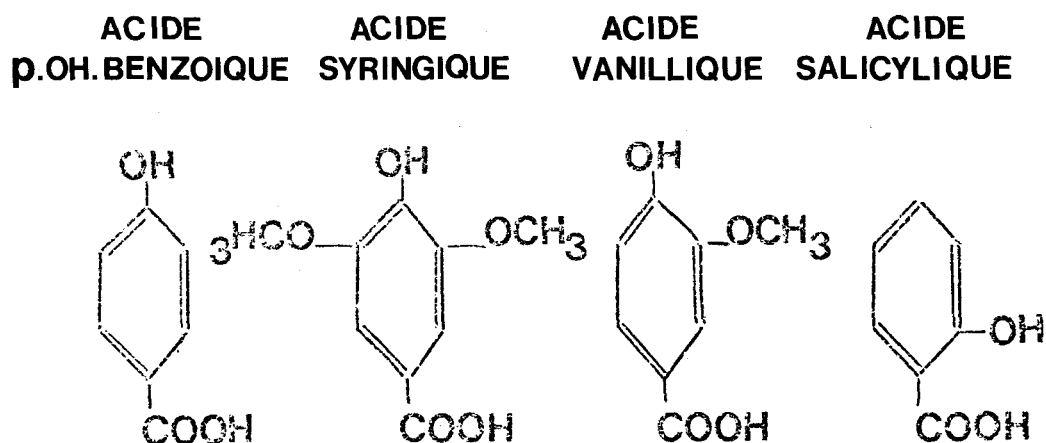
La détection peut se faire par fluorescence mais certains composés comme les acides benzoïques n'apparaissent pas dans les conditions habituelles de fluorescence à la température ambiante (RIBEREAU-GAYON, 1968). D'autres acides, comme l'acide paracoumarique, possède une fluorescence très atténuée (*quenching*) ce qui rend leur détection le plus souvent très difficile (JANGAARD, 1970).

Après chromatographie sur couche mince, il est possible, en éluant les zones supposées contenir les acides recherchés d'effectuer une

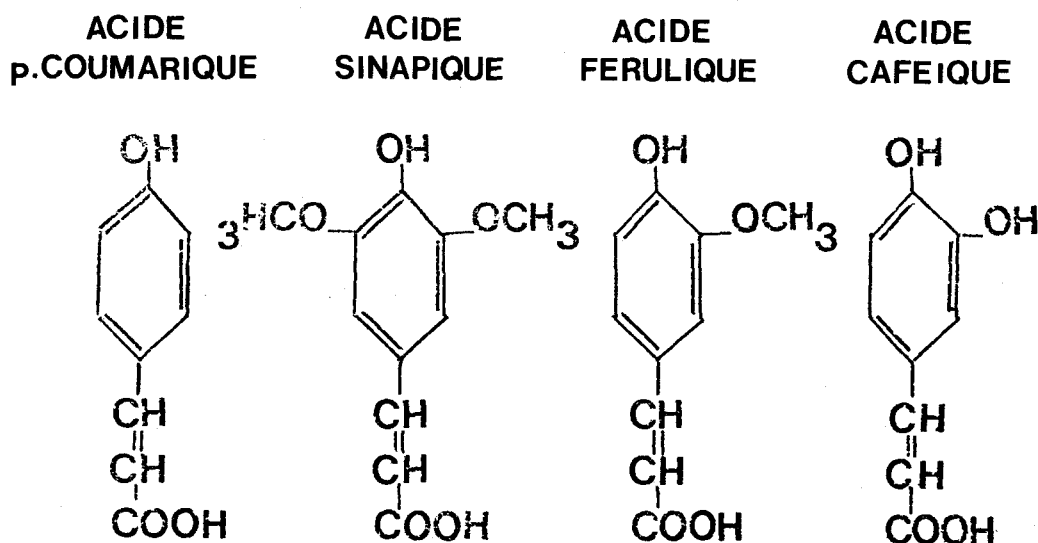
injection directe des acides phénoliques dans un chromatographe en phase gazeuse. Les pics détectés ne sont pas proportionnels à la quantité d'acide injecté (MENDEZ, 1966) ; il est donc préférable d'effectuer une triméthylsilylation (PELLIZZARI *et al.*, 1969 ; KLEBE, 1966) avec le N.O. bis (triméthylsilyl-)acétamide(BSA). Le dosage d'acides phénoliques ou de polyphénols a été réalisé par chromatographie en phase gazeuse sur les végétaux (DRAWERT, 1976) dans le vin et parfois dans la bière (DRAWERT *et al.*, 1977).

Depuis que le rôle primordial des polyphénols polymérisés dans la formation des troubles colloïdaux dans la bière a été démontré (JERUMANIS, 1979), de même que leur participation dans la couleur, la flaveur et la stabilité de la flaveur (BENDELOW, 1979) ; les chercheurs ont expérimenté de nombreuses techniques dans le but de séparer ces composés phénoliques. Ces travaux avaient surtout pour buts l'extraction des polyphénols (KIRBY *et al.*, 1980) leur dosage à différents moments de la fabrication, (BELLEAU, 1979 ; DADIC, 1980 ; QURESHI, 1979 a-b) et du vieillissement de la bière. Peu de travaux récents se sont tournés vers l'analyse qualitative des acides phénoliques dans l'orge même et dans les eaux de trempage en malterie.

Comme il est fort probable que des différences d'inhibition soient dues à la variété des orges mais aussi, à la composition qualitative des polyphénols, nous avons tenté d'analyser de manière sélective les acides phénoliques libres dans les eaux de trempage, ce qui représente 4 dérivés de l'acide benzoïque :



et 4 dérivés de l'acide cinnamique :



Pour effectuer ces dosages, nous avons disposé d'une technique récente, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

2.1. MATERIEL ET METHODES

Les essais et la mise au point ont été effectués à l'aide d'un chromatographe en phase liquide à haute pression VARIAN de la série 5060. Contrairement à la chromatographie en phase gazeuse, où la sélectivité dépend, en général, de la nature de la phase stationnaire, elle est ici étroitement reliée à la composition de la phase éluante.

Ce type d'appareil est équipé d'un dispositif de gradient à trois solvants contrôlé au moyen de microprocesseurs, permettant de réaliser, de façon précise et reproductible le mélange des trois solvants dans toutes les proportions et même pour des débits très faibles (KLINK, 1981).

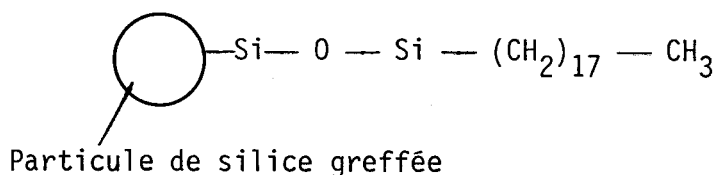
L'injection de l'échantillon se fait par l'intermédiaire d'une boucle d'injection à volume fixe de 10 μ l.

La détection s'effectue dans l'ultra-violet à 254 nm par passage à travers une cellule de 10 mm de passage optique et de 8 μ l de volume.

Nous utilisons une colonne analytique de 30 x 0,4 cm qui contient la phase stationnaire de type inversé.

Dans la technique classique de chromatographie liquide-liquide (LLC), la phase stationnaire est polaire et la phase mobile non polaire. Par contre, dans la phase inversée, la phase stationnaire est apolaire mais la phase mobile polaire, ce qui permet de séparer par cette technique un grand nombre de substances. Dans ce type de chromatographie, les composés les plus polaires sont élués en premiers.

La colonne dont nous disposons est de marque VARIAN, type MCH 10, ce qui correspond à un gel de silice composé de microparticules de silice de 10 μ sur lesquelles sont greffés des groupements octadécyls.

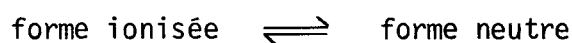


2.1.1. Choix de la technique d'analyse et recherche d'un programme d'éluion

Ce type de phase inversée permet pour le dosage des acides phénoliques de travailler selon deux modes distincts :

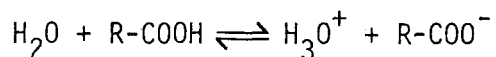
- l'appariement d'ions ;
- la suppression ionique.

Tous nos composés à analyser possèdent une fonction phénolique et une fonction carboxylique, ils sont donc ionisables, or le procédé en phase inversée nécessite la présence de ces acides sous une forme neutre ou apolaire. Les composés ionisables se trouvent en solution sous la forme de l'équilibre suivant :



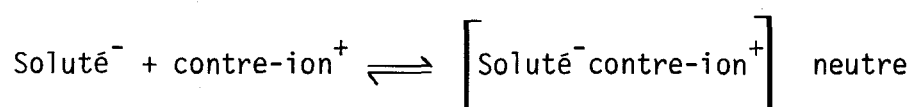
La force ionique de ces produits dépend de leur degré de dissociation, la valeur importante pour nous est donc le pka des acides.

Lorsqu'un acide est en équilibre ;



une phase mobile *acide* déplacera l'équilibre vers la gauche, avec la formation de l'espèce neutre, ce qui facilite l'étude en phase inversée. Cette technique de *suppression ionique* est utilisée pour les acides et les bases faibles avec des tampons compris entre 2 et 8, ce qui correspond à la zone de pH compatibles avec ce genre de garnissage.

Pour des acides forts, la suppression ionique est toutefois inutilisable, il faut alors avoir recours à la technique d'appariement d'ions. On ajoute dans ce cas, un contre-ion convenable dans la phase mobile afin de former une entité nouvelle suivant l'équilibre :



La nature et la concentration du contre-ion utilisé, le rapport méthanol-eau de la phase mobile, le pH vont alors intervenir sur la rétention des différents acides (THOMAS, 1979).

La multiplication de ces nouveaux facteurs à maîtriser et à optimiser pour obtenir une bonne séparation nous a conduit à opter pour la technique par suppression d'ions d'autant que les pka des acides phénoliques que nous désirons doser sont tous situés aux environs de 4,50 ce qui nous permet d'abaisser suffisamment le pH (une unité au moins) pour éviter les formes ionisées des acides et rester dans le domaine d'action de notre colonne.

Le dosage des acides phénols et des flavonoïdes a fait l'objet de quelques travaux axés principalement sur les végétaux (WULF, 1976 ; COURT, 1977 ; MURPHY et *al.*, 1978 ; PRICE et *al.*, 1979 ; HARDIN, 1980). La chromatographie liquide à haute pression offre cependant le désavantage par rapport à la chromatographie en phase gazeuse, d'être très dépendante du type d'appareil utilisé et des performances de la colonne. Il arrive, en effet, que les ordres d'élutions ne soient pas identiques pour deux colonnes

d'une même marque, ce qui nécessite le plus souvent une nouvelle identification et un réétalonnage, lors d'un changement de colonne.

La recherche du solvant d'élution et l'optimisation des conditions chromatographiques (composition du solvant, pH, vitesse d'élution) a été réalisée en analysant un mélange standard contenant 50 mg/l de chacun des acides phénoliques recherchés, dissous dans un mélange méthanol-eau (5-95).

Les solvants d'élution les plus couramment utilisés sont l'eau acidifiée, le méthanol, l'acétonitrile, seuls ou en mélange (GRODZINSKA et *al.*, 1979). Il est possible d'utiliser comme solvant d'élution, un mélange eau-acide acétique (BAZARD et *al.*, 1981), mais le temps requis pour éluer les acides contenus dans notre solution étalon est alors proche d'une heure. Nous avons préféré enrichir notre phase mobile avec du méthanol ; comme la variation de phase mobile ne doit pas entraîner de changement de pH afin de ne pas modifier les conditions d'ionisations, nous avons utilisé un tampon phosphate de potassium à pH 2,2 que nous avons progressivement enrichi en méthanol. L'optimisation des conditions d'élution a été réalisée en analysant un mélange standard avec différentes compositions de phase mobile et différentes valeurs de pH.

Les analyses sont effectuées à la température ambiante et le débit de solvant fixé à $1,5 \text{ ml. mn}^{-1}$. Les dérivés de l'acide parahydroxybenzoïque et de l'acide cinnamique ont été chromatographiés seuls, afin de déterminer leur temps de rétention et en mélange afin d'optimiser le programme d'élution qui se déroule à des pressions de 2000 à 2400 psi (128 à 148 atm). Le solvant d'élution retenu est une solution de méthanol à 15 pour 100 en volume dans le tampon phosphate de potassium pendant 10 mn, puis progressivement enrichi en méthanol pour parvenir à une concentration finale de 35 % en 15 mn et demeurer ensuite stable (figure 4).

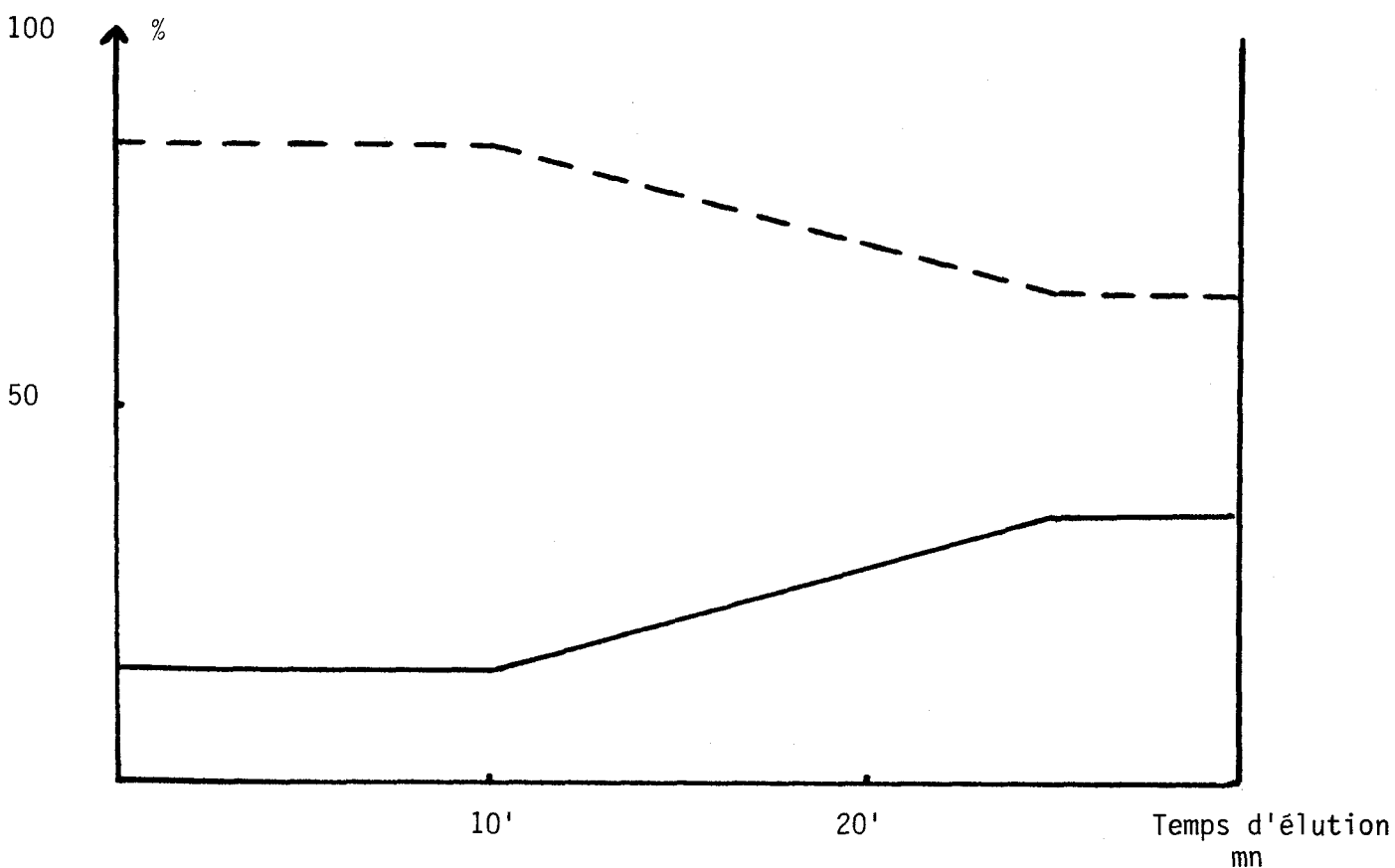


Figure n° 4 - GRADIENT D'ELUTION POUR LES ACIDES PHENOLIQUES

——— méthanol
 - - - tampon phosphate pH 2,2

Dans ces conditions opératoires, tous les acides phénoliques sont élués en 32 mn, les temps de rétention permettent de calculer pour chaque composé les paramètres caractéristiques de la chromatographie : K' facteur de capacité qui caractérise la rétention, α facteur de séparation qui exprime la sélectivité ; N nombre de plateaux théoriques mesure l'efficacité de la colonne et R qui reflète la résolution, caractéristique de la pureté que l'on peut obtenir pour une séparation (BROWN, 1973).

$$K' = \frac{T_r - T_0}{T_0}$$

T_r Temps de rétention d'un composé

T_0 Temps d'élution des produits non retenus

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1}$$

K_2 Facteur de capacité du composé 2

K_1 Facteur de capacité du composé précédent

$$R = \frac{T_{r2} - T_{r1}}{1/2(\Delta V_2 - \Delta V_1)} = \frac{2\Delta T}{\Delta V_2 - \Delta V_1}$$

T_{r1} et T_{r2} : temps de rétention

Δt : différence entre T_{r2} et T_{r1}

ΔV_1 et ΔV_2 : largeur des pics à la base

La figure 5 illustre la séparation des 7 acides phénoliques que nous nous proposons de rechercher dans les eaux de trempe.

Le tableau XII représente les temps de rétention, les facteurs de capacité, de séparation et la résolution de la colonne.

	T_r	K'	α	R
Ac. Parahydroxybenzoïque	11,1	5,53	1,55	4,72
Ac Vanillique	16,3	8,59	1,16	1,44
Ac. Caféique	18,7	10,00	1,16	2,60
Ac. Syringique	21,5	11,65	1,19	3,32
Ac. Paracoumarique	25,3	13,88	1,15	3,30
Ac. Férulique	28,8	15,94	1,10	1,55
Ac. Sinapique	31,5	17,53		

TABLEAU XII- PARAMETRES CHROMATOGRAPHIQUES POUR LA SEPARATION DES ACIDES PHENOLIQUES. Vitesse d'élution 1,5 ml/mn

Il est évident que si le facteur de séparation α est égal à 1, les pics sont confondus et aucune séparation ne s'est accomplie. On considère (SEROUSSI et *al.*, 1979) que la chromatographie liquide à haute pression permet d'obtenir des séparations même lorsque $1 < \alpha < 1,05$. Les dif-

AUFS 0,08

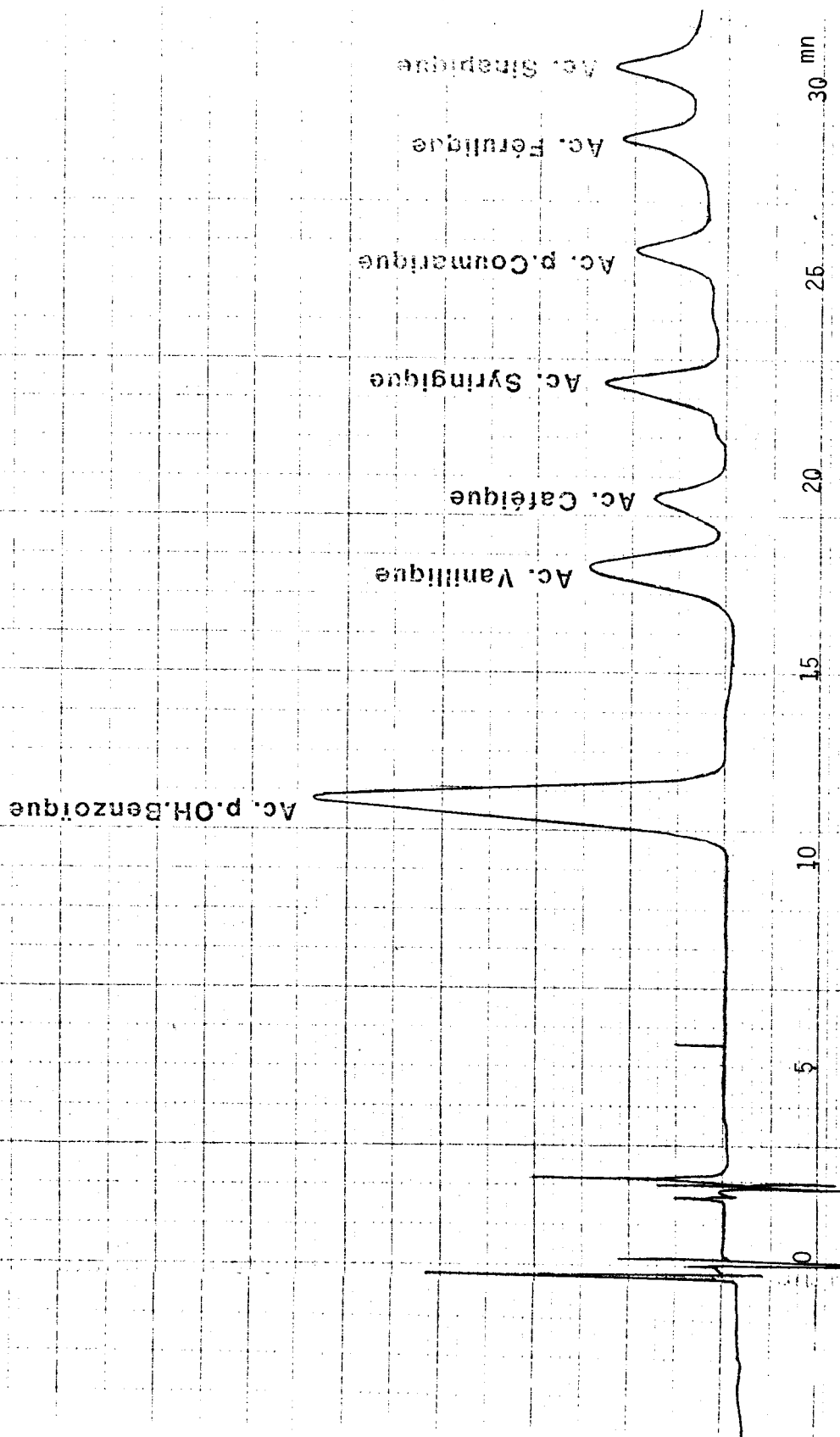


Figure n° 5 - CHROMATOGRAMME D'UNE SOLUTION ETALON



férentes valeurs que nous calculons sont comprises entre 1,10 et 1,55, ce qui témoigne d'une bonne séparation.

Il est possible que la valeur de α soit bonne mais que la colonne ait une faible efficacité. On obtient alors des pics étalés qui se chevauchent à leurs bases. Pour un programme d'élution donné, il est donc utile de caractériser R. Lorsque $R = 1$, la séparation est presque complète (MURPHY *et al.*, 1978), il n'existe que 2 % de chevauchements entre les zones d'élutions, le retour à la ligne de base est effectif pour des valeurs de $R \geq 1,25$; ce qui correspond à notre cas où la valeur minimale de R est de 1,44.

L'élution obtenue est conforme à l'ordre des polarités décroissantes, typiques d'une chromatographie en phase inversée. L'addition d'un groupe méthoxy diminue la polarité dans chaque classe d'acides (benzoïque et cinnamique), et la présence d'une chaîne éthylénique chez les acides cinnamiques diminue leur polarité donc augmente leur rétention par rapport à l'acide parahydroxybenzoïque ayant les mêmes substitutions (paracoumarique - parahydroxybenzoïque, vanillique-férulique).

2.1.2. Extraction des acides phénoliques

Etant donné la faible teneur des acides phénoliques dans l'eau de trempage, associée à la grande complexité de ces solutions, il est impossible de pratiquer un dosage par injection directe.

Les extractions de composés phénoliques sont réalisées, le plus souvent sur des végétaux, ce qui ne nécessite, après broyage d'un fragment de plante qu'une extraction par un solvant approprié, avant une concentration (WILKINSON, 1977 ; FANTOZZI *et al.*, 1978).

Deux méthodes d'extractions dérivées des techniques de concentration utilisées en oenologie (SYMONDS, 1978) ont été testées : une technique d'extraction utilisant l'acétate d'éthyle, une méthode par démixtion.

2.1.2.1. Extraction à l'acétate d'éthyle

Elle se fait dans un erlenmeyer où 40 ml de la solution à extraire sont acidifiés à pH 2 avec de l'acide chlorhydrique 4 N. La solution est saturée en NaCl et les acides phénoliques extraits par 20 ml d'éthyle acétate par agitation durant 10 mn. La phase organique est séparée de la phase aqueuse par centrifugation à 2000 T/mn pendant un quart d'heure.

L'extraction est répétée deux fois et les phases organiques réunies.

2.1.2.2. La démixtion

Elle consiste à séparer l'échantillon en deux phases selon une méthode mise au point à partir de celle de TERRIER (1972).

A 25 ml d'une solution étalon, on ajoute 3 ml de méthanol, 3 ml d'acétone, 18 g de phosphate monosodique et 16 g de sulfate de magnésium dissous par agitation magnétique.

