



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITE DE METZ

THESE

présentée pour l'Obtention du Grade
de Docteur de Spécialité (3^e cycle)
en Chimie Moléculaire

ETUDE DU COMPORTEMENT DES POLYPHENOLS
AU COURS DE LA FABRICATION DE LA BIÈRE
IDENTIFICATION ET SYNTHÈSE

par

Gilles FONKNECHTEN

Maître Es Sciences

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv	1983 002 S
Cote	S/M ₃ 83/L
Loc	Magasin

SOUTENUE LE 20 JUIN 1983
DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Mme D. CAGNIANT Professeur à l'Université de Metz

Mr B. GROSS Professeur à l'Université de Nancy I

Mr J. JERUMANIS Chargé de Cours à l'Université de Louvain la Neuve

Mr M. MOLL Directeur du Tepral
Centre de Recherche Branche Boissons BSN

Que Mme le Professeur D. CAGNIANT trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon estime pour la formation dont j'ai bénéficié, pour ses nombreuses suggestions et pour l'intérêt qu'elle a porté au présent travail.

Je remercie, pour leur étroite collaboration, Monsieur G. KIRSCH et Monsieur J.F. MULLER maîtres assistants au Laboratoire de Carbochimie et de Synthèse Organique de la Faculté des Sciences de Metz.

J'exprime à Monsieur M. MOLL, Directeur du TEPRAL, et à tout le personnel ma profonde gratitude pour m'avoir accueilli au Centre de Recherche, ce qui m'a permis d'effectuer cette thèse dans d'excellentes conditions.

Mes remerciements vont encore à Messieurs les Professeurs B. GROSS et J. JERUMANIS qui ont accepté de juger mon travail et de faire partie de mon jury de thèse.

L'identification spectroscopique des substances naturelles et de synthèse décrites dans cette étude a pu être réalisée grâce à la collaboration des services de RMN et de spectroscopie Infra-Rouge de NANCY I que Monsieur le Professeur J.J. DELPUECH et Madame N. MOLL en soient remerciés ici.

UNIVERSITE DE METZ

PRESIDENT : J. DAVID

VICES-PRESIDENTS : D. CAGNIANT - M. GASSER - C. LEMEL

SECRETAIRE GENERAL : J. DIEBOLD

UER " Sciences exactes et naturelles "

DIRECTEUR DE L'UER : M. BONN

PROFESSEURS : R. BARO

M. BERVEILLER

D. CAGNIANT

C. CARABATOS

M. CERTIER

A. CHARLIER

A. CHAUVIN

P. COUSOT

J.P. DAX

D. DURAND

P. FALLER

PROFESSEURS : J.J. HEITZMANN

----- R. KLEIM

J. LERAY

J.P. LONCHAMP

A. MOLINARI

B. MUTEL

M. NOURISSON

D. PAQUER

G. PLUVINAGE

G. RHIN

C. ROGER

A. ROUX

B. SCHMITT

A. SEC

C. TAVARD

E. UZAN

J.D. WEBER

E. WENDLING

PLAN

CHAPITRE I - INTRODUCTION GENERALE Page 1

I-1. Classification des polyphénols naturels Page 2

I-2. Les polyphénols naturels Page 4

I-2.1. Les acides phénoliques Page 4

I-2.2. Les flavonoïdes Page 5

I-2.3. Polymères de flavonoïdes Page 8

I-3. Biosynthèse des proanthocyanidines Page 14

CHAPITRE II - STABILITE COLLOIDALE DE LA BIERE Page 15

II-1. Constituants du trouble au froid Page 16

II-2. Influence des proanthocyanidines sur
la formation des troubles apparaissant
au cours de la conservation de la bière Page 17

II-3. Etat actuel des connaissances sur le
mécanisme de formation des troubles Page 18

II-4. But du travail Page 23

CHAPITRE III - PROANTHOCYANIDINES B3 ET B4 OBTENTION -----	ET CARACTERISATION SPECTROSCOPIQUE	Page 25
III-1.	Extraction	Page 26
III-2.	Synthèse des proanthocyanidines B3 et B4 ..	Page 28
III-3.	Caractérisation spectroscopique	Page 30
III-3.1.	Spectrographie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	Page 30
III-3.2.	Spectrographie de masse (SM)	Page 35
III-4.	Partie expérimentale	Page 42
CHAPITRE IV - METHODE D'ANALYSE DES POLYPHENOLS PAR -----	CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)	Page 44
IV-1.	Introduction	Page 45
IV-2.	Essais préliminaires	Page 47
IV-2.1.	Interaction PVP-Polyphénols	Page 47
IV-2.1.	Interaction Nylon 66-Polyphénols	Page 49
IV-3.	Mode opératoire adopté	Page 50

CHAPITRE V - EVOLUTION DES POLYPHENOLS AU COURS

----- DE LA FABRICATION DE LA BIÈRE Page 51

V-1. Evolution au cours du maltage Page 52

V-2. Evolution au cours du brassage
et de la conservation Page 55

V-3. Discussion Page 62

CHAPITRE VI - ETUDE EN SOLUTIONS MODELES DE LA

----- CATECHINE, EPICATECHINE ET B3
SOUMISES -AUX CONDITIONS DU BRASSAGE Page 64

VI-1. Réaction Catéchine-Epicatéchine Page 65

VI-2. Réaction B3-Catéchine Page 66

CHAPITRE VII - ETUDE DE L'OXYDATION ENZYMATIQUE PAR

----- LA POLYPHENOLOXYDASE (PPO) DE LA
CATECHINE, EPICATECHINE, B3 ET B4 Page 71

VII-1. Etude théorique de la
réaction enzymatique Page 73

VII-2. Discussion des résultats expérimentaux Page 75

CHAPITRE VIII - ETUDE DU TROUBLE PERMANENT

----- DE LA BIÈRE Page 78

VIII-1. Introduction Page 79

VIII-2. Recherche des Glucides Page 80

VIII-3. Recherche des Acides aminés Page 81

VIII-4. Recherche des Polyphénols adsorbés Page 81

VIII-5. Recherche des polyphénols liés Page 84

VIII-6. Conclusion Page 85

CHAPITRE IX - EVOLUTION DES POLYPHENOLS LIBRES ET

----- LIÉS AU COURS DE LA FABRICATION DE
LA BIÈRE ET DE SA CONSERVATION Page 88

IX-1. Introduction Page 89

IX-2. Résultats et interprétation Page 90

CHAPITRE X - CONCLUSION GENERALE Page 92

ANNEXE I - BIOSYNTHESE DES PROCYANIDINES OLIGOMERES ... Page 95

AI-1. Introduction	Page 96
AI-2. Schéma de Birch	Page 96
AI-3. Schéma de Haslam	Page 98
AI-4. Schéma de Roux	Page 100
AI-5. Hydroxyle sur le cycle B	Page 100

ANNEXE II - ETUDE EXPERIMENTALE DE LA METHODE

----- D'ANALYSE DES POLYPHENOLS Page 102

AII-1. Interaction PVP-Polyphénols	Page 103
AII-2. Interaction Nylon 66-Polyphénols	Page 105
AII-3. Méthode d'analyse	Page 105

ANNEXE III - EVOLUTION DES POLYPHENOLS AU COURS

----- DE LA FABRICATION DE LA BIERE Page 116

AIII-1. Procédé de fabrication de la bière en pilote	Page 117
AIII-2. Tableaux et courbes résultant du dosage des polyphénols au cours d'un brassin et de la conservation de la bière	Page 121

ANNEXE IV - TENEUR EN POLYPHENOLS SUR LES	
----- HOUBLONS ET EXTRAITS UTILISES	
POUR LES ESSAIS PILOTES	Page 130

AIV-1. Introduction	Page 131
---------------------------	----------

AIV-2. Interprétation et résultats	Page 131
--	----------

AIV-3. Chromatogrammes	Page 132
------------------------------	----------

ANNEXE V - ETUDE EXPERIMENTALE DE L'OXYDATION	
----- PAR LA POLYPHENOLOXYDASE (PPO) DE LA	
CATECHINE, EPICATECHINE, B3 ET B4	Page 137

AV-1. Matériels et méthode	Page 138
----------------------------------	----------

AV-2. Résultats et courbes	Page 140
----------------------------------	----------

ANNEXE VI - ETUDE DU TROUBLE PERMANENT DE LA BIERE ...	Page 145

AVI-1. Sucres	Page 146
---------------------	----------

AVI-2. Acides Aminés (protéines)	Page 147
--	----------

AVI-3. Polyphénols	Page 148
--------------------------	----------

BIBLIOGRAPHIE	Page 149
---------------------	----------

INDEX DES TABLEAUX

CHAPITRES

I	- Formules développées des proanthocyanidines du groupe B	Page 10
II	- Résultats de l'interaction Nylon 66- Polyphénols .	Page 49
III	- Evolution de la B3 à ébullition	Page 69
IV	- Evolution de la B3 à 80°C	Page 69
V	- Résultats expérimentaux de l'oxydation par la polyphénoloxydase de la Catéchine, Epicatechine, B3 et B4	Page 75

ANNEXES

1	- Récapitulatif des solutions préparées pour l'interaction PVP-Polyphénols	Page 103
2	- Résultats de l'interaction PVP-Catéchine	Page 104
3	- Résultats de l'interaction PVP-B3	Page 104
4	- Etalonnage, relation entre concentration et hauteur du pic	Page 114
5	- Etalonnage, relation entre concentration et surface du pic	Page 115
6	- Evolution de la Prodelphinidine par variété	Page 123

7	- Evolution de la B3 par variété	Page 124
8	- Evolution de la Catéchine par variété	Page 125
9	- Evolution de l'Epicatechine par variété	Page 126
10	- Teneur en Polyphénols de divers houblons et extraits	Page 127
11	- Vitesse de réaction Polyphénols - PPO en f(C)	Page 141
12	- Vitesse de réaction Polyphénols - PPO en f(T)	Page 142

INDEX DES COURBES

CHAPITRES

I	- % de Catéchine adsorbée sur PVP	Page 48
II	- % de B3 adsorbée sur PVP	Page 48
III	- Evolution de la Catéchine pendant la germination de l'orge	Page 53
IV	- Evolution de la B3 pendant la germination de l'orge	Page 54
V	- Evolution de la Prodelphinidine par variété	Page 57
VI	- Evolution de la B3 par variété	Page 58

VII	- Evolution de la Catéchine par variété	Page 59
VIII	- Evolution de l'Epicatechine par variété	Page 60
IX	- Evolution de la Prodelphinidine, B3, Catéchine et Epicatechine pour une variété d'orge	Page 61
X	- Evolution de la Catéchine pendant l'ébullition en f(pH)	Page 67
XI	- Evolution de la Catéchine à 80°C en f(pH)	Page 67
XII	- Evolution de l'Epicatechine pendant l'ébullition en f(pH)	Page 68
XIII	- Evolution de l'Epicatechine à 80°C en f(pH)	Page 68
XIV	- Evolution de la B3 à ébullition et à 80°C	Page 69
XV	- Vitesse de réaction Polyphénols - PPO en f(T)	Page 76
XVI	- Vitesse de réaction Polyphénols - PPO en f(C)	Page 77
XVII	- Etalonnage en Glucose	Page 80
XVIII	- Suivi des Proanthocyanidines libres et liées au cours du procédé de fabrication de la bière ...	Page 90
XIX	- Suivi de la B3 libre au cours du procédé de fabrication de la bière	Page 90

ANNEXES

1 à 8	- Evolution Prodelphinidine, B3, Catéchine et Epicatechine par malt	Page 126
-------	--	----------

9	- Oxydation de la Catéchine	Page 142
10	- Oxydation de l'Epicatechine	Page 143
11	- Oxydation de la B3	Page 143
12	- Oxydation de la B4	Page 144

INDEX DES FIGURES

CHAPITRES

I	- Spectre RMN ¹ H de la B3 décaacétylée	Page 31
II	- Spectre RMN ¹ H de la B4 décaacétylée	Page 33
III	- Spectre RMN ¹³ C de la B3 et B4 libres	Page 34
IVa	- Spectre de Masse par ionisation chimique de la catéchine	Page 37
IVb	- Spectre de Masse par impact LASER (ion +) de la catéchine	Page 37
Va	- Spectre de Masse par ionisation chimique de la B3	Page 38
Vb	- Spectre de Masse par impact LASER (ion +) de la B3	Page 38

Via	- Spectre de Masse par ionisation chimique de l'Epicatechine	Page 38
Vib	- Spectre de Masse par impact LASER (ion +) de l'Epicatechine	Page 38
VIIa	- Spectre de Masse par ionisation chimique de la B4	Page 39
VIIb	- Spectre de Masse par impact LASER (ion +) de la B4	Page 39
VIII	- Spectre de Masse par impact LASER (ion +) de la Catéchine, Epicatechine, B3 et B4 regroupés et non simplifiés	Page 39
IX	- Spectre de Masse par impact LASER (ion -) de la Catéchine, Epicatechine, Catéchine tétraméthoxylée et B4	Page 41
X	- Courbe théorique d'une réaction enzymatique	Page 73
XI	- Représentation de l'oxydation par la Polyphénoloxydase (PPD) d'un substrat	Page 74

ANNEXES

1	- Schéma de la biogénèse selon BIRSCH et HASLAM	Page 97
2a	- Formation de différentes proanthocyanidines à partir d'un même précurseur	Page 99
2b	- Condensation en hélice selon HASLAM	Page 99
3	- Schéma de la biogénèse selon ROUX	Page 101

INDEX DES CHROMATOGRAMMES

CHAPITRES

- I - Résultats chromatographiques de la transformation de la B3 à l'ébullition et à 80°C . Page 70
- II - Acides Aminés du trouble Page 83
- III - Acides Aminés de la bière Page 87
- IV - Hydrolyse de la B3 et de deux bières Page 91

ANNEXES

- 1 - Cônes Midkent Page 135
- 2 - Cônes Brewers Gold Page 135
- 3 - Pellets Hallertau Page 136
- 4 - Extrait éthanol Page 136
- 5 - Extrait CO₂ (Hopstabil) Page 136
- 6 - Extrait CO₂ (Pauls) Page 136

INDEX DES HISTOGRAMMES

CHAPITRES

- I - Teneur du trouble en Acides Aminés Page 82
- II - Teneur des bières en Acides Aminés Page 86

ANNEXES

- 1 - Teneur en B3 de divers houblons et extraits Page 133
- 2 - Teneur en Catéchine de divers
houblons et extraits Page 133
- 3 - Teneur en B4 de divers houblons et extraits Page 133
- 4 - Teneur en C1 de divers houblons et extraits Page 134
- 5 - Teneur en Epicatéchine de divers
houblons et extraits Page 134

C

H

A

P

I

T

R

E

S

CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

I-1. Classification des polyphénols naturels	Page 2
I-2. Les polyphénols naturels	Page 4
I-2.1. Les acides phénoliques	Page 4
I-2.2. Les flavonoïdes	Page 5
I-2.2.1. Flavonols	Page 6
I-2.2.2. Flavanes-3-ol	Page 6
I-2.2.3. Flavanes-3,4 diols	Page 7
I-2.3. Polymères de flavonoïdes	Page 8
I-2.3.1. Procyanidines dimères	Page 8
I-2.3.2. Procyanidines trimères	Page 13
I-3. Biosynthèse des proanthocyanidines	Page 14

CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

I-1. Classification des polyphénols naturels :

Les tissus végétaux contiennent un grand nombre de substances à fonction phénol dont les plus importantes sont les anthocyanes, pigments rouges et bleus des fleurs et des fruits, les flavones et leurs dérivés, pigments jaunes, enfin les tanins, produits de polymérisation.

Les composés phénoliques existent normalement dans les plantes sous forme de combinaisons. Ainsi dans le cas des flavonoïdes on rencontre fréquemment des hétérosides dans lesquels la liaison osidique fait intervenir un OH alcoolique ou un OH phénolique de la molécule de polyphénol. Dans le cas des acides-phénols, ces combinaisons sont le plus généralement des esters.

A côté de ces composés de structures simples on rencontre des produits plus complexes, de nature polymérique, plus ou moins condensés: les lignines et les tanins.

Les tanins sont des composés phénoliques de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 et qui, en plus des propriétés classiques des phénols, précipitent les alcaloïdes, la gélatine et les autres protéines.

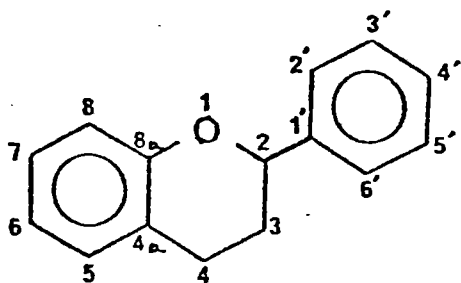
On distingue habituellement:

-Les tanins hydrolysables, molécules complexes qui font intervenir des liaisons de type ester et donnent, par hydrolyse, une fraction glucidique et une fraction phénolique: acide gallique, acide ellagique.

-les tanins condensés, dont les propriétés dépendent de la nature des molécules élémentaires qui interviennent dans leur composition, du mode d'enchaînement de ces molécules et surtout de leur taille et de leur poids moléculaire.

Les propriétés tanantes d'un échantillon, c'est à dire son aptitude à se combiner aux protéines, augmentent du dimère au décamère et diminuent ensuite. Lorsque la molécule devient trop volumineuse, elle perd la propriété de s'unir énergiquement aux protéines; elle peut même devenir insoluble (1).

GEISSMAN et HINREINER (2) ont proposé l'expression "flavonoïdes" pour désigner tous les pigments qui ont un squelette carboné du type



avec ou sans double liaison dans la partie hétérocyclique.

FREUDENBERG et WEINGES (3) désignent toutes les substances incolores isolées des plantes, qui forment des anthocyanidines de coloration rouge caractéristique par chauffage en milieu acide, du nom de "proanthocyanidines". La découverte des proanthocyanidines remonte aux travaux de TSWETT (4) ; cet auteur observe que le chauffage en milieu acide de nombreux extraits végétaux incolores donne naissance à une coloration rouge intense et que ces colorants rouges présentent des propriétés chimiques fort semblables à celles des anthocyanidines naturelles.

WEINGES (5) réserve les termes "leucoanthocyanidines" aux proanthocyanidines monomères et "proanthocyanidines condensées" aux différents dimères flavanes-3-ols et oligomères supérieurs. HASLAM (6) préconise cette nomenclature.

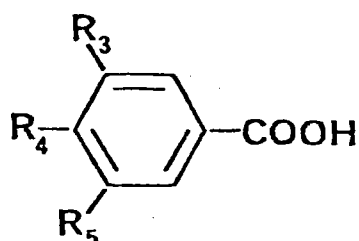
Il est bon de rappeler ici la signification du terme "anthocyanogène", introduit par HARRIS (7) en 1959 et utilisé depuis dans la littérature brassicole; elle est équivalente à la définition générale des proanthocyanidines de FREUDENBERG et WEINGES.

I-2. Les polyphénols naturels :

Selon la structure et les propriétés des polyphénols, des groupes bien définis ont été déterminés. Les polyphénols trouvés dans les matières premières de la bière appartiennent à trois groupes principaux (8) :

I-2.1. Les acides phénoliques :

-dérivant de l'acide benzoïque ($R_3=R_4=R_5=H$)



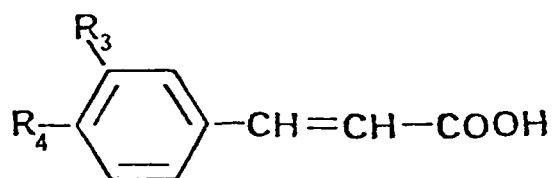
-acide gallique $R_3=R_4=R_5=OH$

-acide protocatéchique $R_3=R_4=OH$, $R_5=H$

-acide vanillique $R_3=OCH_3$, $R_4=OH$, $R_5=H$

-acide syringique $R_3=R_5=OCH_3$, $R_4=OH$

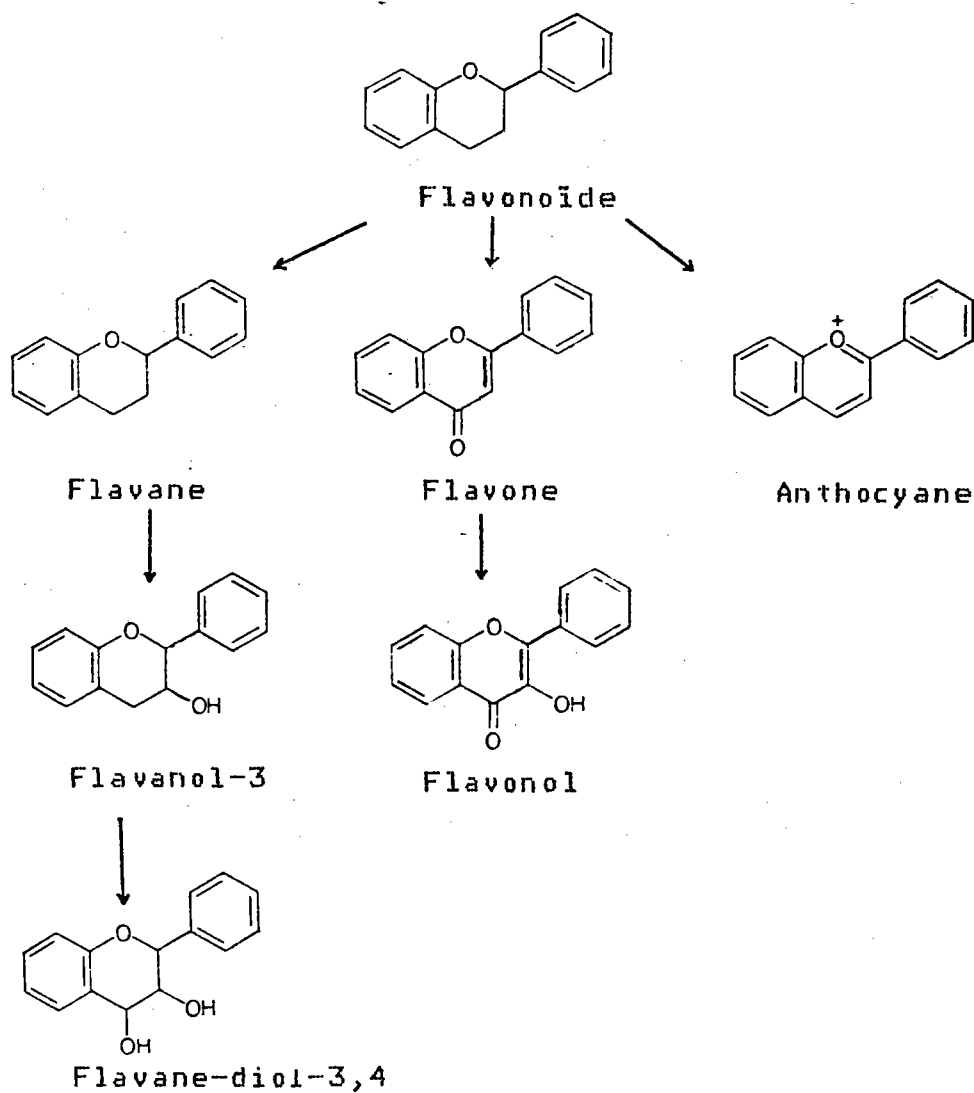
-dérivant de l'acide cinnamique ($R_3=R_4=H$)



-acide caféique $R_3=R_4=OH$

-acide férulique $R_3=OCH_3$, $R_4=OH$

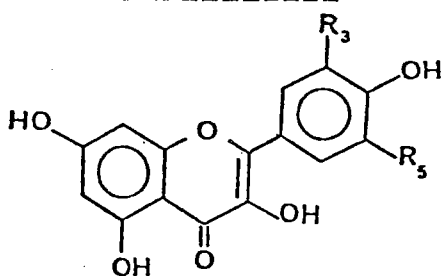
I-2.2. Les flavonoïdes : (dérivés du squelette général du
----- phényl-2 4H [1] benzopyrane)



Dans chaque classe, les substances se différencient par la position et le nombre de groupements OH qui peuvent être alcoylés ou engagés dans une liaison osidique. Les flavanes se différencient des autres composés phénoliques en ce sens qu'ils existent dans la nature sous forme d'aglycones, le plus souvent polymérisés, alors que les flavones, flavonols et composés voisins sont toujours sous forme hétérosidique.

