



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

**INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

**Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie
et des Industries Alimentaires**

**CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Laboratoire des Sciences
du Génie Chimique**

Ecole doctorale Science et ingénierie des
RESSOURCES PROCEDES PRODUITS ENVIRONNEMENT (RP2E)

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR

De l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Par

Wafa GUIGA

Identification des inhibiteurs de la germination de l'orge et Mise au point d'un procédé de traitement des eaux de trempes en malterie en vue de leur recyclage.

Soutenue à huis clos le 15 Novembre 2006 devant la commission d'examen :

M. C. DAGOT
M. N. ROCHE

Professeur à l'ENSIL (Limoges).
Professeur à l'IUT de Marseille.

Mme. N. OUARNIER
M. P. MORRALL
M. P. BOIVIN
M. J. BOUDRANT
M. M. FICK

Ingénieur de Recherche (IFBM, Nancy).
Directeur Industriel (TREETOPS, U.K).
Directeur Industriel (IFBM, Nancy).
Directeur de Recherche (LSGC - CNRS, Nancy).
Professeur à l'ENSAIA – INPL (Nancy).

Remerciements

Cette thèse représente une partie du travail qui a été effectué pendant trois ans dans le cadre du projet SWAN (Save Water and Attent Nature), impliquant des malteurs français et britanniques. Ce travail a été réalisé en partie au Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC), particulièrement au Groupe des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires (GPBA) et en partie à l'Institut Français des Boissons, de la Brasserie et de la Malterie (IFBM).

Je remercie Monsieur Michel Sardin - directeur du LSGC - pour m'avoir accueillie au laboratoire, Monsieur Michel Fick - Responsable du GPBA - pour m'avoir proposé cette thèse et surtout pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ce travail, et Monsieur Patrick Boivin - Directeur Général de l'IFBM - pour m'avoir intégrée à son entreprise pour la durée de ma thèse.

Je remercie aussi Messieurs Christophe Dagot - Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Limoges - et Nicolas Roche - Professeur à l'IUT de Marseille - pour avoir aimablement accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs, Monsieur Joseph Boudrant pour avoir accepté de présider le jury de thèse, Monsieur Philip Morrall pour avoir accepté de faire le déplacement depuis La Grande Bretagne pour faire partie du jury en tant qu'examinateur, et Madame Nathalie Ouarnier aussi en tant qu'examinatrice.

Je tiens surtout à exprimer ma reconnaissance pour Madame Nathalie Ouarnier et Monsieur Frantz Fournier pour tout le temps qu'ils m'ont consacré, pour leur disponibilité, pour leurs conseils précieux et pour la rigueur dont ils ont fait preuve tout au long de ce projet.

Je remercie aussi tous les malteurs qui ont participé à ce projet, pour leurs encouragements et leur amabilité.

Je remercie aussi tout le personnel de l'IFBM qui m'a patiemment et gentiment apporté son aide et son savoir faire tout au long de ce travail.

Je remercie aussi vivement Mister Rondags, qui a le génie de redonner confiance aux thésards du GPBA dans les moments de doute.

Je tiens aussi à remercier Messieurs Xavier Framboisier, Fabrice Blanchard, Ivan Marc et Madame Christelle Harscoat pour leur

disponibilité, leur gentillesse et pour la bonne ambiance de travail qu'ils nous offrent au quotidien.

Je n'oublie pas Féno, l'homme invisible, Anissa, Eric, Naziha, Gérard, Bertrand et tous les autres étudiants avec qui j'ai pu passer des moments formidables tout au long de ces années.

Je remercie du fond du cœur Sepehr, qui n'a cessé de me soutenir et de m'aider. Grâce à lui j'ai adopté la France, et grâce à lui j'ai découvert la magie de l'unique pays au monde - La Perse - où les Poètes du vin sont plus vénérés que les dieux, n'en déplaise aux pieux!

Je remercie enfin - et surtout - mes parents, qui m'ont transmis le goût du savoir et le mépris des honneurs, et leur foi en l'Homme.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	9
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
I- MARCHE MONDIAL DE L'ORGE, DU MALT ET DE LA BIERE.....	15
II- STRUCTURE DU GRAIN D'ORGE	16
1- Taxonomie	16
2- Composition biochimique du grain d'orge	17
3- Histologie	18
3.1- L'embryon	19
3.2- L'endosperme	19
3.3- La couche à aleurones.....	21
3.4- Péricarpe – testa.....	22
3.5- Les glumelles.....	22
3.6- La paroi externe	22
4- La microflore de l'orge.....	24
III- PROCEDE DE MALTAGE	26
1- La trempe.....	27
1.1- Hydratation du grain	27
1.2- Température de l'eau de trempage.....	29
2- La germination.....	29
2.1- Paramètres de la germination.....	29
2.2- Influence de l'humidité du grain.....	29
2.3- Influence de la température de l'air	29
2.4- Aération	30
2.5- Durée de la germination.....	30
3- Le touraillage.....	30
4- Le dégermage et le stockage.....	31
5- Physiologie de la germination	32
5.1- Les changements durant la germination	34
5.2- Les inhibiteurs de la germination et les mécanismes d'inhibition	35
6- La composition des eaux de trempage	41
IV- TRAITEMENT DES EAUX USEES	42
1- Problématique des ressources en eau.....	42
a- La demande	42
b- Les sources de contamination de l'eau	43
c- Le traitement et le recyclage de l'eau dans les procédés industriels	44
2- Traitement des eaux usées	46
a- Principe d'épuration de l'eau	46
b- Principales opérations unitaires	47
c- Les procédés de traitement.....	47
DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES	61
I- PROCEDE DE MALTAGE ET DE BRASSAGE	61
1- Caractéristiques des lots d'orge utilisés.....	61
2- L'étape de Trempe.....	61
3- La germination et le touraillage.....	62
4- Procédé de brassage.....	62

II- ANALYSES SUR ORGE, MALT ET MOUT.....	63
1- Analyses sur Orge.....	63
a- Humidité de l'orge et du malt	63
b- Indice de trempe (test de Chapon)	63
2- Analyses des Malts	64
2.1- Analyses sur Malt	64
2.2- Analyses sur moût EBC.....	66
III- TRAITEMENT DES EAUX DE TREMPÉ	68
1- Traitements à l'échelle de laboratoire	68
a- Traitement biologique en réacteur discontinu de 1L.....	68
b- Traitement biologique en réacteur continu de 1L.....	69
c- Traitement en Bio-réacteur à membranes	69
d- Autres traitements physico-chimiques.....	71
2- Traitements à l'échelle pilote	73
IV- ANALYSES DES EAUX DE TREMPÉ	75
1- Analyse des acides organiques	76
2- Analyses des sucres et alcools.....	77
3- Demande chimique en oxygène.....	78
4- Dosage des polyphénols totaux	78
5- Analyse des composés phénoliques par HPLC	78
6- Dosage des métaux lourds et alcalino-terreux.....	79
7- Dosage du phosphore	80
8- Dosage de l'azote total	80
9- Indice de germination	80
10- Poids sec	81
11- Charge microbienne.....	81
12- Densité optique.....	81
13- Chromatographie d'exclusion de taille.....	81
V- RECHERCHE DES INHIBITEURS DE LA GERMINATION.....	81
1- Recyclage des eaux de trempe.....	81
2- Fractionnement des eaux de trempe	82
3- Oxydation des composés phénoliques.....	83
4- Extraction des composés phénoliques	84
TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	89
CHAPITRE I- ETUDE PRELIMINAIRE.....	89
1- Caractérisation des eaux de trempe	89
2- Pouvoir inhibiteur des eaux de trempe	91
3- Essais de recyclages des eaux de trempe.....	92
a- Analyses sur eau	93
b- Analyses sur malt vert et malt	94
3- Effet de la durée de la première phase sous eau sur le recyclage des eaux de trempe	95
CHAPITRE II- RECHERCHE DES INHIBITEURS DE LA GERMINATION.....	97
1- Corrélations entre l'inhibition et les différents composés identifiés dans les eaux de trempe	97
2- Effet de la variété d'orge	98
3- Fractionnement des eaux de trempe	99
4- Relation entre couleur et inhibition	100
5- Implication des composés phénoliques dans l'inhibition	102

6- Implication des enveloppes	107
7- Nature des réactions d'oxydation mises en oeuvre.....	108
CHAPITRE III- TRAITEMENT DES EAUX DE TREMPÉ A L'ECHELLE DE LABORATOIRE.....	111
1- Traitement en réacteur discontinu	111
a- Traitements physico-chimiques	111
b- Traitement biologique.....	112
2- Traitement en Bio-Réacteur à Membrane.....	115
a- Suivi de la biomasse.....	115
b- Suivi de la qualité de l'eau.....	116
3- Traitements complémentaires.....	118
a- Traitement par charbon actif	118
b- Traitement par osmose inverse	119
c- Traitement par nano-filtration	120
4- Etude de la qualité des malts obtenus en utilisant différentes eaux traitées	121
5- Essais de maltages avec des eaux ayant différents taux d'inhibition	122
CHAPITRE IV- TRAITEMENT ET RECYCLAGE DES EAUX DE TREMPÉ A L'ECHELLE PILOTE.....	125
1- Analyse des eaux traitées par les systèmes <i>Sys1 et Sys2</i>	125
- Confirmation des résultats de biodégradation des pesticides et mycotoxines	129
2- Qualité des malts, moûts et bières	130
a- Analyses des malts	130
b- Analyses des moûts et des bières	133
<u>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES</u>	<u>139</u>
<u>ANNEXES.....</u>	<u>147</u>
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	<u>179</u>

Abbreviations

2RH = Orge d'hiver à 2 rangs ;
2RP= Orge de printemps à 2 rangs ;
6RH= Orge d'hiver à 6 rangs ;
6RP= Orge de printemps à 6 rangs ;
BRM = Bioréacteur à Membranes
D.B.O = Demande Biochimique en Oxygène
D.C = Désagrégation Calcofluor
D.C.O = Demande chimique en oxygène
D.O = Densité Optique
E = Extrait fine mouture
EBC = European Brewery Convention
ED = Electro-dialyse
GT = Transfert de gaz
H = Homogénéité Calcofluor
I = Indice de germination
I.T = Indice de trempe
M.F = Microfiltration
N.D = Non Détecté
N.F = Nanofiltration
O.I = Osmose Inverse
PC = Pro-cyanidine
PD = Pro-delphidine
PPO = Polyphénol-oxydase
PV = Pervaporation
Sys1 = Système pilote de traitement, à membranes immergées
Sys2 = Système pilote de traitement, à membranes externes
U.F = Ultrafiltration
W.K = Windish Kolbach
%Inh = Pourcentage d'inhibition

INTRODUCTION

Introduction Générale

A l'horizon 2025, 35% de la population mondiale vivra dans des zones manquant d'eau. Avec ce constat, la nécessité d'économie d'eau et de préservation des ressources devient une évidence. Cette problématique de l'eau se présente sous deux aspects : d'une part, la consommation d'eau en tant que telle, et d'autre part, les rejets d'eaux usées, qui polluent le milieu naturel de manière générale et les réserves d'eau en particulier.

La consommation d'eau peut être maîtrisée et optimisée, par des actions de sensibilisation à l'adresse des principaux consommateurs : l'agriculture et l'industrie alimentaire. Les rejets d'eaux usées, quant à eux, sont plus difficiles à gérer, du fait même qu'ils peuvent contaminer les ressources.

En France, les industries agro-alimentaires sont responsables de 20% des rejets en eaux résiduaires industrielles.

L'exemple des malteries est particulièrement intéressant, puisque la quasi-totalité de l'eau qui y est utilisée est transformée en rejet.

Le procédé de maltage consiste à faire germer les céréales (exemples : orge, blé) puis à les sécher (étape dite de touraillage). L'objectif de ce procédé est de rendre les réserves de sucres de ces graines, accessibles aux micro-organismes pour la phase de fermentation de la bière. En fait, le procédé de maltage se déroule en trois principales étapes : la trempe, la germination et le touraillage. La première étape – la trempe – consiste à augmenter l'humidité des grains d'orge en les trempant dans l'eau pendant des durées variables, en alternance avec des périodes d'aération, sans eau. La seconde étape – la germination – consiste à maintenir les grains dans une atmosphère humide pendant 5 jours en moyenne. Pendant cette étape, les parois se désagrègent, les protéines et les polyssaccharides des grains commencent à être hydrolysés par les enzymes. Ainsi les grains deviennent plus friables et donc plus facilement exploitables lors du brassage, et leurs réserves (protéines et amidon) deviennent plus accessibles. Enfin, la troisième étape – le touraillage – permet de

ramener l'humidité des graines à 4-5%, ce qui facilite le stockage du malt, d'une part, et permet de développer la couleur et certains arômes, d'autre part.

Dans ce procédé, la principale étape responsable de rejets d'eaux usées est l'étape de trempe.

On estime à 22 Mm³ les rejets annuels d'eaux usées par des malteries françaises et britanniques. Le recyclage de ces eaux dans le procédé représente donc des intérêts multiples. En fait, il permet d'abord de diminuer les coûts des rejets. Ensuite, de la réutilisation de ces eaux traitées dans la malterie, il résulte une diminution de la consommation globale d'eau.

Or, il est communément admis que la réutilisation des eaux de trempe en l'état est impossible, car elle est susceptible de nuire au bon déroulement du procédé, en provoquant une dégradation de la qualité du malt. Cette détérioration proviendrait d'une inhibition de la germination des grains d'orge, provoquée par des molécules présentes dans l'eau de trempe. Le traitement préalable de ces eaux est donc indispensable avant de les recycler dans le procédé. Ce traitement doit notamment être efficace pour l'élimination des substances inhibitrices, qui restent à identifier.

Pour le présent travail, qui se situe dans le cadre du Projet *SWAN (Save Water and Attent Nature)* impliquant des malteurs français et britanniques, trois principaux objectifs ont donc été définis :

- L'étude de la composition des eaux de trempe, afin de mieux caractériser la pollution que celles-ci constituent ; cette étude permettra par la suite de mieux cibler les systèmes de traitement à tester ;
- L'identification des inhibiteurs de la germination, présents dans ces eaux de trempe ;
- La mise au point et l'étude des performances d'un système de traitement des eaux de trempe en malterie. Ce système de traitement doit être efficace pour l'épuration de l'eau et en particulier pour l'élimination des inhibiteurs de la germination. Enfin, l'impact du recyclage des eaux traitées sur les performances du procédé de maltage doit être étudié.

Ce rapport comporte 4 principales parties:

En premier lieu, dans une synthèse bibliographique on se propose de présenter le secteur de la malterie, d'expliquer le procédé de maltage et de synthétiser l'état des connaissances sur les inhibiteurs de la germination de l'orge, puis de détailler la question du traitement des eaux usées industrielles.

Une seconde partie présente le matériel et les méthodes mis en œuvre pour l'analyse des eaux de trempe, des malts et des moûts, pour conduire le procédé de maltage, pour le traitement des eaux de trempe et enfin pour la recherche des inhibiteurs de la germination.

Une troisième partie présente et discute les résultats obtenus pour les différentes parties étudiées : la caractérisation des eaux de trempe, l'étude du recyclage des eaux non traitées, la recherche des inhibiteurs de la germination et l'étude de leur mécanisme d'action, le traitement et le recyclage aux échelles de laboratoire et pilote ainsi que les qualités de malts et bières obtenus.

Enfin, les conclusions de ce travail sont dressées et les différentes perspectives proposées dans la dernière partie.

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

Première partie : Synthèse Bibliographique

I- Marché mondial de l'orge, du malt et de la bière

La consommation de bière s'est mondialement accrue depuis les années 1950. En 25 ans, celle-ci a plus que doublé, passant ainsi de 650 millions d'hectolitres en 1970 à 1200 millions en 1992. La production de bière est de 1400 millions d'hectolitres en 2004. Les 12 leaders mondiaux représentent environ 52 % de la production mondiale de la bière.

Cette évolution implique à son tour une augmentation des besoins en orge de brasserie de qualité et donc en malt. La production mondiale de malt est de l'ordre de 16 millions de tonnes, dont 94% est destinée à la production de la bière, 4% à la fabrication du whisky et 2% à l'alimentation humaine.

Contrairement à la bière qui est brassée dans 130 pays, la production de malt est limitée à 49 pays où les conditions climatiques sont favorables à la culture de l'orge. Approximativement, 30 pays participent à l'exportation de malt. Le nombre de malteries dans le monde est estimé à 450 usines, dont 155 situées dans les pays de la CEE. Les 12 premiers malteurs représentent environ 54 % de la production mondiale.

La France, premier exportateur mondial de malt depuis plus de 25 ans, fournit les brasseries du monde entier. Parmi les 5 premiers producteurs mondiaux de malt, 4 sont français. Actuellement, les malteries *Soufflet* sont à la tête des principaux producteurs Français de malt avec une capacité de production de 1 273 000 tonnes, suivie par *Malteurop* avec une production de 946 000 t.

Consommation et rejet d'eau en malterie

Aujourd'hui, la consommation d'eau dans les malteries reste très élevée ; de plus, la majeure partie de ces volumes est ensuite rejetée. Par exemple, les malteries françaises consomment 12 Mm³ d'eau par an, et les malteries britanniques en consomment 14 Mm³/an. Sur ce total de 26 Mm³/an, 22 Mm³/an sont rejetés sous forme d'eaux usées, soit 85%.

II- Structure du grain d'orge

1- Taxonomie

Même s'il est possible de produire de la bière à partir de malts de différentes céréales, l'orge reste la graine la plus utilisée en malterie en Europe.

La classification de l'orge est résumée ci-dessous :

Règne	Végétal
Embranchement	Anthophytes
Classe	Monocotylédones
Sous-classe	Commelinidae
Ordre	Cyperales
Famille	Poaceae
Genre	<i>Hordeum</i>

Les orges brassicoles appartiennent essentiellement à deux grandes espèces :

- les orges à deux rangs (*Hordeum distichum*) dont seul l'épillet central est fertile;
- les orges à six rangs (*Hordeum polystichum*) dont tous les épillets sont fertiles.

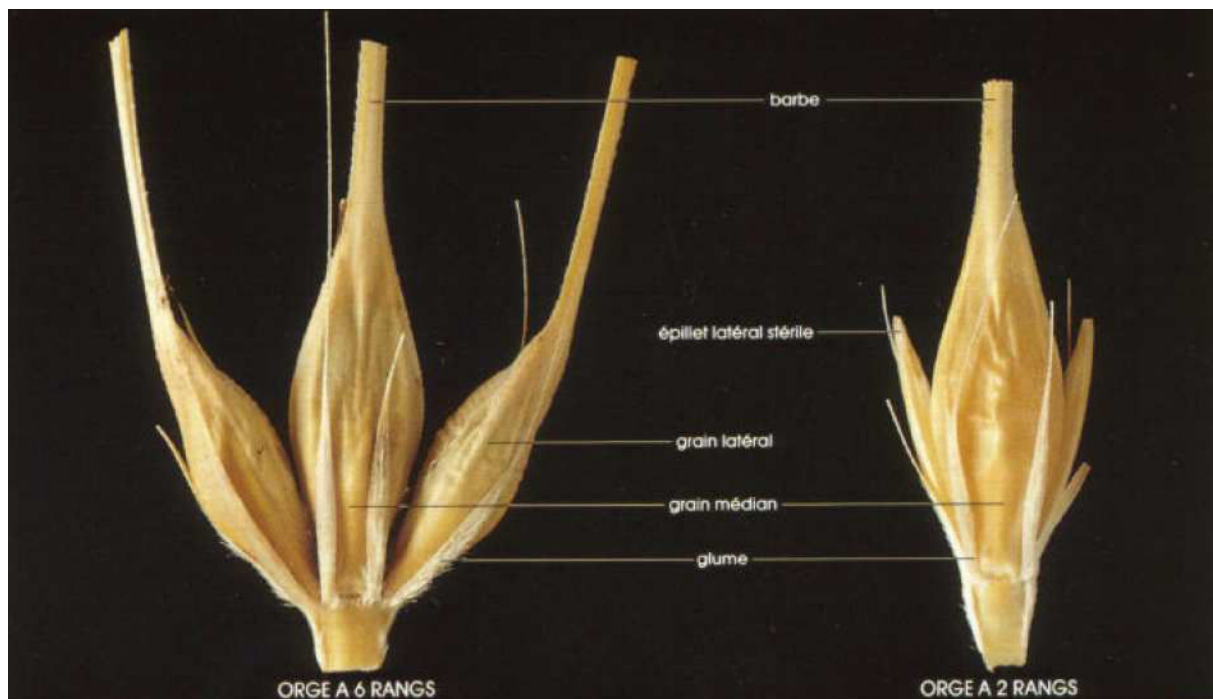


Figure 1 : Différences Orge à six rangs – Orge à deux rangs.

Les orges à deux rangs sont généralement des orges de printemps (2RP) et les orges à six rangs des orges d'hiver (6RH), même si on trouve des variétés d'orge à deux rangs d'hiver (2RH) et des variétés – très rares – à six rangs de printemps (6RP).

2- Composition biochimique du grain d'orge

La composition du grain d'orge est très importante pour la qualité finale du malt, car elle détermine la modification physico-chimique du grain au cours du trempage et de la germination. Chacune des parties constituant un grain d'orge a un rôle particulier dans le déroulement de la germination.

La composition biochimique en poids sec d'un grain d'orge est donnée dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Composition biochimique de l'orge et du malt (Allosio-Ouarnier, 1999).

Constituants biochimiques	ORGE Teneur en % du poids sec	MALT Teneur en % du poids sec
Glucides	78-85	79-88
Amidon	63-65	58-60
Saccharose	1-2	3-5
Sucres réducteurs	0,1-0,2	3-4
Polysaccharides solubles dans l'eau (gommes)	1-1,5	2-4
Polysaccharides solubles dans les solvants organiques (hémicelluloses)	8-10	6-8
Cellulose	4-5	5
Autres	1	2
Lipides	2-3	2-3
Protéines	8-11	8-11
Albumine	0,5	2
Globuline	3	-
Hordéine	3-4	2
Glutéline	3-4	3-4
Acides aminés et peptides	0,5	1-2
Acides nucléiques	0,2-0,3	0,2-0,3
Sels minéraux	2	2,2
Autres dont lignine...	5-6	6-7

3- Histologie

L'orge est une graine vêtue ; les glumelles adhèrent au grain et ne s'en séparent pas au battage. Les figures 2 et 3 présentent des coupes longitudinale et transversale d'un grain d'orge.

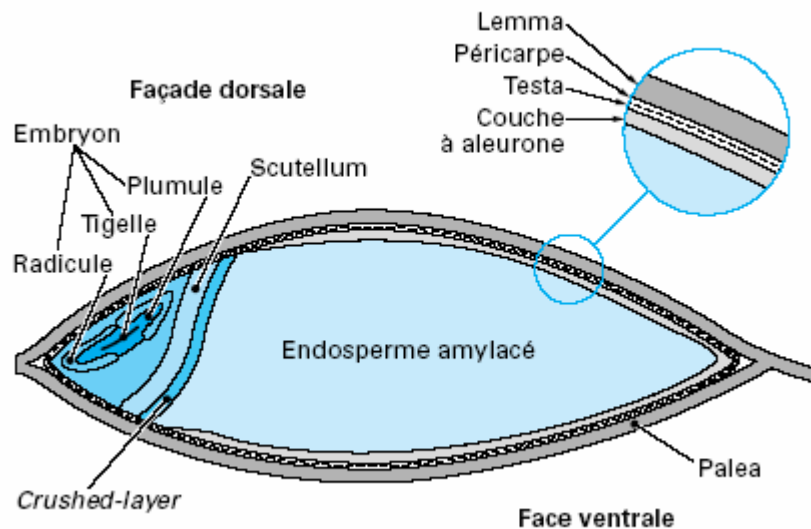


Figure 2 : Coupe longitudinale d'un grain d'orge (Société *Malteurop*, 2000)

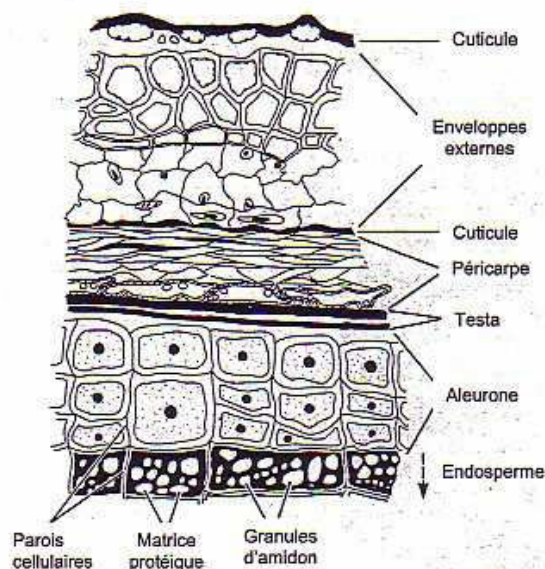


Figure 3 : Coupe transversale des enveloppes, de la couche à aleurone et de l'endosperme amylicé d'un grain d'orge (Palmer, 1989).

Les principales parties constituant un grain d'orge sont, de l'intérieur vers l'extérieur:

- l'embryon (plantule complète) ;
- l'endosperme (réserve de matières nutritives) ;
- la couche à aleurone, périphérique (réservoir enzymatique) ;
- le péricarpe - testa (membrane semi-perméable) ;
- et la paroi externe.

3.1- L'embryon

L'embryon est formé principalement par une radicule, une tigelle et une plumule. Situé principalement sur la face dorsale du grain, il est séparé de l'endosperme par le scutellum qui a une fonction de sécrétion et permet la diffusion des enzymes hydrolytiques de l'embryon vers l'endosperme. L'embryon et l'endosperme se développant indépendamment l'un de l'autre, ils ont des compositions chimiques différentes. L'embryon, qui représente le siège des activités vitales du grain, en particulier grâce aux activités enzymatiques, contient du saccharose, principal substrat respiratoire, ainsi que des lipides et des protéines de structure.

Les principaux sucres de l'embryon sont le saccharose et le raffinose. Ils représentent 25% du poids sec de l'embryon.

Les principales protéines de l'embryon d'un grain d'orge sont des albumines et des globulines.

Au cours du maltage, la plumule grandit de la face dorsale du grain vers sa face ventrale. Pendant sa croissance, l'embryon produit des hormones (acide gibbérellique GA) qui traversent l'embryon vers la couche à aleurone, où elles vont stimuler la formation d'enzymes. Les enzymes ainsi formées dans la couche à aleurone vont être sécrétées vers l'endosperme (MacLeod, 1979).

3.2- L'endosperme

L'albumen (endosperme) représente l'organe de réserve de l'orge. Il est constitué de cellules mortes remplies de granules d'amidon entourés de protéines.

La composition biochimique de l'endosperme est donnée dans le tableau 2.

Une hydrolyse acide ménagée de l'endosperme met en évidence trois niveaux de résistance : on distingue des zones amorphes tendres, des zones amorphes plus dures et des zones cristallines acido-résistantes.

Les graines d'orge sont caractérisées par des différences structurales au niveau de l'endosperme, où on peut trouver des secteurs farineux, contenant des cellules lâchement condensées avec la présence d'un espace aérien entre les granules d'amidon, et des secteurs durs densément condensés de petits granules d'amidon dans une matrice de protéines dense (Chandra *et al*, 1999).

Tableau 2 : Composition biochimique de l'endosperme

Constituants Biochimiques	Teneur dans l'endosperme
Amidon	65%
Protéines	7 à 12%
Parois cellulaires :	
Gommes et matériels celluloseux	6 à 8%
β-glucanes	70%
Pentosanes	20%
Protéines	5%
Glucomannanes	2%
Cellulose	2%
Acides phénoliques	0,5%
Acides uroniques	0,5%
Lipides	2 à 3%

L'amidon est le constituant majeur de l'endosperme de l'orge. Il représente 50 à 70% du poids sec du grain. Il est constitué de deux polymères : l'amylose (25 %) et l'amylopectine (75 %).

L'amylose est un polymère linéaire de 500 à 2500 unités glucose liées par des liaisons α -(1-4). L'amylopectine se définit comme étant de l'amylose avec des ramifications partant de liaisons α -(1-6). 20 à 25 unités glucose séparent les ramifications. Le poids moléculaire élevé suppose une structure très ramifiée comprenant de 10 000 à 100 000 glucoses.

A maturité, l'endosperme de l'orge est constitué de deux types de granules d'amidon, qui ont une structure semi cristalline. Les gros granules d'amidon (Type A), de diamètre compris entre 10 et 25 μ m représentent 10 % du nombre de granules et 90 % du poids de l'amidon. Ils ont une température de gélatinisation de 61-62°C. Les petits granules d'amidon (Type B), de diamètre compris entre 1 et 5 μ m représentent 90 % du nombre de granules et 10 % du poids de l'amidon, et ont une température de gélatinisation de 75-80°C. La température d'empesage est de 60°C. Cette température, basse par rapport à l'amidon de pomme de terre (65°C) ou de maïs (75°C), facilite la saccharification qui a lieu au cours du brassage (Macleod, 1979).

On trouve au niveau des parois cellulaires de l'endosperme, d'autres polysaccharides : les β -glucanes et les pentosanes. Les β -glucanes sont constitués d'enchaînements de 3 ou 4 unités glucose liées par des liaisons β -(1-4) séparés par une liaison β -(1-3). Les pentosanes ou arabinoxylanes sont des polymères de xylose.

On retrouve aussi des protéines au niveau de l'endosperme. La composition protéique dépend des particularités génétiques et des conditions environnementales de culture. Les protéines sont indispensables pour le bon déroulement de la fermentation, influencent la flaveur de la bière et la stabilité de la mousse, mais elles affectent aussi la turbidité et la filtration du moût ainsi que le rendement de brassage.

Il y a 4 types de protéines d'orge :

- l'albumine ou leucosine (4 % des protéines totales) soluble dans l'eau,
- la globuline ou édestine (31 % des protéines totales) soluble dans les solutions salines,
- la prolamine ou hordéine (36 % des protéines totales) soluble dans l'alcool à 70 %
- et la glutéline (29 % des protéines totales) soluble dans la soude.

Enfin, on trouve des lipides de quatre types : triglycérides (69 %), lipides polaires (27 %), diglycérides (2 %) et acides gras libres (2 %). Les granules d'amidon contenant des quantités plus petites de lipides polaires seront plus faciles à dégrader par les enzymes.

3.3- La couche à aleurones

La couche à aleurones renferme, dans sa partie la plus externe, de l'amidon et des protéines, et dans sa partie interne, des lipides (30 %), des protéines (20 %), de l'acide phytique, des vitamines du groupe B, de la cellulose, des pentosanes, des β -glucanes dans les parois cellulaires, mais pas d'amidon. La couche à aleurone est constituée de 3 ou 4 assises de cellules vivantes riches en matières azotées et en globules lipidiques. Pendant le développement du grain, ces cellules vont se différencier. Les plus internes vont permettre la synthèse de protéines et d'amidon. Les plus externes sont les cellules à aleurone. Les cellules à aleurone renferment de

petits organes subcellulaires riches en protéines, acide phytique et sucres. Elles sont spécialisées dans la synthèse (lors de la germination) d'enzymes hydrolytiques qui vont solubiliser les polymères dans l'endosperme (MacLeod, 1979).

3.4- Péricarpe – testa

Le péricarpe est séparé de l'enveloppe par une couche cireuse et est soudé à la testa par une couche de cellules à parois lignifiées. Le péricarpe est composé majoritairement de cellulose (20 %) mais contient également 6 % de protéines, 2 % de cendres, 0,5 % de lipides et de pentosanes. La testa est constituée de deux bandes superposées composées de matériaux cireux et lipidiques. L'ensemble péricarpe - testa est semi-perméable : il est perméable à l'eau mais constitue une barrière pour de nombreux solutés. Il confère au grain sa capacité sélective d'absorption. Cette imperméabilité diminue avec le temps de trempage. La testa contient beaucoup de substances phénoliques telles que les **pro-anthocyanidines** (ou tannins condensés) qui sont impliquées dans le trouble colloïdal de la bière.

3.5- Les glumelles

La glumelle dorsale ou lemma possède une paroi épaisse, alors que la glumelle ventrale ou palea a une paroi plus fine. Les glumelles protègent la plumule qui va se développer au cours de la germination et constituent donc un avantage pour l'orge par rapport à d'autres graines qui n'ont pas d'enveloppes. Les glumelles sont très riches en celluloses et hémicelluloses, et représentent 10 à 20 % du poids sec de la graine (MacLeod, 1979).

3.6- La paroi externe

La paroi externe entoure complètement le grain sauf aux 2 extrémités. Elle doit être intacte pour permettre une absorption d'eau homogène lors du trempage, pour protéger l'embryon des infections pendant la germination. Elle représente ± 3 % du poids du grain. Elle possède une fonction protectrice, et assure par capillarité la distribution d'eau sur la surface du grain. La graine est sélectivement perméable ; elle empêche non seulement la sortie des sucres et des acides aminés du grain, mais aussi l'entrée des microorganismes. Les dégradations fortuites par ces parois permettent la perte de substances nutritives, la croissance microbienne dans les

tissus et la perte de la force mécanique. Dans des cas extrêmes, elles peuvent même empêcher la germination de l'embryon.

La composition détaillée de la paroi externe est donnée sur la figure 4. Elle représente la composition des enveloppes, établie en utilisant différentes méthodes d'extraction chimiques ou enzymatiques (Höjje et al, 2005).

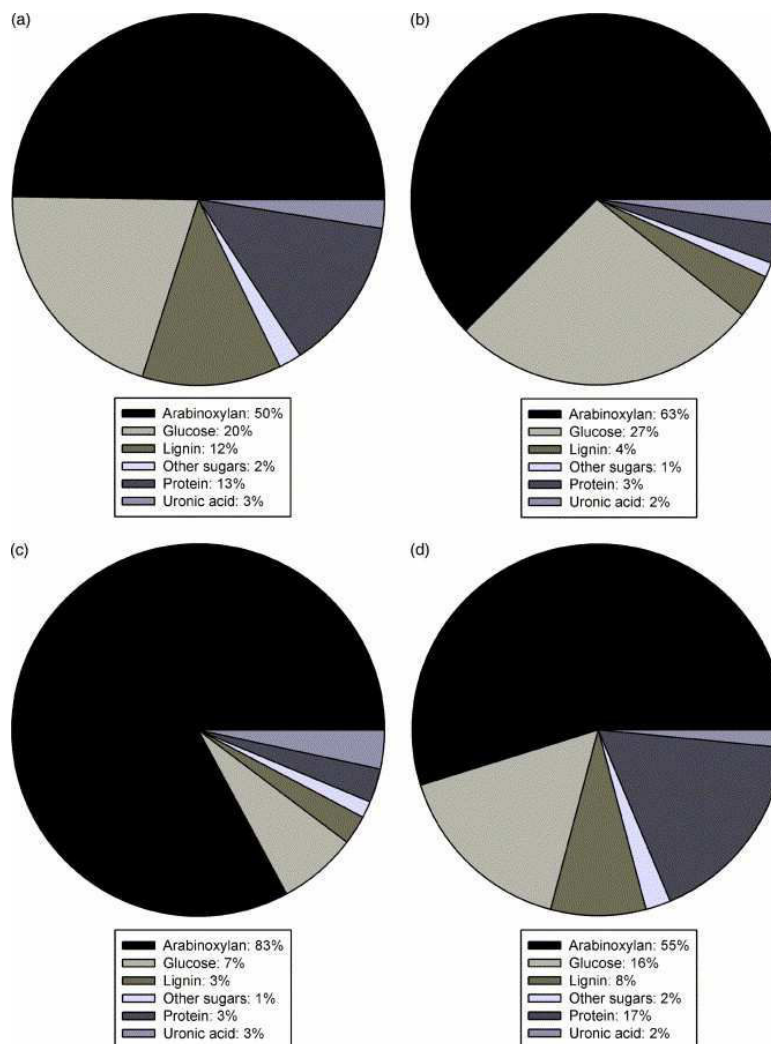


Figure 4 : Composition détaillée de la paroi externe selon une extraction alcaline après différentes techniques de prétraitement (Höjje et al, 2005). (a) : prétraitement au HCl ; (b) : prétraitement au HCl/ NH₄OH et délignification à l'éthanol; (c) prétraitement au HCl et délignification au NaCl; (d) prétraitement enzymatiques.

On remarque que les enveloppes sont principalement composées d'arabinoxylanes, de lignine, de glucose et de protéines.

Les arabinoxylanes, composants majoritaires des parois, se constituent d'un squelette de β -D-xylopyranosyls liés entre eux par des liaisons β -(1-4). On peut aussi

trouver des molécules comprenant des substitutions en position 2 et/ou 3 avec un α -L-arabinofuranosyl (Mac Gregor et Fincher, 1993).

4- La microflore de l'orge

Plusieurs microorganismes sont naturellement présents sur l'orge et dans l'environnement de la malterie. Les conditions de maltage (eau, température, nutriments, oxygène) sont plutôt favorables à leur maintien et même à leur développement.

La microflore de l'orge comprend des bactéries, levures, et champignons filamenteux (moisissures) qui contaminent et colonisent le grain dans le champ et lors du stockage. La nature et la quantité de ces microorganismes dépendent d'une part des conditions climatiques lors de la culture et la récolte, et d'autre part, des conditions et de la durée de stockage.

Au cours de la maturation et avant la récolte, l'orge est exposée à de nombreuses contaminations microbiennes liées au contact de l'orge avec l'air et le sol. Les deux facteurs prépondérants sont d'une part la teneur en eau du grain et, d'autre part la température.

Cette microflore est dominée généralement par les bactéries, plus particulièrement gram négatives. Les genres les plus rencontrés sont *Erwinia* et *Pseudomonas*. La contamination de l'orge par les levures est aussi importante et regroupe de nombreux genres (*Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Torulopsis*, *Candida*...).

Les moisissures de champ ont une tendance phytopathogène et appartiennent aux genres *Fusarium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Verticillium*, *Botrytis* (Nicolas et Boivin, 1990 ; Maghribi, 1985 et MacLeod, 1979). Les *Cladosporium* sont présents sur 100 % des enveloppes et 100 % des caryopses, les *Alternaria* sur 49 % des enveloppes et 45 % des caryopses et *Epicoccum nigrum* sur 63 % des enveloppes et 48 % des caryopses et *Botrytis cinerea* sur 3,7 % des enveloppes et 3 % des caryopses.

Après la récolte, ces moisissures persistent plus ou moins longtemps au cours du stockage. Ces champignons filamenteux sont plus ou moins xérophiles et

typiquement saprophytes. Les espèces les plus prédominantes sont *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor*, etc. Ces espèces sont absentes ou présentes en faible quantité dans le champ et deviennent prédominantes lors du stockage.

Les conditions de stockage (durée, température, humidité) sont importantes pour empêcher une prolifération de ces microorganismes. Les études de Beattie (1998), menées sur l'effet de sept mois de stockage d'orge dans des conditions différentes de températures (-20 °C, 4 °C, 24 °C), ont montré que le stockage de l'orge à 24 °C accompagné d'une bonne aération permet une réduction efficace de la viabilité de *Fusarium* ainsi que de la teneur en déoxynivalenol.

Les conditions hydro thermiques des diverses opérations de maltage sont suffisantes pour permettre le développement et la prolifération de la microflore de l'orge. L'augmentation de l'humidité du grain au cours de la trempe et de la germination, l'augmentation de la température liée à l'activité biologique du grain sont les principaux paramètres favorisant le développement de cette microflore.

La croissance microbienne se poursuit au cours de la trempe et le nombre des cellules augmente plus rapidement pendant la germination quand les enzymes convertissent les polysaccharides (β -glucanes) résiduels en sucres fermentescibles. Le touraillage du malt vert dure environ 24h. Il débute par un séchage à 50 °C, ce qui favorise le développement des moisissures thermo tolérantes, notamment des *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*. Le coup de feu (température élevée de séchage du malt) permet de ramener l'humidité des grains à une teneur de 3 % à 5 % et d'éliminer une grande quantité de cette microflore.

III- Procédé de maltage

Le procédé de maltage, pratiqué depuis plus de 6000 ans (Briggs, 1998), a connu des améliorations considérables. En effet, grâce à la maîtrise de la température, des ratios orge/eau, de l'amélioration et la sélection des variétés ainsi que des autres paramètres, la durée totale de trempe a été réduite à 35 – 40h, alors qu'il y a un siècle elle pouvait durer jusqu'à 8 jours ; de même, la germination est passée de 10 – 35 jours à 3 – 6 jours. Quant au touraillage, qui pouvait durer jusqu'à 6 jours, il dure aujourd'hui en moyenne 24h.

Le procédé de maltage peut être défini comme une germination limitée et contrôlée des graines, qu'on stoppe durant le touraillage en tuant l'embryon. L'objectif de ce procédé est d'induire les modifications physiques et biochimiques du grain, nécessaires au bon déroulement des étapes de brassage et de fermentation du moût en brasserie.

Le procédé de maltage se déroule en plusieurs étapes :

- le nettoyage et la calibration : cette étape permet l'élimination des corps indésirables tels que les cailloux, les débris végétaux, les graines de trop petite taille et pailles ;
- la trempe : permet un lavage du grain ainsi que son humidification. Ainsi son humidité passe de 12 – 15% à 42 – 45%.
- la germination : permet d'obtenir d'importantes modifications structurales et biochimiques des graines ;
- le touraillage : permet, en séchant les grains, d'arrêter le développement de l'embryon, mais aussi de développer la couleur et les arômes nécessaires ;
- le dégermage : les radicules sont fortement hygroscopiques. Le dégermage permet donc d'améliorer les conditions de stockage.

Les étapes clés de ce procédé sont la trempe et la germination, qui vont déterminer la qualité du malt.

1- La trempe

La trempe est une étape essentielle du procédé de maltage, dont la conduite déterminera le déroulement de toutes les opérations ultérieures. En effet, il est connu qu'aucune étape ultérieure ne permet de corriger les méfaits d'une mauvaise trempe.

Le but de la trempe est d'amener l'humidité du grain de 12 – 15% à 42 – 45% afin d'initier sa germination. En plus de l'hydratation de l'endosperme, la trempe permet d'éliminer de la surface du grain des impuretés, micro-organismes et inhibiteurs de la germination. Les paramètres importants de la trempe sont : la température de l'eau, le ratio orge / eau, le diagramme de trempe, l'aération, l'extraction du CO₂, l'agitation, la variété d'orge et l'utilisation de différents additifs.

1.1- Hydratation du grain

L'hydratation est importante pour l'humidification de l'embryon et de la couche à aleurone, indispensable pour amorcer la synthèse d'enzymes et pour assurer le transport de celles-ci vers l'endosperme. De plus, l'eau absorbée doit permettre une modification homogène des tissus tout en minimisant la croissance et la respiration de l'embryon (Chapon, 1960).

Au début de la trempe, la prise d'eau est très rapide. Elle diminue dans un second temps et devient de plus en plus lente (Urion, 1948). En conséquence, l'embryon et les enveloppes absorbent l'eau plus rapidement que l'endosperme. Le mécanisme d'absorption consiste en fait en deux phases séparées (Brooks *et al.*, 1976) :

1- prise d'eau rapide par l'embryon, par simple diffusion ;

2- une phase plus lente de prise d'eau, contrôlée par le métabolisme.

La trempe est constituée de plusieurs étapes de « sous eau » et « de sous air » successives. Ces diagrammes doivent être adaptés à chaque variété d'orge utilisée. La durée des étapes sous eau et sous air joue un rôle décisif pour la qualité finale du malt.

Les différentes variétés d'orge sont caractérisées par des taux d'humidité minimum au dessous desquels les graines ne germent pas. Les variétés les moins exigeantes germent à partir de 30% d'humidité tandis que les variétés les plus exigeantes ne germent qu'à partir d'un taux d'humidité de 50% (cas extrêmes). La vitesse de la

prise d'eau dépend de la structure du grain (variété, taille, rigidité des réseaux protéiques) mais aussi de la température de l'eau (Morgan et al, 1983).

Des teneurs élevées en protéines et en β -glucanes freinent la prise d'eau (Gibbons, 1983). Les caractéristiques de l'endosperme jouent aussi un rôle important dans la prise d'eau. En fait, les endospermes farineux ont une structure ouverte et fissurée et les granules d'amidon sont peu liés à la matrice protéique. L'eau pénètre donc dans ce type d'amande plus facilement que dans des endospermes durs. Les graines à endosperme farineux permettent d'ailleurs généralement d'obtenir des malts de meilleure qualité.

L'entrée d'eau est aussi ralentie par les couches externes imperméables du grain et notamment le péricarpe. Dans une graine intacte, l'eau pénètre préférentiellement dans la région embryonnaire ; elle entre plus lentement à l'extrémité distale et dans des proportions encore moindres dans la région ventrale (Axcell, 1983). Une abrasion ou une scarification du péricarpe facilite l'imbibition. De tels traitements ont été appliqués pour améliorer la rapidité de la trempe et donc accélérer la transformation de l'orge. Cependant, cette technique ne s'est pas développée vue l'hétérogénéité de l'hydratation.

La pression hydrostatique peut aussi influencer la qualité de la trempe. Ainsi, le piquage des grains (la sortie de la plumule de l'enveloppe) est totalement inhibé par une pression supérieure à 2 bars. Cet effet dépend de l'avancement du développement embryonnaire.

Durant la trempe, on assiste à des modifications dues à la dissolution de diverses substances. La testa étant semi-perméable, les sels minéraux contenus dans l'eau ne peuvent pas pénétrer dans l'endosperme. **L'action dissolvante se limite donc à l'enveloppe** (Urion, 1948).

Pendant les 6 premières heures de trempage, le grain perd de 0.6 à 1.5% de sa matière sèche. Les substances dissoutes sont de natures diverses : tanins, matières azotées, gommes, sucres, et quelques matières minérales. La trempe amorce les réactions enzymatiques qui se poursuivront et s'amplifieront pendant la germination.

1.2-Température de l'eau de trempage

La température de l'eau de trempage est très importante. En fait, elle agit sur la vitesse d'imbibition et la vitesse de dissolution, donc sur la durée de la trempage. Elle joue aussi un rôle sur la croissance des micro-organismes à la surface du grain et dans l'eau de trempage. Cependant, elle ne semble avoir aucun effet sur la qualité finale du malt (Fliss, 1996).

2- La germination

La germination est une étape très importante du procédé de maltage. Elle est à l'origine des principales modifications qui apparaissent au sein du grain au cours du maltage. Elle représente une amplification des transformations physiologiques du grain avec développement du germe, des enzymes et des radicules (Mac Grégor, 1991 ; Debourg, 1998).

2.1- Paramètres de la germination

Les deux processus fondamentaux intervenant lors de la germination (hydrolyses enzymatiques dans l'amande et synthèses dans le germe) sont fortement influencés par la température, l'aération, la durée et l'humidité régnant au cours de cette étape.

2.2- Influence de l'humidité du grain

Pour que l'embryon puisse poursuivre sa croissance pendant la germination, il récupère une partie de l'eau présente dans l'endosperme entraînant ainsi un dessèchement progressif du grain (environ 0,5 % d'humidité est perdue par jour de germination, (Narziss, 1970)). Il est nécessaire de maintenir l'humidité du grain autour de 45 %. Pour cela, des arrosages peuvent être pratiqués et l'humidité ambiante est maintenue à environ 100%.

2.3- Influence de la température de l'air

La température de la germination est un paramètre difficile à optimiser. En effet des températures basses permettent de bonnes activités enzymatiques alors que les températures élevées permettent d'accélérer la germination et la production d'enzymes au début de cette étape. Cependant ces dernières sont dénaturées par la suite. Il est donc nécessaire de trouver un optimum entre 16 et 20 °C.

2.4- Aération

L'aération agit sur la respiration et donc sur les biosynthèses. Il faut par conséquent la limiter si on veut limiter les freintes (pertes de matières). La consommation d'oxygène est de 2 à 3 fois plus rapide en germination qu'en trempe (Dalshstrom et al, 1963). Le quotient respiratoire du grain augmente rapidement après la trempe pendant 8 heures, pour se stabiliser 20 heures avant de réaugmenter jusqu'au cinquième jour de germination (Waller, 1967).

2.5- Durée de la germination

La durée de la germination dépend de la variété d'orge maltée et du type d'installation utilisé et dure entre 4 à 6 jours. Un allongement de la durée de germination favorise la désagrégation du grain et augmente l'activité enzymatique (Narziss, 1969). D'après Robbins *et al.* en 1963, la teneur du malt en acides aminés est accrue lorsque la durée de germination augmente. Selon Bathgate *et al.* en 1978, une germination longue et fraîche maximise la fermentabilité du malt et minimise les pertes au maltage.

3- Le touraillage

Au cours de la germination, l'activité biologique du grain continue à se développer, et lorsque la production enzymatique et la modification de l'endosperme ont atteint leurs niveaux optimaux, cette activité doit être arrêtée.

Le touraillage consiste à faire passer de l'air chaud au travers de la couche de malt vert et de ramener l'humidité du malt de 40-45 % à une valeur inférieure à 5 %. La baisse du taux d'humidité limite les modifications du malt et facilite sa stabilité au cours du stockage, sans risque de contamination microbienne. Outre la baisse de la teneur en humidité, le touraillage permet d'assurer un certain potentiel enzymatique et de développer les arômes et la couleur du malt. En effet, la couleur et les composés aromatiques du malt résultent des complexations chimiques et des réactions biochimiques intervenant pendant cette opération (Scriban *et al.*, 1973). La qualité de la bière finie dépend pour plusieurs raisons d'un contrôle strict du séchage et du « coup de feu ».

Le touraillage débute par des températures de l'air inférieures à 35°C, qui amènent l'humidité du grain de 45-47 % à une valeur de 20 %. Durant cette phase, la

respiration du grain se poursuit, le pouvoir diastasique augmente légèrement et les synthèses (sucres réducteurs, saccharose) accompagnées d'une diminution des réserves et d'un dégagement de dioxyde de carbone se poursuivent.

Le touraillage se prolonge par une température plus élevée comprise entre 45 et 55°C. Durant cette phase, l'embryon est détruit, mais l'activité enzymatique persiste. De nouveaux sucres apparaissent et le taux d'azote soluble s'accroît. Si la température et l'humidité sont suffisamment élevées, des sucres et des acides aminés s'accumulent. Ce mélange, provoque par réaction de Maillard, l'apparition de mélanoidines colorées (Karakus, 1975).

La température du coup de feu varie selon le type de malt à produire. L'augmentation de cette température de 75 à 95°C, résulte en une légère modification de l'extrait, de la viscosité du moût, une diminution du taux d' α -amylase et une augmentation du taux d'azote soluble et de la couleur du moût de malt (Piendl, 1976). Au-delà de 60°C, les enzymes sont progressivement désactivées. Elles ne sont détruites que pour des températures dépassant 110-120°C ou pour une durée prolongée du coup de feu. Les malts clairs, destinés à la fabrication des bières blondes, et les malts foncés, destinés à la fabrication des bières brunes subissent des touraillages d'intensité différente. La destruction enzymatique est moindre dans les malts clairs.

Le touraillage ne se limite pas au blocage de l'activité des enzymes mais provoque également la coagulation des autres protéines, essentielle à la clarté de la bière. La quantité d'azote soluble (et par conséquent l'extrait) diminue donc légèrement.

4- Le dégermage et le stockage

Le malt touraillé doit être débarrassé de ses radicelles qui sont fortement hygroscopiques, et qui peuvent transmettre des substances indésirables au moût. La valorisation des radicelles se fait dans les domaines de l'alimentation animale, en pharmacie (tisanes de radicelles contre le diabète), substrat pour la levure de boulangerie, culture d'orchidées (Urion, 1948).