Après dissolution complète des sels à 40°C, et au bout de deux heures, la phase méthanol-acétone est complètement séparée de la phase aqueuse et contient la majorité des composés phénoliques.

Le dosage des acides phénoliques s'effectue soit sur la phase organique de la démixtion, soit sur la réunion des extractions à l'acétate d'éthyle.

2.1.2.3. Comparaison des deux techniques

Dans un premier temps, nous avons extrait par ces deux méthodes des solutions pures de chaque acide phénolique à 200 mg/l, afin, à l'aide essentiellement des hauteurs de pics mesurées sur 3 injections de calculer les rendements consécutifs à une seule extraction (Tableau XIII).

Acides \ 1 Extraction	Acétate d'éthyle Rendement %	Démixtion Rendement %
Parahydroxybenzoïque	88	70
Vanillique	93	75
Caféique	100	87
Syringique	89	95
Paracoumarique	105	79
Férulique	95	88
Sinapique	103	83

TABLEAU XIII- RENDEMENTS D'EXTRACTION POUR CHAQUE COMPOSE
SELON LE MODE UTILISE

L'extraction paraît incomplète principalement lors de la démixtion. Ceci peut s'expliquer par le fait que cette méthode entraîne la formation d'une pâte au fond du vase servant à l'extraction, pâte qui ne permet pas de récupérer totalement la phase organique.

Nous avons cependant conservé ces deux méthodes afin de vérifier leur efficacité en diminuant les concentrations qui sont certainement beaucoup trop élevées par rapport à celles qui peuvent exister, et en pratiquant ces extractions non plus sur des solutions pures d'un seul acide mais sur des mélanges des sept acides phénoliques. Le Tableau XIV indique les rendements de la première puis de la seconde extraction ainsi que le rendement global. Il faut immédiatement préciser que ces rendements ne sont que des valeurs indicatives permettant de comparer les deux types d'extractions ; puisque à ce stade du travail, nous n'avons pas encore effectué de tests de répétabilité.

Dans cette première approche, tous les calculs de rendements ont été effectués à l'aide de la méthode des surfaces par rapport à des injections directes des solutions mères.

On observe des rendements particulièrement élevés et parfois même anormaux avec la méthode par démixtion, mais par contre la première

concentration: acide phénolique	3 mg/l		6 mg/l		12,5 mg/l		25 mg/l		50 mg/l		100 mg/l		200 mg/l	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Acide Para-hydroxybenzoïque	84 (84+0)	101 (84+17) **	91 (91+0)	95 (87+8)	95	104	95	103	109	108	94	94	94	89
Acide Vanillique	82 (82+0)	107 (76+31)	87 (87+0)	101 (92+9)	102	109	88	91	106	109	88	99	93	106
Acide Caféique	83 (83+0)	107 (87+20)	90 (90+0)	124 (117+7)	97	106	96	116	83	104	88	107	106	109
Acide Syringique	93 (77+16)	103 (81+22)	86 (86+0)	106 (98+8)	97	111	107	113	106	107	91	95	97	102
Acide Para-coumarique	109 (109+0)	103 (67+36)	70 (70+0)	73 (66+7)	105	102	87	87	103	104	106	91	99	120
Acide Férulique	85 (85+0)	112 (81+31)	89 (89+0)	101 (92+9)	107	106	95	86	106	110	93	97	102	107
Acide Sinapique	91 (91+0)	135 (108+27)	79 (79+0)	94 (86+8)	90	110	83	96	104	103	77	111	91	98

. A acétate d'éthyle

. B démixtion

:: rendements de la première puis de la seconde extraction



TABLEAU n° XIV - RENDEMENTS DE RECUPERATION APRES 2 EXTRACTIONS

extraction n'est jamais suffisante. Pour des solutions contenant 3 et 6 mg/l de chaque acide phénolique, l'acétate d'éthyle ne solubilise plus rien lors de la deuxième extraction, les rendements sont cependant compris entre 84 et 100 %.

A ces mêmes concentrations, la deuxième démixtion contient encore respectivement 30 et 10 % de chaque acide généralement dans un volume important donc à faible concentration.

Bien qu'en apparence très simple, il apparaît pourtant difficile de standardiser la démixtion et notamment la récupération de la phase organique dont les volumes varient de 4,5 à 8 ml dans les mêmes conditions opératoires.

Nous n'avons pas retenu la méthode de démixtion pour cet ensemble de raisons et notamment pour son manque de fiabilité et sa longueur (2 ou 3 extractions de 2 heures chacune).

Les rendements obtenus par l'acétate d'éthyle sont intéressants si une seule extraction peut suffire. Une seconde extraction permettant de récupérer un faible pourcentage entraîne cependant une dilution importante. L'acétate d'éthyle pose alors le problème de la concentration qui ne peut se faire qu'à une température relativement élevée et sous azote ou en présence d'un anti oxygène.

Nous avons remplacé l'acétate d'éthyle comme solvant par l'éther diéthylique qui ne posant pas de problèmes pour sa concentration nous permet d'envisager immédiatement 3 extractions successives. Les phases organiques sont réunies et concentrées dans un micro-concentrateur type Kuderna-Danish (figure 6) ce qui autorise des volumes finaux de l'ordre de 0,5 à 1,5 ml (Tableau XV).

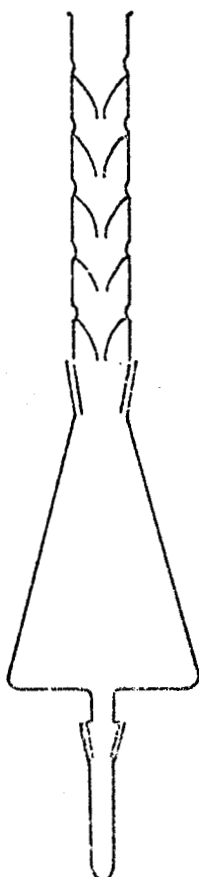


Figure n° 6 - CONCENTRATEUR TYPE KUDERNA DANISH

Concentration de chaque acide:	25 mg/l	10 mg/l	5,0 mg/l	2,5 mg/l
Acides				
Parahydroxybenzoïque	95	95	82	95
Vanillique	88	102	82	82
Caféique	96	97	83	83
Syringique	107	97	93	93
Paracoumarique	87	103	109	109
Férulique	95	107	85	85
Sinapique	83	90	91	91

TABLEAU XV - RENDEMENTS DES EXTRACTIONS A L'ETHER DIETHYLIQUE SUR DES SOLUTIONS ETALONS



2.1.2.4. Méthode définitive

Les solutions étalons sont conservées à 4° au réfrigérateur et recouvertes en permanence de papier d'aluminium afin de les protéger le plus possible de la lumière. Il est nécessaire de les tester régulièrement car les acides cinnamiques s'isomérisent rapidement pour donner lors de l'analyse, deux pics qui correspondent aux formes *cis* et *trans*. Selon HARTLEY (1975) cette isomérisation des acides *trans* cinnamiques serait initiée par la faible quantité de rayonnement UV contenu dans une pièce normalement éclairée ; mais elle se produit aussi naturellement lorsque les acides cinnamiques sont conservés dans le méthanol (FENTON, 1978).

Toutes les opérations d'extractions ont donc été effectuées à l'abri de la lumière, selon le procédé décrit dans la figure 7.

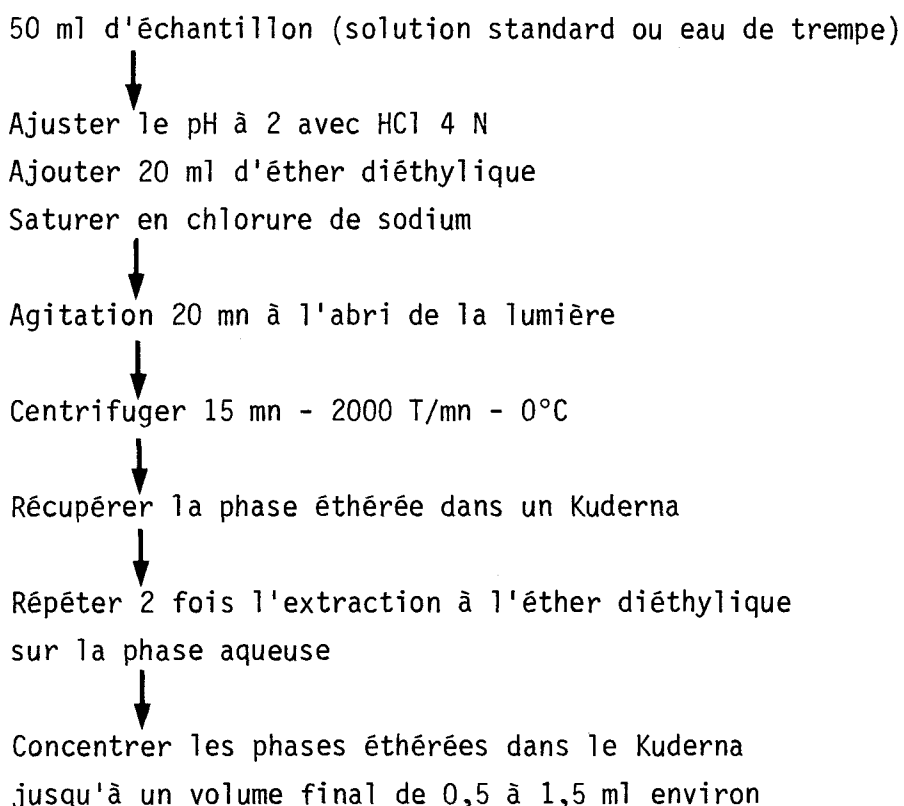


Figure n°7 : PROCEDE D'EXTRACTION DES ACIDES PHENOLIQUES EN SOLUTION

Les pourcentages de récupération sont aussi bons (83 à 100 %) que ceux obtenus lors des extractions à l'acétate d'éthyle ; l'éther possède

par contre l'avantage de s'évaporer beaucoup plus facilement, ce qui permet de pratiquer 3 extractions successives sur tous les échantillons.

2.1.3. Répétabilité et étalonnage

Nous avons testé la répétabilité de la méthode sur l'extraction d'une solution étalon contenant 3 mg/l de chaque acide phénolique (Tableau XVI). Les calculs ont été effectués à partir des hauteurs de pics mais aussi des surfaces. Les coefficients de variation peuvent apparaître élevés (ils sont compris entre 6,4 et 8,9 % pour 13 extractions différentes) mais ils tiennent compte de la répétabilité de l'extraction et de celle du dosage proprement dit par chromatographie ; ce qui est donc très satisfaisant.

Dans la suite des travaux, nous n'avons plus pris en considération que les hauteurs de pics.

Acides Phénols	\bar{S} (mm ²)	\bar{H} (mm)	n	σ Surface	σ Hauteur	CV % Surface	CV % Hauteur
Parahydroxybenzoïque	955	143	13	88,9	10,8	9,3	7,5
Vanillique	579	74	13	32	4,8	5,5	6,4
Caféique	353	44	13	26	3	7,4	6,8
Syringique	227	38	13	24	3,4	10,5	8,9
Paracoumarique	141	22	13	15,3	1,8	10,8	8,1
Férulique	313	48	13	20,6	3,3	6,6	6,8
Sinapique	191	26	13	16,1	2,3	8,4	8,8

TABLEAU XVI - ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE DE L'EXTRACTION ET DU DOSAGE DES ACIDES PHENOLS

Après les premières injections de solutions de concentrations croissantes en acides-phénols, il est rapidement apparu qu'il serait difficile de relier directement la concentration en acide et la hauteur du

pic correspondant, bien que certains auteurs (BERTRAND et *al.*, 1981) semblent vérifier cette proportionnalité mais avec des solutions beaucoup plus concentrées. Afin d'améliorer la fiabilité de la colonne, de limiter l'influence de l'injection qui peut parfois ne pas être reproductible puisque nous sommes en présence d'une solution éthérée fortement volatile, et donc de faciliter l'utilisation de la méthode, nous avons recherché un étalon interne compatible avec nos échantillons. Notre but était de choisir un étalon interne de manière à ce qu'il présente des caractéristiques de structures moléculaires proches de celles des acides phénoliques. La recherche de ce témoin a dû se faire sur des solutions extraites d'eau de trempe car dans l'éventualité où les eaux échantillonnées contiennent nos 7 acides-phénols, le standard interne doit pouvoir :

- . être élué distinctement des autres composés ;
- . dans un temps correct pour la chromatographie ;
- . être d'une grande pureté ;
- . ne pas interférer avec d'autres pics susceptibles d'être élués et donc contenus dans les eaux de trempes industrielles.

Après avoir déterminé les temps de rétention du pyrogallol, des acides salicylique, acétylsalicylique, ascorbique, notre choix s'est porté finalement sur l'orcinol (2-5 dihydroxytoluène) dont le temps de rétention est de 8,8 minutes. Si l'on se réfère au Tableau XII, le standard interne est élué en tête des 7 acides que nous recherchons mais immédiatement après des acides phénoliques dont la présence est bien connue chez tous les végétaux ; les acides gallique et protocatéchique (3, 4, 5 hydroxybenzoïque et 3,4 hydroxybenzoïque). La quantité d'orcinol ajoutée est calculée afin de donner une hauteur de pic semblable à celle de la majorité des acides phénoliques.

L'étalonnage interne s'est effectué en ajoutant 20 μ l d'une solution méthanolique d'orcinol à 50 g/l dans l'échantillon avant concentration dans le Kuderna. Les courbes d'étalonnages ont été réalisées avec 5 solutions d'acides phénoliques de concentrations différentes, extraites selon le procédé déterminé précédemment, ce qui permet de déterminer les coefficients de réponse de chaque acide phénol par rapport à l'orcinol.

Pour chaque acide, et à chaque concentration, il suffit de calculer le rapport :

$$r_x = \frac{h_x}{h_s} \quad \text{avec}$$

h_x = hauteur du pic dû à la substance x en mm

h_s = hauteur du pic dû au standard en mm.

Ces deux hauteurs seront éventuellement corrigées par un facteur tenant compte d'une modification de la sensibilité au cours du déroulement de l'analyse.

La courbe $r_x = f(C_x)$ avec

C_x = concentration de la substance x dans la solution étudiée, est une droite pour chaque acide phénolique comme le montre la figure 8.

Il est donc possible de calculer la pente P_x de chaque droite ; la liste de ces différents coefficients apparaît dans le Tableau XVII. La concentration en acide phénolique d'un échantillon est définie en effectuant le rapport des hauteurs de pics des acides et du standard et en multipliant par la pente de la droite correspondante

$$X_{\text{mg/l}} = \frac{h_x}{h_s} \cdot P_x$$

Un test de répétabilité effectué sur la première eau de trempé que nous ayons dosée donne de bons résultats sur les différents acides phénoliques, avec des coefficients de variation sensiblement identiques à ceux obtenus sur une solution étalon (Tableau XVIII).

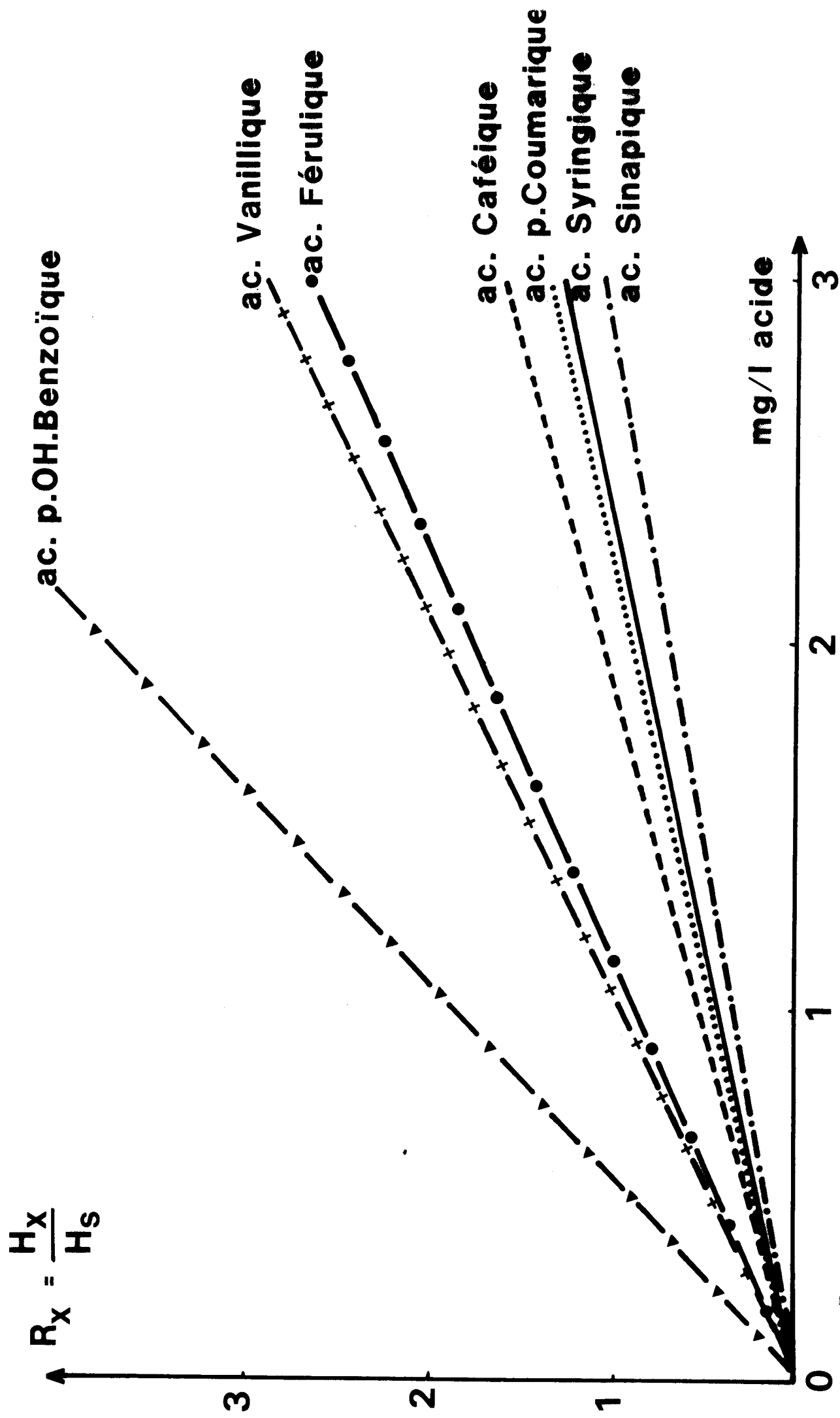


Figure n° 8

COURBES D'ETALONNAGE DES ACIDES PHENOLIQUES



TABLEAU XVII

COEFFICIENTS DE REPONSE DES ACIDES PHENOLIQUES

Acides	Concentration mg/l	R _x	P _x	Acides	Concentration mg/l	R _x	P _x
Parahydroxy- benzoïque	5,8	9,9	0,54	Para- coumarique	5,0	1,9	2,2
	2,9	5,58			2,5	0,58	
	1,16	2,12			1,0	0,43	
	0,58	1,17			0,5	0,25	
	0,29	0,59			0,25	0,13	
Vanillique	4,2	4,4	1,04	Ferulique	3,6	2,8	1,15
	2,1	2			1,8	1,8	
	0,84	0,96			0,72	0,58	
	0,42	0,41			0,36	0,3	
	0,21	0,20			0,18	0,15	
Caféique	4,8	2,75	1,90	Sinapique	4,6	1,7	2,78
	2,4	1,25			2,3	0,75	
	0,96	0,61			0,92	0,4	
	0,48	0,22			0,46	0,10	
	0,24	0,1			0,23	0,08	
Syringique	3,2	0,95	2,3				
	1,6	0,62					
	0,64	0,25					
	0,32	0,21					
	0,16	0,13					



Acides	\bar{X} mg/l	n	σ	CV %
Parahydroxybenzoïque	0,44	4	0,02	4,5
Vanillique	0,79	4	0,05	6,3
Caféique	0,37	4	0,03	6,6
Syringique	0,20	4	0,02	8,3
Paracoumarique	0,28	4	0,02	7,3
Férulique	0,48	4	0,05	9,0
Sinapique	0,19	4	0,02	10,5

TABLEAU XVIII - REPETABILITE SUR UNE EAU DE TREMPE INDUSTRIELLE

A la fin de chaque chromatographie, la colonne est reconditionnée pendant six minutes dans le solvant d'élution initial. Le stockage de la colonne en phase inversée s'effectuant dans le méthanol, il est impératif d'éluer avec de l'eau distillée avant d'utiliser le méthanol qui risque de précipiter les phosphates du tampon demeurés sur le garnissage de la colonne.

2.2. RESULTATS

Il est nécessaire de pratiquer l'extraction et le dosage des acides phénoliques le plus rapidement possible, ceci afin d'éviter toute modification chimique de l'échantillon et notamment l'isomérisation possible des acides cinnamiques (exemple l'acide férulique, figure 9). Le nombre d'acides recherchés étant relativement important, une isomérisation entraînerait pour certains acides un dédoublement des pics d'où de grandes difficultés lors de l'identification et la quantification.

Le dosage des acides phénoliques a été entrepris sur tous les échantillons provenant des différents traitements envisagés lors de la première série d'essais (Tableaux XIX A et B), ces traitements ayant été abandonnés car incompatibles avec une germination normale. Notons simplement que le traitement au charbon actif (5 c) qui avait donné les

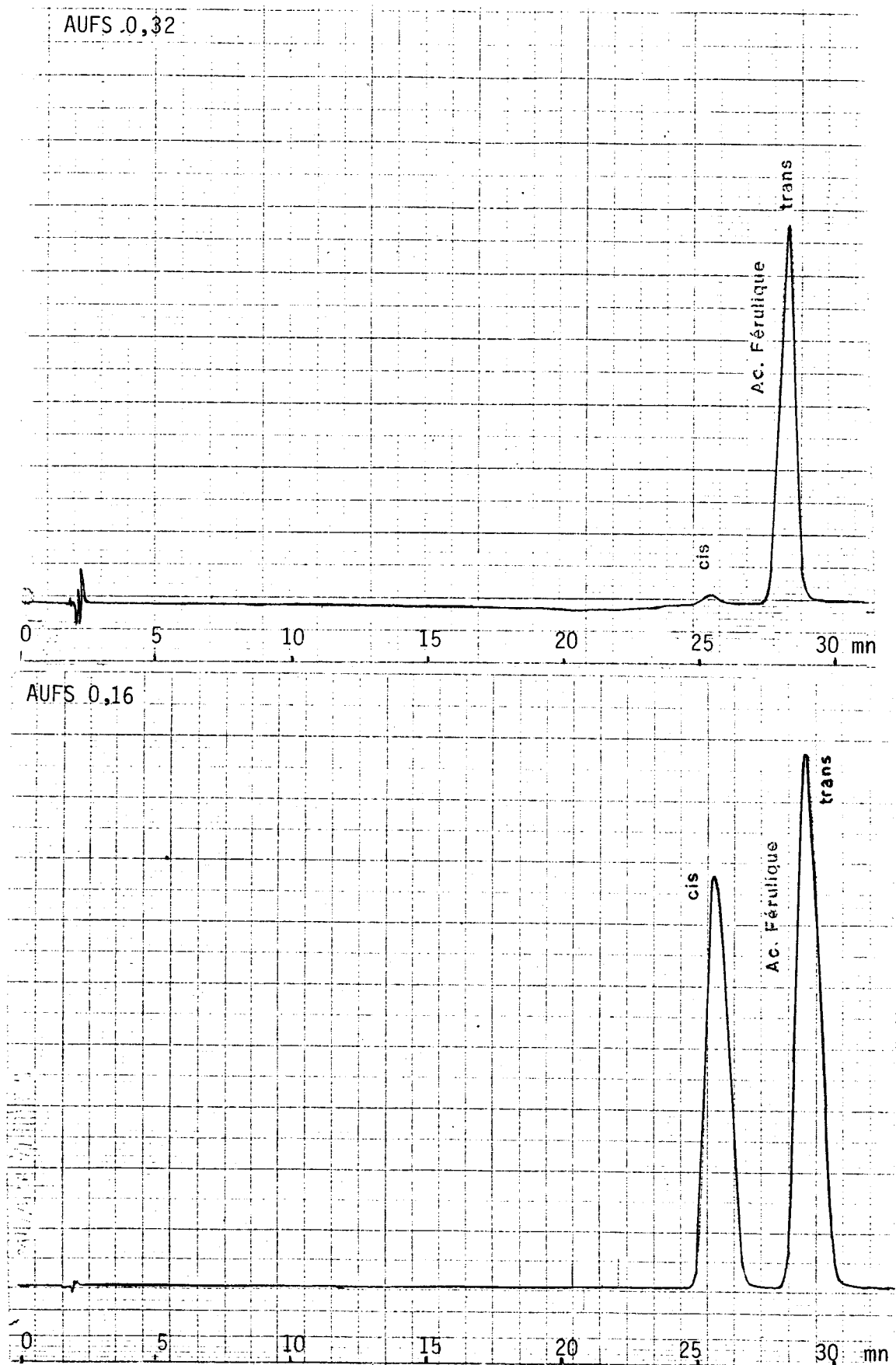


Figure n° 9 - ISOMERISATION DE L'ACIDE FERULIQUE



Echantillons:	1	1A	1B	1C	3	3A	5	5A	5B	5C
Acides										
Acide Parahydroxybenzoïque mg/l	0,80	0,6	0,30	0,3	0,75	0,5	0,50	0,40	0,45	0,15
Acide Vanillique mg/l	1,80	0,8	0,70	1,2	1,30	1,05	1,1	0,6	1,0	0,25
Acide Caféique mg/l	0,13	0,07	0,07	ND	0,05	ND	0,11	0,05	0,08	0,01
Acide Syringique mg/l	1,10	0,2	0,6	0,24	0,70	0,5	0,25	0,08	ND	0,11
Acide Paracoumarique mg/l	1,07	0,4	0,55	0,45	0,45	0,10	0,65	0,4	0,3	ND
Acide Férulique mg/l	1,50	1,0	0,95	1,10	1,40	0,57	0,50	0,30	0,30	0,06
Acide Sinapique mg/l	0,73	0,2	0,2	0,15	0,23	0,13	0,50	0,40	0,25	0,03

ND = pic non détecté

TABLEAU XIX A

DOSAGE DES ACIDES PHENOLIQUES LORS DE LA RECHERCHE D'UN TRAITEMENT

(Orge 2RH Sonja - Eau de lère trempé - Cf. Tableau I A)



Echantillons	2	2A	2B	2C	4	4A	4B
Acides							
Acide Parahydroxybenzoïque mg/l	0,07	0,02	0,02	0,05	0,10	0,03	0,03
Acide Vanillique mg/l	0,40	0,15	0,15	0,20	0,11	0,07	0,10
Acide Caféique mg/l	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acide Syringique mg/l	0,70	0,10	0,10	0,30	0,20	0,20	0,20
Acide Paracoumarique mg/l	0,4	ND	0,30	ND	0,08	0,05	0,04
Acide Férulique mg/l	0,9	ND	0,34	ND	0,14	0,06	0,03
Acide Sinapique mg/l	0,5	ND	0,2	ND	0,08	0,04	0,04

ND = pic non détecté

TABLEAU XIX B

DOSAGE DES ACIDES PHENOLIQUES LORS DE LA RECHERCHE D'UN TRAITEMENT

(Orge 2RH Sonja - Eau de 2ème trempé - Cf. Tableau I B)



meilleurs rendements d'épuration provoque une nette diminution des acides phénoliques notamment des acides férulique, sinapique, paracoumarique et vanillique.