Les flavonoïdes peuvent être divisés en :

I-2.2.1. Flavonols

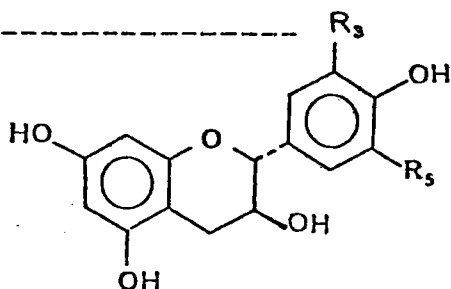


-quercétine $R_3=OH$, $R_5=H$

-kaempférol $R_3=R_5=H$

-myricétine $R_3=R_5=OH$

I-2.2.2. Flavanes-3-ol :

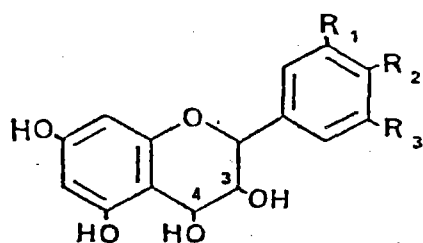


-catéchine $R_3=OH$, $R_5=H$

-gallocatéchine $R_3=R_5=OH$

-afzélédrine $R_3=R_5=H$

I-2.2.3. Flavanes-3,4 diols ou leuco anthocyanidines :



-leuco pélargonidine $R_1=R_3=H$

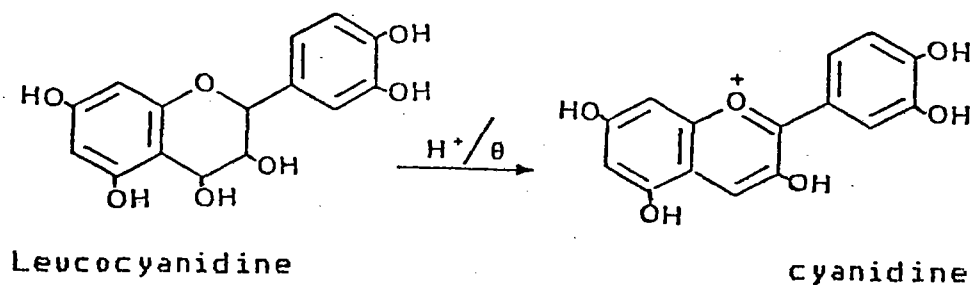
$R_2=OH$

-leuco cyanidine $R_3=H$

$R_1=R_2=OH$

-leuco delphinidine $R_1=R_2=R_3=OH$

Les leuco anthocyanidines donnent naissance par hydrolyse acide à chaud à des anthocyanidines colorées (pélargonidine, cyanidine, delphinidine).



I-2.3. Polymères de flavonoïdes : (proanthocyanidines ----- condensées)

I-2.3.1. Les proanthocyanidines dimères : -----

Les polyhydroxy-flavanes-3,4 diols (leucoanthocyanidines) ne constituent pas les seules proanthocyanidines présentes dans le règne végétal. WEINGES (9,10) démontre que de nombreuses proanthocyanidines issues de fruits sont constituées par l'association de deux unités flavonoïdiques, c'est à dire qu'elles se scindent sous l'action des acides en deux molécules (catéchine et cyanidine). Ces substances ont été appelées proanthocyanidines dimères. Le rendement des fruits en proanthocyanidines dimères dépend principalement de leur degré de maturation. Les fruits mûrs contiennent moins de proanthocyanidines dimères que les fruits verts.

Ces proanthocyanidines ont d'abord été classées en fonction de l'anthocyanidine qu'elles libèrent, c'est à dire propélarгонidine, procyanidine, prodelfphinidine... Cependant, les procyanidines sont les plus rencontrées dans la nature.

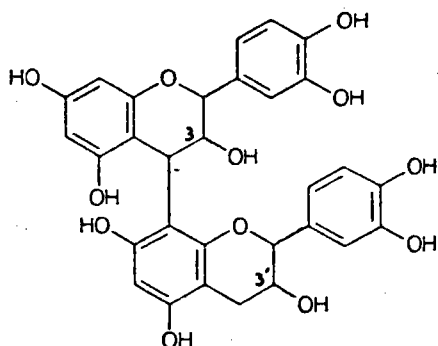
I-2.3.1.1. Les procyanidines dimères naturelles: -----

Ce sont des procyanidines dimères qui, outre la cyanidine, donnent par dégradation soit la (+) catéchine, soit la (-) épicatechine. Grâce aux spectrométries de masse (SM) et de résonance magnétique nucléaire (RMN), WEINGES (11) a montré que ces composés se subdivisent en deux groupes distincts :

- le groupe B comprenant les substances de composition $C_{30}H_{26}O_{12}$,
- le groupe A comprenant les substances de composition $C_{30}H_{24}O_{12}$.

I-2.3.1.1.1. Procyanidines C₃₀ H₂₆ O₁₂ (groupe B) :

A ce groupe appartiennent les biflavanes qui possèdent huit fonctions phénoliques et deux fonctions alcooliques. L'examen des spectres RMN des dérivés décaacétylés et du spectre de masse des dérivés octa O-méthylés et diacétylés-3, 3' permet d'établir la structure des procyanidines du groupe B



Cette structure est caractérisée par la présence d'une simple liaison C-C entre les deux unités flavonoïdiques. La molécule possède cinq centres asymétriques ; elle est donc susceptible de se présenter sous $2^5=32$ formes optiquement actives et sous 16 mélanges racémiques.

Par extraction alcoolique, WEINGES (11) isole 4 diastéréoisomères optiquement actifs, à savoir les procyanidines B1 à B4. Les configurations en ont été déterminées grâce à la mise en oeuvre de la RMN (12) à partir des constantes de couplage des protons hétérocycliques ternaïres. De plus, la synthèse de ces procyanidines dimères à partir de taxifoline* et de catéchine prouve leur structure et leur configuration. Par chromatographie sur gel de Sephadex LH 20, l'école de SHEFFIELD (13) isole 8 procyanidines dimères B1 à B8 dont les configurations

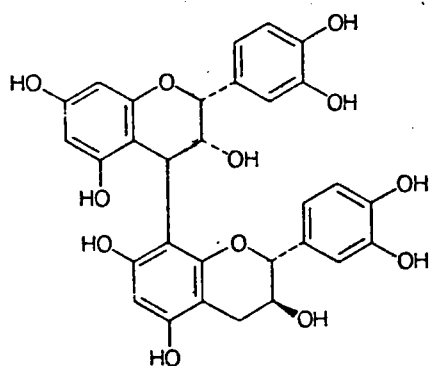
* taxifoline = dihydroquercétine

sont les suivantes :

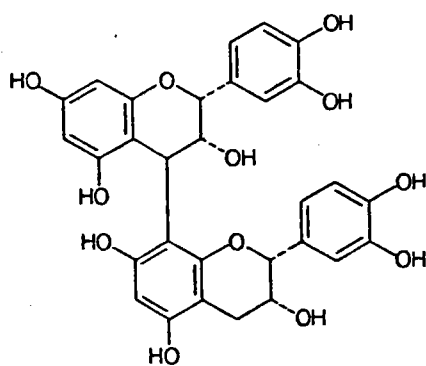
Procyanidine B1 :	(-) épicatechine	(+) catéchine
Procyanidine B2 :	(-) épicatechine	(-) épicatechine
Procyanidine B3 :	(+) catéchine	(+) catéchine
Procyanidine B4 :	(+) catéchine	(-) épicatechine
Procyanidine B5 :	(-) épicatechine	(-) épicatechine
	: (isomère de B2)	
Procyanidine B6 :	(+) catéchine	(+) catéchine
	: (isomère de B3)	
Procyanidine B7 :	(-) épicatechine	(+) catéchine
	: (isomère de B1)	
Procyanidine B8 :	(+) catéchine	(-) épicatechine
	: (isomère de B4)	

Le tableau I donne les formules développées de quelques procyanidines B.

TABLEAU I

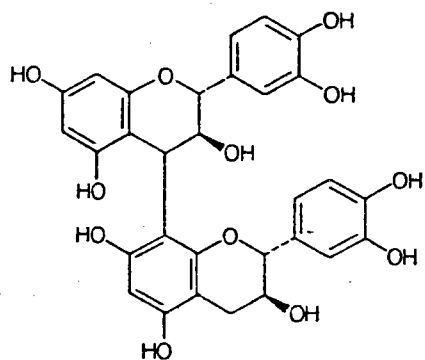


B1 : (-) épicatechine
(+) catéchine

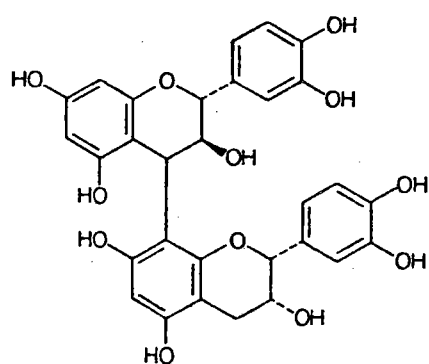


B2 : (-) épicatechine
(-) épicatechine

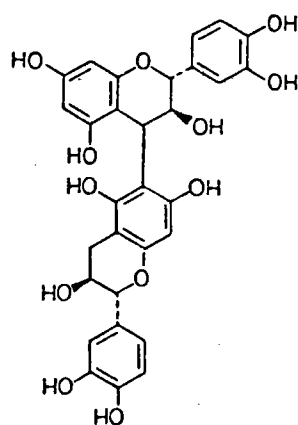
TARLEAU I (suite)



B3 : (+) catéchine
(+) catéchine



B4 : (+) catéchine
(-) épicatechine



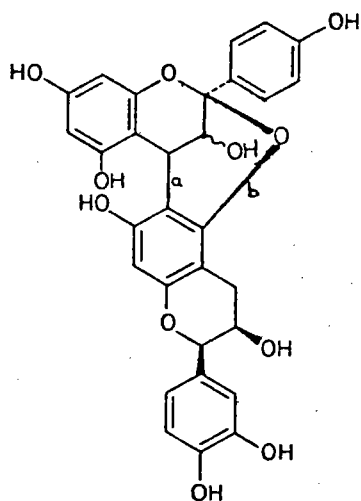
B6 : (+) catéchine (+) catéchine
: (isomère de B3)

I-2.3.1.1.2. Procyanidines C₃₀ H₂₄ O₁₂ (groupe A) :

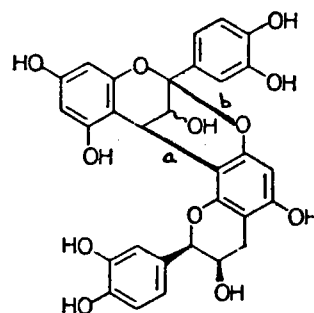
Les procyanidines du groupe A sont également formées par l'association de deux unités flavonoïdiques. L'obtention de dérivés nonacétylés et heptaméthylés diacétylés montre que ces composés possèdent sept fonctions présentant un caractère phénolique et deux un caractère alcoolique.

Les spectres RMN des dérivés nonacétylés révèlent que les deux unités flavonoïdiques sont liées, non seulement par une liaison C-C (a), mais également par une liaison éther (b).

Deux procyanidines A1 et A2 ont été mises en évidence :



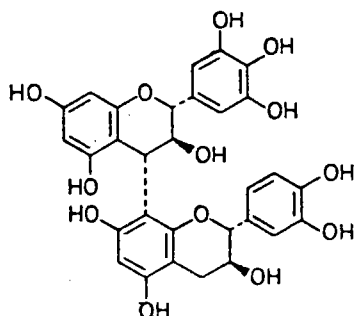
A1



A2

I-2.3.1.2. Autres proanthocyanidines dimères :

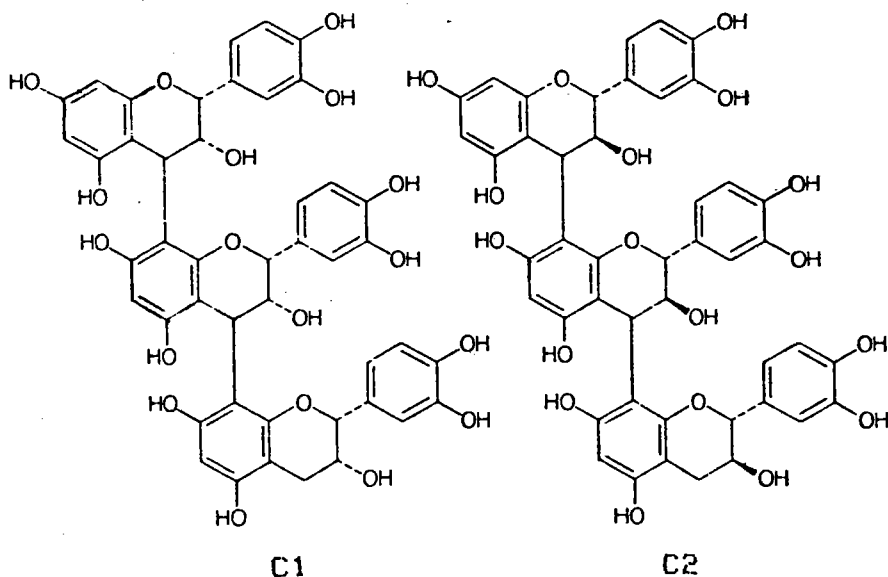
D'autres proanthocyanidines dimères ont été isolées des plantes comme les prodelphinidines et les propélargonidines.



I-2.3.2. Procyanidines condensées (trimères) :

L'école de SHEFFIELD (13) a isolé deux procyanidines naturelles

- C1 formée par l'association de 3 molécules d'épicatéchine
- C2 formée par l'association de 3 molécules de catéchine



I-3. Biosynthèse des proanthocyanidines oligomères :

Les proanthocyanidines oligomères sont réputées être les plus dangereuses pour la stabilité de la bière .La connaissance de leur formation est donc intéressante car en agissant à divers stades de cette biosynthèse on peut espérer orienter la sélection vers des proanthocyanidines moins dangereuses pour la stabilité colloïdale.

C'est la raison pour laquelle nous avons réuni en Annexe I les principales hypothèses actuellement admises concernant la biosynthèse des proanthocyanidines oligomères (14 à 37).

CHAPITRE II

STABILITE COLLOIDALE DE LA BIERE

II-1. Constituants du trouble au froid	Page 16
II-2. Influence des proanthocyanidines sur la formation des troubles apparaissant au cours de la conservation de la bière	Page 17
II-3. Etat actuel des connaissances sur le mécanisme de formation des troubles	Page 18
II-4. But du travail	Page 23

CHAPITRE II

STABILITE COLLOIDALE DE LA BIERE

La stabilité colloïdale de la bière est sous la dépendance d'un grand nombre de facteurs qui n'agissent pas isolément et qui ont également une influence sur ses qualités organoleptiques, sur sa coloration et sur la formation de la mousse. En particulier la destruction de cette stabilité soit par abaissement de la température soit au cours du vieillissement conduit à l'apparition d'un trouble.

II-1. Constituants du trouble au froid :

Le trouble au froid est défini par l'European Brewery Convention comme " le trouble qui se forme à 0°C et qui se redissout à 20°C ".

Les polyphénols et les peptides sont considérés comme les principaux constituants des troubles non-biologiques par suite d'association par liaisons hydrogènes entre les groupements phénoliques d'une part et les carbonyles des liaisons peptidiques d'autre part. Ces constituants forment des solutions colloïdales en équilibre instable. Il en résulte l'apparition d'un trouble lorsqu'on soumet la bière à l'action du froid : ce trouble disparaît par retour à la température ordinaire.

Pour retarder la formation du trouble au froid le traitement appliqué porte sur ses principaux constituants, les peptides et les proanthocyanidines (38).

On dégrade, en général, les peptides gênants par l'action des enzymes protéolytiques ou on les précipite par le tanin gallique.

Pour agir sur les polyphénols, on emploie la polyvinylpyrrolidone, les nylons, la caséine, et les enzymes (38-47).

L'emploi du formaldéhyde à l'empâtage, très efficace, est interdit par la plupart des législations (48).

Récemment, la brasserie de CARLSBERG (49) a sélectionné des orges sans B3 qui donnent des bières beaucoup plus stables.

II-2. Influence des proanthocyanidines sur la formation des troubles apparaissant au cours de la conservation de la bière :

Indépendamment du trouble au froid cité précédemment, un autre phénomène de trouble apparaît lors de la conservation des bières au bout de quelques mois. Ici encore les proanthocyanidines sont supposées jouer un rôle.

Un moyen simple d'étudier l'effet d'un composé sur la formation d'un trouble est de l'ajouter à un échantillon de bière et d'y mesurer la vitesse d'apparition de ce trouble et son intensité par rapport à une bière sans ajout. Cette démarche a été utilisée pour démontrer le rôle de certains polyphénols (50-53) et de complexes tannins-protéines isolés de la bière (41, 54, 55). Mais dans la plupart de ces travaux les substances n'étaient pas très bien caractérisées du point de vue chimique et d'autre part les quantités ajoutées étaient bien supérieures à celles que l'on rencontre dans la bière; par exemple la (+) catéchine a été testée à 25 ppm (50) et à 100 ppm (51) alors que la concentration de celle-ci, établie par chromatographie gazeuse (57), se situe entre 5 et 8 ppm, celle de la procyanidine B3 est comprise entre 4 et 20 ppm. Les expériences (57, 58), plus récentes, réalisées en tenant compte de ces résultats font ressortir les points suivants :

- les polyphénols monomères l'(+ catéchine, (-) épicatechine], ajoutés dans la bière dans des proportions de 5 à 10 ppm n'ont pas d'effet sensible sur la vitesse d'apparition du trouble.

- tous les polyphénols dimères ou oligomères provoquent une augmentation du trouble mais seuls les troubles formés par addition de proanthocyanidines sont semblables à ceux qui apparaissent dans une bière normale.
- le degré de polymérisation et la structure des polyphénols jouent un rôle capital dans la formation des troubles : ils augmentent quand on passe du monomère au dimère et au trimère catéchique et ils se forment plus rapidement avec la B3 (catéchine-catéchine) qu'avec la B4 (catéchine-épicatechine) (57).
- paradoxalement, les proanthocyanidines qui sont déjà des tannins véritables subsistent dans la bière finie, mais si on les ajoute à la bière même en faible quantité (1 à 4 ppm par exemple pour la B3) elles accélèrent l'apparition du trouble.

Ces observations tendent à montrer que les précurseurs les plus importants du trouble dans la bière ont un poids moléculaire moyen. Ce sont les conclusions auxquelles arrive SOGAWA (58-60). Il indique en effet que 90% des polyphénols de la bière ont un poids moléculaire compris entre 500 et 10000. Cependant, quand il procède à un fractionnement plus poussé, il trouve un poids moyen qui se situe vers 500, ce qui pourrait correspondre aux dimères et aux trimères catéchiques. C'est pourquoi, à l'heure actuelle, on a tendance à considérer les proanthocyanidines dimères et trimères comme les composés phénoliques les plus importants pour la formation des troubles non biologiques de la bière.

II-3. Etat actuel des connaissances sur le mécanisme de formation des troubles de la bière :

Pour rendre compte de la formation des troubles de la bière plusieurs schémas ont été proposés dans lesquels interviennent les composés phénoliques et certaines fractions protéiques.

Le schéma le plus largement répandu (61-64) dû à J.W. GRAMSHAW est représenté ci-dessous:

PHENOLS SIMPLES



polymérisation

POLYMERES PHENOLIQUES (tannins)



+ "matériel protéique" de la bière

COMPLEXES TANNINS-PROTEINES



combinaisons

TROUBLE

Des composés phénoliques se transforment lentement dans la bière, tout d'abord en polymères phénoliques de bas poids moléculaire (tannoïdes) (65) puis en tannins, l'oxydation et le milieu jouant un rôle certainement important dans cette polycondensation spontanée. Les polymères ainsi formés s'associent alors aux protéines de la bière entraînant l'apparition d'une phase dispersée tannins-protéines dont la solubilité est plus faible à 0°C qu'à température ambiante et qui constitue "le trouble au froid". Lorsque le degré de polymérisation des tannoïdes s'accroît la réversibilité du phénomène diminue tandis que la quantité des substances insolubles augmente ce qui se traduit par la formation d'un trouble permanent tannins-protéines. Toutefois seule une partie des protéines de la bière semble participer à ce processus, il s'agit de "protéines sensibles" qui en s'associant aux tannoïdes donnent lieu à la formation de complexes réversibles tannins-protéines. Il s'agit vraisemblablement de produits de dégradation des protéines dont le poids moléculaire se situe entre 10000 et 20000.