Le malt fraîchement touraillé contient suivant la qualité et le lieu de production 4,5 % d'humidité. Ce produit est très hygroscopique et toutes les mesures doivent être employées pour éviter la prise d'humidité. Le stockage doit avoir lieu à des températures inférieures à 25°C afin d'empêcher une augmentation de la couleur

dans les silos sans aération. Après contrôles analytiques, les malts seront stockés dans des cellules distinctes de même composition. Ces différents malts pourront être mélangés en vue d'obtenir les caractéristiques exigées par chacun des clients pour avoir des livraisons les plus homogènes possibles.

5- Physiologie de la germination

La germination commence par la prise d'eau par le grain, se poursuit par des transformations physiologiques telles que le développement du germe et la production d'enzymes, et finit par l'élongation de l'axe embryonnaire et le piquage du grain. C'est la principale étape qui est à l'origine des modifications qui apparaissent au sein du grain au cours du maltage.

La prise d'eau par le grain d'orge pendant la germination se déroule en trois phases, résumées sur la figure 5 (Bewley, 1997).

- La première phase, appelée phase d'imbibition, correspond à une forte prise d'eau couplée à une augmentation de l'activité respiratoire. Au niveau technologique, cette étape se déroule durant la trempe.
- Suit alors un plateau au niveau de la prise d'eau ; cette seconde phase correspond à la germination *stricto sensu*, et est caractérisée par une stabilisation de la prise d'eau et de l'activité respiratoire.
- Enfin, on trouve la phase d'élongation des radicules (Heller *et al.*, 1995).

Les mécanismes de prise d'eau correspondent à son absorption principalement par les molécules colloïdales, telles que les protéines et autres macromolécules dans le grain (Hopkins, 2003).

Wain (1975) a démontré que le péricarpe – testa se comportait comme une membrane osmotique : il permet l'entrée d'eau dans le grain, mais est imperméable au passage des solutés. Ainsi, les nutriments ne sont pas largués à l'extérieur du grain, et les solutés contenus dans l'eau n'entrent pas.

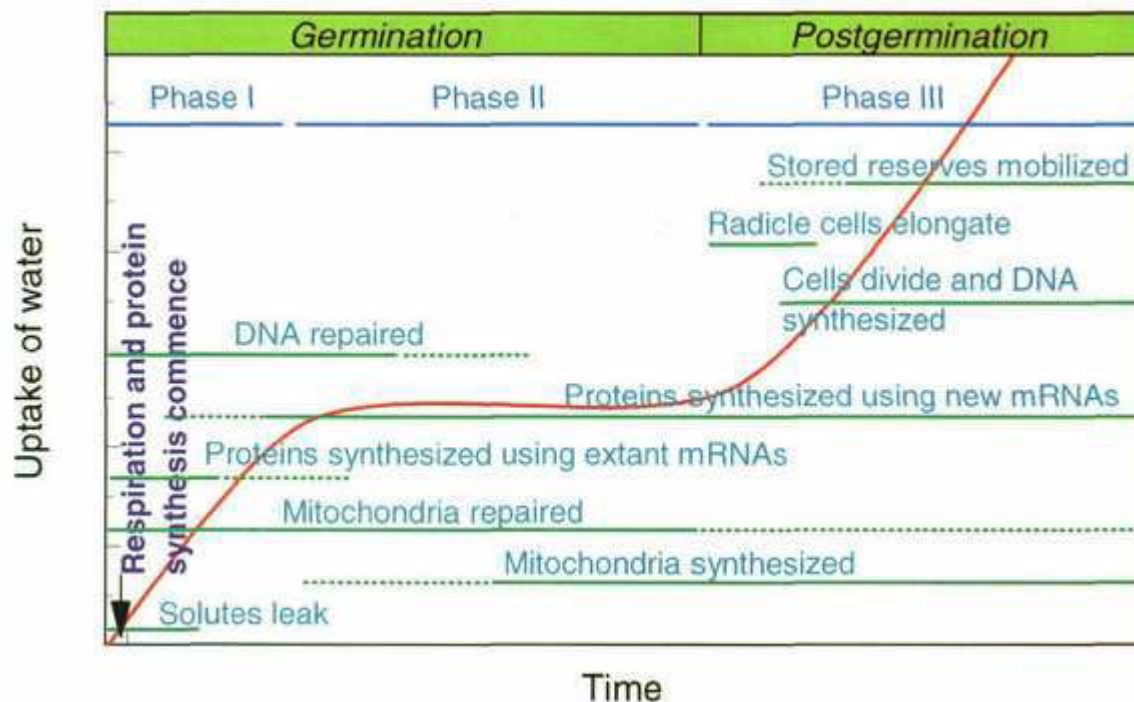


Figure 5 : Différentes phases de prise d'eau et de respiration pendant la germination (Bewley, 1997)

McEntyre *et al.* (1998) ont pu suivre l'entrée d'eau dans le grain par RMN. Cette technique a permis de constater que l'eau passe d'abord par le micropyle ; les couches supérieures sont d'abord hydratées ; cette eau migre ensuite vers l'aleurone et l'endosperme. L'évolution de la distribution de l'eau dans le grain pendant la trempage est présentée dans la figure 6. L'hydratation des couches extérieures et le début d'hydratation de l'endosperme ont lieu généralement pendant la trempage. Pendant l'étape de germination, l'hydratation du grain va tendre à s'homogénéiser, et les activités métaboliques vont s'amplifier.

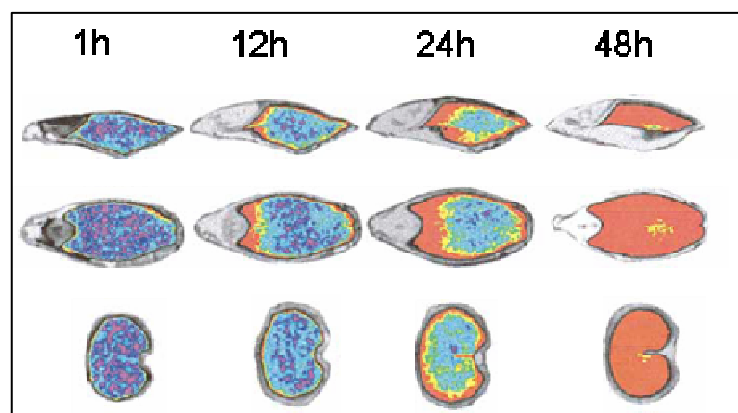


Figure 6 : Distribution de l'eau dans le grain pendant la trempage. (Couleur violette : tissus les moins hydratés ; couleur rouge : tissus les plus hydratés). (Molina-Cano *et al.*, 2002)

5.1- Les changements durant la germination

La figure 7 montre le développement de l'embryon, l'élongation de la plumule et des racicules pendant la trempé et la germination.

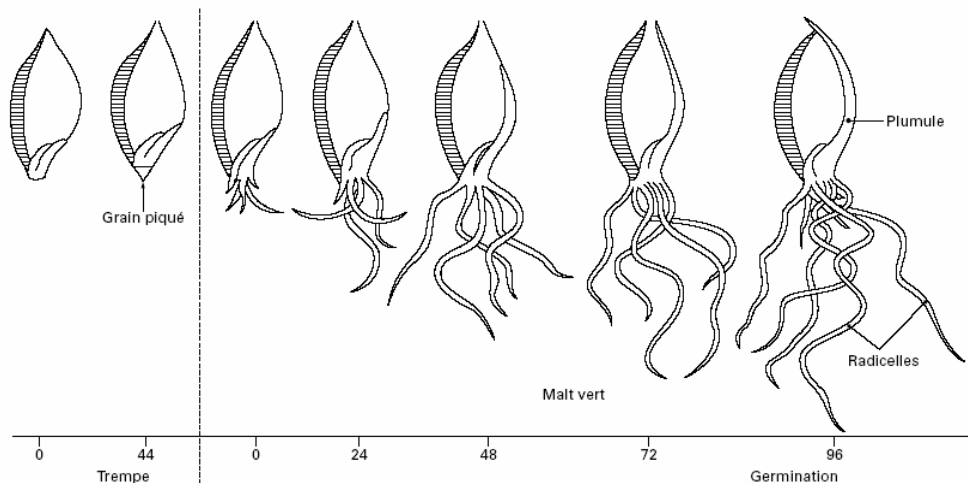


Figure 7 : Évolution morphologique du grain d'orge au cours des étapes de trempage et de germination (Société *Malteurop*, 2000)

L'eau absorbée pendant la trempé ainsi que celle amenée tout au long de la germination par arrosage vont permettre la reprise d'activités métaboliques par l'embryon, qui va synthétiser des hormones telles que les gibbérellines. Ces hormones traversent les couches externes du grain et sont sécrétées vers la couche à aleurone, où elles vont déclencher les synthèses enzymatiques. L'eau va aussi permettre la migration des enzymes produites dans la couche à aleurone vers l'endosperme. Ces enzymes vont permettre l'hydrolyse des protéines de réserve afin de produire des peptides et des acides aminés. Les acides aminés sont destinés au développement des plantules et aux synthèses protéiques. Les sucres sont la principale source d'énergie.

Les acides aminés sont acheminés vers le scutellum dans la direction contraire à leur gradient de concentration grâce à un système de transport actif. Le taux maximum de concentration de peptides et d'acides aminés dans le scutellum est atteint au bout de trois jours de germination.

Les β -glucanases - pentosanases attaquent le réseau des membranes cellulosesiques qui perd de sa rigidité. Les protéines matricielles sont ensuite hydrolysées, libérant ainsi les granules d'amidon. Apparaissent alors des zones de moindre résistance dans la substance interstitielle. C'est la « désagrégation ».

Ainsi, la germination amène une désagrégation chimique du grain, due à une modification des substrats biochimiques, et qui a pour autre conséquence une structure plus friable du grain, qu'on appelle désagrégation physique.

5.2- Les inhibiteurs de la germination et les mécanismes d'inhibition

On retrouve dans la littérature une très large variété de molécules responsables de l'inhibition de la germination de l'orge. Cependant, les mécanismes d'inhibition sont encore mal connus.

Ainsi, l'ammonium, l'éthylène, les huiles essentielles de la moutarde, les acides organiques, les lactones insaturées, les aldéhydes, les huiles essentielles ayant un rôle imperméabilisant, alcaloïdes, sont cités comme étant des inhibiteurs de la germination (Evenari, 1949).

Mais différentes autres substances et différents paramètres physico-chimiques sont aussi cités comme inhibiteurs de la germination.

- La force ionique et la pression osmotique :

Shabala *et al.* (2000), en travaillant sur les grains de blé, ont étudié les profils de prise de potassium, de calcium et de protons sur la surface des grains en germination. Ils ont constaté que lorsqu'il y avait inhibition de la germination, il y avait aussi une modification des flux de ces éléments.

Karaki (2001) a aussi exposé l'effet de sels sur la germination ; il a constaté que les sels provoquaient une diminution de l'imbibition du fait d'une diminution du potentiel d'eau.

De plus, lorsque des grains de blé sont germés en milieu salin (NaCl à 200 mM), le profil protéique est altéré (Hurkmann et Tanaka, 1987). La germinine, identifiée comme étant une oxalate-oxydase (Bolwell et Wojtaszek, 1997), est régulée par un stress salin (Hurkmann et Tanaka, 1987).

Briggs (1992) a démontré que les sucres solubles, résultant de l'hydrolyse des substances de réserve, peuvent avoir un effet sur la synthèse de la gibbérelline, donc sur la germination.

- Les hormones végétales :

L'acide abscissique est connu pour être une hormone inhibitrice de la germination. La gibbérelline, quant à elle, est connue pour être activatrice de la germination.

- Les acides gras :

Van Beckum et Wang (1994) ont démontré l'effet négatif des acides gras à courte chaîne (heptanoïque, octanoïque et nonanoïque) sur la germination des grains d'orge.

- Les pesticides et mycotoxines :

Certains auteurs (Wain, 1975) ont montré que des pesticides (tels que le chlorméquat chlorure) et des mycotoxines peuvent être considérés comme des retardateurs de croissance.

- Le peroxyde d'hydrogène :

Palma *et al.* (2003) expliquent que durant la mobilisation des réserves, la β -oxydation des lipides génère du peroxyde d'hydrogène qui est insuffisamment dégradé, puisque la catalase est inhibée par l'acide gibbérellique. Cette accumulation de H_2O_2 provoque la mort cellulaire dans la couche à aleurone.

- Les micro-organismes :

La compétition pour l'oxygène entre le grain et les micro-organismes a été mentionnée comme mécanisme d'inhibition de la germination (Doran *et al.*, 1992).

- Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques sont les composés les plus cités dans la littérature pour être impliqués dans le phénomène d'inhibition de la germination de l'orge.

En effet, ils sont connus pour être impliqués dans les mécanismes de défense des plantes (Dicarlo *et al.*, 1999). Ils jouent le rôle d'inhibiteurs d'activités enzymatiques, d'agents anti-oxydants, de régulateurs d'hormones et de complexants de métaux.

Localisation des polyphénols dans les grains d'orge:

La couche à aleurone contient des quantités importantes d'anthocyanogènes, majoritairement liés à des peptides de faible poids moléculaire. On trouve aussi des teneurs élevées en tanins dans les enveloppes de grains d'orge.

Les composés phénoliques de l'orge peuvent être répartis entre les classes présentées sur la Figure 8.

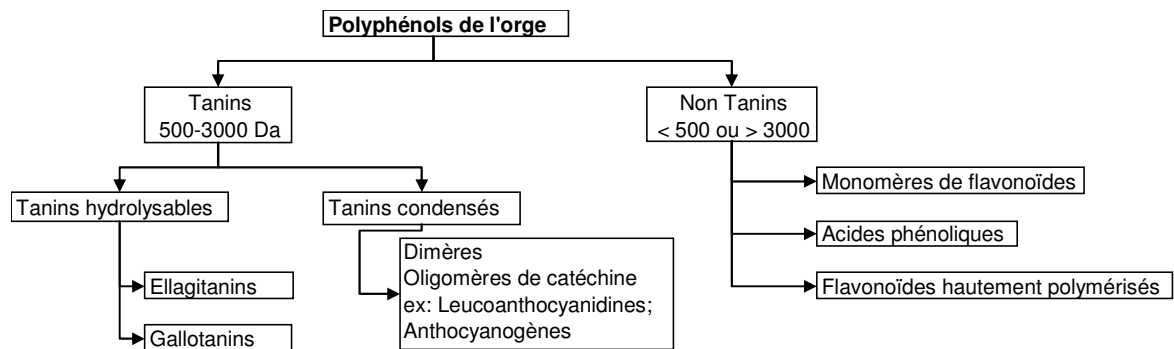


Figure 8 : Différentes classes de composés phénoliques (Pollock et Moll, 1979)

Ainsi, dans les grains d'orge, les composés phénoliques les plus abondants sont :

- les flavan-3-ols (2 ou 3 unités de catéchine) ; ils représentent plus de 85% des composés phénoliques totaux de l'orge (Maillard *et al.*, 1996) ;
- des esters cinnamiques ; ils représentent environ 10% des composés phénoliques totaux de l'orge ;
- quelques flavonols ; ils représentent près de 5% des composés phénoliques totaux de l'orge ;
- des acides phénoliques,
- des caroténoïdes et des tocophérols (Goupy *et al.*, 1996).

Les flavan-3-ols peuvent polymériser, donnant des procyanidines oligomériques et polymériques et des prodelphidines, ayant les structures suivantes (figures 9 et 10):

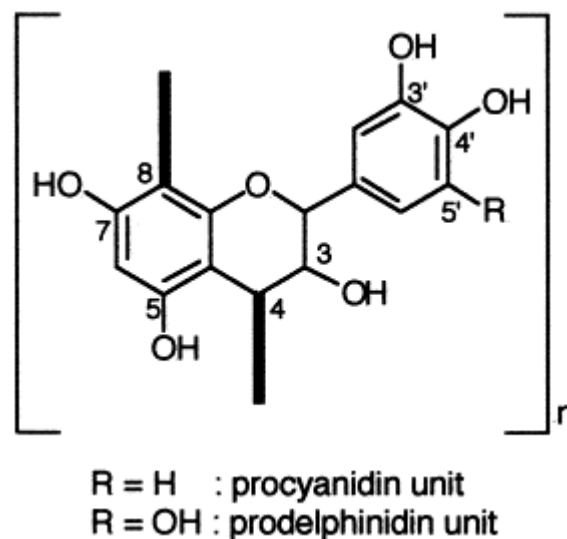


Figure 9 : Structure générique des unités de procyanidines et prodelphidines (Yanagida *et al.*, 1999)

Selon Maillard *et al.* (1996), les composés phénoliques de l'orge, essentiellement les flavan-3-ols, peuvent donner des radicaux libres qui interfèreraient avec l'oxydation des lipides.

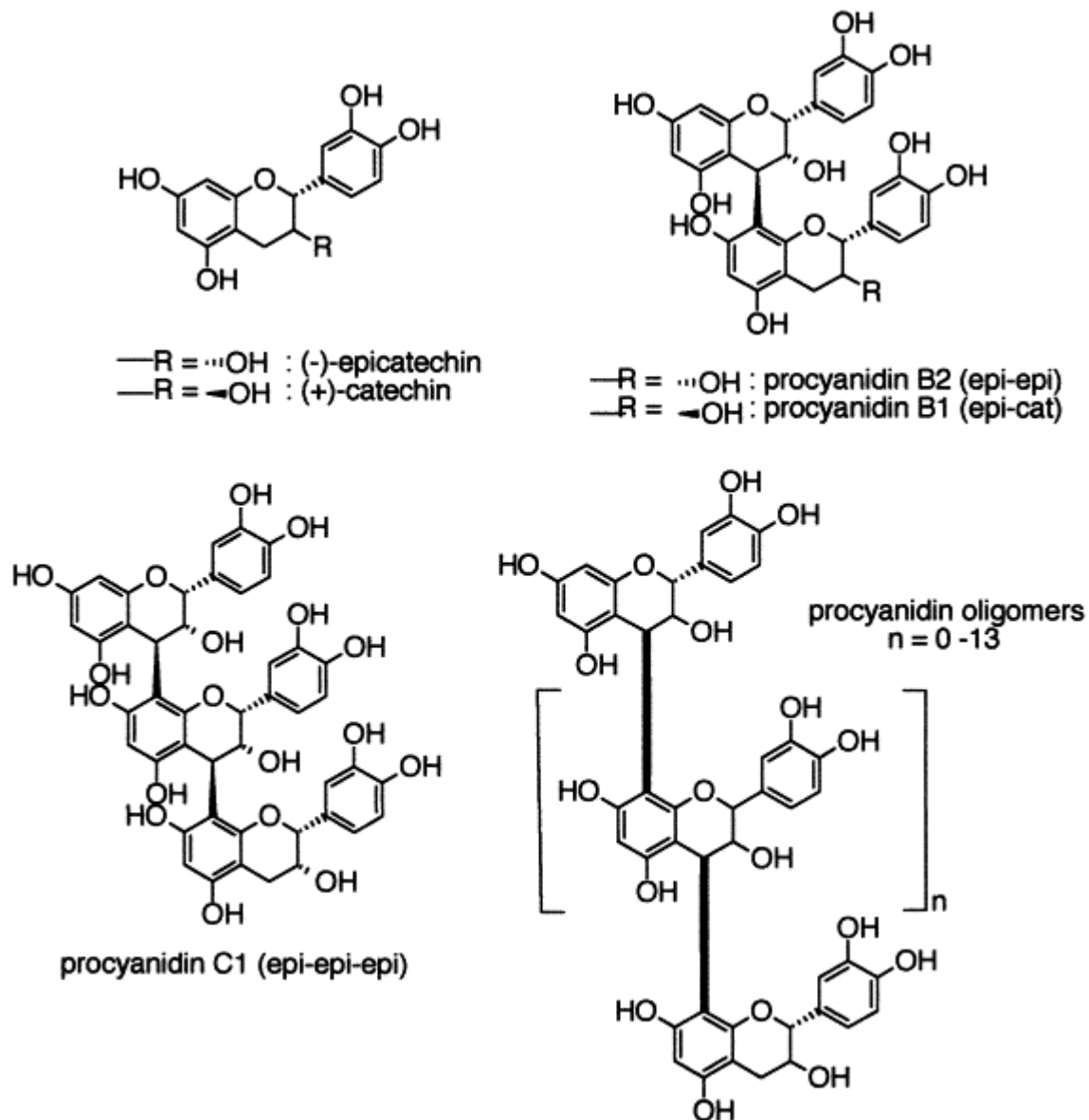


Figure 10: Structures de monomères de flavan-3-ols et d'oligomères: procyanidines (Yanagida *et al.*, 1999)

Les composés phénoliques les plus abondants dans le grain d'orge sont : la catéchine, la procyanidine B3, la procyanidine C2, la prodelphidine B3, l'acide p-coumarique, l'acide férulique et l'acide vanillique (Maillard *et al.*, 1996).

Parmi ces composés, les pro-anthocyanidines, à travers l'inhibition de la synthèse d'ATP, inhibent le développement des plantes et la germination des graines (Rawat *et al.*, 1998).

Les coumarines et autres molécules similaires (4-hydroxycoumarine, psolarène, xanthotoxine) inhibent la mitose (Kupidlowska *et al.*, 1994 ; Zobel et Brown, 1995). A titre d'exemple, Baskin et al (1967) ont démontré que le contact de psoralène avec l'embryon provoquait une inhibition de la croissance.

Selon Evenari *et al.* (1949), l'inhibition provoquée par les composés phénoliques est due à la présence de groupements hydroxyles. Pour Garcia Bilbao et Hernandez Garcia (1971), les coumarines et la scopolétine sont inhibitrices à cause de leurs lactones insaturées.

Selon Briggs *et al.* (1992), les tanins agissent comme antagonistes de la gibbérelline. L'existence de liaisons réversibles entre l'acide gibbérellique et divers composés phénoliques a été établie. Elle peut expliquer l'effet inhibiteur des tannins, la disparition apparente de gibbérelline de la surface des grains et les difficultés pour séparer les gibbérellines dans les extraits de graines.

Selon Corbineau *et al.* (1980), les glumelles adhérentes au grain d'orge sont responsables de la dormance, et les éliminer des grains permet l'augmentation du taux de germination. Dans un premier temps, ces auteurs ont conclu que les glumelles inhibaient la germination en freinant le transfert d'oxygène vers l'embryon. Dans une étude ultérieure, ils ont formulé l'hypothèse selon laquelle ce manque de transfert d'oxygène pourrait être dû à des phénomènes oxydatifs au niveau des glumelles, créant ainsi une compétition pour l'oxygène (Corbineau *et al.*, 1982).

En effet, des réactions d'oxydation ont lieu pendant la germination, à partir du moment où des oxydoréductases sont activées par la prise d'eau.

Les polyphénol-oxydases (PPO) oxydent divers composés phénoliques en leurs quinones correspondantes, qui subissent facilement des réactions secondaires avec des acides aminés, protéines, ou d'autres composés phénoliques, pour former des mélanines (Friedman, 1996).

Le rôle des PPO chez les plantes n'est pas encore clairement connu, mais il a été proposé qu'elles pouvaient être impliquées dans des nécroses sur des feuilles endommagées par exemple, et dans des mécanismes de défense contre des insectes et des contaminants de plantes (champignons par exemple). Les composés phénoliques peuvent agir comme des inhibiteurs de la croissance de bactéries, ou comme des précurseurs à la formation de barrière physique polyphénolique pour

limiter la propagation d'agents pathogènes. Les quinones formées par des PPO modifient les protéines des plantes, limitant leur accessibilité pour les herbivores ou pour les organismes pathogènes ou parasites. Les polymères de composés phénoliques semblent avoir un effet toxique plus important que celui des composés phénoliques simples -monomères- (Aydemir, 2004).

Pour éviter les oxydations dues aux PPO, des molécules comme la L-cystéine ou le 4-hexylrésorcinol sont utilisés (Iyidogan et Bayindirli, 2004). Les mécanismes expliquant l'effet de la L-cystéine sur le brunissement sont bien connus (Friedman, 1996).

Dans une étude sur les inhibiteurs de la germination de l'orge, Massart *et al.* (1958) a conclu à un effet synergique des différents composés phénoliques.

Il est intéressant de remarquer que les enveloppes des grains d'orge sont utilisées comme adsorbants pour la décoloration des eaux usées des industries textiles (Robinson *et al.*, 2002). En fait, ces enveloppes agiraient comme des échangeurs d'anions (Orlando *et al.*, 2003).

Renard *et al.* (1996), travaillant sur la pomme, ont montré que l'élimination des polyphénols de la peau, et plus particulièrement les polymères précipités, a pour conséquence l'élimination du réseau hydrophobe qui agit comme une contrainte à la prise d'eau.

Le même mécanisme pourrait avoir lieu durant le trempage de l'orge, puisque celui-ci correspond à une absorption de l'eau par les colloïdes dans le grain.

Dans le même sens, Beta *et al.* (2000) ont montré que le trempage des grains de sorgho dans une solution alcaline permettait d'éliminer les tanins, ce qui améliore la prise d'eau par le grain. Les mêmes auteurs ont remarqué que les tanins se liaient à l' α -amylase dans le malt de sorgho, rendant ces enzymes indisponibles pour l'hydrolyse de l'amidon.

Lili Kandra *et al.* (2004) ont fait une observation dans le même sens : les tanins se fixent aux α -amylases. La liaison peut avoir lieu sur le site actif de l'enzyme ou sur le site secondaire de l'enzyme libre. Ces liaisons engendrent des complexes du type enzyme-inhibiteur, puisque les tanins agissent comme inhibiteurs compétitifs des α -amylases.

6- La composition des eaux de trempe

Etant donné que la trempe se déroule en plusieurs (2 à 3) étapes sous eau et sous air, nous obtenons dans un même procédé des eaux de trempe de différentes caractéristiques. Généralement, l'eau de trempage récupérée à la fin de la première étape sous eau possède la demande chimique en oxygène (DCO) la plus élevée.

La composition de ces eaux dépend du diagramme de trempe, de la température et de la variété d'orge utilisée. Mais globalement, elles sont constituées de substances libérées par l'orge et d'autres produites ou transformées par la microflore présente dans l'eau et sur le grain. Ainsi, on y retrouve par exemple des acides organiques, des polysaccharides, des composés phénoliques, des mycotoxines, etc.

Ces eaux de trempe constituent un rejet industriel particulièrement pollué et polluant, puisqu'elles sont riches en composés organiques favorables à la croissance des micro-organismes.

Ainsi, il est intéressant d'épurer – au moins partiellement – ces effluents avant de les rejeter vers les stations municipales de traitement ou encore dans la nature.

IV- Traitement des eaux usées

1- Problématique des ressources en eau

a- La demande

Les besoins en eau sont de diverses natures : on retrouve ainsi la production alimentaire, les besoins domestiques, les industries, la production d'énergie mais aussi le besoin de préserver l'intégrité des écosystèmes (Kirby, 2003). Les pressions sur les ressources et réserves d'eau sont croissantes et de plus en plus sensibles. Ainsi, en Amérique du Nord, la consommation d'eau a augmenté de 800% entre 1900 et 1995. Par ailleurs, la consommation mondiale a plus que triplé entre 1950 et 2000 (Shiklomanov, 1998).

La France consomme environ 33 milliards de m³ d'eau par an pour l'ensemble de ses besoins. La figure 11 montre la répartition de la consommation d'eau entre les différents secteurs :

- 6 milliards de m³ pour alimenter la population en eau, dont 60% d'eaux souterraines et 40% d'eaux de surface ;
- 5 milliards de m³ pour l'agriculture ;
- 5 milliards de m³ pour l'industrie ;
- 17 milliards de m³ pour l'énergie électrique (Godart, 1999).

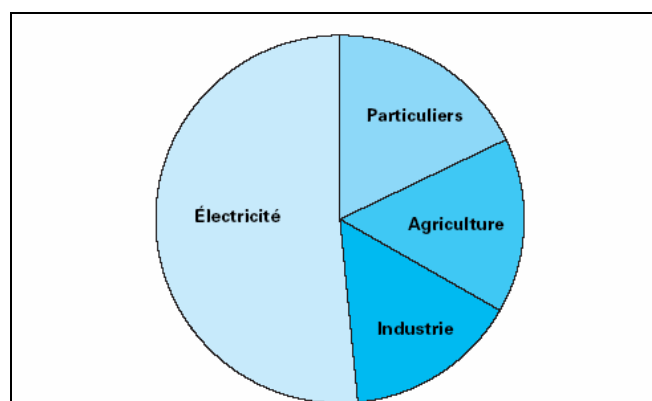


Figure 11 : Répartition de la consommation totale d'eau potable en France (Godart, 1999)

Mais ces utilisations donnent lieu à une consommation réelle très faible (Godart, 1999) ; il s'agit en fait d'un transit et l'utilisateur rejette, sous différentes formes, l'eau consommée après en avoir détérioré la qualité (exemple : les eaux de lavage).

b- Les sources de contamination de l'eau

Comme le précise Boeglin (2001), « utiliser l'eau, c'est pratiquement accepter de la polluer ».

Si l'utilisation de l'eau pour la production d'énergie n'en affecte que la qualité thermique, les autres utilisations ont des effets bien plus prononcés sur la qualité de l'eau.

De plus, si les effluents ménagers sont bien gérés et traités dans les stations municipales d'épuration, les rejets agricoles et industriels posent plus de problèmes. En fait, l'agriculture et l'industrie peuvent rejeter dans la nature des eaux dont la qualité a été détériorée après l'usage, sans forcément lui appliquer un traitement préalable d'épuration (Kirby, 2003).

Ces usages provoquent un double danger pour les ressources en eau : d'une part, les rejets détériorent la qualité des milieux récepteurs (Kirby, 2003), et d'autre part, le danger pour les ressources provient de l'épuisement de celles-ci (augmentation de la consommation + diminution de la pluviométrie dans plusieurs régions du monde).

Ainsi, à l'horizon 2025, 35% de la population mondiale vivra dans des zones manquant d'eau (Gardner-Outlaw et Engelman, 1997 ; Hinrichsen et al, 1998).

Les industries agro-alimentaires, responsables de 20% des rejets en eaux résiduaires de l'industrie française, produisent des rejets généralement très concentrés, notamment en matières organiques fortement biodégradables (ratio $\frac{DCO}{DBO} = 1 \text{ à } 3$). Le taux de matières en suspension est plus ou moins important, mais leur présence est fréquente (Mathieu-André, 2000).

Le tableau suivant détaille les différents types de pollution et leur impact sur le milieu naturel. On y distingue différents types de pollutions : la pollution soluble, la pollution insoluble, la pollution thermique et la pollution microbiologique. Les impacts de ces différents types de pollution peuvent aller de la simple nuisance esthétique jusqu'à la toxicité aiguë ou la modification de l'écosystème.

La nature des contaminants solubles est variable. Ainsi, les activités agricoles peuvent amener dans l'eau des contaminants tels que des agents agrochimiques, des nutriments, ou encore des micro-organismes pathogènes ou leurs toxines (EEA/WHO, 1997). Dans l'industrie, les contaminants peuvent aussi être de nature chimique (par exemple des métaux lourds, des détergents), biochimique (molécules organiques par exemple dans le cas des industries alimentaires) ou des micro-organismes (Kirby, 2003).

Tableau 3 : Nature des rejets et leur impact (Boeglin, 2001)

Tableau 1 – Nature des rejets et leur impact	
Types de pollution	Impact sur le milieu naturel
Pollution insoluble	
Phase polluante solide (minérale et/ou organique) : – débris grossiers – matières en suspension – matières non colloïdales – matières colloïdales Phase polluante (organique) : – non dispersée – dispersée (émulsion)	Nuisances esthétiques Dépôt de sédiments Diminution de la photosynthèse Diminution des transferts d'oxygène
Pollution soluble	
Pollution de nature minérale : – acidité ou basicité – oxydants ou réducteurs (chromates, cyanures, sulfures...) – sels toxiques (métaux lourds : Cu, Pb, Zn, Cd, Hg...) – formes minérales de l'azote (ammonium, nitrites, nitrates) et du phosphore (phosphates) Pollution de nature organique : – biodégradable – non biodégradable – formes organiques de l'azote (urée) et du phosphore – substances toxiques (phytosanitaires, hydrocarbures polycycliques aromatiques, composés phénolés...)	Toxicité aiguë entraînant une mortalité rapide Toxicité différée par bioaccumulation (troubles du métabolisme des espèces) Eutrophisation : prolifération surabondante d'algues, toxicité Consommation de l'oxygène dissous (mortalité des poissons par asphyxie) Contamination des chaînes trophiques Eutrophisation (déséquilibre de l'écosystème, altération de la qualité de l'eau) Toxicité à long terme (troubles de la reproduction des espèces)
Pollution thermique	Diminution de l'oxygène dissous, modifications de l'écosystème
Pollution microbiologique	Présence de germes pathogènes et de virus, dangereux pour l'homme et les animaux (épidémies)

c- Le traitement et le recyclage de l'eau dans les procédés industriels

La prise de conscience quant à la détérioration des ressources en eau a permis l'apparition d'une protection juridique des milieux récepteurs (Cauchi, 1999). Ainsi, à partir de 1898 en France il a été reconnu que l'eau pouvait manquer. Depuis, la législation n'a cessé de progresser pour protéger les ressources en eau ainsi que les milieux récepteurs. Depuis les années 1950, avec une prise de conscience de la dégradation de la qualité de l'eau à cause des rejets, les textes de loi se succèdent pour réglementer les déversements, rejets, dépôts...etc, en milieu naturel (loi de 1964), et avec la loi de 1992 le droit de l'eau évolue de la notion d'**usage** à celle de **bien commun**.

Les motivations pour le recyclage des eaux usées sont donc multiples. Les plus fréquemment citées concernent les pressions sur les ressources en eau. Il s'agit en effet de préserver ces ressources de l'épuisement et de la dégradation de leur qualité. Cependant, une motivation plus pragmatique est celle des pressions législatives et financières, surtout lorsque le recyclage des eaux usées est impossible sans traitement (= investissement supplémentaire) préalable.

De plus, bien qu'elles consacrent 10% de leurs investissements à la protection de l'environnement, les industries agro-alimentaires n'attribuent que 17% de ces sommes à des mesures préventives ou de recherche. Afin d'obtenir plus de progrès dans ce sens, par des pressions ou des incitations financières, les pouvoirs publics promeuvent la conciliation du développement économique et de la préservation de l'environnement (Mathieu-André, 2000). Ainsi, l'augmentation du prix de l'eau incite les industriels à minimiser leur consommation et la mise en place de redevances « Pollution », « Prélèvement » et « Assainissement » les encourage à limiter leurs rejets ou du moins à en améliorer la qualité. La loi sur l'eau de 1992 définit en plus un certain nombre de conditions. Notamment, aucun établissement ne peut envoyer ses eaux usées au milieu naturel sans traitement ou, du moins, sans y être autorisé. Cette restriction permet au pouvoir public par exemple, d'interdire les rejets de certaines industries, notamment en cas de sécheresse, où certains cours d'eaux naturels sont déjà très concentrés.

De plus, en Europe, la directive 91/61/EC sur l'IPPC (Integrated Pollution Prevention and Control) fait obligation aux usines polluantes, dont les malteries, de réduire drastiquement à l'échéance 2007 les émissions polluantes. La directive 98/83/CE (Annexe 8) définit quant à elle les critères de potabilité de l'eau et fixe les limites de chaque paramètre. Sauf dérogation, les industries agro-alimentaires doivent utiliser dans leurs procédés une eau qui réponde à ces critères de potabilité.

Logiquement, ce n'est qu'une fois toutes les actions de réduction des pollutions et des consommations à la source auront été menées (actions préventives, optimisation des procédés...etc) que l'on pourra envisager les prétraitements et traitements proprement dits, évitant ainsi les mauvais dimensionnements des dispositifs (Mathieu-André, 2000).

2- Traitement des eaux usées

a- Principe d'épuration de l'eau

Différents procédés de traitement sont possibles, selon l'origine, la nature de la pollution (organique ou minérale) et sa forme (soluble, colloïdale ou en suspension). La figure 12 détaille les différents traitements possibles en fonction des caractéristiques des matières polluantes et du degré d'épuration visé (Boeglin, 1997):

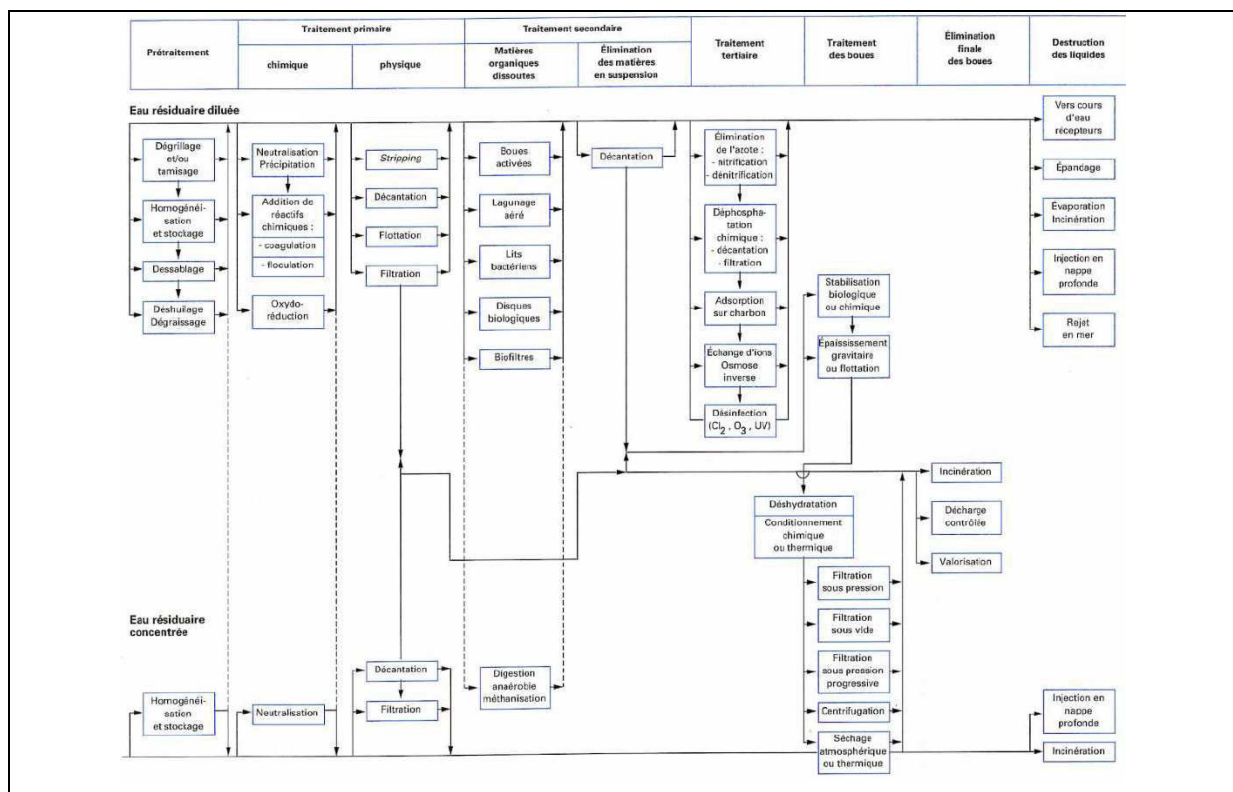


Figure 12 : Chaînes de traitement avec les variantes possibles (Boeglin, 1997).

On distingue des étapes de prétraitement, des traitements primaires, secondaires et tertiaires, et des étapes de traitement et d'élimination des boues générées par les opérations d'épuration de l'eau.

Les prétraitements visent à préparer les effluents au traitement proprement dit. Les traitements primaires, secondaires et tertiaires permettent d'atteindre différents niveaux d'épuration.

b- Principales opérations unitaires

Les chaînes de traitement utilisent des opérations unitaires qui peuvent être réparties en :

- Opérations unitaires physiques : comme la décantation, flottation, filtration...etc.
- Opérations unitaires chimiques : comme la coagulation floculation, neutralisation, oxydoréduction...etc.
- Opérations unitaires biologiques : il s'agit de l'élimination de la pollution soluble par des micro-organismes, en anaérobiose ou aérobie.

c- Les procédés de traitement

On peut considérer d'une manière générale, que l'épuration des eaux usées amènera toujours à mettre en œuvre des procédés :

- de séparation et d'élimination des matières en suspension ;
- d'élimination des matières en solution, dont une certaine proportion pourra être convertie en matières en suspension et éliminée avec ces dernières, et une autre proportion pourra être dégradée.

Ces chaînes de traitement sont résumées figure 12 (Boeglin, 1997).

Généralement, on trouve dans un même procédé une utilisation combinée d'opérations physiques, chimiques et biologiques, ce qui permet une épuration plus complète des eaux.

Procédés conventionnels

Les procédés conventionnels de traitement des eaux usées sont centrés sur une opération de traitement biologique, autour de laquelle on retrouve des opérations préliminaires de prétraitement et des opérations de traitement complémentaires.

Par exemple, la figure 13 montre l'utilisation d'un traitement biologique, suivi d'une opération physique de décantation des boues afin d'avoir un effluent clair et peu chargé.

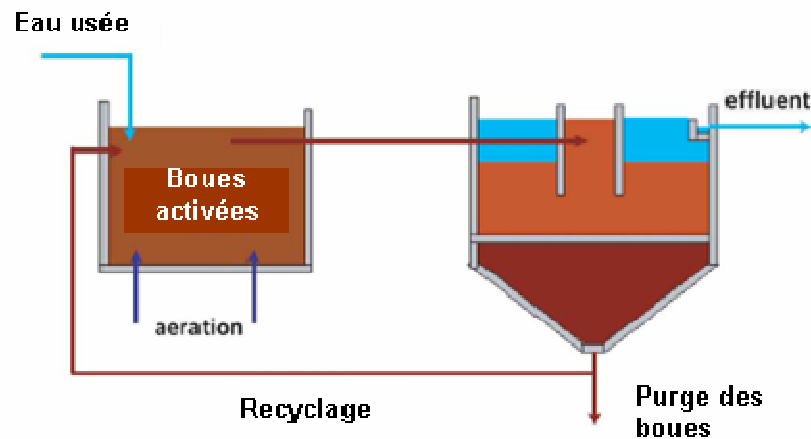


Figure 13 : Traitement conventionnel à boue activée (Van't Oever, 2005).

Cependant, avant de pouvoir effectuer un traitement biologique, des étapes de prétraitements sont le plus souvent indispensables, par exemple pour éliminer les grosses particules insolubles, comme le montre la figure 14 : on constate effectivement l'utilisation d'un premier clarificateur.

On remarque aussi qu'une simple décantation après le traitement biologique n'est généralement pas suffisante, surtout lorsque l'objectif est d'obtenir une eau de bonne qualité (dans le but de la réintégrer dans un procédé par exemple). On peut donc avoir recours à des traitements chimiques (recarbonatation) et physiques (osmose inverse), comme le montre la figure 14. Ces traitements qui permettent d'ajuster la qualité de l'eau au niveau désiré. Ainsi, des produits coagulants et floculants, tels que la chaux ou le chlorure de fer sont utilisés pour faire précipiter les molécules solubles dans les eaux à traiter.

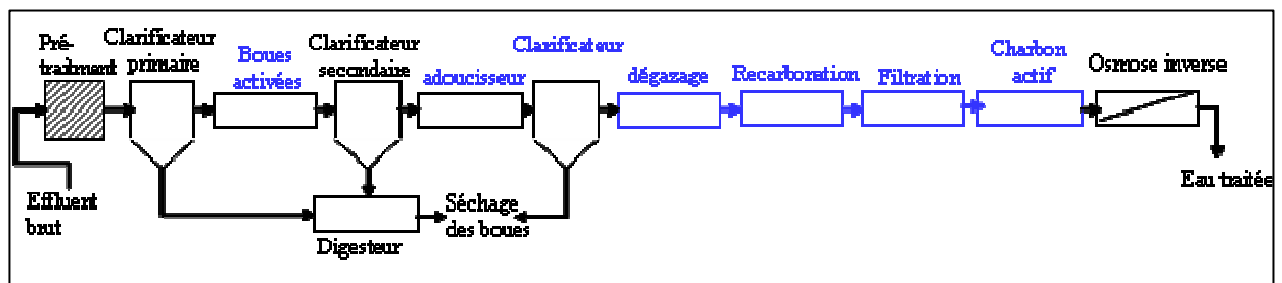


Figure 14: Procédé conventionnel de traitement des eaux usées (Côté et al., 1997)

Mais la multiplicité des opérations après le traitement biologique rend le procédé lourd, surtout pour de petites unités de traitement. De plus, ces procédés génèrent

des quantités importantes de boues chimiques, dont le traitement aura un coût assez élevé. Il est alors intéressant d'utiliser des techniques ne générant pas beaucoup de boues chimiques, et permettant de simplifier le procédé.

Procédés membranaires

Ainsi, les étapes d'adoucissement, re-carbonatation, filtration et traitement au charbon actif peuvent être remplacées par une simple étape de micro ou d'ultra filtration, comme le montre la figure 15.

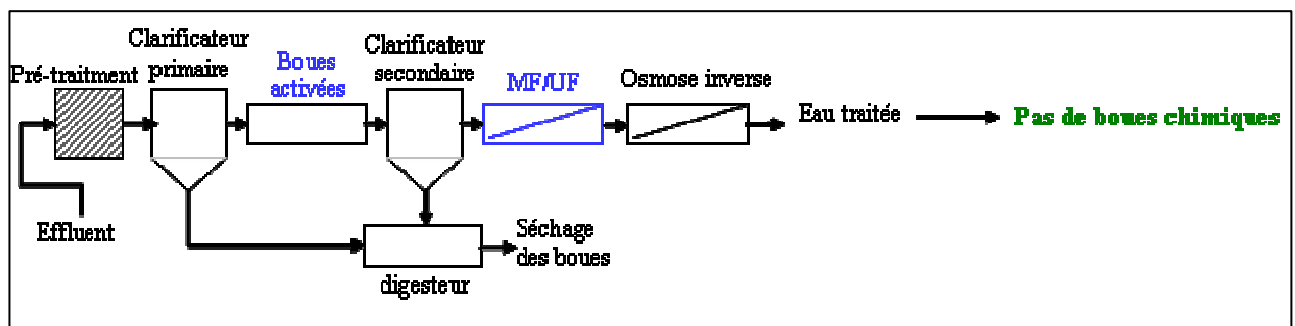


Figure 15: Traitement par boues activées avec MF/UF comme traitement préalable à l'osmose inverse (Côté *et al*, 1997)

Les technologies membranaires permettent donc un gain considérable, en termes de boues chimiques et/ou biologiques générées, ainsi qu'en termes de compacité du procédé et des installations.

Selon l'objectif souhaité, en termes de niveau d'épuration des eaux usées, différents types de membranes peuvent être utilisés. La figure 16 détaille la répartition et la dénomination des différentes techniques membranaires, en fonction du seuil de coupure des membranes, ainsi qu'en fonction de la nature des composés susceptibles d'être éliminés par ces techniques.

Les techniques membranaires offrent donc, vu la large gamme de seuils de coupures utilisés, une alternative à bon nombre d'autres techniques physiques ou chimiques.

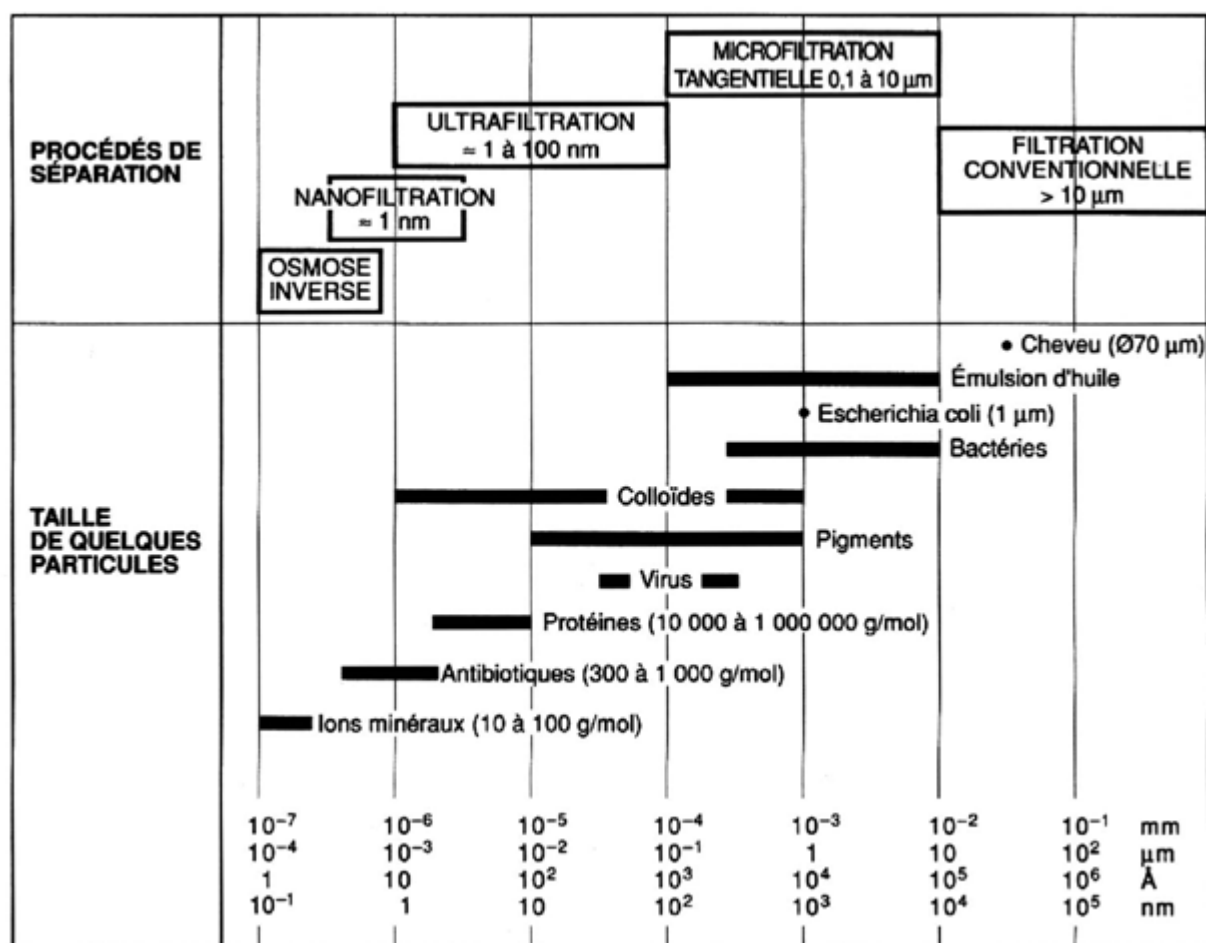


Figure 16 : Situation des techniques de séparation par membranes en fonction de la taille des particules retenues (Maurel, 1993)

Le tableau 4 résume les avantages de chaque procédé membranaire pour le traitement des eaux :

Tableau 4 : Avantages des différentes techniques membranaires (Judd et Jefferson, 2003)

Procédé	Principaux objectifs
Microfiltration (MF)	Élimination des matières en suspension, y compris les microorganismes
Ultrafiltration (UF)	Élimination de molécules solubles de haut poids moléculaire et de particules colloïdales.
Nanofiltration (NF)	Élimination (sélective) d'ions multivalents et de certaines molécules chargées ou polaires
Osmose inverse (RO)	Élimination d'ions inorganiques
Electrodialyse (ED) et dialyse	Extraction (sélective) d'ions à partir de l'eau, ou leur concentration
Pervaporation (PV)	Extraction (sélective) de molécules à l'état gazeux ou de volatiles solubles.
Transfert de gaz (GT)	Transfert de molécules de l'état gazeux dans l'eau ou leur élimination de l'eau

En résumé, les procédés membranaires offrent trois avantages principaux, en comparaison avec les traitements conventionnels:

D'abord, la séparation ne nécessite pas de changement de phase, comme c'est le cas pour la distillation.