La sélection d'un traitement lors d'essais complémentaires effectués sur une eau provenant d'une variété d'orge différente (figure 10) a été faite en tenant compte en priorité de son pouvoir d'épuration et de son action sur la germination (Tableau XX). Le traitement au polychlorure d'aluminium semble avoir une action plus générale sur les différents acides phénoliques et non plus sélective comme les précédents. On remarque que le traitement n°6 qui avait produit une eau parfaitement limpide ; mais n'a pas été retenu à cause de son coût élevé, possède ici aussi une très grande capacité d'épuration puisque les acides vanillique et paracoumarique ne sont plus détectés. La figure 11 montre les chromatogrammes d'une eau de première trempe, de la même eau ayant subi le traitement au polychlorure d'aluminium et de l'effet du traitement n°6.

L'optimisation du traitement et l'essai de recyclage des boues qui n'avait pas été concluant vis-à-vis de la germination, montrent qu'il est possible d'ajuster l'intensité du traitement et que la recirculation d'une fraction des boues (50 %) peut occasionner une augmentation de la concentration en acides phénols dans les eaux (Tableau XXI). Une certaine souplesse dans le traitement peut être bénéfique, car si les concentrations en acides dans les eaux de seconde trempe sont relativement faibles, des variations importantes peuvent survenir dans la composition de la première eau de trempage comme le montre la figure 12 où la concentration en acide caféique est supérieure à 2 mg/l, ce qui est exceptionnellement élevé. Chaque acide phénolique dépasse cependant très rarement la concentration de 1 mg/l dans la première eau de trempage, et ces concentrations diminuent rapidement au cours des trempes ultérieures. Le traitement destiné à épurer les eaux diminue ces concentrations mais devant les faibles quantités d'acides phénoliques détectées, la question se pose de savoir s'ils peuvent être responsables des inhibitions de germination que l'on observe.

Nous avons effectué des tests de germination avec des solutions pures d'acides phénoliques seuls puis en mélange et à des concentrations variables.

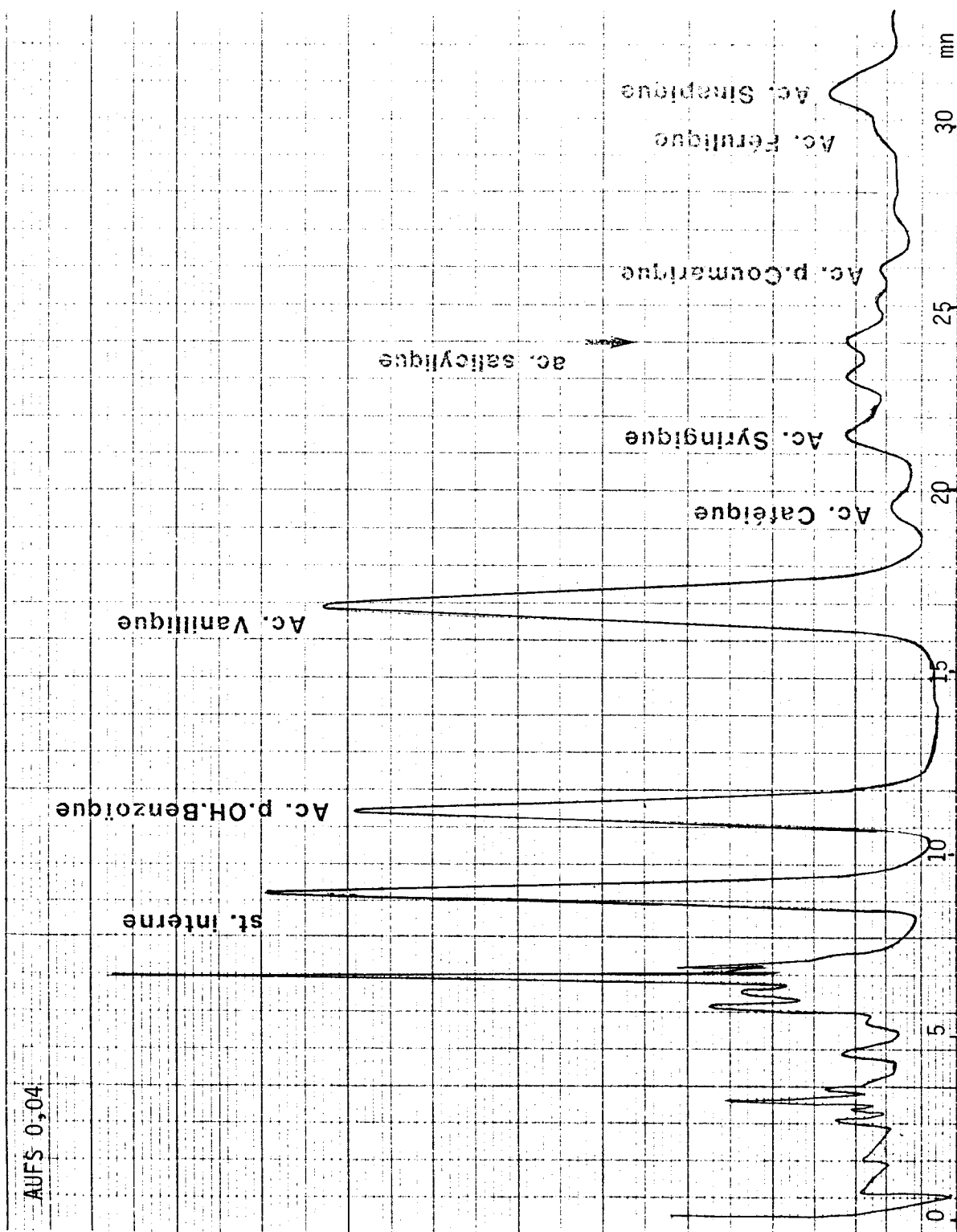


Figure n° 10 - EAU DE TREMPE (6RH GERBEL)



Traitements	Eau de 1ère trempé	Polychlorure d'aluminium 1	Sulfate d'alumine 2	FeCl ₃ 3	Polyélectrolyte: ERPAFLOC 115	6
Acides mg/l						
Parahydroxybenzoïque	0,20	0,20	0,15	0,13	0,15	0,02
Vanillique	0,60	0,55	0,52	0,27	0,15	ND
Caféique	0,25	0,15	0,20	ND	ND	0,06
Syringique	0,32	0,15	0,15	0,12	0,15	0,10
Paracoumarique	0,15	0,12	0,09	0,12	0,06	ND
Férulique	0,10	ND	0,10	ND	0,05	0,03
Sinapique	0,40	0,20	0,32	0,29	0,30	0,15
Inhibitions:	55	0	17	17	18	0

TABLEAU XX

DOSAGE DES ACIDES PHENOLIQUES PENDANT L'ETUDE DE L'EFFICACITE DE DIFFERENTS TRAITEMENTS
(Orge 6 RH Gerbel - Eau de 1ère trempé - Cf. Tableau VI)



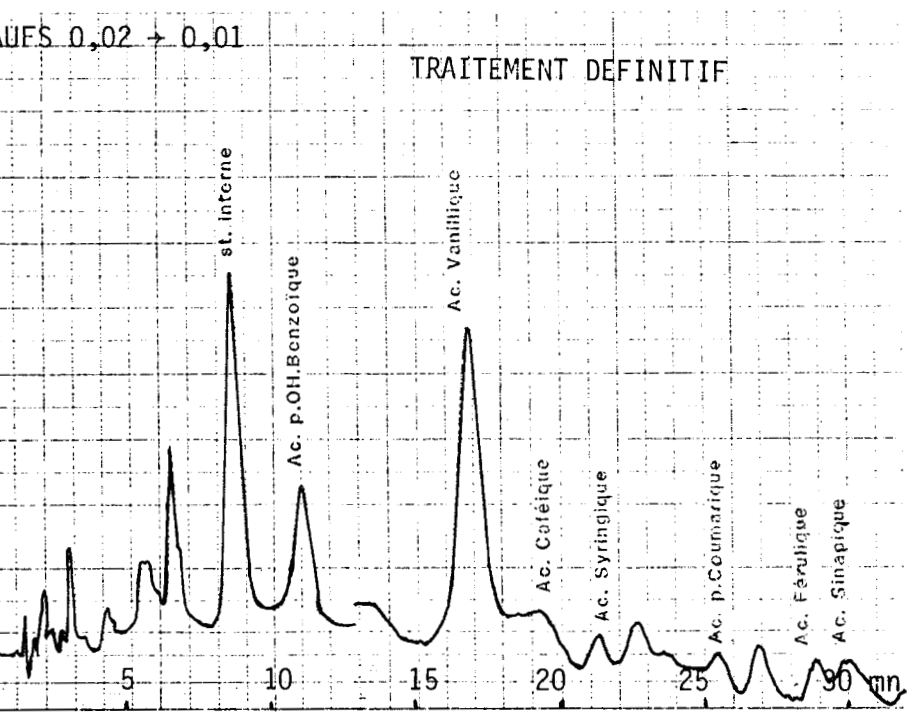
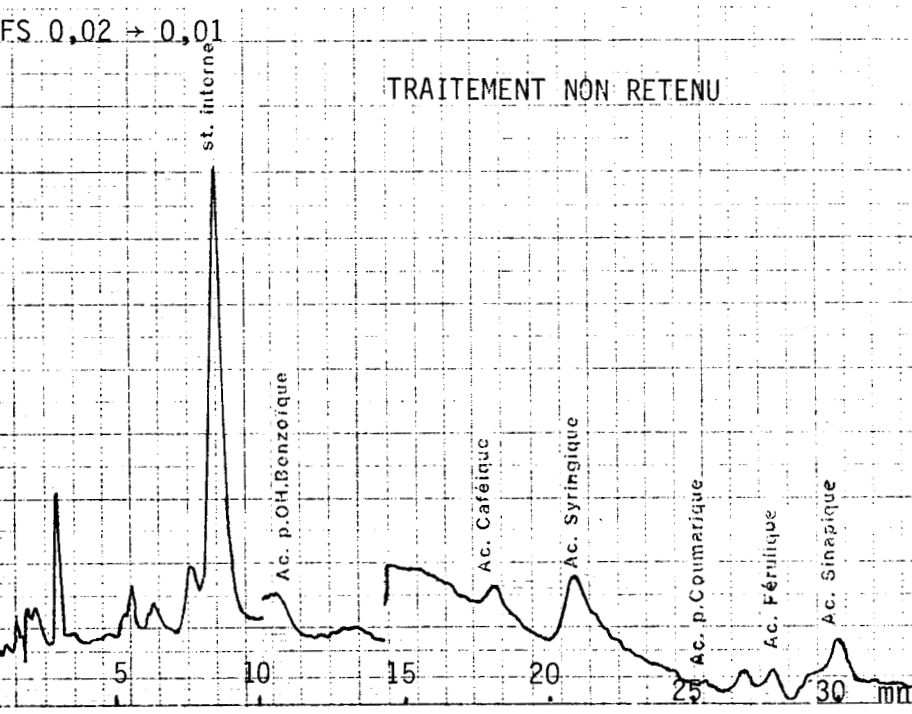
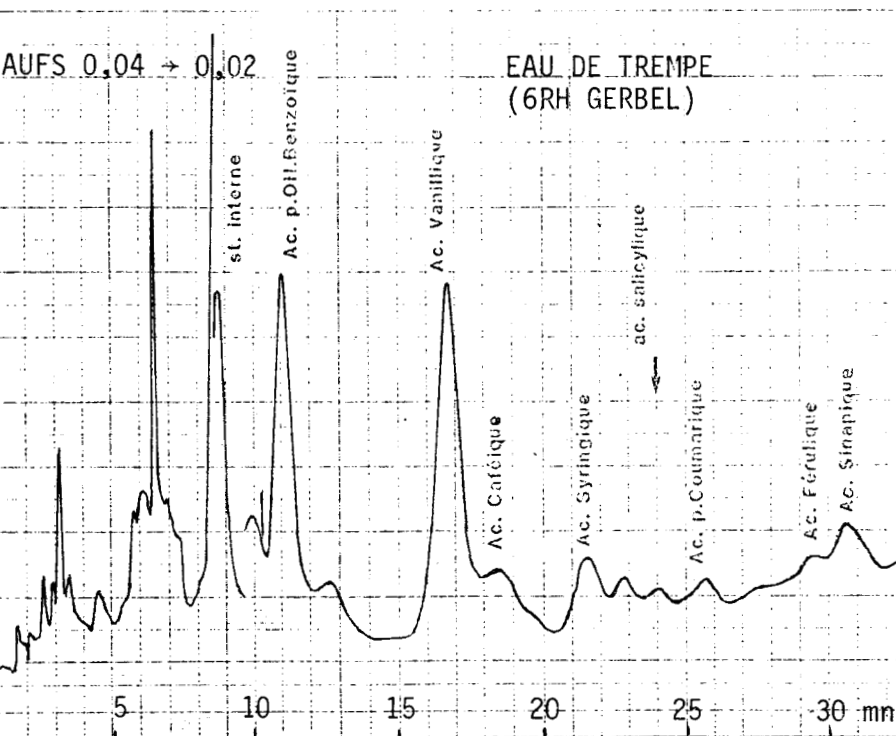


Figure n° 11

EFFET DU TRAITEMENT D'EPURATION



Acides mg/l	Traitement : Polychlorure d'aluminium	0,2 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l et recirculation des boues à 50 %	0,7 mg/l	1 mg/l
Parahydroxybenzoïque		0,20	0,10	0,15	0,15	0,02
Vanillique		0,2	ND	ND	0,25	0,15
Caféique		0,08	0,08	0,08	0,02	0,02
Syringique		0,15	0,10	0,2	0,2	0,15
Paracoumarique		0,02	0,2	0,2	0,06	0,10
Férulique		ND	ND	ND	ND	ND
Sinapique		0,25	0,25	0,30	0,20	0,20

TABLEAU XXI

ACIDES PHENOLIQUES LORS DE L'OPTIMISATION DU TRAITEMENT

(Orge 6RH Gerbel - Eau de lère trempe - Cf. Tableau VII)



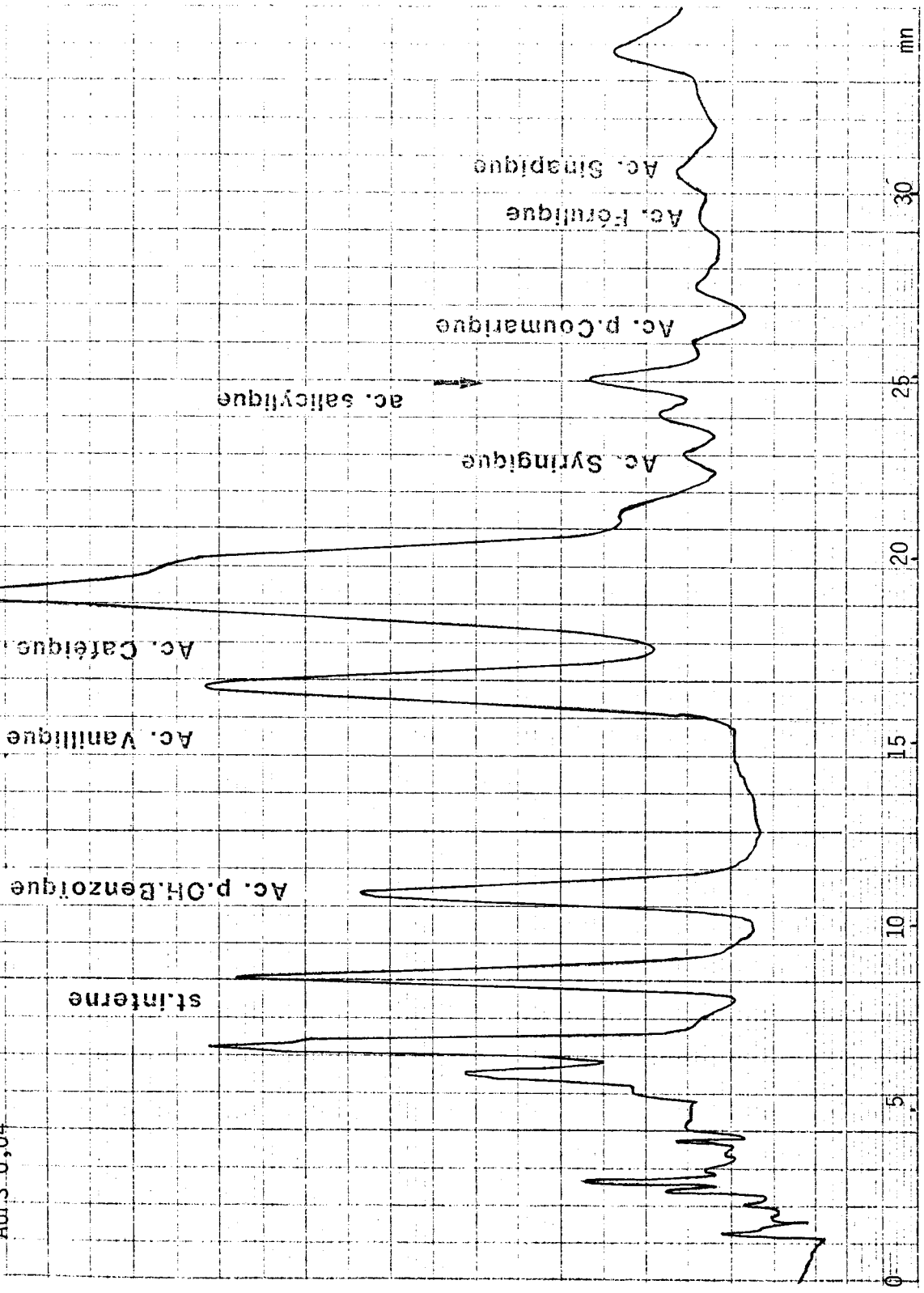


Figure n° 12

INFLUENCE DE L'ORIGINE DE L'ECHANTILLON SUR LE DOSAGE DES ACIDES PHENOLIQUES
(Orge 6RH Nympe de diverses provenances)



Parmi les 7 acides phénoliques que nous avons étudiés et quantifiés dans les eaux de trempe, aucun n'entraîne une inhibition de germination véritablement significative à des concentrations de 100 mg/l. A cette concentration, seuls les acides férulique et vanillique entraînent une inhibition de l'ordre de 15 % qui s'annule lorsque la concentration est de 25 mg/l. L'acide vanillique possède, de plus, la particularité de freiner assez nettement l'élongation de la racine principale ; cette action freinante persiste plus longtemps que l'activité inhibitrice proprement dite puisqu'elle se manifeste encore à des concentrations de 10 mg/l.

Une solution contenant chacun des acides phénoliques à la concentration de 100 mg/l entraîne une inhibition de 73 % qui diminue rapidement, puisqu'elle n'est plus que de 10 % pour une concentration de 25 mg/l. Ce résultat semble cependant indiquer une certaine synergie d'action de ces composés.

L'acide salicylique (dérivé de l'acide benzoïque possédant un OH en position ortho par rapport à la fonction acide) dont l'activité inhibitrice a été mise en évidence récemment (TSAO, 1980 ; KHURANA et *al.*, 1980) montre par contre une action inhibitrice de la germination plus marquée et un net ralentissement de l'élongation de la racine principale. Une solution à la concentration de 100 mg/l inhibe fortement la germination (94 % d'inhibition) mais ce pouvoir inhibiteur décroît cependant rapidement : 10 % d'inhibition à 25 mg/l et pratiquement aucune à 10 mg/l.

Une solution contenant 20 mg/l des 7 acides phénoliques auxquels on ajoute l'acide salicylique en même quantité montre une inhibition de 15 %, ce qui semble confirmer le rôle inhibiteur de l'acide salicylique.

Devant ce résultat, nous avons repris l'étude chromatographique de l'acide salicylique qui avait été abordée lors de la recherche d'un étalon interne. Son temps de rétention (23,5 mn) qui le situe entre les acides syringique et paracoumarique nous l'avait fait écarter.

De la même manière, nous avons identifié par leur temps de rétention, les acides gallique (3-4-5 hydroxybenzoïque) et protocatéchique (3-4 hydroxybenzoïque) (figure 13). Nous n'avons pas étalonné ces trois acides

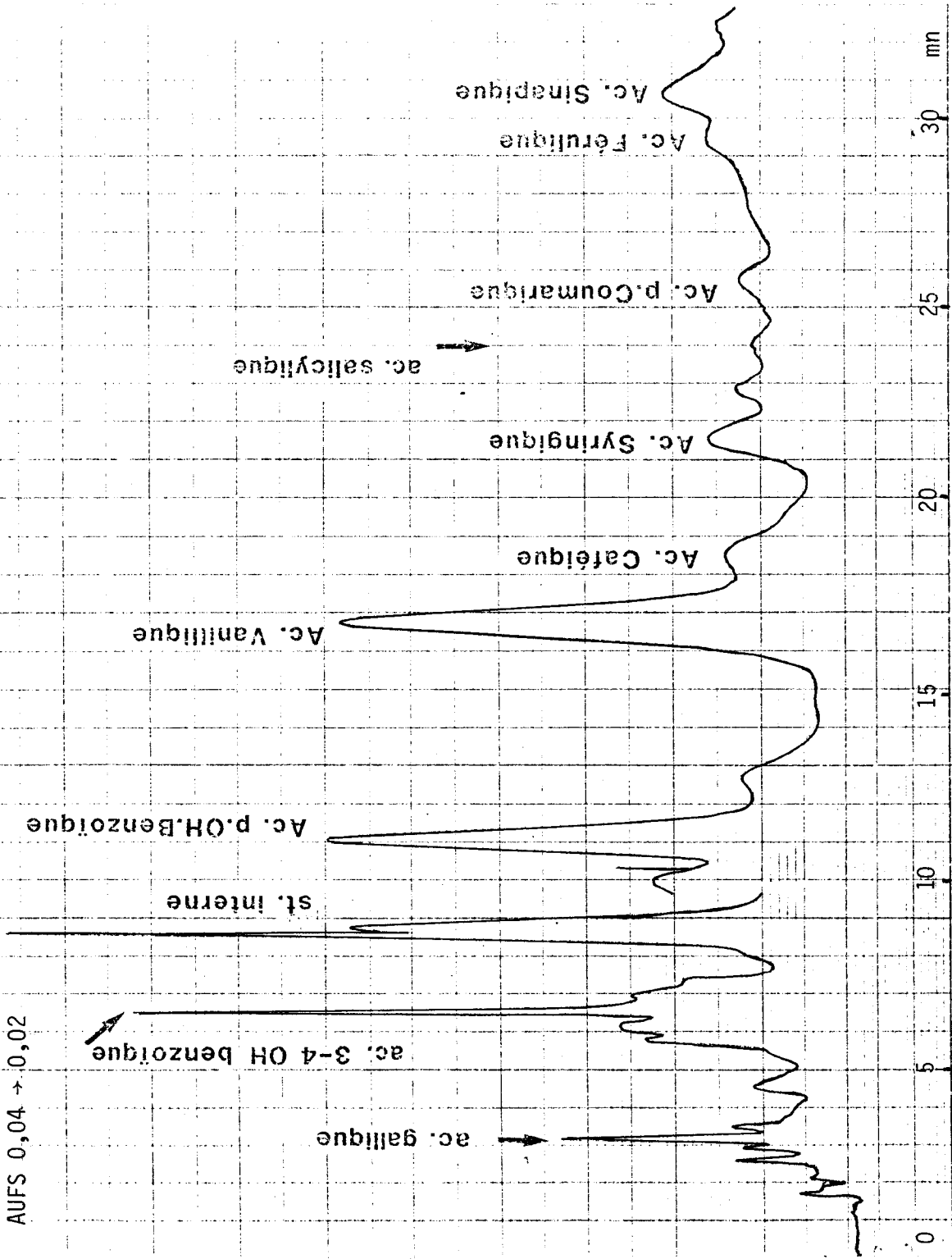


Figure n° 13
DOSAGE DES ACIDES PHENOLIQUES DANS UNE EAU DE TREMPE INDUSTRIELLE (Orge 6RH Nympe)



phénoliques que l'on retrouve dans les eaux de trempage, à des concentrations estimées, d'après les hauteurs de pics, inférieures au mg/l ; d'autant que les acides gallique et protocatéchique ne sont pas connus pour exercer, même à forte concentration une activité inhibitrice spécifique.