Les auteurs qui admettent ce schéma hypothétique, avancent un certain nombre d'arguments pour tenter de le justifier. Par exemple, ils pensent que la formation des troubles ne peut pas être directement imputable à des tannins préexistants car la teneur en protéines de la bière est suffisante pour provoquer leur précipitation. D'autre part l'oxydation joue un rôle important comme l'ont montré des expériences réalisées avec de l' $^{18}\text{O}_2$ (66). Pourtant, cette théorie ne permet pas d'expliquer les résultats de certains travaux récents. En effet, en utilisant des produits marqués, Mc GUINNESS et Coll. (67) ont constaté que ni la (-)épicatechine, ni la (+) catéchine ajoutées à la bière ne se polymérisaient au cours d'une conservation même prolongée de la bière. La conclusion logique de ces observations serait que la polymérisation des phénols n'est pas un préalable indispensable à la formation du trouble.

C'est ce que pensent certains auteurs pour lesquels un "complexe préformé" serait le précurseur le plus important de la précipitation colloïdale. Le rôle éventuel de ce complexe préexistant n'est pas une idée nouvelle. Dès 1964, MEREDITH et TKACHUK (64) avaient montré qu'un complexe tanno-protéique de l'orge subsistait relativement inchangé jusque dans la bière finie. CHAPON (69) également avait observé qu'une orge maltée dans de mauvaises conditions donnait un moût riche en combinaisons tannins-protéines qui rendaient la bière particulièrement apte à former des troubles. C'est pourquoi GARDNER et Mc GUINNESS (70) ont proposé un autre schéma qui semble tenir compte des résultats plus récents:

COMPLEXES PHENOLIQUES PREFORMES



activation (ex: oxydation)

POLYPHENOLS ACTIVES



+ matériel protéique de la bière ou (et)
complexes tannins-protéines préformés

COMPLEXES TANNINS-PROTEINES



"activation" et combinaison

TROUBLE

Ce sont des polyphénols condensés déjà existants qui sont les principaux responsables de la formation des troubles mais ils ne peuvent se combiner avec les matières azotées de la bière qu'après une activation, probablement une oxydation impliquant la formation d'une quinone. Ces complexes phénols-protéines et (ou) les complexes préexistants s'associent pour former en quelque sorte la base du trouble, cette formation demandant certainement elle aussi une activation. Ce mécanisme diffère des précédents dans la mesure où il ne fait pas intervenir la polymérisation des phénols dans la bière ; or plusieurs arguments militent dans ce sens. En effet, si les polyphénols donnent lieu à des polymérisations, ceci n'implique pas leur condensation spontanée dans la bière.

On peut en effet logiquement penser que les polyphénols les plus sensibles à la polymérisation ont été activés et ont réagi au cours des différentes étapes du brassage, par conséquent ils ne peuvent être présents dans la bière finie qu'en très faible quantité. DADIC et BELLEAU (71) ont d'ailleurs montré une bonne stabilité des phénols simples de la bière vis-à-vis de la polymérisation. D'autre part CHAPON et Coll. (72) ont rapporté que l'oxydation de polyphénols dans un milieu contenant du matériel protéique provoque la formation d'une plus grande quantité de trouble que l'addition directe à ce même milieu de quantités comparables de polyphénols préalablement oxydés. GARDNER et Mc GUINNESS (70) concluent à la suite de cette observation que l'oxydation des polyphénols comme intermédiaires actifs est peut être plus importante que leur propre polymérisation.

Cependant, il faut bien reconnaître qu'aucun des arguments rapportés ici, ne permet de trancher en faveur de l'une ou l'autre des hypothèses proposées.

Malgré les nombreux travaux qui lui sont consacrés, le mécanisme de la formation des troubles non biologiques de la bière est loin d'être élucidé. Il semble bien qu'une meilleure compréhension de celui-ci passe nécessairement par une connaissance plus approfondie des substances qui y participent et de leur évolution au cours du procédé de fabrication de la bière.

II-4. But du travail :

On remarque tout au long de cette mise au point des connaissances actuelles que la plupart des auteurs s'accordent pour attribuer aux proanthocyanidines un rôle prépondérant dans la formation du trouble non biologique de la bière. Dans plusieurs essais, on a pu montrer que ces proanthocyanidines n'ont pas toutes la même activité dans la formation de ce trouble. Certaines sont beaucoup plus favorables à la formation de complexes vis-à-vis des protéines. De plus les résultats n'ont pas toujours une véritable signification dans la mesure où dans les réactions étudiées les composés entrant en jeu ne sont pas des constituants de la bière mais des substances modèles. Les seuls composés pouvant intervenir dans le phénomène sont ceux apportés par l'orge et éventuellement par le houblon. D'autre part les quantités utilisées dans les ajouts sont trop importantes. Enfin peu de travaux ont été consacrés à l'évolution des proanthocyanidines de l'orge au cours du procédé de fabrication de la bière. Ceci est dû en grande partie à un manque de moyens analytiques permettant leur identification et leur dosage rapide.

L'objectif de notre travail est d'apporter une contribution à la connaissance du phénomène de formation du trouble à la conservation en partant de l'hypothèse d'une intervention des procyanidines et en suivant en particulier leur évolution au cours de la fabrication de la bière.

Notre démarche a été la suivante :

La première partie de notre étude a été consacrée à la mise au point de l'analyse quantitative des proanthocyanidines dans l'orge, le malt, le houblon, le moût et la bière. La réalisation de cette étude a posé en préalable l'obtention en quantités importantes d'échantillons de B3 et B4. Après avoir tenté la voie extractive à partir de l'orge nous avons été conduit à mettre au point une méthode de synthèse de ces dimères dont l'exposé fait l'objet du chapitre III. Le chapitre IV décrit quant à lui les divers essais qui nous ont conduit à l'élaboration du protocole adopté.

La seconde partie décrit l'évolution des polyphénols monomères (catéchine, épicatechine) et dimères (E3, prodelphinidine) aux diverses étapes de la fabrication de la bière et de sa conservation sur plusieurs mois (chapitre V).

La troisième partie de nos recherches a permis d'établir, à partir de solutions modèles, l'évolution des monomères et dimères catéchiques en fonction du pH et de la température (chapitre VI). De ceci nous avons pu élucider le pourquoi de leur évolution respective au cours du brassage. De même qu'une étude de l'oxydation par la polyphénoloxydase a permis de mieux interpréter les résultats observés au cours de la germination. Cette partie fait l'objet du chapitre VII.

Dans la dernière partie de notre travail (chapitre VIII), nous avons recherché dans le trouble permanent de la bière les différents constituants présents dans celui-ci. Nous avons pu montré qu'il s'agit de protéines, de sucres et de polyphénols. Chacun de ces constituants a fait l'objet d'une étude plus poussée. La composition en acides aminés des protéines a été établie de même que leur concentration respective. Le même travail a été effectué sur les sucres et les polyphénols. A la suite de ces résultats, nous avons entrepris la mise au point du dosage des complexes [polyphénols]-[protéines ou sucres] (chapitre IX). L'application de ce protocole a permis de suivre l'évolution de ces substances durant la fabrication de la bière et pendant sa conservation.

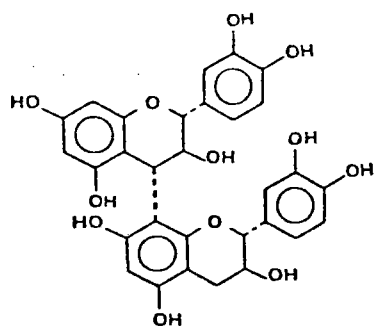
CHAPITRE III

PROANTHOCYANIDINES B3 ET B4

OBTENTION ET CARACTERISATION SPECTROSCOPIQUE

III-1. Extraction	Page 26
III-2. Synthèse des proanthocyanidines B3 et B4	Page 28
III-3. Caractérisation spectroscopique	Page 30
III-3.1. Spectrographie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	Page 30
III-3.2. Spectrographie de masse (SM)	Page 35
III-4. Partie expérimentale	Page 42

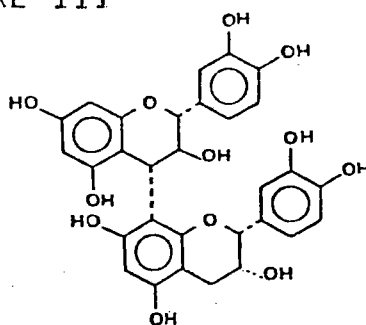
CHAPITRE III



B₃

dihydro-2,3 (dihydroxy phényl-3,4)-2

trihydroxy-3,5,7 4H / 1 7benzopyrannes "dimères"



B₄

Ces composés ont été identifiés dans les matières premières, orge, houblon, malt (75,76) et caractérisés, après extraction et purification, par leurs spectres de RMN¹H (73,77-80) et récemment de RMN¹³C (81).

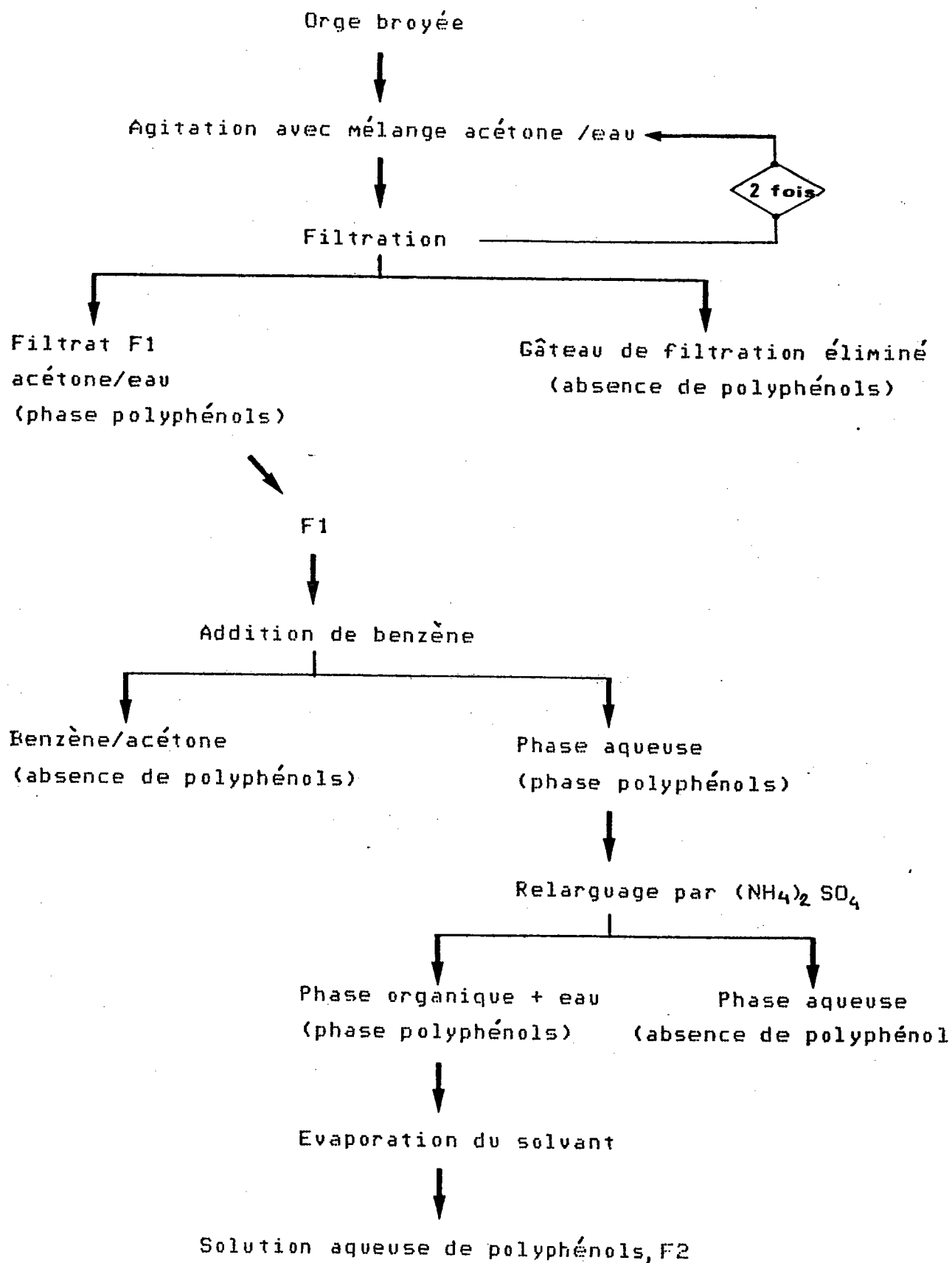
III-1. Extraction :

Dans une première approche nous avons utilisé la voie extractive à partir de la farine d'orge, selon le protocole décrit dans l'organigramme ci-après. Les conclusions que l'on peut tirer de ces essais sont les suivantes :

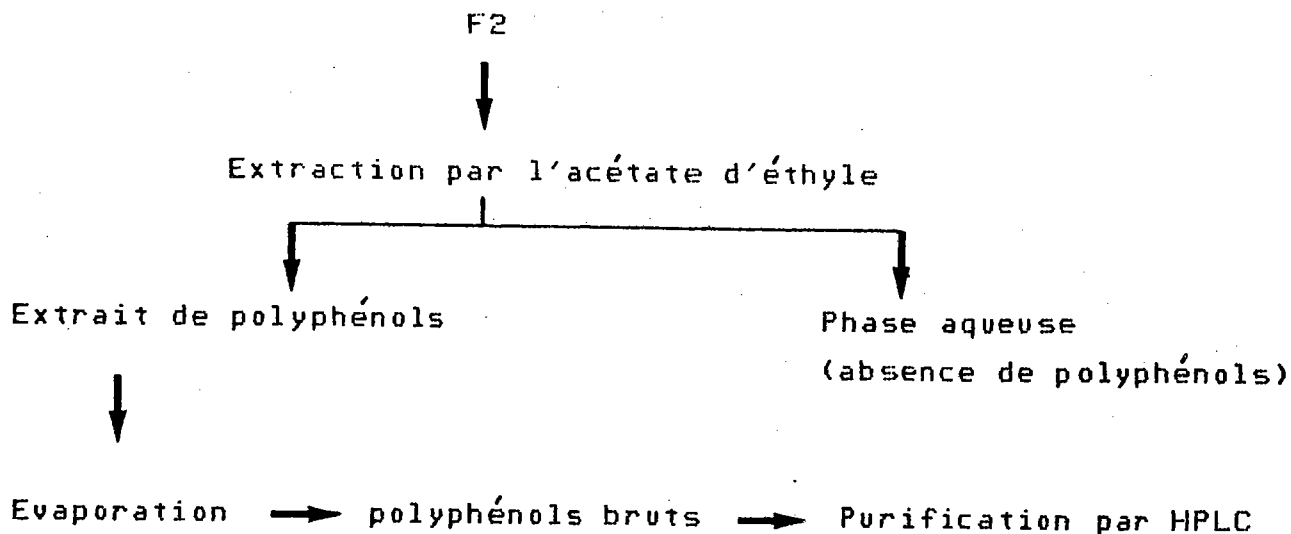
- complexité du mélange polyphénolique extrait qui ne permet d'obtenir la B₃ qu'avec un très faible rendement : le bilan global conduit à 0.3 g de polyphénols bruts à partir de 1200 g d'orge.
- longueur de l'extraction.
- difficulté de séparation.

Cette méthode que nous avons dû abandonner pour ces raisons nous a toutefois permis d'obtenir un premier échantillon de B₃ "naturelle" et de pouvoir effectuer la comparaison de structure avec le produit résultant de la synthèse.

ORGANIGRAMME



ORGANIGRAMME (suite)



III-2. Synthèse des proanthocyanidines B3 et B4 :

Nous avons donc eu recours à la voie synthétique à partir de substances naturelles aisément accessibles (+)dihydroquercétine 1 (+)catéchine 4, (-)épicatechine 5. Plusieurs tentatives de synthèse sont décrites dans la littérature. Elles ont l'inconvénient de conduire avec des rendements médiocres aux dérivés décaacétylés (12,57,75,82-84), d'où il est très difficile d'accéder aux produits hydroxylés libres.

En particulier, la voie proposée par Eastmond (57,75), qui évite l'isolement du flavane diol-3,4 2, très instable (83) n'avait conduit, dans les conditions utilisées, qu'à 20% de rendement en produit acétylé.

Le mode opératoire que nous proposons (voir partie expérimentale) s'inspire de celui de Eastmond mais, après optimisation des conditions (85) et utilisation de la HPLC préparative il permet d'accéder, avec un rendement de 50%, aux composés B3 et B4, purs, directement sous forme hydroxylée libre.

L'extension du procédé à la synthèse de "trimères" du groupe C à toutefois échoué.

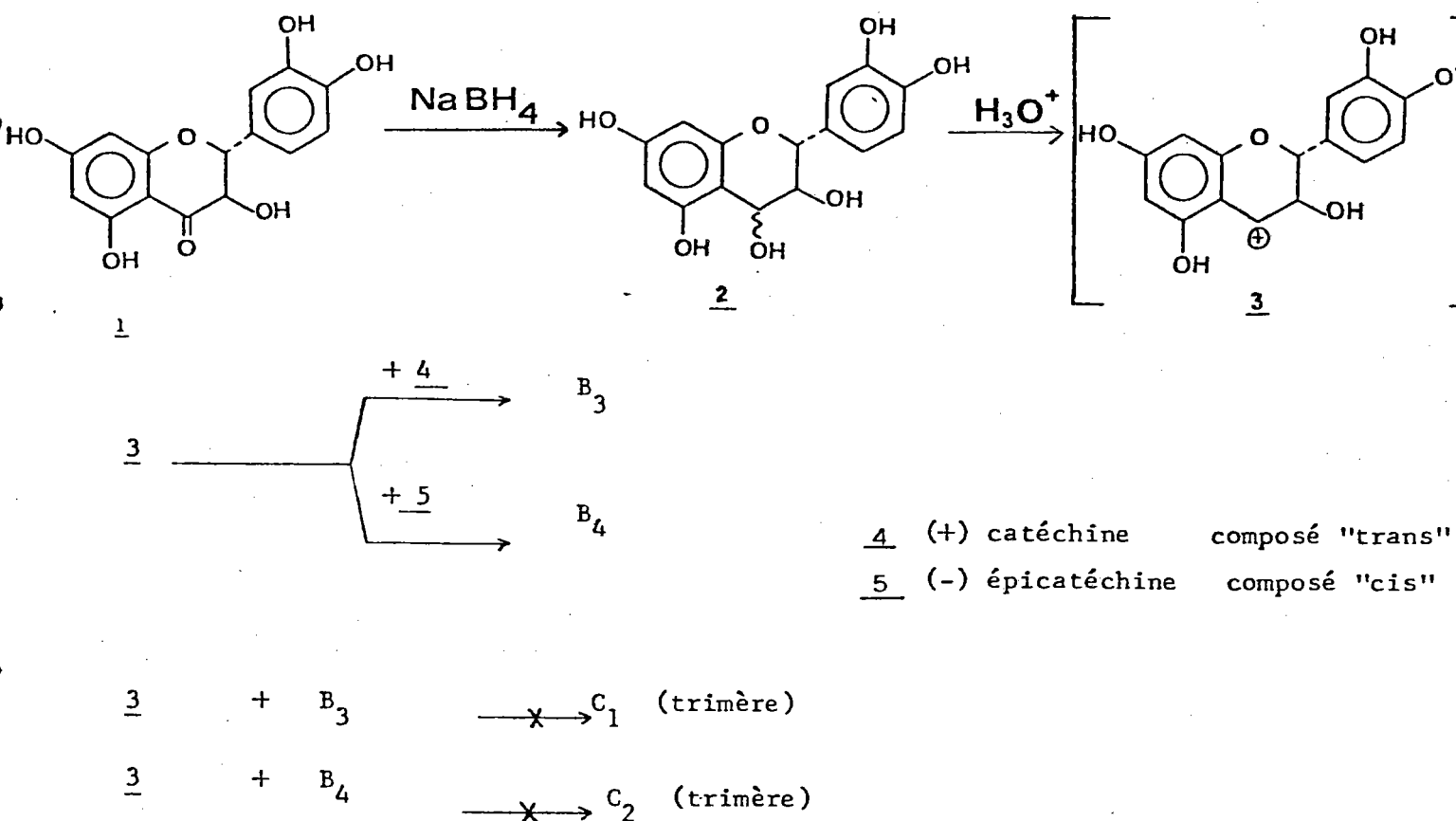


Schéma I

A noter que l'attaque du carbocation intermédiaire sur la position-6 de la catéchine (ou de l'épicatechine) n'a pas été constatée.

Pour les besoins de l'identification spectroscopique (RMN et spectrographie de masse) nous avons préparé les dérivés déacétylés des dimères B3 et B4 et les dérivés tétraméthoxylés de la catéchine et de l'épicatechine.