Ensuite, peu ou pas d'accumulation a lieu, ce qui permet d'opérer le procédé en continu sous son état stationnaire, sans besoin de cycles de régénération comme c'est le cas dans les techniques d'adsorption.

Enfin, peu ou pas de produits chimiques sont utilisés, contrairement aux opérations conventionnelles de clarification qui nécessitent l'utilisation de coagulants ou de floculants. Ceci évite la formation de boues chimiques.

Ainsi, l'utilisation de technologies membranaires peut aboutir à des procédés d'une grande compacité, comme le montre le schéma suivant (Figure 17) d'un traitement par bioréacteur à membranes, avec seulement un prétraitement et une étape complémentaire d'osmose inverse, généralement nécessaire pour atteindre les critères de potabilité de l'eau.

L'étape de prétraitement peut se limiter à une opération de dégrillage ou de tamisage. L'étape de traitement et d'élimination des boues reste quand même incontournable, car même si ce procédé évite la formation des boues chimiques, il produit néanmoins des boues biologiques.

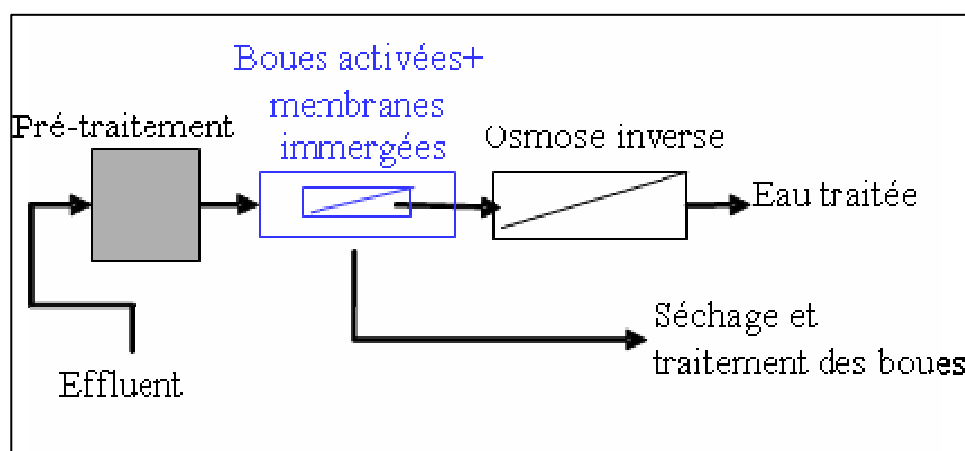


Figure 17: Procédé à membrane et à boues activées (Côté *et al*, 1997)

Dans ces traitements en bioréacteur à membrane, il existe deux types de réacteurs : les bioréacteurs à membranes à boucle externe et les bioréacteurs à membranes immergées.

La figure 18 décrit les bioréacteurs à membranes externes et à membranes immergées.

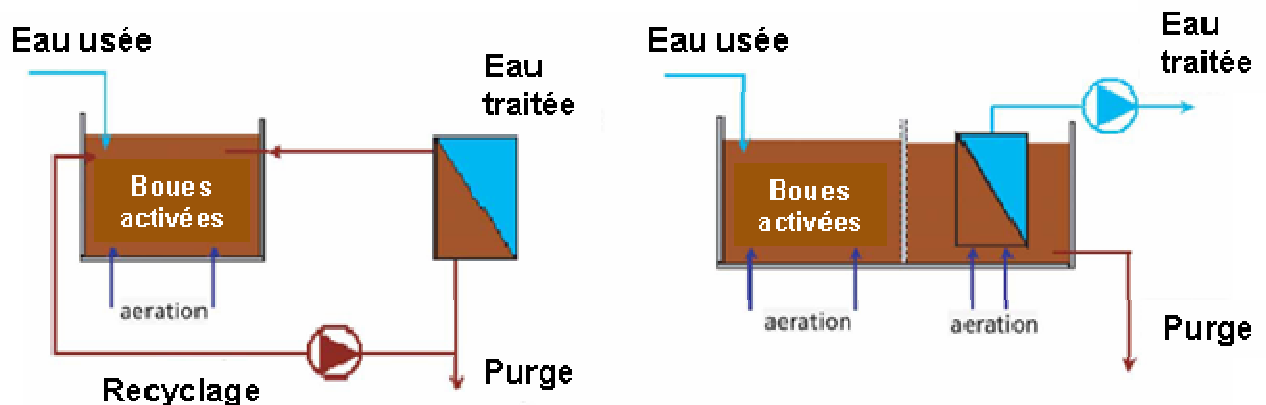
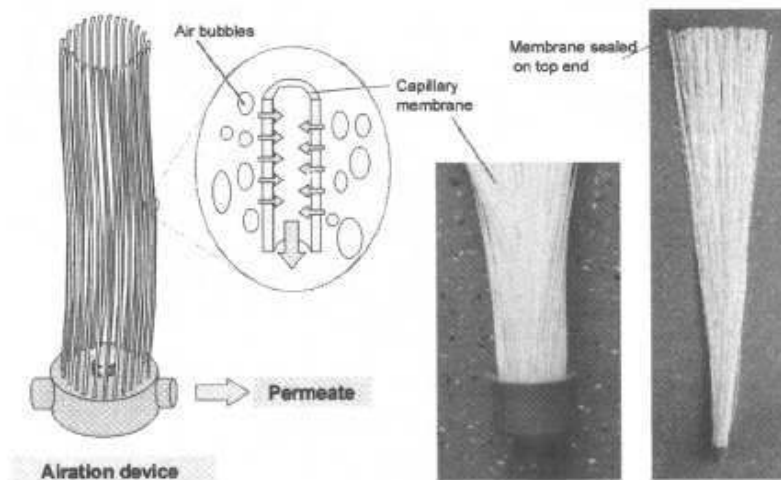


Figure 18: Systèmes de Bio-réacteurs à membranes externes et immergées (Van't Oever, 2005).

Chronologiquement, les premières générations de bioréacteurs à membranes mettent en œuvre des membranes tubulaires organiques ou inorganiques placées dans des boucles externes de recirculation. La biomasse circule à grande vitesse dans ces boucles de façon à limiter le colmatage des membranes et à réduire la fréquence des lavages chimiques. Mais cette recirculation induit une consommation énergétique élevée (de 10 à 50 kW/m³). Cette contrainte est une des raisons du développement de la nouvelle configuration de réacteur, à savoir les bioréacteurs à membranes immergées. Ces derniers sont donc apparus avec l'objectif de simplifier la mise en œuvre des systèmes et de réduire les coûts de fonctionnement. Dans cette nouvelle configuration, les membranes sont directement immergées dans les bioréacteurs et le perméat est soutiré par aspiration. Le travail est donc effectué en dépression et on ne dépasse en général pas 0.5 bar, au lieu de 1 bar voire plus dans le cas des boucles externes. En conséquence, la dépense énergétique associée au bioréacteur à membranes immergées ne dépasse pas 0,2 – 0,4 kW/m³ (Gander et al, 2000). En contre partie, l'investissement initial et la maintenance relatifs au coût des membranes sont plus importants que dans le cas des procédés à boucle externe.

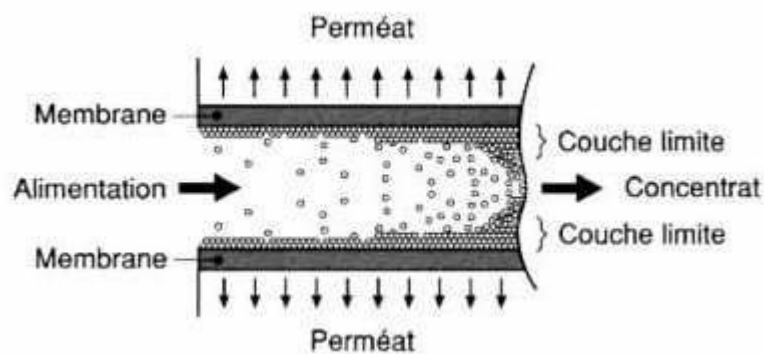
Le principe de filtration avec les membranes externes et immergées est montré sur la figure 19.

Membranes immergées



(Geissler et al, 2005)

Membranes externes



(Maurel, 1993)

Figure 19: Principe de filtration par membranes immergées et membranes en boucle externe

Par ailleurs, il faut noter que la consommation en énergie dépend aussi de la configuration et de la géométrie des membranes. En fait, les différents types de modules membranaires qui peuvent être utilisés sont classiquement rassemblés en 5 grands groupes :

- les membranes planes, généralement organiques ;
- les membranes sous forme de spirales ;
- les membranes tubulaires ;
- les capillaires ;
- les fibres creuses.

Les coûts, les capacités de turbulences et les possibilités de nettoyage en « backflush » de chacune de ces configurations sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Table 5: Configurations des membranes (Judd et Jefferson, 2003)

Configuration	ratio (m ² /m ³) surf/vol.	Coût	Turbulence	« Backflush »?	Application
plane	500-1500	Très bas	Très faible	Non	DE-MF, faibles MES
« Plate-and-frame »	100-300	Elevé	Correcte	Non	ED , UF, RO
Spirales	800-1200	Bas	Faible	Non	RO , NF, UF
Tubulaires	150-300	Très élevé	Excellente	Non	CFMF, MES élevées
Capillaires	1500-5000	Bas	Bonne	Oui	UF
Fibres creuses	10000-20000	Très bas	Très faible	Oui	MF , RO

Les membranes en fibres creuses sont aujourd'hui les plus répandues dans les procédés en boucle externe, car elles autorisent une facilité de modulation dans leur configuration et permettent ainsi d'optimiser les performances des procédés. Quant aux membranes immergées, elles se présentent généralement sous la forme capillaire. Dans le cas des bioréacteurs à membranes utilisés pour le traitement des eaux usées, on utilise généralement des membranes de microfiltration ou d'ultrafiltration (souvent entre 0,01 et 0,2 µm). Ces seuils de coupure permettent essentiellement de retenir les micro-organismes, mais aussi bon nombre de structures colloïdales de haut poids moléculaire.

Il y a aussi une diversité des matériaux utilisés pour ces membranes. Elles peuvent en effet être organiques ou minérales. Cependant, les membranes minérales sont de plus en plus utilisées, car elles présentent des avantages incontestables, en ce qui concerne leur résistance physique, chimique ou encore thermique. Ainsi, les matériaux les plus utilisés aujourd'hui dans la fabrication des membranes sont les polysulfones et les polyéthylènes.

Performances d'épuration des eaux usées

Selon Urbain *et al.* (1997), dans un système de bioréacteur à membrane, l'étape de filtration contribue à l'élimination de 30% de la matière organique environ, ce qui

correspond à la fraction insoluble, et plus particulièrement aux micro-organismes. Quant à la fraction soluble (sucres, acides organiques, acides gras, protéines et peptides, polyphénols), elle est éliminée grâce à l'activité microbiologique. Généralement, et sous les conditions optimales, la biomasse est maintenue dans un environnement aussi limité que possible en nutriments, ce qui permet de réduire le rendement en biomasse tout en assurant un effluent traité débarrassé du maximum de matières organiques solubles. En BRM, ceci est rendu possible grâce à l'indépendance entre le temps de rétention hydraulique et celui de résidence de la biomasse.

Grâce à la variété de bactéries hétérotrophes dans la biomasse, l'élimination des matières organiques en BRM ne semble pas être fortement influencée par les variations de température entre 5 et 20°C. On ne constate qu'une diminution de l'activité à basse température (Chiemchaisri et al, 1994).

- Les matières azotées :

L'élimination des matières azotées en BRM peut atteindre 90%, que ce soit par accumulation dans les boues soit par dénitrification (Chiemchaisri et al, 1993).

- Le phosphore :

Le phosphore résiduel dans les eaux usées est à l'origine de problèmes d'eutrophisation qui affectent négativement les milieux récepteurs, et provoquent notamment un développement excessif d'algues (de-Bashan *et al.*, 2004). L'élimination du phosphore est donc une obligation dans le traitement des eaux usées. Elle peut être effectuée par précipitation à l'aide de sels métalliques (sels de fer, d'aluminium, de calcium ou de magnésium), mais ces techniques sont à la fois coûteuses et génératrices d'un nouveau problème, celui de l'élimination des sels résiduels. Ainsi, l'alternative la plus crédible est celle de l'élimination par adsorption sur les micro-organismes. L'avantage de cette technique est qu'il n'y a aucune exigence quant à la spécificité des micro-organismes (De la Noüe *et al.*, 1988). Dans les bioréacteurs à membranes, l'élimination du phosphore par accumulation dans la biomasse implique la détermination d'un taux de purge minimum du réacteur.

- Les pesticides et mycotoxines :

L'élimination des pesticides et mycotoxines présents dans les eaux usées présente une dernière difficulté, car leur accumulation peut être néfaste en cas de recyclage dans les procédés de fabrication, aussi bien pour la qualité du produit que pour la santé des consommateurs.

Les pesticides modernes présentent heureusement des propriétés de persistance et de résistance à la dégradation largement inférieures à celles des anciens pesticides, organochlorés (Marca Schrap *et al.*, 2000). Ainsi, il est possible d'obtenir en bioréacteur à membrane une (bio) dégradation plus ou moins avancée de ces produits, en fonction des conditions opératoires (pH, température, nutriments). Il faut néanmoins noter qu'il est possible que les produits intermédiaires de dégradation des pesticides présentent à leur tour une toxicité plus ou moins élevée (Belfroid *et al.*, 1998 ; Somasundaram *et al.*, 1991).

Les mycotoxines sont des contaminants quasi-inévitables pour les graines (Stoloff, 1976). Elles sont d'origine fongique (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*), et leur ingestion peut provoquer des maladies graves, voire même la mort (CAST, 1989). Leur étude et contrôles étaient longtemps centrés sur les aflatoxines, seules mycotoxines faisant l'objet de réglementation aux USA. Mais récemment, les recherches ont commencé à s'étendre aux autres groupes de mycotoxines. Différentes méthodes de dégradation ont été étudiées, et la première à avoir été proposée comme méthode efficace est la dégradation à l'ozone. Ainsi, une dégradation et une détoxification efficaces et totales des aflatoxines, de l'acide cyclopiazonique, de l'ochratoxine A, de la patuline, de l'acide sécalonique et de la zéaralénone ont été rapportées (Mac Kenzie *et al.*, 1997). Plus récemment, l'utilisation d'ozone aqueux s'est aussi révélée efficace pour la dégradation de dix mycotoxines du groupe des trichothécènes, surtout pour des pH compris entre 4 et 6 (Young *et al.*, 2006).

Plusieurs produits chimiques peuvent aussi être utilisés pour la détoxification des mycotoxines, comme les ammoniums, l'hydroxyde de sodium ou l'hydroxyde de calcium (Bata *et al.*, 1999).

Par ailleurs, certains champignons ont été cités pour être efficaces dans la biodégradation de certaines mycotoxines. Ainsi, plusieurs espèces d'*Aspergillus* sont capables de dégrader efficacement l'ochratoxine A, aussi bien en milieu solide qu'en

milieu liquide (Varga *et al.*, 2000). De même, plusieurs espèces de *Rhizopus* sont capables de dégrader efficacement l'ochrotoxine A, la zéaralénone et la patuline (Varga *et al.*, 2005).

Cependant, dans les installations de traitement des eaux usées, quelle que soit la configuration utilisée pour l'étape de dégradation biologique, ce sont le plus souvent des bactéries qui sont utilisées. Pour la dégradation de mycotoxines, certaines espèces d'*Agrobacterium* et *Acinobactus* sont capables de détoxifier efficacement l'ochratoxine A et le déoxynivalenol (Bata, 1999). Certains *Flavobacterium* peuvent adsorber les aflatoxines. Sudakin *et al.* (2003) citent des bactéries telles que des *Pseudomonas*, des *Arthrobacter*, des *Blastobacter* et des *Agrobacterium* comme ayant la capacité de détoxifier la toxine T2. Beeton *et al.* (1989) avaient de plus identifié plusieurs souches de *Pseudomonas* capables de détoxifier la toxine T2 et même de l'utiliser comme source de carbone. Ces souches transforment la toxine T2 en HT2, puis la HT2 en T2-triol, puis le T2-triol en T2-tétraol. Beeton *et al.* ont aussi montré par des tests de toxicité sur des souris que le T2-triol et le T2-tétraol sont 20 fois moins toxiques que la T2 et la HT2. Ils ont enfin conclu de leurs travaux que des communautés bactériennes étaient toujours plus efficaces qu'une souche pure pour la détoxification de mycotoxines.

Traitement des eaux usées des malteries

Peu d'information est disponible sur le traitement des eaux usées en malterie. Certaines malteries possèdent leurs stations d'épurations, mais celles-ci fonctionnent généralement selon le mode classique (boues activées, lagunage).

Judd et Jefferson (2003) ont rapporté que des essais dans certaines malteries ont permis de conclure que des traitements par nanofiltration et par osmose inverse donnent une eau valable à la réutilisation en malterie. Mais ils ont aussi précisé que le coût du traitement des effluents n'est pas réduit.

Schildbach (2005) a réalisé des essais de recyclage des eaux de trempée traitées (par bioréacteur à membrane) et non traitées et en a conclu la nécessité d'assurer les caractéristiques suivantes pour l'eau de trempage, afin d'obtenir un malt de bonne qualité et de garantir l'aspect hygiénique du procédé :

- la conductivité de l'eau, déterminante pour la vitesse de prise d'eau par le grain, ne doit pas dépasser 2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$;
- l'eau doit être exempte de bactéries et de spores fongiques afin d'éviter une surcroissance microbienne dans l'eau au cours de la trempe ;
- l'eau doit aussi être exempte de DCO facilement biodégradable, qui accélérerait la croissance microbienne.

A la lumière de ces données bibliographiques, le présent travail sera centré sur les objectifs suivants :

- 1- Une caractérisation plus fine des eaux de trempe des malteries ;
- 2- Une étude approfondie des inhibiteurs de la germination de l'orge, présents dans les eaux de trempe ;
- 3- Le développement d'un procédé de traitement des eaux de trempe, à la fois efficace pour l'élimination de ces inhibiteurs et performant pour l'amélioration des qualités physico-chimique et microbiologique de l'eau.

MATERIEL

ET

METHODES

Deuxième partie : Matériel et Méthodes

I- Procédé de maltage et de brassage

1- Caractéristiques des lots d'orge utilisés

Tout au long de ce travail, la variété d'orge *Scarlett*, de différentes récoltes successives a été utilisée comme variété de référence.

- Pour les essais pilotes de maltage, brassage, traitement et recyclage des eaux de trempes, le lot d'orge utilisé a les caractéristiques suivantes :

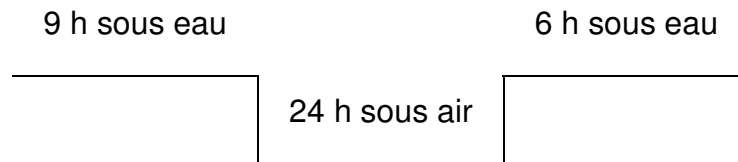
- Variété: Scarlett;
- Récolte: 2004;
- % humidité = 12,6%;
- % Protéines = 10,2% (m.s);
- Germination > 95% en 72 heures;
- Pesticides et mycotoxines:
 - Multitrichothécènes: ND;
 - Ochratoxine: ND;
 - Cytochalasine: ND ;
 - Chlorméquat: 0.065 mg/kg.

Dans le cadre de ces mêmes essais pilotes, un autre lot d'orge *Scarlett*, naturellement contaminé en toxines T2/HT2 (800 ppb), a été utilisé dans le but d'étudier le passage des mycotoxines dans l'eau de trempes et leur élimination par BRM.

D'autres essais ont nécessité l'utilisation d'orge de la variété *Caminant*, à faible teneur en polyphénols, ainsi que d'autres variétés d'orges nues (sans enveloppes externes) non classées.

2- L'étape de Trempe

Différents diagrammes de trempes ont été testés et le diagramme qui a finalement été adopté pour les essais pilotes avec recyclage de l'eau traitée est le suivant :



La trempé est effectuée à 18 °C, avec 600 Kg d'orge et 1m³ d'eau. Les trempes sont effectuées avec aération et extraction du CO₂.

Les trempes à l'échelle de laboratoire ont été effectués sans aération et sans extraction du CO₂.

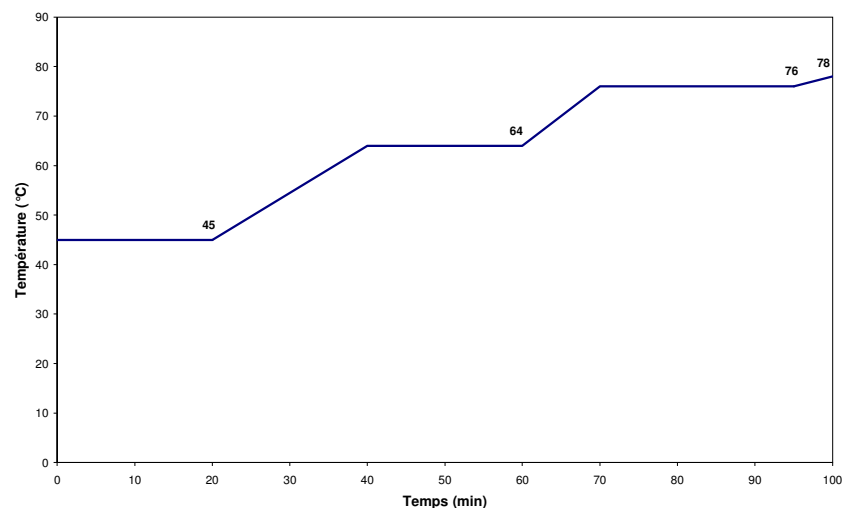
3- La germination et le touraillage

En fin de trempé, l'orge est mise en germination à 16 °C pendant 5 jours, en atmosphère humide. Pour les essais pilotes de recyclage de l'eau de trempé traitée, des arrosages sont prévus en cours de germination en cas de chute de l'humidité.

Ensuite, le malt vert est placé en touraille pendant 24 heures pour en ramener l'humidité à 4 – 5%, et développer sa couleur et ses arômes.

4- Procédé de brassage

Le malt est brassé après 10 jours de stockage. Le diagramme de brassage est le suivant :



Le procédé de brassage pilote est effectué avec 300 Kg de malt. Le volume final du moût est de 17 hl.

On définit les rendements de brassage et d'extraction comme suit :

- le rendement de brassage représente la quantité d'extrait (en %) obtenu à partir de 100 kg de malt durant le brassage.
- le rendement d'extraction est le pourcentage que représente le rendement de brassage par rapport à l'extrait de malt.

II- Analyses sur Orge, Malt et Moult

1- Analyses sur Orge

a- Humidité de l'orge et du malt

Pour l'orge trempée et le malt vert, l'humidité est mesurée en utilisant une balance à infrarouge. 5 à 6 g d'échantillon sont préalablement essuyés et broyés en fine mouture. La dessiccation se fait à l'aide d'une balance à infrarouge (Sartorius) à une température de 120 °C (Analytica EBC, 1998).

b- Indice de trempe (test de Chapon)

Cet indice (Chapon, 1960), renseigne sur la distribution de l'eau dans l'endosperme en fin de trempe ; il dépend en grande partie de la variété d'orge utilisée et du diagramme de trempe appliqué. Le test consiste à mettre une centaine de grains d'orge (prélevés à différentes phases de trempe) dans de l'eau ayant bouilli pendant 1 minute. Les grains sont coupés en deux longitudinalement, une moitié est rejetée et l'autre est utilisée pour le test. L'examen des 100 demi grains permet de classer les grains selon leur degré de translucidité en quatre catégories :

- α Première catégorie (A): complètement translucide ;
- α Deuxième catégorie (B): $\frac{3}{4}$ translucide
- α Troisième catégorie (C): $\frac{1}{2}$ translucide
- α Quatrième catégorie (D): $\frac{1}{4}$ translucide

L'indice de trempe est calculé par l'équation suivante :

$$I.T = 1 \times A + 2 \times B + 3 \times C + 4 \times D$$

Selon le degré de distribution de l'eau, cet indice varie entre 100 et 400. Pour atteindre une bonne distribution de l'eau dans l'endosperme, l'indice de trempe doit avoir une valeur proche de 100.

2- Analyses des Malts

2.1- Analyses sur Malt

a- Humidité du malt

Pour le malt, les mesures d'humidité sont également effectuées sur une fine mouture, mais avec séchage à l'étuve à 130-133°C pendant 2h.(Analytica EBC, 1998).

b- Longueur de plumules

La longueur de plumule est un indicateur de germination. La plumule se glisse entre la testa et la glumelle le long de la face dorsale du grain. Une plumule qui dépasse la pointe du grain est appelée « hussard » et le grain est considéré comme sur-désagrégué. La mesure de la longueur de plumule permet de distinguer 5 groupes :

$(0 - \frac{1}{4})$, $(\frac{1}{4} - \frac{1}{2})$, $(\frac{1}{2} - \frac{3}{4})$, $(\frac{3}{4} - 1)$, et (>1) .

c- Friabilité

Le taux de friabilité exprime la désagrégation physique du grain à la fin du maltage. Un échantillon de 50 g de malt est placé dans un tambour dont la paroi est une grille en acier inoxydable. Les grains sont pressés contre le tamis tournant, par un disque de caoutchouc pendant 8 minutes. Le contenu du tambour est ensuite pesé. La friabilité est le pourcentage de farine finement broyée (qui traverse le tamis) par rapport à la quantité initiale de malt utilisée pour le test (Analytica EBC, 1998).

d- Protéines totales

Le taux de protéines totales est déterminé sur un échantillon de farine d'orge ou de malt de granulométrie 0.2 mm selon la méthode de Kjeldahl. L'échantillon est minéralisé en présence d'acide sulfurique et d'un catalyseur (sélénite de mercure). L'ammoniac formé est transformé en son sel par une base forte (NaOH), entraîné par la vapeur dans une solution d'acide borique, puis titré par une solution diluée

d'acide fort (H_2SO_4 0.05M) en présence d'un indicateur coloré. La quantité de protéines correspondante est obtenue en multipliant la valeur par le coefficient 6,25 (Analytica EBC, 1998).

e- Désagrégation Calcofluor

La désagrégation calcofluor estime l'homogénéité et le taux de désagrégation biochimique du malt. Les parois cellulaires de l'endosperme des grains, riches en β -glucanes, sont progressivement dégradées au cours du maltage. Ce processus est mis en évidence en colorant les parois cellulaires qui restent intactes à l'aide d'un fluorochrome (Calcofluor) qui se fixe de manière spécifique sur les β -glucanes et devient alors fluorescent. Les grains sont coupés longitudinalement et les demi-grains sont placés sur une plaque qui est alors observée sous lumière ultraviolette. Une fluorescence bleue claire se produit dans les parties non désagrégées alors que les parties désagrégées apparaissent bleu foncé. Pour chaque grain, le taux de désagrégation est représenté en pourcentage par le rapport de la surface désagrégée de l'endosperme à sa surface totale. Ce calcul est effectué pour 100 grains. Les grains sont ensuite classés en 5 catégories :

- 0% à 5% (A);
- 5% à 25% (B);
- 25% à 50% (C);
- 50% à 75% (D);
- 75% à 95% (E);
- 95% à 100% (F).

La désagrégation calcofluor est calculée comme suit:

$$D.C = 0.125 \times B + 0.375 \times C + 0.625 \times D + 0.875 \times E + F$$

L'homogénéité calcofluor est calculée comme suit:

$$H = 100 - 2 \times \sqrt{(100 \times X - DC^2)}$$

$$\text{Où } X = 0.125^2 \times B + 0.375^2 \times C + 0.625^2 \times D + 0.875^2 \times E + F$$

f- Vitesse de filtration Tépral

Cette mesure permet de déceler les malts pouvant causer des problèmes de filtration au brassage. La validité de cette méthode tient compte du rapport : eau/mouture du diagramme de température et du lavage des drèches qui sont proches des réalités industrielles.

On réalise un brassage comportant 3 paliers de 15 minutes. Les températures de ces paliers sont de 50°C, 63°C et 75°C. Les montées en température entre deux paliers sont effectuées à raison de 1°C par minute. La filtration du moût obtenu se fait à chaud et sous pression.

2.2- Analyses sur moût EBC

50 g de malt broyé (granulométrie 0.2 µm) sont mélangés avec 200 ml d'eau distillée à 45°C puis placés dans un bain-marie agité. Un diagramme de brassage est alors appliqué. Il consiste en un plateau à 45°C maintenu pendant 30 minutes, suivi par une augmentation de la température à une vitesse de 1°C/min jusqu'à atteindre 70°C ; un second plateau est alors appliqué et maintenu pendant 60 minutes, suivi par une étape de refroidissement à 20°C. Le volume de moût est alors ajusté à 450 ml et filtré. Ce moût sert à effectuer les analyses suivantes :

a- Extrait fine mouture

(Analytica EBC, 1998)

L'extrait fine mouture exprime le rendement du brassage ou la quantité de matières solubilisées au cours de ce brassage conventionnel. La teneur en extrait est calculée à partir de la densité du moût à 20°C, à l'aide d'un pycnomètre. La teneur en extrait du moût en g pour 100 g de moût est lue dans des tables officielles Foldiner et Klemenn pour le saccharose. La teneur en extrait du malt sur matière sèche est alors donnée par la formule :

$$E = \frac{[100 \times P \times (H + 800)]}{[(100 - P) \times (100 - H)]}$$

Où: P = teneur en extrait du moût;

H = teneur en eau du malt;

800 = quantité d'eau distillée ajoutée au brassage pour 100 g de malt.

b- Protéines solubles

Cette mesure exprime les performances de la protéolyse du malt et se mesure par la méthode de Kjeldahl. Le résultat d'azote soluble est multiplié par 6.25 pour obtenir la teneur en protéines. Les valeurs moyennes sont comprises entre 3.5% et 4.5%.
(Analytica EBC, 1998)

c- Indice Kolbach

L'indice Kolbach ou indice de désagrégation chimique représente le rapport du taux de protéines solubles sur le taux de protéines totales.

d- Viscosité du moût

La mesure se fait à 20°C avec par exemple un viscosimètre à chute de bille (Analytica EBC, 1998).

e- Atténuation limite

En brasserie, on nomme atténuation la diminution de la densité de la bière au cours de la fermentation de son extrait. En fabrication, on ne considère que l'atténuation apparente car elle s'obtient directement par une simple mesure de la densité de la bière. Cette atténuation s'exprime par rapport à l'extrait de départ de la fermentation, donc en % de l'extrait primitif. L'évolution de l'atténuation pendant la fermentation et sa valeur finale permettent de contrôler l'état physiologique de la levure et son pouvoir fermentaire. Cette analyse a pour objectif de mesurer la fermentescibilité du moût. Ce dernier est bouilli et fermenté en laboratoire. A partir des densités initiale et finale on peut évaluer le pourcentage de sucres fermentescibles (Analytica EBC, 1998).

f- Pouvoir diastasique

Il renseigne sur l'hydrolyse de l'amidon par les α - et surtout les β -amylases sans spécificité d'action. Il a pour but de mettre en évidence l'activité combinée de l' α -amylase et de la β -amylase dans des conditions de réaction normalisées. Les enzymes du malt sont extraites dans de l'eau distillée à 40°C. Une solution d'amidon normalisée est alors hydrolysée par l'extrait obtenu. Les sucres réducteurs formés

sont mesurés par iodométrie. Le résultat est exprimé en grammes de maltose produit par 100g de malt ou en Windish Kolbach (W.K) (Analytica EBC, 1998).

g- Azote α -aminé

Cette mesure permet de déterminer la teneur en acides aminés libres qui influencent la multiplication de la levure et le goût de la bière finale. La mesure se fait par colorimétrie à la ninhydrine directement sur le moût d'analyse (Analytica EBC, 1998).

III- Traitement des eaux de trempes

1- Traitements à l'échelle de laboratoire

a- Traitement biologique en réacteur discontinu de 1L

Des eaux de trempes récupérées à l'IFBM ou à la fin de trempes à l'échelle de laboratoire sont placées en bioréacteur de 1L. On procède à une agitation, une aération du milieu et une régulation du pH. Le dispositif utilisé est représenté sur la *figure 1* :

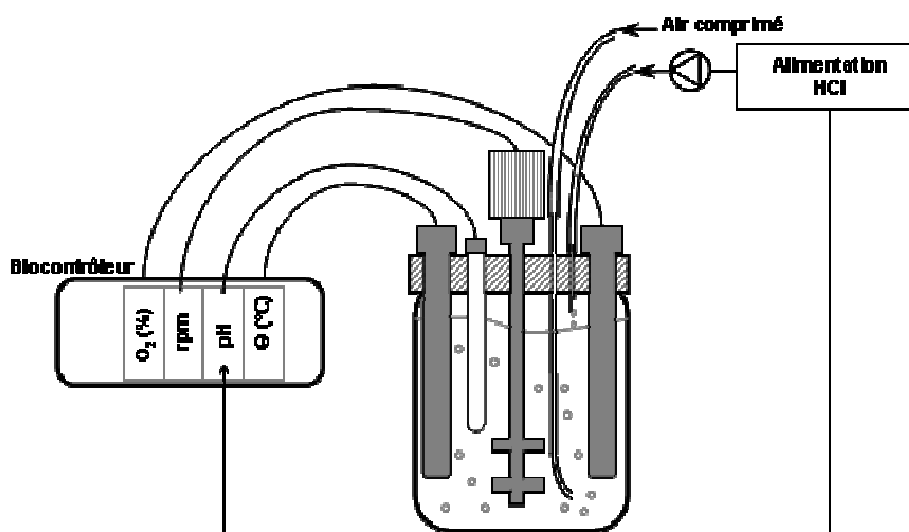


Figure 1 : Schéma d'un réacteur discontinu

La croissance des micro-organismes est suivie par la mesure de la densité optique de l'eau à 600 nm. Les DCO totale et soluble sont aussi mesurées au cours du temps afin d'évaluer l'épuration de l'eau par les micro-organismes.

b- Traitement biologique en réacteur continu de 1L

Le même dispositif de base qu'en réacteur discontinu est utilisé, avec une alimentation en eau de trempe. L'alimentation est maintenue à 4°C afin d'y limiter la croissance microbienne. Le dispositif utilisé est représenté sur la *figure 2*. Différents débits d'alimentation sont testés. On suit aussi la croissance microbienne à travers la D.O mesurée à 600 nm ainsi que les DCO totale et soluble. La relation entre biomasse et D.O est donnée dans la *figure 3*.

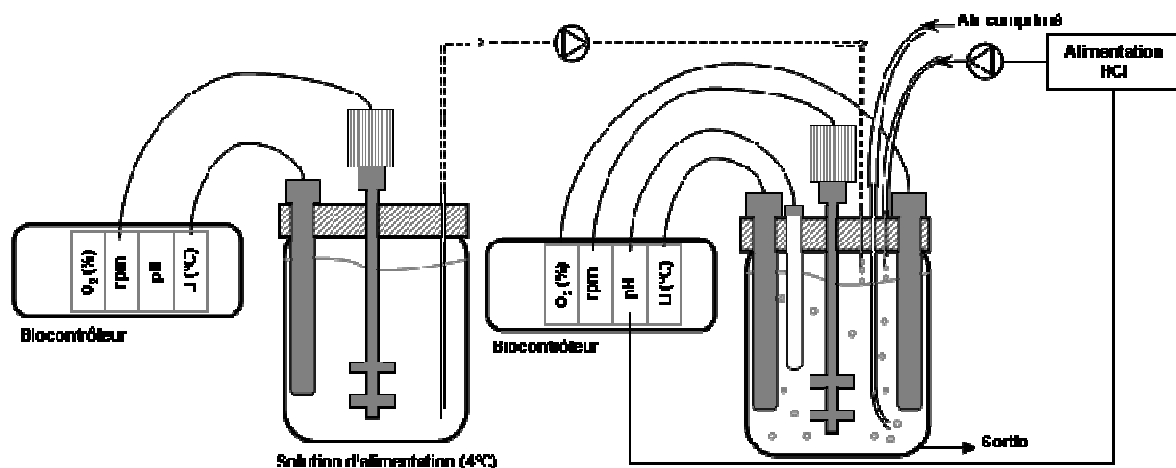


Figure 2 : Schéma du dispositif expérimental pour le traitement biologique en système continu

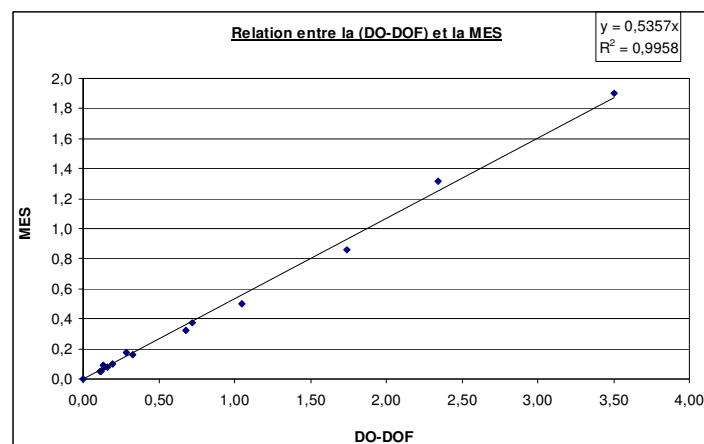


Figure 3 : Relation entre la D.O et la teneur en biomasse

La DO de l'échantillon filtré est soustraite de la D.O totale car le milieu est généralement coloré (couleur brune)

c- Traitement en Bio-réacteur à membranes

Le bio réacteur à membrane est un fermenteur de 7L de volume. Il est composé de :

- une cuve agitée avec régulation de pH ;
- un échangeur poly-tubulaire permettant soit de maintenir des températures élevées, soit de réguler finement la température de culture avec de l'eau ;
- la pompe à lobes réglable avec un variateur de vitesse permettant le contrôle de la pression transmembranaire et de la vitesse de circulation ;
- un manomètre indiquant la pression d'admission dans la colonne ;
- un manomètre indiquant la pression de sortie de colonne côté rétentat ou côté perméat ;
- deux cartouches de microfiltration en parallèle destinées à fonctionner alternativement en cas de colmatage des membranes (la pompe ne permet pas la circulation simultanée dans les 2 cartouches) ;
- un débitmètre électromagnétique mesurant le débit de circulation et par là même la vitesse linéaire dans les modules,

et couplé à un système de filtration sur membrane, comme le montre la figure 4.

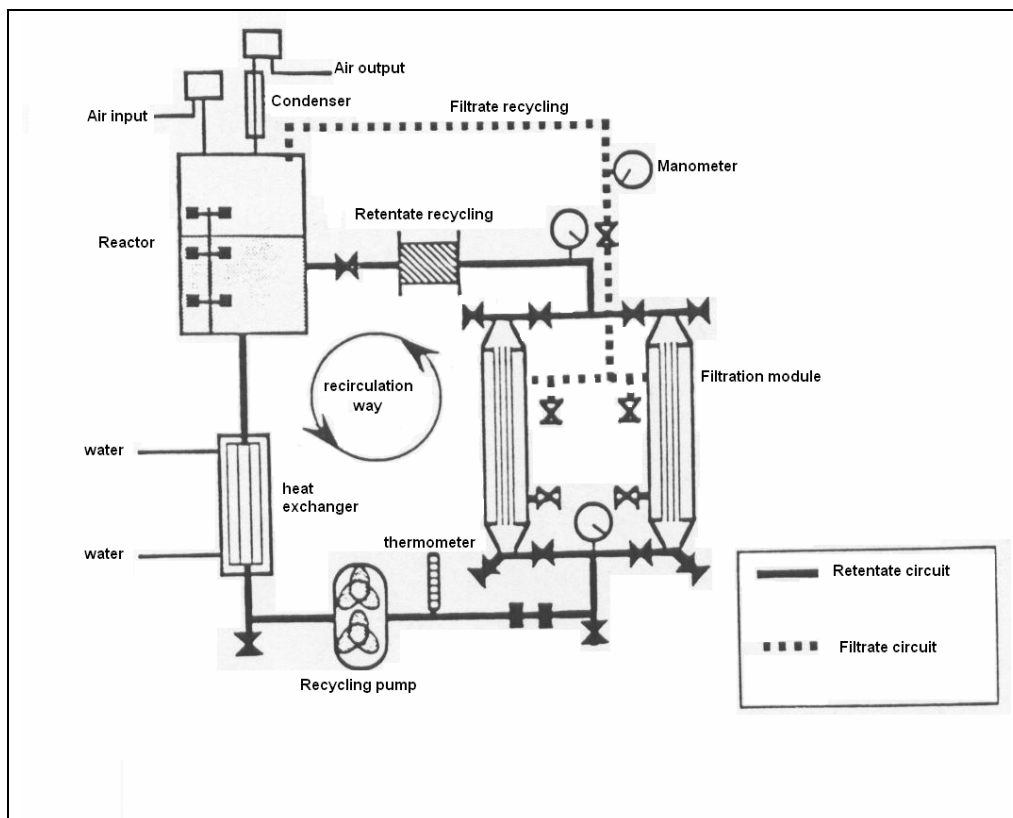


Figure 4: Schéma du Bio réacteur à membrane

Le module de filtration utilisé (Figure 5) pour les traitements en BRM consiste en une cartouche de filtration, avec un support en céramique, de texture macroporeuse (15 μ m de diamètre), et une géométrie en multi canal. Le module est composé de 19 canaux (diamètre = 4 mm ; longueur = 850 mm). La surface totale de filtration pour chaque canal est de 0.2m². Sur la surface du support macroporeux, on trouve une membrane filtrante en alumine α . La taille des pores de la membrane de filtration est de 0.2 μ m.

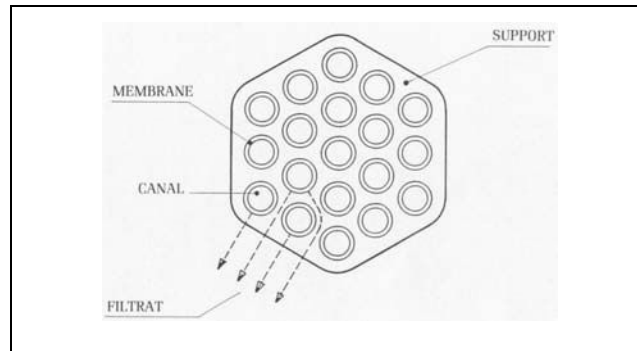


Figure 5: Géométrie du module de filtration

d- Autres traitements physico-chimiques

- La coagulation – floculation :

L'eau de trempe est placée dans un réacteur agité et à température contrôlée (25°C). Un coagulant, le chlorure de Fer III, est ajouté à différentes concentrations. Les effets de la durée, de la vitesse d'agitation et du pH sont aussi étudiés.

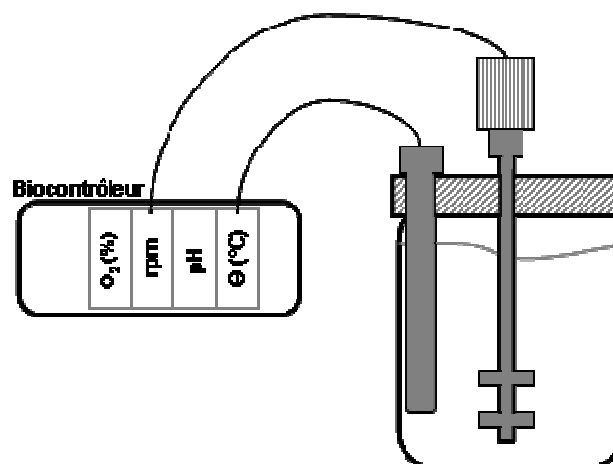


Figure 6 : Dispositif expérimental pour les expériences de coagulation-floculation

- L'osmose inverse

Les eaux de trempe traitées par bioréacteur à membrane à l'échelle de laboratoire sont retraitées par osmose inverse afin d'éliminer les sels, les ions et les molécules de faibles poids moléculaire. Ce traitement a été confié à l'entreprise *FAR Ingénierie (Messein)*. La figure 7 représente le dispositif d'osmose inverse utilisé.

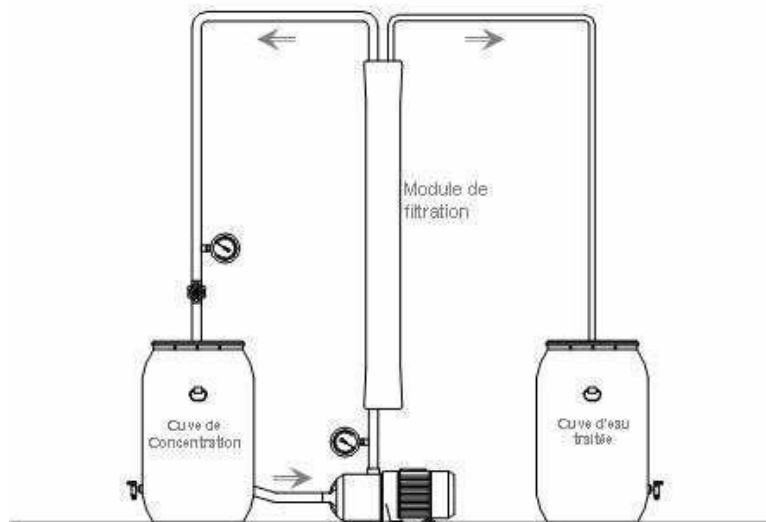


Figure 7 : Dispositif expérimental pour l'osmose inverse

- La nanofiltration

Les eaux de trempe traitées par bioréacteur à membrane sont aussi utilisées pour un traitement supplémentaire par nanofiltration afin d'éliminer les molécules de faible poids moléculaire. Le dispositif utilisé à l'échelle de laboratoire est le même que pour les essais de fractionnement des eaux de trempe (voir E/ 2-). La membrane de nanofiltration utilisée a un seuil de coupure de 500 Da.

- Le charbon actif

Les eaux de trempe traitées par bioréacteur à membrane à l'échelle de laboratoire sont aussi utilisées pour un retraitement au charbon actif afin d'éliminer les polyphénols, la couleur et un certain nombre de métaux. Le charbon actif utilisé (Sigma) se présente sous forme de poudre avec une granulométrie moyenne inférieure à 80 μm , une teneur en cendres de 3% et une teneur en eau inférieure à 10%.

2- Traitements à l'échelle pilote

Les caractéristiques requises pour les systèmes pilotes de traitement des eaux de trempes ont été établies à partir des analyses de ces eaux ainsi qu'à partir des résultats des essais de traitement à l'échelle de laboratoire.

Sur la base de ces spécifications, deux fournisseurs ont été choisis : ils seront notés *Sys1* et *Sys2*. Le tableau 1 résume les principales caractéristiques comparées des deux systèmes.

Tableau-1: Différences majeures dans les caractéristiques et les conditions d'utilisation des systèmes *Sys1* et *Sys2*.

	Sys1	Sys2
Membranes	Immergées	Externes
Concentration des boues (g/L)	6-7 (provenant d'une station d'épuration des eaux usées d'une brasserie)	6-10 (provenant d'une station d'épuration d'une entreprise de transformation de légumes)
Volume (m³)	3	2
Température (°C)	24-26	24-38
Purge	Non	Oui
Ajout de sucres	Oui (2 Kg de saccharose pendant le week-end)	Non (pour une meilleure adaptation de la biomasse à l'eau de trempes comme source de nutriments)
Taille des pores des membranes	0,1-0,2 µm	0,02 µm
Nettoyage des Membranes	A la fin des essais	Après chaque essai

La stratégie de traitement et de recyclage est détaillée en annexe.

Traitement des eaux de trempes par BRM

Les premier et second sous eau de chaque trempes sont récupérés pour être traités par BRM. Après chaque étape de trempage utilisant 1m³ d'eau, environ 800 – 900 L d'eau de trempes sont récupérés.

L'eau de trempes est stockée à température ambiante dans un bac tampon avant d'être utilisée pour alimenter progressivement le BRM.

- Pour le système *Sys1*, l'ajout d'alimentation du BRM en eau de trempes est effectué de manière séquentielle : 33L/min pendant 3 minutes, et ce, 1 fois par heure. Le perméat est récupéré en continu, de telle manière que le volume à l'intérieur du BRM demeure constant.
- Pour le système *Sys2*, l'alimentation est effectuée avec un débit de 135 L/h, pendant 5 à 6 heures. Le perméat est récupéré à un débit de 1.4 m³, une

heure après la fin de l'alimentation. On a donc à chaque étape de traitement, une variation d'environ 50% du volume des boues.

Dans les deux cas, le perméat récupéré est refroidi à 10°C dans un chiller, avant d'être utilisé pour une trempe.

La première phase sous eau de chaque trempe utilise 100% d'eau traitée par BRM.

La seconde phase sous eau de chaque trempe utilise 100% d'eau du réseau.

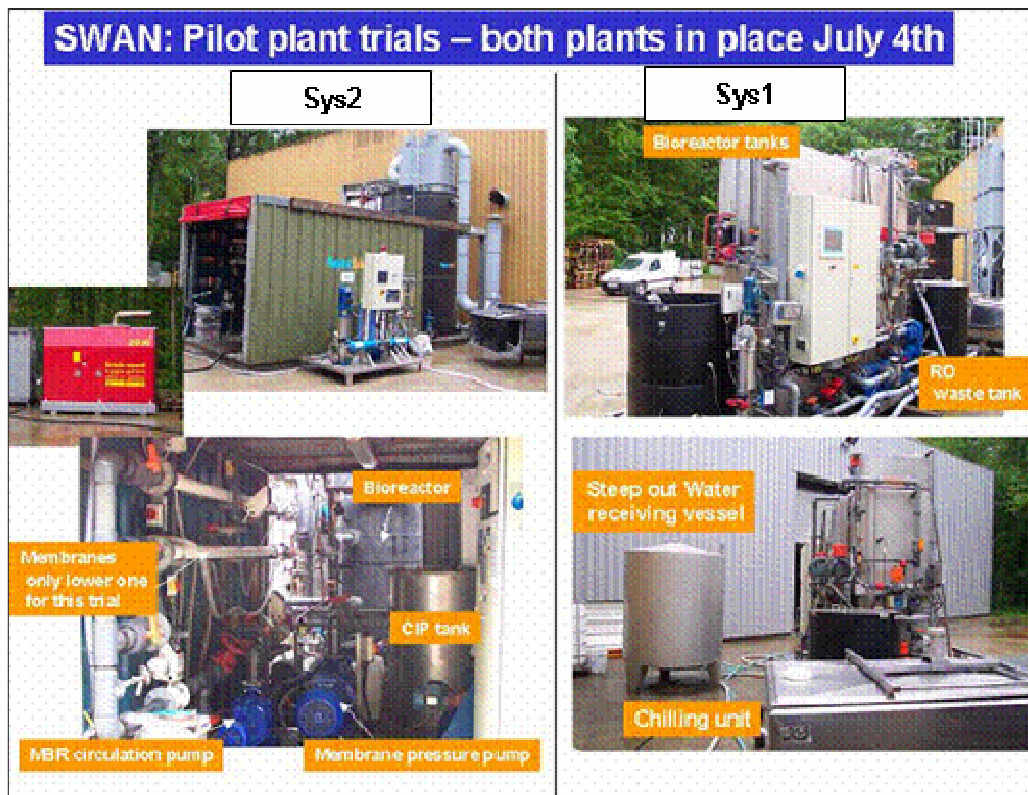


Figure 8: Systèmes pilotes Sys1 et Sys2

Traitement par osmose inverse

Le système Sys1 a utilisé 4 membranes de 9.5 m² de surface placées en série, tandis que le système Sys2 a utilisé une membrane de 40 m² de surface.