2.3. DISCUSSION - CONCLUSION

Divers auteurs s'accordent à penser qu'on a peut-être exagéré le rôle joué par les inhibiteurs de germination (WAREING, 1965 ; ROLLIN, 1966) parce que les techniques utilisées pour étudier ces substances ne sont pas très satisfaisantes ou plus exactement parce que les résultats fournis par ces techniques pouvaient donner lieu à des interprétations différentes. Actuellement encore, rien ne permet d'affirmer qu'une substance endogène, localisée dans les cellules d'un organe a le même effet *in situ* que lorsqu'elle est apportée de façon exogène.

Les résultats que nous avons obtenus lors de nos tests de germination semblent concorder avec les résultats de MAYER et *al.* (1975) qui constatent une inhibition de germination de 50 % pour des concentrations au moins égales à 10^{-3} M/l, (ce qui correspond à des quantités supérieures à 150 mg/l) lorsque les acides phénoliques sont testés seuls.

Les quantités d'acides phénoliques détectées dans l'eau de trempage sont fortement éloignées de celles qui peuvent induire une inhibition de germination ou même un freinage de l'élongation de la racine principale.

Il faut replacer notre étude dans son cadre industriel où l'eau de trempage, après épuration, peut être réutilisée pour les trempes ultérieures et apporter ainsi une quantité supplémentaire de substances inhibitrices dont l'effet viendra s'ajouter à celles qui existent naturellement dans l'orge.

Nous avons adapté assez facilement notre technique d'analyse à l'orge même ; l'extraction se faisant sur du grain finement moulu. Le tableau XXII représente les concentrations en acides phénoliques d'une orge 6RH (Nympe), la concentration dans les écorces et dans l'eau d'une trempage industrielle.

Acides	Eau de trempe industrielle mg/l **	Orge (Nymphe) 6 RH - mg/kg	Ecorces (Nymphe) 6 RH - mg/kg ***
Parahydroxybenzoïque	0,20	0,40	2,30
Vanillique	0,60	1,25	7,80
Caféique	0,20	0,50	3,90
Syringique	0,32	0,80	2,90
Paracoumarique	0,12	1,60	30,40
Férulique	0,10	1,20	19,30
Sinapique	0,35	0,60	17,00

TABLEAU XXII - TENEURS EN ACIDES PHENOLIQUES DANS L'ORGE ET L'EAU DE TREMPÉ

** Eau de trempe, Orge 6RH Nymphe 156 Tonnes - Eau 80 m³

*** Ecorces de l'orge Nymphe qui représentent 10 % du poids de l'orge.

Les enveloppes contiennent donc des substances inhibitrices et vont pouvoir intervenir de façons différentes, soit par leur "dureté", soit par leur imperméabilité à l'eau ou à l'oxygène. Des polyphénols-oxydases en favorisant l'oxydation des composés phénoliques contribuent à limiter l'apport d'oxygène à l'embryon.

Peu de travaux ont été effectués sur la teneur des orges en acides phénoliques mais d'ores et déjà, toute généralisation paraît difficile. Les résultats sont dépendants des variétés d'orges utilisées mais aussi très certainement des techniques d'extractions et de dosages employés comme le montre le tableau XXIII.

Acides	MAC MURROUGH 1980			SLOMINSKI 1980 après stockage de	
	ENSIA	ANT. 13	EMMA	14 jours	42 jours
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	g/kg	g/kg
Caféique	0,40	traces	traces	ND	ND
Paracoumarique	1,25	1,4	0,2	0,28	0,38
Férulique	0,50	1,2	0,6	1,38	0,96
Syringique	0,80	2,2	0,1	0,27	0,25
Vanillique	1,60	1,7	0,6	0,08	0,09
Sinapique	1,20	NR	NR	0,05	0,05
Parahydroxybenzoïque	0,60	NR	NR	1,07	0,92

TABLEAU XXIII - ACIDES PHENOLIQUES DANS DIFFERENTES ORGES

ND : pic non détecté

NR : acide phénolique non recherché

Des différences importantes s'expriment et il paraît évident que le rôle et l'importance de l'acide férulique libre, pour ne prendre que cet exemple ne peut être identique selon que cet acide se trouve à la concentration de 0,6 à 1 mg/kg ou de 1 à 1,4 g/kg.

Il semble admis en revanche que lors du stockage, une légère baisse de la concentration en acides phénoliques puisse intervenir (SOLOMAKHINA, 1979 ; SLOMINSKI, 1980).

Il serait vain de nier que la recherche des acides phénoliques et leur quantification dans les eaux de trempage n'ont pas répondu à notre attente dans l'immédiat. S'il est incontestable que les premières eaux de trempage possèdent des pouvoirs inhibiteurs différents mais bien réels, il paraît de même évident que les seuls acides phénoliques, en raison de leur faible concentration dans les eaux ne peuvent être directement responsables de la totalité de cette inhibition. Nous verrons cependant qu'ils peuvent agir d'une autre façon sur la germination et qu'il serait imprudent de négliger leur action.

Le procédé d'épuration mis au point dans la première partie de l'étude est du type physico-chimique et son fonctionnement au stade d'une installation pilote est imminent. Lors de travaux antérieurs, nous avons participé à la mise au point du recyclage d'eau épurée dans une malterie ; l'épuration de type biologique s'effectuant par la méthode classique des boues activées. Il semble qu'après une année de fonctionnement, des problèmes soient survenus non pas, comme on pouvait le craindre au stade de la germination de l'orge, mais dans le fonctionnement de la station d'épuration elle-même. L'eau recyclée a été mise en cause car, en effet, l'arrêt du recyclage a permis de revenir rapidement à une situation normale.

Cet "accident" n'a pas fait l'objet d'une étude précise et seules des hypothèses peuvent être avancées. Lors de l'épuration biologique, le devenir des acides phénoliques n'a pas été étudié ; on peut dès lors craindre leur persistance dans l'eau puis une accumulation qui se révélerait néfaste sur les microorganismes.

L'action antimicrobienne et même antifongique de certains acides-phénols est connue depuis longtemps si l'on se réfère notamment à l'acide salicylique dont l'action a été révélée au siècle dernier. De nombreux acides-phénols et certains de leurs esters possèdent une activité antibactérienne et antifongique et cette classe chimique un peu oubliée peut représenter, selon certains chercheurs (VASQUEZ-NEGRE, 1980 ; KNUSEL, 1972) un intérêt dans le présent et dans l'avenir comme antiseptique notamment. Il est alors permis de supposer que lors de l'épuration biologique certains composés dont les acides phénoliques non seulement ne sont pas métabolisés mais au contraire s'accumulent pouvant ainsi atteindre des concentrations leur permettant d'exercer une activité inhibitrice et peut-être même létale vis-à-vis de la flore bactérienne.

Si cette hypothèse s'avérait exacte, l'épuration physico-chimique posséderait l'avantage d'éliminer une fraction des acides phénoliques.

Ces acides-phénols possèdent un spectre d'action assez large, certains acides cinnamiques ayant une activité inhibitrice vis-à-vis de *Saccharomyces Cerevisiae* (BARANOWSKI et al., 1980). L'acide paracoumarique à la concentration de 100 ppm augmente considérablement la phase de latence de *Saccharomyces Cerevisiae*, de même que l'acide férulique qui, à partir de 250 ppm, peut inhiber complètement la croissance de la levure, ce qui

laisse supposer que les acides phénoliques peuvent encore occasionner sinon des incidents, du moins des retards lors de la fermentation principale en brasserie.

Cette technique d'analyse des acides phénoliques peut donc se révéler précieuse car elle est simple au niveau de l'extraction et relativement rapide ; elle possède l'avantage de s'adapter aux différentes formes d'échantillons susceptibles d'être rencontrés c'est-à-dire, l'orge, l'eau de trempé, le moût ou la bière.

TROISIÈME PARTIE :

RELATIONS ENTRE LES ACIDES PHENOLIQUES
ET LES PHYTOHORMONES ;
ACTION SUR LA DORMANCE

Dans une semence, c'est l'embryon qui germe ; c'est lui qui va donner naissance à la nouvelle plante et constitue la partie active et vivante de la semence.

Cet embryon, isolé et placé dans un milieu humide à une température moyenne (20° par exemple) peut parfois être rigoureusement incapable de germer ou de donner une plantule normale et vigoureuse. On dit alors que l'embryon est *dormant*.

Dans de nombreux cas, cependant, l'embryon bien que non dormant ne germe pas lorsqu'il est entouré de ses enveloppes. Celles-ci ont donc le pouvoir de s'opposer à la germination, on parle alors d'une *inhibition de germination*.

1 - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. DEFINITIONS

On regroupe sous l'appellation d'inhibition de germination tout phénomène qui s'oppose à la germination d'un embryon non dormant ; l'inhibition disparaissant si le facteur responsable est supprimé.

Beaucoup d'entre-elles sont dues aux enveloppes de la graine, il s'agit d'inhibitions tégumentaires ; les autres résultent de la présence dans le milieu de substances inhibitrices, que l'on peut qualifier d'inhibiteurs chimiques.

Nous avons vu que parmi les inhibiteurs chimiques, les acides phénoliques, contenus dans les enveloppes ou dans une solution servant au trempage de l'orge ne peuvent expliquer complètement certaines inhibitions observées.

L'inhibition embryonnaire désigne une inaptitude à la germination inhérente à l'embryon.

Certains auteurs (COME, 1970 ; EVENARI, 1957) considèrent que d'un point de vue physiologique, le terme *dormance* devrait être réservé à ces cas précis d'inaptitude à la germination.

Ce type d'inhibition ou dormance s'installe souvent lors du développement de la semence sur la plante ; lors de la maturation physiologique, c'est alors une dormance embryonnaire *primaire*. On peut aussi provoquer cette dormance ; il s'agit alors d'une dormance embryonnaire *secondaire ou induite*.

Une dormance embryonnaire se caractérise par le fait qu'elle subsiste quand on enlève les enveloppes ou quand on supprime le facteur qui l'a provoquée.

Si la dormance primaire est en place dans l'embryon de la semence, la dormance secondaire, elle, est provoquée par des conditions défavorables à la germination de cet embryon. Il semble qu'il s'agisse d'une réaction de défense de l'embryon face aux mauvaises conditions auxquelles on le soumet. Les causes de cette inhibition sont très diverses ; parmi les causes physiques, citons : une température trop élevée, un milieu trop humide, une atmosphère trop pauvre en oxygène.

Pour avoir la certitude d'être en présence d'une dormance secondaire, il est nécessaire de pouvoir rendre à nouveau l'embryon capable de germer. Un traitement par le froid, qui lève la dormance secondaire, comme la dormance primaire permet cette vérification.

Nous avons vu que les acides phénoliques possèdent probablement une part de responsabilité dans l'inhibition de germination qui s'exerce sur les semences.

Il semble que leur action ne se fasse pas uniquement par intervention directe sur la germination mais qu'ils puissent agir par l'intermédiaire d'autres composés. Certains acides phénoliques en fonction de leur concentration et peut-être de leur structure vont influencer sur la concentration et l'activité de composés tels l'acide β indolyl-acétique (MARIGO et al., 1979 ; PODSTOLSKI et al., 1981), l'acide abscissique (SOLOMAKHINA, 1980 ; RAY et al., 1980) ; qui sont classés parmi les phytohormones.

On peut définir une phytohormone, en accord avec PILET (1961) comme une substance qui, produite dans une région déterminée d'un organe

végétal, serait transportée dans une autre région pour y contrôler, régler ou encore déclencher un processus physiologique déterminé.

1.2. L'ACIDE ABSCISSIQUE

Parmi ces substances, *l'inhibiteur β* a paru le plus actif jusque vers 1964.

KOVES en 1957, VARGAS en 1958 pensent qu'il s'agit d'un ensemble de diverses substances tels l'acide salicylique, l'acide férulique et l'acide paracoumarique qui ralentiraient fortement la croissance des racines.

L'inhibiteur β présumé composé de l'association de plusieurs acides phénoliques est ainsi resté connu jusqu'en 1965 avec parfois le qualificatif de *dormine*.

Ce n'est qu'en 1965 qu'une structure chimique a été proposée pour cette substance par OHKUMA et confirmée par synthèse par CORNFORTH la même année. Ce composé est maintenant connu sous le nom d'acide abscissique (ABA) (MILBORROW, 1967).

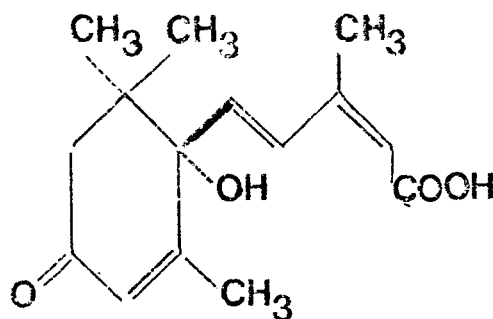


Figure n° 14 - STRUCTURE DE L'ACIDE CIS ABSCISSIQUE

La confusion qui a régné entre cet acide abscissique et les acides phénoliques pendant de nombreuses années, s'explique par le fait que ces derniers, sans être des précurseurs au sens biochimique du terme, influe cependant très fortement sur la concentration et donc l'action de l'acide abscissique qui est désormais classé parmi les phytohormones.

La découverte de cette substance a donné un nouvel élan aux recherches sur les inhibiteurs et en 1968, l'ABA était impliqué, au terme de recherches effectuées par deux équipes différentes (JACKSON, 1968 ; SONDEIMER, 1968) dans la dormance des graines. L'intérêt de cette nouvelle voie d'investigations a fait négliger presque complètement les recherches sur le rôle de l'acide abscissique en tant qu'inhibiteur propre de germination.

Dans chaque série d'expériences précitées, les auteurs mesurent la concentration en ABA dans des graines en dormance et dans des graines dont la dormance a été levée par traitement au froid.

Il ressort des résultats que le niveau de l'acide abscissique est plus élevé dans les grains dormants que dans les grains non dormants mais aussi que dans les graines dont la dormance a été préalablement levée. Il se vérifie enfin aisément que la germination de grains non dormants est inhibée par de faibles quantités d'ABA exogène.

Ces auteurs ont donc conclu que la différence de concentration en acide abscissique était représentative de la levée ou de l'absence de la dormance, ce qui a fait attribuer à l'ABA la responsabilité de l'entrée en dormance mais aussi du maintien de cet état physiologique.

Quelques expériences contradictoires (BALBOA, 1977 ; DENNIS et *al.*, 1978) ont été réalisées et ont montré qu'il n'y avait pas ou peu de réduction de l'ABA lorsque des graines étaient traitées à des températures maintenant ou non la dormance.

Bien qu'en règle générale l'ABA chute fortement lorsque les graines sont traitées à basse température, il paraît actuellement difficile d'affirmer que la réduction de l'hormone est *suffisante* pour lever la dormance mais le problème de la *nécessité* d'une diminution de l'acide abscissique libre pour la levée de dormance reste posé.

Ces incertitudes demeureront tant que le mode et le lieu d'action exacts de l'ABA ne seront pas complètement élucidés. Selon VILLIERS (1972) l'ABA inhiberait la synthèse des acides nucléiques mais n'affecterait pas directement celle des protéines. Il semble cependant que l'acide abscissique

n'affecte pas directement la synthèse des acides désoxyribonucléiques (JACOBSEN et *al.*, 1978) mais agit plus vraisemblablement au niveau de la RNA-polymérase. Dans l'orge, une application exogène d'acide abscissique aurait pour conséquence de diminuer la synthèse de l' α -amylase (HO, 1976) alors que la plupart des autres protéines ne serait pas modifiée. Il est cependant difficile d'affirmer si l'acide abscissique agit, ce qui paraît vraisemblable, sur la synthèse protéique de l' α -amylase ou au niveau de l'acide gibbèrellique dont la synthèse d' α -amylase est sous le contrôle (HABER, 1969 ; CHRISPEELS et *al.*, 1967).

Nous parvenons à ce stade à la régulation de processus métaboliques par l'intermédiaire de plusieurs médiateurs hormonaux. Si l'acide abscissique possède effectivement un rôle antagoniste vis-à-vis de l'acide gibbèrellique et notamment de son action sur la biosynthèse d'enzymes, ce contrôle peut être levé par un apport exogène massif d'acide gibbèrellique mais également par l'addition d'éthylène, phytohormone elle aussi (figure n° 15).

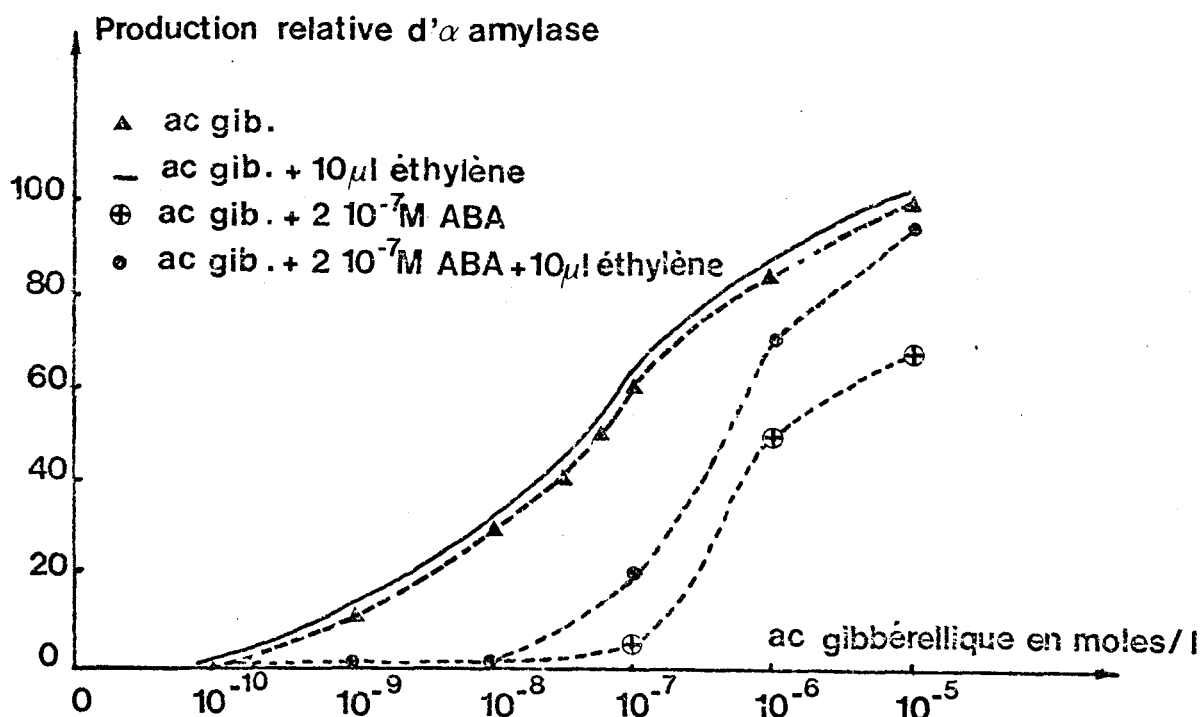


Figure n° 15 - EFFET DES HORMONES SUR LA SYNTHÈSE DE L' α -AMYLASE DE L'ORGE (d'après JACOBSEN, 1973)

Nous avons précisé, à plusieurs reprises que nous envisagions le rôle de l'acide abscissique libre. En effet, les métabolites de l'acide abscissique ne possèdent pas d'activité physiologique et il est intéressant de noter que lors de la levée de dormance (HARRISON *et al.*, 1975 ; WRIGHT, 1975) parallèlement à une diminution du taux d'ABA libre, on constate une augmentation de la teneur en acide abscissique lié avec du glucose principalement. Il semble bien établi qu'une diminution de l'acide cis abscissique libre corresponde à une augmentation proportionnelle d'acide lié (BARTHE *et al.*, 1978) ; il paraît tentant dans ces conditions de faire correspondre ces deux états à des formes respectivement actives et inactives de l'hormone (Figure n° 16). Pour MILBORROW (1970), l'abscisate de β .D glucopyranose représente l'un des principaux produits du métabolisme de l'ABA et l'activité inhibitrice qui lui était attribuée n'est en fait que le résultat d'un artéfact ; des estérases présentes dans les tissus végétaux induisant la libération d'ABA libre.

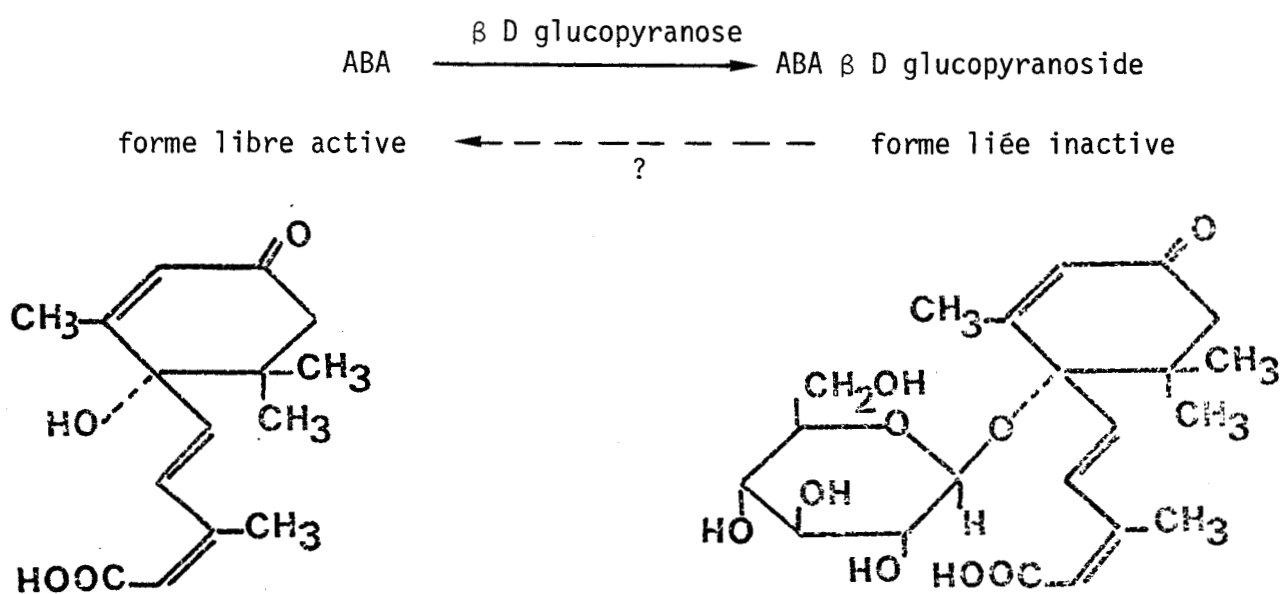


Figure n° 16 - INACTIVATION DE L'ACIDE ABSCISSIQUE
(d'après MILBORROW, 1970)

La fonction de cet acide abscissique lié n'est pas encore parfaitement défini ; chez certains végétaux la transformation forme libre forme liée est irréversible (SEMBDNER *et al.*, 1980) ; ce qui correspondrait à la première étape d'un processus de dégradation. On peut cependant envisager que cette molécule liée corresponde à une forme de stockage et/ou de transport de l'hormone.

Il existe au sujet de l'acide abscissique une dernière controverse relative à la présence de son isomère *trans* à l'état natif dans le règne végétal. La plupart des auteurs attribuent la présence de la forme *trans* à une photoisomérisation lors de l'extraction alors que LE PAGE-DEGIVRY (1979) explique la diminution d'ABA libre actif par la transformation en son isomère ; isomérisation importante puisque la forme *trans* ne possède aucune activité biologique ni inhibitrice.