III-3. Caractérisation spectroscopique :

III-3.1. Résonance magnétique nucléaire :

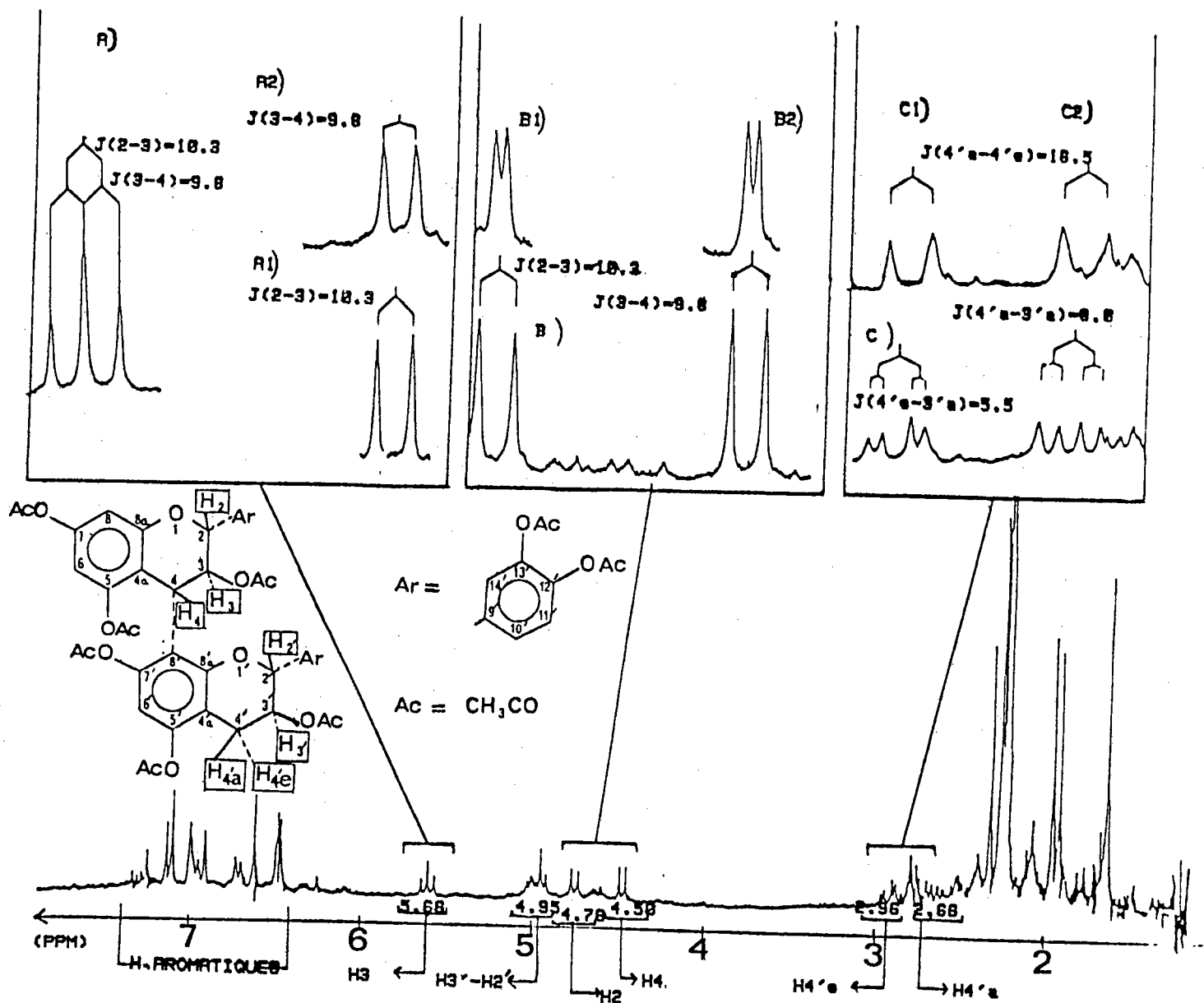
Spectroscopie de RMN ^1H avec découplage

La spectroscopie de RMN ^1H a été utilisée pour caractériser les proanthocyanidines extraites de plantes (86). Ainsi, les spectres de RMN ^1H des dimères B3, libre (80) et acétylé (81,86), et B4 libre (80) et acétylé (80) ont été interprétés (80,86) sur la base d'une isomérisation conformationnelle liée à une rotation empêchée au niveau de la liaison C4-C8, les deux conformères étant supposés présents à l'état naturel (79). De façon à confirmer la structure de nos composés de synthèse, nous avons comparé les spectres de RMN de leurs dérivés décaacétylés avec ceux de la bibliographie.

-RMN ^1H du dimère B3 décaacétylé (fig. I).

Figure I

- A agrandissement de H_3 (dd). $J_{2,3} = 10,3 \text{ Hz}$; $J_{3,4} = 9,8 \text{ Hz}$.
A₁ découplage de H_4 , A₂ découplage de H_2 .
- B agrandissement de H_2 et H_4 H_2 (d) $J_{2,3} = 10,3 \text{ Hz}$; H_4 (d) $J_{3,4} = 9,8 \text{ Hz}$
B₁ et B₂ découplage de H_3 ; (découplages incomplets).
- C agrandissement de $\text{H}_{4'a}$, $\text{H}_{4'e}$ - système AB dû à la non équivalence magnétique des protons 4' ;
C₁ et C₂ : découplage de H_3 , $J_{4'a,4'e} = 16,5 \text{ Hz}$ - $J_{3'a,4'e} = 5,5 \text{ Hz}$
 $J_{3'a,4'a} = 8 \text{ Hz}$



Ce spectre est en accord avec celui décrit à propos du composé naturel (B1) et les valeurs des constantes de couplage confirment la stéréochimie proposée. Par contre aucun conformère n'a pu être décelé, contrairement aux interprétations données, à partir du spectre de RMN du composé B3 hydroxylé libre (80,86). A noter que dans le cas du dérivé acétylé un seul isomère serait présent (86).

-RMN ^1H du dimère B4 décaacétylé (fig. II)

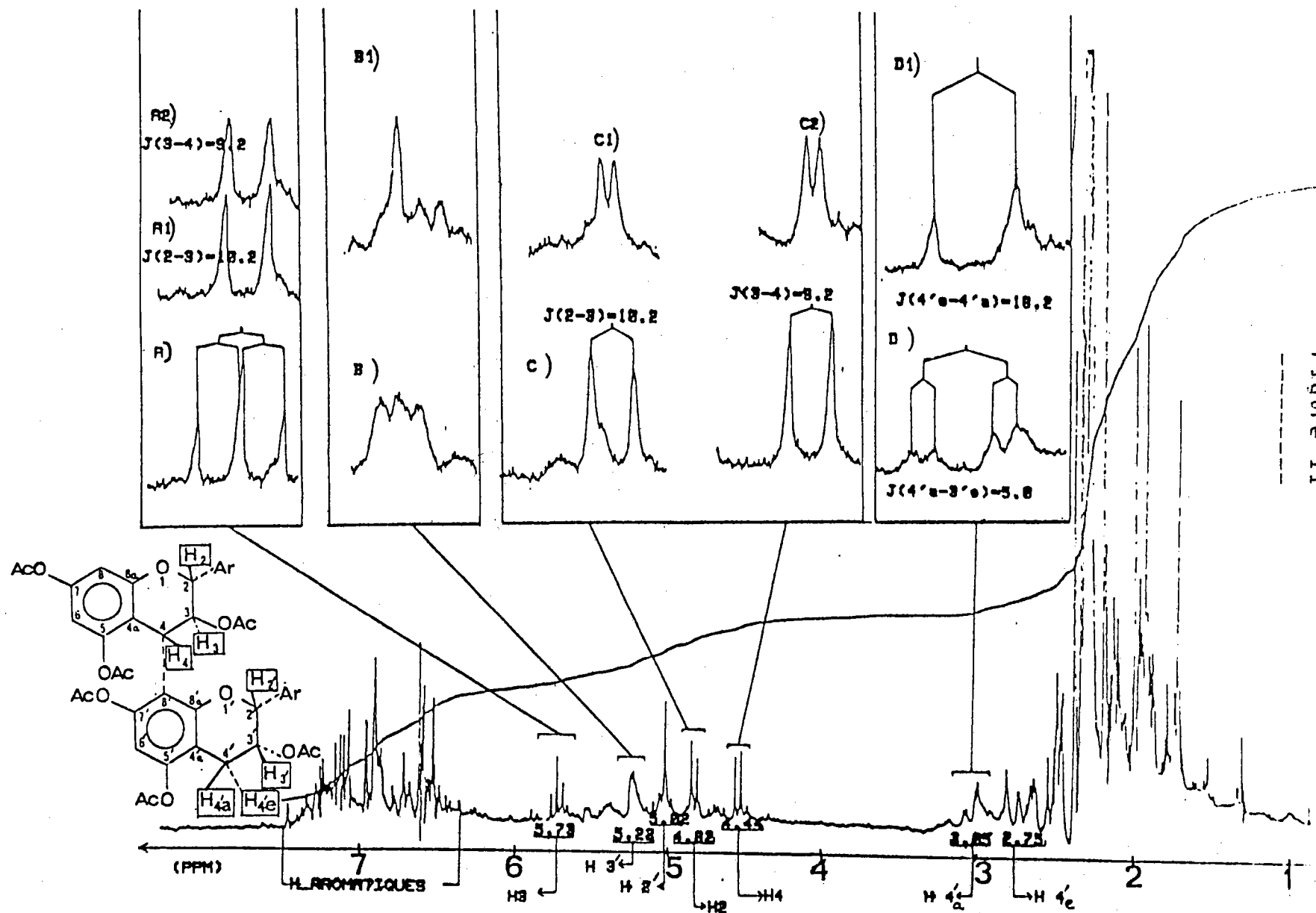
Figure II

- A agrandissement de H_3 (dd) $J_{2,3}=10,0 \text{ Hz}$; $J_{3,4}=9,2 \text{ Hz}$
 $\underline{A}_1$ découplage de H_4 , $\underline{A}_2$ découplage de H_2
- B agrandissement de H_3 , - $\underline{B}_1$ découplage de H_4 ,
- C agrandissement de H_2 et H_4 ; H_2 (d) $J_{2,3}=10,2 \text{ Hz}$; H_4 (d)
 $J_{3,4} = 9,2 \text{ Hz}$ - $\underline{C}_1$ découplage de H_3 ; $\underline{C}_2$ découplage de H_3
 (découplages incomplets)
- D agrandissement de $\text{H}_{4'a}$ (dd) : $J_{4'a,4'e} = 18,2 \text{ Hz}$
 $J_{3'e,4'a} = 5,0 \text{ Hz}$
 $\underline{D}_1$ découplage de $\text{H}_{3'e}$. Sur le spectre intégral : $\text{H}_{4'e}$ (d) $J_{4'a,4'e} = 18,2 \text{ Hz}$
 $J_{3'e,4'e} = 0$.

La présence du motif catéchine (B3) ou épicatechine (B4) entraîne une différence significative entre les spectres des dimères B3 et B4 au niveau des protons en 4'.

Par contre la complexité du massif à 5.22 ppm, même après découplage (encadré B) pourrait être en faveur de la présence d'un conformère.

Figure II



-Spectre de RMN ^{13}C des dimères B3 et B4 (fig. III).

Les spectres de ^{13}C ont été établis sur les dimères B3 et B4 libres et ne présentent aucune différence significative. Les attributions proposées résultent de l'utilisation, sur la base de l'additivité des déplacements chimiques, des incréments de la bibliographie (87). Le spectre ^{13}C du dimère B3 décaacétylé, récemment publié, est dans l'ensemble conforme à nos résultats. Une différence notable toutefois : la valeur de $\delta\text{C}_8'$, repérée par les auteurs cités (81) dans le massif (108-111 ppm) des carbones C_8 , C_6 et C_6' et pour laquelle nous proposons une valeur plus conforme au déblindage attendu du fait de sa substitution par le résidu catéchine (6154.1).

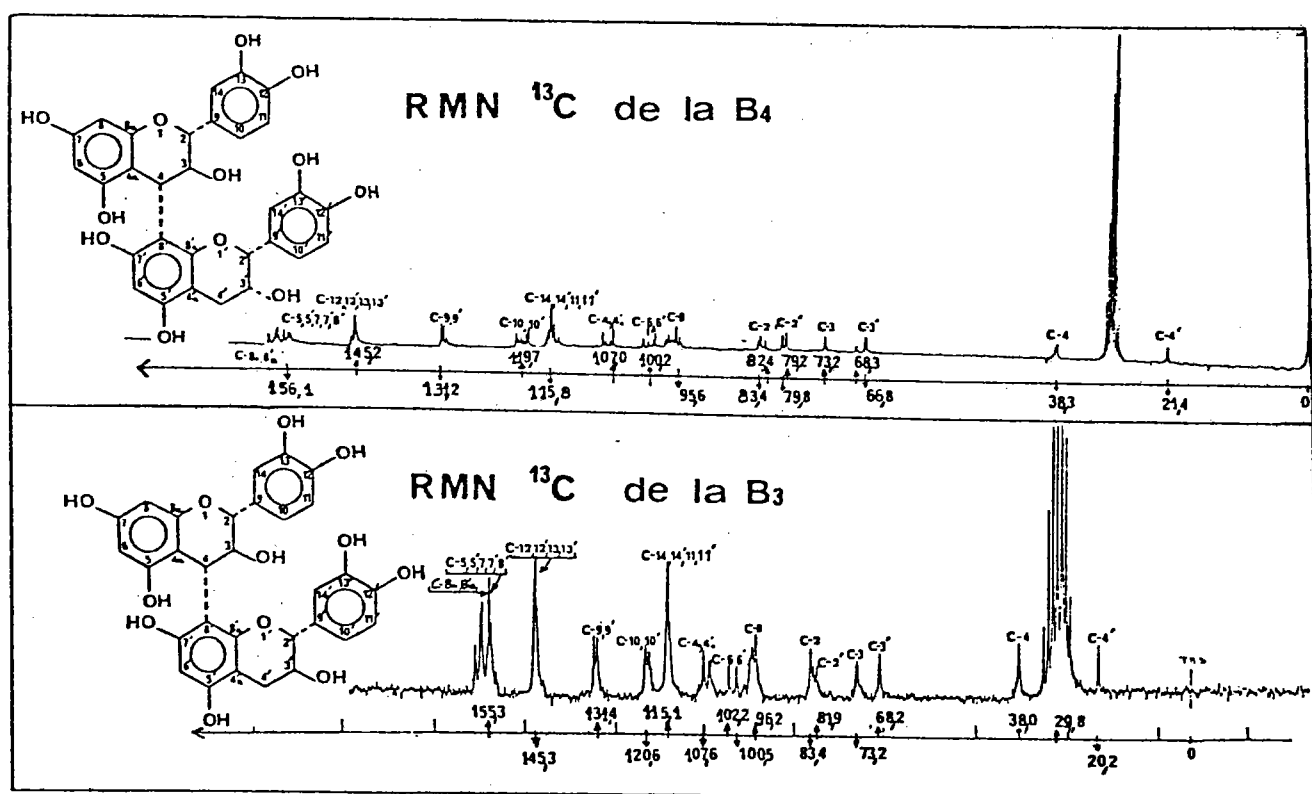


Figure III

III-3.2. Spectres de masse :

Les spectres de masse ont été établis par ionisation chimique sur les dimères B3, B4 (fig. Va, fig. VIIa) et à titre comparatif sur la (+) catéchine 4 et la (-) épicatechine 5 (fig. IVa, fig. VIa).

Ils permettent essentiellement de caractériser le pic moléculaire $(M+H)^+$ (291) dans les monomères 4 et 5, pic que l'on retrouve dans les dimères B3 et B4 à côté d'un pic à 170. Aucun fragment de masse > 390 n'apparaît et aucune différence significative ne permet de caractériser l'un ou l'autre des dimères dans les conditions utilisées.

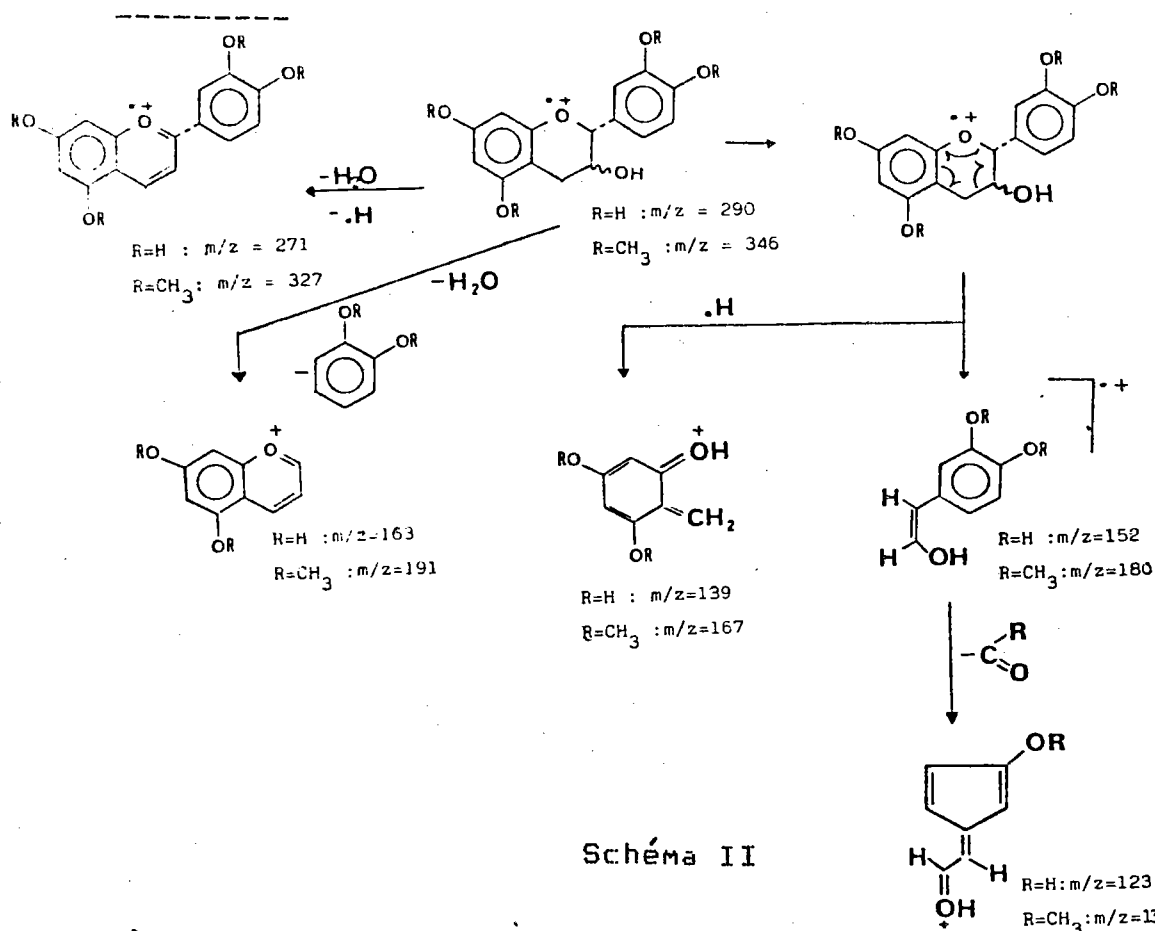
Par contre la spectrographie par impact laser LAMMA, utilisée en ions(+) et en ion(-) conduit à des résultats particulièrement intéressants permettant de caractériser immédiatement l'un ou l'autre des dimères.

Les spectres en ions(+) de la catéchine (fig. IVb) de l'épicatechine (fig. VIb) de la B3 (fig. Vb) et de la B4 (fig. VIIb) sont représentés comparativement aux spectres de masse obtenus par ionisation chimique.

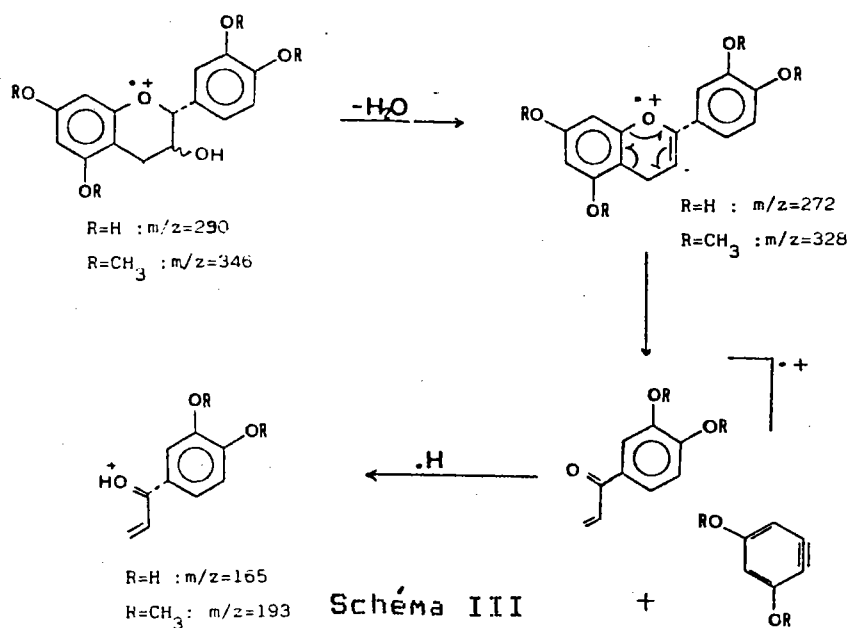
Les spectres des dérivés tétraméthoxylés des monomères 4 et 5 ne sont pas représentés, leur fragmentation reportée (surtout visible en spectrométrie LAMMA) sur le schéma II conforte le mécanisme proposé.

En tenant compte des deux mécanismes de fragmentation bien connus caractéristiques des flavanes-3 ol (88) nous proposons les attributions suivantes des pics principaux relevés :

1ère voie : Pics à $m/z = 123, 139, 152, 163, 271$.



2ème voie : Pic à $m/z = 165$ (cette voie implique la fragmentation aux dépens du flavène résultant d'une déshydratation préalable).



La première voie rend compte des principaux fragments relevés dans les spectres en ions(+) de la catéchine, de l'épicatéchine et du dimère B3 ; la seconde voie implique la déshydratation en flavène, elle est préférentielle dans le cas du dimère B4. Ceci est en accord avec la facilité de déshydratation de l'épicatéchine comparée à celle de la catéchine(89).

On notera qu'en spectrométrie LAMMA, le pic moléculaire à 291 (M+H) de 4 et 5 n'apparaît pas en ion(+)(fig. VIII).

La figure IX rassemble les spectres LAMMA en ion (-) des monomères 4 et 5 et du dimère B4.

Fig.IVa : catéchine spectre de masse par ionisation chimique.

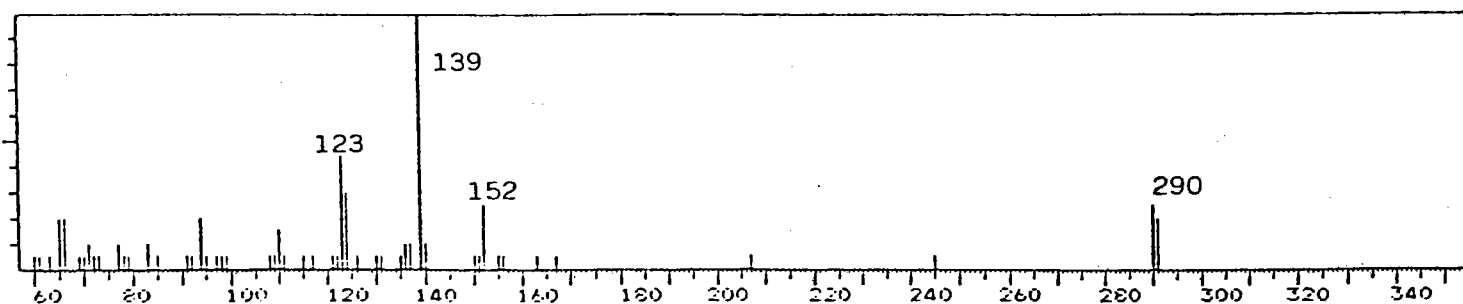


Fig.IVb : catéchine spectre de masse par impact LASER (ions(+)).