Traitement par charbon actif

Des essais de traitement du perméat de BRM par charbon actif ont été effectués avec l'équipe Sys2.

IV- Analyses des eaux de trempe

Dans un premier temps, les analyses suivantes ont été effectuées sur des échantillons d'eaux non traitées, provenant de différentes malteries, afin d'effectuer une étude préliminaire de caractérisation des eaux de trempe en malterie. Dans un second temps, ces mêmes analyses ont été effectuées sur les eaux de trempe traitées et non traitées afin d'étudier les performances des différentes méthodes de traitement.

- Analyses sur les eaux de trempe de différentes provenances : des échantillons d'eau ont été récupérés sur les sites suivants :

Eaux de trempe de sites français :

Les eaux de trempe françaises analysées proviennent de 5 sites différents (F1, F2, F3, F4, F5):

F1: Cuve conique; trempe non-aérée; 3 sous-eaux;

F2: Cuve conique; faible aération; 3 sous-eaux;

F3: Cuve à fond plat; forte aération; 3 sous-eaux;

F4: Cuve à fond plat ; aération moyenne; 2 sous-eaux;

F5: Cuve conique; 3 sous-eaux;

Eaux de trempe de sites britanniques :

Les eaux de trempe britanniques analysées proviennent de 5 sites différents (UK1, UK2, UK3, UK4, UK5):

UK1: Cuve à fond conique, trempe aérée; 2 sous-eaux;

UK2: 3 sous-eaux;

UK3: Cuve à fond plat, trempe aérée; 2 sous-eaux;

UK4: Cuve cylindro-conique; trempe aérée; 3 sous-eaux;

UK5: Cuve Saladin; trempe non aérée; 2 sous-eaux.

Tableau 2: Appellations des échantillons
Echantillons britanniques

UK1A	UK1B	UK2A	UK2B	UK2C	UK2D	UK2E	UK3A	UK3B	UK3C	UK4A	UK4B	UK4C	UK5A	UK5B	UK5C	UK5D
SE1	SE2	SE1	SE2	SE3	Eff	T. Eff	SE1	SE2	T. Eff	SE1	SE2	SE3	SE1	SE2	Eff	T. Eff

SE : Sous-Eau; Eff: Effluent; T. Eff: Effluent Traité.

Echantillons français

F1.1	F1.2	F1.3	F2.1	F2.2	F2.3	F3.1	F3.2	F3.3	F4.1d	F4.1m	F4.1f	F4.2d	F4.2m	F4.2f	F5.1	F5.2	F5.3
SE1	SE2	SE3	SE1	SE2	SE3	SE1	SE2	SE3	SE1	SE1	SE1	SE2	SE2	SE2	SE1	SE2	SE3

d = début / m = milieu / f = fin

Eaux de trempe de l'IFBM

1- Les eaux de trempe de l'IFBM utilisées pour l'étude de caractérisation proviennent d'un procédé aéré à 3 sous eaux avec débordement au premier sous eau. Le débordement consiste à verser dans la cuve de trempe un volume d'eau supérieur à sa capacité, de manière à éliminer les matières insolubles qui flottent à la surface, et les premières substances qui se solubilisent en début de trempe.

2- Les eaux de trempe utilisées pour les essais de traitement proviennent de procédés aérés à 2 sous eaux.

1- Analyse des acides organiques**Principe :**

Il s'agit de séparer et quantifier les différentes molécules d'acides organiques contenues dans un échantillon filtré, en utilisant une colonne de CLHP échangeuse d'ions et un détecteur à UV.

Conditions opératoires :

- système CHROMA ;
- Colonne Polypore H 7.0 (D.I) * 250mm (phase mobile recommandée : 0,01N H₂SO₄, débit 0.5ml/min) = résine échangeuse d'ions macroporeuse, en copolymère de styrène et divinyl benzène.
- phase mobile utilisée : 0,04N H₂SO₄ à 0.9 ml/min.
- Température colonne : 65°C.
- solution de rinçage de l'aiguille : Eau distillée.
- détecteur: UV à 210nm.

Tableau 3 : Acides organiques dosés par CLHP

Molécules dosées
Citrate
α -cétooglutarate
Pyruvate
Succinate
Lactate
Acétate
Propionate
Butyrate

2- Analyses des sucres et alcools

- La colonne utilisée est une colonne de CLHP **Alltech 700CH** composée d'une résine échangeuse d'ions sous la forme ionique Ca^{++} . Elle est spécifiquement désignée à la séparation des polysaccharides, monosaccharides et sucres alcools.
- La seule phase mobile utilisable est **l'eau distillée désionisée**.
- La séparation se fait essentiellement par exclusion stérique.
- Les performances optimales sont obtenues à des températures élevées ; ici, la colonne est utilisée à 90 °C.
- Dimensions de la colonne: 3/8 en O.D * 335 mm.
- Le débit de la phase mobile ne doit pas excéder 0.7 ml/min, afin que la pression de la pompe ne dépasse pas 100 atm (1500 psi). Ici, le débit sera fixé à la valeur recommandée, soit 0.5 ml/min.
- pré colonne : afin d'éliminer les contaminants et sels susceptibles de modifier les performances de la colonne, on utilise une pré colonne *Alltech*.
- Les échantillons à analyser sont filtrés à 0,2 μm .
- La détection se fait grâce à un détecteur R.I. Cependant, on peut aussi utiliser des détecteurs à U.V ou électrochimiques.

Tableau 4 : Standards Sucres / Alcools dosés par CLHP

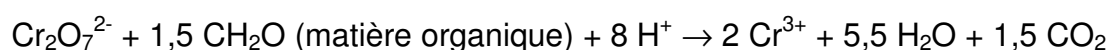
Substances dosées
Maltose
Lactose
Glucose
Galactose
Fructose
Ethanol

3- Demande chimique en oxygène

La DCO est la quantité d'oxygène consommée par les matières oxydables dissoutes, essentiellement des matières organiques. Ce test est particulièrement utile pour la caractérisation de toutes les eaux brutes ou traitées par voie biologique ou physico-chimique. Les matières oxydables dans l'eau sont oxydées quantitativement par une quantité connue et en excès de bichromate de potassium en milieu acide fort H₂SO₄ et au reflux pendant 2 heures. Le bichromate qui, en fin de réaction, n'a pas réagi, est titré par une solution de Fe(II) (solution de sel de Mohr, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂). On obtient la DCO en déduisant la quantité de bichromate réduite par la solution à analyser.

On opère en présence d'un catalyseur (Ag⁺) et en présence d'un complexant des ions chlorure (Cl⁻): Hg⁺⁺ complexe Cl⁻ en HgCl₂ qui empêche Cl⁻ d'être oxydé par le bichromate en dichlore (Cl₂) gazeux. La concentration de la solution de Fe(II) n'étant pas stable (oxydation à l'air), il est indispensable de déterminer le titre exact de la solution utilisée pour une série de dosages. Une mesure de DCO doit être faite simultanément sur les échantillons et sur de l'eau distillée qui est utilisée pour faire les différentes dilutions. Cette mesure constitue ce que l'on appelle un "blanc". En effet, le bichromate est susceptible d'oxyder l'eau en dioxygène.

La réaction d'oxydoréduction est la suivante:



4- Dosage des polyphénols totaux

La concentration en polyphénols totaux est déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Le réactif de Folin-Ciocalteu va se complexer avec les noyaux aromatiques. Il en résulte une coloration bleue du milieu réactionnel. Cette coloration est mesurée par un spectrophotomètre à 750 nm.

5- Analyse des composés phénoliques par HPLC

L'appareil d'analyse est un Integrity HPLC6PDACPL05' de marque WATERS. La colonne utilisée est une C18 (UP50DB-15Qtx) avec un greffage ODB. Sa granulométrie est de 5 µm. La colonne mesure 150 mm pour un diamètre interne de 4,6 mm.

Les éluants utilisés pour l'analyse sont :

- A : de l'eau osmosée à un pH de 2,6
- B : de l'acétonitrile (CHROMASALU, pureté de 99,9% pour HPLC fabriqué par Sigma Aldrich Chimie),
- C : du méthanol (Prolabo TLX : 980566F), de l'eau osmosée et de l'acétonitrile en proportions 3/1/1.

Avant chaque série d'analyse la colonne est conditionnée par un passage de l'éluant A pendant 5mn, puis on remplace progressivement (20mn) l'éluant A par un mélange d'éluant B (95%) et C (5%), qui passe dans la colonne pendant 80mn.

6- Dosage des métaux lourds et alcalino-terreux

La spectrométrie atomique étudie les émissions ou absorptions de lumière par l'atome libre, c'est à dire lorsque celui-ci voit son énergie varier au cours d'un passage d'un de ses électrons d'une orbite électronique à une autre. Généralement seuls les électrons externes de l'atome sont concernés. Ce sera le cas si les énergies mises en jeu sont modérées.

Les principales techniques mettant en jeu la spectroscopie atomique utilisée en analyse chimique sont

- l'émission d'arc ou d'étincelle (analyse qualitative préalable),
- l'émission de flamme et l'absorption atomique (analyse quantitative des éléments à faibles teneurs).

Principe

L'absorption des radiations électromagnétiques des régions visibles et UV du spectre par les atomes libres résulte d'un changement dans la structure électronique. On l'observe lorsque la radiation caractéristique (de résonance en général) d'un élément passe dans un nuage de vapeur atomique de l'échantillon. L'échantillon est vaporisé par aspiration de la solution dans une flamme ou par évaporation d'une surface chauffée électriquement.

L'appareil utilisé est un SpectrAA.20 Varian.

Flamme : air + acétylène

Eléments dosés : Cu, Zn, Cd, Fe, Mn.

7- Dosage du phosphore

On utilise un réactif (réactif molybdique) donnant un dérivé coloré avec les phosphates (complexe phosphomolybdique de couleur bleue). L'intensité de la coloration, mesurée par colorimétrie ou spectrophotométrie à 700 nm, est proportionnelle à la concentration en phosphates.

8- Dosage de l'azote total

Le dosage est effectué par la méthode de Kjeldahl. (voir *B- Analyses sur Orge, Malt et Moût, 1/ d-*)

9- Indice de germination

Définition et Principe :

L'indice de germination est un chiffre compris entre 0 et 10, qui indique la capacité de l'orge à germer dans un milieu donné, sur trois jours.

Mode opératoire :

100 grains d'orge sont placés dans une boîte de Pétri dont le fond contient un papier filtre Whatman, en présence de 4 ml d'une eau donnée (eau distillée, eau de trempé, ou autre solution). Le nombre de grains germés est compté après 24, 48 et 72 heures d'incubation à 20 °C et dans l'obscurité. La fermeture de la boîte de Pétri doit être bien étanche pour éviter toute perte d'humidité.

A chaque comptage, il faut enlever de la boîte les grains germés afin qu'ils n'absorbent pas trop d'humidité.

L'indice de germination (I) est calculé comme suit :

$$I = \frac{10 \times T}{N_{24} + 2 \times N_{48} + 3 \times N_{72}}$$

Où : T est le nombre total de grains germés en 3 jours;

N_{24} est le nombre de grains germés après 24 heures;

N_{48} est le nombre de grains germés après 48 heures;

N_{72} est le nombre de grains germés après 72 heures.

10- Poids sec

Il s'agit d'éliminer l'humidité d'un échantillon de volume connu (à 105°C), et d'en mesurer la masse résiduelle.

11- Charge microbienne

Le milieu Agar est utilisé pour les bactéries et le milieu Potatoe Dextrose Agar pour les levures et moisissures.

Les échantillons sont incubées à 20 °C pendant 72 heures.

12- Densité optique

La densité optique de chaque échantillon est mesurée par un spectrophotomètre à 600 nm contre un blanc constitué par de l'eau distillée. Elle permet d'avoir une idée sur la turbidité de l'échantillon, donc sa teneur en matières insolubles.

13- Chromatographie d'exclusion de taille

Il s'agit de séparer les molécules sur la base de leur poids moléculaire.

La colonne utilisée est une Superdex® Peptide HR 10/30. Elle est constituée de dextrane lié par des liaisons covalentes à l'agarose. C'est essentiellement le dextrane qui détermine les propriétés de séparation de la colonne.

La meilleure séparation est obtenue pour les molécules de PM compris entre 100 et 7000 Da.

L'éluant utilisé est un mélange de méthanol (59,95%), acétonitrile (39,95%), et acide tri-fluoro-acétique (0,1%). Les longueurs d'onde que nous avons utilisées sont 214 nm pour reconnaître les protéines et 310 nm pour reconnaître les composés phénoliques.

V- Recherche des inhibiteurs de la germination

1- Recyclage des eaux de trempe

La réutilisation des eaux de trempe dans le procédé a pour objectif d'étudier l'impact de ces eaux sur la qualité du malt, et de mettre en évidence la nécessité de traiter

ces eaux avant leur réutilisation. Le recyclage des eaux de trempes en malterie a été effectué en suivant la stratégie décrite dans la figure 9:

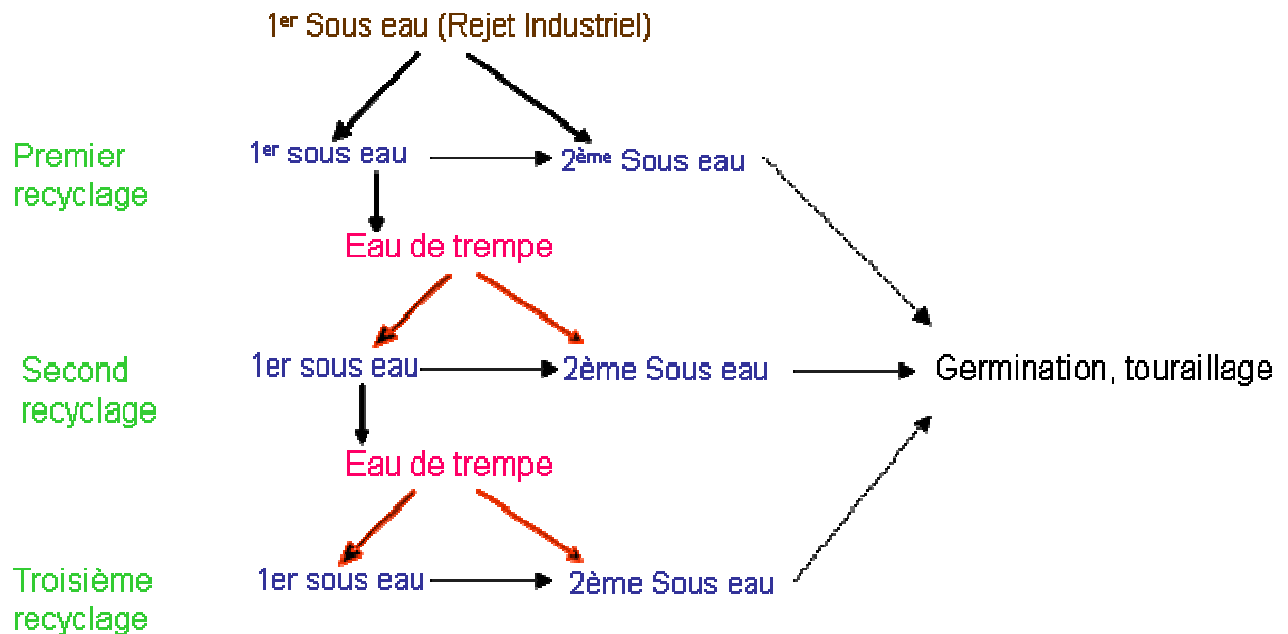


Figure 9 : Schéma des recyclages d'eau de trempe en laboratoire

Les malts obtenus aux différents stades de recyclage sont analysés.

2- Fractionnement des eaux de trempe

Les eaux de trempes sont fractionnées en utilisant des membranes de filtration de différents seuils de coupure. L'objectif de ces fractionnements est de localiser les molécules inhibitrices en terme de poids moléculaire apparent.

La filtration à 500 Da a aussi été utilisée comme opération supplémentaire de traitement des eaux de trempe.

Les eaux de trempes sont pré filtrées avant d'être fractionnées, afin d'éliminer les particules en suspension.

Description de l'unité de filtration tangentielle :

Il s'agit d'une unité de filtration PROSCALE (Millipore) comportant les éléments suivants (voir figure 10):

- un réservoir d'alimentation R01 ;
- une pompe centrifuge P01 conduisant le liquide d'alimentation vers la membrane ;
- un réservoir R02 contenant l'eau osmosée nécessaire pour les diafiltrations ;

- une pompe péristaltique P02 (alimentant R01 à partir de R02) ;
- des vannes manuelles V01, V02, V03 et V04 ;
- une sonde de température placée sur la sortie rétentat ;
- deux manomètres, l'un sur la ligne d'alimentation et l'autre sur la sortie rétentat ;
- un indicateur de débit placé sur la sortie perméat. Cet indicateur est en réalité un débitmètre massique précis.

Sur cette installation, des membranes planes ou spiralées peuvent être utilisées.

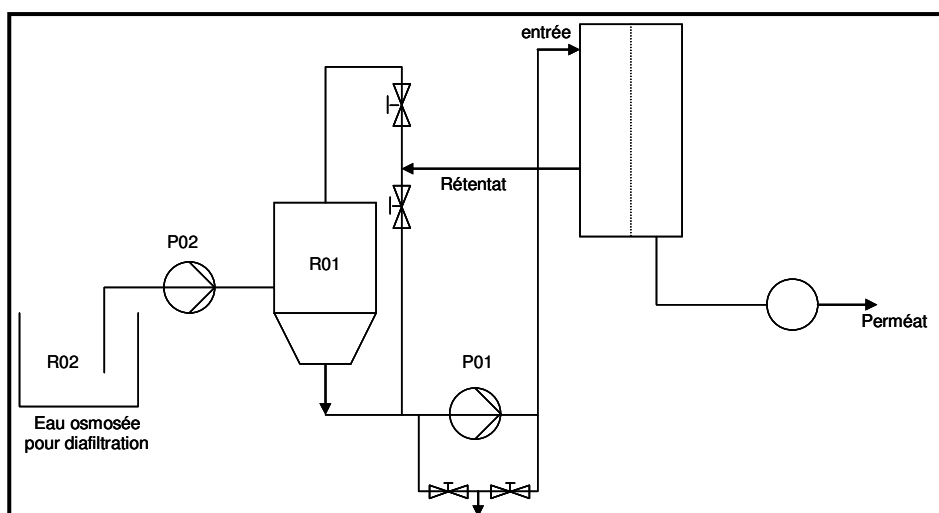


Figure 10: Schéma de fonctionnement du pilote de filtration tangentielle

Tableau 5: Caractéristiques et conditions d'utilisation des membranes

	Membrane	PLBC	NANOMAX50	PLAC
	Seuil de coupure	3 kDa	500 Da	1 kDa
	Nature	Acétate de cellulose	Polyamide	Acétate de cellulose
	Surface filtrante	0,1 m ²	0,37 m ²	0,1 m ²
Rinçage / nettoyage	Vitesse pompe	13%	63%	13%
	PTM	1-2 bars	10 bars	1-2 bars
Filtration	Vitesse pompe	23%	63%	23%
	PTM	5 bars	10 bars	5 bars
	Solution de nettoyage	NaOH 0,1N	NaOH 0,1N	NaOH 0,1N
	Solution de stockage	H ₃ PO ₄ 0,1N	NaN ₃ 0,05%	H ₃ PO ₄ 0,1N

3- Oxydation des composés phénoliques

- Des réactions d'oxydation de différents composés phénoliques de l'orge ont été réalisées en utilisant comme enzymes la laccase de *Trametes versicolor* (Fluka, 0.8

unités/mg) avec un apport d'oxygène, et la peroxydase de raifort (Fluka, 250-330 unités/mg) en ajoutant du H_2O_2 . La consommation de substrat est suivie par analyse des échantillons par HPLC en phase inverse.

- La cystéine est utilisée en tant que produit anti-oxydant, pour étudier la modification des réactions d'oxydation pendant la trempe et pendant la germination. Son influence sur la coloration des eaux de trempe et sur le pouvoir inhibiteur des eaux de trempe est aussi étudiée.

L'effet de concentration est aussi suivi.

4- Extraction des composés phénoliques

- Extraction des tanins condensés de l'orge

Chavan *et al.*, (2001) ont testé différents solvants pour l'extraction des tanins condensés : eau, méthanol de 70% à 100% et acétone de 70% à 100%, avec ou sans HCl à 1%.

Ils ont obtenu les meilleurs rendements d'extraction avec de l'acétone à 70% sans HCl. La Figure 11 présente la technique d'extraction et purification des tannins condensés :

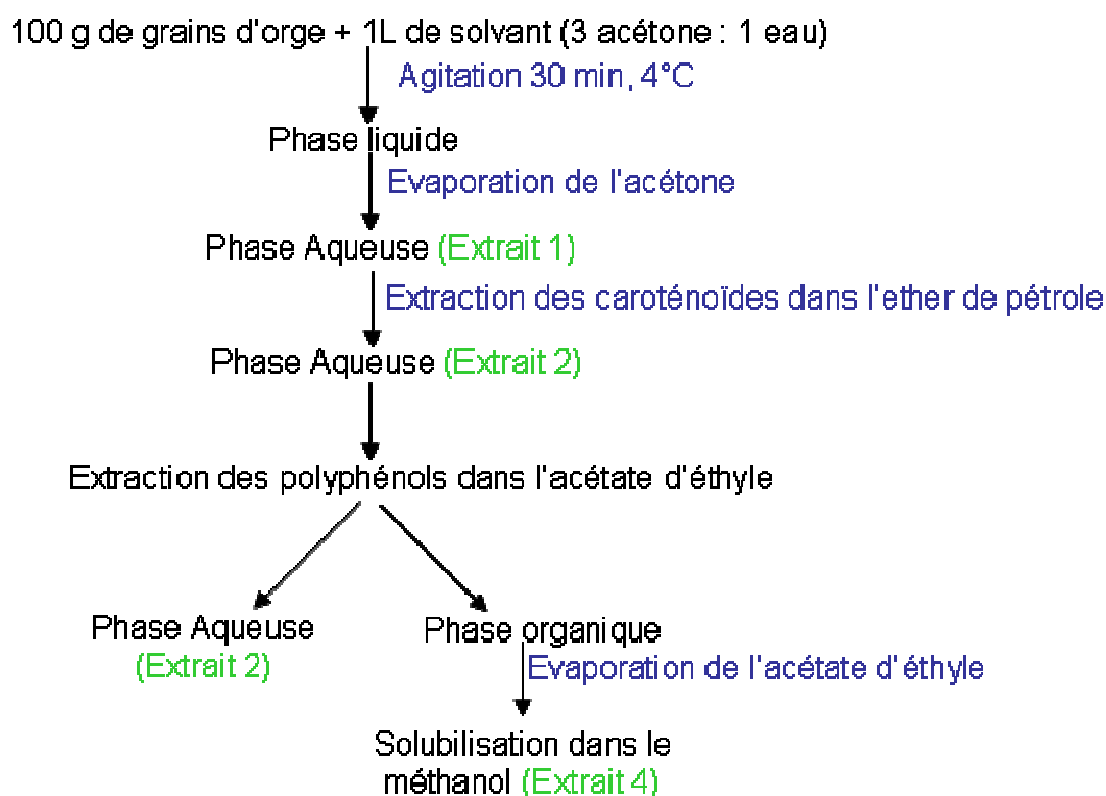


Figure 11 : Etapes d'extraction des tanins condensés de l'orge

- Extraction des flavanols de l'orge :

Mac Murrough *et al*, (1983) ont proposé la technique suivante pour l'extraction et la purification des flavanols :

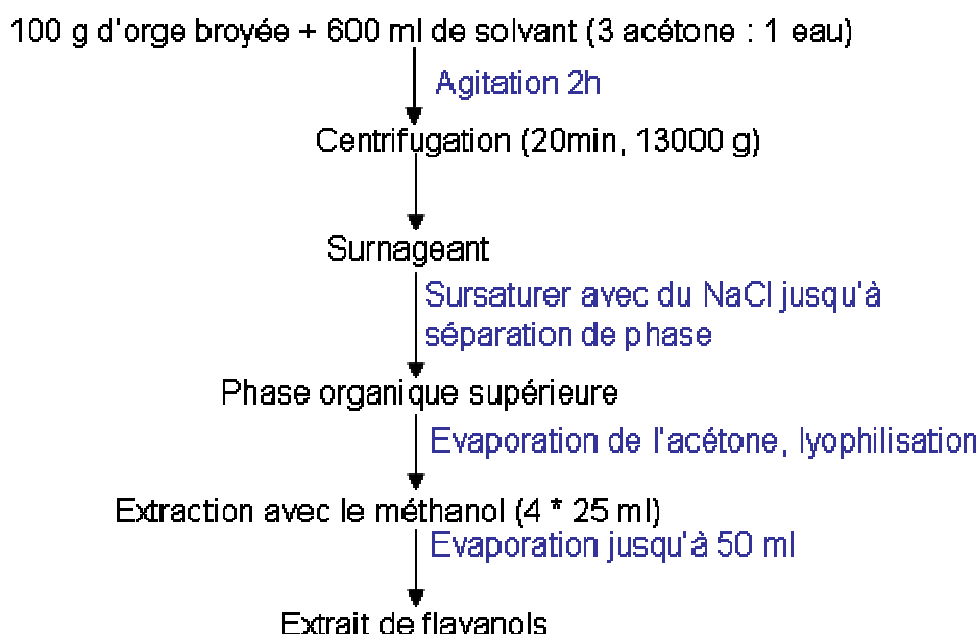


Figure 12 : Etapes d'extraction des flavanols.

- Extraction des polyphénols totaux de l'eau de trempage

L'eau de trempage filtrée est mise en contact avec une résine acrylique moyennement polaire : l'Amberlite XAD-7. C'est une résine macroréticulaire non-ionique qui adsorbe et relargue les espèces ioniques par interactions hydrophobes et polaires.

Les composés phénoliques ainsi retenus sur la résine sont récupérés par rinçage au méthanol.

RESULTATS

ET

DISCUSSIONS

Troisième partie : Résultats et Discussions

Chapitre I- Etude préliminaire

1- Caractérisation des eaux de trempes

L'objectif de ce travail préliminaire est d'établir l'inventaire des substances présentes dans les eaux de trempes. Pour cela des échantillons ont été prélevés sur des sites différents, à partir de cuves de différentes formes, des diagrammes et des températures de trempes différentes, ainsi que des variétés d'orge différentes.

Les résultats sont détaillés en *Annexe 1*. Les différentes analyses physico-chimiques montrent la présence :

- de sucres, essentiellement du maltose a été identifié (jusqu'à 0,85 g/L), mais aussi du glucose, galactose et fructose. La présence d'oligomères a été vérifiée, mais ces différents composés n'ont pas été identifiés.
- d'acides organiques, essentiellement : citrate, α -cétoglutarate, l-malate, pyruvate, succinate, lactate, fumarate, acétate, propionate et butyrate.
- d'éthanol,
- de métaux lourds : Fe, Mn.
- de phosphore,
- de composés phénoliques : essentiellement des acides phénoliques ont été identifiés : acide gallique, hydrobenzoïque, protocatéchuïque, syringique, vanillique, coumarique, férulique. Sur les eaux de la première phase sous eau, la teneur en polyphénols totaux varie de 50 à 170 mg/L.
- de pesticides : sur 24 composés recherchés, les pesticides suivants ont été détectés : chlorméquat chlorure, fenpropimorphe, glyphosate (uniquement sur des échantillons en provenance de malteries britanniques), pirimiphos-méthyl, azoxystrobine, bifenthrine, butoxyde pypéronyl, deltaméthrine, dichlorvos et malathion.
- et de mycotoxines : déoxynivalénol, nivalénol, ochratoxine A, cytochalasine E. Il faut noter que les échantillons ici analysés concernent des trempes de lots d'orge

des récoltes de 2003. Des récoltes plus récentes (depuis 2005) montrent la présence de nouvelles mycotoxines telles que le T2 et la HT2.

On remarque aussi que l'eau résultant de la première phase sous eau a toujours une DCO plus élevée que celles résultant des deuxième et troisième phases sous eau et que son utilisation pour des tests de germination donne les taux de germination les plus faibles à 24, 48 et 72h de germination.

Par ailleurs, les tests de germination avec les différents échantillons d'eaux de trempes montrent des résultats très variables. Ainsi –par exemple – le pourcentage de germination à 24h pour les tests utilisant 4 ml d'eau de trempes, varie de 25% à 100%. Ces différences s'expliquent aussi bien par les différences dans les paramètres de procédé (ratio eau/orge, température, durée de la trempes, aération) que par les différences variétales des lots d'orge ou encore par les différences des populations microbiennes qui se développent pendant la trempes.

La charge microbienne est quant à elle plus faible dans l'eau de la première phase sous-eau que des deuxième et troisième phases sous eau. En fait, lors de la phase sous air, les micro-organismes continuent à se développer à la surface des grains d'orge, ce qui explique leur plus grande concentration dans la phase d'immersion suivante. Par ailleurs, on constate des teneurs plus élevées en bactéries qu'en levures.

De plus, les échantillons d'eaux traitées en stations d'épuration montrent des concentrations plus faibles pour les différentes substances détectées et des taux de germination plus élevés.

Enfin, les résultats d'analyse des eaux de trempes d'IFBM sont détaillés en *Annexe 2*. Il s'agit d'eaux issues de trempes réalisées à l'échelle pilote (600 jg d'orge et ~ 1,2m³ d'eau). Elles semblent avoir des caractéristiques différentes : les concentrations des différentes substances détectées sont nettement plus faibles que celles retrouvées dans les eaux industrielles. Ces résultats sont liés au fait que ces échantillons de l'IFBM proviennent d'une trempes avec débordement : en début de trempes, le volume d'eau ajouté est supérieur à la capacité de la cuve, ce qui provoque un débordement, permettant d'éliminer les poussières et les enveloppes des graines qui flottent à la surface. Cette opération provoque aussi une dilution des matières solubles libérées dans le milieu en début de trempes.

2- Pouvoir inhibiteur des eaux de trempe

Les tests de germination effectués sur les différentes eaux de trempe (*Annexe 1*) montrent que plus la durée du test de germination est longue (de 24 à 72h), plus les écarts entre les échantillons se réduisent. Les indices de germination constituent quant à eux des valeurs moyennes de la vitesse de germination des grains sur 72 heures.

En conséquence, un test sur 24 heures semble être le plus adéquat pour mieux déceler les différences entre les pouvoirs inhibiteurs des eaux de trempe.

Un test « d'inhibition » a donc été mis au point. Il s'agit d'un test effectué dans les mêmes conditions que le test réalisé pour la mesure de l'indice de germination. Cependant, ce test est effectué sur seulement 24h.

L'objectif est de quantifier le pouvoir inhibiteur d'un échantillon d'eau. Pour chaque série d'essais, un test de référence est effectué en utilisant le même lot d'orge et de l'eau distillée.

Le pouvoir inhibiteur d'une eau est exprimé en pourcentage d'inhibition par rapport au test de référence :

$$\%Inh = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Où : A est le nombre de grains germés en 24 h pour le test de référence ;

B est le nombre de grains germés en 24 h avec l'eau à tester.

Pour l'ensemble des échantillons provenant de sites industriels britanniques, les valeurs minimale et maximale des pourcentages d'inhibition à différents temps (24h, 48h et 72h) sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

Tableau 1 : Pourcentages d'inhibition minimum et maximum pour les échantillons britanniques (tests de germination avec 4 ml d'eau de trempe)

Echantillons britanniques (4 ml)		%inh 24h	%inh 48h	%inh 72h	%inh indice
Non Filtrés	Min	4%	3%	1%	4%
	Max	36%	12%	7%	23%
Filtrés	Min	0%	0%	0%	0%
	Max	17%	9%	7%	16%

Tableau 2 : Pourcentages d'inhibition minimum et maximum pour les échantillons britanniques (tests de germination avec 8 ml d'eau de trempé)

Echantillons britanniques (8 ml)		%inh 24h	%inh 48h	%inh 72h	%inh indice
Non Filtrés	Min	33%	10%	6%	20%
	Max	71%	43%	41%	30%

Les tableaux 1 et 2 montrent qu'aussi bien pour les tests avec 4 ml que pour les tests avec 8 ml, les taux d'inhibition sont les plus élevés à 24h, et ils s'atténuent avec le temps. Les taux d'inhibition sur les indices de germination représentent quant à eux des valeurs moyennes sur 3 jours. Ces résultats montrent que les eaux de trempé ne provoquent pas un blocage de la germination, mais plutôt un retard de la reprise des activités métaboliques du grain. Par ailleurs, les tests de germination effectués avec 8 ml d'eau de trempé montrent des pourcentages d'inhibition plus élevés que les tests avec 4 ml.

Ainsi, les résultats les plus discriminants sont ceux des tests de germination avec 8 ml, après 24h de germination. Ces conditions seront donc retenues pour tester dans la suite du travail, le pouvoir inhibiteur de différentes eaux (*test d'inhibition*).

- Essais de répétabilité

Afin de vérifier la fiabilité et la répétabilité du test d'inhibition, 10 tests ont été effectués en parallèle et dans les mêmes conditions. Le coefficient de variation obtenu est de 1,95%. Le test est donc fiable pour la comparaison du pouvoir inhibiteur de différentes eaux de trempé.

3- Essais de recyclages des eaux de trempé

L'objectif de ces essais de recyclage est d'étudier la possibilité de la réutilisation de l'eau de trempé pour le trempage de l'orge, et son effet sur la qualité finale du malt.

Le diagramme de trempé utilisé est le suivant: 9h sous eau – 6h sous air – 18h sous eau – 3h sous air. La trempé est effectuée à 18°C, sans aération durant les phases sous eau. Ces conditions de trempé sont défavorables, vu les longues durées d'immersion pendant lesquelles la respiration et donc le métabolisme du grain sont freinés. Elles permettent donc de bien différencier les échantillons, en fonction de la

qualité de l'eau de trempage. L'eau de la première phase sous-eau est récupérée pour être utilisée dans le trempage en deux phases sous eau d'un nouvel échantillon d'orge.

Afin de suivre l'évolution de la qualité de l'eau ainsi que celle du malt au cours des recyclages, les analyses suivantes sont effectuées : DCO totale et DCO soluble, Teneurs en bactéries et levures, tests de germination avec les différents échantillons d'eau, humidité en fin de trempage et en fin de germination, ainsi que la friabilité des malts.

a- Analyses sur eau

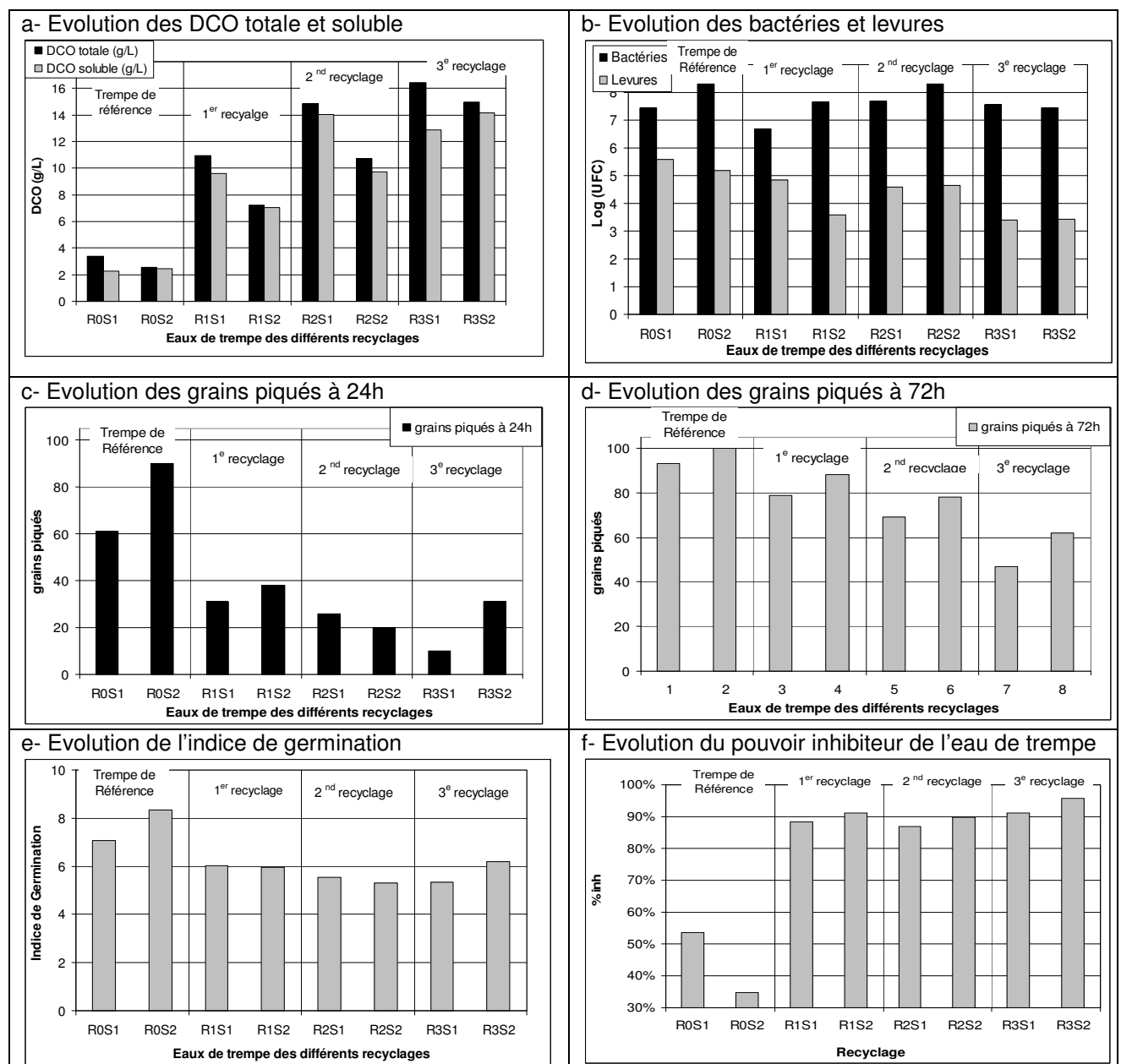


Figure 1 : Caractéristiques des eaux de trempage au cours des recyclages.

Les analyses d'eau au cours des recyclages montrent (*figure 1*) une augmentation de la DCO.

La teneur en bactéries reste stable, tandis que la teneur en levures diminue légèrement. Cette différence peut être due à une meilleure adaptation des bactéries, vu leur plus grande diversité par rapport aux levures.

Ces changements dans les caractéristiques des eaux de trempé lors des recyclages successifs sont accompagnés d'une nette augmentation de leur pouvoir inhibiteur. En effet, dès le premier recyclage, le pouvoir inhibiteur de l'eau de trempé approche les 90%.

Ceci permet donc de prédire un impact sensible du recyclage de ces eaux sur la qualité du malt.

b- Analyses sur malt vert et malt

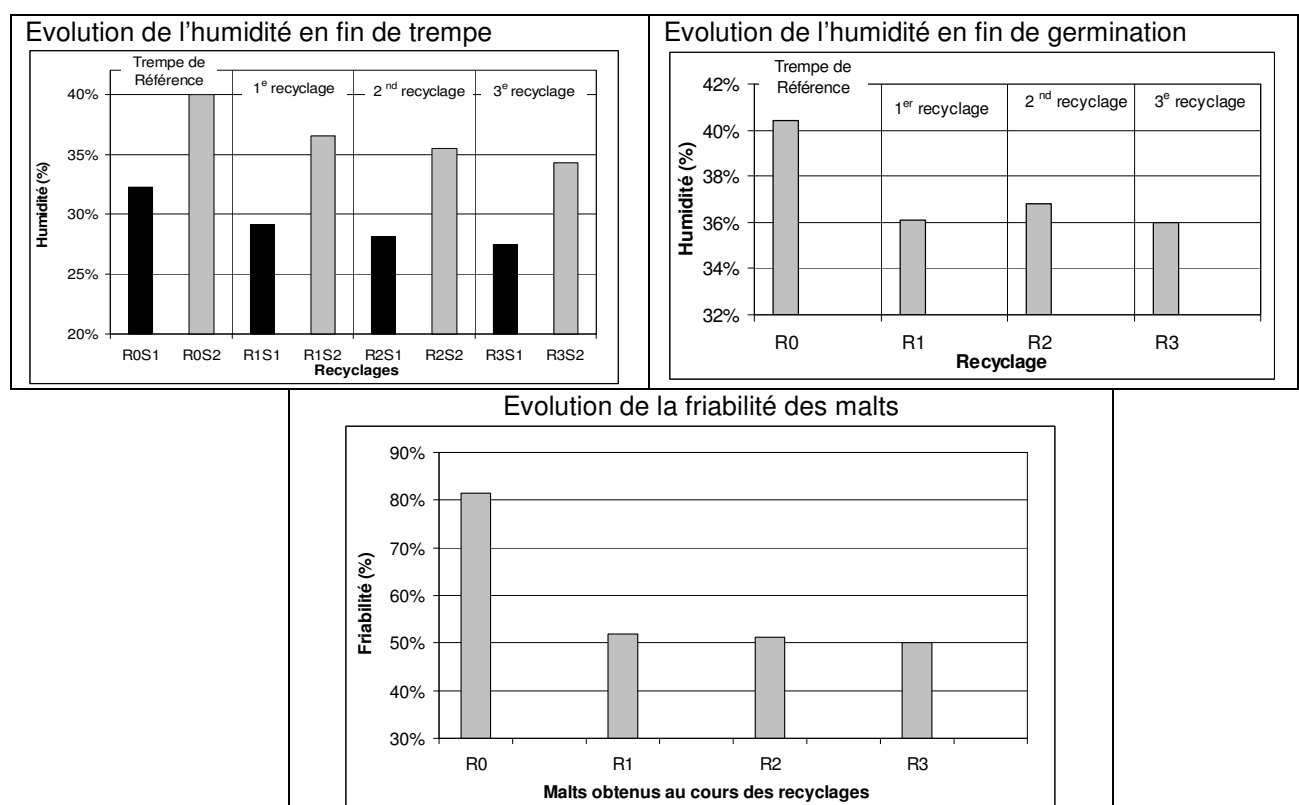


Figure 2 : Evolution de la qualité du malt au cours des recyclages

Les analyses sur orge et malt montrent que l'humidité de l'orge en fin de trempage diminue au cours des recyclages (figure 2). Il en est de même pour l'humidité en fin de germination. Ce résultat s'explique par l'augmentation de la DCO soluble au cours des recyclages. Cette augmentation de la DCO a pour conséquence le ralentissement des transferts de matière du grain d'orge vers le milieu extérieur, et de la prise d'eau par le grain.

Il résulte de cette baisse de l'humidité, un retard de la reprise des activités métaboliques dans le grain, d'où une plus faible modification et désagrégation du grain d'orge. Sur le malt final, ceci se traduit par une diminution de la friabilité, qui est de l'ordre de 50% au troisième recyclage. Une friabilité minimale de 80% est requise pour garantir une bonne qualité de malt.

Ainsi, la réutilisation des eaux de trempage pour le trempage de l'orge provoque une détérioration de la qualité du malt.

3- Effet de la durée de la première phase sous eau sur le recyclage des eaux de trempage

La détérioration de la qualité du malt lors de l'utilisation des eaux de trempage issues du recyclage pourrait ainsi s'expliquer par un simple ralentissement des transferts d'eau et de solutés, ou encore par l'apparition d'un phénomène biochimique d'inhibition de la germination.

Afin de vérifier s'il s'agit bien d'un simple retard de prise d'eau, plusieurs trempes ont été effectuées avec une même eau usée, et différentes durées de la première phase sous eau.

L'eau de trempage utilisée provient du trempage de 4 kg d'orge dans 6L d'eau pendant 14h et à 18°C, sans aération.

Pour le test de référence, la première phase sous eau a une durée de 12h. Les résultats obtenus pour les différents malts sont représentés en *Annexe 3*.

On remarque que plus la première phase sous eau est longue, plus l'humidité en fin de germination et la friabilité du malt sont élevées. Ce résultat signifie que lorsqu'on

augmente la durée de la phase sous eau, même en réutilisant une eau de trempage inhibitrice, on se rapproche de la qualité du malt de référence. Les autres paramètres montrent aussi que la prolongation de la première phase sous eau est bénéfique pour la qualité de malt. En fait, ce résultat s'explique par une prise d'eau plus importante pour des durées de trempage plus élevées. Cependant, le malt obtenu avec la phase sous eau la plus longue n'atteint pas la qualité du malt de référence. On remarque par exemple des différences dans les concentrations de protéines solubles ou le pourcentage de grains entiers.

Ces résultats confirment que la réutilisation des eaux de trempage provoque un retard de la germination, difficilement rattrapable après l'étape de trempage. Ce retard persistant s'explique donc à la fois par la force ionique élevée des eaux de trempage, qui provoque un ralentissement de la diffusion des matières solubles et la prise d'eau par le grain, mais aussi par l'inhibition biochimique due à la présence de molécules actives dans l'eau de trempage ou dans le grain.

Chapitre II- Recherche des inhibiteurs de la germination

Les essais de réutilisation de l'eau de trempage ont permis de démontrer un retard de la germination, et une qualité détériorée du malt.

L'étape présente de ce travail a pour objectif la mise en évidence de l'existence, dans les eaux de trempage, de substances inhibitrices de la germination de l'orge, puis l'identification de ces substances.

1- Corrélations entre l'inhibition et les différents composés identifiés dans les eaux de trempage

Afin de vérifier que le retard de prise d'eau par le grain n'est pas simplement dû à la force ionique du milieu, des tests de germination ont été effectués avec des solutions de chlorure de sodium à différentes concentrations, correspondant aux conductivités retrouvées dans les eaux de trempage (jusqu'à 2 mS/cm). Ces solutions n'ont provoqué aucune inhibition de la germination. Le retard de germination et de prise d'eau par le grain ne sont donc pas simplement dus à la force ionique du milieu.

Les différents échantillons d'eaux de trempage provenant de sites français et britanniques, analysés dans la partie I, sont utilisés pour la recherche de corrélations entre l'inhibition et les composés identifiés dans ces échantillons.

D'une part, on remarque que lorsque les eaux de trempage sont filtrées, le taux d'inhibition diminue. Les matières en suspension, qui sont en partie constituées de micro-organismes, contribuent donc à l'inhibition de la germination. Cependant, il n'y a pas de corrélation significative entre la teneur en matières en suspension et le taux d'inhibition.

D'autre part, en établissant les courbes représentant l'inhibition en fonction des différentes caractéristiques physico-chimiques des échantillons industriels d'eaux de trempage (DBO, DCO, polyphénols totaux, pesticides,...etc.), aucune corrélation significative n'a été trouvée, comme l'illustrent par exemple les *figures 2 a/, b/ et c/*.

Par ailleurs, les analyses en régression multiple n'ont pas été possibles, à cause de la petite taille d'échantillons par rapport au nombre de paramètres à tester.

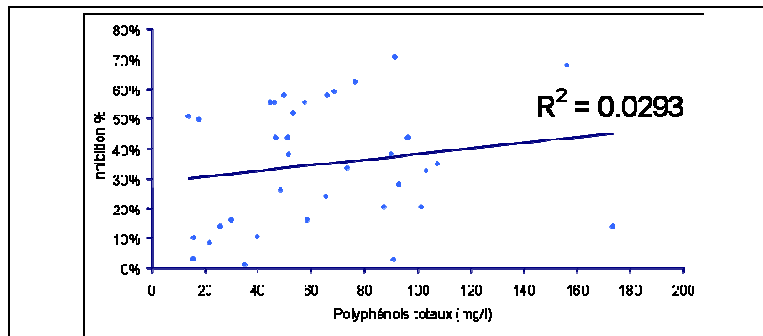


Figure 2, a/ : Corrélation entre le taux d'inhibition et la teneur en polyphénols totaux pour les échantillons d'eaux de trempe industrielles

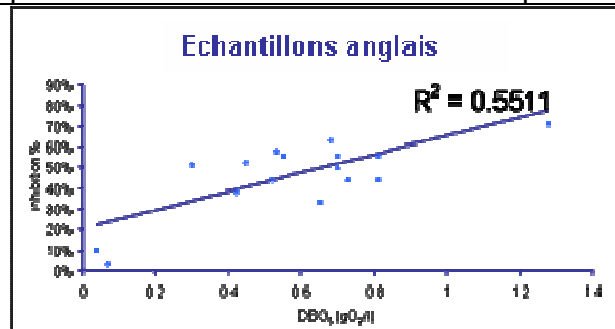


Figure 2, b/ : Corrélation entre le taux d'inhibition et la DBO₅ pour les échantillons d'eaux de trempe industrielles britanniques

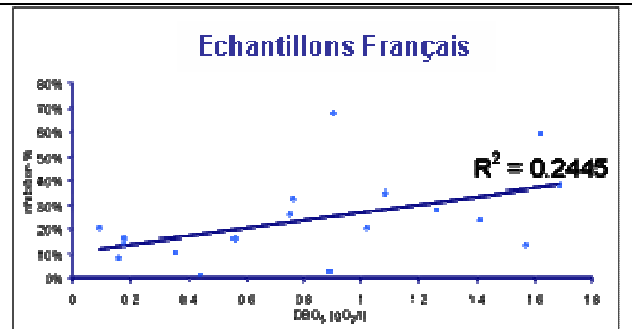


Figure 2, c/ : Corrélation entre le taux d'inhibition et la DBO₅ pour les échantillons d'eaux de trempe industrielles françaises

2- Effet de la variété d'orge

Différentes variétés d'orges de printemps ont été trempées selon un même diagramme (9h sous eau – 24h sous air – 6h sous eau) à l'échelle pilote (IFBM). L'eau provenant de la première phase sous eau a été testée pour son pouvoir inhibiteur. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Taux d'inhibition obtenus avec les premiers sous-eaux de trempage de différentes variétés d'orges de printemps (NF = échantillon non filtré ; F = échantillon filtré).

Variété	NF	F
V1	25%	6%
V2	52%	17%
V3	50%	8%
V4	56%	25%
V5	49%	25%
V6	52%	15%
V7	46%	13%

On retrouve le même résultat que pour les échantillons industriels, en ce qui concerne l'effet des matières en suspension. On remarque aussi qu'il y a un effet variétal sur l'inhibition. Cet effet s'explique par la différence de composition biochimique du grain d'orge d'une variété à l'autre.

3- Fractionnement des eaux de trempe

Les essais de fractionnement ont été effectués pour étudier les inhibiteurs de la germination de l'orge, présents dans les eaux de trempe, en identifiant la/les classe(s) de poids moléculaires à laquelle (auxquelles) ils appartiennent.

La *figure 3* montre que les substances présentes dans une eau de trempe sont effectivement distribuées sur une large gamme de poids moléculaires.

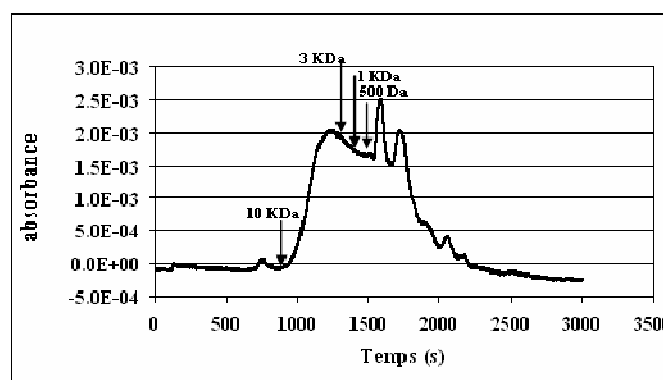


Figure 3 : Profil de poids moléculaires d'une eau de trempe, établi par chromatographie d'exclusion de taille avec un détecteur à UV à 310 nm.