A ce jour, il est unanimement admis que l'acide abscissique joue un rôle :

- dans l'*induction* de la dormance mais son rôle dans l'entretien et la levée de cette dormance reste encore obscur ;
- dans l'inhibition de germination puisque l'acide abscissique se comporte comme un inhibiteur chimique.

1.3. L'ACIDE β INDOLYL-ACETIQUE

Si le rôle de l'acide abscissique dans la dormance n'est pas encore parfaitement défini, du moins agit-il invariablement comme antagoniste des hormones de croissance. Il semble que l'action de l'acide β indolyl-acétique (Figure 17) classé parmi les hormones de croissance soit cependant beaucoup plus subtile et soumise à des régulations fort nombreuses.

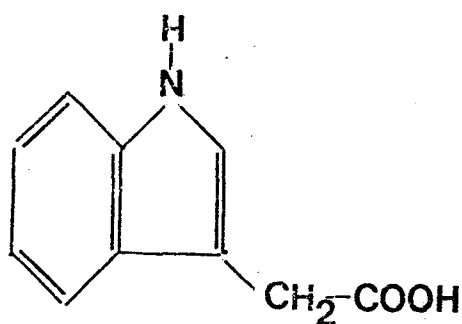


Figure n° 17 - STRUCTURE DE L'ACIDE β INDOLYL-ACETIQUE (IAA)

L'acide indol-acétique agirait effectivement de deux manières différentes selon sa concentration endogène. En faible quantité, il apparaît comme un facteur activateur de la croissance alors qu'en

quantité importante il se comporte comme un véritable inhibiteur. L'action activatrice de l'IAA a particulièrement été étudiée par PILET (1961) ; mais les hypothèses faites sur les mécanismes de son action inhibitrice restent divergentes bien que les mêmes inducteurs, c'est-à-dire les acides phénoliques soient mis en cause.

Selon MARIGO (1979), l'accumulation d'acides phénoliques entraîne une diminution du transport de l'IAA et surtout l'inhibition de l'IAA oxydase. On assiste alors à un accroissement anormal de l'indol-acétique qui aux concentrations ainsi atteintes, possède un effet inhibiteur sur la croissance.

GABER (1969) supposait que le manque de sensibilité à l'eau de l'orge, pour germer dans des conditions optimales était dû au découplage de la phosphorylation oxydative, suite à l'apparition anormale d'IAA, selon ce même processus.

Pour DATTA (1978) et PODSTOLSKI (1981), par contre, les composés phénoliques de l'orge stimuleraient l'activité de l'IAA oxydase d'où une baisse de concentration critique de l'hormone qui se trouverait en quantité insuffisante pour assurer une croissance normale.

Un environnement défavorable modifierait la destination de la phénylalanine qui au lieu d'être incorporée dans les protéines donnerait naissance à la série des acides cinnamiques des acides phénoliques.

Il n'est pas le moins paradoxal que des séries de travaux récents aboutissent aux mêmes conclusions concernant l'action négative sur la germination des acides phénoliques par l'intermédiaire de l'acide indol-acétique avec cependant des interprétations opposées du mécanisme réactionnel.

Les acides phénoliques semblent donc réguler la concentration de l'indol-acétique par l'intermédiaire de l'IAA-oxydase, mais leur action serait différente selon qu'ils possèdent 2 ou 3 OH adjacents (acides caféique, gallique) ou un seul groupement hydroxyl (acide paracoumarique) (LETHAM, 1978).

Selon FLETCHER (1964), le taux d'IAA libre qui agit en stimulant la pénétration de l'eau, en favorisant la respiration, l'hydrolyse de l'amidon et la synthèse protéique, est en étroite corrélation avec la croissance ; mais il ne peut affirmer que seul un taux d'IAA élevé permet d'assurer celle-ci. Il est possible que les formes d'existence de cet acide soient soumises à des équilibres semblables à ceux qui régissent l'acide abscissique.

UEDA (1969) suggère que l'indol-acétique n'existe pas ou très peu (1 à 10 %) sous forme libre mais serait lié à des molécules de glucose reliées par des liaisons β 1 \rightarrow 4 pouvant être hydrolysées par des cellulases (PISKORNIK, 1972).

2 - DOSAGES DES ACIDES ABSCISSIQUE ET β INDOLYL ACETIQUE

Une des premières fonctions connues de l'acide abscissique a été son rôle dans la régulation des échanges gazeux chez les végétaux et notamment dans l'ouverture des stomates (LITTLE, 1968 ; MITTELHEUSER, 1969). Les premières estimations de l'acide abscissique ont été réalisées par chromatographie sur couches minces (ZEEWART, 1971). La chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à capture d'électrons (QUARRIE, 1978 ; ALLEN, 1981) ou associée à la spectrométrie de masse (RIVIER et *al.*, 1981) s'est révélée comme une bonne technique de dosage mais nécessitant une préparation longue et fastidieuse de l'échantillon.

La chromatographie liquide à haute pression permet de doser l'acide abscissique soit avec une colonne échangeuse d'ions (CARGILE, 1978) soit avec une colonne en phase inversée (DURING, 1975 ; CIHA et *al.*, 1977 ; RAPP et *al.*, 1976).

Ayant une action physiologique moins spectaculaire, l'acide β indolyl-acétique a fait l'objet d'un nombre plus restreint de travaux. Sa détection peut s'effectuer par chromatographie sur papier ou couches minces (UEDA, 1969) ou par chromatographie en phase gazeuse (DAVIS, 1968) en utilisant notamment deux standards internes radioactifs (COHEN, 1981).

2.1. MATERIEL ET METHODE

2.1.1. Programme d'élution

Nous avons utilisé une colonne de phase inversée type C₁₈ identique à celle recommandée pour les acides phénoliques, ainsi qu'un détecteur UV à 254 nm pour la détermination des deux phytohormones.

Nous avons préféré rechercher dans l'immédiat un solvant d'élution permettant de travailler en "suppression d'ion", ce qui impose un pH relativement bas (compris entre 2,5 et 3) mais compatible avec la colonne.

Travaillant sur des mélanges standards d'acides abscissique et de β indolyl-acétique, il est possible d'éluer ces deux composés séparément en dix minutes sans variation de composition de la phase mobile et avec un débit fixe de 1 ml/mn (figure 18).

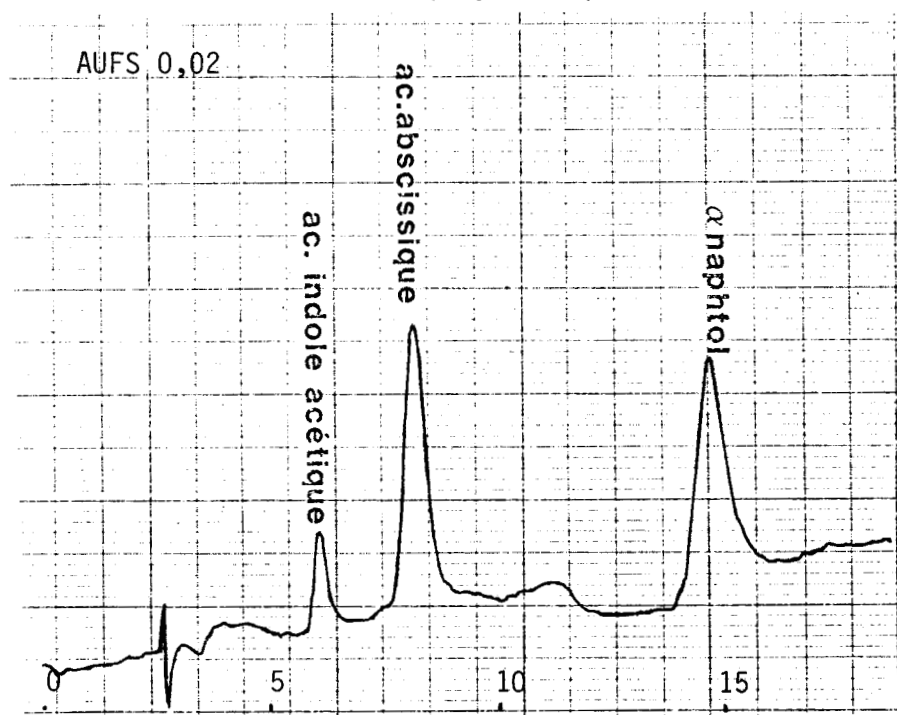


Figure n° 18 - CHROMATOGRAMME DES ACIDES ABSCISSIQUE ET INDOLE 3 ACIDE ACETIQUE COLONNE C₁₈ (MCH₁₀)

phase mobile : 55 % solution d'acide acétique 0,2 N
45 % méthanol

débit 1 ml/mn pression 1600 psi

Dans ces conditions analytiques, le pH de la solution d'acide acétique se situe à 2,7, les temps de rétention sont les suivants :

acide β indolyl acétique $T_r = 6,5$ mn

acide abscissique $T_r = 8,9$ mn

On remarque immédiatement que les deux acides dosés à partir de solutions de même concentration possèdent des réponses fort différentes, l'absorption de l'indol-acétique à la longueur d'onde utilisée étant particulièrement faible.

On vérifie aisément dans ce cas que la hauteur du pic en acide abscissique est bien proportionnelle à la concentration de la solution (figure 19).

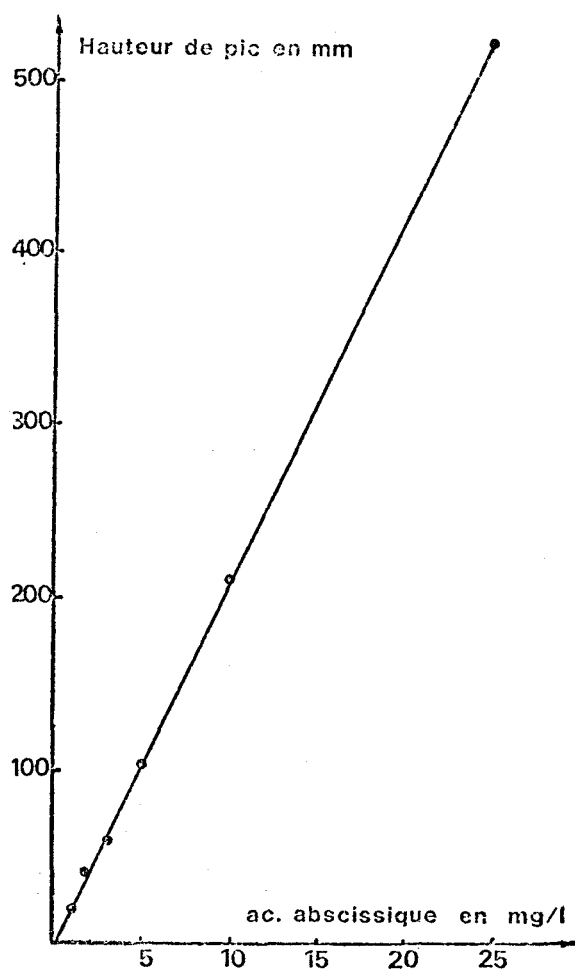


Figure n° 19 - ETALONNAGE DE L'ACIDE ABCISSIQUE

Afin d'améliorer la fiabilité de la méthode analytique, nous avons recherché un étalon interne et travaillé dans un premier temps avec l'acide sulfosalicylique dont le temps de rétention est de 3,5 mn. Nous

verrons que nous avons été obligés, par la suite, d'abandonner cet étalon interne qui ne s'éluait pas distinctement de certains autres composés.

Les modes d'extraction de l'acide abscissique (MILBORROW, 1967 ; SWEETSER, 1976) et de l'acide indole-acétique font apparaître de grandes similitudes avec le type d'extraction mis au point pour les acides phénoliques.

La phase mobile retenue pour les phytohormones contenant une proportion plus importante de méthanol, on pouvait penser que les acides phénoliques seraient élués rapidement et n'interféreraient pas avec les deux hormones (figure 20).

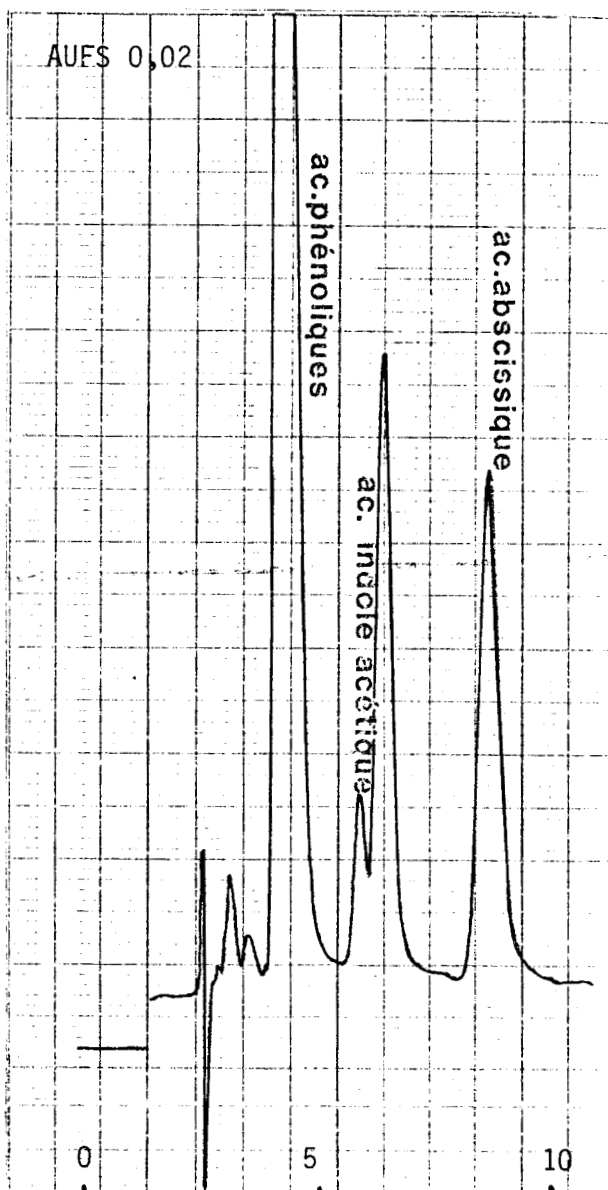


Figure n° 20 - CHROMATOGRAMME D'UNE SOLUTION ETALON D'ACIDES PHENOLIQUES, D'ACIDE ABSCISSIQUE ET D'ACIDE INDOLE ACETIQUE

Les acides phénoliques témoins sont effectivement élués rapidement mais risquent de rendre difficile l'identification de l'acide indol-acétique et masquent l'étalon interne, l'acide sulfosalicylique, que nous avons abandonné et remplacé par un acide élué après l'acide abscissique ce qui élimine théoriquement les interférences.

2.1.2. Extraction des phytohormones

Nous avons d'abord choisi de travailler sur une méthode simple (ALLEN, 1981) qui évite le stade de chromatographie sur couche mince et permet une détermination rapide à partir d'un matériel végétal.

L'extraction (figure 21) fait donc appel à une séparation liquide-liquide avec du dichlorométhane qui solubilise l'acide abscissique à pH 2. La méthode a été mise au point sur une solution d'acide *cis* abscissique à 2 mg/l et contenant un pool d'acides phénoliques.

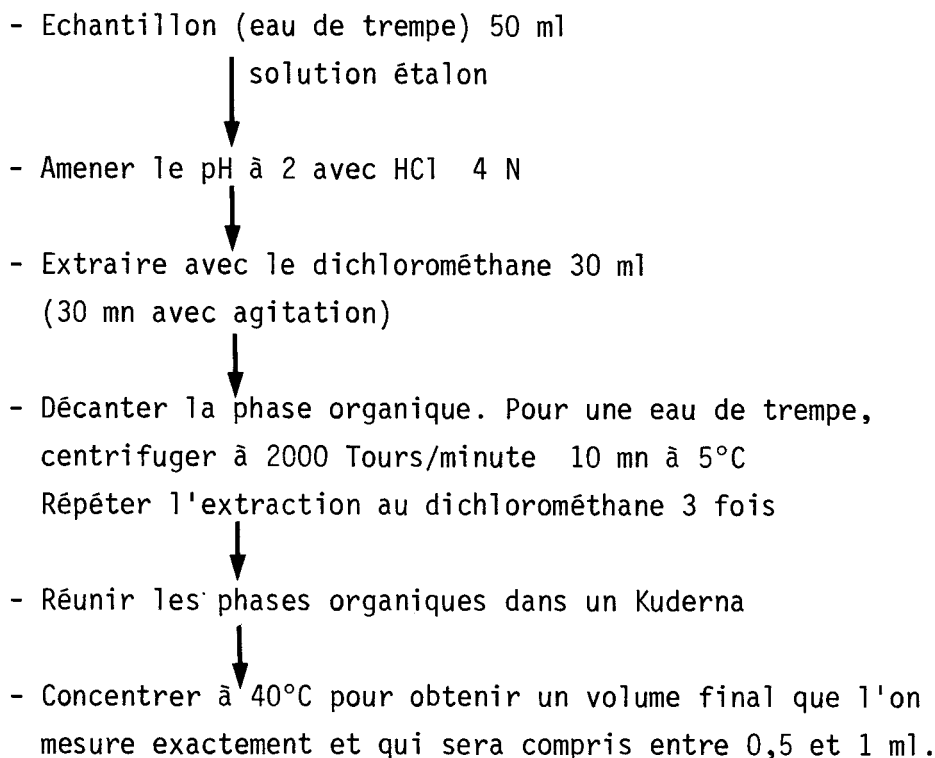


Figure n° 21 - SCHEMA D'EXTRACTION DE L'ACIDE ABSCISSIQUE
AU DICHLOROMETHANE

Les rendements d'extraction de l'acide abscissique obtenus par cette méthode sont de 71 % (figure 22).

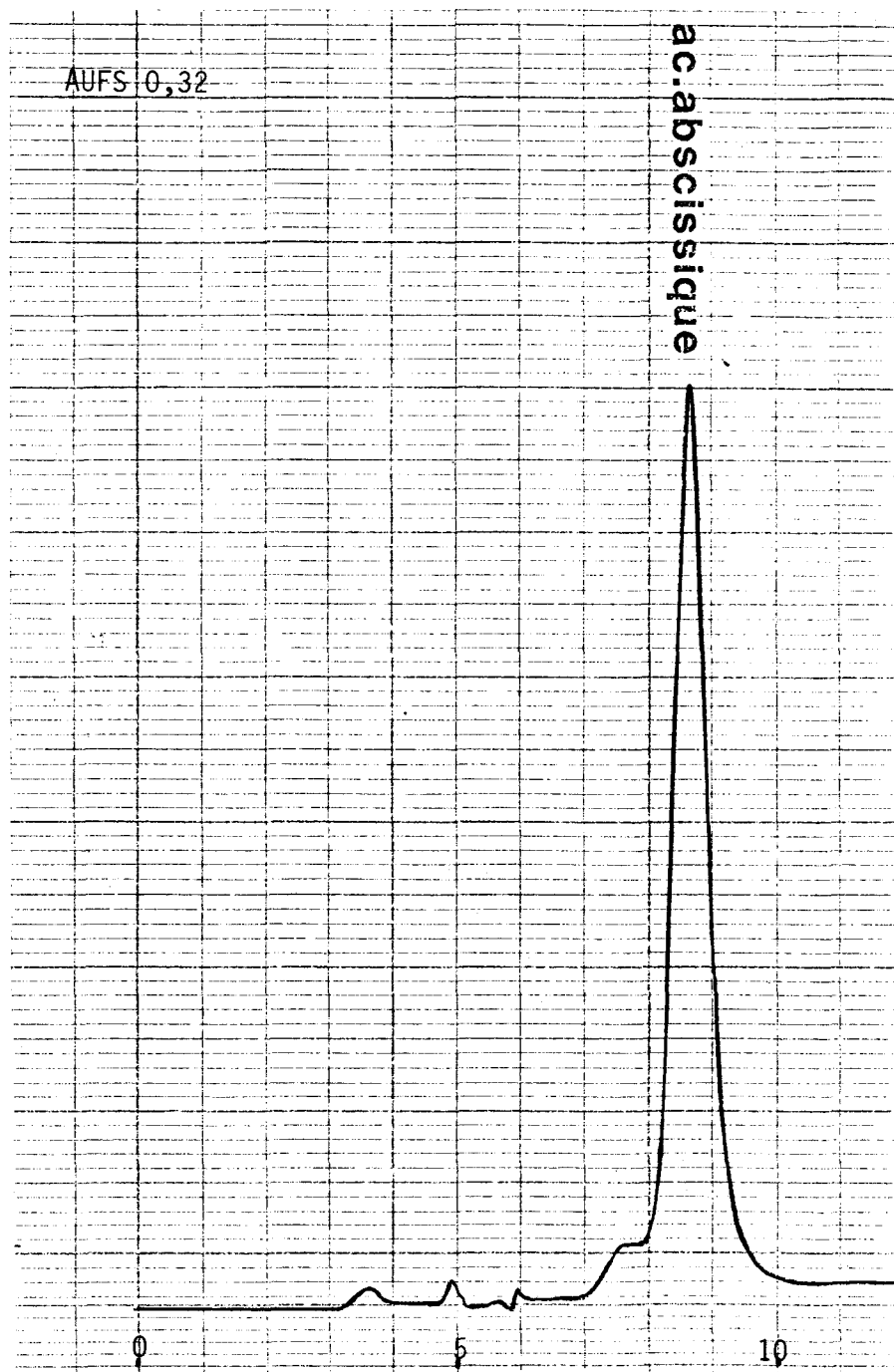


Figure n° 22 - CHROMATOGRAMME D'UNE SOLUTION CONTENANT 2 mg/l D'ACIDE ABSCISSIQUE APRES EXTRACTION AU DICHLOROMETHANE

Dès la prise d'un échantillon d'eau de trempe, ou à partir de la réalisation de la solution étalon, toutes les opérations se passent le plus possible à l'abri de la lumière. Il est en effet primordial d'éviter d'induire la transformation de l'acide *cis* abscissique en son isomère *trans*, qui ne se trouve pas à l'état naturel dans les végétaux et donc dans l'eau de trempe et ne possède pas d'activité biologique. Cette isomérisation est néanmoins une caractéristique utile pour la justification de l'identité de l'acide abscissique dans un échantillon.

Une exposition de 3 heures sous une lumière ultraviolette à 254 nm suffit, en effet, pour obtenir un mélange en parties égales de *cis* et *trans* abscissique à partir de la forme *cis* pure (figure 23).

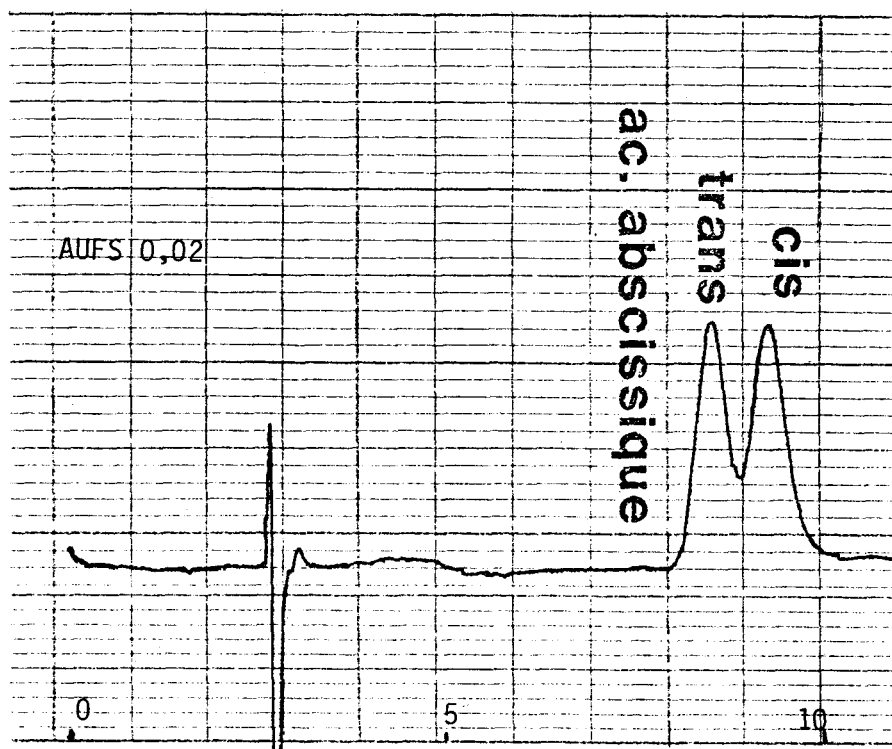
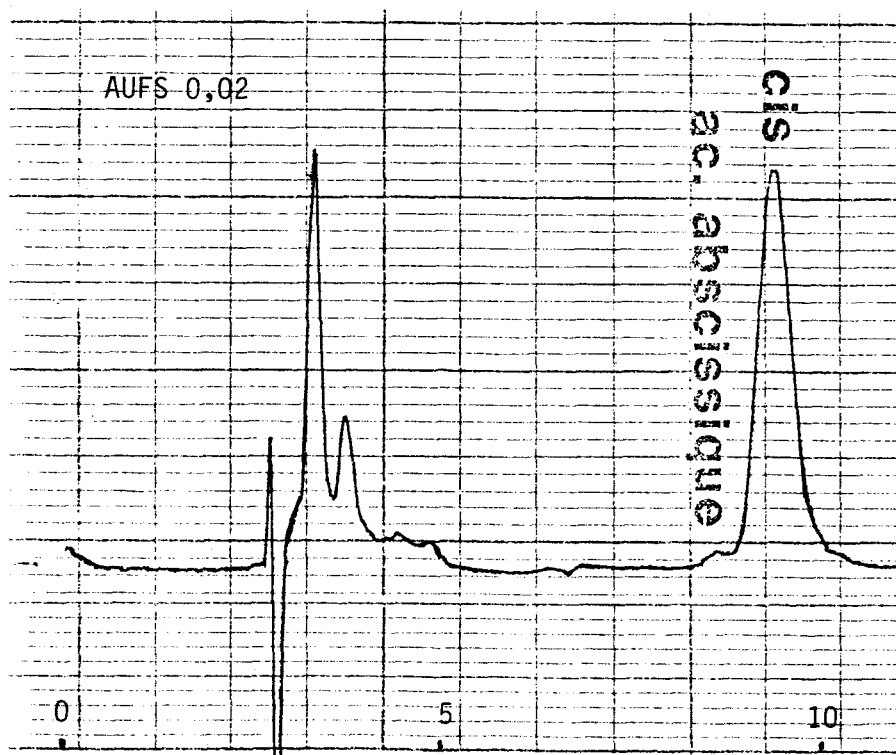


Figure n° 23 - ISOMERISATION DE L'ACIDE ABSCISSIQUE

- a) ABA pur forme *cis*
- b) ABA après une exposition de 3 heures aux rayons UV à 254 nm.