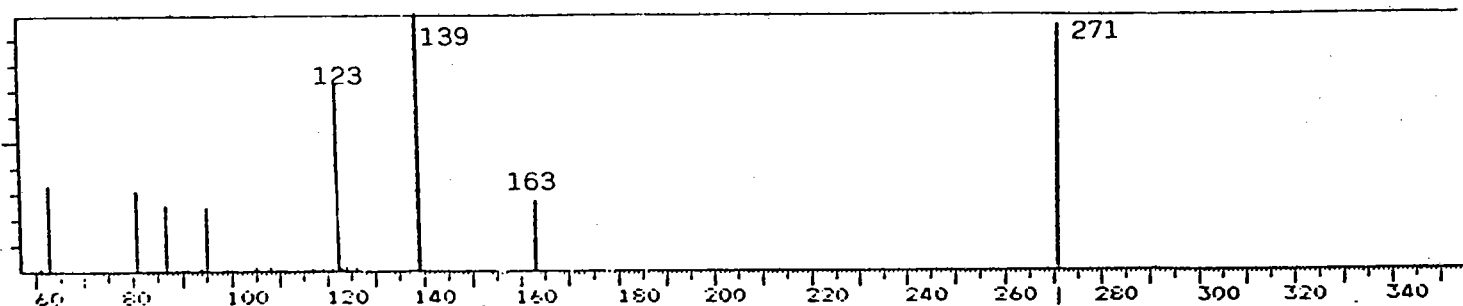


Fig.Va : B3 spectre de masse par ionisation chimique.

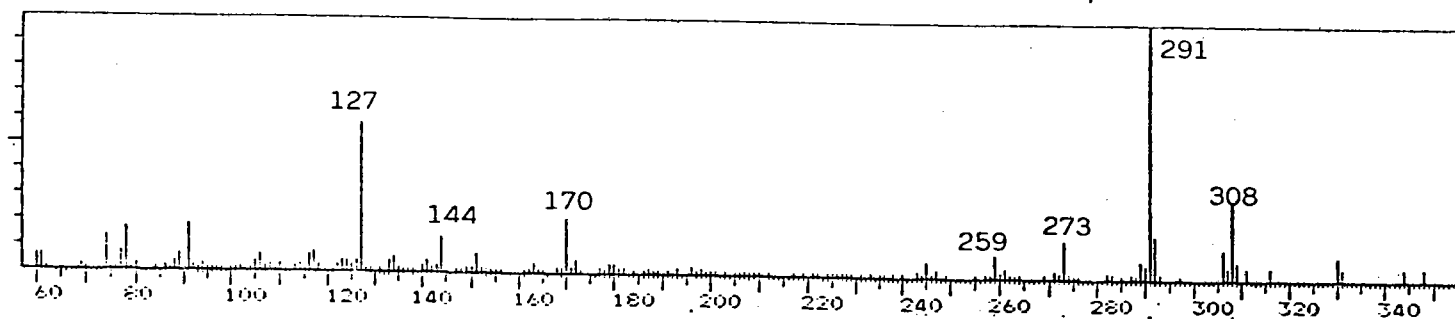


Fig.Vb : B3 spectre de masse par impact LASER (ions(+)).

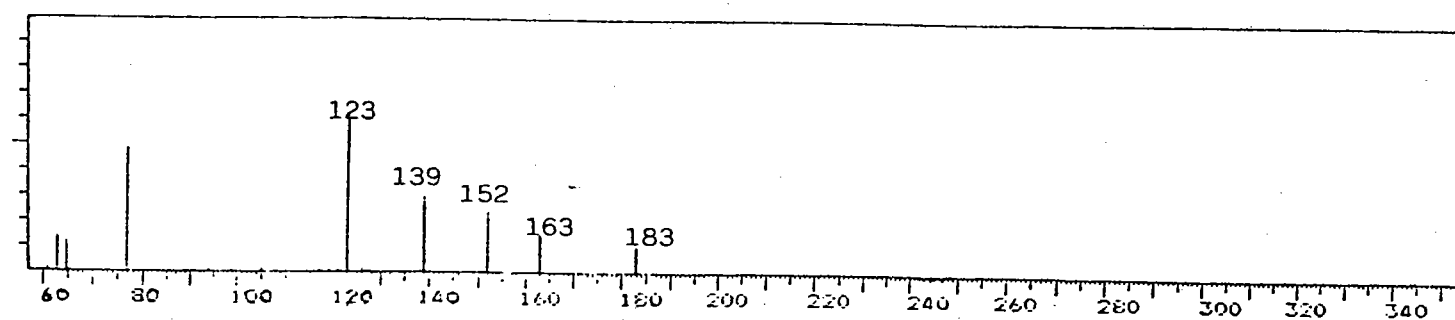


Fig.VIa : épicatechine spectre de masse par ionisation chimique.

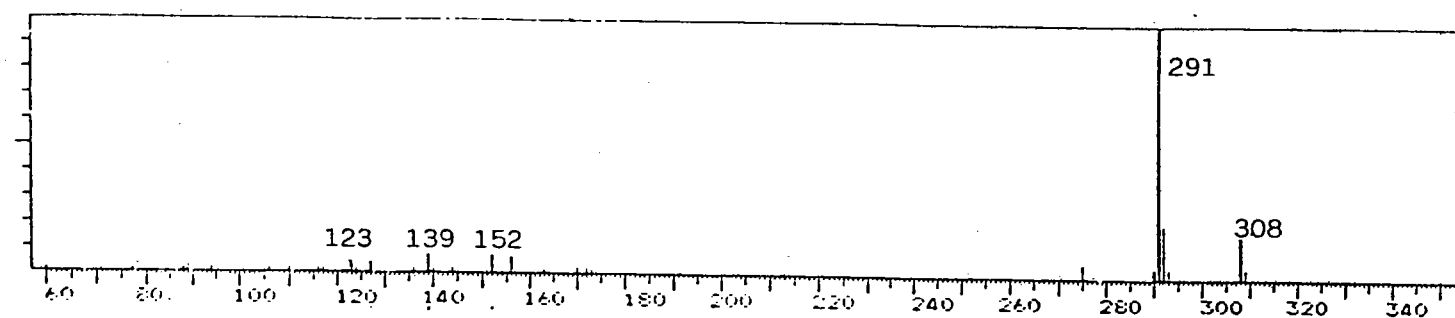


Fig.VIb : épicatechine spectre de masse par impact LASER (ions(+)).

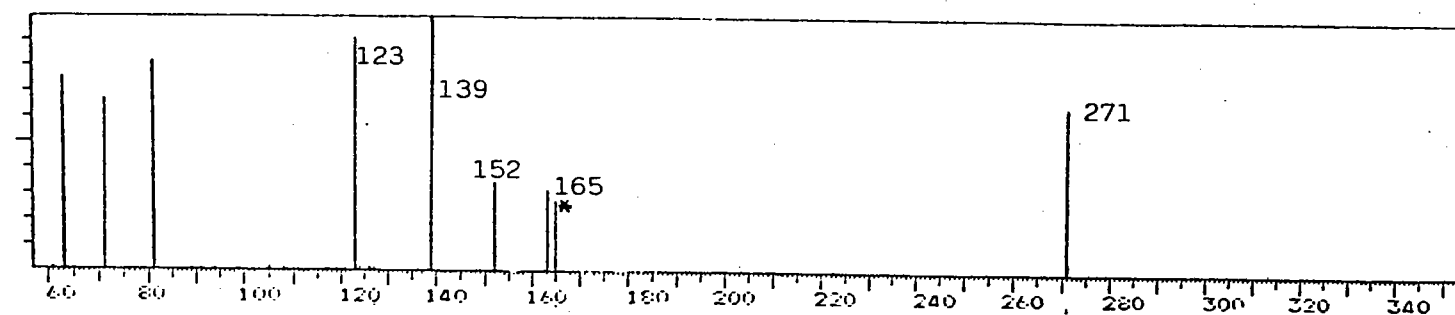


Fig.VIIa : B4 spectre de masse par ionisation chimique.

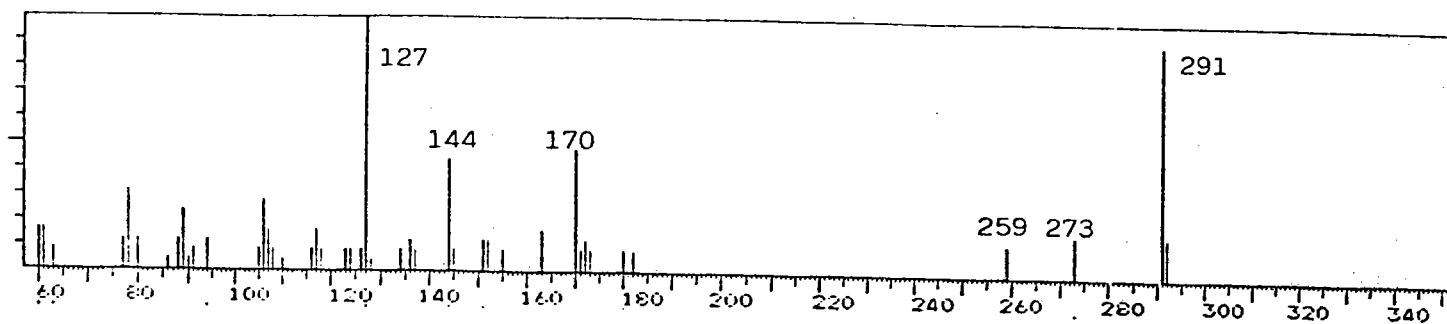


Fig.VIIb : B4 spectre de masse par impact LASER (ions(+)).

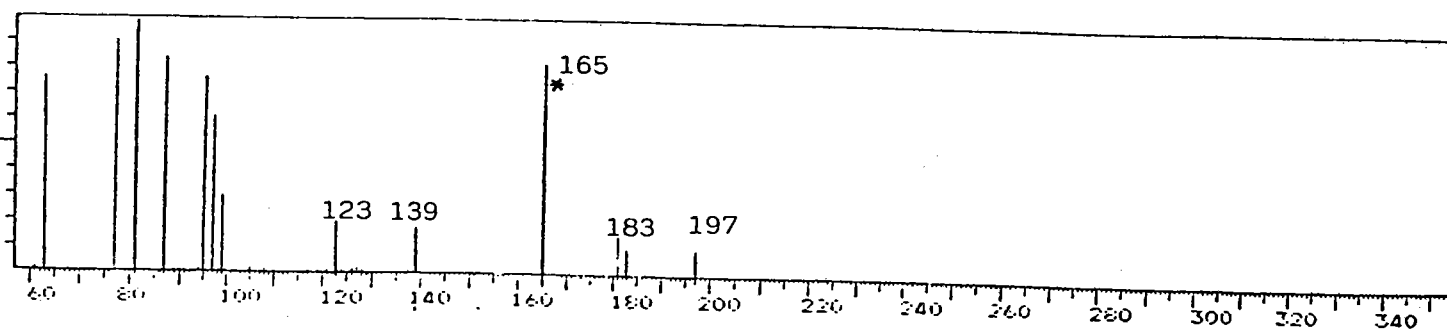
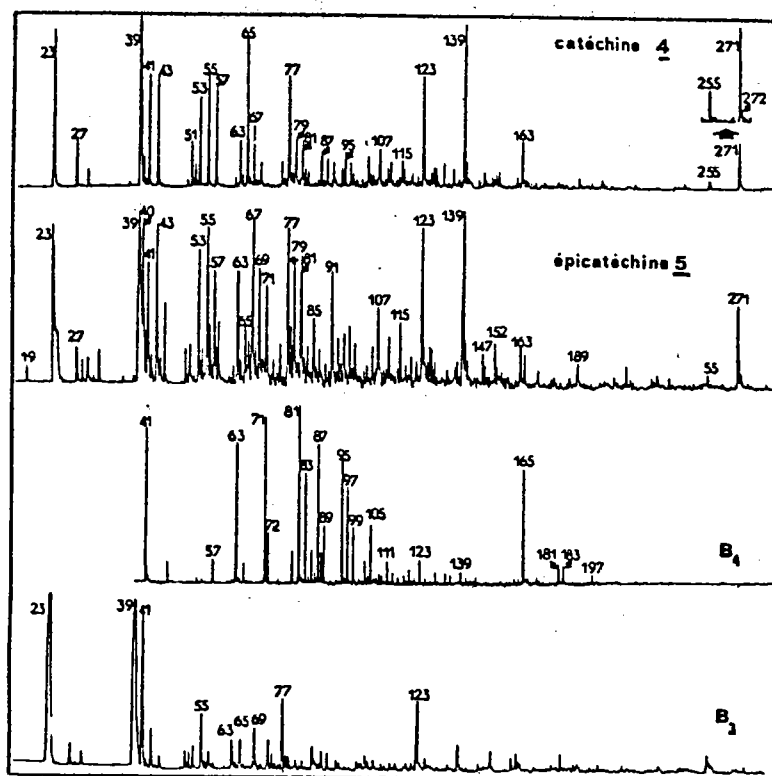
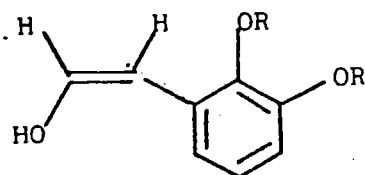


Fig.VIII : Spectre LAMMA (ions(+)) de la catéchine 4, de l'épicatechine 5, des dimères B3 et B4.



Les spectres LAMMA en ions (-) (Fig. IX) de 4, 5 et de la catéchine tétraméthoxylée présentent tous le pic quasimoléculaire (M-H). On note également la présence de pics intenses à m/z=149, 150, 151 dont les intensités relatives varient d'un spectre à l'autre. Le pic m/z=151 peut-être attribué à l'ion (A-H)⁻ issu d'une fragmentation selon un mécanisme rétro Diels-Adler (1ère voie, schéma II).



A

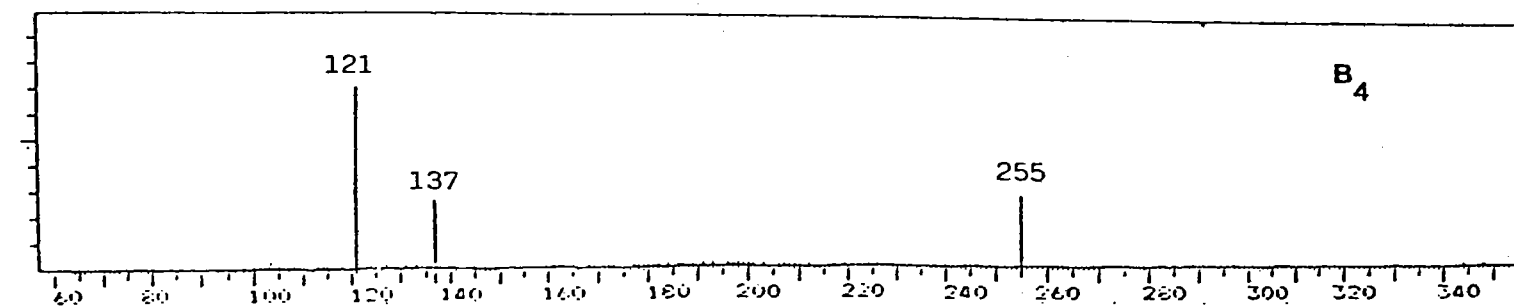
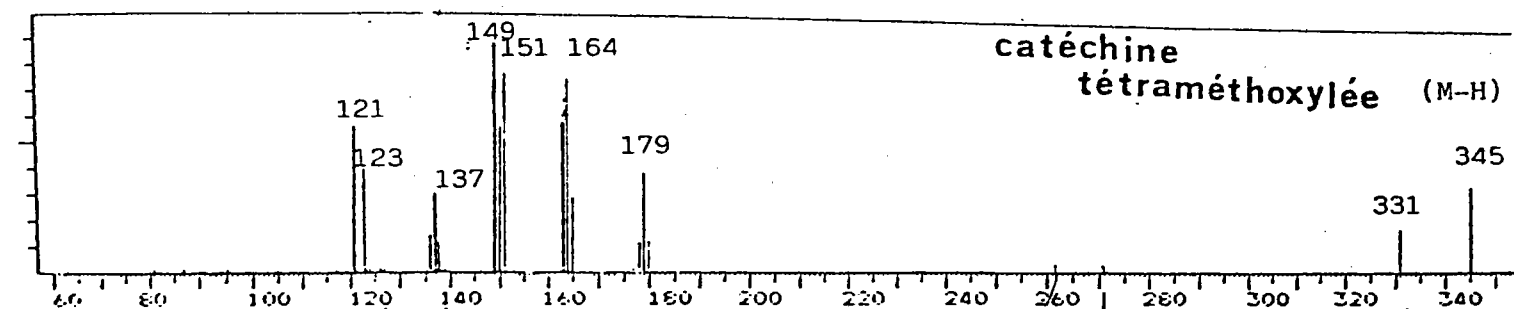
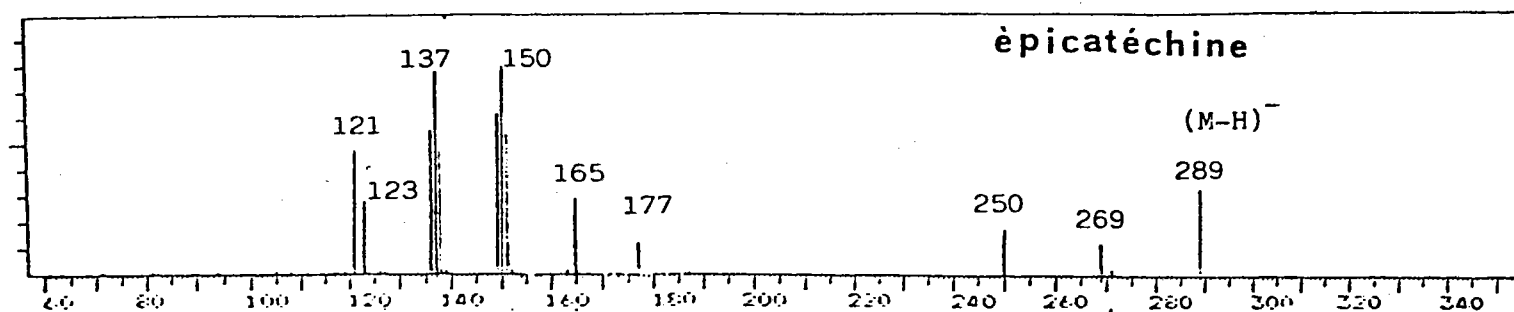
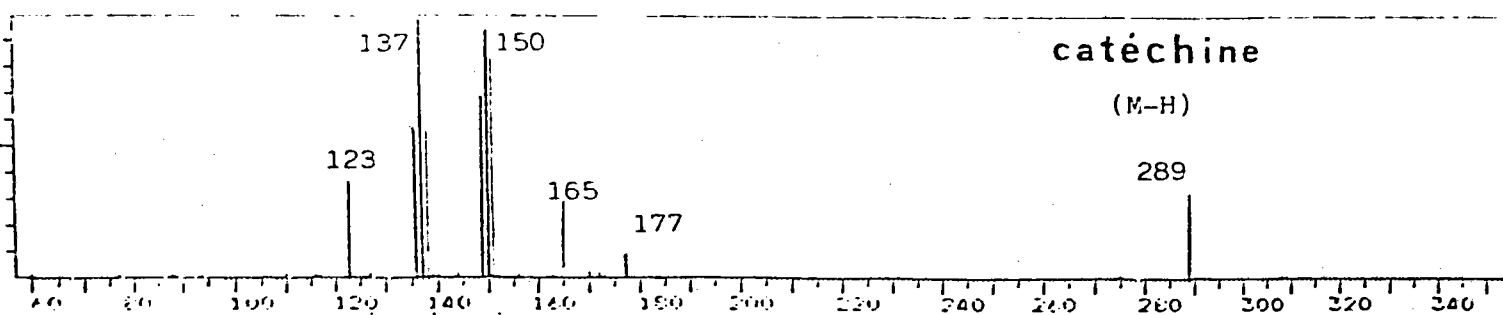
R=H : (A-H)⁻ , m/z=151

R=CH₃ : (A-H)⁻ , m/z=179

Le fait que le pic à m/z=151 n'apparaisse pas dans le spectre en ions négatifs de la B4 serait en faveur de ce mécanisme. En effet, pour la B4, nous avons montré précédemment que la fragmentation suivait de façon préférentielle la 2ème voie (schéma III) qui exclue la structure A. De même, l'apparition pour la catéchine tétraméthoxylée de l'ion m/z=179 (ion (A-H)⁻ avec R=CH₃) conforte cette hypothèse de fragmentation en ions négatifs.

En conclusion, la méthode de synthèse mise au point permet de porter à 50% le rendement en dimères B3 et B4 obtenus sous la forme hydroxylée pure. La structure a été confirmée par RMN ¹H et ¹³C. La spectrométrie par impact LASER permet une différenciation rapide des deux isomères B3 et B4.

Fig.IX : Spectres de masse par impact LASER (ions(-)).



III-4. Partie expérimentale :

Les spectres de RMN¹H et ¹³C ont été établis à 250 MHz (TMS en référence interne) sur l'appareil Caméca(*).

-solvants utilisés : CDCl₃ (¹H) ; acétone -d₆ (¹³C).

Les spectres de masse ont été réalisés soit par ionisation chimique (NH₃) sur Spectrographe Ryber mag R10-10(**), soit par impact LASER sur LAMMA 500(***)).

Préparation des procyanidines B3 et B4

Mode opératoire général - optimisation des paramètres.

Le protocole mis au point est le suivant, dont nous soulignons les paramètres optimisés par la méthode des plans d'expérience (B4) :

A une solution de 1g de dihydroquercétine 1 (3.29 nmoles, soit un excès de 100%) dans 50 ml d'eau portée à 60°C sous agitation, on ajoute 500mg de NaBH₄ par petites portions, et laisse 15 minutes à t° ambiante.