Des fractionnements ont été effectués avec des membranes de filtration de différents seuils de coupure. Les rétentats ont été « lavés » avec de l'eau osmosée par diafiltration, afin d'en éliminer les molécules de taille inférieure au seuil de coupure. Les résultats des tests de germination effectués avec les différentes fractions sont présentés dans le *tableau 4*.

Tableau 4 : Taux d'inhibition obtenus avec les différentes fractions d'eaux de trempe

	10 KDa	3 KDa	1 KDa	500 Da
Eau de trempe	40%	29%	34%	30%
Perméat	14%	11%	19%	2.7%
Rétentat "lavé"	20%	10%	28%	38%

Pour les fractionnements à 10, 3 et 1 KDa, on remarque qu'une inhibition significative est encore présente dans les deux fractions (perméat et rétentat). Ce résultat montre que les molécules inhibitrices ont une large distribution des poids moléculaires apparents. Il peut donc s'agir de différentes substances, de différentes classes ou familles moléculaires.

Par contre, le fractionnement à 500 Da donne un concentrat fortement inhibiteur, et un perméat avec une inhibition non significative. Ce résultat montre que les molécules inhibitrices ont un poids moléculaire apparent supérieur à 500 Da.

Enfin, les essais de fractionnement à 500 Da ont permis de constater que le rétentat avait une couleur brune foncée tandis que le perméat était totalement incolore, comme le montrent les mesures de D.O dans le *tableau 5*. Pour les essais précédents de fractionnement (10, 3 et 1KDa), aussi bien le perméat que le rétentat étaient colorés.

Tableau 5 : Mesures de la D.O pour les fractions d'eau de trempe obtenues avec une membrane de 500 Da.

	D.O (500nm)
Eau de trempe	0.166
Perméat 500 Da	0.001
Rétentat 500 Da	0.355

Ce résultat permet d'émettre l'hypothèse de l'implication de composés colorés dans le phénomène d'inhibition.

4- Relation entre couleur et inhibition

L'objectif de ces essais est d'étudier l'évolution de la couleur et du pouvoir inhibiteur de l'eau au cours de la trempe afin de vérifier l'hypothèse de l'implication des composés colorés dans le phénomène d'inhibition.

Les figures 4 a/, b/ et c/ montrent respectivement l'évolution du pouvoir inhibiteur de l'eau au cours de la trempe, l'évolution de la couleur de l'eau au cours de la trempe, et la corrélation entre couleur et inhibition.

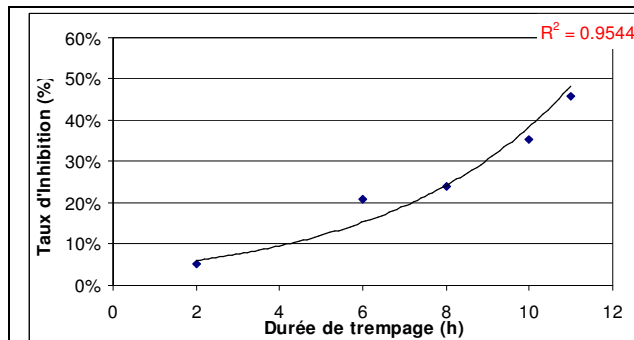


Figure 4 a/ : Evolution de l'inhibition au cours de la trempage

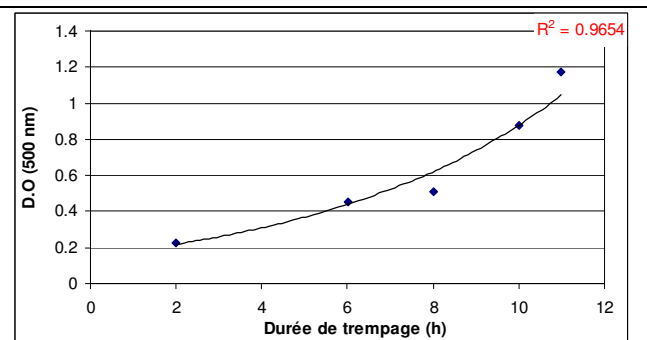


Figure 4 b/ : Evolution de la couleur au cours de la trempage

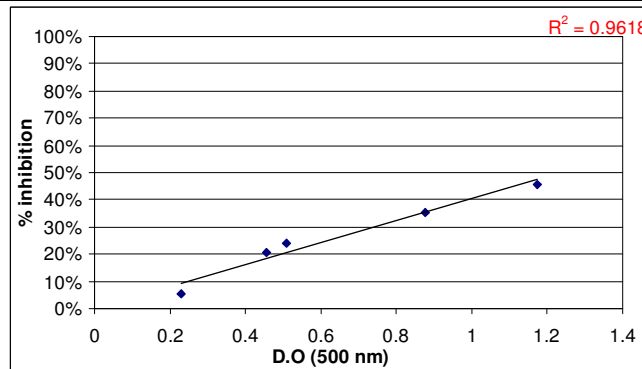


Figure 4 c/ : Corrélation entre la couleur et l'inhibition

Ces figures montrent une augmentation de la couleur de l'eau de trempage au cours du trempage, ainsi qu'une augmentation de son pouvoir inhibiteur. Ce dernier résultat peut correspondre à un relargage continu de molécules inhibitrices à partir du grain d'orge, ou bien à une transformation des molécules relarguées non inhibitrices en d'autres inhibitrices. La *figure 4 c/* montre aussi que la couleur et l'inhibition sont bien corrélées.

En ajoutant les échantillons les couples (D.O, %inh) correspondant aux eaux de trempage industrielles (1^{er} sous-eau) à la *figure 4 c/*, on obtient la *figure 5*, qui montre que la corrélation entre couleur et inhibition reste valable, même en ajoutant des échantillons provenant de différents procédés et de différentes conditions de trempage.

Ces résultats tendent à confirmer l'hypothèse de l'implication de composés colorés dans le phénomène d'inhibition. Or dans l'eau de trempage, les principaux composés colorés sont des polyphénols complexés ou pas avec des polysaccharides ou des peptides. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que ces composés pourraient être responsables de l'inhibition de la germination.

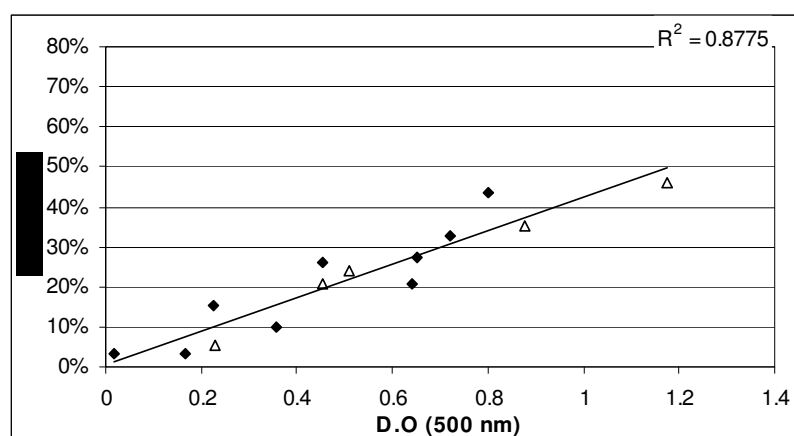


Figure 5 : Relation entre couleur et inhibition en combinant une trempe pilote avec des échantillons d'eaux de trempe industrielles (△ échantillons prélevés pendant une trempe à l'échelle pilote ; ◆ échantillons prélevés pendant des trempes à l'échelle industrielle).

5- Implication des composés phénoliques dans l'inhibition

a- Afin d'étudier l'implication des polyphénols dans le phénomène d'inhibition, les différents composés phénoliques identifiés dans les eaux de trempe industrielles sont utilisés dans des tests de germination. Les résultats de ces tests sont détaillés en *Annexe 4*.

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de différence claire entre les résultats d'un test en présence d'un composé phénolique et ceux d'un test de référence. On remarque aussi qu'un mélange de tous ces composés phénoliques (à 10 ppm chacun) n'inhibe pas la germination de l'orge.

Ces composés phénoliques ne sont donc pas les inhibiteurs de germination recherchés.

b- Essais avec une variété d'orge pauvre en polyphénols (*Caminant*)

Les tests de germination en présence de composés phénoliques n'ayant pas montré d'inhibition, l'utilisation d'une variété d'orge pauvre en polyphénols permet de vérifier l'effet de la concentration des composés phénoliques dans l'orge sur la germination.

Le tableau 6 montre la composition en polyphénols de différentes variétés d'orge.

Tableau 6 : Composition en polyphénols de différentes variétés d'orge.

Variété d'orge	Flavan-ols					Flavanols totaux	Flavonols	Acides phénoliques
	Catéchine	PcB3	PdB3	PCC2	Trimères			
Plaisant	25	82	52	20	7	185	59	12
Alexis	30	55	51	14	7	157	24	8
Caminant	5	2	3	2	1	13	11	1

PC = procyanidine ; Pd = prodelphidine.

Des eaux de trempage provenant du trempage d'une orge de la variété *Scarlett* et d'une orge de la variété *Caminant* ont été testées pour leur pouvoir inhibiteur. Le *tableau 7* montre les résultats d'inhibition obtenus avec les eaux de trempage filtrées à 0,2 µm.

Tableau 7 : Pourcentages d'inhibition obtenus avec une eau de trempage de la variété *Scarlett* et une eau de trempage de la variété *Caminant*.

Eau de trempage de <i>Caminant</i>	1% d'inhibition
Eau de trempage de <i>Scarlett</i>	26% d'inhibition

On remarque que l'eau de trempage de la variété *Caminant* n'est pas significativement inhibitrice.

La variété d'orge pauvre en polyphénols relargue en effet moins de composés phénoliques qu'une variété classique, et il en résulte un pouvoir inhibiteur quasi inexistant dans l'eau de trempage.

Afin de confirmer le rôle des composés phénoliques dans le phénomène d'inhibition, les extraits de polyphénols totaux des deux variétés sont donc utilisés pour des tests d'inhibition, et on obtient 1% d'inhibition avec l'extrait de *Caminant* et 38% avec l'extrait de *Scarlett*. Ce résultat confirme l'hypothèse de l'implication des composés phénoliques dans le phénomène d'inhibition de la germination. Dans ce cas l'extrait phénolique de la variété d'orge *Scarlett* est plus inhibiteur que l'eau de trempage de la même variété, car une quantité plus importante de composés phénoliques est extraite.

Ainsi, on peut conclure à l'implication des composés phénoliques dans l'inhibition de la germination de l'orge. Or l'utilisation d'acides phénoliques purs ou de flavonoïdes purs n'a pas abouti à une inhibition. Ce qui veut dire que ces composés simples ne

sont pas directement responsables de l'inhibition. Par ailleurs, les composés phénoliques que l'orge relargue dans l'eau pendant le trempage subissent des modifications liées à leur pouvoir anti-oxydant. Ainsi, les dérivés de catéchine, principaux composés phénoliques de l'orge, ne sont pas retrouvés dans l'eau de trempage (*Annexe 1: 3/ Composés phénoliques*). Ils sont probablement sous forme oxydée, polymérisée ou complexée avec d'autres molécules (peptides ou polysaccharides).

Ainsi, il est possible d'émettre l'hypothèse de l'implication des réactions ou des produits d'oxydation de ces polyphénols dans le phénomène d'inhibition.

De plus, cette hypothèse est en accord avec les résultats présentés en a-, puisque les composés phénoliques retrouvés dans l'eau de trempage, utilisés pour des tests de germination, sont les composés « natifs » (non oxydés), c'est-à-dire ceux qui ne sont pas impliqués dans les réactions d'oxydation durant la trempage ou la germination.

c- Blocage de l'oxydation des composés phénoliques, par ajout de cystéine

Afin de vérifier cette dernière hypothèse, les réactions d'oxydation sont bloquées grâce à un agent réducteur tel que la cystéine. La *figure 6* montre le mécanisme d'action des polyphénol-oxydases et l'intervention de la cystéine pour bloquer ce mécanisme.

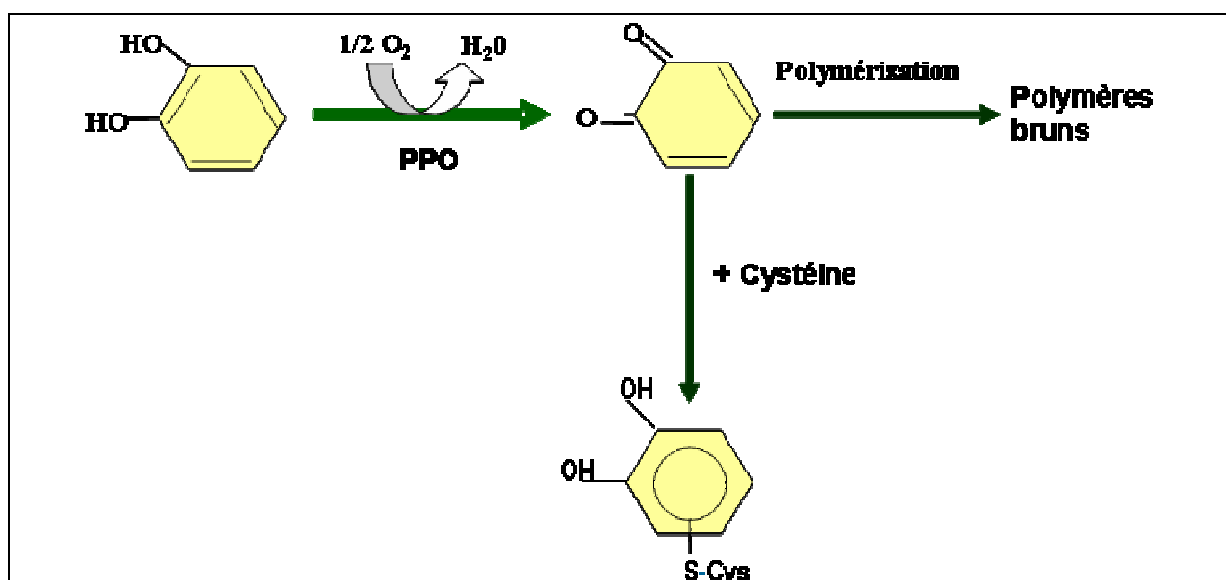


Figure 6 : Oxydation enzymatique et polymérisation des composés phénoliques, et mode d'action de la cystéine.

D'abord, un diphénol est transformé en quinone grâce à la polyphénoloxydase. Les quinones se polymérisent ensuite pour former des tanins (polymères de couleur brune).

La cystéine forme un complexe stable et incolore avec les quinones, empêchant ainsi la formation de polymères bruns.

- Evolution de la germination en fonction de la teneur en cystéine

Afin d'étudier l'impact des réactions d'oxydation des polyphénols sur la germination, la cystéine est ajoutée en excès dans une eau de trempe filtrée, et le mélange est utilisé pour des tests de germination. Les résultats de la germination en 24h sont présentés dans la *figure 7*.

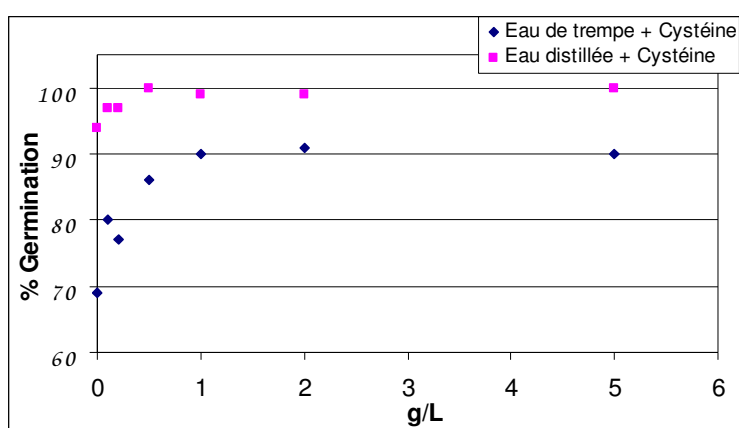


Figure 7 : Pourcentages de germination en 24h en fonction de la concentration de la cystéine dans l'eau pure et dans une eau de trempe.

On remarque qu'au dessus d'une concentration de 1 g/L, on atteint des seuils de germination maxima, aussi bien dans l'eau de trempe que dans l'eau distillée. Ces seuils de germination sont supérieurs à 90% et ne sont pas très distincts des niveaux minimums obtenus sans cystéine, comme le montre le tableau 8.

Tableau 8 : Taux de germination en 24h avec et sans cystéine (5 g/L) dans l'eau distillée et dans l'eau de trempe.

	Eau distillée	Eau de trempe
Sans cystéine	94%	69%
+ 5 g/L cystéine	100%	90%

Afin d'avoir des résultats plus discriminants, la durée des tests de germination est réduite à 18h. Les résultats sont représentés *figure 8*. On remarque sur cette figure

que le seuil de germination maximum est atteint à la même concentration de cystéine, à savoir 1 g/L. On remarque de plus que dans cet essai il y a une différence plus nette entre le seuil atteint dans l'eau de trempe + cystéine (66%) et celui atteint dans l'eau pure + cystéine (97%).

Ainsi, la cystéine a permis 14,1% d'amélioration de la germination dans l'eau distillée et 43,5% d'amélioration dans l'eau de trempe. L'impact de la cystéine est donc plus important dans l'eau de trempe que dans l'eau distillée.

En fait, dès que les inhibiteurs sont formés ou relargués dans l'eau distillée, ils sont bloqués par la cystéine. La différence est donc faible entre l'eau distillée sans cystéine et l'eau distillée avec cystéine. Par contre, dans l'eau de trempe, les inhibiteurs sont déjà présents en concentration importante au début du test de germination, donc le blocage de leur action se traduit par une plus nette amélioration de la germination.

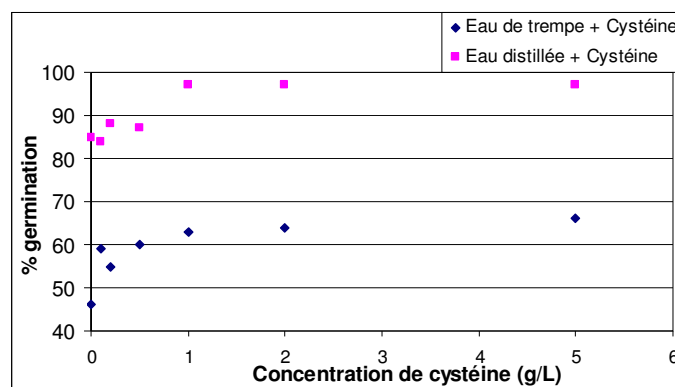


Figure 8 : Pourcentages de germination en 18h en fonction de la concentration de la cystéine dans l'eau pure et dans une eau de trempe.

Ces résultats de germination en présence de cystéine confirment bien l'implication de réactions d'oxydation dans le phénomène d'inhibition de la germination. La relation entre ces réactions d'oxydation et la formation de couleur est confirmée par la *figure 9*, qui montre que lorsqu'on laisse une eau de trempe à l'air libre, sa couleur s'intensifie au cours du temps ; par contre, en y ajoutant de la cystéine, la couleur reste stable.

Enfin, en ajoutant de la cystéine au début de la trempe, on constate que l'eau de trempe résultante est moins inhibitrice qu'une eau de trempe ne contenant pas de cystéine (*tableau 9*).

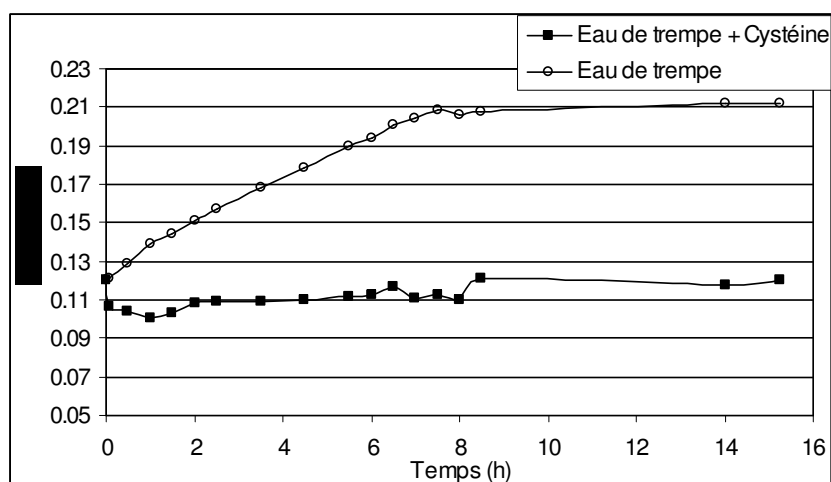


Figure 9 : Evolution de la couleur d'une eau de trempage avec et sans ajout de cystéine.

Tableau 9 : Taux de germination obtenus avec des eaux de trempage avec ou sans ajout de cystéine au début du trempage:

	Taux de germination à 24 h
A/ Sans Cystéine	86%
B/ Avec Cystéine	97%

Pour récapituler, les résultats obtenus avec le fractionnement des eaux de trempage, la corrélation trouvée entre la couleur et l'inhibition, l'extraction des polyphénols de l'orge et de l'eau de trempage, l'ajout de cystéine, l'utilisation d'orge pauvre en polyphénols, permettent de conclure que l'inhibition de la germination est provoquée par les réactions d'oxydation et de polymérisation des composés phénoliques dont le poids moléculaire apparent est supérieur à 500Da.

6- Implication des enveloppes

L'ensemble péricarpe-testa, situé juste en dessous de la paroi externe du grain d'orge, est connu pour être semi-perméable : il est perméable à l'eau mais constitue une barrière pour la plupart des solutés ; cette imperméabilité diminue au cours du trempage. Par ailleurs, il faut rappeler que la testa contient beaucoup de substances phénoliques, telles que les pro-anthocyanidines (tannins condensés). Il est donc possible que les enveloppes du grain d'orge constituent le siège de réactions chimiques et/ou de transferts à l'origine des phénomènes d'inhibition.

Afin d'étudier l'effet des enveloppes sur l'inhibition de la germination, une variété d'orge nue (sans enveloppe) a été utilisée. Le tableau 10 montre les résultats de

germination d'orge nue et d'orge *Scarlett*, effectués avec des eaux de trempes des deux variétés.

D'une part, on remarque que pour les tests de référence, les deux variétés présentent une germination comparable (93% et 94%). D'autre part, on remarque que les eaux de trempes issues des deux variétés sont fortement inhibitrices de la germination de l'orge de la variété *Scarlett*. Cependant, ces mêmes eaux de trempes ne sont pas significativement inhibitrices de la germination de l'orge nue.

Ce résultat renforce l'hypothèse de l'implication de l'enveloppe du grain dans le mécanisme d'inhibition de la germination.

Tableau 10 : Tests de germination d'orge de la variété *Scarlett* et de la variété d'orge nue, effectués avec des eaux de trempes des deux variétés.

Variété d'orge	Eau de trempes	% grains germés	% inhibition
Référence <i>Scarlett</i>	Eau distillée	93	-
Référence Orge nue	Eau distillée	94	-
<i>Scarlett</i>	Eau de trempes de <i>Scarlett</i>	41	55
	Eau de trempes d'orge nue	44	52
Orge nue	Eau de trempes de <i>Scarlett</i>	89	5
	Eau de trempes d'orge nue	90	4

7- Nature des réactions d'oxydation mises en oeuvre

Les résultats présentés dans la partie précédente (5-) ont permis de démontrer l'implication des réactions d'oxydation des composés phénoliques dans le phénomène d'inhibition. Or les réactions d'oxydation peuvent être chimiques (catalysées par des métaux tels que le cuivre ou le zinc) ou enzymatiques (catalysées par des polyphénol-oxydases (PPO) ou des peroxydases).

Afin d'identifier la nature des réactions d'oxydation responsables de l'inhibition, des essais d'inactivations enzymatiques et de capture de métaux ont été effectués.

L'inactivation irréversible des PPO par ébullition de l'eau de trempes pendant 30 secondes (Lerici *et al.*, 2000) a permis d'obtenir une eau de trempes beaucoup moins inhibitrice que l'eau de trempes contenant des PPO actives (*tableau 11*). Ceci démontre la contribution des PPO dans le mécanisme d'inhibition. Cependant, l'inactivation des PPO n'annule pas totalement le pouvoir inhibiteur de l'eau de trempes. D'autres réactions que les oxydations par les PPO sont donc impliquées.

En effet, il existe d'autres types d'oxydoréductases que les PPO : il est possible de retrouver dans l'eau de trempe des peroxydases, qu'on peut irréversiblement dénaturer par acidification de l'eau de trempe à pH 2,5 (Lemos *et al.*, 2000). Dans le *tableau 11* on remarque cependant que l'inactivation des peroxydases ne modifie pas le pouvoir inhibiteur des eaux de trempe.

Ainsi, les réactions enzymatiques contribuant à l'inhibition de la germination mettent en œuvre des PPO et non pas des peroxydases.

Tableau 11 : Taux de germination et d'inhibition avant et après inactivation des PPO et des peroxydases (ET f = Eau de Trempe filtrée).

	% germination	% inhibition
Référence	79	
Eau de trempe filtrée	42	47%
Référence PPO	79	0%
PPO inactivées	56	29%
Référence peroxydases	79	0%
Peroxydases inactivées	42	47%

(Référence PPO = eau distillée bouillie pendant 30 secondes ; Référence peroxydases = eau distillée acidifiée à pH 2,5)

Cependant, il y a une inhibition résiduelle dont les PPO ne sont pas responsables.

L'ajout d'EDTA dans une eau de trempe inhibitrice à 35% permet de ramener le taux d'inhibition à 1%. En effet, l'EDTA permet de capturer les cations bivalents, ce qui bloque les réactions d'oxydation chimique. Cependant, les cations bivalents peuvent aussi être impliqués dans les réactions d'oxydation enzymatiques.

Ainsi, en stoppant à la fois les oxydations chimiques et enzymatiques, on élimine totalement l'inhibition de la germination (pouvoir inhibiteur = 0%). De plus, la *figure 10* montre que l'ajout d'EDTA permet aussi de diminuer l'intensité de la couleur de l'eau de trempe, ce qui confirme le blocage des réactions d'oxydation et de polymérisation des polyphénols.

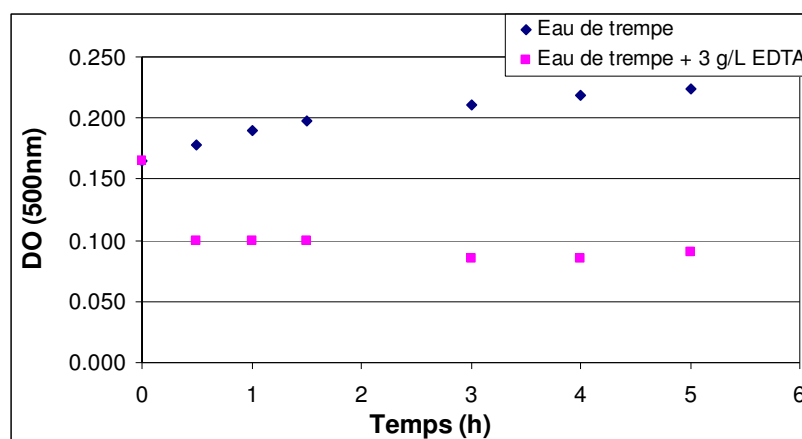


Figure 10 : Evolution de la couleur d'une eau de trempe au cours du temps, avec et sans ajout d'EDTA.

En conclusion, l'inhibition de la germination de l'orge par l'eau de trempe est due aux réactions d'oxydations aussi bien chimiques qu'enzymatiques des composés phénoliques présents dans l'eau. Ce phénomène semble avoir pour siège l'enveloppe du grain d'orge, puisque la germination des grains d'orge nue n'est pas inhibée par des eaux de trempe fortement inhibitrices pour la variété *Scarlett*.

Ces réactions contribueraient donc au renforcement des enveloppes du grain, qui rendrait plus difficile le piquage de celui-ci (sortie des radicules de l'enveloppe).

Chapitre III- Traitement des eaux de trempes à l'échelle de laboratoire

De la caractérisation des eaux de trempes et des inhibiteurs qui y sont présents, il ressort une nécessité de traitement de ces eaux avant leur éventuelle réutilisation dans le procédé de maltage. Un couplage entre différentes techniques de traitement est souvent nécessaire pour atteindre une qualité satisfaisante de l'eau traitée. Dans le cas présent, il est possible d'envisager un couplage entre des techniques de traitement physico-chimique, biologique et membranaire.

Les essais de traitements physico-chimiques et biologiques à l'échelle de laboratoire permettent d'étudier la diminution de la DCO au cours de ces traitements. On peut définir deux niveaux de qualité à atteindre :

- un premier objectif consiste à obtenir, grâce au procédé de traitement à développer, une eau dont la qualité ne nuit pas au procédé de maltage en cas de recyclage ;
- un second objectif, plus strict, consiste à obtenir une eau de qualité potable selon les critères fixés par la Directive européenne 98/83/CE (*Annexe 7*).

1- Traitement en réacteur discontinu

a- Traitements physico-chimiques

Un traitement de coagulation – floculation a été effectué sur les eaux de trempes, afin de définir les taux d'élimination de la DCO possibles atteindre.

Tableau 12 : Plan d'expérience factoriel complet pour le traitement de l'eau de trempes par coagulation – floculation avec le chlorure de fer III.

	FeCl ₃ mg/L	pH	Agitation (rpm)	Durée (min)	% d'élimination de la DCO
1	5	5	40	20	13%
2	5	5	40	60	15%
3	5	5	80	20	15%
4	5	5	80	60	19%
5	5	6	40	20	29%
6	5	6	40	60	36%
7	5	6	80	20	24%
8	5	6	80	60	37%
9	500	5	40	20	36%
10	500	5	40	60	37%
11	500	5	80	20	4%
12	500	5	80	60	38%
13	500	6	40	20	20%
14	500	6	40	60	14%
15	500	6	80	20	30%
16	500	6	80	60	70%

Le FeCl_3 a été utilisé comme agent de coagulation – floculation. L'effet de la concentration de FeCl_3 a été testé, ainsi que l'effet du pH, de la vitesse d'agitation et du temps de contact.

Afin d'étudier l'influence de ces paramètres sur l'élimination de la DCO, un plan d'expérience factoriel complet a été suivi, avec les niveaux bas et haut indiqués dans le *tableau 12*.

La DCO initiale étant variable pour ces expériences, la réponse retenue est donc le pourcentage de DCO éliminée, plutôt que la DCO finale de l'échantillon filtré. Les résultats d'élimination de la DCO n'ont pas permis l'élaboration d'un modèle reliant les paramètres étudiés à la réponse (taux d'élimination de la DCO). En revanche, on constate que le taux d'élimination de la DCO le plus élevé est obtenu avec la concentration la plus élevée de FeCl_3 , le niveau haut de pH, la vitesse et le temps d'agitation les plus élevés. En fait, ces conditions ont permis d'éliminer 70% de la DCO.

Cependant, la DCO résiduelle demeure élevée : autour de 1 g/L, ce qui signifie que ce traitement n'est pas suffisant. De plus, l'utilisation du chlorure de fer donne des eaux traitées avec une forte teneur résiduelle en Fer.

Enfin, ce traitement est relativement coûteux ; en particulier, plus la DCO initiale est élevée, plus la quantité de chlorure de fer à utiliser est importante.

Ainsi, il est plus avantageux de recourir à des traitements moins coûteux, tels que les traitements biologiques.

b- Traitement biologique

Le traitement aérobie d'une eau de trempe en réacteur discontinu à 25°C et pH7 donne la cinétique de croissance représentée dans la *figure 11*. Cette figure montre que la culture en discontinu permet d'atteindre une concentration maximale de biomasse de l'ordre de 0,6 g/L.

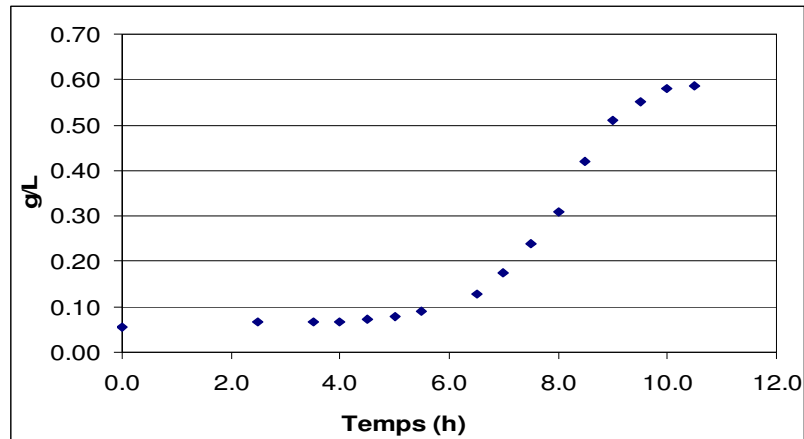


Figure 11: Croissance des micro-organismes en culture discontinue

-  limination de la DCO

En même temps que la croissance des micro-organismes dans l'eau de trempe, les substances organiques solubles sont consomm es. Cette consommation se traduit par une diminution de la DCO soluble. On remarque sur la *figure 12* que la DCO soluble initiale est de 3,2 g/L. Au maximum de croissance de la biomasse, la DCO consomm e est de l'ordre de 1 g/L, ce qui donne une DCO résiduelle de 2,2 g/L. Mais on constate que pendant la phase de déclin de la biomasse, la DCO soluble continue de baisser, pour atteindre un niveau minimum de 0,7 g/L.

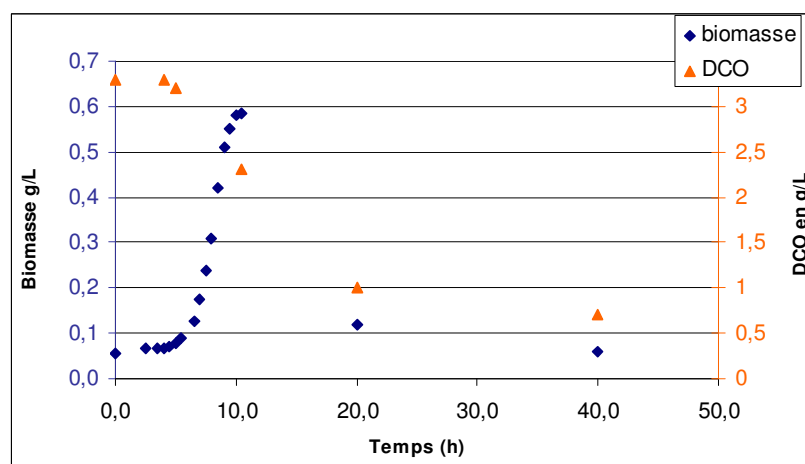


Figure 12: Evolution de la biomasse et de la DCO au cours d'un traitement biologique en réacteur discontinu.

Même si 78% de la DCO soluble sont  limin es, la DCO résiduelle est encore trop  lev e, surtout en comparaison avec un objectif de potabilité de l'eau traitée (30 mg/L).

Cependant, ces essais préliminaires permettent de constater la possibilité d'épuration de l'eau grâce au traitement biologique. Ce traitement biologique peut avoir de meilleures performances, si les conditions opératoires sont modifiées : traitement en réacteur continu, ou en bioréacteur à membranes.

- **Elimination des toxines T2 et HT2 :**

Les performances du traitement biologique sont aussi testées pour l'élimination de produits toxiques, dont la présence dans les eaux de trempage peut affecter la qualité sanitaire du malt. Les toxines T2 et HT2 sont les nouvelles mycotoxines retrouvées dans les récentes récoltes d'orges de printemps, et possédant une forte toxicité. Elles sont produites par des champignons de l'espèce *Fusarium sporotrichioides*. Les structures respectives de ces deux mycotoxines sont représentées dans la figure 13.

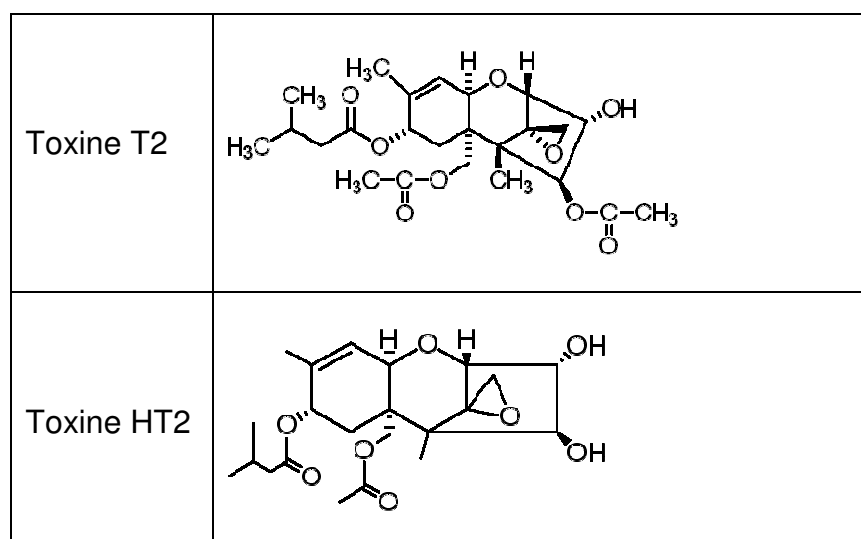


Figure 13 : Structures chimiques des mycotoxines T2 et HT2.

Sur le lot d'orge de la variété *Scarlett* (récolte 2005) utilisé pour les essais de biodégradation des mycotoxines, les concentrations sont de 30 µg/kg pour la toxine T2 et 50 µg/kg pour la toxine HT2.

En trempant 1 kg d'orge dans 1,5 L d'eau pendant 14h et à 18°C, on récupère 1L d'eau de trempage.

Les concentrations des toxines T2 et HT2 dans cette eau de trempage sont respectivement de 1 ppb et 20 ppb.

Deux explications sont possibles pour cette différence de concentration entre l'eau et l'orge : soit les mycotoxines ne passent pas entièrement dans l'eau, soit elles commencent à être dégradées dès qu'elles sont dans l'eau, donc en fin de trempage on retrouverait déjà des produits d'oxydation ou de dégradation de ces mycotoxines.

Un essai de traitement en discontinu est effectué avec un 1L de cette eau de trempage, comme précédemment. La croissance de la biomasse est suivie au cours du temps, et les concentrations finales (au maximum de croissance de la biomasse) des toxines T2 et HT2 sont déterminées. La biomasse suit la même cinétique de croissance que précédemment (*Figure 12*).

La concentration de la toxine T2 passe de 1 ppb à 0,02 ppb à $t = 10\text{h}$, ce qui correspond à une élimination de 98%.

La concentration de la toxine HT2 passe de 20 ppb à 0,33 ppb à $t = 10\text{h}$, soit 98% d'élimination.

Cette élimination peut consister soit en une adsorption des toxines sur les parois bactériennes ou leur accumulation à l'intérieur des cellules, soit en une réelle biodégradation de ces molécules. Dans les deux cas, ces résultats démontrent que dans l'eau de trempage traitée et filtrée, la quasi-totalité de ces deux mycotoxines est éliminée, ce qui signifie que le recyclage de l'eau de trempage traitée, dans le procédé de maltage, ne présentera pas de risque de toxicité associé à ces mycotoxines.

2- Traitement en Bio-Réacteur à Membrane

Le traitement des eaux de trempage en bioréacteur à membrane permet d'atteindre des teneurs en biomasse plus élevées et d'améliorer ainsi les conditions d'épuration biologique de l'eau.

Le traitement a été effectué en appliquant un taux de dilution hydraulique de $0,1\text{ h}^{-1}$ et un débit de purge de 30 ml/h.

a- Suivi de la biomasse

Après 50h, la concentration de la biomasse atteint un seuil de 3,7g/L, mais augmente ensuite pour atteindre 8 g/L autour de $t = 100\text{h}$. Cette seconde phase d'augmentation est due à l'apport, avec l'alimentation en eau de trempage, de particules en suspension.

Ce traitement permet de déceler l'amélioration de l'épuration de l'eau par rapport aux essais en réacteur discontinu: ainsi, la biomasse atteint bien une concentration plus élevée (en tenant compte du premier seuil de 3,7 g/L), ce qui permettrait ainsi une meilleure épuration de l'eau.

b- Suivi de la qualité de l'eau

Les résultats d'analyses du perméat de BRM sont présentés dans la figure 14. On remarque qu'au cours du traitement, il y a une diminution de la DCO soluble de plus de 90% (de 2,7 à <0,25 g/L en environ 50h) qui reste néanmoins supérieure à la limite fixée par la directive européenne (30 mg/L) pour atteindre la potabilité.

On remarque aussi qu'à l'état stationnaire il y a une très bonne élimination des acides organiques (de 3 g/L environ à < 0,15 g/L, soit plus de 95% d'élimination), des sucres, des métaux (tous inférieurs aux limites fixées par la directive européenne, sauf le Mn) et de l'azote total (de 47 à < 8 mg/L, soit plus de 83% d'élimination). Cependant, on remarque qu'il y a une élimination médiocre du phosphore. En fait, celui-ci ne s'adsorbe pas sur la biomasse, contrairement aux métaux. De plus, le faible débit utilisé pour la pompe de purge n'a pas permis un bon renouvellement des boues et donc une meilleure élimination du phosphore.

La teneur en phosphore reste donc trop élevée, en comparaison avec la limite recommandée (mais non encore imposée) par la directive européenne (0,4 ppm).

Enfin, le traitement des eaux de trempes en BRM a permis une excellente élimination du pouvoir inhibiteur de l'eau (figure 15), qui passe de 11,5% à 2% environ à l'état stationnaire.

Ainsi le traitement des eaux de trempes en bioréacteur à membrane a permis une nette amélioration de la qualité de l'eau, en ramenant la teneur en azote total et en métaux en-dessous des limites fixées par la loi, mais surtout en éliminant quasi-totalement le pouvoir inhibiteur des eaux de trempes. Ce paramètre est le plus décisif car c'est de lui que dépendra la possibilité de recycler les eaux traitées dans le procédé de maltage. Des taux d'inhibition aussi bas permettent de prédire l'absence d'impact négatif des eaux traitées recyclées, sur le procédé de maltage et donc sur le produit final.

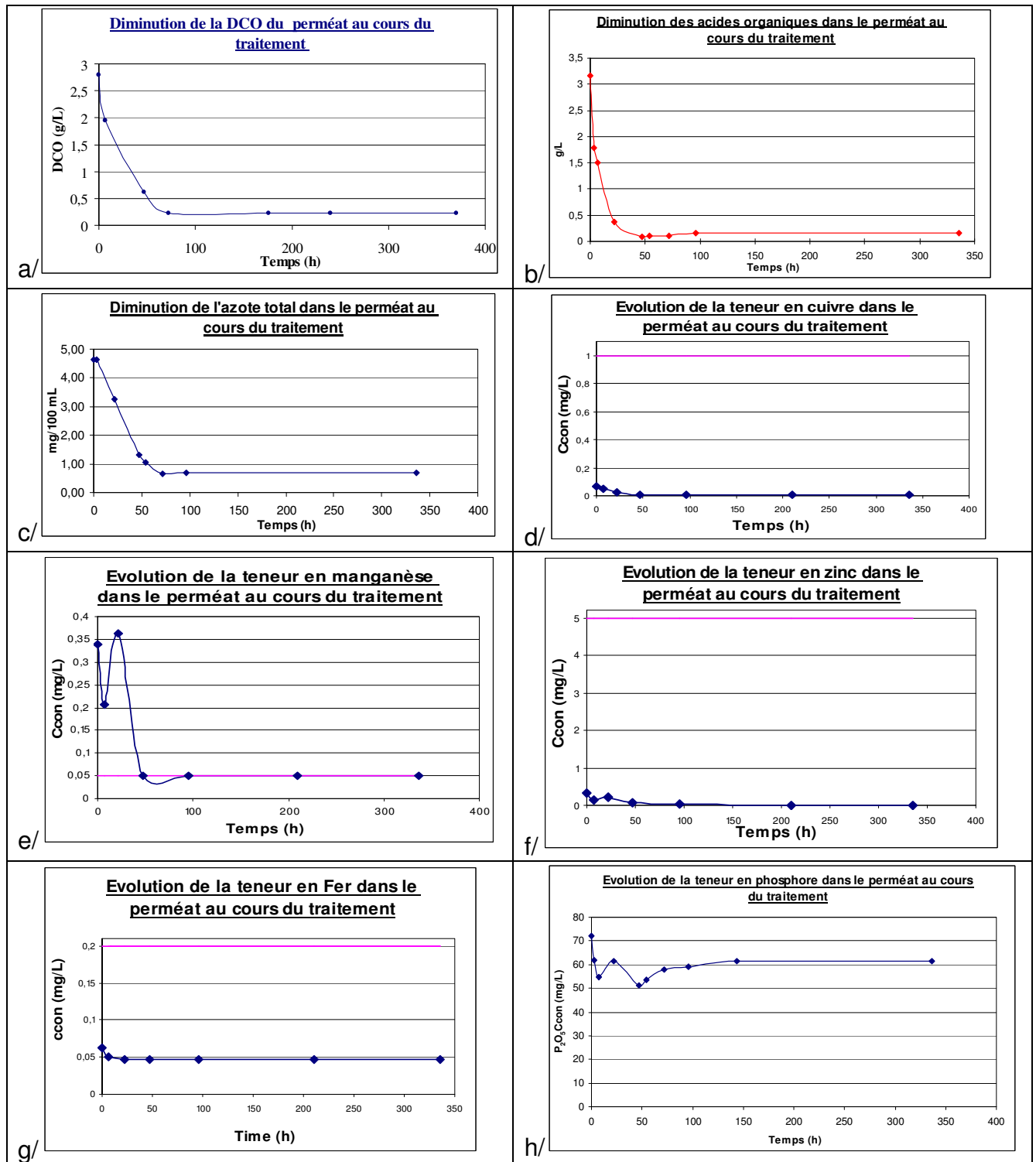


Figure 14 : Evolution de différentes caractéristiques du perméat de BRM au cours du traitement (a/ DCO ; b/ Acides organiques totaux ; c/ Azote total ; d/ Teneur en cuivre ; e/ Teneur en manganèse ; f/ Teneur en Zinc ; g/ Teneur en Fer ; h/ Teneur en phosphore)

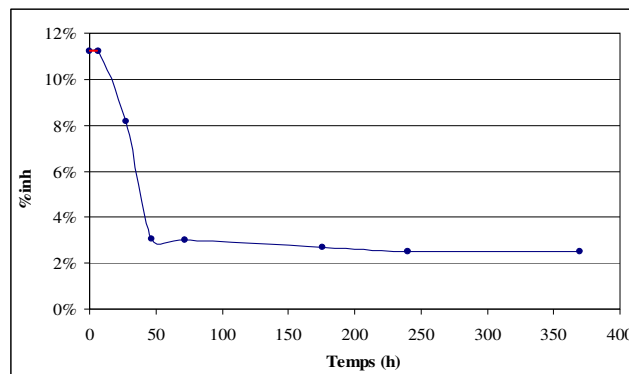


Figure 15 : Evolution du pouvoir inhibiteur du perméat de BRM au cours du traitement.

Mais si l'eau recyclée dans le procédé doit être de qualité potable, il faudra alors améliorer les résultats surtout pour la DCO résiduelle, le phosphore et la couleur.

Des traitements complémentaires doivent donc être utilisés, tels que le charbon actif, l'osmose inverse ou la nanofiltration.

3- Traitements complémentaires

a- Traitement par charbon actif

L'utilisation du charbon actif permet une bonne élimination des composés colorés, et la rétention de certains métaux lourds.

Un travail préliminaire a été effectué pour étudier la cinétique d'élimination de la couleur par le charbon actif à une température de 25°C, et avec différents ratios eau/charbon (de 0,1 à 0,5% de charbon).

Les figures suivantes (14 et 15) représentent l'équilibre atteint par la répartition des composés colorés entre le milieu liquide et le charbon, ainsi que la cinétique d'adsorption de ces composés.

On remarque qu'avec 0,5% de charbon actif en poudre, l'équilibre est atteint au bout de 50 minutes environ. On remarque de plus que plus de 97% de la couleur est éliminée par ce procédé.

De plus, ce traitement, appliqué au perméat de microfiltration du BRM, a permis de ramener les teneurs de Cuivre et de Zinc à des valeurs < 10 ppb, de ramener la teneur fer au dessous de la limite fixée par la directive européenne (25 ppb), d'obtenir une faible concentration de Mn (120 ppb) et de diminuer la DCO de moitié

(de 0,2 à 0,1 g/L). Cependant, la teneur en phosphore n'a pas été modifiée par ce traitement.

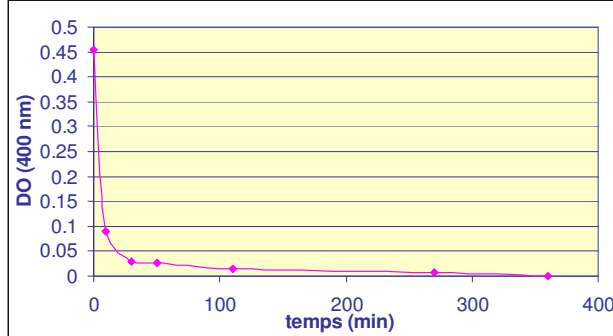


Figure 14 : Cinétique d'élimination de la couleur à partir du perméat de BRM avec 0.5% C.A à 25 °C

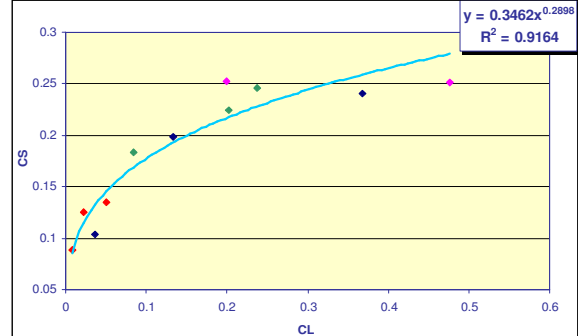


Figure 15 : Isotherme d'adsorption des composés colorés du perméat de BRM sur le C.A à 25 °C

CS = couleur dans le solide (charbon actif) ; CL = couleur dans le liquide (eau de trempe)

On remarque qu'avec 0,5% de charbon actif en poudre, l'équilibre est atteint au bout de 50 minutes environ. On remarque de plus que plus de 97% de la couleur est éliminée par ce procédé.

De plus, ce traitement, appliqué au perméat de microfiltration du BRM, a permis de ramener les teneurs de Cuivre et de Zinc à des valeurs < 10 ppb, de ramener la teneur fer au dessous de la limite fixée par la directive européenne (25 ppb), d'obtenir une faible concentration de Mn (120 ppb) et de diminuer la DCO de moitié (de 0,2 à 0,1 g/L). Cependant, la teneur en phosphore n'a pas été modifiée par ce traitement.

b- Traitement par osmose inverse

Ce traitement, appliqué au perméat de microfiltration du BRM, a permis d'obtenir une eau d'excellente qualité:

- eau incolore;
- DCO du perméat < 30 mg/L;
- Très faibles concentrations de métaux (Fe, Zn, Mn, Cu < 10 ppb)
- La teneur en phosphore total est ramenée à 0,5 ppm.

Ainsi, le perméat d'osmose inverse est de qualité potable. De plus, les performances de ce traitement dépendent en partie de la pression appliquée. Ainsi, il suffirait de procéder à une légère augmentation de la pression pour obtenir une eau encore plus pure ou alors utiliser des membranes avec des caractéristiques différentes.