Il est ainsi possible de confirmer la présence d'acide abscissique en exposant la fraction restante de l'extraction aux UV à 254 nm et d'observer la diminution du pic au temps de rétention 8,9 mn.

Nous avons obtenu des rendements d'extractions proches de 90 % pour l'acide abscissique en travaillant au début sur des solutions à 5 mg/l. Ces rendements n'ont pas été retenus car ils paraissaient disproportionnés par rapport à ceux obtenus sur des solutions plus diluées, et nous nous attendons à des concentrations infiniment plus faibles lors des dosages effectués sur des eaux de trempe.

2.1.3. Etude de la répétabilité

L'étude de la répétabilité s'est faite sur des solutions standards d'acide abscissique contenant des acides phénoliques à la concentration de 0,1 mg/l chacun (Tableau XXIV).

mg/l ABA	5	2	1	0,5	0,25	0,1	0,05
Rendement	90	69	75	65	73	74	70
d'extraction	91	72	72	68	70	72	70
	90	74	70	66	70	74	X

TABLEAU XXIV - REPETABILITE DE L'EXTRACTION AU DICHLOROMETHANE

Les rendements sont donc voisins de 70 % pour la majorité des solutions comprises entre 2 et 0,05 mg/l ; seule la série des extractions sur une solution à 0,5 mg/l indique des pourcentages un peu faibles ; la manipulation des solutions étant probablement à l'origine de cette différence.

2.2. DOSAGE DANS LES EAUX DE TREMPÉ

Dès les premières extractions sur les eaux de trempe, il est apparu que la méthode mise au point précédemment demanderait des modifications, l'extraction étant trop peu spécifique. L'acide abscissique est le plus souvent repérable mais il est impossible d'affirmer la présence ou l'absence d'acide indole-acétique.

Nous avons donc abandonné dans l'immédiat le dosage de l'acide β indolyl-acétique et tenté de purifier les extraits obtenus après extraction à pH 2, en adaptant la méthode de HUBAC (1981) et CHARNAY (1981).

Nous avons travaillé sur une eau de trempe chargée en acide abscissique à une concentration voisine de 2,0 mg/l.

Après extraction à pH 2 par le chlorure de méthylène, la phase aqueuse est chromatographiée, et contient 6 % d'ABA.

La phase organique contenant les 94 % d'ABA est amenée à pH 9 avec NH_4OH à 5 %. L'acide abscissique passe alors en solution dans la phase aqueuse qui est évaporée sous vide à 50°C, sous un courant d'azote en fin de concentration.

L'extrait sec est remis en suspension dans 5 ml de méthanol acidifié. Le rendement est ainsi de 75 %, donc peu amélioré par rapport à la méthode précédente, mais la solubilisation complète de l'acide abscissique dans la phase aqueuse à pH 9 permet d'éliminer dans la phase organique quelques impuretés, rendant ainsi le chromatogramme plus dépouillé.

L'inconvénient de cette méthode est une concentration sous vide et sous courant d'azote d'une phase aqueuse, aussi avons nous cherché à concentrer préférentiellement une phase organique en effectuant une purification préalable (figure 24).

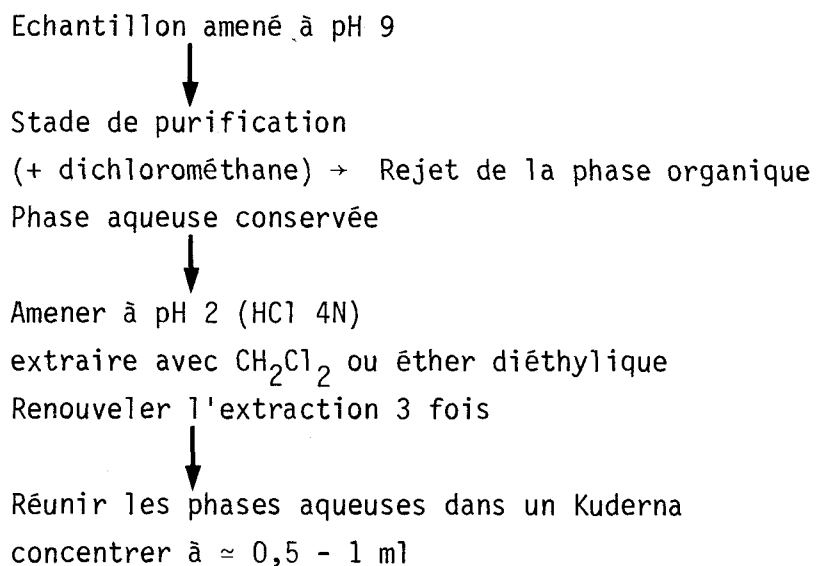


Figure n° 24 - EXTRACTION DE L'ACIDE ABSCISSIQUE
AVEC UNE PURIFICATION PREALABLE EN MILIEU BASIQUE

La pratique de cette extraction avec une purification en milieu basique n'améliore aucunement les rendements qui sont restés voisins de 70 % mais permet d'éliminer certaines impuretés contenus dans les eaux de trempé.

La figure 25 montre le chromatogramme d'une eau de trempé industrielle contenant 0,012 mg/l d'acide abscissique.

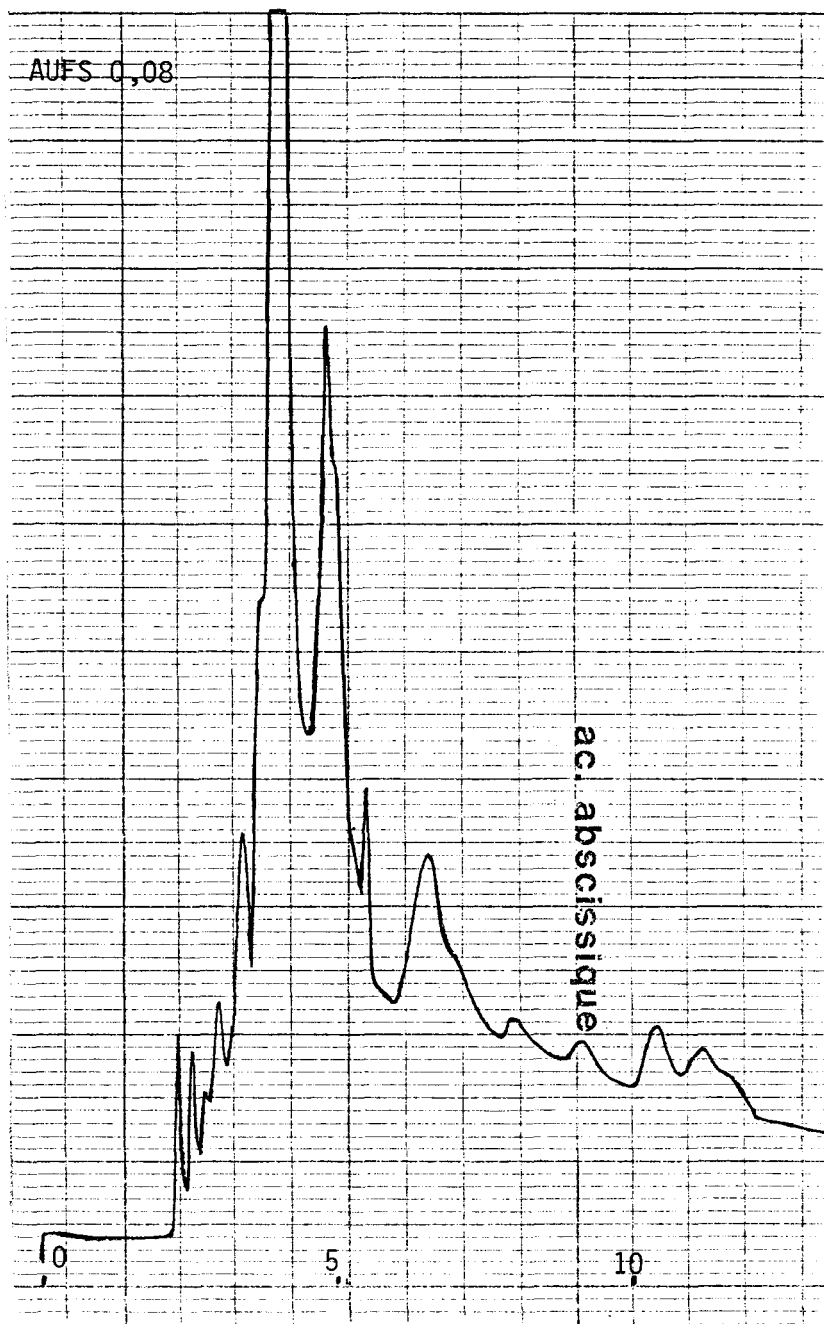


Figure n° 25 - DOSAGE D'ACIDE ABSCISSIQUE
SUR UNE PREMIERE EAU DE TREMPE INDUSTRIELLE
Orge 2RH Sonja 164 T dans 70 m³ d'eau



L'identité du pic d'acide abscissique a été vérifiée en ajoutant de l'acide *cis* abscissique pur d'une part, ce qui nous a permis de recalculer par différence une concentration en acide abscissique de 0,010 mg/l et en exposant une fraction de l'extraction à un rayonnement U.V. d'autre part, afin de visualiser la diminution du pic d'acide *cis* abscissique suite à son isomérisation. Il est important de prendre garde aux volumes mis en oeuvre pendant cette exposition ; on se trouve en effet dans un milieu étheré et il est parfois nécessaire de réajuster le volume final afin qu'il soit identique au volume initial.

En règle générale, toutes les eaux de première trempe analysées qui provenaient d'orge à 2RH Sonja, d'orge à 6RH Nympe contenaient des *teneurs* d'acide *cis* abscissique comprises entre 0,008 et 0,015 mg/l.

Le dosage de l'acide indol acétique par cette méthode a été provisoirement arrêté pour plusieurs raisons. Cet acide possède en effet une très mauvaise réponse lors de la détection en UV à 254 nm ; (figure 26) en fonction du volume de notre injection (10 μ l) la solution initiale d'extraction devrait avoir une concentration voisine de 0,5 mg/l ce qui est très improbable.

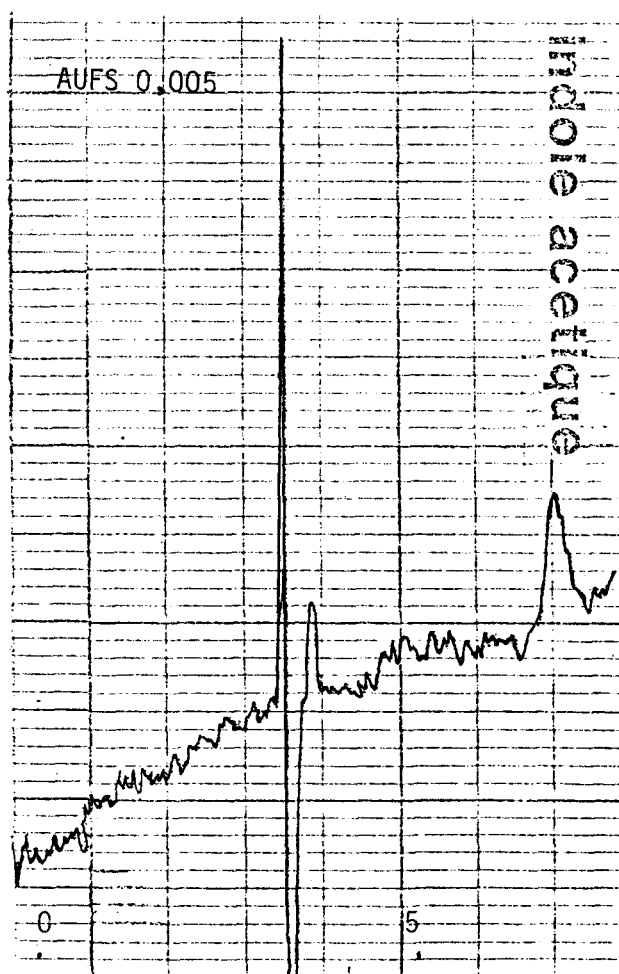


Figure n° 26 - LIMITE DE DETECTION DE L'ACIDE β INDOLYL ACETIQUE EN UV A 254 nm

Si l'on se réfère au chromatogramme d'une eau de trempe (figure 25), on s'aperçoit que les acides phénoliques empêchent par ailleurs sa détection normale et ce d'autant plus qu'il nous est à l'avance impossible de prévoir de fortes concentrations en acides phénols.

Deux solutions relativement simples s'offrent soit pour extraire l'acide indol-acétique plus sélectivement soit pour le doser spécifiquement.

Extraire l'indol 3 acide acétique plus sélectivement, c'est-à-dire le séparer des acides phénoliques peut se faire aisément par chromatographie sur couche mince de cellulose ou gel de silice (SAGI, 1969).

Des tests effectués sur plaque de cellulose MN 300 (solvant : phase supérieure du mélange butanol-ammoniaque-eau-4-1-1) et sur gel de silice Kieselgel G60 (solvant - toluène - acétate d'éthyle - acide acétique 100 - 60 - 8) indiquent pour l'acide indol-3-acétique révélé sur UV à 366 nm des Rf respectivement égaux à 0,40 et 0,66.

La détection UV faite sur des eaux de trempe montre qu'effectivement une grande partie des acides phénoliques est éliminée puisque migrant au front du solvant. Si la séparation est nettement améliorée, le problème du dosage reste ainsi intact car une chromatographie sur plaque entraîne une plus grande dissolution de l'échantillon à laquelle viennent s'ajouter des pertes lors de la récupération sur le support de couches minces.

Il existe actuellement une technique de choix pour le dosage de l'acide β -indolyl acétique (CROZIER et al., 1980 ; SANDBERY, 1981 ; SWEETSER et al., 1978 ; IINO et al., 1980) qui est la fluorescence et notamment la chromatographie liquide à haute pression équipée d'un fluorimètre. La réception imminente d'un détecteur à fluorescence devrait nous permettre rapidement de quantifier beaucoup plus facilement cette phytohormone.

2.3. L'ACIDE ABSCISSIQUE INHIBITEUR DE GERMINATION

Parallèlement au dosage de l'acide abscissique et à la démonstration de sa présence dans les premières eaux de trempage, nous avons effectué

des tests de germination avec des solutions de concentrations croissantes en acide *cis* abscissique. Comme la dénomination phytohormone pouvait le laisser prévoir, les concentrations mises en oeuvre lors de ces tests sont nettement plus faibles que celles des acides phénoliques (figure 27).

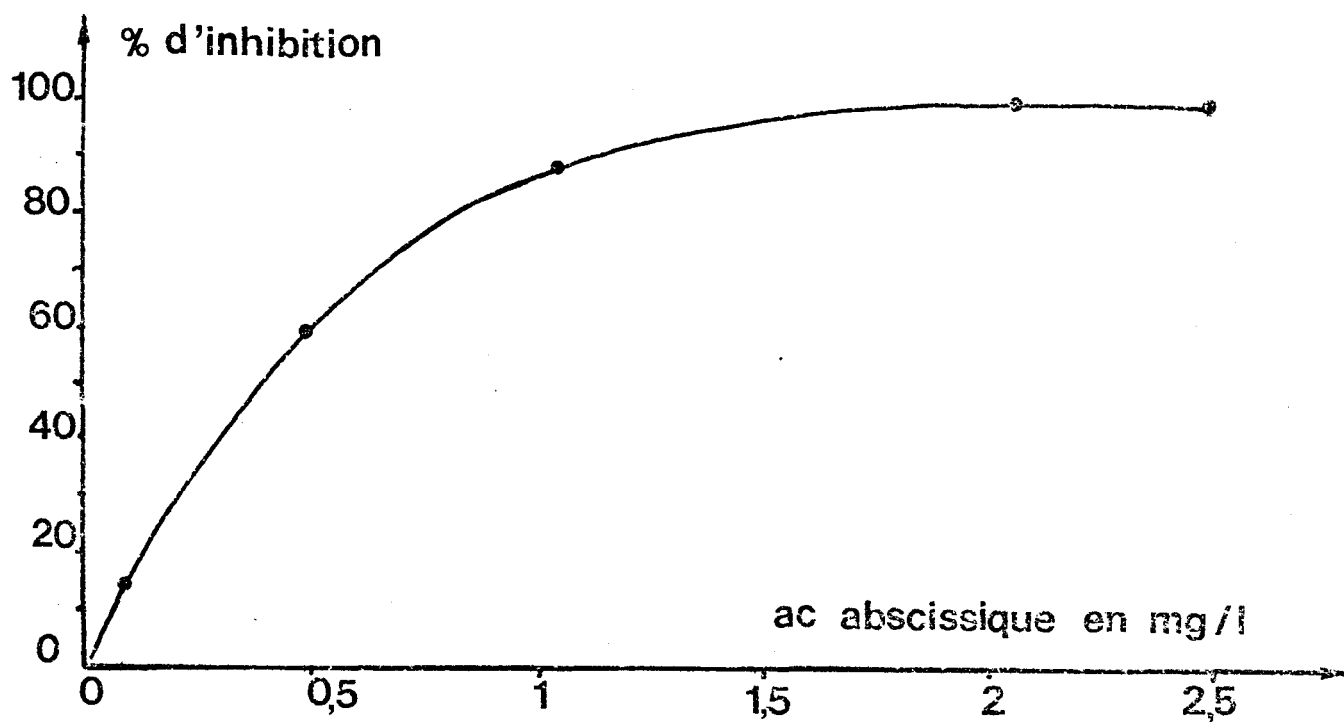


Figure n° 27 - POURCENTAGE D'INHIBITION DE L'ORGE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ACIDE *CIS* ABCISSIQUE LIBRE

Une concentration en acide *cis* abscissique libre de 0,5 mg/l entraîne des inhibitions de germination de 50 à 60 % sur des graines de laitue ou d'orge ; mais des solutions contenant 0,05 mg/l montrent encore infailliblement un faible pouvoir inhibiteur.

L'inhibition due à l'application exogène d'ABA est cependant réversible puisque l'inhibition déclenchée par l'application d'une solution à 100 mg/l pendant 40 h est entièrement levée par un lavage des graines pendant une heure.

Rappelons que les dosages d'acide *cis* abscissique libre dans les eaux de trempes situent la concentration vers 0,010 mg/l en moyenne. Il n'est donc pas impossible que les inhibitions observées soient dues à la concentration exogène d'acide abscissique dans l'eau de trempes, s'ajoutant à l'ABA endogène et aux acides phénoliques.

3 - DISCUSSION - CONCLUSION

La méthode d'analyse comprenant l'extraction à partir d'une eau de trempes et le dosage par chromatographie liquide à haute pression de l'acide *cis* abscissique est parfaitement mise au point et donne de bons résultats ; diverses améliorations selon des options différentes pourront peut-être y être apportées dans un très proche avenir.

3.1. AMELIORATION DE L'EXTRACTION

Il semble, d'après nos résultats qu'il sera difficile d'améliorer le rendement même de l'extraction mais il doit être possible de la rendre plus sélective.

Plusieurs solvants organiques ont été testés lors de la purification à pH 9. Rappelons qu'à ce stade l'acide abscissique demeure dans la phase aqueuse, le but de la phase organique étant de solubiliser, afin de pouvoir éliminer, le plus d'impuretés possible. Le butanol saturé d'eau entraîne lors de la chromatographie une déformation du pic d'acide abscissique, l'acétate d'éthyle et le chloroforme même à pH 9 doivent solubiliser trop d'acide abscissique puisque les rendements sont respectivement de 45 et 46 %.

Il peut paraître logique enfin de commencer l'extraction à pH 2 et de la purifier ensuite à pH 9. Ceci impose si l'on reste à pH 9 d'être en présence d'une phase aqueuse qu'il faut concentrer, en présence d'azote ou plus simplement en présence d'un antioxydant, le butylhydroxytoluène (BHT). Les rendements sont voisins de ceux que nous obtenons par notre méthode mais lors de la concentration, nous concentrons aussi le BHT et ses impuretés ce qui nous oblige, après élution de l'acide abscissique, d'attendre le passage de l'étalon interne et à l'aide d'un gradient d'élution



tion enrichi en méthanol, d'éluer des impuretés entre 28 et 30 mn.

L'avantage de notre méthode est de travailler de manière isocratique ce qui évite de devoir reconditionner la colonne entre deux injections. Il suffit d'attendre la sortie de notre étalon interne, l' α naphthol (figure 18), élué à 14,3 mn, qui n'interfère avec aucun autre composé pour pratiquer rapidement l'injection suivante.

Il semble que l'extraction pourrait être réalisée soit avec des cartouches Sep-pak garnies de silice (HUBICK, 1980) soit avec du polyclar AT (PVP) ou même en combinant ces deux techniques qui permettraient d'éliminer une grande quantité d'impuretés et notamment de composés phénoliques.

3.2. LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE, ETAPE INTERMEDIAIRE

Après extraction et concentration, nous avons essayé de purifier davantage notre échantillon à l'aide d'une chromatographie sur couche mince de gel de silice contenant un indicateur fluorescent. Le solvant retenu est le mélange benzène / éthyl acétate / acide acétique (75/25/5), le Rf de l'acide *cis*-abscissique est de 0,48. Pour mémoire, on peut signaler que les isomères *cis* et *trans* se séparent très bien par chromatographie sur plaque, l'isomère *trans* ayant un Rf de 0,55 et l'acide β indolyl acétique un Rf de 0,62. Précisons que la détection de l'acide abscissique se fait exclusivement avec une lampe UV à courte longueur d'onde 254 nm et qu'il est obligatoire de protéger la migration de l'échantillon puisqu'une telle longueur d'onde induit une isomérisation.

La séparation acide abscissique - acides phénoliques est nette, donc la purification effective, mais deux nouveaux problèmes peuvent surgir :

- cette étape supplémentaire entraîne, comme nous l'avons déjà signalé une dilution de notre échantillon puisque le dépôt ne correspond pas à la totalité de l'échantillon extrait concentré ;
- la récupération impose une redissolution, une concentration supplémentaire mais surtout des rendements relativement faibles de récupération puisque voisins de 50 %.

Dans un premier temps, nous avons utilisé l'éthyl acétate saturé d'eau puis l'éthyl acétate pur afin de réextraire l'ABA. Chacune de ces deux

méthodes entraîne un pic parasite sur le chromatogramme à 8,3 mn alors que l'ABA est élué à 8,9 mn. Même un lavage de nos plaques de silica-gel (solvant acétate d'éthyle / acide acétique 95/5) préalablement à la réactivation des plaques n'élimine pas ce pic parasite ; ce dernier, par contre, n'apparaît pas si l'acétate d'éthyle concentrée est chromatographiée.

Le méthanol nous a, pour l'instant, donné les meilleurs rendements de récupération soit 48 à 50 %.

Nous n'avons pas abandonné, pour l'instant, cette technique de purification par chromatographie sur couche mince car elle se révèle précieuse si l'on veut quantifier l'acide abscissique dans l'orge.

3.3. DOSAGE DE L'ACIDE ABSCISSIQUE DANS L'ORGE

Précédemment nous avons détecté des quantités importantes d'acides phénoliques dans les enveloppes de l'orge. Une purification insuffisante entraîne la présence de pics importants dus à ces acides qui peuvent gêner la détermination de l'acide abscissique.

Nous avons réalisé ces dosages sur différentes variétés d'orge (figure 28), les extractions se faisant selon la méthode mise au point mais aussi par l'intermédiaire d'une chromatographie sur couche mince.