Après refroidissement à -10°C, on ajoute une solution de 500 mg de catéchine 4 (1.72 nmoles) (ou d'épicatéchine 5) dans 5 ml de méthanol. On acidifie par 3 ml d'HCl à 37%. Les produits phénoliques sont extraits à l'acétate d'éthyle (6 fois volume à volume). Après séchage et évaporation sous vide à 30°C le résidu est repris par 10 ml d'eau et soumis à une séparation par chromatographie liquide haute performance préparative (Waters Associates Prep LC500A, colonne C18, débit 150 ml/min, solvant d'élution=acide acétique à 10%).

(*)- Service Commun d'Analyse RMN (NANCY I).

(**)- Centre de Recherche TEPRAL Champigneulle -54250.

(***)- Service d'Analyse Commun LAMMA de l'Université de METZ.

La fraction de B3 (ou B4) récupérée est extraite à l'acétate d'éthyle (cf ci-dessus) ; la solution organique est concentrée à 5 ml, congelée et lyophilisée.

L'identification et la pureté des produits ont été établies par analyse centésimale, spectroscopie UV (B3 λ_{max} méthanol 281nm, $\epsilon=7310$; B4 λ_{max} méthanol 281nm, $\epsilon=7324$), spectroscopie de RMN ^1H des produits décaacétylés et RMN ^{13}C des produits hydroxylés libres (cf. Fig. I, II et III), spectrographie de masse par ionisation chimique et impact laser.

Préparation des dérivés décaacétylés des dimères B3 et B4.

L'acétylation a été réalisée à 0°C au moyen d'un excès d'anhydride acétique dans le minimum de pyridine. Après repos 2 heures à t° ambiante, le mélange réactionnel versé dans l'eau est repris au chlorure de méthylène. Après séchage de la couche organique et évaporation sous vide le produit est purifié, si besoin est, par chromatographie sur colonne de silice avec élution par un mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole (4/1 en volume).

Préparation des dérivés méthoxylés de la Catéchine 4 et de l'épicatéchine 5.

La méthoxylation a été effectuée au moyen du diazométhane.

A une solution de diazométhane ($\approx 1\text{g}$) dans l'éther ($\approx 50\text{ ml}$) préparée selon (90) on ajoute les dérivés (4 ou 5) (1 mmole) dissous dans un minimum de méthanol. On laisse la réaction 24 h à t° ambiante, puis les solvants sont évaporés sous pression réduite : les dérivés méthoxylés sont purifiés par HPLC préparative (Waters Prep LC500A) sur gel de silice en éluant avec un mélange hexane-acétate d'éthyle (4/1).

-Rendement : à partir de 4 90%, à partir de 5 70%.

-Catéchine tétraméthoxylée : F 150°C

-Epicatéchine tétraméthoxylée : F 152°C

CHAPITRE IV

METHODE D'ANALYSE DES POLYPHENOLS PAR ----- CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE ----- (HPLC) -----

IV-1. Introduction	Page 45
IV-2. Essais préliminaires	Page 47
IV-2.1. Interaction PVP--Polyphénols	Page 47
IV-2.2. Interaction nylon 66--Polyphénols	Page 49
IV-3. Mode opératoire adopté	Page 50

CHAPITRE IV

METHODE D'ANALYSE DES POLYPHENOLS PAR HPLC

IV-1. Introduction :

Pour suivre les polyphénols au cours de la fabrication de la bière (de l'orge à la bière finie), après avoir mis au point la méthode de synthèse et de séparation en préparatif des dimères de la catéchine et de l'épicatéchine, il nous fallait encore une méthode de dosage fiable, rapide et précise. Nous présentons dans ce qui suit un récapitulatif des méthodes existantes (91) :

AUTEURS	DETECTIONS	QUALITATIVE	QUANTITATIVE	DUREE
HARTONG DE CLERCK et al. STONE et GRAY OWADES et al. HARRIS et RICKETTS KLEBER et SCHMID MacFARLANE MacFARLANE et al. STEINER et STOCKER STEINER BUDAY et al. DE CLERCK et JERUMANIS (méthode EBC) YADAV DADIC et al. DADIC SOGAWA NG et MOCEK THALACKER et al.	Toutes ces méthodes sont du type colorimétrique ou spectrophotométrique	Dosage des polyphénols totaux donc aucune distinction du degré de polymérisation ni de la répartition en fonction de la structure	Elles sont en général toutes quantitatives	Dosage relativement rapide (1 heure environ suivant la préparation de l'échantillon)

AUTEURS	DETECTIONS	QUALITATIVE	QUANTITATIVE	DUREE
WYE et MacFARLANE SCHMID et KLEBER GRAMSHAW VANCRAENENBROECK SOGAWA	Méthodes par chromatographie sur papier avec traitement préalable pour séparer les polyphénols	Très bonne méthode pour déterminer avec précision la répartition des différents polymères et leur degré de polymérisation.	Inconvénient majeur de la chromatographie sur papier. Elle n'est que semi-quantitative dans le meilleur des cas.	En général la durée est moyenne elle dépend de la séparation initiale.
BELLEAU et DADIC MacGUINNESS GRACEY et BARKER DRAWERT et al. VANCRAENENBROECK	Chromatographie en phase gazeuse	Toutes les méthodes sont qualitatives et donnent une bonne répartition des pics suivant le degré de polymérisation et le type de liaison	Elles peuvent être quantitatives mais un mauvais coefficient de variation dû à la dilution des produits de l'échantillon (CV 15 à 20 %)	
VANCRAENENBROECK et LONTIE STEINER et STOCKER SOGAWA EASTMOND DADIC et BELLEAU VANCRAENENBROECK et al. JERUMANIS KIRBY et WHEELER BELLEAU et DADIC MacMURROUGH	Chromatographie sur colonne suivie d'une chromatographie liquide haute performance dans certains cas.	Excellente méthode qualitative lorsqu'elle est suivie de la séparation par HPLC	La méthode par HPLC peut être quantitative mais les méthodes citées ont un mauvais coefficient de variation (~ 15 %) sauf la méthode de MacMURROUGH (60) sur l'orge et le houblon	Le principal défaut des méthodes décrites est la lenteur de la manipulation (plusieurs heures) qui restreint le nombre des analyses lors de recherches sur l'évolution des polyphénols

On remarque donc dans cet arsenal de méthodes qu'aucune ne permet une séparation analytique rapide et précise des monomères et dimères catéchiques. Ceci nous a conduit à mettre au point une méthode de séparation par HPLC.

IV-2. Mise au point de la méthode:

A partir de solutions étalons de catéchine et de B3 nous avons recherché le meilleur protocole permettant l'extraction des polyphénols de leur solution aqueuse et leur dosage ultérieur de façon quantitative. Deux adsorbants ont été testés :

- la polyvinylpyrrolidone (PVP) soluble et insoluble (elles ne diffèrent entre elles que par la masse moléculaire)
- le Nylon 66.

De même nous avons étudié divers mélanges de solvants de désorption.

IV-2.1. Interaction PVP-Polyphénols:

Le protocole décrit en Annexe II permet de montrer que l'adsorption des polyphénols (catéchine et B3), d'abord croissante atteint une limite (cf courbes I et II). Ce comportement est différent de celui des tannoïdes qui passe par un maximum (92).

La réactivité des polyphénols de faible degré de polymérisation apparaît donc différente de celle des polymères de haut poids moléculaire. L'adsorption est plus forte au niveau de la PVP insoluble.

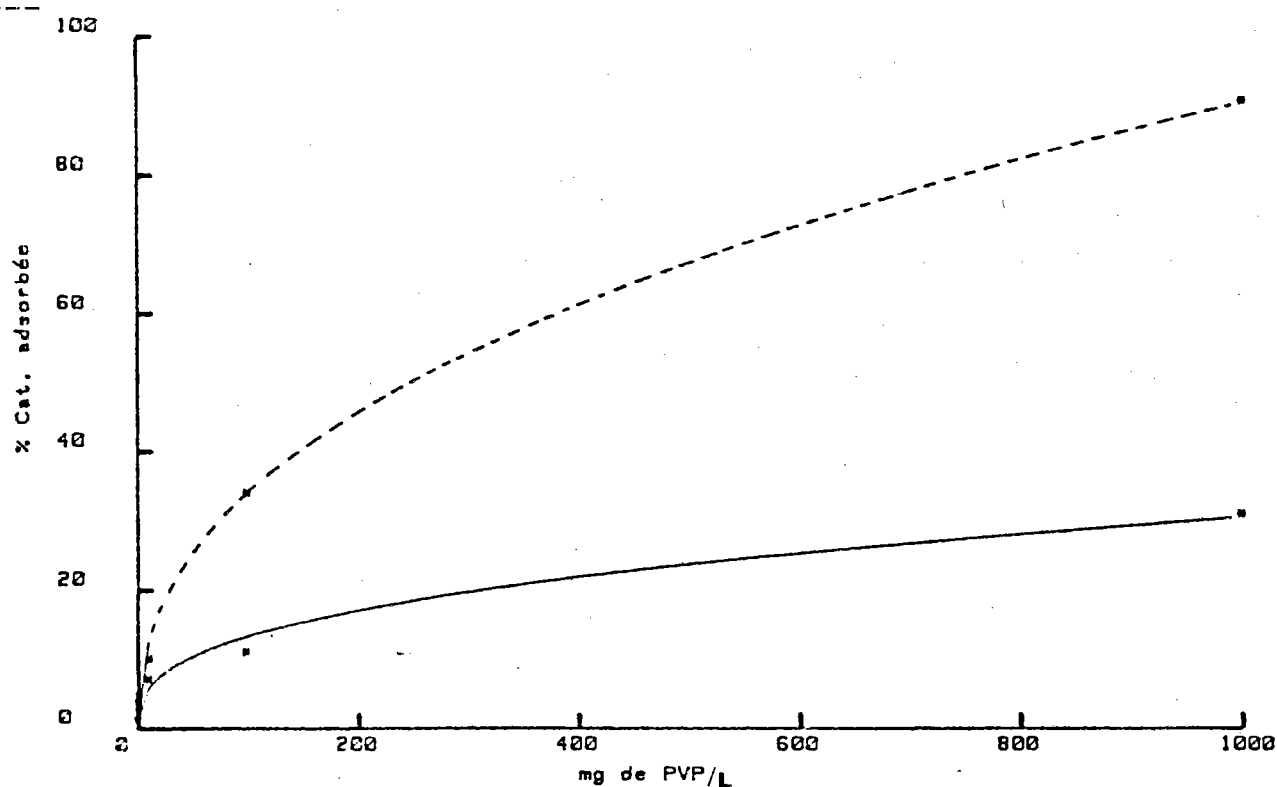
L'étude de la désorption par le mélange acétone /eau a montré que les liaisons catéchine-PVP sont nettement moins fortes que B3-PVP. On ne désorbe que très peu de B3 par le mélange acétone/eau alors que la catéchine est totalement désorbée.

Nous avons observé le même phénomène entre le monomère (-) épicatechine et le dimère B4.

La désorption par la N-Méthylpyrrolidone (93) est bien meilleure mais la distillation est difficile et longue (vide de 10^{-3} torrs et piège à l'azote liquide). Ce protocole ne peut donc être retenu pour une méthode analytique.

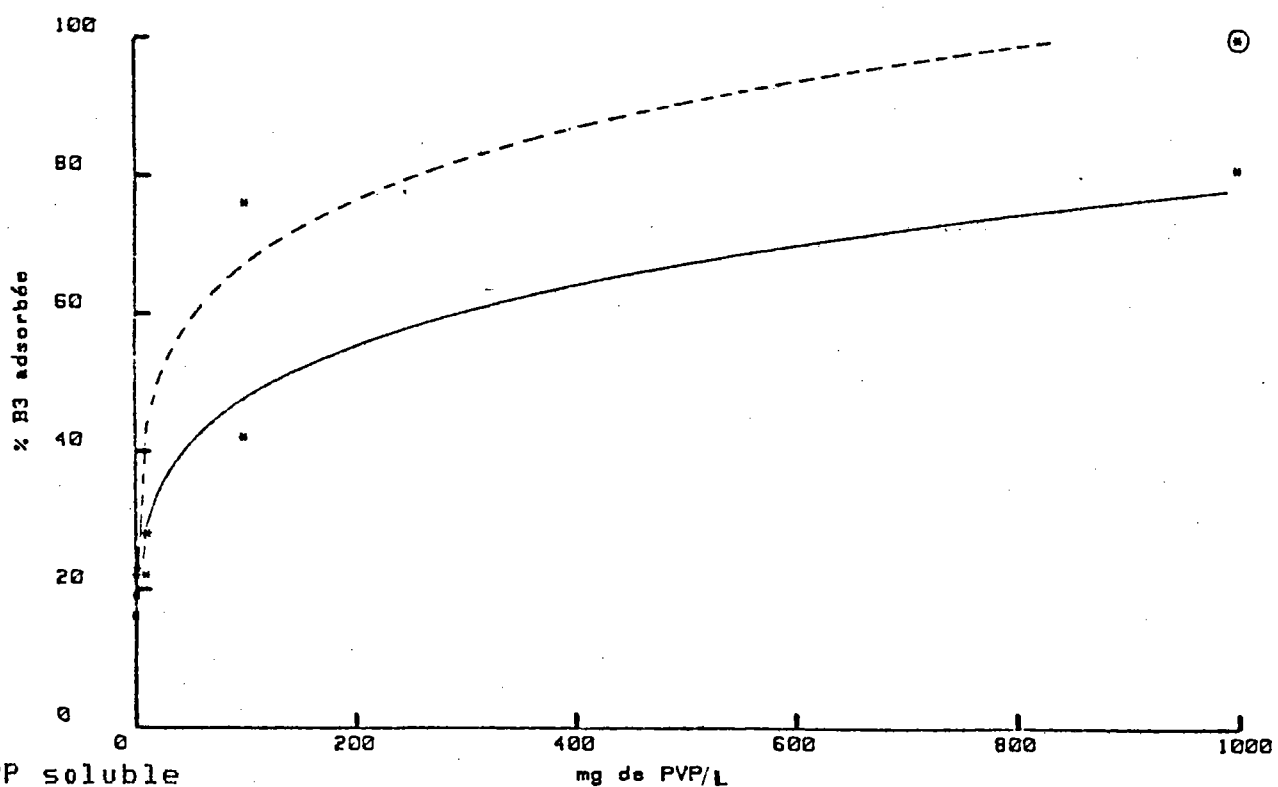
Courbe I

% de Catéchine adsorbée sur PVP *



Courbe II

% de B3 adsorbée sur PVP



— PVP soluble

--- PVP insoluble

* : Les valeurs expérimentales se trouvent en Annexe II Page 104

IV-2.2. Interaction Nylon 66-Polyphénols :

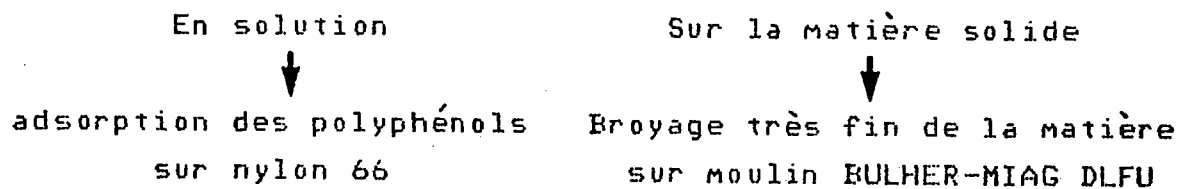
Dans le tableau II qui suit nous avons réuni tous les résultats de nos études sur les diverses opérations après optimisation.

Tableau II : Résultats de l'interaction Nylon 66-Polyphénols
----- (en mg/litre)

	B ₃	CATECHINE	B ₄	EPICATECHINE
Solution ETALON	44 mg	125 mg	28 mg	106 mg
Après Adsorption	0	0	0	0
Après Désorption	43 mg	125 mg	29 mg	109 mg
Après Extraction	45 mg	129 mg	30 mg	110 mg

Le choix du nylon comme adsorbant et du mélange acétone/eau (75/25) (cf:Annexe III) comme éluant conduit à une adsorption totale des polyphénols sur le nylon suivie d'une extraction totale par le solvant. Ce sont donc les conditions que nous avons retenues dans le mode opératoire adopté ci-après.

IV-3. Mode opératoire adopté :



La méthode est rédigée suivant les normes AFNOR (voir annexe II).

Cette méthode d'analyse qualitative et quantitative peut être exécutée en 60 minutes avec un coefficient de variation très acceptable. Ce résultat est obtenu grâce à l'optimisation de l'adsorption par le Nylon 66 et à l'élution rapide par le mélange acétone/eau.

CHAPITRE V

EVOLUTION DES POLYPHENOLS AU COURS DE

LA FABRICATION DE LA BIERE

V-1. Evolution au cours du maltage :	Page 52
V-2. Evolution au cours du brassage et de la conservation :	Page 55
V-3. Discussion :	Page 62

EVOLUTION DES POLYPHENOLS AU COURS DE

LA FABRICATION DE LA BIÈRE

V-1. Evolution au cours du maltage :

L'étude a porté sur trois orges [GERBEL 6 rangs d'hiver (6RH), CARINA 2 rangs de printemps (2RP), SONIA 2 rangs d'hiver (2RH)]. Nous avons suivi l'évolution de la catéchine (courbe III) et de la B3 (courbe IV) du 1er jour au 6ème jour de germination.

La catéchine subit une dégradation importante de 40 à 70% au terme de 6 jours de germination. De plus cette dégradation se manifeste dès le premier jour.

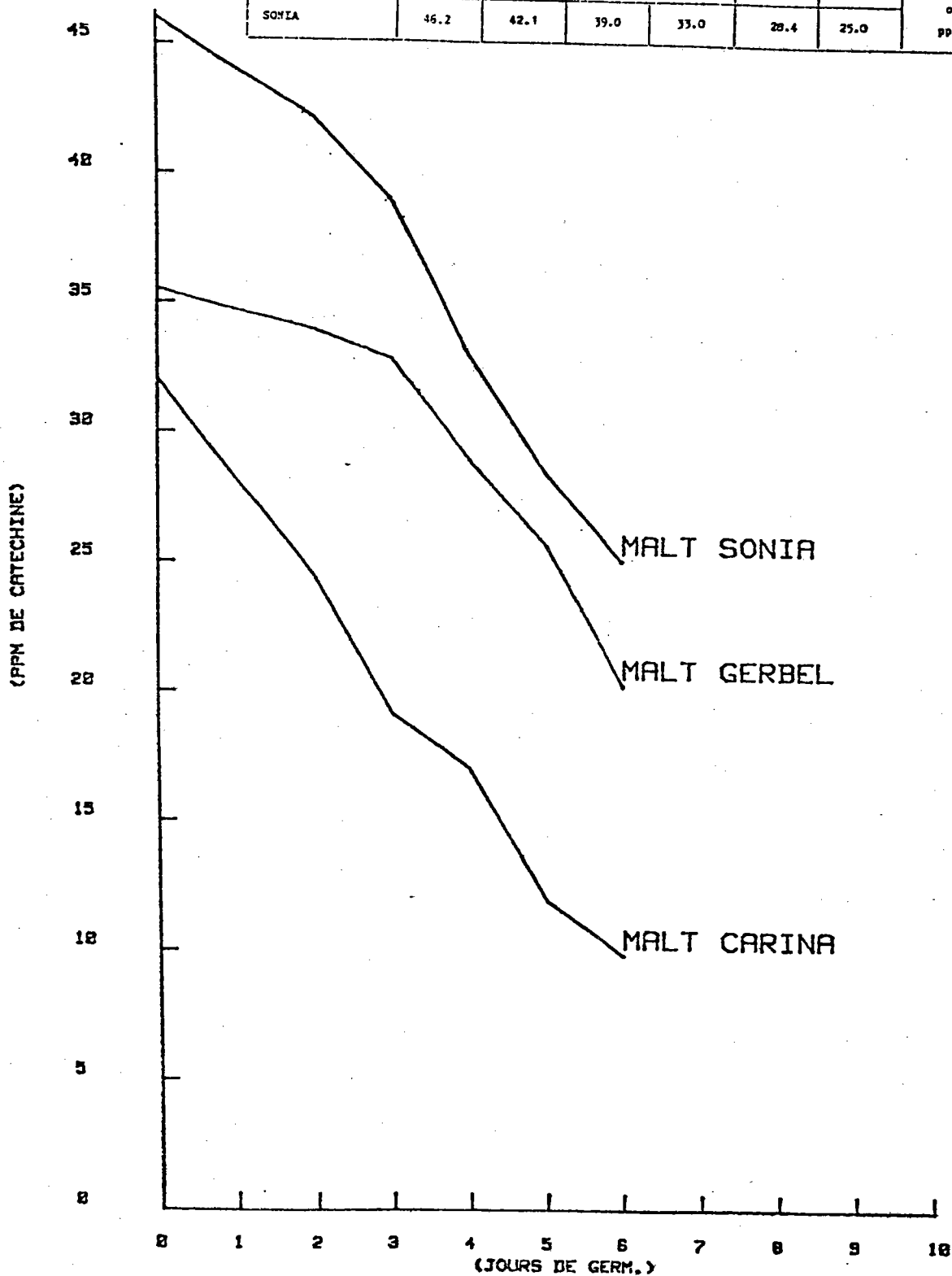
Par contre, on constate que la teneur en B3 se stabilise au bout d'un temps variable selon l'orge considérée à une valeur qui demeure ensuite pratiquement constante au cours du maltage. Ainsi si ce plateau est atteint dès le premier jour avec la variété Sonia, il ne l'est qu'au bout du 3ème ou 4ème jour respectivement pour les variétés Carina et Gerbel.

Pour expliquer ces variations de comportement entre la catéchine et son "dimère" B3 on peut émettre l'hypothèse d'une différence de sensibilité à l'oxydation de ces deux composés, la catéchine étant plus sensible que la B3.

De façon à vérifier cette hypothèse nous avons étudié, en solution modèle, la vitesse d'oxydation de la catéchine et de la B3 par la polyphénoloxydase (PPD) (cf : chapitre VII).