Mais l'inconvénient de cette technique consiste justement dans l'utilisation de pressions élevées, qui engendre des coûts élevés de traitement.

c- Traitement par nano-filtration

L'étude de la nature des inhibiteurs de la germination a permis de constater qu'une nanofiltration permettait d'éliminer totalement les composés colorés d'une eau de trempe. Ce traitement a été effectué avec la même membrane de nanofiltration avec une taille des pores moyenne de 500 Da, sur le perméat de microfiltration du BRM. Il a permis d'améliorer la qualité de ce dernier:

- eau incolore;
- DCO à 30 mg/L;
- Très faibles concentrations de métaux (Fe, Zn, Mn, Cu < 10 ppb);
- Teneur en phosphore total à 1,23 ppm ;

Ainsi, mise à part la concentration résiduelle de phosphore, qui dépasse la limite recommandée par la directive européenne, les critères de potabilité sont atteints grâce à ce traitement, qui est en plus moins coûteux que le traitement par osmose inverse.

Conclusion sur les traitements complémentaires:

Les différents traitements complémentaires, effectués sur le perméat de BRM, ont permis une nette amélioration de la qualité de l'eau. Ainsi, la nanofiltration et l'osmose inverse ont permis d'obtenir une eau répondant aux critères de potabilité, sauf pour la DCO qui était à la limite de la potabilité, et le phosphore qui demeurait légèrement en dessus de la limite recommandée, dans le cas de la nanofiltration.

Le traitement par charbon actif a aussi permis une amélioration de la qualité de l'eau, mais sans permettre d'atteindre les critères de potabilité.

Cependant, il est intéressant d'étudier l'impact de ces différentes eaux sur la qualité du malt, si elles étaient recyclées dans le procédé. En fait, si la qualité du malt n'est pas améliorée grâce à ces traitements complémentaires, ces derniers constitueraient alors des coûts supplémentaires inintéressants.

4- Etude de la qualité des malts obtenus en utilisant différentes eaux traitées

Les eaux issues des différents traitements complémentaires (3-) sont utilisées dans l'étape de trempage pour des essais de micromaltages. Un test de référence est effectué avec de l'eau potable.

Les résultats d'analyses des malts ainsi obtenus sont présentés en Annexe 5 a.

Globalement, on remarque que tous les malts obtenus sont de qualité satisfaisante. Cependant, le malt obtenu par l'eau traitée par osmose inverse a une qualité légèrement meilleure, en comparaison avec celui issu du recyclage d'eau traitée par NF et celui issu de l'utilisation d'eau du réseau. Ces deux derniers échantillons ont d'ailleurs des qualités comparables.

La meilleure qualité du malt obtenu en utilisant l'eau osmosée en trempage, s'explique par la meilleure qualité de cette eau par rapport à l'eau du réseau. En effet, cette dernière est plus riche en métaux et en minéraux, ce qui peut engendrer une légère différence dans la vitesse de prise d'eau et de relargage des substances solubles par le grain. De plus, l'eau traitée par nanofiltration ayant donné un malt de qualité comparable avec la référence, il est donc possible de conclure que ce traitement est suffisant pour l'obtention d'un malt de qualité satisfaisante, et que le traitement complémentaire par osmose inverse engendre des coûts supplémentaires sans être intéressant pour le procédé. Ce traitement est néanmoins indispensable si l'objectif fixé est celui de la potabilité de l'eau.

5- Essais de maltages avec des eaux ayant différents taux d'inhibition

Des eaux de trempes ayant différents taux d'inhibition ont été utilisées en micromaltages, à l'étape de trempes. Les différents taux d'inhibition ont été obtenus en diluant l'eau de trempes avec de l'eau traitée en bioréacteur à membrane:

- eau de trempes: 49% d'inhibition;
- perméat de microfiltration du BRM: 2,7%;
- eau de trempes + perméat de BRM (V/V = 1/1): 28% d'inhibition;
- l'eau utilisée pour le maltage de référence: eau du réseau non inhibitrice.

Les résultats d'analyse des malts ainsi obtenus, sont présentés en Annexe 5 b-.

On remarque d'abord que l'eau de trempes (49% d'inhibition), réutilisée pour le trempage de l'orge, provoque une détérioration significative de la qualité du malt, en comparaison avec le malt de référence. Ceci confirme les résultats précédemment obtenus (I- 2/).

L'eau de trempes diluée par une même quantité de perméat de BRM, utilisée en trempes, a permis d'obtenir un malt de qualité intermédiaire entre celle du malt de référence et celle du malt obtenu avec l'eau de trempes.

On remarque ensuite que l'eau du réseau (0% d'inhibition) et le perméat de BRM (2,7% d'inhibition) permettent d'obtenir des malts de qualités comparables.

Ainsi, on peut conclure que la qualité du malt s'améliore avec l'amélioration de la qualité de l'eau utilisée en trempes (eau plus pure et moins inhibitrice). De plus, cette étude montre qu'une eau de trempes traitée par BRM et ayant un pouvoir inhibiteur de l'ordre de 2,5% ne semble pas avoir d'impact négatif sur le procédé de maltage.

Afin d'avoir une comparaison plus fine entre les malts obtenus avec l'eau du réseau et avec l'eau traitée par BRM, des essais de filtration tépral sont effectués. Les résultats d'analyses sont présentés dans le tableau 13.

On remarque, d'après ces résultats de filtrations Tépral, qu'il y a des différences entre les deux échantillons. Ces différences concernent essentiellement l'azote aminé libre et les pentes (les vitesses) de filtration.

Ainsi, on peut conclure que l'eau traitée par BRM ne donne pas un malt de qualité parfaitement équivalente à celui obtenu avec l'eau du réseau. Cependant, ces résultats doivent être confirmés à l'échelle industrielle et à long terme (après

plusieurs cycles de traitement–recyclage ; essais de répétabilité). Enfin, il faut vérifier si ces malts donnent des bières de qualité équivalentes, malgré ces différences au niveau des paramètres de filtration tépral.

Tableau 13 : Paramètres de filtration Tépral pour un malt de référence et un malt obtenu avec le perméat de BRM :

	Référence	Perméat
Poids filtré (g)	408,5	409,5
Durée totale de filtration	00:11:20	00:14:15
Temps pour filtrer 350g	00:10:25	00:11:28
Densité du moût	1,08	1,08
Humidité (%)	4,4	4,4
Rendement (%)	81,4	81,7
Viscosité (mPa.s)	1,89	1,96
Azote aminé libre (mg/L)	201	170
pente b	46,6	35,3
pente c	72,5	43,2
pH	5,92	5,96

Conclusions sur les essais de traitement et de recyclage des eaux de trempe à l'échelle de laboratoire:

- Le traitement des eaux de trempe par bioréacteur à membrane a permis une très nette amélioration de la qualité de l'eau. En fait, ce traitement a permis d'obtenir un perméat qui n'a aucun impact négatif sur la germination de l'orge: les tests de germination avec cette eau ont donné des résultats équivalents à l'eau distillée. De plus, ce traitement a permis d'obtenir un perméat à faible DCO (<0,2 g/L). Il a aussi permis de ramener les concentrations de plusieurs métaux lourds en dessous des limites fixées par la directive européenne.

- Ensuite, le malt obtenu avec l'eau traitée a une qualité comparable à celle du malt de référence, obtenu avec l'eau du réseau. Seule une faible différence a été remarquée au niveau des paramètres de filtration tépral.

- Des traitements complémentaires ont permis d'améliorer encore plus la qualité de l'eau. Ainsi, on a remarqué une élimination de la couleur et une baisse de la DCO et de la teneur en métaux lourds :

- ces traitements – nanofiltration, osmose inverse et charbon actif – sont efficaces pour l'élimination de la couleur et la diminution de la DCO ;

- la nanofiltration et l'osmose inverse donnent une eau de qualité potable ;

- Le choix de l'une de ces techniques de traitement complémentaire dépendra de la qualité de l'eau nécessaire à l'obtention d'un malt de bonne qualité, mais aussi des coûts de traitement, et de l'obligation ou non (d'un point de vu légal) de respecter les critères de potabilité. L'extrapolation de ce procédé de l'échelle de laboratoire à l'échelle pilote permettra d'avoir une meilleure estimation des performances et des coûts de traitement.

Chapitre IV- Traitement et recyclage des eaux de trempe à l'échelle pilote

Afin de confirmer les résultats obtenus à l'échelle de laboratoire, pour la qualité de l'eau traitée par BRM, osmose inverse et charbon actif, ainsi que pour la qualité des malts obtenus après recyclage de ces eaux, des essais de traitement et de recyclage des eaux de trempe sont effectués à l'échelle pilote. Ces essais sont effectués en utilisant deux systèmes de traitement, qui diffèrent essentiellement par les membranes de filtration utilisées :

- le premier système, qui sera désigné par *Sys1*, utilise des membranes de microfiltration (0,2 μm) immergées.
- le second système, qui sera désigné par *Sys2*, utilise des membranes d'ultrafiltration (0,02 μm) externes ;

La différence de taille des pores des membranes utilisées se traduira par une meilleure rétention des substances solubles avec le système *Sys2* qu'avec le système *Sys1*.

1- Analyse des eaux traitées par les systèmes *Sys1* et *Sys2*

Afin d'étudier et de comparer la capacité des deux systèmes à traiter et purifier les eaux de trempe, différentes analyses ont été effectuées sur les eaux usées ainsi que sur les eaux traitées par BRM, osmose inverse ou charbon actif.

Les résultats d'analyses sont présentés en Annexe 6 a-.

- On remarque d'abord que toutes les eaux de trempe issues de la première phase sous-eau ont une conductivité supérieure à la limite imposée par la directive européenne (1 mS/cm). Les eaux provenant de la seconde phase sous-eau ont quant à elles des conductivités proches du critère de potabilité.

Après traitement des eaux provenant de la première phase sous-eau, on remarque une nette diminution de la conductivité des eaux traitées, pour les deux systèmes. Cependant, ces valeurs de conductivité demeurent supérieures à la limite légale pour

l'eau potable. Le traitement des eaux issues des secondes phases sous-eau voient leur conductivité augmenter, à cause de la forte teneur en ions dans le bioréacteur.

Ensuite, on remarque qu'au cours des traitements successifs, la conductivité des eaux traitées augmente, dans les deux systèmes, à cause de l'accumulation d'ions dans le bioréacteur, jusqu'au traitement par osmose inverse. Après ce traitement, on remarque une nette diminution de la conductivité de l'eau traitée, qui redescend en dessous de la limite de potabilité.

Enfin, le traitement par charbon actif n'a pas permis de diminuer la conductivité par rapport à celle de l'eau traitée par BRM.

Ces résultats soulèvent la question du nombre de recyclages successifs d'eau traitée par BRM, au-delà duquel la conductivité atteindrait un seuil critique pour le maltage, mais aussi pour le bon fonctionnement du bioréacteur.

- On remarque la même tendance pour la couleur des eaux de trempes traitées et non traitées. Cependant, dans ce cas, le traitement par charbon actif a été efficace : les eaux ainsi traitées par BRM+charbon actif sont incolores.

- L'évolution de la matière sèche suit aussi la même tendance que la conductivité, sans diminution supplémentaire par le charbon actif.

- L'élimination de la DCO par les deux systèmes n'a pas donné des résultats comparables. En fait, les eaux de trempes traitées par le système *Sys1* ont une DCO de l'ordre de 200 mg/L tandis que les eaux traitées par le système *Sys2* ont une DCO inférieure à 100 mg/L. Cette différence s'explique par la différence de taille des pores des membranes de filtration utilisées par les deux systèmes. En fait, le système *Sys1* utilise des membranes à 0,2 μm , tandis que le système *Sys2* utilise des membranes à 0,02 μm .

Par ailleurs, on remarque que pour les deux systèmes, la DCO des eaux traitées par BRM demeure supérieure à la limite imposée par la directive européenne (30 mg/L). Le traitement complémentaire par osmose inverse a permis dans les deux cas de ramener la DCO à des valeurs de potabilité. Le charbon actif, cependant, n'a pas permis une diminution supplémentaire de la DCO.

- Cette diminution de la DCO dans les eaux traitées, par rapport aux eaux de trempes, correspond essentiellement à une biodégradation des matières organiques solubles.

C'est pour cela qu'on constate en parallèle une excellente élimination des sucres, alcools et des acides organiques par le traitement en BRM. Les faibles quantités résiduelles de ces composés après traitement en BRM sont efficacement éliminées par les traitements complémentaires (osmose inverse et charbon actif).

Les deux systèmes ont donné des résultats comparables pour l'élimination de ces composés, qui correspond au traitement biologique et non à l'étape de filtration.

- La consommation des sucres, alcools et acides organiques a provoqué une augmentation du pH dans les deux systèmes de traitement. Ainsi, alors que le pH de l'eau de trempe est autour de 6,7, le pH des eaux traitées par BRM est autour de 8, pour les deux systèmes. Le traitement par osmose inverse a permis pour les deux systèmes de ramener le pH à des valeurs proches de la neutralité, tandis que le traitement par charbon actif a provoqué une augmentation supplémentaire du pH, qui a ainsi atteint 9,2.

Or, pour respecter les critères de potabilité fixés par la directive européenne, le pH doit être compris entre 6,5 et 9,0.

- La partie de traitement biologique a aussi permis l'élimination de près de 90% de l'azote total. Par ailleurs, si l'osmose inverse permet d'éliminer les quantités résiduelles d'azote, le charbon actif n'était pas efficace.

- Les composés phénoliques ont aussi été efficacement éliminés : on atteint 93% d'élimination avec le système *Sys2*, et 83% d'élimination avec le système *Sys1*. Cette différence peut être expliquée par la taille de pores des membranes de filtration, qui sont 10 fois plus grands dans le système *Sys1* que dans le système *Sys2*. Ainsi, il peut s'agir de tannins condensés, ou de complexes polyphénols-polysaccharides ou polyphénols-peptides, qui sont retenus par le second système et pas par le premier. Il peut aussi s'agir de phénomènes d'adsorption différents entre les deux systèmes membranaires. De plus, on remarque que pour les deux systèmes, le traitement complémentaire par osmose inverse a permis d'éliminer totalement les quantités résiduelles de composés phénoliques. Le charbon actif, par contre, était inefficace.

- L'évolution du phosphore dans les eaux traitées représente la différence majeure entre les deux systèmes. En fait, on remarque que le système *Sys1* a permis une élimination efficace du phosphore, tandis qu'avec le système *Sys2* on a plutôt une

augmentation du phosphore dans les eaux traitées par rapport aux eaux non traitées. Cependant, pour ce dernier système, on remarque aussi qu'au cours des recyclages successifs, la concentration de phosphore dans les eaux traitées diminue progressivement.

L'hypothèse qu'il est possible d'émettre pour expliquer cette différence est que les boues initiales utilisées dans chacun de ces deux systèmes n'avaient pas des teneurs comparables de phosphore au départ. Afin de vérifier cette hypothèse, la concentration initiale de phosphore soluble de chacun des deux systèmes a été déterminée : dans le système *Sys1* on trouve une concentration de 1,7 ppm tandis que dans le système *Sys2* on trouve une concentration de 52 ppm. Ce résultat confirme donc notre hypothèse. De plus, la baisse progressive de la teneur en phosphore durant les traitements successifs avec le système *Sys2* prouve qu'à plus long terme, cette concentration se serait stabilisée à un faible niveau.

Le traitement complémentaire par osmose inverse a permis de ramener la concentration de phosphore au niveau de potabilité. Le traitement au charbon actif a aussi permis une diminution conséquente de la concentration en phosphore, mais la concentration résiduelle (3 ppm) demeure supérieure à la limite légale.

- Les résultats d'élimination des métaux lourds et des sels sont présentés dans le tableau suivant.

	<i>Sys1</i>			<i>Sys2</i>				
	<i>Eau de trempe</i>	<i>BRM</i>	<i>O.I</i>	<i>Eau de trempe</i>	<i>BRM</i>	<i>O.I</i>	<i>C.A</i>	<i>Législation</i>
Fe	430-850 µg/L	500-650 µg/L	1-2 µg/L	300-1200 µg/L	250-300 µg/L	< 1 µg/L	150 µg/L	200 µg/L
Mn	140-160µg/L	75-90 µg/L	1-1.5 µg/L	125-140 µg/L	0.1-0.3 µg/L	0.1 µg/L	0.8 µg/L	50 µg/L
Cu	< 25 µg/L	< 25 µg/L	< 25 µg/L	< 25 µg/L	< 25 µg/L	< 25 µg/L	< 25 µg/L	1000 µg/L
Zn	15-70 µg/L	11-22 µg/L	< 2 µg/L	22-62 µg/L	1-7 µg/L	< 2 µg/L	< 2 µg/L	5000 µg/L
Cd	< 0,1 µg/L	< 0,1 µg/L	< 0,1 µg/L	< 0,1 µg/L	< 0,1 µg/L	< 0,1 µg/L	< 0,1 µg/L	5 µg/L
Pb	< 1 µg/L	< 1 µg/L	< 1 µg/L	< 1 µg/L	< 1 µg/L	< 1 µg/L	< 1 µg/L	10 µg/L
Hg	<0,1 µg/L	<0,1 µg/L	< 0,1 µg/L	<0,1 µg/L	<0,1 µg/L	< 0,1 µg/L	< 0,1 µg/L	0,1 µg/L
Na	20-50 mg/L	30-80 mg/L	≤ 1 mg/L	10-25 mg/L	10-30 mg/L	≤ 1 mg/L	45 mg/L	
K	430-700 mg/L	300-400 mg/L	< 20 mg/L	350-520 mg/L	175-400 mg/L	< 50 mg/L	≅ 280 mg/L	-
Mg	< 40 mg/L	< 40 mg/L	< 0,5 mg/L	< 15 mg/L	< 15 mg/L	< 0,5 mg/L	< 15 mg/L	-

On constate que le système *Sys1* a été plus efficace que le système *Sys2*. Cette différence peut être inhérente à l'opération de purge. En fait, avec le système *Sys1* il n'y a pas eu de purge au niveau de la cuve d'aération. Cette opération a permis, dans le cas du système *Sys2*, une diminution de la concentration d'ions, ainsi qu'un léger renouvellement des boues, qui ont pu ainsi adsorber une quantité plus importante d'ions.

On remarque aussi que, mis à part le Fe et le Mn, le système *Sys1* a permis de ramener les teneurs en sels et en métaux lourds en dessous des limites fixées par la directive européenne. Le système *Sys2* a en plus permis de ramener la concentration de Mn en dessous de la limite imposée.

De plus, les traitements complémentaires d'osmose inverse et charbon actif ont permis de ramener tous les éléments à des concentrations conformes à la norme de potabilité.

Enfin, on remarque que les deux systèmes ont été efficaces pour l'élimination du pouvoir inhibiteur des eaux de trempes (Taux d'inhibition avec les eaux traitées = 2-3%), avec des résultats comparables.

- Confirmation des résultats de biodégradation des pesticides et mycotoxines

Le tableau suivant montre l'élimination de pesticides et de mycotoxines ajoutés dans le système de traitement *Sys1*, après 5h.

Contaminants	Chlorméquat chlorure	azoxystrobine	Fenpropimorphe	T2	HT2
limite de quantification (µg/L)	5	1	1		
ET OH	25138	3795	1245	11,45	49
Perméat 5 H	1423	537	1,7	0,06	8,82
ccon finale si dilution sans élimination	7182	1084	355,7	3,27	14
% élimination	80%	50%	100%	98%	37%

Les résultats obtenus avec cet essai confirment ceux qui ont été obtenus à l'échelle de laboratoire. Ils montrent une bonne élimination de l'azoxystrobine et de la HT2 (50% et 37% respectivement) et une élimination de la quasi-totalité de chlorméquat chlorure, de fenpropimorphe et de toxine T2.

Pour cet essai, on peut expliquer l'élimination des contaminants au cours du traitement, soit par une biodégradation effective de ces molécules, soit par leur adsorption sur les parois cellulaires.

Conclusions générales sur les analyses des eaux traitées :

- Les traitements par BRM n'ont pas permis de ramener la conductivité de l'eau à des valeurs respectant le critère de potabilité (1 mS/cm). L'utilisation d'osmose inverse ou de charbon actif ont permis d'atteindre cet objectif.
- L'osmose inverse et le charbon actif ont aussi permis de ramener la DCO à des valeurs de potabilité (< 30 mg/L).
- le pH des eaux traitées par BRM et osmose inverse est compatible avec les limites fixées par la directive européenne (de 6 à 9), mais l'utilisation du charbon actif a abouti à des pH trop élevés (9,2).
- Seule l'utilisation d'osmose inverse a permis de ramener le phosphore à des valeurs qui respectent les limites potabilité.
- Mis à part le Fe et le Mn, les teneurs en métaux lourds dans les eaux traitées par BRM respectent la législation européenne ; en ajoutant un traitement par charbon actif ou osmose inverse, le Fe et le Mn sont aussi ramenés à des valeurs en accord avec les critères de potabilité.

Globalement, les différences observées entre les eaux traitées par les deux systèmes sont dues à la fois à la différence de taille des pores des membranes, et aux différences dans les conditions opératoires (par exemple : la purge).

Enfin, on retrouve avec les deux systèmes de traitement des performances d'épuration équivalentes aux résultats obtenus à l'échelle de laboratoire.

2- Qualité des malts, moûts et bières

a- Analyses des malts

Les maltages pilotes ont été effectués en utilisant – pour l'étape de trempe – l'eau du réseau, les eaux traitées par BRM et les eaux traitées par osmose inverse, avec les

deux systèmes. Les malts obtenus ont été analysés dans le but d'étudier l'impact du recyclage des eaux traitées sur la qualité du produit.

Les résultats d'analyses des malts, moûts et bières sont présentés en Annexe 6 b- à f-.

On remarque qu'au cours des traitements successifs, les indices de trempe n'ont pas varié de manière significative. Ces résultats signifient que les eaux traitées, aussi bien par BRM que par BRM+osmose inverse, n'ont pas d'incidence sur la prise d'eau par le grain au cours de la trempe.

On remarque que pour la friabilité des malts, les valeurs obtenues sont entre 85% et 91%. Ces résultats ne sont pas significativement différents, aussi bien pour les essais d'un même système qu'entre les deux systèmes. De plus, les eaux traitées par BRM ou par osmose inverse donnent des résultats comparables.

La désagrégation calcofluor est aussi comparable pour tous les échantillons. Les valeurs sont $> 97\%$. Ainsi, il n'y a pas de différence significative entre les malts de référence et ceux obtenus avec des eaux recyclées. De même, il n'y a pas de différence significative entre les résultats obtenus avec les eaux traitées par les deux systèmes.

La viscosité des moûts des malts obtenus varie entre 1,49 et 1,53. Ces résultats ne sont pas significativement différents. Ainsi, les malts de référence et les malts obtenus avec les eaux traitées par BRM ou par osmose inverse donnent des viscosités comparables, et ne présenteront pas de difficulté au moment de la filtration du moût.

Avec les eaux traitées par le système *Sys1*, les malts obtenus ont une teneur en β -glucanes qui varie de 72 à 108 mg/L. Les eaux traitées avec le système *Sys2* donnent des malts dont la teneur en β -glucanes varie entre 81 et 117 mg/L. Cette variation ne peut pas être imputée à la qualité des eaux traitées, puisque le malt de référence n'a pas une teneur en β -glucanes plus faible que les autres échantillons de malt, et ce pour les deux systèmes. De plus, on ne peut pas conclure à une différence significative entre les deux systèmes, puisqu'il y a déjà une légère différence entre les deux malts de référence.

- La longueur de plumule donne une indication sur la progression de la germination. On remarque que pour tous les échantillons de malt, les résultats obtenus sont comparables : la proportion la plus élevée se retrouve pour des longueurs de plumules entre $\frac{1}{2}$ et $\frac{3}{4}$. Ce résultat signifie bien qu'on obtient la même qualité de germination avec les différentes eaux traitées et les deux systèmes.

Dans le but d'étudier plus finement la qualité des différents malts obtenus, des essais de filtration tepral ont été effectués. Ces essais donnent pour les différents moûts, le temps total de filtration, la vitesse de filtration (à travers les pentes de filtration) et le pH.

On remarque globalement que la variabilité de ces paramètres est plus grande pour les malts obtenus par recyclage des eaux traitées par le système *Sys2* que par *Sys1*. En fait, pour le système *Sys2*, les différents échantillons de malt ont des qualités comparables à celle du malt de référence. Pour le système *Sys1*, les différences entre les échantillons de malt et le malt de référence est plus sensible. Seul le pH ne varie pas significativement dans les deux cas. De plus, pour le système *Sys1*, on remarque une différence entre les malts obtenus par les eaux traitées par BRM et celles traitées par BRM+osmose inverse. Cette différence n'est pas remarquée dans le cas de *Sys2*.

Des essais de recyclages successifs plus nombreux et des conditions plus discriminantes (par exemple : lot d'orge plus sensible, diagramme de trempe moins favorable, pas d'arrosages au cours de la germination) auraient pu donner des résultats plus évidents, et montrer si ces différences sont importantes ou pas, et si elles vont s'amplifier au cours des recyclages.

Afin de compléter ces analyses, la teneur en acides aminés libres et la viscosité du moût ont été mesurés. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les différents échantillons issus d'un même système de traitement et entre les deux systèmes de traitement.

Conclusions sur la qualité des malts obtenus après recyclage de l'eau :

Les eaux traitées par les deux systèmes, recyclées dans l'étape de trempe, ont permis d'obtenir des malts de qualités variables. En fait, les malts obtenus après recyclage des eaux traitées par le système Sys2 ont de meilleurs résultats concernant la filtration tepral. De plus, ces derniers malts avaient des qualités homogènes : on n'a pas remarqué de différences significatives entre le malt de référence et les autres malts, qu'ils soient issus du recyclage d'eau traitée par BRM ou par BRM+osmose inverse.

En contre partie, les malts obtenus après recyclage des eaux traitées par Sys1 ont des qualités plus variables, selon qu'il s'agit d'eaux traitées par BRM ou par osmose inverse. Ces différences de qualité sont constatées pour la filtration tepral.

Cependant, ces légères différences ne doivent pas être automatiquement imputées à la qualité de l'eau de trempe. En effet, d'autres paramètres peuvent en être à l'origine. Par exemple, la température moyenne pendant la trempe n'était pas contrôlée : on a noté une variation globale de 7°C entre les 5 échantillons. Or, l'impact de la température de trempe sur la vitesse de prise d'eau, de germination et de modification du grain est bien établi.

b- Analyses des moûts et des bières

5 échantillons de malts ont été choisis pour les essais de brassage. Il s'agit des malts issus de l'utilisation des eaux suivantes en trempe:

- Eau du réseau (échantillon Sys2) ;
- la seconde eau traitée par BRM, pour chaque système ;
- la seconde eau traitée par osmose inverse, pour chaque système.

Les résultats de brassages, d'analyses des moûts, de fermentation, d'analyses physico-chimiques et sensorielles de la bière, concernent ces 5 échantillons.

* Le brassage :

Le suivi des paramètres de brassage (saccharification, filtration du mout, rendement de brassage et d'extraction) n'a pas révélé de différences significatives entre ces 5 échantillons.

* Analyses des moûts :

Ces analyses montrent que tous les moûts ont été saccharifiés, et qu'il n'y a pas de différence significative entre les 5 échantillons, en ce qui concerne les résultats de pH, de viscosité de l'extrait, de couleur, d'amertume, d'azote aminé et de calcium.

Ainsi, les 5 moûts obtenus sont de qualités comparables, le moût de référence ne différant pas significativement des quatre autres échantillons.

* Fermentation :

Les résultats obtenus pour la fermentation des 5 échantillons montrent qu'il n'y a pas de différences significatives en ce qui concerne l'atténuation après 7 jours, les dicétones au refroidissement, ainsi que les paramètres de filtration.

* Analyses des bières :

Les différentes analyses, effectuées sur les 5 bières obtenues, montrent que les échantillons ont des qualités comparables. La bière de référence ne présente pas de différences significatives par rapport aux quatre autres échantillons.

* Analyses sensorielles :

D'une part, les notes moyennes attribuées aux 5 échantillons de bière ne sont pas significativement différentes.

D'autre part, la comparaison des échantillons sur la base de chaque paramètre n'a pas révélé de différences significatives non plus.

On peut donc conclure que les 5 échantillons de malt permettent d'obtenir des bières de qualités comparables.

Même si de légères différences ont été constatées dans la qualité de l'eau utilisée en trempe, et dans les paramètres de filtration tepal, celles-ci n'ont pas d'impact sur les qualités physico-chimique et sensorielle de la bière.

Conclusions sur les qualités des moûts et des bières :

Malgré les quelques différences remarquées entre les malts pour les paramètres de filtration tepal, les moûts obtenus étaient de qualités comparables. De même, les bières obtenues avaient des qualités physico-chimiques et organoleptiques similaires.

Ainsi, les eaux traitées par bioréacteur à membrane avec ou sans osmose inverse, et recyclées dans la trempe n'ont aucun impact négatif sur la qualité des produits finis.

CONCLUSIONS

ET

PERSPECTIVES

Conclusions Générales et Perspectives

Le présent travail se situe dans le cadre du projet *SWAN (Save Water and Attent Nature)*, initié par des malteurs Français et Britanniques. Il s'inscrit dans la thématique d'économie de l'eau et d'amélioration de la qualité des rejets des industries agro-alimentaires.

1- Les principaux objectifs de ce travail ont été les suivants :

a- Caractériser les eaux de trempes : Il s'agit d'acquérir une connaissance approfondie de la composition des eaux de trempes en malterie, et de caractériser la pollution que celles-ci constituent (Demandes chimique et biochimique en oxygène, matières en suspension, présence de produits toxiques, etc).

b- Identifier les inhibiteurs de la germination de l'orge, présents dans les eaux de trempes, en se basant sur les données de la littérature.

c- Mettre au point un système de traitement et une stratégie de recyclage des eaux de trempes en malterie. Ce système de traitement doit notamment être efficace pour l'élimination des substances responsables de l'inhibition de la germination de l'orge. Il doit aussi permettre l'obtention d'une eau de qualité satisfaisante pour le procédé de maltage.

Enfin, il s'agit d'étudier l'impact du recyclage – dans l'étape de trempes – des eaux traitées, sur les performances du procédé de maltage. La qualité des malts, moûts et bières ainsi obtenus est ainsi comparée à des produits de référence.

2- Le présent travail a abouti aux conclusions suivantes :

a- Caractérisation des eaux de trempes :

De nouvelles connaissances ont été acquises en ce qui concerne les substances présentes dans les eaux de trempes, et les gammes de concentrations relatives à chaque composé. On a aussi constaté une diversité de la composition des eaux

de trempage, selon le procédé (température, aération, ratio orge/eau) et la variété d'orge utilisée.

Ainsi, les eaux de trempage se révèlent être un rejet particulièrement chargé en microflore (bactéries, levures et moisissures), en composés organiques (acides organiques, matières azotées, sucres, composés phénoliques) mais aussi en sels, métaux lourds et produits phytosanitaires.

Le recyclage de ces eaux dans l'étape de trempage a confirmé l'impact négatif sur le bon déroulement du procédé : un retard de prise d'eau par les grains a été constaté, ainsi qu'un retard dans la germination. Ces méfaits du recyclage de l'eau de trempage n'ont pas pu être compensés par une prolongation du trempage.

b- Identification des inhibiteurs de la germination de l'orge, présents dans les eaux de trempage :

L'impact négatif de l'eau de trempage sur le procédé a été expliqué par la présence, dans ces eaux de composés inhibiteurs de la germination.

Les investigations menées ont permis de mettre en évidence le rôle des composés phénoliques de l'orge dans le phénomène de l'inhibition de la germination au cours du procédé. Plus précisément, ce sont les réactions d'oxydation et de polymérisation de ces composés qui sont en cause. Le péricarpe-testa, ensemble semi-imperméable et riche en pro-anthocyanidines (tannins condensés), semble être le siège de ces phénomènes d'inhibition. Les réactions d'oxydation et de polymérisation des composés phénoliques au niveau du péricarpe-testa pourraient provoquer un renforcement des parois du grain, freinant ainsi la prise d'eau et l'élongation des plumules.

Par ailleurs, et afin de pouvoir comparer différents échantillons, un test simple et rapide a été mis au point, permettant de quantifier le pouvoir inhibiteur d'une eau de trempage.

c- Mise au point d'un système de traitement et d'une stratégie de recyclage des eaux de trempage en malterie :

A la lumière des nouvelles connaissances acquises sur la composition des eaux de trempage ainsi que sur la nature des inhibiteurs de la germination, un système de traitement de ces eaux a été mis au point.

Les objectifs de l'utilisation de ce système de traitement sont :

- d'une part l'élimination des inhibiteurs de la germination ;
- et d'autre part une épuration suffisante de l'eau, respectant l'un ou l'autre des objectifs suivants :
 - o premier objectif : obtenir une eau traitée de qualité potable; cet objectif correspond à la réglementation en vigueur, selon laquelle l'eau en entrée d'un procédé alimentaire doit être de qualité potable.
 - o second objectif : obtenir une eau suffisamment épurée pour que son recyclage dans le procédé de maltage n'ait pas d'impact négatif sur la qualité du produit fini.

Le système de traitement mis au point consiste en un bioréacteur à membrane de micro- ou ultra- filtration, couplé ou non à un module d'osmose inverse. Le choix de l'une ou l'autre de ces techniques membranaires dépend de la qualité visée pour l'eau traitée.

A l'échelle de laboratoire, le traitement par osmose inverse s'est avéré indispensable à l'obtention d'une eau de qualité potable. Cependant, le système de bioréacteur à membrane de microfiltration garantissait, sans atteindre les critères de potabilité, l'obtention d'une eau de bonne qualité, dont le recyclage en trempe n'a eu aucun effet négatif significatif sur la qualité du malt. Ce traitement complété par une étape de nanofiltration a permis d'améliorer la qualité de l'eau (baisse de la DCO, élimination de la couleur, baisse significative de la concentration de phosphore total). Le malt ainsi obtenu était aussi de qualité comparable au malt de référence. Enfin, un traitement au charbon actif de l'eau microfiltrée a donné des résultats comparables à la nanofiltration, sauf pour le phosphore, dont la concentration est restée inchangée.

Les essais à l'échelle pilote, avec un bioréacteur à membranes externes et un bioréacteur à membranes immergées, ont permis de confirmer ces résultats. La micro- et l'ultra- filtrations ont présenté de légères différences au niveau des caractéristiques de l'eau traitée (différences en faveur de l'eau ultrafiltrée, pour la teneur en polyphénols totaux, azote total et DCO). L'utilisation de membranes immergées ou externes a donné des résultats comparables.

Aucun impact négatif significatif n'a été observé sur le procédé de maltage : les malts, moûts et bières obtenus par ces deux derniers systèmes de traitement étaient de qualité équivalente aux échantillons de référence.

Ce système de traitement a enfin été mis au point à l'échelle industrielle, en optant pour des membranes externes, vu le faible coût d'investissement et d'entretien que ces dernières présentent par rapport aux membranes immergées.

Pour cette phase de validation industrielle, le site *Stowmarket* des malteries britanniques *Muntons* a été choisi. Le système de traitement installé est prévu pour une capacité de traitement de l'ordre de 50m³ par jour. Il utilise des membranes d'ultrafiltration et peut être complété par une étape d'osmose inverse afin d'atteindre les critères de potabilité.

Les boues initiales utilisées dans ce système proviennent de la station de traitement des eaux usées de *Muntons*. Il s'agit de boues utilisées pour le traitement de toutes les eaux usées de l'usine (y compris eaux usées du laboratoire, de la cantine, etc).

Des essais préliminaires ont été effectués, et deux orientations ont été testées au niveau de ces essais :

- des essais de traitement et de recyclage par BRM + osmose inverse, afin d'obtenir une eau de qualité potable. L'objectif de ces essais n'est donc pas d'étudier la qualité des malts résultant de recyclage des eaux traitées, mais d'étudier les performances du système à long terme (essentiellement la robustesse des membranes d'osmose inverse).

- des essais de traitement et recyclage par bioréacteur à membranes d'ultrafiltration uniquement (3 cycles successifs de traitement-recyclage). Dans ce cas, il est intéressant d'étudier l'évolution de l'eau traitée au cours des recyclages. En fait, des métaux lourds, des sels, des pesticides et des mycotoxines risquent de s'y accumuler.

Ces essais préliminaires semblent confirmer les essais conduits à l'échelle pilote. L'efficacité du traitement par BRM, pour l'élimination de la DCO et du pouvoir inhibiteur ainsi que pour la diminution du phosphore a été confirmée.

De plus, aucune différence importante n'a été notée entre le malt de référence, et les malts obtenus avec de l'eau traitée par BRM avec ou sans osmose inverse.

3- Plusieurs perspectives peuvent être envisagées pour ce projet :

a- Etude des performances du système de traitement à l'échelle industrielle à long terme : robustesse, coûts énergétiques, coûts d'entretien, viabilité économique.

b- Les essais de recyclage de l'eau traitée ultrafiltrée, sans osmose inverse, ont été effectués sur 3 cycles seulement. Des essais à long terme seraient donc enrichissants pour :

- l'étude de l'accumulation dans l'eau traitée des métaux lourds, des pesticides et des mycotoxines;
- l'étude de l'évolution du pouvoir inhibiteur dans le perméat;
- l'étude de l'évolution de la qualité des malts obtenus par recyclage des eaux traitées.

Ainsi, cette étude à long terme permettra de définir un nombre limite de traitements-recyclages successifs, au-delà duquel une opération d'osmose inverse ou un renouvellement de l'eau s'avère nécessaire.

A l'heure actuelle, l'unique frein à l'installation de ce type de systèmes de traitement (BRM + osmose inverse) dans les malteries, mais aussi, plus généralement dans les industries agro-alimentaires, reste le bas prix de l'eau et le coût des rejets, en comparaison avec les coûts d'investissement et de traitement.

Par ailleurs, un recyclage dans le procédé des eaux traitées uniquement par BRM nécessite préalablement une dérogation spéciale, vu les restrictions légales sur la qualité de l'eau en entrée des procédés agro-alimentaires.

c- Devenir des boues : Pour un système de bioréacteur à membrane traitant 50 m³ d'eau de trempage par jour, il est prévu de purger 5m³/jour de boues ayant 10 g/L environ de matière sèche. De plus, ces boues peuvent contenir, selon les lots d'orge trempés, des pesticides et des mycotoxines. Une étude pourrait être menée dans l'objectif d'estimer les coûts de ce rejet, les différents traitements qu'on peut y appliquer, ou encore pour établir les éventuelles voies de valorisation.

d- Etude plus approfondie des inhibiteurs de la germination et de leur mode d'action.

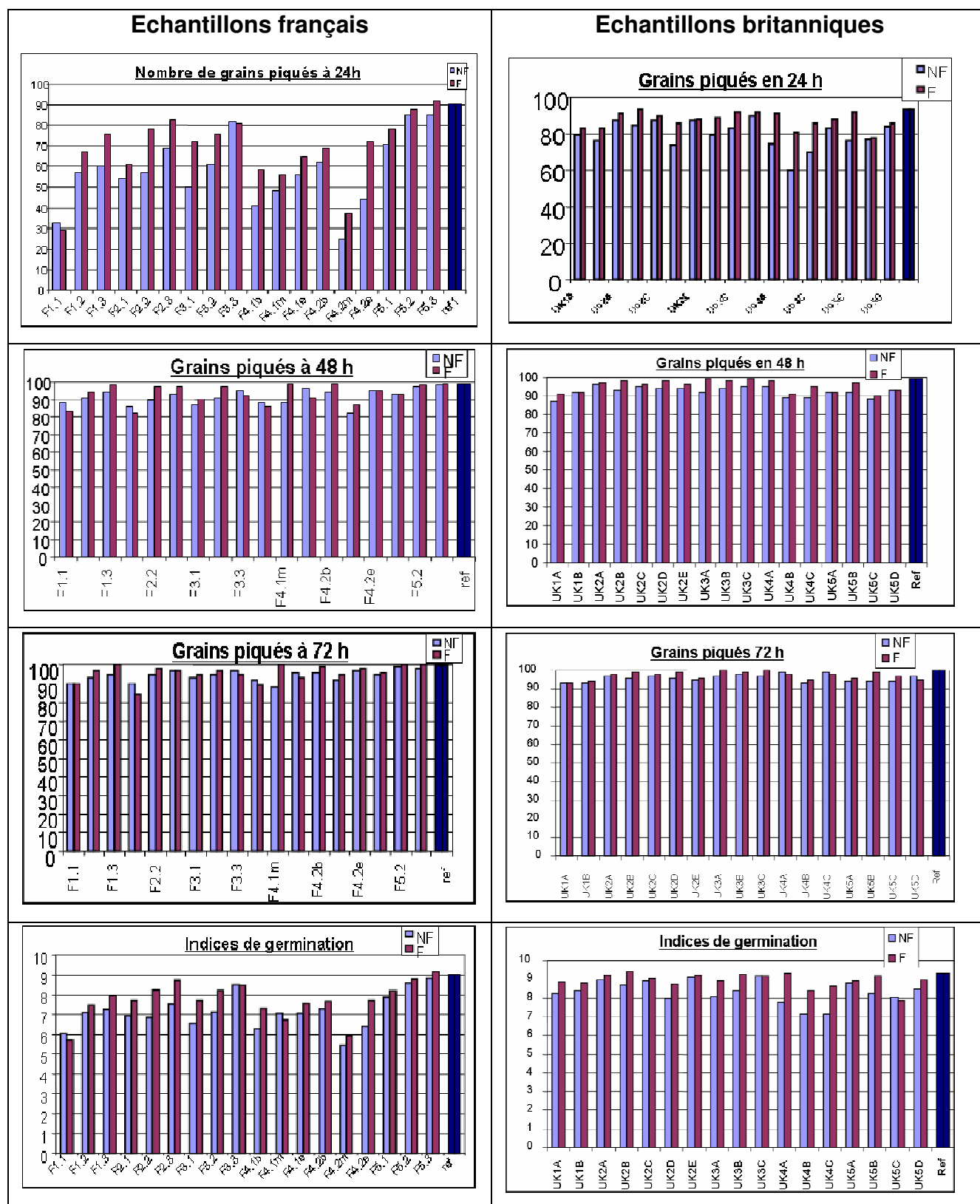
e- Etude de l'utilisation des variétés d'orge nues ou des variétés pauvres en polyphénols, dans les procédés de maltage.

ANNEXES

Annexes

Annexe 1 : Caractérisation d'eaux de trempe industrielles

1- Tests de germination (4 ml)



2- Tests de germination (8 ml, échantillons filtrés)



3- Composés phénoliques

mg/L	F1.1	F1.2	F1.3	F2.1	F2.2	F2.3	F3.1	F3.2	F3.3	LD	LQ
Ac. Abscissique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.02	0.06
Ac. Benzoïque	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.06	0.18
Ac. Cafféique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.04	0.12
Ac. Chlorogénique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.06	0.18
Ac. Coumarique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.02	0.06
Ac. Férulique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.03	0.09
Ac. Gallique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.06	0.18
Ac. Hydroxybenzoïque	ND	ND	ND	1.68	ND	ND	ND	ND	ND	0.06	0.18
Ac. Protocatéchuique	ND	ND	ND	0.43	ND	ND	ND	ND	ND	0.06	0.18
Ac. Sinapinique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	0.03
Ac. Syringique	ND	ND	ND	0.71	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	0.03
Ac. Trans Cinnamique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	0.03
Ac. Vanillique	ND	ND	ND	1.39	ND	ND	ND	ND	ND	0.04	0.12
Catéchine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.28	0.84
Epicatéchine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.22	0.66
Rutine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.16	0.48

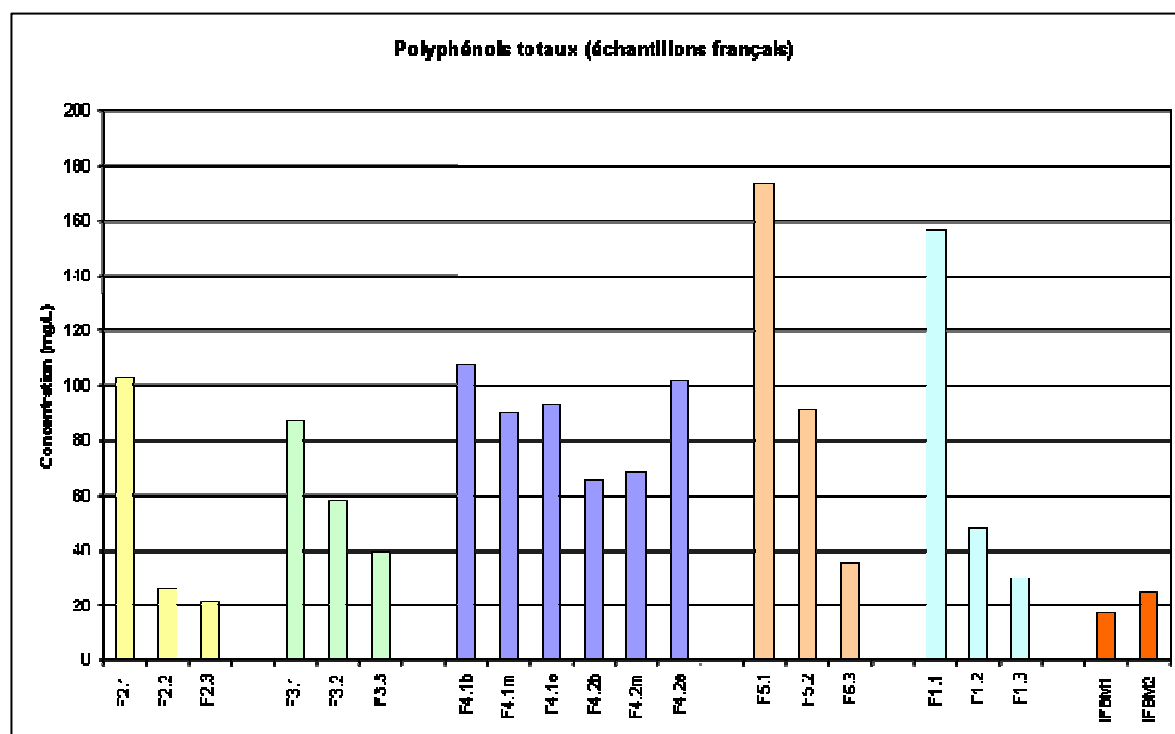
mg/L	F4.1b	F4.1m	F4.1e	F4.2b	F4.2m	F4.2e	F5.1	F5.2	F5.3
Ac. Abscissique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Benzoïque	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Cafféique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Chlorogénique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Coumarique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Férulique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Gallique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Hydroxybenzoïque	ND	0.71	ND	ND	ND	ND	1.52	ND	ND
Ac. Protocatéchuique	ND	0.26	ND	ND	ND	ND	0.42	ND	ND
Ac. Sinapinique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Syringique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.71	ND	ND
Ac. Trans Cinnamique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Vanillique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.45	ND	ND
Catéchine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Epicatéchine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Rutine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

mg/L	UK1A	UK1B	UK2A	UK2B	UK2C	UK2D	UK2E	UK3A	UK3B	UK3C
Ac. Abscissique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Benzoïque	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Cafféique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Chlorogénique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Coumarique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Férulique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Gallique	0.84	1.14	0.89	0.80	0.8	ND	ND	0.36	ND	ND
Ac. Hydroxybenzoïque	0.51	ND	0.35	ND	0.2	ND	ND	0.27	0.12	ND
Ac. Protocatéchuique	0.16	ND	ND	0.16	0.3	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Sinapinique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Syringique	0.38	0.17	ND	0.13	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Trans Cinnamique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Vanillique	0.95	0.35	0.59	0.51	0.3	ND	ND	ND	ND	ND
Catéchine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Epicatéchine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Rutine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

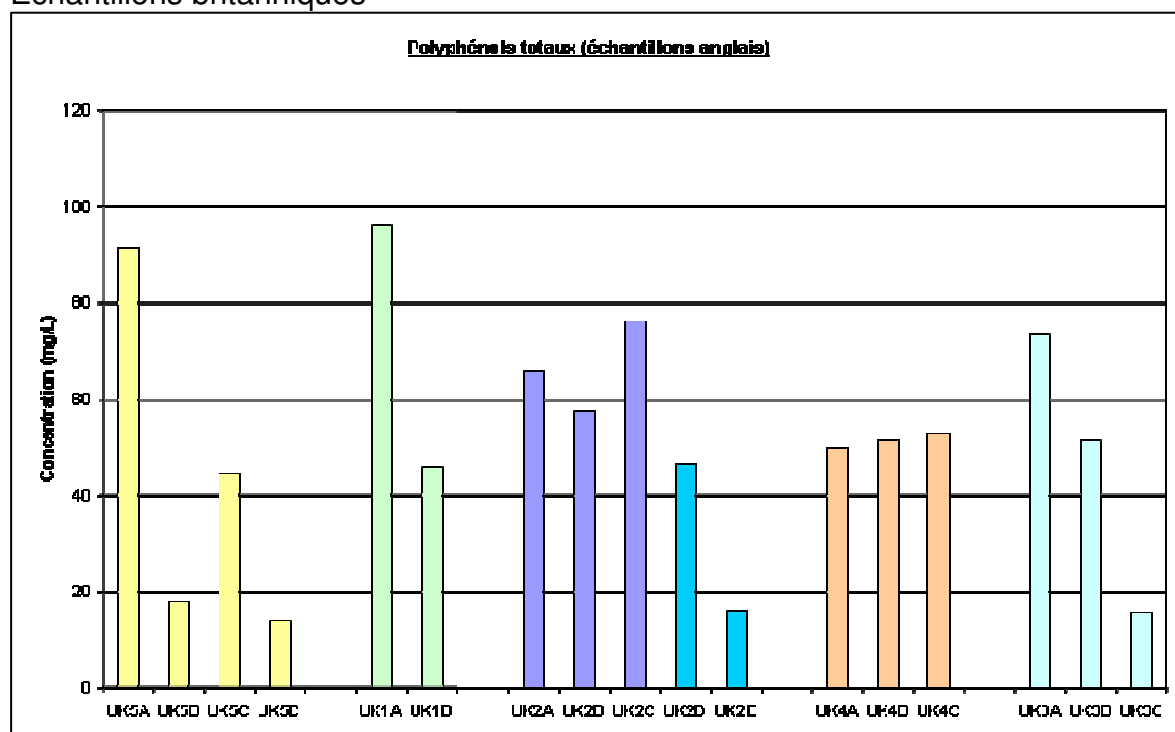
mg/L	UK4A	UK4B	UK4C	UK5A	UK5B	UK5C	UK5D	IFBM 1	IFBM 2
Ac. Abscissique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Benzoïque	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Cafféique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Chlorogénique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Coumarique	0.44	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Férulique	0.54	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Gallique	1.02	0.95	ND	1.76	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Hydroxybenzoïque	0.71	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Protocatéchuique	ND	0.17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Sinapinique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Syringique	0.27	0.14	0.06	0.22	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Trans Cinnamique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac. Vanillique	0.94	0.60	0.10	0.70	0.09	0.35	ND	ND	ND
Catéchine	ND	ND	ND	ND	2.01	ND	ND	ND	ND
Epicatéchine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Rutine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