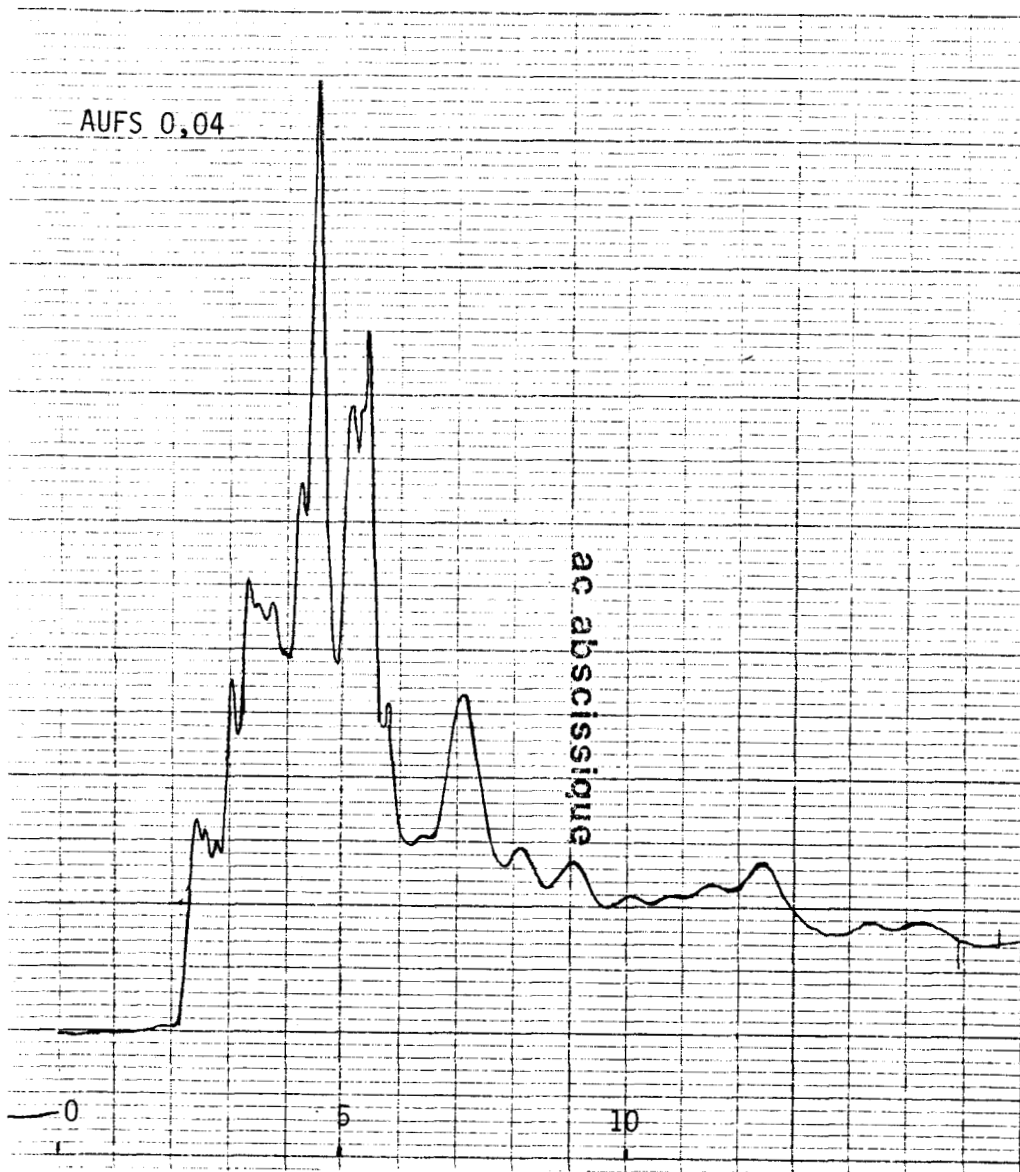


Figure n° 28 - DOSAGE DE L'ACIDE ABSCISSIQUE DANS UNE ORGE 2RH SONJA



Les résultats correspondant à différentes variétés d'orges exprimés dans le Tableau XXV montrent que les méthodes avec ou sans chromatographie sur couche mince donnent des valeurs sensiblement identiques avec un taux de récupération à partir des chromatographies sur plaques de 50 %.

Orges	SONJA 2RH	NYPHE 6RH	ARAMIR 2RP	MENUET 2RP
Extraction				
pH 9 puis pH 2 éther diéthylique	0,08 mg/kg	0,06 mg/kg	0,05 mg/kg	déTECTÉ mais non calculable
chromatographie sur couches minces silica-gel	0,10 mg/kg	0,075 mg/kg	non déterminé	non détecté

TABLEAU XXV - DOSAGE DE L'ACIDE ABCISSIQUE
DANS DIFFERENTES VARIETES D'ORGES

Il nous est donc possible actuellement de doser l'acide abscissique dans les premières eaux de trempage et dans l'orge même. Nous pensions au début de notre travail que les acides phénoliques jouaient un rôle prédominant dans l'inhibition de germination. Leurs concentrations, faibles par rapport à celles exigées pour induire une véritable inhibition indiquent que, seuls, ils ne suffisent probablement pas pour inhiber la germination de semences.

L'acide abscissique, phytohormone responsable de l'induction de la dormance s'est révélée être un composé possédant un pouvoir inhibiteur beaucoup plus important. Cette hormone peut alors nous intéresser pour deux raisons différentes.

Nous avons montré que lors de la trempage, l'acide *cis* abscissique libre, donc actif, pouvait être solubilisé dans l'eau de trempage, à des concentrations faibles certes (0,015 mg/l) mais néanmoins proches de concentrations entraînant encore un faible pouvoir inhibiteur (0,05 mg/l).

Lors de l'épuration physico-chimique, nous avons montré qu'il y avait élimination d'acides phénoliques, ce qui réduirait le risque de voir

ces acides se concentrer au cours de recyclages successifs et parvenir ainsi à des concentrations inhibitrices. Le même risque est couru avec l'acide abscissique mais la différence de concentration entre une solution possédant un pouvoir inhibiteur (0,05 mg/l) et l'eau de première trempe (0,015 mg/l) est infime par rapport à celle des acides phénoliques.

Il faut préciser que les trempes ultérieures sont beaucoup plus diluées en composés inhibiteurs et lors de 2 essais, nous ne sommes jamais parvenus à mettre l'acide abscissique en évidence. Il nous restera cependant à vérifier, lors d'essais au stade pilote qui devraient avoir lieu prochainement que l'acide abscissique s'élimine bien en totalité ou au moins en partie lors du traitement. La première eau de trempe qui est la plus chargée, en acides phénoliques et en acide abscissique est d'ailleurs diluée une première fois avec l'eau des trempes ultérieures, et une seconde fois avec un appoint d'eau propre nécessaire.

Une prochaine expérimentation en pilote devrait nous permettre de tirer les premières conclusions à un niveau quasi industriel sur l'épuration des eaux de trempe, mais aussi sur la possibilité de les recycler sans risques pour les germinations futures.

Notre étude nous ayant conduit vers le dosage d'une phytohormone, le deuxième axe d'intérêt se trouvait être la dormance, soit le potentiel de germination d'une semence à un moment donné. Cette dormance revêt un aspect essentiel pour le malteur, et rappelons nous que l'une des principales phases du maltage est précisément une germination. Chaque année, l'industriel doit donc attendre que la dormance soit levée avant de fabriquer du malt à partir d'orge de la dernière récolte. Nous avons vu que des moyens physiques telles une basse température peuvent lever la dormance ; il n'est bien sûr pas possible de mettre en oeuvre de tels moyens au stade industriel. Peu de composés chimiques, même parmi les hormones permettent de lever complètement cet état (figure 29).

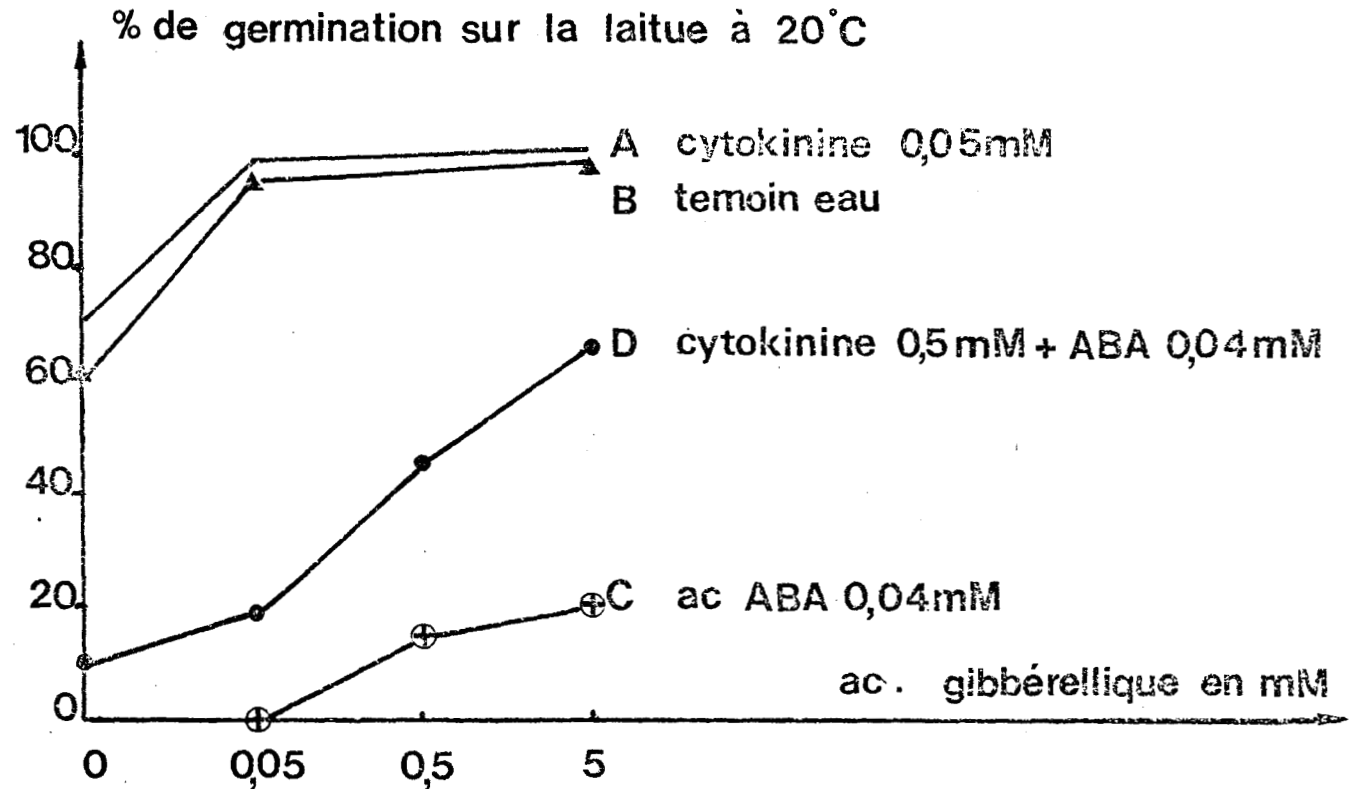


Figure n° 29 - EFFETS DE L'ACIDE ABCISSIQUE ET D'UNE CYTOKININE SUR LA GERMINATION EN PRESENCE D'ACIDE GIBBERELLIQUE (d'après KHAN, 1968)

L'application de cytokinine et d'acide gibbéréllique ne permet pas une germination normale en présence d'acide abscissique, même lorsque les doses de ces phytohormones de croissance sont 10 fois plus élevées que les concentrations d'acide abscissique.

Il est apparu qu'il serait difficile de corréler, ainsi que nous pensions le faire, la levée de dormance avec une diminution de la teneur de l'orge en acide abscissique. Si l'action de cette phytohormone dans l'induction de la dormance est unanimement reconnue, son rôle dans le maintien d'un état dormant reste très discuté.

L'état de dormance pourrait, en effet, résulter de la présence d'une substance inhibitrice active qui pourrait être l'acide abscissique, mais

aussi l'acide β indolyl acétique à forte concentration et enfin de *l'absence d'une substance de croissance* essentielle.

L'embryon serait donc sous la dépendance d'un équilibre dynamique qui s'instaure entre plusieurs hormones, leurs systèmes de régulation et probablement la présence d'acides phénoliques jouant un rôle d'effecteurs de certaines réactions d'activation ou d'inactivation hormonale.

Dans cette hypothèse, le dosage de l'acide abscissique en tant que composé "*marqueur*" permettant de déterminer rapidement la levée ou non de la dormance se révèle nettement insuffisant, mais on peut apercevoir l'intérêt d'un "*bilan hormonal*" comprenant le dosage de phytohormones cibles qui pourraient être dans un premier temps l'acide abscissique, l'acide β indolyl acétique et l'acide gibbérellique.

CONCLUSIONS GENERALES



Le but de cette étude était d'une part de participer à la mise au point de l'épuration par voie physico-chimique de l'eau de trempe en malterie et d'autre part, de rendre compte de la composition de cette eau en acides phénoliques.

Le traitement d'épuration devrait être testé très prochainement au stade pilote puis au niveau industriel et s'accompagnera alors d'un recyclage de l'eau épurée pour les trempes suivantes.

Lorsque l'eau traitée est recyclée, il s'avère nécessaire d'en connaître la composition le plus complètement possible afin de détecter et de prévenir d'éventuelles concentrations en composés inhibiteurs de la germination. Gardons en souvenir, à cet effet, les problèmes engendrés dans le bon fonctionnement d'une station d'épuration biologique, problèmes résultant peut-être de l'activité antimicrobienne due à la concentration des acides phénoliques lors de recyclages successifs.

L'eau de première trempe contient des composés beaucoup plus actifs que les acides phénoliques, ce sont les phytohormones et parmi celles-ci l'acide *cis*-abscissique.

L'acide *cis*-abscissique possède une action antagoniste vis-à-vis de toutes les hormones de croissance, et notamment de l'acide gibbèrellique, hormone d'importance primordiale pour le malteur puisqu'elle contrôle la synthèse d'enzymes dont l' α -amylase. Le dosage et l'étude de l'acide abscissique pose un nouveau problème qui est celui de la dormance. Des variétés d'orges caractérisées par une très faible dormance possèdent des taux d'acide *cis* abscissique particulièrement faible (GOLDBACK, 1977), ce qui permet de relier la dormance ou plus exactement son induction à la concentration hormonale.

Le mode d'action complet des phytohormones reste cependant encore méconnu, mais il apparaît comme certain que la réduction seule de l'acide *cis* abscissique ne suffit pas à lever la dormance et donc à permettre la germination. Il semble que l'embryon répondrait à un état d'équilibre qui s'instaurerait entre les différentes phytohormones d'où la nécessité de pratiquer un véritable bilan hormonal permettant de suivre les concentrations en acides abscissique, gibbèrellique, β indolyl acétique et éventuel-

lement les cytokinines. Il faudrait établir des relations avec les différents acides phénoliques qui, s'ils ne sont pas directement responsables de la totalité de l'inhibition, créée par l'eau de trempé, influent sur différentes activités hormonales.

Par ailleurs, il ne faut pas négliger les renseignements apportés par une analyse chimique plus classique, mais la plus complète possible de l'eau de trempé (CUVELLIER, 1980).

Une concentration élevée en ions potassium peut freiner l'action inhibitrice de l'acide *cis* abscissique (DAVIES, 1980) or nous savons que les premières eaux de trempé sont particulièrement riche en potassium (200 à 500 mg/l et parfois même 1 g/l). Ces concentrations élevées pourront avoir une grande importance si l'on considère avec TREWAVAS (1976) que les substances de croissance peuvent initialement par une modification de flux ioniques induirent les transformations biochimiques attribuées aux hormones. On ne peut, en effet, réfuter *à priori* l'hypothèse selon laquelle les hormones agiraient en induisant une modification des transports ioniques et simultanément par action directe sur des composants cellulaires, les membranes et des enzymes ce qui ouvre un très large éventail de recherche.

La compréhension de ces phénomènes et surtout des modes d'action est vraiment fondamentale afin d'appliquer les résultats de ces travaux de recherches dans l'industrie de la malterie, en minimisant les risques d'erreurs. Cela pourra conduire à des incidences en sélection, en agronomie et sur les aspects économiques en malterie.

ANNEXES

ANNEXE 1

DETERMINATION DE LA DEMANDE CHIMIQUE EN OXYGENE DCO

La "demande chimique en oxygène" (DCO) est la quantité d'oxygène exprimée en milligrammes, qui est consommée par les matières, oxydables dans les conditions de l'essai, contenues dans 1 litre d'eau.

PRINCIPE

Les matières oxydables dans les conditions de l'essai, contenues dans l'eau sont oxydées par un excès de dichromate de potassium en milieu acide et à l'ébullition, en présence de sulfate d'argent (jouant un rôle de catalyseur d'oxydation) et de sulfate de mercure (agent complexant des chlorures).

L'excès de dichromate est déterminé à l'aide d'une solution titrée de sulfate de fer (II) et d'ammonium.

REACTIFS

- 1) Sulfate de mercure (II) en cristaux (Hg SO_4)
- 2) Acide sulfurique dans lequel est dissous du sulfate d'argent :
Dissoudre du sulfate d'argent en cristaux, dans de l'acide sulfurique (d1,84) à raison de 6,6 g/l
- 3) Solution de sulfate de fer (II) et d'ammonium, environ 0,25 N :
Dissoudre 98 g de sulfate de fer (II) et d'ammonium ($\text{Fe SO}_4 (\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) dans de l'eau
Ajouter 20 ml d'acide sulfurique (d 1,84) et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée
Déterminer chaque jour le titre de la solution à l'aide de la solution de dichromate
- 4) Dichromate de potassium 0,25 N
Dissoudre dans de l'eau 12,2588 g, pesés à 0,1 mg près de dichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) préalablement séché à 110°C pendant 2 heures. Diluer à 1000 ml en fiole jaugée

5) Solution de ferroïne

Utiliser une solution commercialisée ou dissoudre 1,485 g de 1.10 phénantroline et 0,695 g de sulfate de fer ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dans de l'eau. Compléter à 100 ml.

MODE OPERATOIRE

$V = 50 \text{ ml}$ Lorsque l'échantillon a une DCO supérieure à 800 mg d'oxygène par litre, procéder à une dilution avec de l'eau avant de prélever la prise d'essai.

Introduire la prise d'essai dans le ballon. Ajouter 1 g de sulfate de mercure puis 5 ml d'acide sulfurique (2) et dissoudre.

Ajouter 25 ml exactement mesurés de solution de dichromate (4) puis 70 ml d'acide sulfurique (2).

Introduire quelques billes de verre, adapter un réfrigérant et faire bouillir pendant deux heures.

Laisser refroidir et étendre à 350 ml environ avec de l'eau, ajouter quelques gouttes de ferroïne et réduire l'excès de dichromate à l'aide de la solution de sulfate de fer et d'ammonium (3). La coloration passe du vert au rouge violacé.

Essai à blanc : Effectuer pour chaque série, un essai à blanc en remplaçant la prise d'essai par 50 ml d'eau.

EXPRESSION DES RESULTATS

Soient :

V_1 le volume en millilitre de solution de sulfate de fer et d'ammonium utilisé pour la détermination

V_0 le volume en millilitre utilisé pour l'essai à blanc

T le titre exprimé en normalité de la solution de sulfate de fer et d'ammonium

V le volume en millilitre de la prise d'essai

La demande chimique en oxygène, exprimé en milligrammes d'oxygène par litre est donnée par l'expression

$$\frac{8000 (V_0 - V_1) T}{V}$$

ANNEXE 2

TEST DE GERMINATION

MATERIEL

Boîte de Pétri diamètre 9,0 cm
Filtre sans cendres diamètre 9,0 cm
Semences de laitue

MODE OPERATOIRE

Placer deux filtres superposés dans la boîte de Pétri ; les humecter avec 4 ml de la solution à tester. Déposer sur les filtres 50 semences de laitue, le plus régulièrement possible. Fermer la boîte de Pétri et mettre à l'obscurité à $20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 42 heures, avant de dénombrer les semences germées.

On calcule le pourcentage d'inhibition par rapport à un essai témoin réalisé avec 4 ml d'eau distillée.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{germination dans l'eau \%} - \text{germination dans la solution test \%}}{\text{germination dans l'eau \%}}$$

REFERENCE

Seed Science and Technology, 1976, 4, 4, 664-680.

ANNEXE 3

DOSAGE GLOBAL DES COMPOSES PHENOLIQUES

MATERIEL

Spectrophotomètre en lumière visible avec cuvettes de 10 mm
Laine de verre

REACTIFS

Tungstate de sodium $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Acide phosphomolybdique $\text{H}_3 \left[\text{P} (\text{MO}_3\text{O}_{10})_4 \right] \cdot x\text{H}_2\text{O}$
Acide phosphorique H_3PO_4 , 85 %
Carbonate de sodium (anhydre) Na_2CO_3
Carbonate de sodium (hydrate) $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
Acide tannique

PREPARATION DU REACTIF DE FOLIN-DENIS

Le réactif est obtenu en mélangeant 750 ml d'eau, 100 g de tungstate de sodium, 20 g d'acide phosphomolybdique et 50 ml d'acide phosphorique. On chauffe sous reflux pendant deux heures et après refroidissement, on complète à 1 litre.

On utilise aussi une solution de carbonate de sodium préparée en dissolvant, à 70 ou 80°C, 35 g de carbonate de sodium anhydre dans 100 ml d'eau. Après avoir laissé refroidir pendant une nuit, on provoque la cristallisation dans la solution sursaturée en ajoutant un cristal de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

Après cristallisation, on filtre sur laine de verre.

MODE OPERATOIRE

Pour effectuer le dosage, on part d'une prise d'échantillon de 10 ml que l'on place dans une fiole jaugée de 100 ml contenant environ 70 ml d'eau. On ajoute 5 ml de réactif de Folin-Denis et 10 ml de la solution de carbonate de sodium ; on dilue avec de l'eau jusqu'à 100 ml. Après agitation, on détermine la densité optique à 750 m μ dans une cuvette de 10 mm par rapport à un blanc préparé à partir d'eau distillée.

Le résultat s'exprime en mg/l d'acide tanique, en comparant avec une courbe étalon préparée à partir d'une solution de référence obtenue en dissolvant 100 mg d'acide tanique dans 1 litre d'eau.

REFERENCE

Pascal RIBEREAU-GAYON, 1968
"Les composés phénoliques des végétaux"
Dunod, Paris, 52-53.

ANNEXE 4

PREPARATION DES PLAQUES DE SILICA-GEL ET DE CELLULOSE

PLAQUES DE GEL DE SILICE

On mélange 30 g de gel de silice G (Merck) et 0,5 g d'indicateur de fluorescence F₂₅₄ (Merck) avec 65 ml d'eau distillée.

Agiter aussitôt le mélange manuellement pendant 60 secondes et verser la suspension assez fluide mais homogène dans l'étaleur réglé au préalable sur 250 μ d'épaisseur.

Il est important, pour obtenir des épaisseurs de couches rigoureusement constantes de fixer le temps d'agitation avec précision car la suspension contient du plâtre et "prend" en quelques minutes.

On laisse les plaques en place jusqu'à ce que la surface devienne mate ce qui demande environ 15 mn.

L'activation se fait à 105°C pendant 45 mn. Afin de faciliter la circulation de l'air lors de cette opération, les plaques sont déposées verticalement sur leur portoir pendant le passage à l'étuve.

Le stockage se fait dans un dessiccateur garni de gel de silice bleu afin d'éviter une perte d'activité à l'air humide.

PLAQUES DE CELLULOSE

On pèse 17 g de cellulose MN 300 (Macherey-Nagel) qu'il est nécessaire d'homogénéiser avec 120 ml d'eau distillée.

L'étalement des couches est grandement facilité et celles-ci sont plus lisses si l'homogénéisation est électrique. Nous avons utilisé un homogénéiseur Virtis à couteaux pendant 2 mn.

On étale ensuite la suspension pour obtenir des couches de 350 μ d'épaisseur. Bien que ne contenant pas de liant, la cellulose adhère très fortement aux plaques de verre.

On laisse les plaques sécher une nuit à la température ambiante.

Pour obtenir une ligne de front régulière, on élimine à l'aide d'une spatule une bande marginale d'environ 3 mm avant l'utilisation.

REFERENCES

RANDERATH K., 1971

"Chromatographie sur couches minces"

Gauthier-Villars, Paris, 25-43.

STAHL E., 1969

"Thin Layer Chromatography"

Egon Stahl, 2ème Ed., Berlin Heidelberg New-York,
8-23, 37-39, 52-70.

BIBLIOGRAPHIE



AFNOR, 1979.

Recueil de normes françaises Eaux. Méthodes d'essais 1ère Ed.
AFNOR, Paris, 115-119, 243-249.

ALLEN J.G. et HALL K.S., 1981.

Rapid method for the determination of abscissic acid applied
to apple leaves
Journal of chromatography, 205, 1, 199-201.

ANONYME, 1981.

Rapport interne. Association nationale des industries agro-
alimentaires
Service Scientifique et Technique
Ministère de l'Environnement et du Cadre de Vie - Direction de la
Prévention des pollutions - Mars 1981.