Courbe III

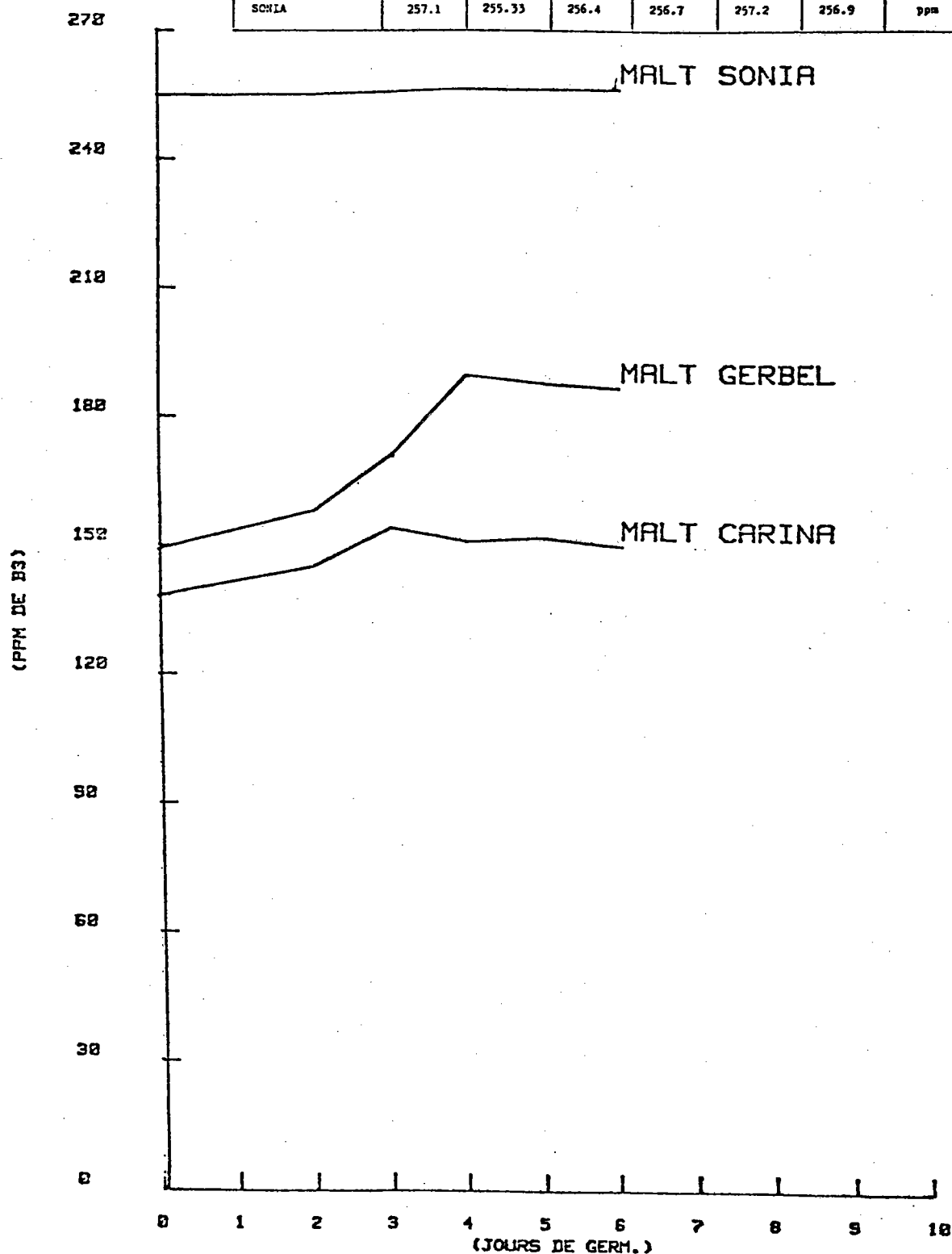
TYPE D'ORGE	NOMBRES DE JOURS DE GERMINATION						RESULTATS en mg/1000g ou ppe
	ORGE	2	3	4	5	6	
GERBEL	35.5	33.9	32.8	29.9	25.6	20.2	
CARINA	32.0	24.3	19.1	17.0	11.9	9.8	
SONIA	46.2	42.1	39.0	33.0	28.4	25.0	



EVOLUTION DE LA CATECHINE PENDANT
LA GERMINATION DE L'ORGE

Courbe IV

TYPE D'ORGE	NOMBRE DE JOURS DE GERMINATION						RESULTATS en mg/1000 g ou ppm
	ORGE	2	3	4	5	6	
GERBEL	143.3	158.5	171.6	190.2	188.0	186.9	
CARINA	138.1	145.5	154.1	151.3	152.1	150.2	
SONIA	257.1	255.33	256.4	256.7	257.2	256.9	



EVOLUTION DE LA B3 PENDANT
LA GERMINATION DE L'ORGE

V-2. Evolution au cours du brassage et de la conservation :

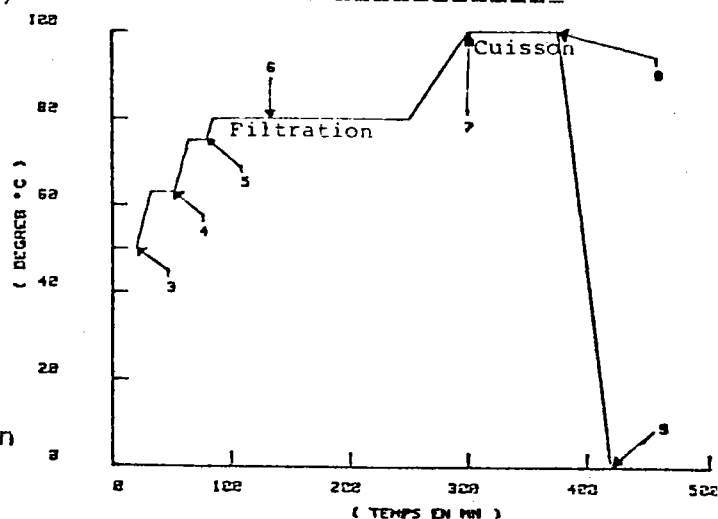
Les résultats qui suivent et l'analyse qui en découle ont été établis sur des brassins pilotes (malts LIX 81 et houblonnage par extrait de houblon). Il est à noter que l'extrait de houblon ne contient que très peu de polyphénols (cf:Annexe IV).

Les teneurs en ppm des solutions ont été ramenées à la dilution finale, c'est à dire que les valeurs se trouvant dans les tableaux sont comparables entre elles.

Sur les courbes en abscisse nous avons les prélèvements de 2 à 14 avec :

- 1.orge et malt (cf : ci-dessus)
- 2.début empâtage
- 3.palier 50°C (fin palier)
- 4.palier 63°C (fin palier)
- 5.palier 75°C (fin palier)
- 6.premier bouillon
- 7.début ébullition
- 8.fin ébullition
- 9.premier jour de fermentation
- 10.sixième jour de fermentation
- 11.fin garde
- 12.embouteillage
- 13.un mois après embouteillage
- 14.six mois après embouteillage

Courbe d'un brassin

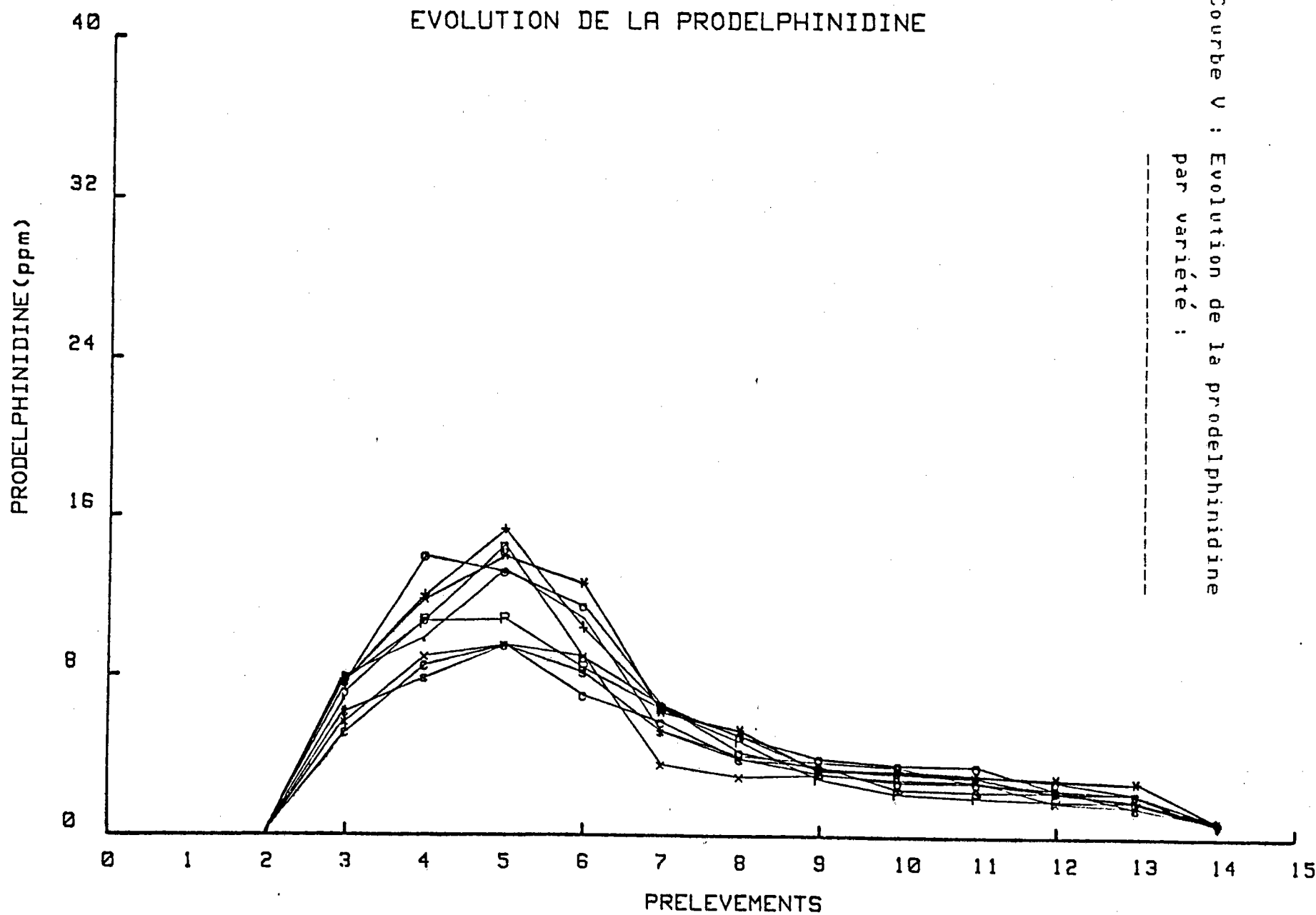


En ordonnée nous avons les teneurs en ppm avec :

- p---p : Plaisant C (6RH)
- P---P : Plaisant B (6RH)
- +---+ : Menüet (2RP)
- *---* : Béatrice (2RP)
- o---o : Carina (2RP)
- x---x : Sonia 1 (2RH)
- s---s : Sonia 2 (2RH)
- .---. : Triumph (2RP)
- c---c : Claret (2RP)

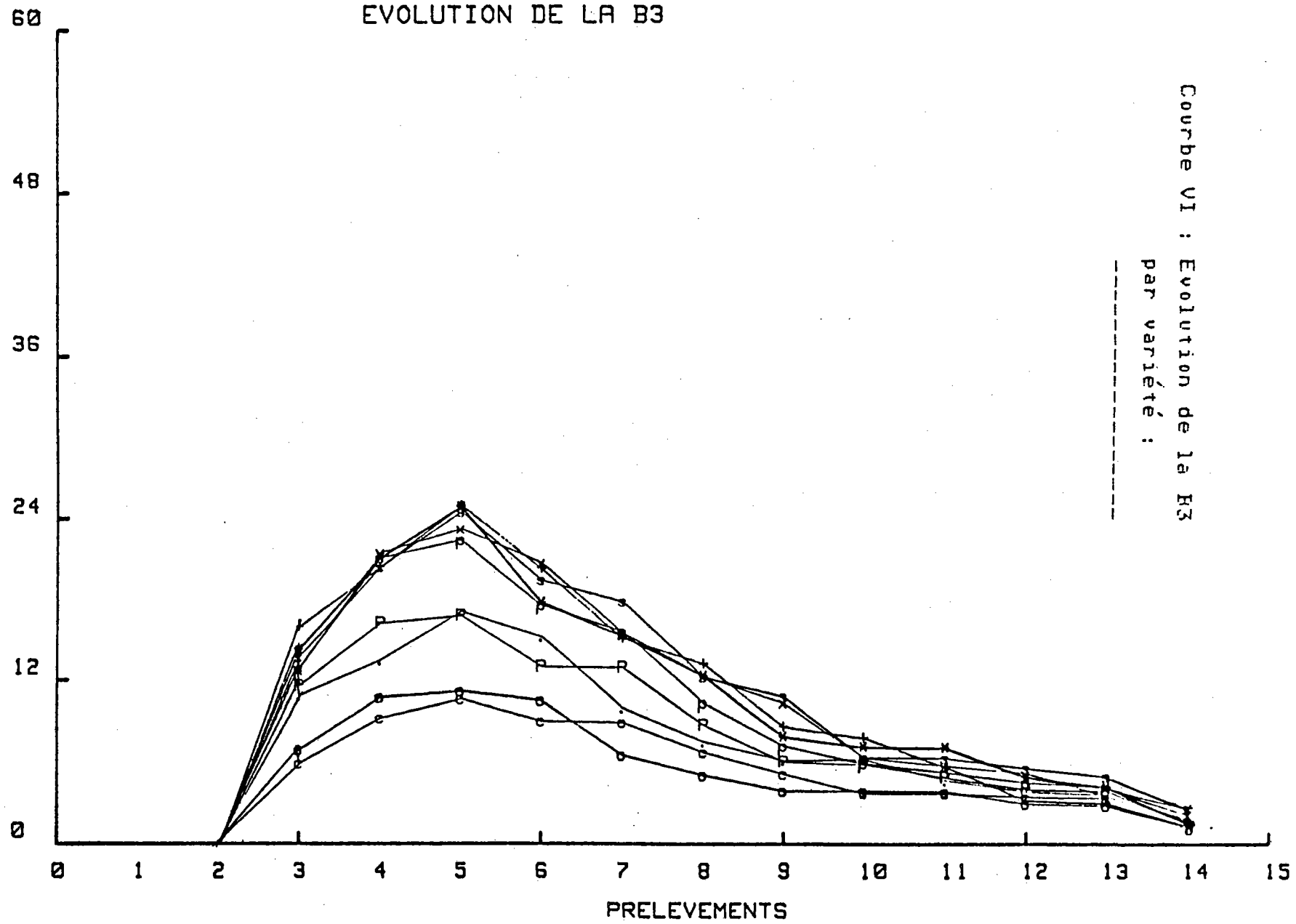
NB : On trouvera en annexe III les détails du procédé de fabrication de la bière en pilote, les tableaux et courbes qui en résultent et qui ne figurent pas ici pour plus de clarté.

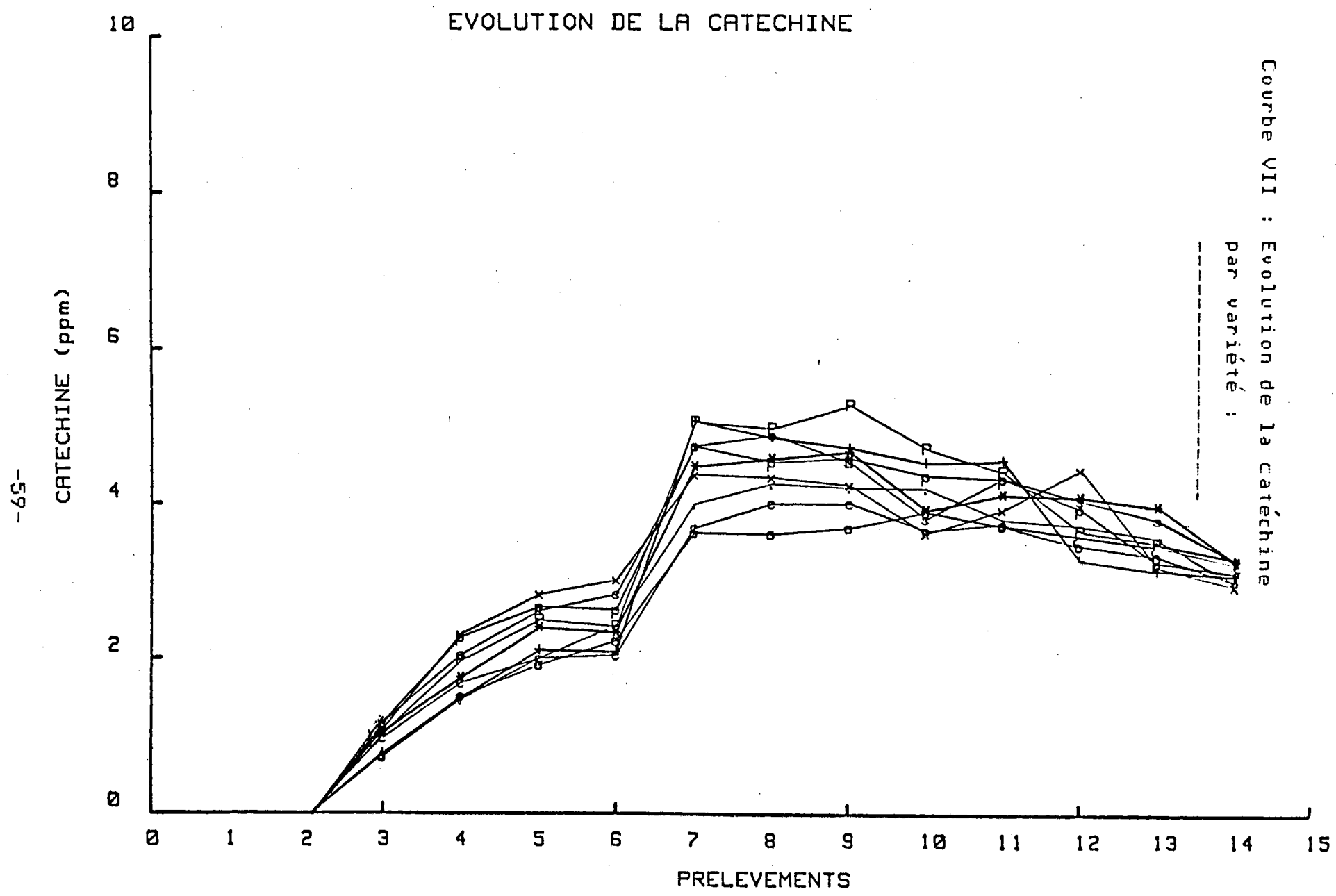
Courbe V : Evolution de la prodelphinidine
par variété :



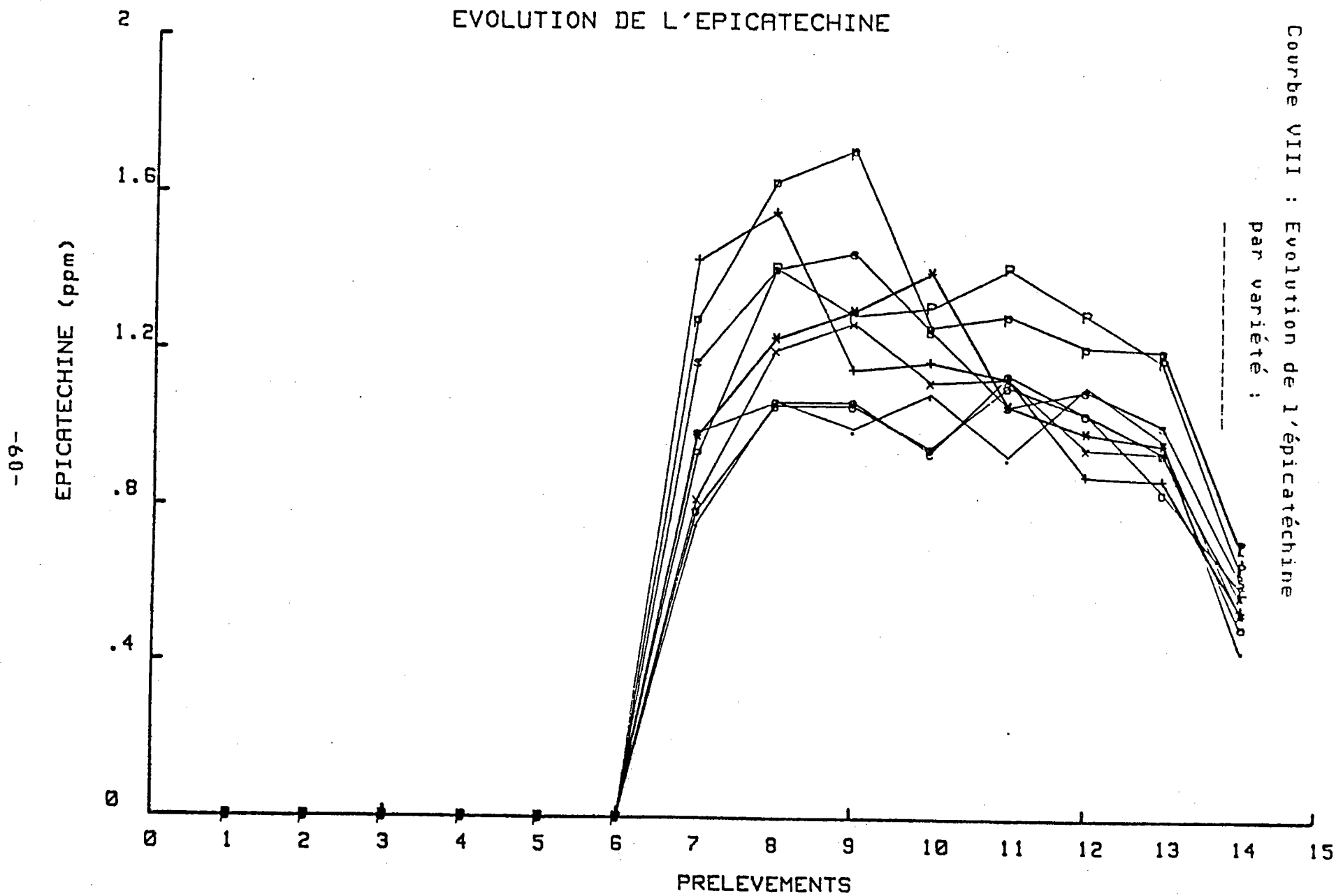
158

83 (ppm)



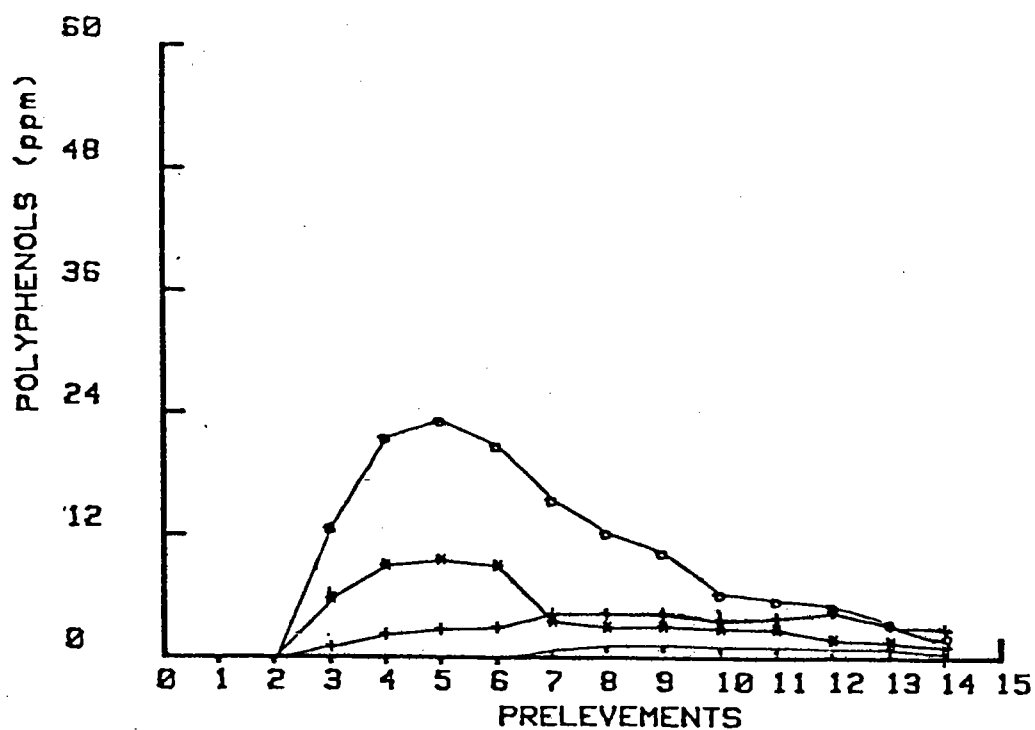


Courbe VIII : Evolution de l'épicaéchine
par variété :



Courbe IX : Evolution prodelphinidine, B3, catéchine et épicatechine :

-
- o—o : B3
 - *—* : Prodelphinidine
 - +—+ : Catéchine
 - .—. : Epicatechine



EVOLUTION SUR MALT SONIA 1

V-3. Discussion :

V-3.1. Prodelphinidine et B3 :

Dans les deux cas l'évolution est similaire. On constate d'abord une croissance nette pendant le brassage tant que le malt est en contact avec l'eau par suite de la solubilisation des deux dimères. Ceux-ci ne sont pas extraits à 100 %. L'analyse du résidu ("drèches"), récupéré après centrifugation du liquide pendant le prélèvement à 75°C, montre que l'extraction des dimères est en partie incomplète : on retrouve bien la quantité de produit manquant avec toutefois une faible disparition de polyphénols.