4- Polyphénols totaux

Echantillons français



Echantillons britanniques



5- Pesticides

Echantillons britanniques

µg/L	UK1	UK2	UK3	UK4	UK5		LD	LQ
2,4 D	ND	ND	ND	ND	ND		0.20	0.50
Azoxystrobine	<LQ	<LQ	ND	ND	ND		0.30	0.60
Bifenthrine	ND	ND	ND	ND	ND		0.10	0.20
Chlorméquat chlorure	ND	3.00	ND	1.60	ND		0.50	1.00
Chlorpyrifos méthyl	ND	ND	ND	ND	ND		0.05	0.10
Cypermethrine	ND	ND	ND	ND	ND		0.10	0.20
Cyproconazole	ND	ND	ND	ND	ND		0.20	0.40
Deltamethrine	ND	ND	ND	ND	ND		0.06	0.20
Epoxyconazole	ND	ND	ND	ND	ND		0.50	1.00
Esfenvalerate	ND	ND	ND	ND	ND		0.05	0.10
Fenpropridine	ND	ND	ND	ND	ND		0.05	0.10
Fenpropimorphe	0.12	0.20	0.16	0.23	0.11		0.05	0.10
Glyphosate	902	<LQ	ND	<LQ	467		10	50
Kresoxym-méthyl	ND	ND	ND	ND	ND		0.06	0.20
Lambda-Cyhalothrine	ND	ND	ND	ND	ND		0.05	0.10
Mepiquat chlorure	ND	ND	ND	ND	ND		0.50	01.0
Pirimiphos-methyl	ND	3.84	10.51	0.42	0.10		0.05	0.10
Prochloraze	ND	ND	ND	ND	ND		0.05	0.10
Propiconazole	ND	ND	ND	ND	ND		0.05	0.10
Quinoxifene	ND	ND	ND	ND	ND		0.06	0.20
Spiroxamine	ND	ND	ND	ND	ND		0.05	0.10
Tau-Fluvalinate	ND	ND	ND	ND	ND		0.10	0.20
Tebuconazole	ND	ND	ND	ND	ND		0.10	0.20
Trifloxystrobine	ND	ND	ND	ND	ND		0.06	0.20

Echantillons français

µg/L	F1.1	F2.1	F3.1	F4.1e	F5.1	LD	LQ
Alphaméthrine	ND	ND	ND	ND	ND	0.05	0.10
Azoxystrobine	ND	1.21	< LQ	< LQ	0.88	0.30	0.60
BétaCyfluthrine	ND	ND	ND	ND	ND	0.10	0.20
Bifenthrine	1.04	ND	ND	ND	ND	0.10	0.20
Butoxyde pypéronyl	0.14	215.71	0.74	0.19	1.36	0.05	0.10
Cyfluthrine	ND	ND	ND	ND	ND	0.10	0.20
Cyproconazole	ND	ND	ND	ND	ND	0.20	0.40
Cyprodinile	ND	< LQ	ND	ND	ND	0.05	0.10
Deltaméthrine	ND	0.36	ND	ND	ND	0.06	0.20
Dichlorvos	ND	ND	10.92	0.32	ND	0.05	0.10
Epoxyconazole	ND	ND	ND	ND	ND	0.50	1.00
Esfenvalerate	ND	ND	ND	ND	ND	0.05	0.10
Fenpropidine	ND	ND	ND	ND	ND	0.05	0.10
Fenpropimorphe	ND	< LQ	0.15	0.55	0.16	0.05	0.10
Fluzilanole	ND	ND	ND	ND	ND	0.05	0.10
Hexaconazole	ND	ND	ND	ND	ND	0.05	0.10
Kresoxym-méthyl	ND	ND	ND	ND	ND	0.06	0.20
Lambda-Cyhalothrine	ND	ND	ND	ND	ND	0.05	0.10
Malathion	ND	ND	11.90	13.19	ND	0.06	0.20
Pirimiphos-méthyl	28.67	< LQ	0.13	3.58	36.97	0.05	0.10
Prochloraz	ND	ND	ND	ND	ND	0.05	0.10
Propiconazole	ND	ND	ND	ND	ND	0.05	0.10
Pyrimicarbe	ND	ND	ND	ND	ND	0.05	0.10
Quinoxifene	ND	ND	ND	ND	ND	0.06	0.20
Spiroxamine	ND	ND	ND	ND	ND	0.05	0.10
Tau-Fluvalinate	ND	ND	ND	ND	ND	0.10	0.20
Tebuconazole	ND	ND	ND	ND	ND	0.10	0.20
Tridemorphe	ND	ND	ND	ND	ND	0.05	0.10
Trifloxystrobine	ND	ND	ND	ND	ND	0.06	0.20

6- Mycotoxines

Echantillons britanniques

µg/L E307	UK1 A	UK1 B	UK2 A	UK2 B	UK2 C	UK2 D	UK2 E	UK3 A	UK3 B	UK3 C		LD	LQ
Diacétoxyscirpénol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
monoacétoxyscirpénol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
NEO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
Toxine HT2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
Toxine T2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
T2 Triol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
3 acétyl déoxynivalénol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
15 acétyl déoxynivalénol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
déoxynivalénol	<LQ	<LQ	14	ND	ND	ND	ND	14	<LQ	ND		5	10
Fusarénone X	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
Nivalénol	ND	ND	<LQ	<LQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
Ochratoxine A	0.00 4	ND	ND	ND	0.01 7	ND	ND	ND	ND	ND		0.001	0.002
Citrinine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		1	3
Cytochalasin E	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01 3	0.00 8		0.01	0.03

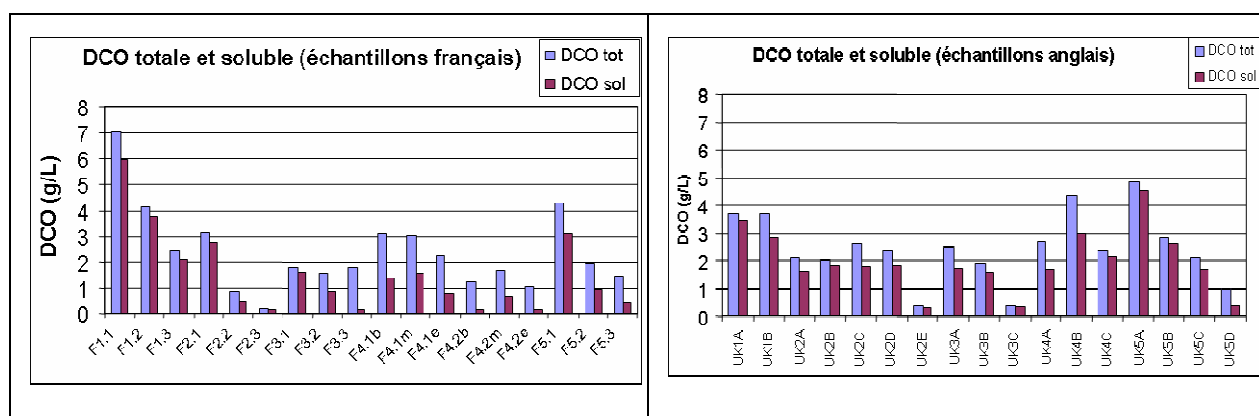
µg/L	UK4A	UK4B	UK4C	UK5A	UK5B	UK5C	UK5D	IFBM 1	IFBM 2		LD	LQ
Diacétoxyscirpénol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
monoacétoxyscirpénol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
NEO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
Toxine HT2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
Toxine T2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
T2 Triol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
3 acétyl déoxynivalénol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
15 acétyl déoxynivalénol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
déoxynivalénol	<LQ	<LQ	ND	14	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
Fusarénone X	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
Nivalénol	ND	<LQ	ND	<LQ	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
Ochratoxine A	ND	ND	ND	0.017	ND	0.006	ND	ND	ND		0.001	0.002
Citrinine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	3	
Cytochalasin E	ND	ND	ND	<LQ	ND	<LQ	ND	<LQ	ND	0.01	0.03	

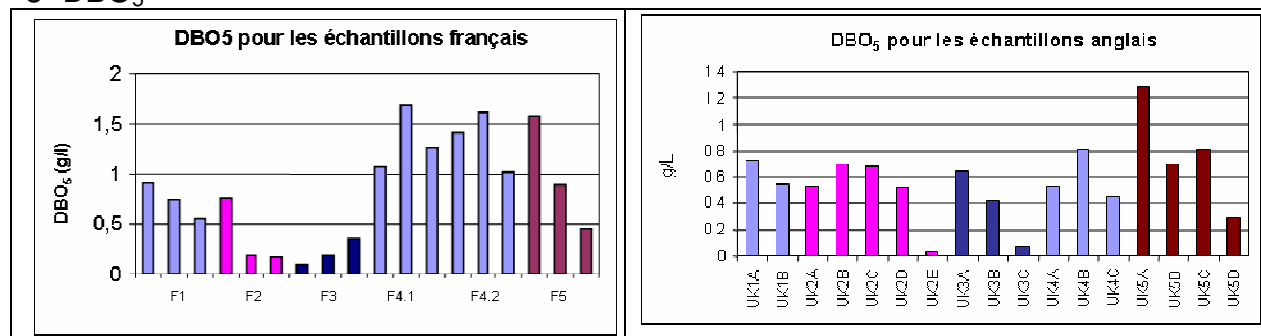
Echantillons français

µg/L	F1.1	F1.2	F1.3	F2.1	F2.2	F2.3	F3.1	F3.2	F3.3		LD	LQ
Diacétoxyscirpénol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		4	8
monoacétoscirpénol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		4	8
NEO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
Toxine HT2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
Toxine T2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
T2 Triol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
3 acétyl déoxynivalénol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		4	8
15 acétyl déoxynivalénol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		4	8
déoxynivalénol	26	<LQ	ND	13	ND	ND	20	<LQ	ND		4	8
Fusarénone X	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		4	8
Nivalénol	45	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		4	8
Ochratoxine A	<0.002	ND	ND	0.007	ND	ND	0.026	0.019	0.017		0.002	0.004
Cytochalasin E	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		0.02	0.04

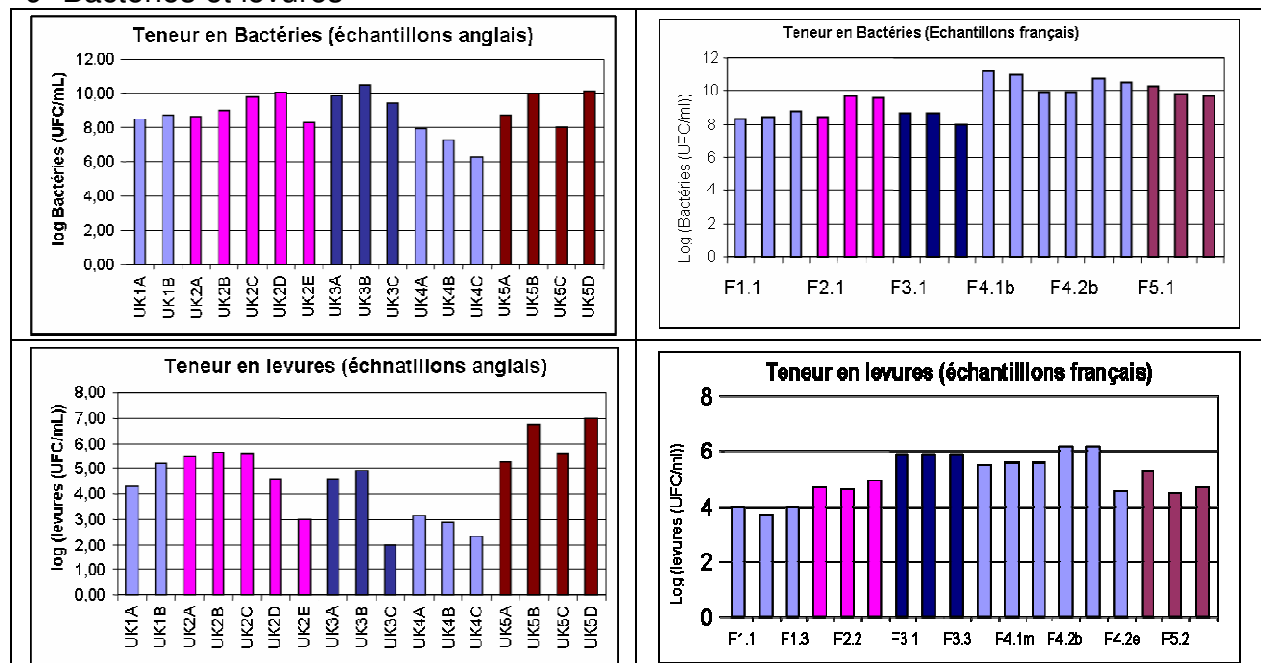
µg/L	F4.1e	F4.2e	F5.1	F5.2	F5.3		LD	LQ
Diacétoxyscirpénol	ND	ND	ND	ND	ND		4	8
monoacétoscirpénol	ND	ND	ND	ND	ND		4	8
NEO	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
Toxine HT2	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
Toxine T2	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
T2 Triol	ND	ND	ND	ND	ND		5	10
3 acétyl déoxynivalénol	ND	ND	ND	ND	ND		4	8
15 acétyl déoxynivalénol	ND	ND	ND	ND	ND		4	8
déoxynivalénol	10	ND	13	ND	ND		4	8
Fusarénone X	ND	ND	ND	ND	ND		4	8
Nivalénol	ND	ND	ND	ND	ND		4	8
Ochratoxine A	0.008	0.008	0.02	0.016	<0.002		0.002	0.004
Cytochalasin E	ND	ND	ND	ND	ND		0.02	0.04

7- DCO



8- DBO₅

9- Bactéries et levures

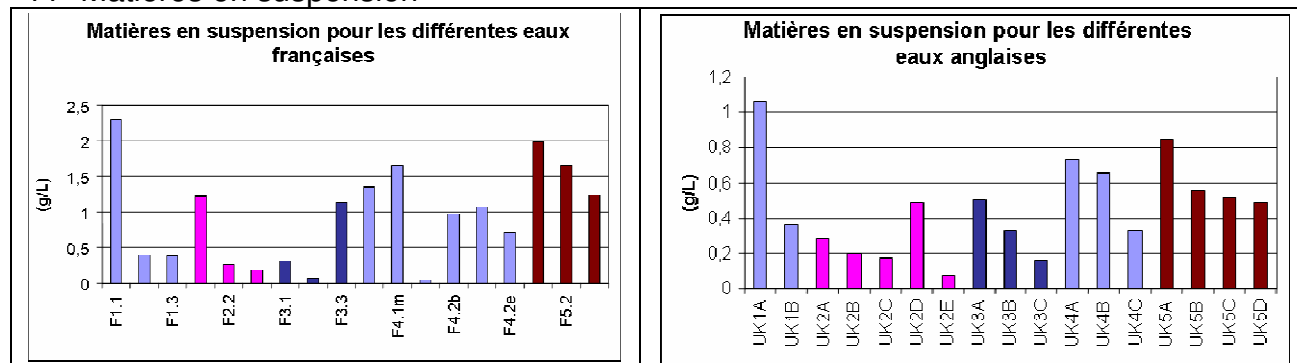


10- Observation des Moisissures

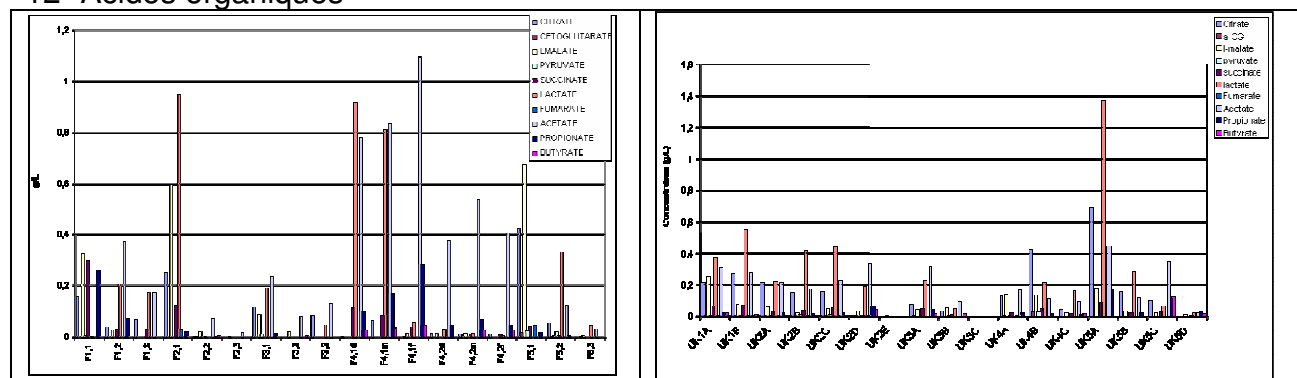
Echantillons britanniques		Echantillons français	
UK1A	Abs (Levures)	F1.1	Levures; Fusarium
UK1B	Abs (Levures)	F1.2	Abs (Levures)
UK2A	Abs (Levures)	F1.3	Abs (Levures)
UK2B	Abs (Levures)	F2.1	Abs (Levures)
UK2C	Abs (Levures)	F2.2	Abs (Levures)
UK3A	Abs (Levures)	F2.3	Abs (Levures)
UK3B	Abs (Levures)	F3.1	Abs (Levures)
UK3C	Abs (Levures)	F3.2	Abs (Levures)
UK4A	Abs (Levures)	F3.3	Abs (Levures)
UK4B	Abs (Levures)	F4.1b	Abs (Levures)
UK4C	Abs (Levures)	F4.1m	Abs (Levures)
UK5A	Levures, <i>Penicillium</i>	F4.1e	Levures; <i>Mucor</i> ; <i>Penicillium</i>
UK5B	Levures, <i>Penicillium</i>	F4.2b	Abs (Levures)
Orge UK1	<i>P. verrucosum</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Alternaria</i>	F4.2m	Abs (Levures)
Orge UK2	<i>Aspergillus</i> , <i>Alternaria</i>	F4.2e	Levures; <i>Mucor</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Alternaria</i> ; <i>Aspergillus</i>

Orge UK2	<i>Aspergillus, Alternaria</i>	F5.1	Abs (Levures)
Orge UK3	<i>Aspergillus, Alternaria</i>	F5.2	Abs (Levures)
Orge UK5	<i>Aspergillus, Alternaria</i>	F5.3	Abs (Levures)
Orge UK5	<i>Aspergillus, Alternaria</i>		

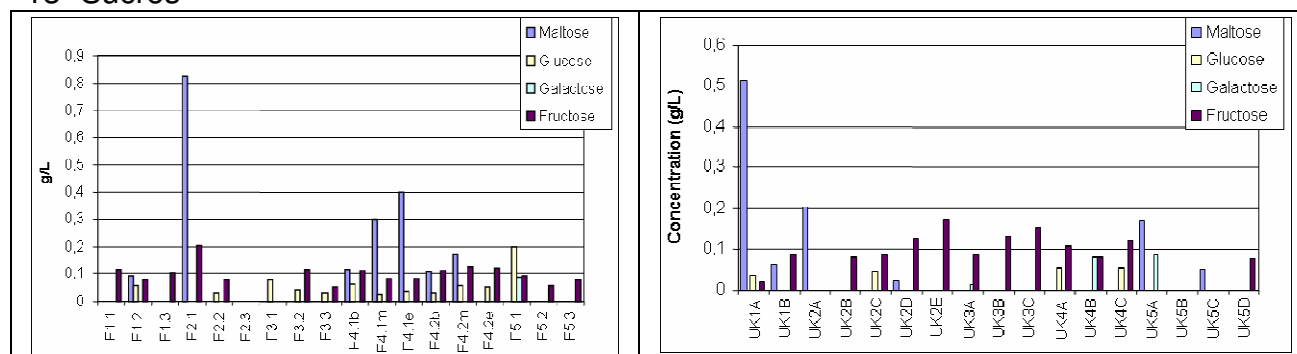
11- Matières en suspension



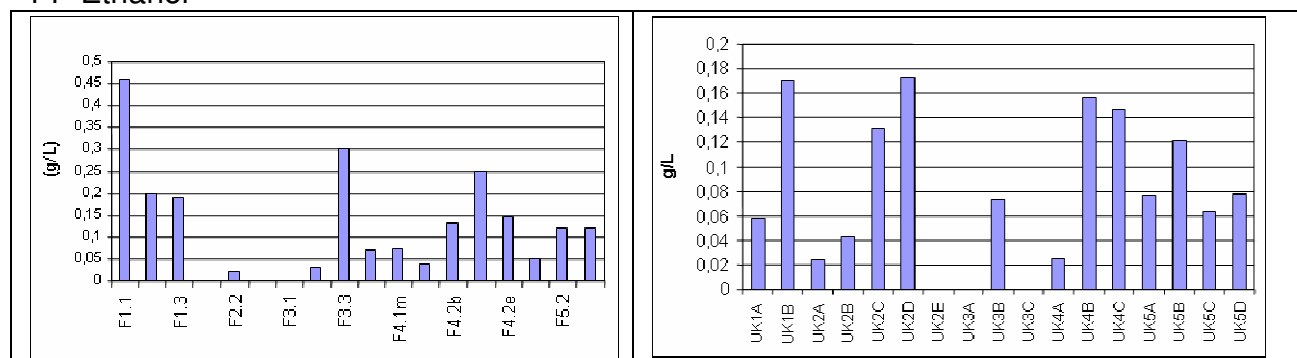
12- Acides organiques



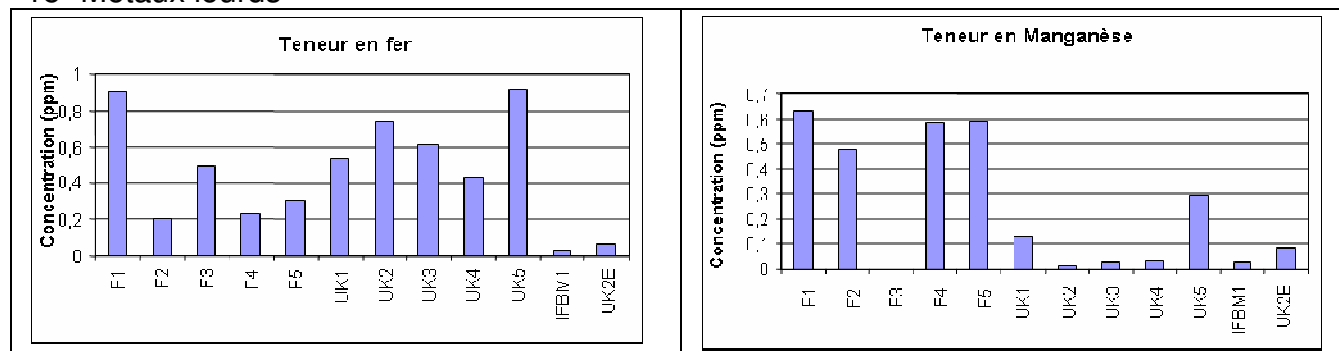
13- Sucres



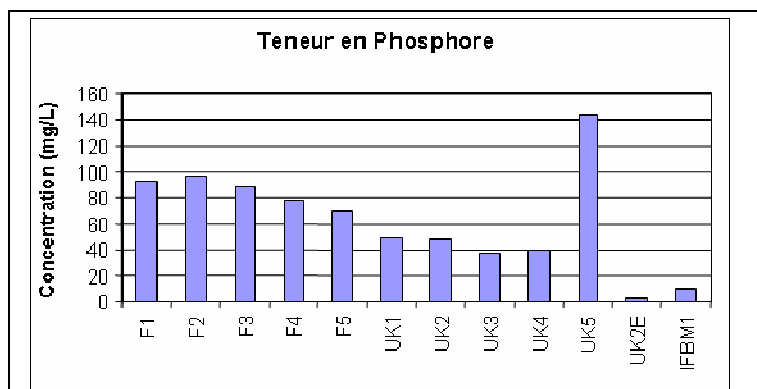
14- Ethanol



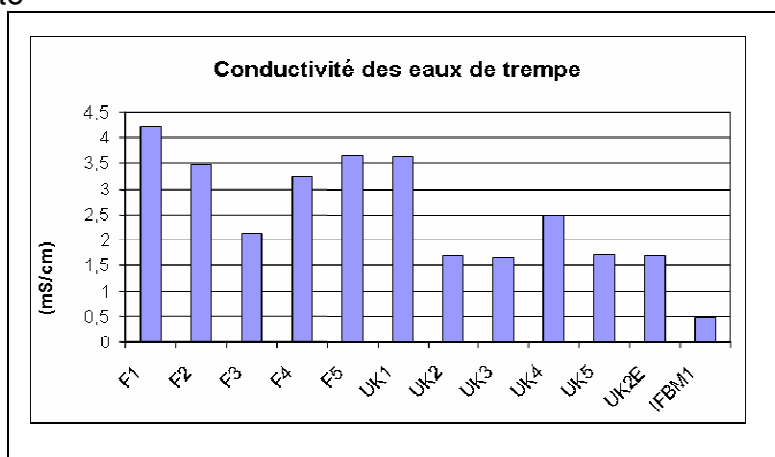
15- Métaux lourds



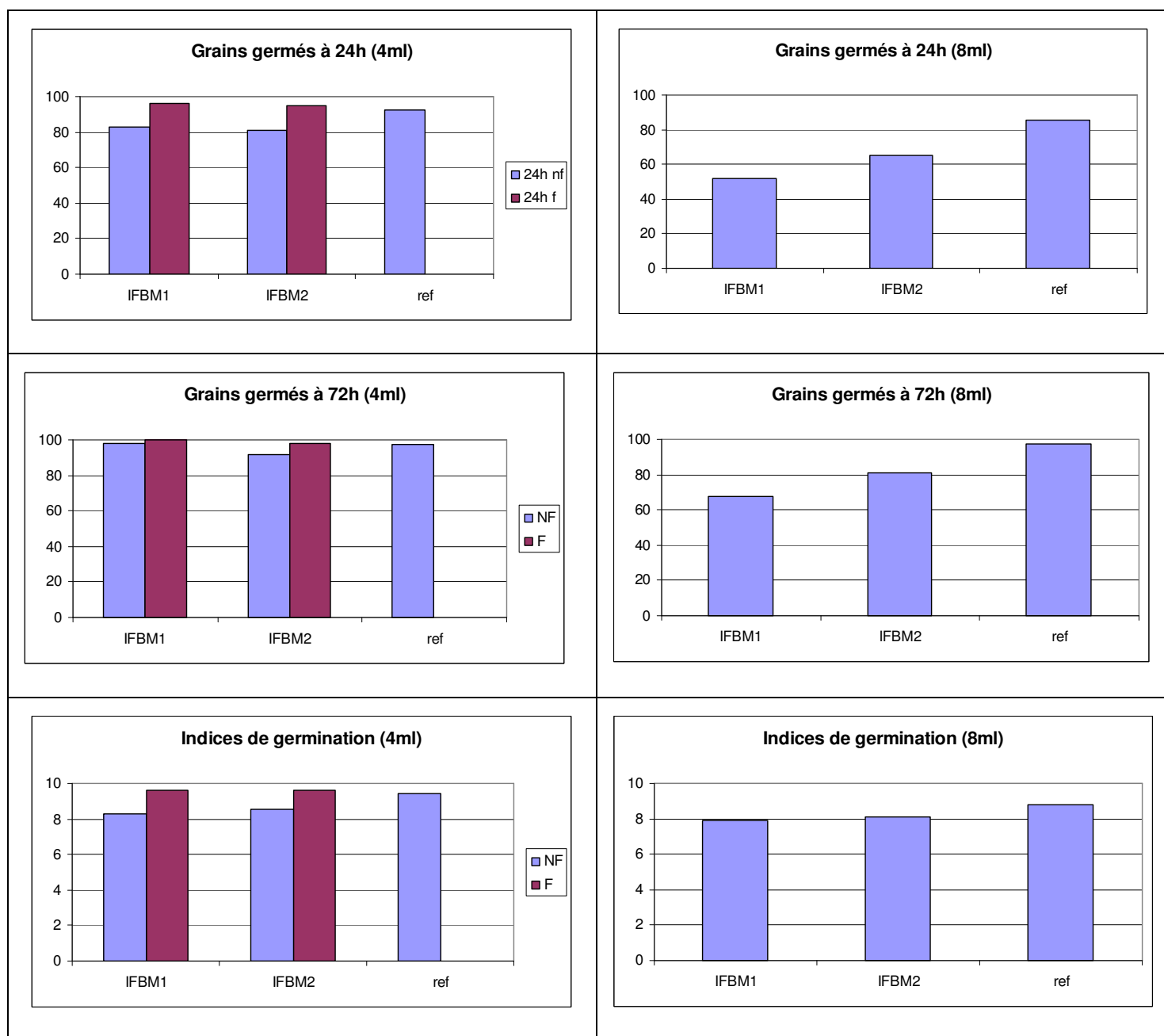
16- Phosphore

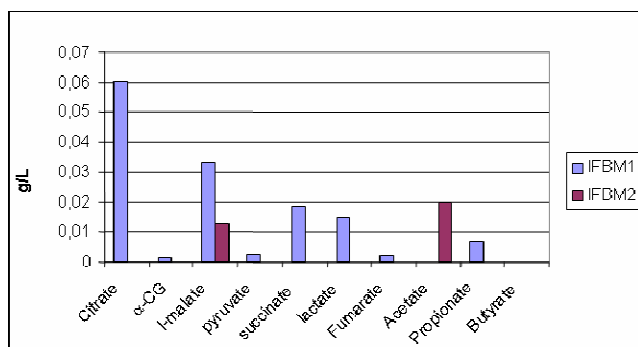
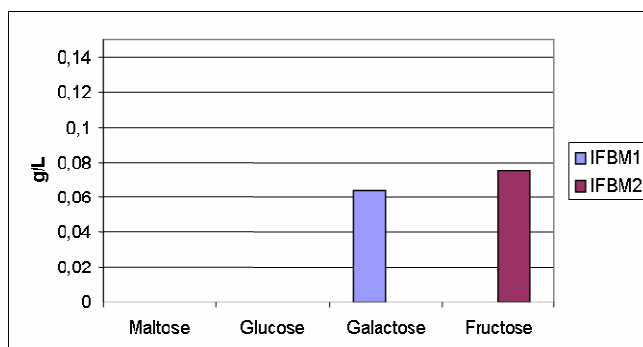


17- Conductivité



Annexe 2 : Caractérisation d'une eau de trempé de l'IFBM



Teneur en acides organiques**Teneur en sucres****Ethanol (g/L):**

IFBM1	0,08277
IFBM2	-

Bactéries et levures (UFC/ml):

	Bactéries	Levures
IFBM1	6,40E+08	3,10E+04
IFBM2	7,00E+09	6,00E+03

Matières en suspension et poids sec total (g/L):

	M.S	P.S
IFBM1	2,1	4,1
IFBM2	2,7	3,3

DCO totale et soluble (g/L):

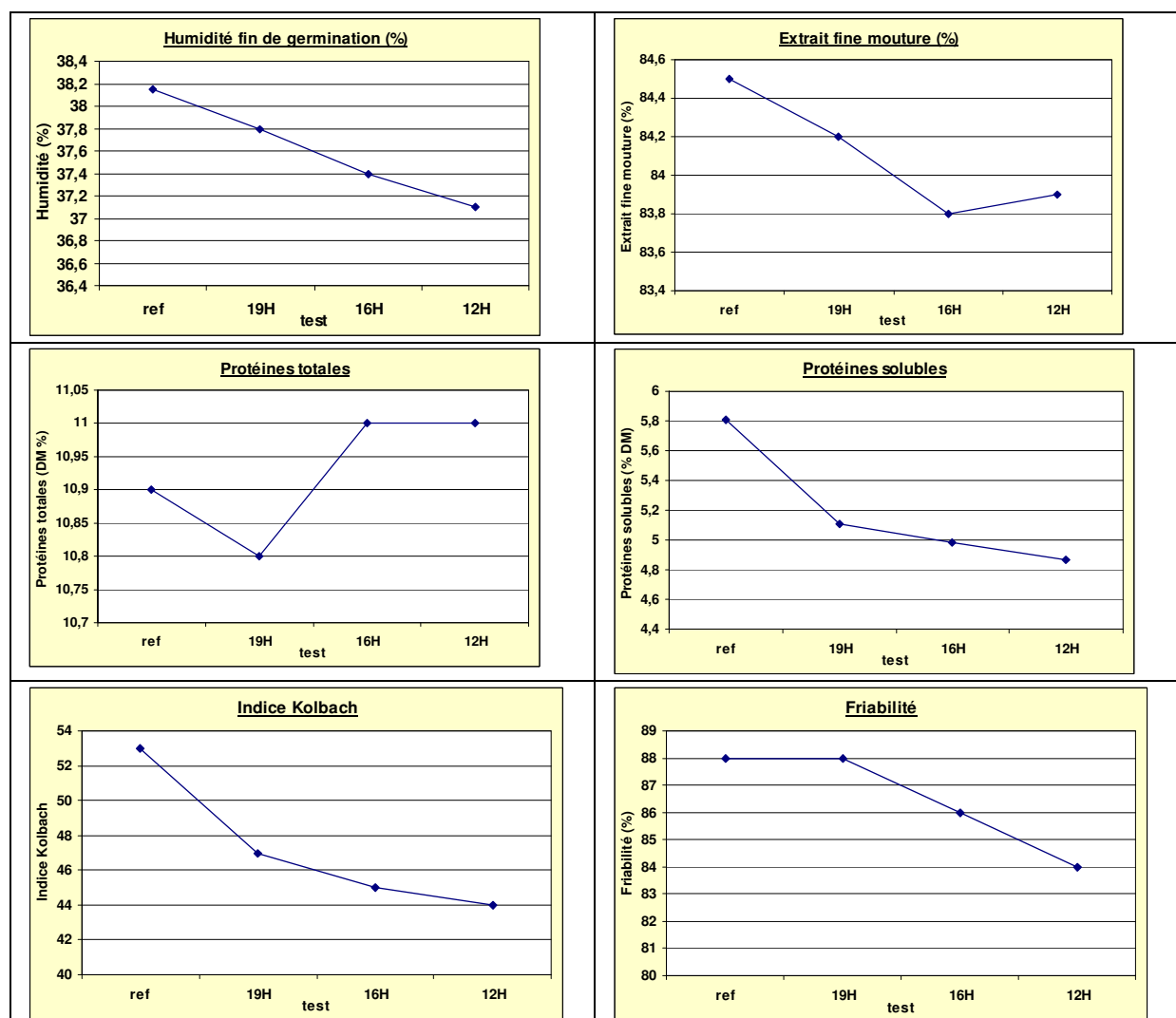
	DCO totale	DCO soluble
IFBM1	2,1	1,6
IFBM2	1,9	1,2

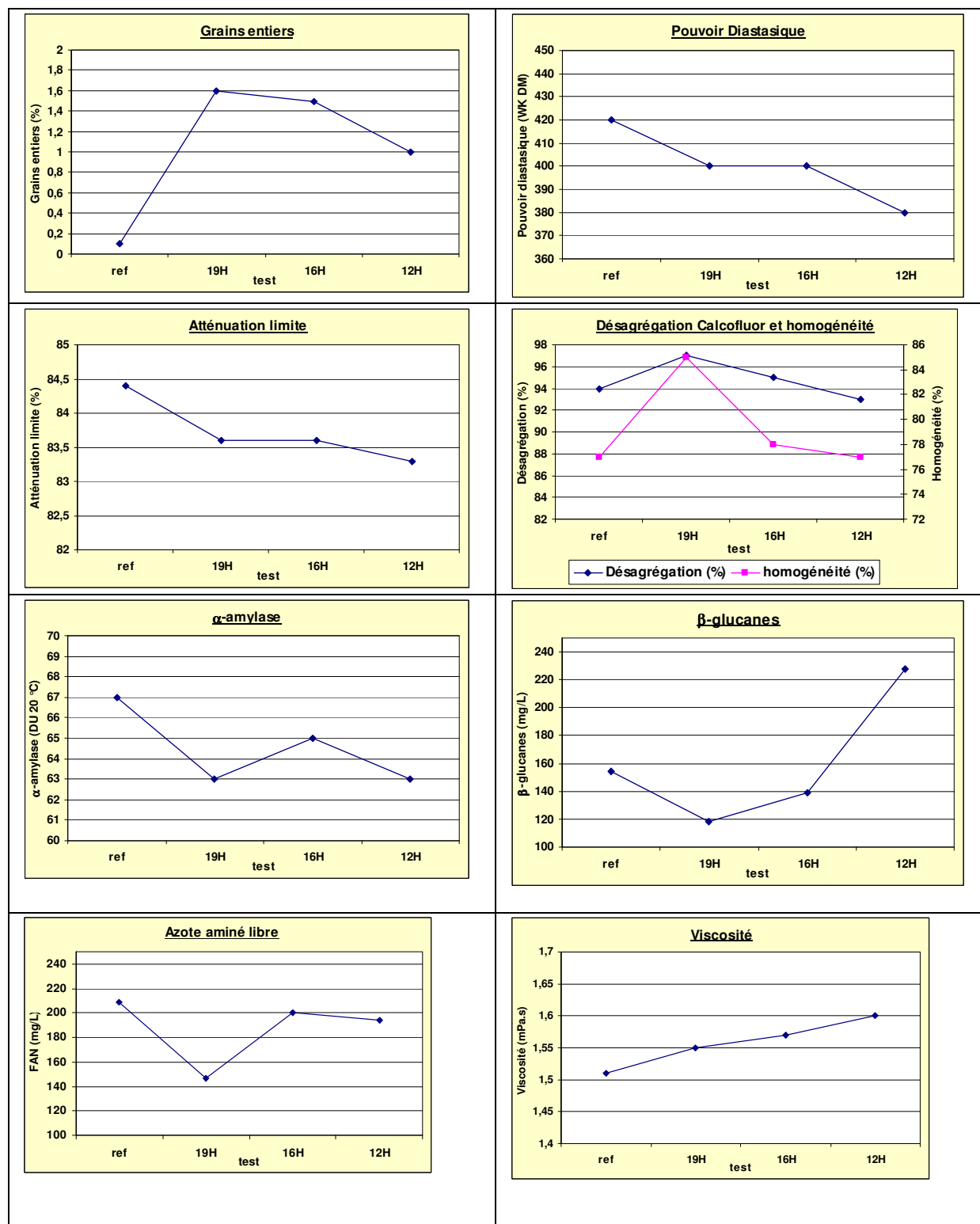
DBO₅ (g/L):

	DBO ₅
IFBM1	0,5
IFBM2	0,4

Annexe 3 : Analyses de malts avec eaux de trempe inhibitrices et différentes durées de sous-eau

	ref	12H	16H	19H
Humidité fin de germination (%)	38,15	37,1	37,4	37,8
Humidité du malt (%)	4,3	4,3	4,3	4,4
Extrait fine mouture (% DM)	84,5	83,9	83,8	84,2
Couleur (EBC)	2,8	2,7	2,9	2,8
pH du moût	5,97	6,01	6,02	5,96
Protéines totales (% DM)	10,9	11	11	10,8
Protéines solubles (% DM)	5,81	4,87	4,98	5,11
Indice Kolbach	53	44	45	47
Friabilité (%)	88	84	86	88
Grains entiers (%)	0,1	1	1,5	1,6
Pouvoir Diastasique (WK DM)	420	380	400	400
Atténuation limite (%)	84,4	83,3	83,6	83,6
Modification Calcofluor (%)	94	93	95	97
Homogénéité (%)	77	77	78	85
α -amylase (DU 20 °C)	67	63	65	63
β -glucans (mg/l)	154	228	139	118
Azote aminé libre (mg/l)	209	194	200	147
Viscosité (mPa.s)	1,51	1,6	1,57	1,55

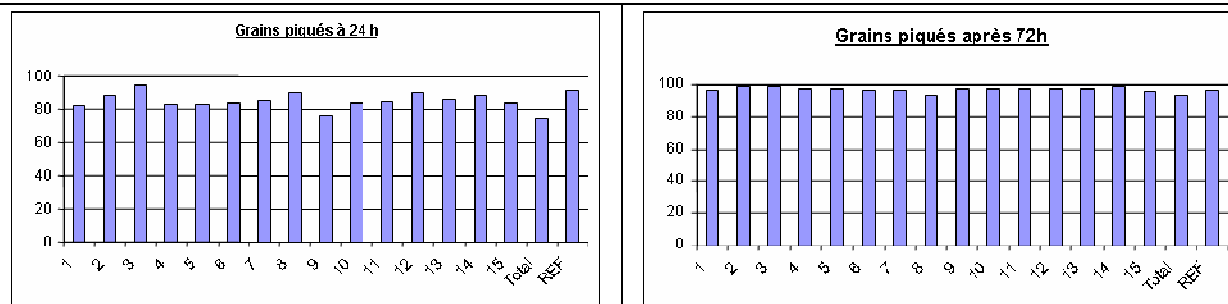




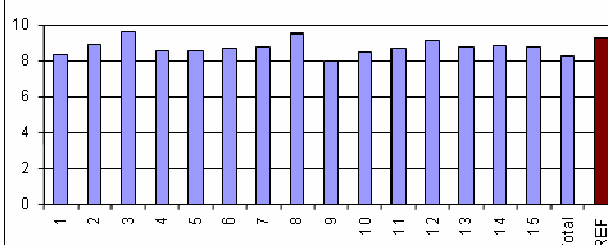
Annexe 4: Tests de germination avec différents composés phénoliques (10 ppm)

Molécules testées : 1- Acide Benzoïque; 2- Acide Syringique; 3- Acide Gallique; 4- Acide Cafféique; 5- Rutine; 6- Acide Protocatéchuïque; 7- Acide Trans-cinnamique; 8- Acide Chlorogénique; 9- Acide Sinapinique; 10- Catéchine; 11- Epicatechine; 12- Acide Hydroxybenzoïque; 13- Acide Férulique; 14- Acide Vanillique; 15- acide p-coumarique

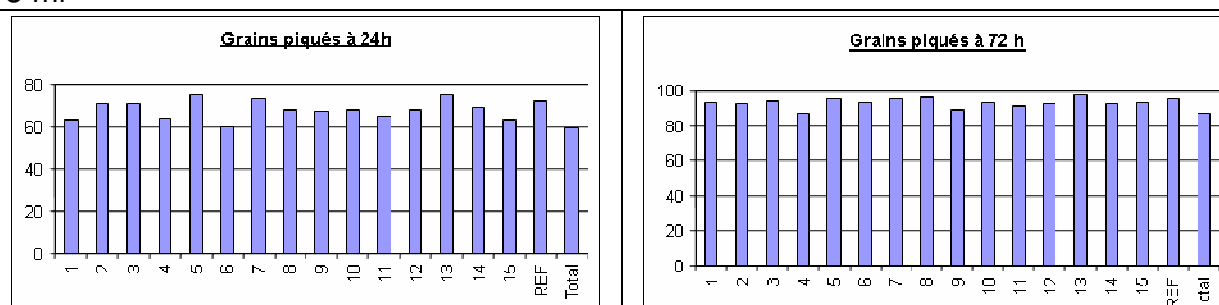
4 ml



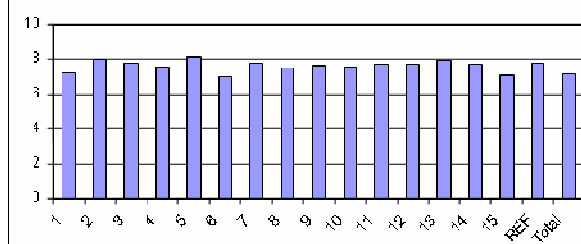
Indices de germination



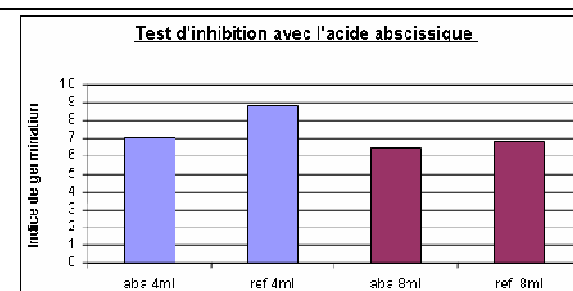
8 ml



Indices de germination

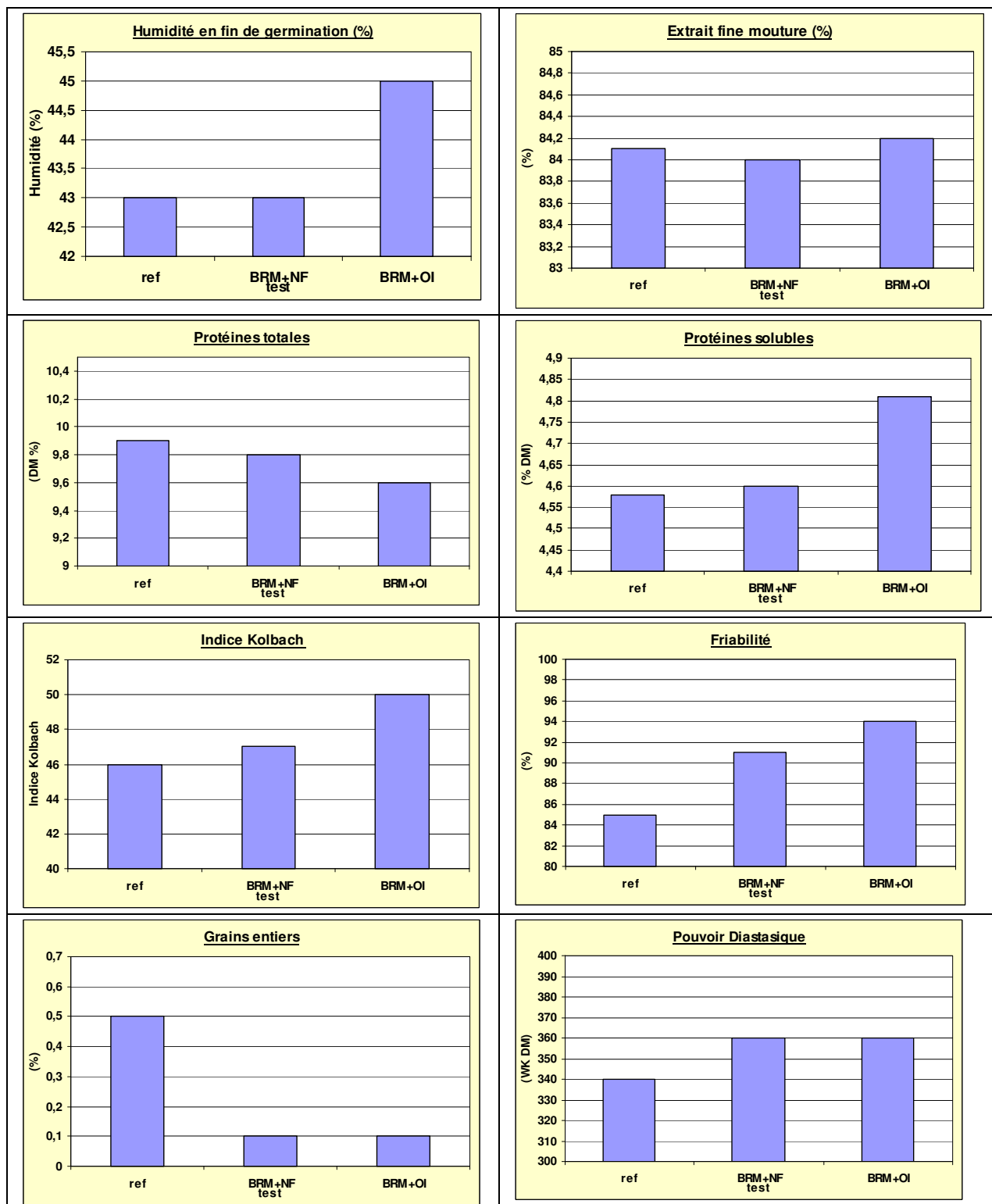


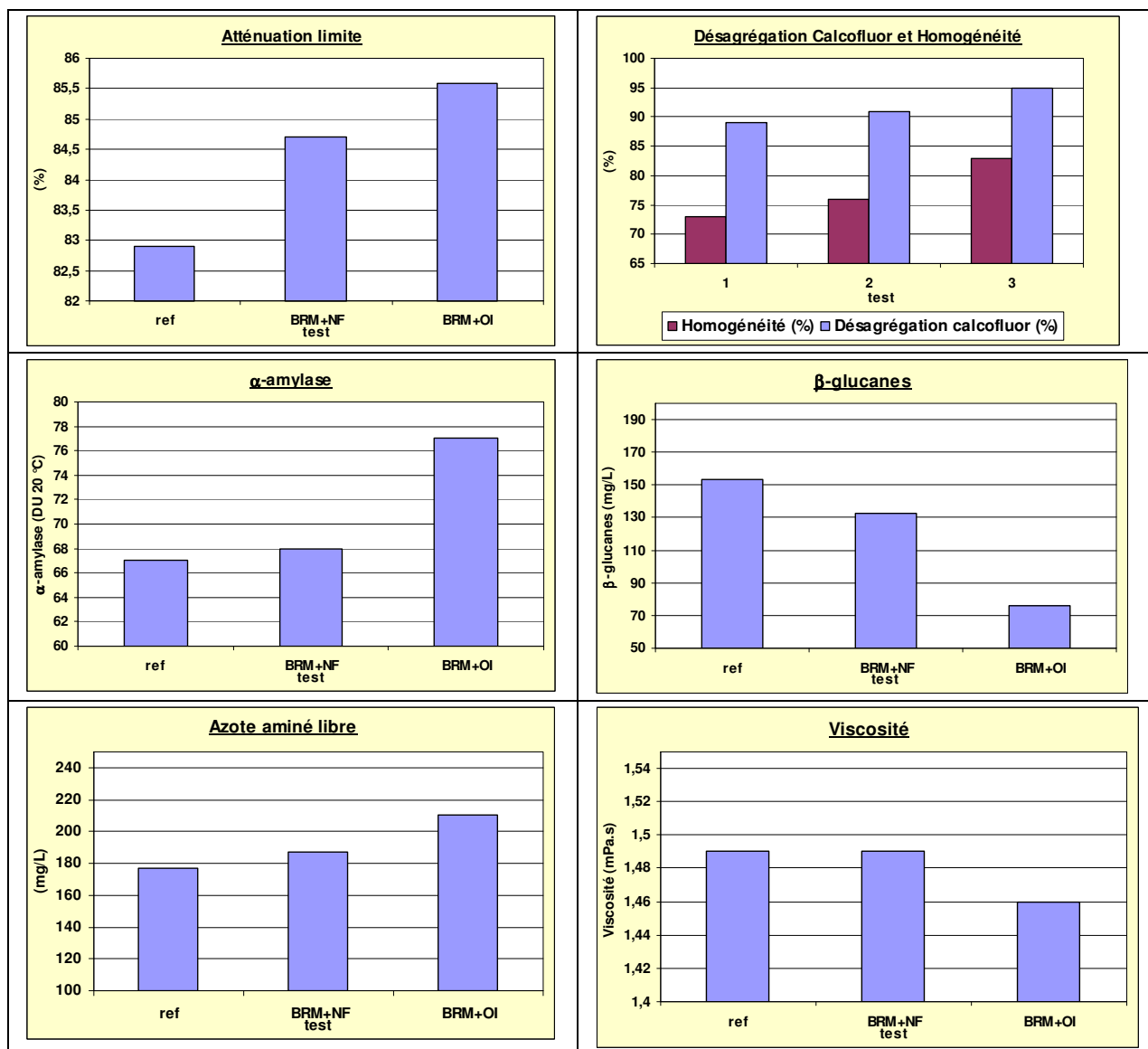
Acide abscissique :