BARANOWSKI J.D., DAVIDSON P.M., NAGEL C.W. et BRANEN A.L., 1980.

Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by naturally occurring
hydroxycinnamates
Journal of Food Science, 45, 592-594.

BARTHE P. et BULARD C., 1978.

Bound and free abscissic levels in dormant and after ripened
embryos of *Pyrus malus* L. CV Golden delicious
Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 90, 201-208.

BAZARD D., FLAYEUX R. et MOLL M., 1981.

Utilisation de la chromatographie liquide à haute performance
dans un laboratoire de l'industrie alimentaire
Industries Alimentaires et Agricoles, 98, 1-2, 55-61.

BELLEAU G. et DADIC M., 1979.

Determination of Tannic Acid in Beer by high-Performance
Liquid chromatography
Journal of the American Society of Brewing Chemists, 37, 4,
175-179.

BENDELOW V.M. et LA BERGE D.E., 1979.

Relationships among Barley, Malt and Beer phenolics
Journal of the American Society of Brewing Chemists, 37, 2,
89-90.

BERTRAND A. et SALAGOITY-AUGUSTE M.H., 1981.

Dosage des acides phénols dans les vins par chromatographie
liquide à haute pression
*Annales des Falsifications et de l'expertise chimique et
toxicologique*, 74, 793, 17-28.

BIOS, 1980.

Statistiques Malterie, Année 1980
Bios, 1980, 12, 6-7.

BOULENGER P., 1980.

En guise de préambule à la résolution du problème de l'eau
dans l'industrie. Eaux de fabrication - Eaux industrielles -
Eaux usées
Industries Alimentaires et Agricoles, 1-2, 43-45.

BROWN P.R., 1973.

High pressure liquid chromatography
Academic Press, New-York, 1-15.

CARGILE N.L., BORCHERT R. et MAC CHESNEY S.D., 1979.

Analysis of abscisic acid by high performance liquid chroma-
tography
Analytical Biochemistry, 97, 2, 331-339.

CHARNAY D., 1981.

Effets de l'acide abscissique exogène sur la levée de dormance
au froid de tubercules de topinambour cultivés in vitro
Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 101, 3, 195-205.

CHRISPEELS J. et VARNER J., 1967.

Hormonal control of enzyme synthesis : on the mode of action
of gibberellic acid and abscisin in aleurone layer of barley
Plant physiology, 42, 1008-1016.

CIHA A.J., BRENNER M.L. et BRUN W.A., 1977.

Rapid separation and quantification of abscisic acid from plant tissues using high performance liquid chromatography
Plant physiology, 59, 821-826.

COHEN J.D. et SCHULZE A., 1981.

Double standard isotope Dilution Assay - I Quantitative assay of Indole 3 acetic acid
Analytical biochemistry, 112, 249-257.

COME D., 1967.

L'inhibition de germination des graines de pommier (*Pirus malus* L.) non dormantes. Rôle possible des phénols tégumentaires
Annales des Sciences Naturelles et Botaniques, VIII, 371-478.

COME D., 1970.

Les obstacles à la germination
Masson et Cie, Paris, 113-133.

COOK A.H. et POLLOCK J.R.A., 1952 a.

Some chemical aspects of malting
Journal of the Institute of Brewing, 58, 3, 216-217.

COOK A.H. et POLLOCK J.R.A., 1952 b.

Chemical aspects of malting II. Method for assaying the germination inhibition activity of barley steeping liquors
Journal of the Institute of Brewing, 58, 6, 407-413.

COOK A.H. et POLLOCK J.R.A., 1952 c.

Chemical aspects of malting I. Removal of free amino acids and sugars from barley during steeping
Journal of the Institute of Brewing, 58, 5, 325-330.

COOK A.H. et POLLOCK J.R.A., 1954.

Chemical aspect of malting. VI. Presence of phenolic acids including vanillic acid in barley steeping liquors and barley
Journal of the Institute of Brewing, 60, 4, 300-303.

CORNFORTH J.W., MILBORROW B.V., RYBACK G. et WAREING G., 1965.

Identity of sycamore "dormin" with abscisin II.

Nature 205, 1269-1270.

COURT W.A., 1977.

High performance reversed phase liquid chromatography of naturally occurring phenolic compounds

Journal of Chromatography, 130, 287-291.

CRABB D. et KIRSOP B.H., 1970.

Water sensitivity in barley. II. Inhibitors from barley embryos

Journal of the Institute of Brewing, 76, 2, 158-162.

CROZIER A., LOFERSKI K., ZAERR. J.B. et MORRIS R.O., 1980.

Analysis of picogram quantities of Indole 3 Acetic acid by HPLC fluorescence procedures

Planta, 150, 5, 366-371.

CUVELLIER G., 1980.

Problème du recyclage des eaux de trempé en malterie ; étude du pouvoir inhibiteur de croissance et de la composition en acides phénoliques

DEA de biochimie appliquée. Université des Sciences et Techniques de Lille I.

DADIC M., 1980.

Recent advances in Phenolic Research in Brewing 1978-1979

The Brewers Digest, 55, 4, 30-39.

DADIC M. et BELLEAU G., 1980.

Beer Hazes. I. Isolation and Preliminary analysis of Phenolic and Carbohydrate Components

Journal of the American Society of Brewing Chemists, 38, 4, 154-158.

DATTA K., SURINDER K. et NANDA K., 1978.

Effects of some phenolic compounds and gibberellic acid on flowering and yields characters of cheena millet

The Journal of Agricultural Science, 91, 3, 731-737.

- DAVIES L.A., HEINZ D.E. et ADDICOTT F.T., 1968.
Gas liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of
abscisic acid and other plant hormones
Plant Physiology, 43, 1389-1394.
- DAVIES W.J., MANSFIELD T.A. et WELLBURN A.R., 1980.
A role for Abscisic acid in drought endurance and drought
avoidance in SKOOG F.
Plant Growth substances 1979, 242-252, Springer Verlag, Berlin.
- DE CLERCK J., 1962.
Cours de Brasserie
Université de Louvain, 2ème Ed., Vol. 1, 29-30.
- DEGREMONT, 1978.
Memento technique de l'eau
Degrémont, 8e Ed., 135-201.
- DRAWERT F. et LEUPOLD G., 1976.
Gas-chromatographische Analyse der Trimethylsilyl-Derivate
phenolischer Verbindung
Chromatographia, 9, 12, 49-63.
- DRAWERT F., LEUPOLD G. et LESSING V., 1977.
Gaschromatographische Analyse von phenolischen Verbindungen
im Bier
Brauwissenschaft, 30, 13-18.
- DURING H. et BACHMANN O., 1975.
Abscisic acid analysis in *Vitis Vinifera* in the period of
endogenous bud dormancy by high pressure liquid chromatography.
Physiology Plant, 34, 201-203.
- ERBER H.L., 1981.
Die Tannoïde in der Brauereitechnologie und ihr Einfluss auf
die geschmackliche Stabilität von Bier.
Monatsschrift für Brauerei, 34, 3, 80-82.

EVENARI M., 1957.

Les problèmes physiologiques de la germination

Bulletin Société Française de Physiologie Végétale, 3, 4, 105-124.

FANTOZZI P. et MONTEODORO G., 1978.

Dosage des composés phénoliques dans les drupes d'olives
récoltées à différents stades de maturation

Industries Alimentaires et Agricoles, 95, 12, 1335-1339.

FENTON T.W., MUELLER M.M. et CLANDININ D.R., 1978.

Isomerization of some cinnamic acid derivatives

Journal of Chromatography, 152, 2, 517-522.

FLETCHER R.A. et ZALIK S., 1964.

Effect of light quality on growth and free indoleacetic acid
content in *Phaseolus vulgaris*

Nature 201, 328-331.

GABER S.D. et ROBERTS E.H., 1969.

Water sensitivity in barley seeds. I. A reappraisal of the
auxin hypothesis

Journal of the Institute of Brewing, 75, 3, 299-302.

GABER S.D. et ROBERTS E.H., 1969.

Water sensitivity in barley seeds. II. Association with
microorganism activity

Journal of the Institute of Brewing, 75, 3, 303-314.

GILBERT S.G., BLUMP P.H. et FRIEDEN A., 1954.

The inhibition of barley germination by steep liquor
A.S.B.C. Proceedings, 51-56.

GOLDBACH H. et MICHAEL G., 1977

Abscisic acid content of barley grains during ripening as
affected by temperature and variety

Crop Science, 16, 797-799.

- GRODZINSKA-ZACHWIEJA Z., BIEGANOWSKA M. et DZIDO T., 1979.
Effect of mobile phase composition on the partition of phenolic acids in reversed phase TLC and HPLC
Chromatographia, 12, 8, 555-558.
- HABER A.H., FOARD D.E. et PERDUE S.W., 1969
Actions of gibberellic and abscisic acids on lettuce seed germination without actions on nuclear DNA synthesis
Plant physiology, 44, 463-467.
- HARDIN J.M. et STUTTE C.A., 1980.
Analysis of phenolic and flavonoïd compounds by high pressure liquid chromatography
Analytical Biochemistry, 102, 171-175.
- HARRIS G. et RICKETTS R., 1958.
Isolation of polyphenols and phenolic acid of malt husk
Journal of the Institute of Brewing, 64, 1, 22-32.
- HARTLEY R.D. et JONES E.C., 1975.
Effect of ultraviolet light on substituted cinnamic acids and the estimation of their cis and trans isomers by gas chromatography
Journal of chromatography, 107, 1, 213-218.
- HESS C.E., 1968.
Internal and external factors regulating root initiation
Proc. XV Easter School in Agricultural Science, University of Nottingham, 42-53.
- HO D.T.H. et VARNER J.E., 1976.
Response of barley aleurone layers to abscisic acid
Plant Physiology, 57, 175-178.
- HUBAC C. et LE PAGE-DEGIVRY M.T., 1981.
Evolution de la teneur en acide abscissique au cours de l'as-sèchement du cotonnier sous différentes périodes
Physiologie Végétale, 19, 1, 87-97.

HUBICK K.T. et REID D.M., 1980.

A rapid method for the extraction and analysis of abscisic acid from plant tissue

Plant physiology, 65, 523-525.

IINO M., YU R.S. et CARR D.J., 1980.

Improved procedure for the estimation of monogram quantities of indole 3 acetic acid in plant extracts using the indolo α pyrone fluorescence method

Plant physiology, 66, 6, 1099-1105.

JACOBSEN J.V., 1973.

Interactions between gibberellic acid, ethylene and abscisic acid in control of amylase synthesis in barley aleurone layers

Plant physiology, 51, 198-202.

JACOBSEN J.V. et HIGGINS T., 1978.

The influence of phytohormones on replication and transcription in LETHMAN D.S., GOODWIN P.B. et HIGGINS T.J.V.

Phytohormones and related compounds : a comprehensive treatise Vol. 1, 515-582, Elsevier Biomedical Press Amsterdam.

JANGAARD N.O., 1970.

Thin layer chromatography of some plant phenolics

Journal of chromatography, 50, 146-148.

JERUMANIS J., 1979.

Separation et identification de flavanoïdes par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Proc. European Brewery Convention, 17, 309-319, Berlin.

KENYHERCZ M.T. et KISSINGER P.T., 1977.

A new approach to the phenolic components in beer. Application to the determination of sinapic, ferulic and paracoumaric acids

Journal of agricultural and food chemistry, 25, 4, 959-961.

KHURANA J.P. et MAHESHWARI S.G., 1980.

Some effects of salicylic acid on growth and flowering in *spirodela polyrrhiza* SP₂₀

Plant and Cell Physiology, 21, 5, 923-927.

KIRBY W. et WHEELER R.E., 1980.

The extraction of beer polyphenols and their assay by HPLC
Journal of the Institute of Brewing, 86, 1, 15-17.

KIRSOP B.H. et POLLOCK J.R.A., 1959.

Studies in barley and malt. XIV. Effects of restriction growth
on the behaviour of barley during malting
Journal of the Institute of Brewing, 65, 3, 259-265.

KLEBE J.F., FINKBEINER H. et WHITE D.M., 1966.

Silylations with bis (trimethylsilyl) acetamide, a highly
reactive silyl donor
Journal of the American Chemical Society, 88, 14, 3390-3395.

KLINK F., 1981.

Various separations using a new single pump ternary solvent
system in high performance liquid chromatography
Analusis, 9, 6, 291-297.

KNUSEL F. et WEIRICH E.G., 1972.

Mikrobiologische evaluierung der salizylsäure und anderer
Breitspektrum Antimikrobika
Dermatologica, 145, 223-244.

LAVARDE R., 1978.

Le coût des eaux résiduaires
Bios, 9, 2, 20-29.

LAVARDE R., 1980 a.

L'évolution de la réglementation sur le rejet des eaux
résiduaires en France et à l'étranger
Bios, 11, 11-12, 17-22.

LAVARDE R., 1980 b.

La pollution industrielle dans le Bassin Nord - Artois -
Picardie. Bilan de 10 années 1969-1979
Cahiers techniques n° 1, Octobre 1980.

LEGRAND L. et POIRIER G., 1976.

Chimie des eaux naturelles. Agressivité. Corrosivité. Traitements

Eyrolles, Paris, 209-211.

LE PAGE-DEGIVRY M. et BULARD C., 1979.

Acide abscissique lié et dormance embryonnaire chez *Pyrus malus*
Physiology plant 46, 115-120.

LETHMAN D.S., 1978.

Natural occurring plant growth regulations other than the principal hormones of higher plants in LETHMAN D.S., GOODWIN P.B. et HIGGINS T.J.V.

Phytohormones and related compounds : a comprehensive treatise
Vol. 1, 349-413. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

LITTLE C.H.A. et EIDT D.C., 1968.

Effect of abscisic acid on budbreak and transpiration in woody species

Nature, 220, 498-499.

MAC MURROUGH, 1980.

Analysis of phenolic compounds in barley hops and beer by high pressure liquid chromatography

European Brewery Convention, Biochemistry Group Meeting, 26-27 Juin 1980, Londres.

MARIGO G. et BOUDET A., 1979.

Effects of an increase in levels of phenolic compounds on the auxin content and growth of *Lycopersicum esculentum*

Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 92, 33-38.

MASSART L., HILDERSON H. et VAN SUMERE C.H.R., 1959.

Germination inhibitors in barley

European Brewery Convention, Rome, 1959, 7-10.

MAYER A.M. et POLJAKOFF-MAYBER A., 1975.

Dormancy, germination Inhibition and stimulation

The germination of seed, 2e Ed., 46-70, Pergamon Press, Oxford.

MEINCK F., STOFF H., KOHLSCHUTTER H., 1977.

Les eaux résiduaires industrielles

Masson 2e Ed., Paris, New-York, Barcelone, Milan, 428-429.

MENDEZ J. et STEVENSON F.J., 1966.

Detection of phenolic carboxylic acids by gaz liquid chromatography

Journal of gas chromatography, 12, 483-485.

MILBORROW B.V., 1967.

The identification of (+) abscisin II [(+) - dormin] in plants and measurement of its concentration

Planta, 76, 93-113.

MILBORROW B.V., 1970.

Metabolism of abscisic acid

Journal of Experimental botany, 21, 17-29.

MITTELHEUSER C.J. et VAN STEVENINCK, 1969.

Stomatal closure and inhibition of transpiration by (RS)-abscisic acid

Nature, 221, 281-282.

MULKAY P., TOUILLAUX R. et JERUMANIS J., 1981.

Les prodelphinidines de l'orge : séparation, identification et influence sur la stabilité colloïdale de la bière

Cerevisia, 6, 1, 29-33.

MURPHY J.B. et STUTTE C.A., 1978.

Analysis for substituted benzoïc acid and cinnamic acids using high pressure liquid chromatography

Analytical Biochemistry, 86, 2, 220-228.

OHKUMA K., 1965.

Structural configuration of a highly active inhibitor of coleoptile elongation

Agricultural and biological chemistry, 29, 962-964.

- PELLIZZARI E.D., CHUANG C.M., KUC J. et WILLIAMS E.B., 1969.
Gas chromatography and mass spectroscopy of plant phenolics
and related compounds
Journal of chromatography, 40, 285-288.
- PILET P.E., 1961.
Les phytohormones de croissance
Masson et Cie, Paris, 149-224.
- PISKORNIK Z. et BANDURSKI R.S., 1972.
Purification and partial characterization of a glucan containing
indole-3-acetic acid.
Plant physiology, 50, 176-182.
- PODSTOLSKI A., SZNAJDER S. et WICHOWSKA G., 1981
Accumulation of phenolics and growth rate of barley seedlings
(*Hordeum vulgare* L)
Biologia plantarum, 23, 2, 120-127.
- PRICE W.P., EDENS R.I., HENDRIX D.L. et DEMING S.N., 1979.
Optimized reverse phase high performance liquid chromatographic
separation of cinnamic acids and related compounds
Analytical biochemistry, 93, 2, 233-237.
- QUARRIE S.A., 1978.
A rapid and sensitive assay for abscisic acid using ethyl
abscisate as an internal standard
Analytical biochemistry, 87, 148-156.
- QURESHI A., BURGER W.C. et PRENTICE N., 1979 a
Quantitation of potential flavoring compounds in worts and
beers by HPLC
Journal of the American Society of Brewing Chemists, 37, 4,
153-160.
- QURESHI A., BURGER W.C. et PRENTICE N., 1979 b
Polyphenols and pyrazines in beer during aging
Journal of the American Society of Brewing Chemists, 37, 4,
161-163.

- RAPP A., ZIEGLER A., BACHMANN O. et DURING H., 1976.
Quantitative bestimmung von abscisinsäure mit Hilfe der Hochdruck
Flüssigkeits Chromatographie
Chromatographia, 98, 1, 44-47.
- RAY S.D., GURUPRASAD K.N. et LALORAYA M.M., 1980.
Antagonistic action of phenolic compounds on abscisic acid
induced inhibition of hypocotyl growth
Journal of Experimental Botany, 31, 125, 1651-1656.
- REYNOLDS T., BUTTON A.H., MAC WILLIAM K.C., 1966.
Malting with production of minimum effluent
Journal of the Institute of Brewing, 72, 3, 282-285.
- RIBEREAU-GAYON P., 1968.
Les composés phénoliques des végétaux
Dunod, Paris, 7-20, 103-106.
- RIVIER L. et PILET P.E., 1981.
Abscisic acid level in the root tips of seven *Zea Mays* varieties
Phytochemistry, 20, 1, 17-19.
- ROLLIN P. et MAIGNAN G., 1966.
La nécessité du phytochrome P_{RL} (= P₇₃₀) pour la germination
des akènes de *Lactuca sativa* L, variété "Reine de Mai"
Comptes-rendus Académie des Sciences, 263, 756-759.
- ROUILLER M., 1979.
L'orge de brasserie
Bios, 10, 6, 65-70.
- SAGI F., 1969.
Silica-gel or cellulose for the thin Layer chromatography of
indole-3-acetic acid ?
Journal of Chromatography, 39, 3, 334-335.

- SANDBERG G., ANDERSSON N.B. et DUNBERG G.A., 1981
Identification of 3 indole-acetic acid in *Pinus sylvestris* L
by gas chromatography mass spectrometry and quantitative analysis by ion pair reversed phase liquid chromatography with spectrofluorimetric detection
Journal of chromatography, 205, 1, 125-137.
- SEIKEL M.K., 1964.
Isolation and identification of phenolic compounds in biological materials in HARBORNE J.B., THOMSON R.H.
Biochemistry of Phenolic compounds, 65-76 Academic Press,
London, New-York.
- SEMBDNER G., DATHE W., KEFELI V.I. et KUTACEK M., 1980.
Abscisic acid and other naturally occurring plant growth inhibitors in SKOO G.F.
Plant Growth substances 1979 , 254-261, Springer Verlag Berlin.
- SEROUSSI G. et BARBES R., 1979.
La chromatographie liquide : une technique de pointe
Spectra 2000, 7, 54, 47-50.
- SLOMINSKI B.A., 1980.
Phenolic acids in the meal of developing and stored barley seeds
Journal of the Science of food and Agriculture, 31, 10, 1007-1011.
- SMART M.G. et O'BRIEN T.P., 1979.
Observations on the Scutellum. III. Ferulic acid as a component of the cell wall in Wheat and Barley
Australian Journal of Plant Physiology, 6, 4, 485-491.
- SOLOMAKHINA A.V. et EZHOV I.S., 1979.
Effect of phenolic substances, abscisic and indolylacetic acids on sprouting of barley during storage
Fermentanaya i Spirtovaya Promysklennost'. 5, 32-35.

STAHL E., 1969.

Thin Layer Chromatography
Egon Stahl 2e Ed., 502, 686-706. Springer Verlag
Heidelberg, New-York.

SWAIN T. et GOLDSTEIN J.L., 1963.

The quantitative analysis of phenolic compounds in PRIDHAM J.B.
et BATE-SMITH E.C. Methods in polyphenol chemistry. 131-146.
Pergamon Press, Londres.

SWEETSER P.B. et VATARS A., 1976.

High performance liquid chromatographic analysis of abscisic
acid in plant extracts
Analytical biochemistry, 71, 68-78.

SWEETSER P.H. et SWARTZFAGER D.G., 1978.

Indole 3 acetic acid level in plant tissue as determined
by a new high performance liquid chromatographic method
Plant physiology, 61, 254-258.

SYMONDS P., 1978.

Application de la chromatographie liquide haute performance
au dosage de quelques acides organiques du vin
Annales de la Nutrition et de l'Alimentation, 32, 957-968.

TERRIER A. et BOIDRON J.N., 1972.

in Manuel pratique d'analyses des moûts et des vins
J. BLOUIN. Chambre d'Agriculture de la Gironde.
Service de la vigne et du vin, édition 1977.

THALLER V., 1963.

Thin-Layer chromatography *in* PRIDHAM J.B. et BATE-SMITH E.C.
Methods in polyphenol chemistry, 79-88
Pergamon Press, Londres.

THOMAS D. et ROCCA J.L., 1979.

Analyse par chromatographie en phase liquide des agents de
surface utilisés dans les formulations détergentes
Analisis, 7, 8, 386-394.

TREWAVAS A.J., 1976.

Plant growth substances *in* BRYANT J.A. Molecular aspects of gene expression in plants, 250-297.
Academic Press, Londres.

TSAO T.H., 1980.

Growth substances : roles in fertilization and sex expression
in VANDERHOEF L.N. et ADDICOTT F.T. Plant growth substances 1979
345-348, Springer Verlag, Berlin.

UEDA M. et BANDURSKI R.S., 1969.

A quantitative estimation of alkali labile indole-3-acetic compounds in dormant and germinative Maize Kernels
Plant physiology, 44, 1175-1181.

URION E., METCHE M. et HALUCK J.P., 1963.

Bestimmung des Phenolsäuren der Gerste mittels polyamid -
Dunnschicht Chromatographie
Brauwissenschaft, 16, 6, 211-215.

URQUHART W.B.M., 1953.

Note on some experimental steeping treatments of malting barley
Journal of the Institute of Brewing, 53, 1, 56-58.

VANCRAENENBROECK R. et JERUMANIS J., 1981 a.

Tanins et polyphénols en brasserie. Mise au point.
Cerevisia, 6, 1, 15-22.

VANCRAENENBROECK R. et DEVREUX A., 1981 b.

Influence des polyphénols du malt et du houblon sur les propriétés du moût et de la bière
Cerevisia, 6, 1-2, 81-88.

VAN LAER M., FROSCHER P. et VANDERSCHUEREN J., 1947.

New factor in barley germination
Journal of the Institute of Brewing, 53, 2, 112.

- VAN SUMERE CH.R., HILDERSON H. et MASSART, 1958.
Coumarins and phenolic acids of barley and malt husk
Naturwissenschaften, 45, 12, 292-294.
- VAN SUMERE C.F., 1960.
Etude biochimique de la germination et de ses inhibiteurs
*Bulletin de l'Association des Anciens Elèves de l'Institut
des Industries de fermentation de Bruxelles*, 1, 28-36.
- VASQUEZ-NEGRE M., 1980.
Propriétés antimicrobiennes de quelques acides phénols de
la série benzoïque
DEA de Microbiologie Appliquée, Marseille.
- VILLIERS T.A., 1972.
in KOZLOWSKI T.T. Seed biology, germination control, metabo-
lism and pathology, vol. 2, 220-279, Academic Press, New-York.
- WAREING P.F., 1965.
Endogenous inhibitors in seed germination and dormancy
Handbuch der Pflanzenphysiologie, 15, 2, 909-924.
- WILKINSON M., SWEENEY J.G. et IACOBUCCI G.A., 1977.
High pressure liquid chromatography of anthocyanidins
Journal of chromatography, 132, 349-351.
- WULF L.W. et NAGEL, 1976.
Analysis of phenolic acids and flavonoids by high pressure
liquid chromatography
Journal of chromatography, 116, 271-279.
- ZAUCHE M., 1981.
La pollution de l'eau par les établissements industriels
Revue des Industries Alimentaires, 28, 291, 73-81.
- ZEEWART J.A., 1971.
(+) - Abscisic acid content of Spinach in relation to
photoperiod and water stress
Plant physiology, 48, 86-90.