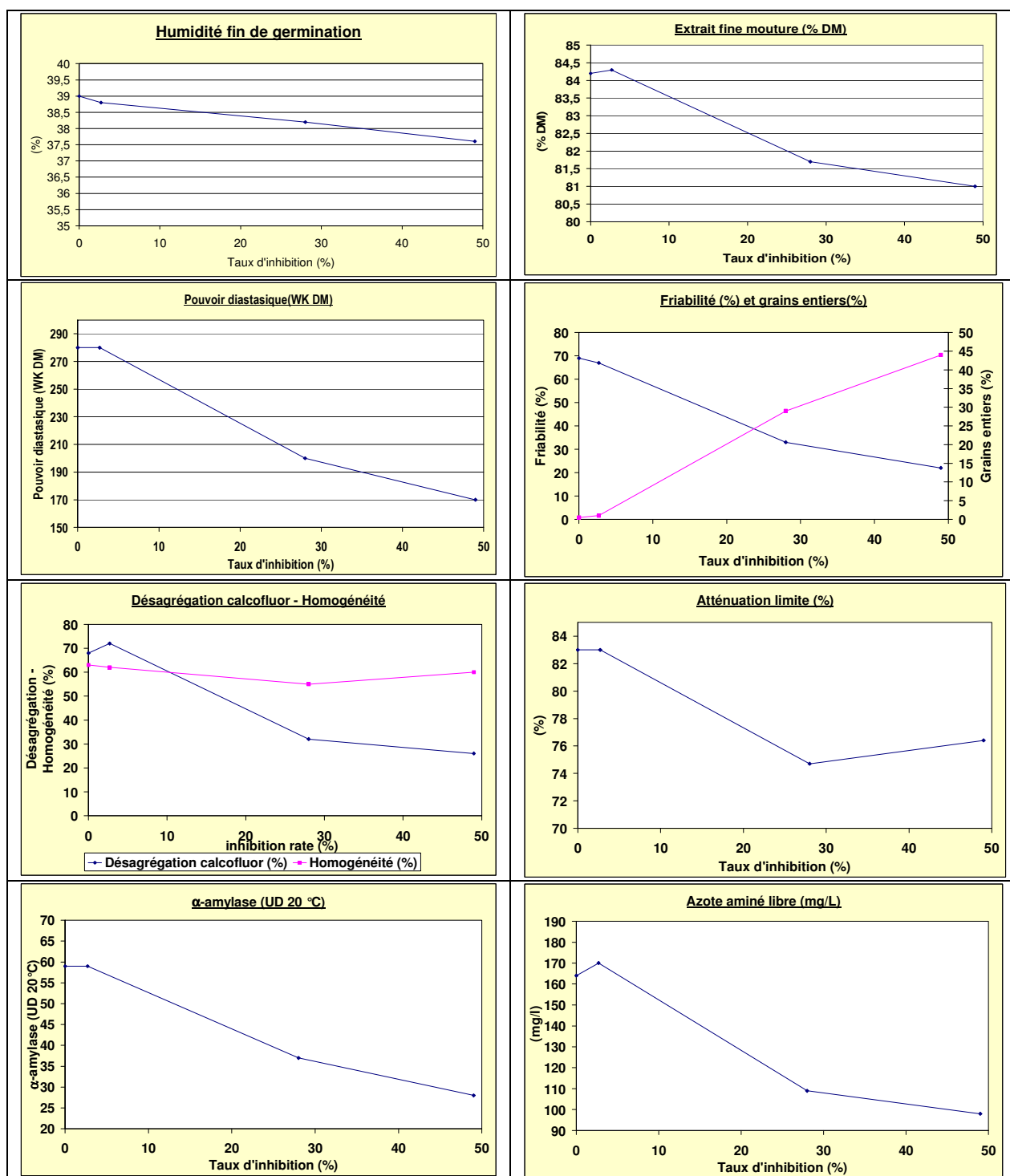
Annexe 5: Résultats de traitement par BRM à l'échelle de laboratoire

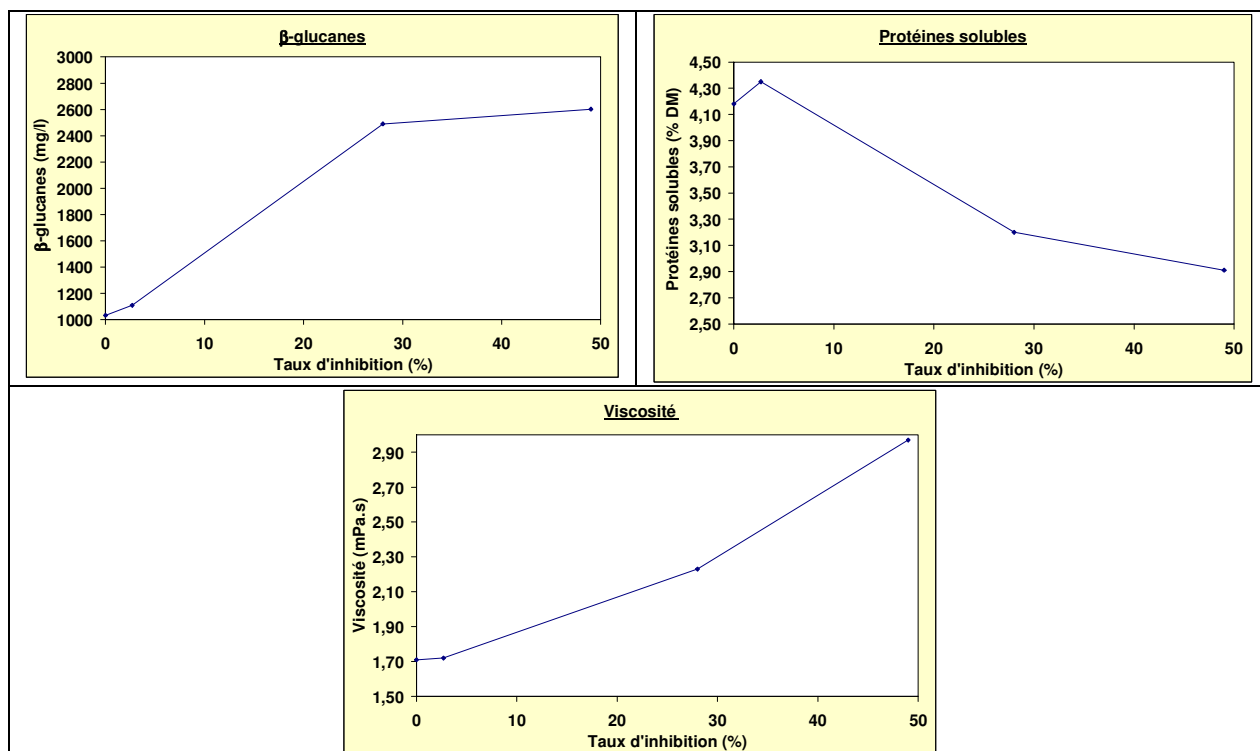
a- Qualité des malts obtenus avec les différentes eaux traitées





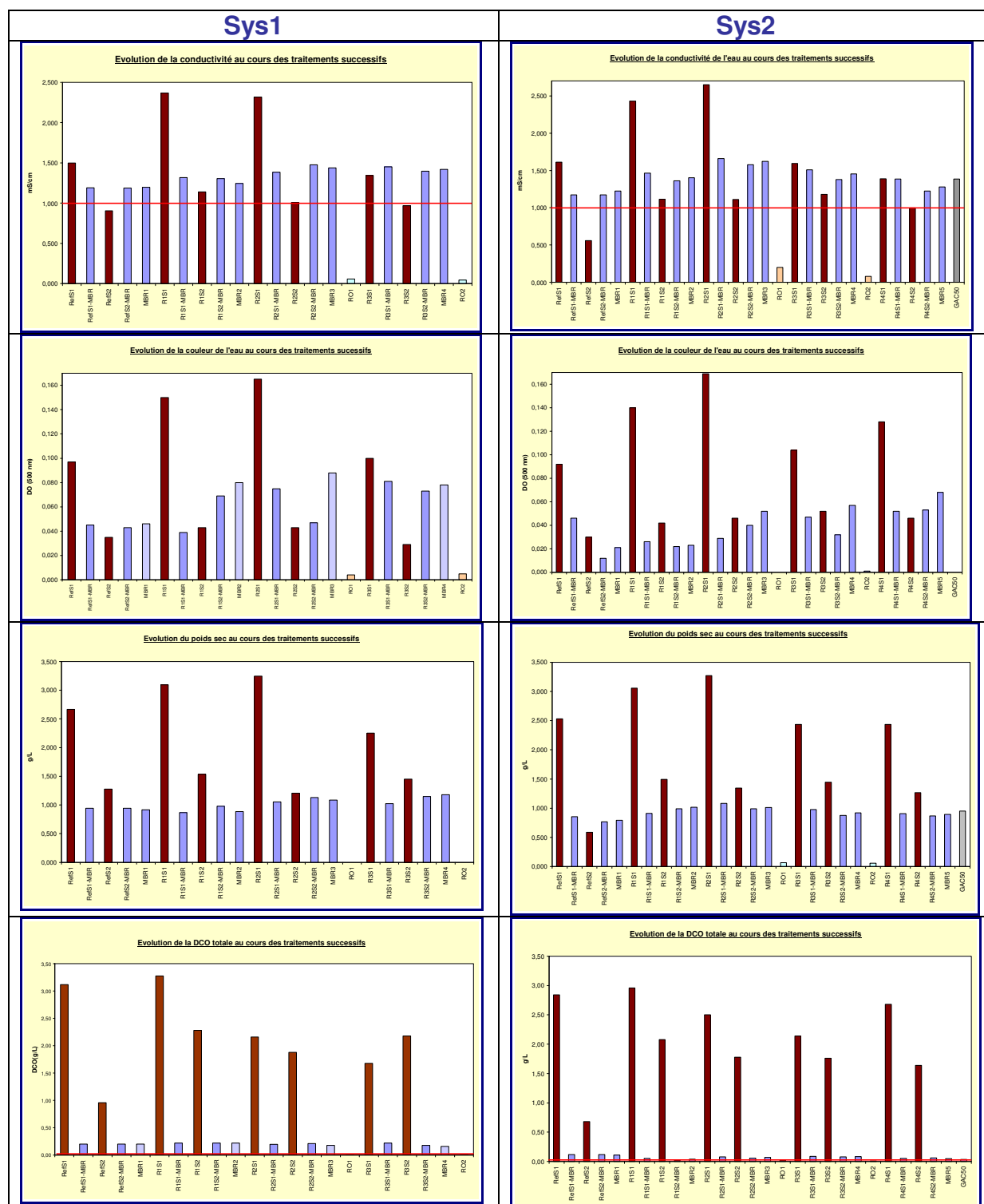
b- Qualité des malts obtenus avec des eaux ayant différents taux d'inhibition

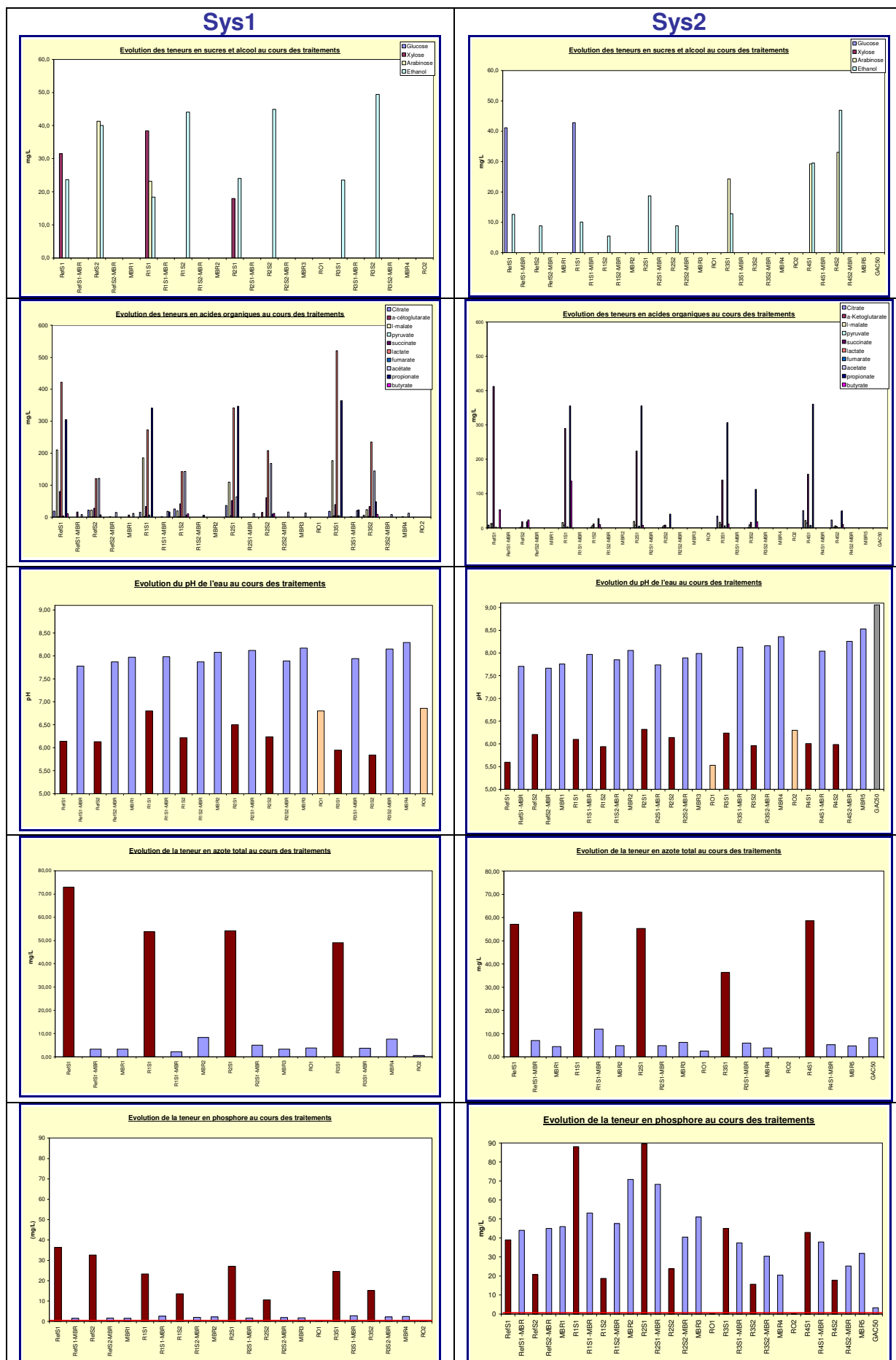


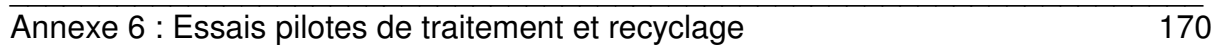


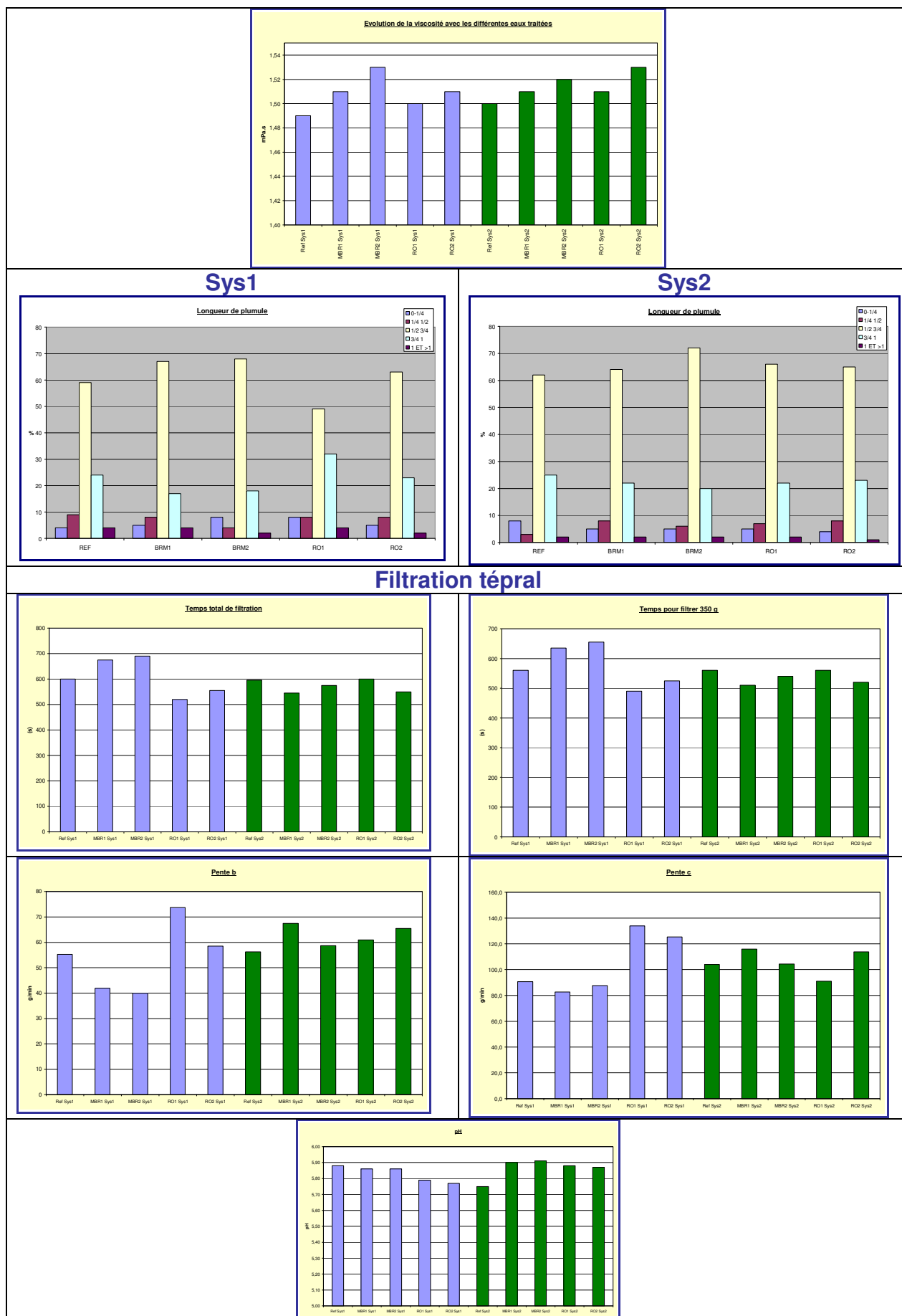
Annexe 6 : Essais pilotes de traitement et recyclage

a- Résultats d'analyses de l'eau

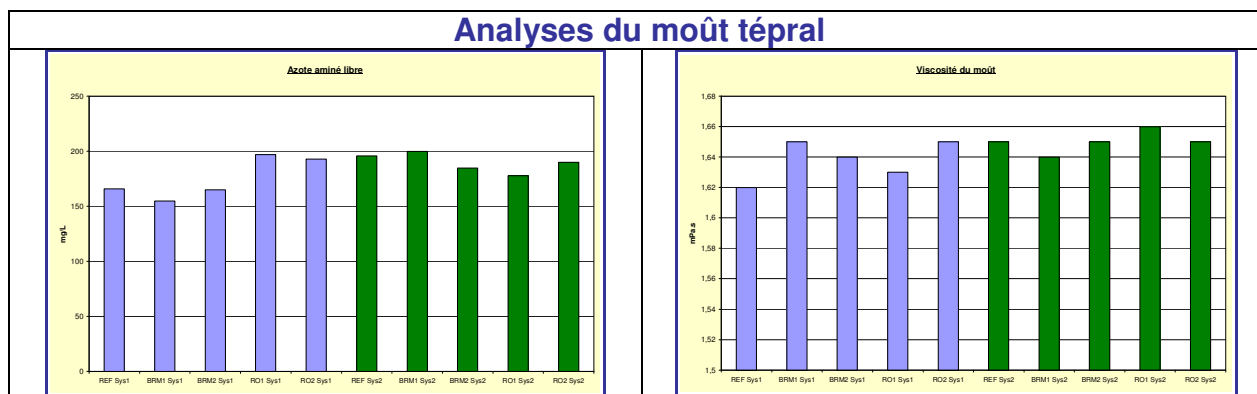








Analyses du moût tépral



c- Résultats des brassages

	<i>Ref Sys2</i>	<i>MBR2 – Sys1</i>	<i>RO2 – Sys1</i>	<i>MBR2 – Sys2</i>	<i>RO2 – Sys2</i>
<i>Saccharification (min)</i>	15	15	15	15	15
<i>Temps pour filtration + lavages (min)</i>	155	155	155	157	153
<i>Temps pour filtrer 450 kg (min)</i>	42	41	42	42	40
<i>Piochage</i>	NO	NO	NO	NO	NO
<i>Rendement de brassage (%)</i>	73,8	71,8	72,9	72,5	71,4
<i>Rendement d'extraction (%)</i>	88,3	86,5	87,6	86,6	85,5

d- Résultats moûts

	Extrait % P	pH	couleur EBC	Amertume (AU)	Saccharification
<i>Ref Sys2</i>	12,01	5,29	10,00	31,3	Saccharifié
<i>MBR2 – Sys1</i>	12,27	5,26	10,60	31,6	Saccharifié
<i>RO2 – Sys1</i>	12,11	5,27	8,40	31,6	Saccharifié
<i>MBR2 – Sys2</i>	12,17	5,27	8,85	30,3	Saccharifié
<i>RO2 – Sys2</i>	12,01	5,24	8,40	33,4	Saccharifié

	Azote aminé (mg/L)	Calcium (mg/kg)	Viscosité (mPa.s)
<i>Ref Sys2</i>	197	57,55	1,73
<i>MBR2 – Sys1</i>	194	60,14	1,77
<i>RO2 – Sys1</i>	191	66,50	1,74
<i>MBR2 – Sys2</i>	200	53,90	1,71
<i>RO2 – Sys2</i>	181	53,50	1,74

e- Résultats de fermentation

	<i>Ref Sys2</i>	<i>MBR2 – Sys1</i>	<i>RO2 – Sys1</i>	<i>MBR2 – Sys2</i>	<i>RO2 – Sys2</i>
Fermentation :					
% d'atténuation limite après 7 jours (%)	94,1	92,3	93,2	96,1	95,6
Dicétones au refroidissement (mg/l)	0,20	0,19	0,20	0,21	0,22
Jour de refroidissement	9,0	10	9	9,0	9,0
Filtration :					
nombre de filtrations	1	1	1	1	1
Oxygène dissous à l'entrée du filtre (ppm)	0,73	0,64	<0,8	0,13	0,12
ΔP en fin de filtration 1 (kg/cm ²)	0,15	0,20	0,15	0,10	0,10
Débit en fin de filtration 1 (hl/h)	10,9	10,4	10,7	10,5	10,8
Durée totale de filtration (min)	80	90	87	80	90
Nombre de levures avant filtration (millions cell/ml)	0,7	1,7	3,1	0,9	2,8

f- Résultats d'analyses des bières

	Mousse	Extrait primaire		Atténuation	
	Moyenne 3 bouteilles	(°plato)	%alcool (v/v)	%	Amertume
<i>Ref Sys2</i>	316	11,40	4,92	81,8	26
<i>MBR2 – Sys1</i>	276	11,74	5,01	80,0	27
<i>RO2 – Sys1</i>	281	11,54	5,11	83,4	26
<i>MBR2 – Sys2</i>	294	11,70	5,14	82,6	26
<i>RO2 – Sys2</i>	279	11,54	5,13	83,5	26

	Couleur EBC	pH	Diacétyle et autres α - cétones (mg/L)	CO ₂ (g/L)	Brillance	polyphénols (mg/L)
<i>Ref Sys2</i>	5,9	4,26	0,19	3,6	0,17	192
<i>MBR2 – Sys1</i>	6,3	4,29	0,17	4,5	0,14	195
<i>RO2 – Sys1</i>	5,4	4,29	0,16	5,3	0,17	198
<i>MBR2 – Sys2</i>	5,6	4,29	0,19	3,9	0,16	198
<i>RO2 – Sys2</i>	5,1	4,29	0,15	3,8	0,20	203

	Head space (ml/l)		Prédiction de la Stabilité colloïdale		
	Mean 3 bottles	SO ₂ (mg/L)	Turbidité initiale	Turbidité finale	Brillance à 8°C
<i>Ref Sys2</i>	5,7	6,1	0,68	5,95	0,18
<i>MBR2 – Sys1</i>	1,6	8,8	0,75	6,00	0,16
<i>RO2 – Sys1</i>	0,8	9,6	0,45	5,50	0,21
<i>MBR2 – Sys2</i>	2,6	9,6	0,35	7,10	0,19
<i>RO2 – Sys2</i>	0,7	8,8	0,23	6,60	0,19

Annexe 7 : Paramètres fixés par la Directive 98/83/CE :

A : Paramètres microbiologiques

Paramètres	Valeur paramétrique (nombre/100 ml)
Escherichia coli (E. Coli)	0
Entérocoques	0

B : Paramètres chimiques

Paramètres	Valeur paramétrique	Unités
Acrylamide	0,1	µg/l
Antimoine	5	µg/l
Arsenic	10	µg/l
Benzène	1	µg/l
Benzo(a)pyrène 0	0,01	µg/l
Bore	1	mg/l
Bromates	10	µg/l
Cadmium	5	µg/l
Chrome	50	µg/l
Cuivre	2	mg/l
Cyanures	50	µg/l
1,2-dichloroéthane	3	µg/l
Epichlorhydrine	0,1	µg/l
Fluorures	1,5	mg/l
Plomb	10	µg/l
Mercure	1	µg/l
Nickel	20	µg/l
Nitrates	50	mg/l
Nitrites	0,5	mg/l
Pesticides	0,1	µg/l
Total pesticides	0,5	µg/l
Hydrocarbures aromatiques polycycliques	0,1	µg/l
Sélénium	10	µg/l
Tétrachloroéthylène et trichloroéthylène	10	µg/l
Total trihalométhanes		
(THM)	100	µg/l
Chlorure de vinyle	0,5	µg/l

C : Paramètres indicateurs

Paramètres	Valeur paramétrique	Unité
Aluminium	200	µg/l
Ammonium	0,5	mg/l
Chlorures	250	mg/l
Clostridium perfringens (y compris les spores)	0	nombre/100 ml
Couleur	Acceptable pour les consommateurs et aucun changement anormal	
Conductivité	2 500	µS cm ¹ à 20 °C
Concentration en ions hydrogène	ou = à 6,5 et ou = à 9,5	unités pH
Fer	200	µg/l
Manganèse	50	µg/l
Odeur	Acceptable pour les consommateurs et aucun changement anormal	
Oxydabilité	5	mg/l O ₂
Sulfates	250	mg/l
Sodium	200	mg/l
Saveur	Acceptable pour les consommateurs et aucun changement anormal	
Teneur en colonies à 22 °C	Aucun changement anormal	
Bactéries coliformes	0	nombre/ml
Carbone organique total (COT)	Aucun changement anormal	
Turbidité	Acceptable pour les consommateurs et aucun changement anormal	
Tritium	100	becquerel/l
Dose totale indicative	0,1	mSv/an

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

Allosio-Ouarnier, N. (1999) Caractérisation de la transformation de l'orge en malt par des méthodes de spectroscopie vibrationnelle, *Thèse INPL, spécialité : Biotechnologies et Industries Alimentaires*, Nancy

Ammadurai, G., Juang, R-S. and Lee D-J., (2002) Microbiological degradation of phenol using mixed liquors of *Pseudomonas putida* and activated sludge, *Waste Management*, **22**, 703-710

Analytica EBC, (1998) *European Brewery Convention*, Ed. Revue de la Brasserie et des Boissons, Nürnberg, Germany, 5th edition.

Assas, N., Ayed, L., Marouani, L. and Hamdi, M. (2002) Decolorization of fresh and stored-back olive-mill wastewaters by *Geotrichum candidum*, *Process Biochemistry*, **38**, 361-365

Axcell, B., Jankovsky, D. and Morrall, P. (1983) Steeping: The crucial factor in determining malt quality, *Brewers Digest*, **58**, 20-23

Aydemir, T., (2004) Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke heads, *Food Chemistry*, **87**, 59-67

Bata, A. and Lasztity, R., (1999) Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms, *Trends in Food Science and Technology*, **10**, 223-228

De-Bashan, L.E. and Bashan, Y. (2004) Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertiliser (1997-2003), *Water research*, **38**, 4222-4246

Baskin, J., M., Ludlow, C. J., Harris, T., M. and Wolf, F., T. (1967) Psoralen, an inhibitor in the seeds of *Psoralea subacaulis*, *Phytochemistry*, **6**, 1209-1213

Bathgate, G.N. (1989), Cereal in Scotch whisky production, *Cereal Science and Technology*, éd. *Aberdeen University Press*, pp 243-278.

Beeton, S. and Bull, A. T. (1989) Biotransformation and detoxification of T-2 Toxin by Soil and Freshwater Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, **55**, 190-197

Belfroid, A.C., van Drunen, M., Beek, M.A., Schrap, S.M., van Gestel, C.A.M. and Hattum, B. (1998) Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems, *Sci. Total Environ.*, **222**, 167-183

Beta, T., Rooney, L.W., Marovatsanga, L.T. and Taylor, J.R.N. (2000) Effect of chemical treatments on polyphenols and malt quality in sorghum, *Journal of Cereal Science*, **31**, 295-302

Bewley, J.D., (1997) Seed Germination and dormancy, *The Plant Cell*, **9**, 1055-1066

Boeglin, J-C. (2002) Traitements physico-chimiques de la pollution insoluble, *Techniques de l'Ingénieur*, **G1270**

Boeglin, J-C. (2001) L'eau et l'Industrie, *Techniques de l'Ingénieur*, **G1100**

Boeglin, J-C. (1998) Traitements biologiques des eaux résiduaires, *Techniques de l'Ingénieur*, **J3942**

Boeglin, J-C. (1997) Inventaire des traitements d'eaux résiduaires, *Techniques de l'Ingénieur*, **J3940**

Bolwell, G.P. and Wojtaszek, P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective, *Physiol. Molecular Plant Pathology*, **51**, 347-366

Briggs D.E. (1998) Malts and Malting, *Backie Academic and Professional*, 7986 p

Briggs D.E. (1992) Barley Germination: Biochemical changes and hormonal control, *Biochemistry*, 369-401

Brookes, P.A., Lovett, D.A. and Mac William I.C. (1976) The steeping of barley. A review of the metabolic consequences of water uptake and their practical implications, *J. Inst. Brew*, **82**, 14-26

- CAST (1989) Mycotoxins : Economic and Health Risks, *Council for Agricultural Science and Technology Task Force Report* N° 116, Ames, IA
- Cauchi, A. (1999) Protection juridique des milieux récepteurs d'eau, *Techniques de l'ingénieur*, **C4220**
- Chandra, G.S., M.O., Proudlove et E.D. Baxter (1999), The structure of barley endosperm-An important determinant of malt modification, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **vol.79**, pp 37-46.
- Chapon, L. (1960) Structure du grain d'orge : Aptitude à la trempe et friabilité du malt, *Conférence faite au Colloque de la Malterie à Maule*.
- Chavan, U.D., Shahide, F. and Naczki, M. (2001) Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents, *Food chemistry*, **75**, 509-512
- Chiemchaisri, C. and Yamamoto, K. (1994) Performance of membrane separation bioreactor at various temperatures for domestic wastewater treatment *J. Membrane Sci*, **87**, 119-129
- Chiemchaisri, C., Wong, Y.K., Urase, T. and Yamamoto, K. (1993) Organic stabilisation and nitrogen removal in a membrane separation bioreactor for domestic wastewater treatment, *Filtration and Separation*, **30**, 247-252
- Corbineau F. and Côme D. (1980) Physiologie végétale – Quelques caractéristiques de la dormance du caryopse d'Orge, *C. R. Sc. Paris*, **294** (III) 967-970
- Corbineau F. and Côme D. (1982) Physiologie végétale – Evolution de la dormance des semences de deux variétés d'orge au cours de leur maturation et de leur conservation au sec, *C. R. Sc. Paris*, **290** (D) 547-550
- COTE, P., BUISSON, H., POUND, C. and ARAKI, G. (1997) Immersed membrane activated sludge for the reuse of municipal wastewater, *Desalination*, **113**, 189-196
- De La Noüe, J. and De Pauw, N. (1988) The potential of microalgal biotechnology : a review of production and uses of micro-algae, *Biotech. Adv.*, **6**, 725-770

Dalshstrom, R.V., B.J. Morton et M.R. Sfat (1963), Respiration of barley during steep and germination, *Proc. Am. Soc. Brew. Chem*; pp 64-69.

Debourg, A. (1998), Cours de techniques brassicoles pour la formation approfondie, ed. Brasserie du Caroux, Nebian.

Dicarolo G., Mascolo N., Izzo A.A. and Capasso F. (1999) Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, **65** (4) 337-353

European Environment Agency (EEA)/World Health Organisation (1997) Water resources and human health in Europe, *Environmental Issues Series*, Draft

Evenari, M. (1949) The botanical review; Germination inhibitors, *Hebrew University*, **15**, 3-5

Fath A., Bethke P.C. and Jones R.L. (2001) Enzymes that scavenge Reactive Oxygen species Are Down-regulated Prior to Gibberellic Acid-Induced Programmed Cell Death in Barley Aleurone, *Plant Physiology*, **126**, 156-166

Fincher, GB (1989) Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **40**, 305-346

Fliss, M. (1996) Contribution à la maîtrise et à l'optimisation du procédé de maltage : conditions de procédé, qualités fonctionnelles et organoleptiques du malt, *Thèse INPL, spécialité : Génie des Procédés*, Nancy.

Friedler, E. (2001) Water reuse – an integral part of water resources management: Israel as a case study, *Water Policy*, **3**, 29-39

Friedman, M. (1996) Food browning and its prevention: an overview, *J. Agricult. Food Chem.*, **44** (3), 631-653

Gander, M., Jefferson, B. and Judd, S. (2000) Aerobic MBRs domestic wastewater treatment : review with cost considerations, *Separation and Purification Technology*, **18**, 119-130

Garcia Bilbao, J.L. and Hernandez Garcia, M.T. (1971) Inhibidores naturales de la germinación de los cereales. Acción de la D-galactosa, *Cerbeza y Malta*, **3**, 27-5

Gardner-Outlaw, T. and Engelman, R. (1997) Sustaining water, easing scarcity. A second update. Washington, *DC Population Action International*, 2-19

Geissler, S., Wintgens, T., Melin, T., Vossenkaul, K. and Kullmann, C. (2005) Modelling approaches for filtration processes with novel submerged capillary modules in membrane bioreactors for wastewater treatment, *Desalination*, **178**, 125-134

Gibbons, G.C. (1983) The effects of oxygen, nitrogen and carbon dioxide steeping regimes on endosperm modification and embryo growth of germinating barley seeds, *Carlsberg Res. Commun*, **48**, 35-56

Godart, H. (1999) Alimentation en eau potable – Besoins et ressources, *Techniques de l'Ingénieur*, **C4190**

Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P. and Amiot, M.J. (1996) Antioxidant compounds of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts, 445-451

Guibelin, E. (1999) Lutte contre la pollution des eaux – Traitements des boues d'épuration, *Techniques de l'Ingénieur*, **G1450**

Heller, R., Esnault, R. and Lance, C. (1995) *Physiologie végétale – Développement*, Ed. Masson, ISBN 2-225-84778-9, 248-255

Hinrichsen D., Robey, B. and Upadhyay, U.D. (1998) Solutions for a water-short world. *Population reports*, Series M, N°14, Baltimore, Johns Hopkins University of Public Health, Population Information Program, September

Höije, A., Gröndahl, M., Tommeraas, K. and Gatenholm, P. (2005) Isolation and characterization of physico-chemical and material properties of arabinoxylans from barley husks, *Carbohydrate Polymers*, **61**, 266-275

Hopkins, W.G., (2003) *Physiologie végétale*, Ed De Boek et Larcier, ISBN 2-7445-0089-5, 287-333

Hurkman, W.J. and Tanaka, C., K. (1987) The effect of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. *Plant Physiol.* **83**, 517-524

- Hurkman, W.J. and Tanaka, C., K. (1996) Effect of salt stress on germin gene expression in barley roots. *Plant Physiol.* **110**, 971-977
- Iyidogan, N.F. and Bayindirli (2004) Effect of L-cysteine, kojic acid and 4-hexylresorcinol combination on inhibition of enzymatic browning in Amasya apple juice, *J. Food Eng.*, **62**, 299-304
- Jones, RL, Jacobsen, JV, (1991) Regulation of the synthesis and transport of secreted proteins in cereal aleurone, *Int Rev Cytol*, **126**, 49-88
- Judd, S. and Jefferson, B. (2003) Membrane for industrial wastewater recovery and reuse, *Elsevier*, Oxford UK
- Karaki, G.N., (2001) Germination, sodium and potassium concentrations of barley seeds as influenced by salinity, *J. Plant Nut*, **24** (3), 511-522
- Karakus, M. (1975), Etude biochimique et technologique des réactions de brunissement au maltage, *Thèse de l'Université de Nancy I.*
- Kirby, R.M., Bartran, J. and Carr, R. (2003) Water in food production and processing: quantity and quality concerns, *Food Control*, **14**, 283-299
- Kupidlowska, E., Kowalec, M., Sulkowski, G. and Zobel, A.M. (1994) The effect of coumarins on root elongation and ultrastructure of meristamic cell protoplast, *Annals of Botany*, **73**, 525-530
- Lili Kandra, Gyemant, G., Zajacz, A. and Batta, G. (2004) Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase, *Biochemical and biophysical research communications*, **319**, 1265-1271
- Lemos M.A., Oliveira J.C. and Savaira J.A. (2000) Influence of pH on the thermal inactivation kinetics of horseradish peroxidase in aqueous solution, *Lebensm.- Wiss. u.- Technol.* **33**, 362-368
- Lenoir C., Corbineau F. and Côme D. (1986) Barley seed dormancy as related to glumella characteristics, *Physiol. Plantarum*, **68**, 301-307

- Lerici C.R. and Manzocco L. (2000) Biological activity of ethanol to its vapour pressure. Note 1: Inactivation of polyphenoloxidase in model systems, *Lebensm.-Wiss. u.- Technol.* **33**, 564-569
- Lovegrove A. And Hooley R. (2000) Gibberellin and abscissic acid signalling in aleurone, *Trends in plant science*, **5 (6)** 102-110
- Mac Entyre, E., Ruan, R. and Fulcher, R.G. (1998) Comparison of water absorption patterns in two barley cultivars, using magnetic resonance imaging. *Cereal Chemistry*, **75 (6)** 792-795
- Mac Gregor, A.W. (1991), The effect of barley structure and composition on malt quality, *Proc. EBC Congress*, pp 37-50.
- Mac Gregor, A.W. and Fincher, G.B. (1993) Carbohydrates of the barley grain. In Mac Gregor, A.W. and Bhatti, R.S. (Eds), *Barley: Chemistry and technology*. St Paul, Minnesota: American Association of cereal Chemists, Inc, pp. 70-130
- Mac Kenzie, K.S., Sarr, A.B., Mayura, K., Bailey, R., Miller, D.R., Rogers, T.D., Norred, W.P., Voss, K.A., Plattner, R.D., Kubena, L.F. and Phillips, T.D. (1997) Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone, *Food and Chemical Toxicology*, **35**, 807-820
- MacLeod, A. (1979) The physiology of malting, *Food Science and Technology a Series of Monographs*, pp 145-232
- Mac Murrough, I., Loughrey, M.J. and Hnnigan, G.P. (1983) Content of (+)-catéchin and proanthocyanidins in barley and malt grain, *J. Sci. Food. Agric.*, **34**, 62-72
- Maghribi, S.T. (1985) Recherche sur les moisissures toxigènes des orges de brasserie et des malts, *Thèse en sciences*, Université de Nancy I
- Maillard, M-N. (1996) Contribution à l'amélioration de la stabilité organoleptique de la bière: suivi du comportement de quelques anti-oxydants endogènes de l'orge et du malt, *Thèse de Doctorat, ENSIA*, 16-29

Maillard, M-N., Soum, M.H., Boivin, P. and Berset, C. (1996) Antioxidant activity of barley and malt: Relationship with phenolic content, *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, **29**, 238-244

Marcucci, M. and Tognotti, L. (2002) Reuse of wastewater for industrial needs: the Pondera case, *Resources Conservation and Recycling*, **34**, 249-259

Massart, L., Hilderson, H. and Van Sumere C. (1958) Germination inhibitors in barley, *Biochemical Department, University of Ghent., Belgium*, 7-10

Mathieu-André, C. (2000) Maîtrise de la consommation d'eau et des rejets des IAA, *Techniques de l'Ingénieur*, **F1450**

Maurel, A. (1993) Techniques séparatives à membrane. Considérations théoriques, *Techniques de l'Ingénieur*, **J2790**

Morgan, A.G., Gilland, A.A. and Smith, D.B. (1983) Some barley grain and green malt properties and their influence on malt hot water extract. II. Proteinase and moisture, *J. Inst. Brew*, **89**, 292-298

Molina-Cano, J.-L., Sopena, A., Polo, J.P., Bergareche, C., Moralejo, M.A., Swanston, J.S. and Glidewel, S.M. (2002) Relationship between barley hordeins and malting quality in a mutant of cv. Triumph. II. Genetic and Environmental effects on water uptake, *Journal of cereal Science*, **36**, 39-50

Narziss, L. (1969), The effect of germination factors on the completion of the malting process and the quality of malt, *Proc. EBC Congress, Interlaken*, pp 77-97.

Narziss, L. et G. Friedrich (1970), Influence of air rests during steeping on malt enzyme activity, *Brauwelt*, pp 229-234.

Nicolas, M.C. and Boivin, P. (1990) Influence positive et négative de la microflore sur le maltage, *Coordinateur Brasseurs-Malteurs-IFBM*, Programme d'étude

Noronha, M., Britz, T., Mavrov, V., Janke, H.D. and Chmiel, H. (2002) Treatment of spent process water from a fruit juice company for purposes of reuse: hybrid process concept and on-site test operation of a pilot plant, *Desalination*, **143**, 183-196

- Orlando, U.S., Okuda, T., Baes, A.U., Nishijima, W. and Okada, M. (2003) Chemical properties of anion exchangers prepared from waste natural materials, *Reactive and functional polymers*, **55**, 311-318
- Palma K. And Kermode A.R. (2003) Metabolism of hydrogen peroxide during reserve mobilization and programmed cell death of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone layer cells, *Free Radical Biology and Medicine*, **35 (10)** 1261-1270
- Palmer, G.H. (1989), Cereals in malting and brewing, Cereal Science and Technology, éd. Aberdeen University Press, p 61
- Piendl, A. (1976), Barley variety and malting technology as influencing factors on the properties of malt – An evaluation by means of the analysis of variance, *MBAA, Techn. Quarterly*, **13 (2)**, pp 131-141
- Podbielkowska, M., Piwocka, M., Waskowska, E., Waleza, M and Zobel, A.M. (1995) Effect of coumarin and its derivatives on mitosis and ultrastructure of meristematic cells, *Int. J. Pharmacognosy*, **33 (1)**, 7-15
- Pollock, J.R.A. and Moll, M. (1979) Brewing Science, Vol1, *Food Science and Technology*, Academic Press, London, 47-50
- Rawat M.S.M., Pant G., Prasad D., Joshi R.K. and Pande C.B. (1998) Plant growth inhibitors (Proanthocyanidins) from *Prunus armeniaca*, *Biochemical systematics and ecology*, **26**, 13-23
- Renard, C.M.G.C., Rohou, Y., Hubert, C., Della Valle, G., Thibault, J.F. and Savina, J.P. (1996) Bleaching of apple pomace by hydrogen peroxide in alkaline conditions: Optimisation and characterisation of the products, *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **30**, 398-405
- Robbins, G.S., J. Chesters et A.D. Dickson (1963), Quantitative changes in free amino acids during malting of two barley varieties, *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, pp 141-148.
- Robert, C., Richard-Forget, F., Rouch, C., Pabion, M. and Cadet, F. (1996) A kinetic study of the inhibition of palmito polyphenol oxidase by L-cysteine, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **28 (4)**, 457-463

Robinson, T., Chandran, B., Sathya Naidu, G. and Nigam, P. (2002) Studies on the removal of dyes from a synthetic textile effluent using barley husk in static batch mode and in continuous flow packed-bed reactor, *Bioresource Technology*, **85**, 43-49

Santos, V.L. and Linardi, V.R. (2003) Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents – Identification and degradation potential, *Process Biochemistry*, 1-7.

Schildbach, S. (2005) Water management in malthouses – best practice and its impact on malt quality, *Proceedings of the 30th EBC Congress (Prague)*, ed. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, pp. 1276-1290.

Schrap, S.M., Van den Henvel, H., Van der Meulen, J., Ruiter, H. and Parsons, J.R. (2000) A chemostat system for investigating pesticide biodegradation in continuous mixed bacteria cultures originating from surface water, *Chemosphere*, **40**, 1389-1397

Scriban, R. and Dupont, D. (1973), Le problème de la couleur du malt et du moût, *Proc. EBC Congress*, Salzburg, pp 57-74.

Shabala, S., Newman, I., Wilson, S. and Clark, R.(2000) Nutrient uptake patterns over the surface of germinating wheat seeds. *Aust. J. Plant. Physiol*, **27**, 89-97

Shiklomanov, I.A. (1998) Assessment of water resources and water availability in the world. Report for the comprehensive assessment of the freshwater resources of the world, United Nations, New York.

Société Malteurop (2000) Elaboration des malts utilisés en brasserie, *Techniques de l'Ingénieur*, **F6200**

Somasundaran, L. and Coats, J.R. (1991) Pesticide transformation products; fate and significance in the environment, *ACS Symposium Series n° 459*, American Chemical Society, Washington DC

Stoloff L. (1976) Occurrence of mycotoxins in food and feeds, *Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems*, American Chemical Society, Washington, DC, 23-50

Sudakin, D. L. (2003) Trichothecenes in the environment: relevance to human health (Minireview), *Toxicology letters*, **143**, 97-107

- Urbain, V., Manem, J., Mobarry, B., de Silva, V.D.G., Stahl, D. and Rittman, B.E. (1997) *International Symposium on Environmental Biotechnology: 94th Event of the European Federation of Biotechnology*
- Van Beckum, J., M., M. and Wang, M., (1994) Effect of short chain fatty acids on physiology of barley grains cv . triumph with different level of dormancy, *Plant Sciences*, **102**, 153-160
- Van't Oever, R. (2005) Is submerged best?, *Filtration and Separation*, **42**, 24-27
- Varga, J., Rigo, K. and Téren, J. (2000) Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species, *International Journal of Food Microbiology*, **59**, 1-7
- Varga, J., Péteri, Z., Tabori, K., Téren, J. and Vagvölgyi C., (2005) Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates, *International Journal of Food Microbiology*, **99**, 321-328
- Wain, R.L. (1975) Review Lecture; Some developments in research on plant growth inhibitors, *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **191**, 335-352
- Waller, H. (1967), Respiratory quotient of germinating barley, *Brauwissenschaft*, pp 41-47.
- Wei, Y.S., Van Houten, R.T., Borger, A.R., Eikelboom, D.H. and Fan, Y. (2003) Minimization of excess sludge production for biological wastewater treatment, *Water Research*, **37**, 4453-4467
- Yanagida, A., Kanda, T., Shoji, T., Ohnishi-Kameyama, M. and Nagata, T. (1999) Fractionation of apple procyanidins by size exclusion chromatography, *Journal of chromatography A*, **855**, 181-190
- Young, J.C., Zhu, H. and Zhou, T. (2006) Degradation of trichothecen mycotoxins by aqueous ozone, *Food and Chemical Toxicology*, **44**, 417-424
- Zhang, S., Van Houten, R., Eikelboom, D. H., Doddema, H., Jiang, Z. and Wang, J. (2003) Sewage treatment by a low energy membrane bioreactor, *Bioresource Technology*, **90**, 185-192

Zobel, A.M. and Brown, S.A. (1995) Coumarins in the interactions between the plant and its environment, *Allelopathy Journal*, **2** (1), 9-20

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Christophe DAGOT, Professeur, ENSIL, Limoges

Monsieur Nicolas ROCHE, Professeur, IUT, Marseille

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame GUIGA Wafa

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Identification des inhibiteurs de la germination de l'orge et Mise au point d'un procédé
de traitement des eaux de trempé en malterie en vue de leur recyclage"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés biotechnologiques et alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 02 novembre 2006

Le Président de l'I.N.P.L.,

L. SCHUFFENECKER

Par délégation
Le Secrétaire Général,

J.Y. RIVIERE

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

Résumé :

Les industries alimentaires sont particulièrement concernées par la problématique de la gestion des ressources en eau, car elles produisent des quantités importantes de rejets pollués. Le présent travail s'intéresse au cas particulier des malteries, qui rejettent – essentiellement à l'étape de trempe – la quasi-totalité de l'eau utilisée. Le principal objectif est de recycler ces eaux dans cette même étape de trempe. Dans un premier temps, l'impact négatif de ces eaux sur la qualité du malt fini a été mis en évidence. En fait, la réutilisation de ces eaux a eu comme principale conséquence un retard de la prise d'eau par le grain et un retard de la germination. Ensuite, l'étude de la composition des eaux de trempe a permis d'une part de caractériser ces rejets et d'autre part d'identifier – parmi les substances présentes – les inhibiteurs de la germination de l'orge : il s'agit des produits intermédiaires des réactions d'oxydation et de polymérisation des composés phénoliques. Une méthode simple a été mise au point afin de quantifier l'effet inhibiteur des eaux de trempe. L'étape suivante a consisté à mettre au point – à l'échelle de laboratoire – un procédé de traitement des eaux de trempe, dans l'objectif d'épurer ces rejets et d'en éliminer les molécules responsables du retard de germination. Ce procédé est basé sur un couplage entre traitement biologique et traitement membranaire (micro, nano-filtration, avec ou sans osmose inverse comme traitement complémentaire). Le recyclage des eaux traitées dans l'étape de trempe a permis d'obtenir des malts de bonne qualité. La substitution de l'étape d'osmose inverse – seule efficace pour l'obtention d'eau potable mais coûteuse – par un traitement au charbon actif a aussi donné des résultats satisfaisants. Des essais menés à l'échelle pilote – avec des membranes externes d'ultrafiltration et des membranes immergées de microfiltration – ont permis de confirmer ces résultats. Les malts, moûts et bières ainsi obtenus avaient des qualités comparables à celles d'un essai témoin. Les résultats obtenus aux échelles de laboratoire et pilote étant encourageants, la validation industrielle de ce procédé est en cours.

Mots clés :

Malterie, traitement des eaux, inhibition, germination, recyclage, trempe.

Abstract :

Food industries are particularly concerned by water resource management, as far as they produce important volumes of polluted wastes. This work focuses on the particular case of malt industries, which reject nearly the whole quantities of steeping waters. The main objective is to recycle these waters into the steeping step. First, the negative effect of these waters on the steeping quality and the final malt quality was proven. In fact, the main consequence of steep water reuse was a delay on water uptake by the grain and a delay of the germination. The characterisation of steep-out waters allowed to identify the substances implied in the germination inhibition phenomenon : they are intermediates of oxidation and polymerisation of phenolic compounds. A simple method was developed for the quantification of the inhibitory effect of steep-out waters. A laboratory scale treatment process was then set up, with the aim to improve the quality of these effluents and to remove the germination inhibitors. This process combines a biological treatment and a membrane technology (MF, NF with or without reverse osmosis as complementary treatment). Recycling these treated waters into the steeping step allowed to obtain a good malt quality. Using activated carbon instead of reverse osmosis – efficient for potable water obtention but too costly – was also satisfactory. Pilot scale trials carried out with external ultrafiltration and immersed microfiltration membranes allowed to confirm these results. Malts, worts and beers obtained showed qualities comparable to a reference test. As soon as these laboratory scale and pilot scale results are encouraging, industrial validation of this process is in progress.

Key words :

Malting plant, Water treatment, inhibition, germination, recycling, steeping.