Puis à partir de la filtration (maische) la décroissance apparaît et se poursuit de façon régulière jusqu'à fin ébullition, ceci étant dû en partie à l'instabilité des deux dimères vis à vis de la température et du pH. En effet on montrera dans le chapitre suivant consacré à l'évolution de la B3 en solution modèle que la transformation des dimères en cyanidine et en catéchine a lieu à pH acide pour une température de 80°C pendant 180 minutes (cuve filtre pendant le brassage) ou à ébullition pendant 80 minutes (chaudière à houblonner). L'instabilité est moins forte entre 0°C et 20°C mais existe toujours.

V-3.2. Catéchine :

L'évolution de la catéchine est identique à celle des dimères lors du brassage , avec toutefois une meilleure dissolution du produit dans l'eau.

Par contre l'extraction devient supérieure à 100 % après filtration, il y a donc eu formation de catéchine. En effet l'étude en solution modèle (cf chapitre VI) montre que la proportion de dimère qui réagit forme bien, par chauffage en milieu acide à $T > 80^{\circ}\text{C}$, la quantité de monomère en excès. Ceci confirme bien l'augmentation de la catéchine au cours de la filtration de la maische (trois heures à 80°C).

V-3.3. Epicatéchine :

L'apparition de l'épicatéchine à partir de la filtration (maische) ne peut être due à sa dissolution car elle n'est pas présente dans la matière première (malt et houblon en extrait) ou trop faiblement. Par contre on montrera dans la suite que son apparition est obtenue par chauffage en milieu acide de la catéchine qui forme de l'épicatéchine (à ébullition seulement). Son évolution ultérieure suit celle des polyphénols (décroissance lente au cours du temps).

CHAPITRE VI

ETUDE EN SOLUTIONS MODELES DE LA ----- CATECHINE, EPICATECHINE ET E3 ----- SOUMISES AUX CONDITIONS DU BRASSAGE -----

VI-1. Réaction Catéchine-Epicatéchine Page 65

VI-2. Réaction E3-Catéchine Page 66

CHAPITRE VI

ETUDE EN SOLUTIONS MODELES DE LA

CATECHINE, EPICATECHINE ET B3

SOUMISES AUX CONDITIONS DU BRASSAGE

De façon à mieux connaître l'évolution de ces polyphénols au cours du brassin nous avons étudié leur évolution en fonction du pH et des conditions de brassage (température et durée).

-80°C pendant 180 minutes (cuve filtre).

-ébullition pendant 80 minutes (chaudière à houblonner).

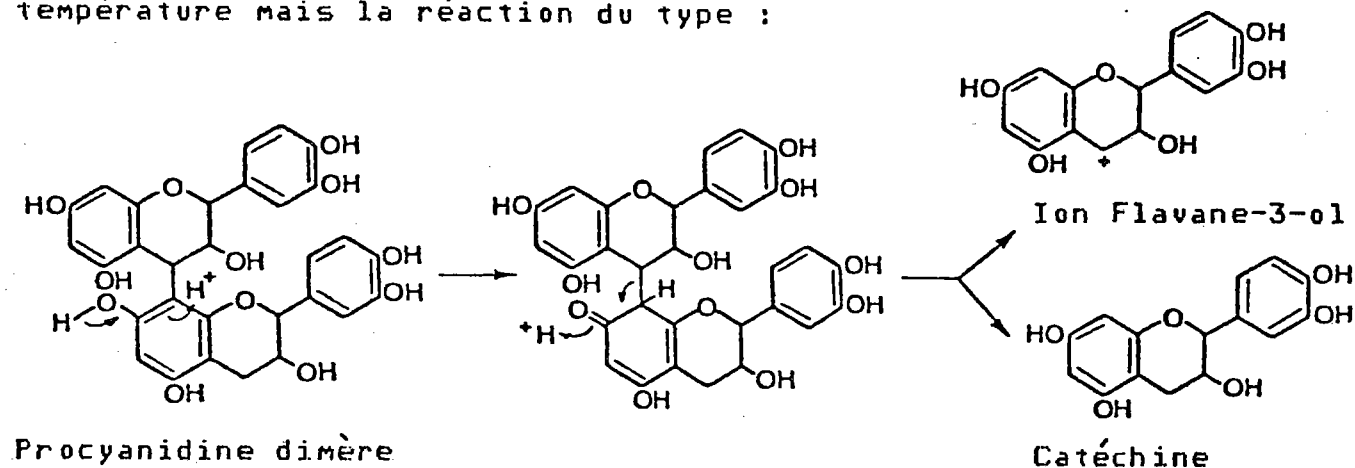
Le pH des solutions est obtenu par le mélange adéquat de solutions tampons phosphate citrate 0.1M à 20°C. Les mélanges étalons de polyphénols sont à une concentration de 100 ppm.

VI-1. Réaction Catéchine-Epicatéchine :

L'augmentation de la température favorise la réaction de transformation à pH fixe (comparer courbes X-XI et XII-XIII qui suivent). La vitesse de la transformation Catéchine-Epicatéchine diminue fortement lorsque l'on abaisse le pH et devient très lente pour des pH voisins de 4. Ceci explique en partie la faible quantité d'épicatéchine dans le moût après ébullition (courbes X à XIII).

VI-2. Réaction B3-Catéchine :

La transformation de la B3 est plus rapide à l'ébullition qu'à 80°C mais les produits résultants de la réaction sont différents (comparer les chromatogrammes II et III). On constate en effet que la réaction à 80°C fournit deux pics qui n'apparaissent pas à 100°C. La formation de Catéchine a bien lieu dans les deux conditions de température mais la réaction du type :

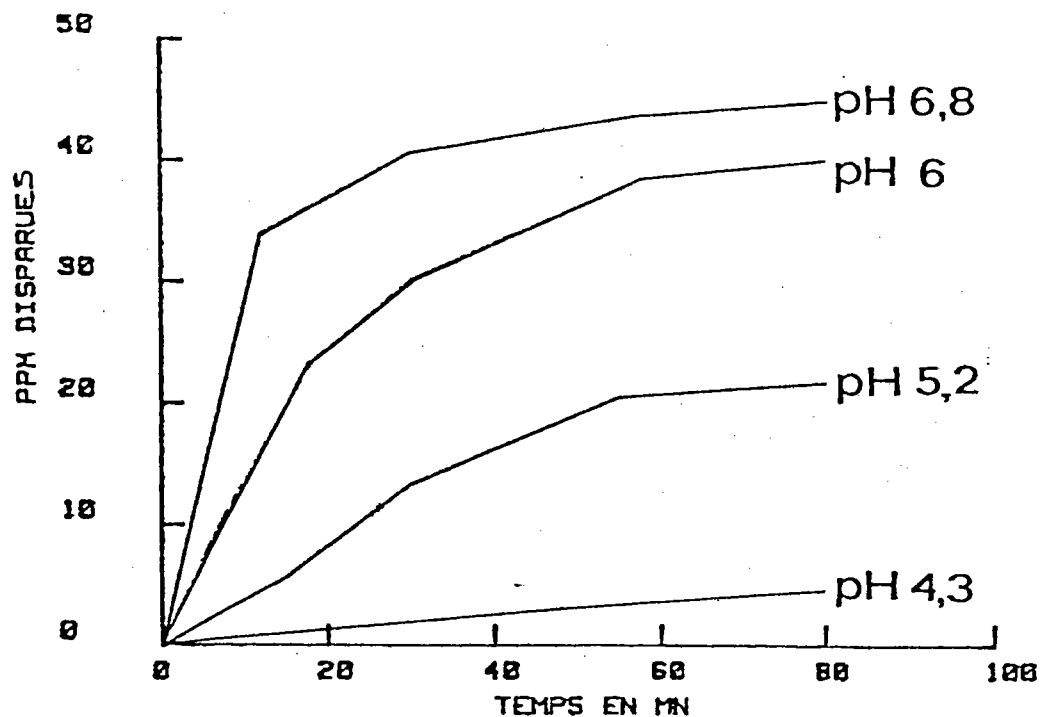


devrait fournir une mole de catéchine pour une mole de B3. Or la présence de catéchine a bien été constatée mais la quantité formée est nettement inférieure à la théorie (cf tableaux III et IV et courbe XIV). Il semblerait que la catéchine qui devrait apparaître se transforme immédiatement dans un autre équilibre qui n'est pas celui vu précédemment car il n'y a pas d'épicatéchine dans les mélanges après réaction.

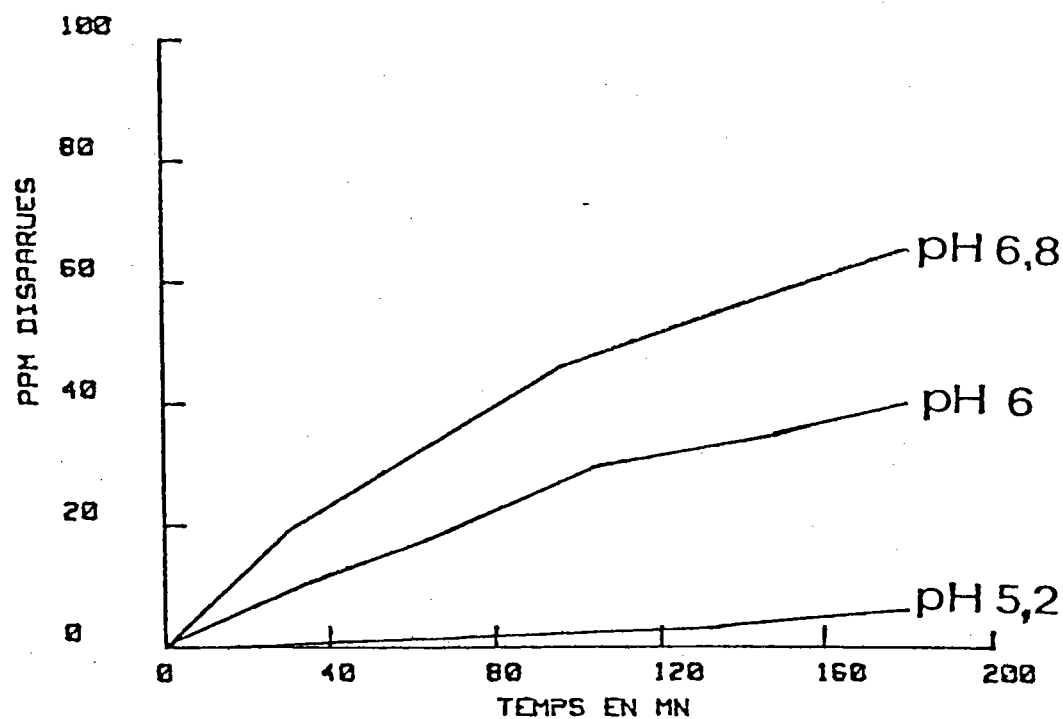
On notera encore que durant l'ébullition la dégradation de la B3 est plus importante à pH 6 qu'à pH 5.1 et devient faible pour un pH 4.1 comme le montre les chromatogrammes III et IV.

Ces différents effets expliquent la disparition de la B3 au cours des étapes de filtration et de houblonnage et la faible quantité de catéchine formée. Le calcul montre que la relation entre B3 disparue et Catéchine formée pendant le brassage est identique à l'équilibre en solution modèle au même pH que le moût.

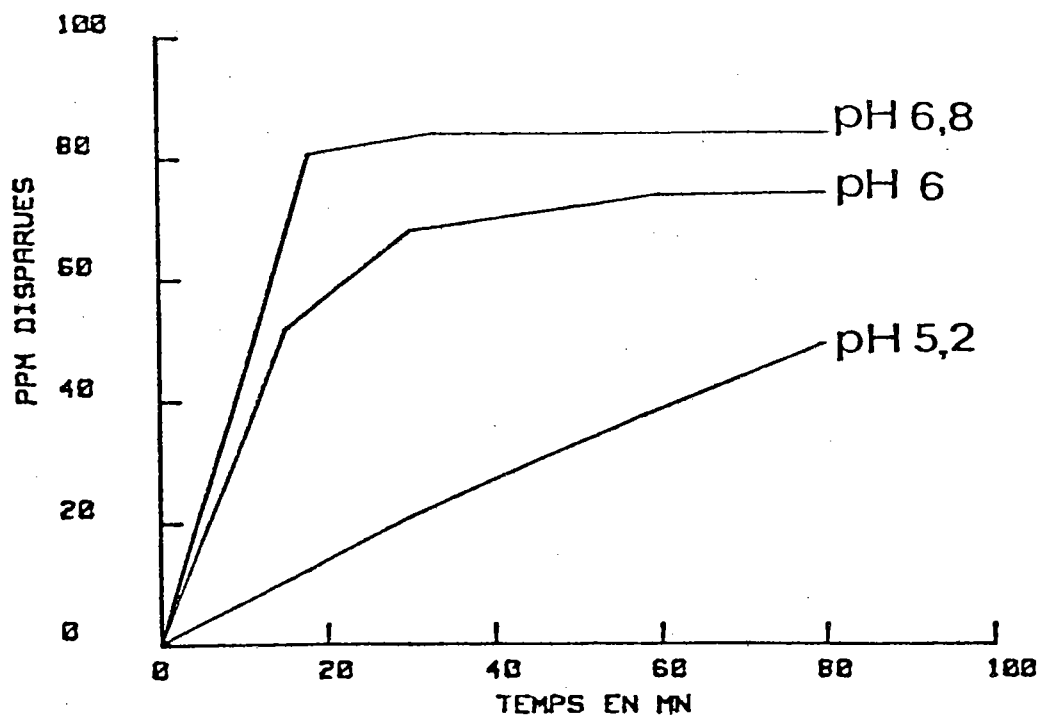
Courbe X : Evolution de la Catéchine pendant
 ----- l'ébullition en fonction du pH.



Courbe XI : Evolution de la Catéchine à
 ----- 80°C en fonction du pH.



Courbe XII : Evolution de l'Epicatechine pendant
----- l'ébullition en fonction du pH.



Courbe XIII : Evolution de l'Epicatechine à
----- 80°C en fonction du pH.

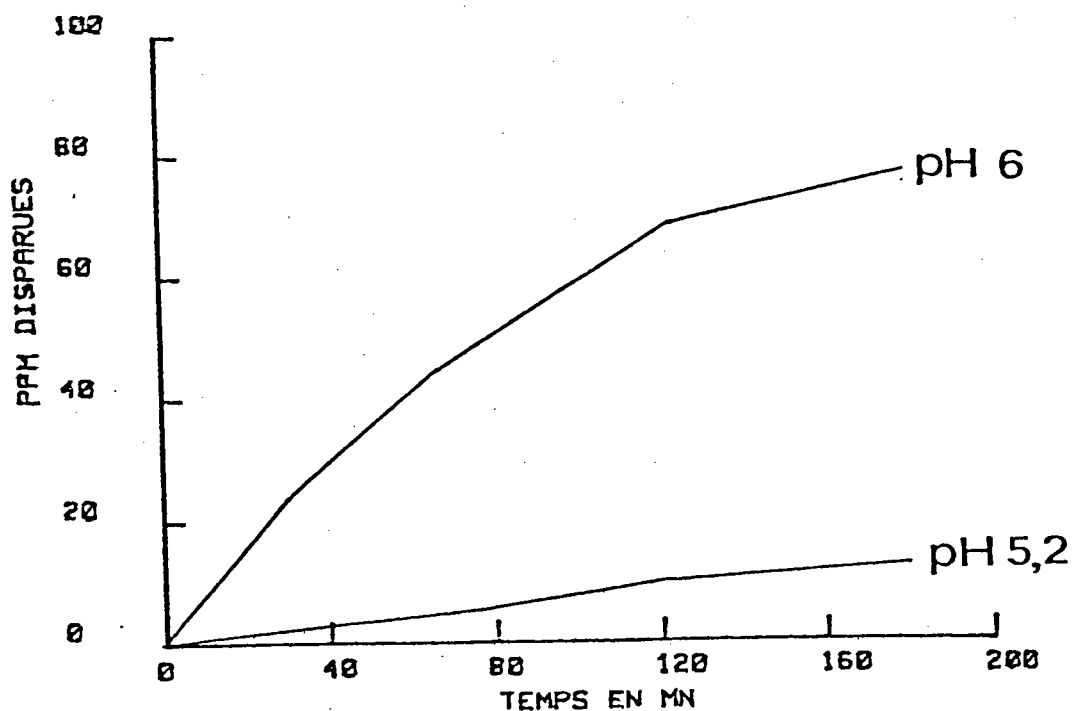


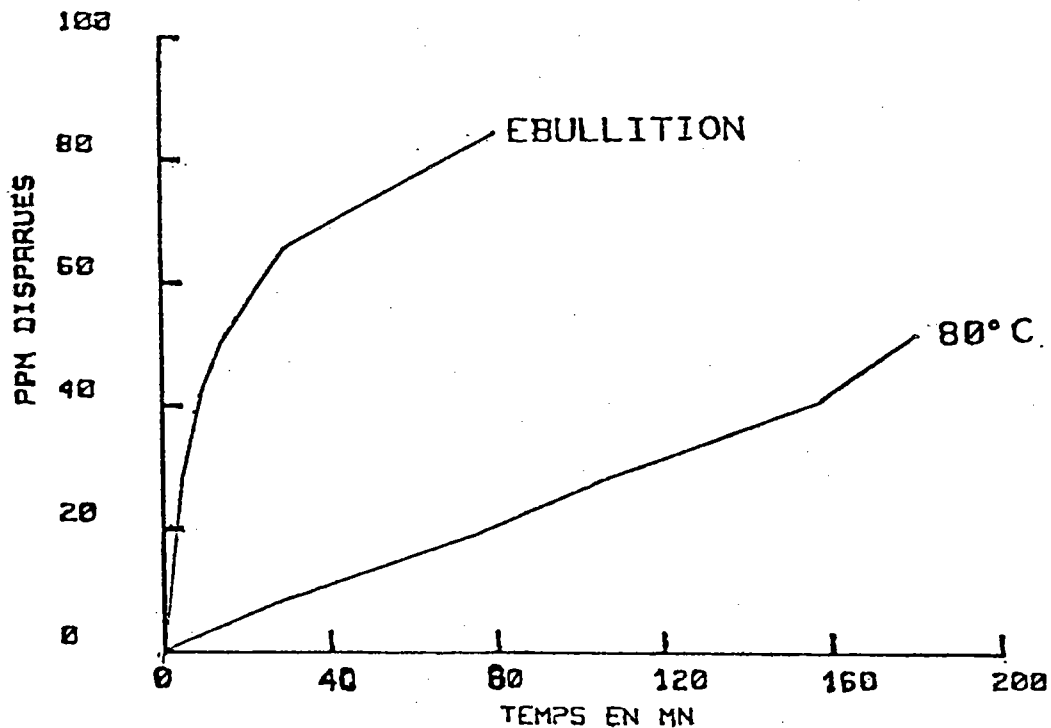
Tableau III : Evolution de la B3 à ébullition.

pH 6	TEMPS- 0 MN	TEMPS- 5 MN	TEMPS- 10 MN	TEMPS- 15 MN	TEMPS- 30 MN	TEMPS- 60 MN
B3 DISPARUE _{ppm}	0.00	27.90	42.80	51.20	66.10	84.70
CATECHINE FORMEE _{ppm}	0.00	1.80	3.70	5.50	6.50	6.90

Tableau IV : Evolution de la B3 à 80°C.

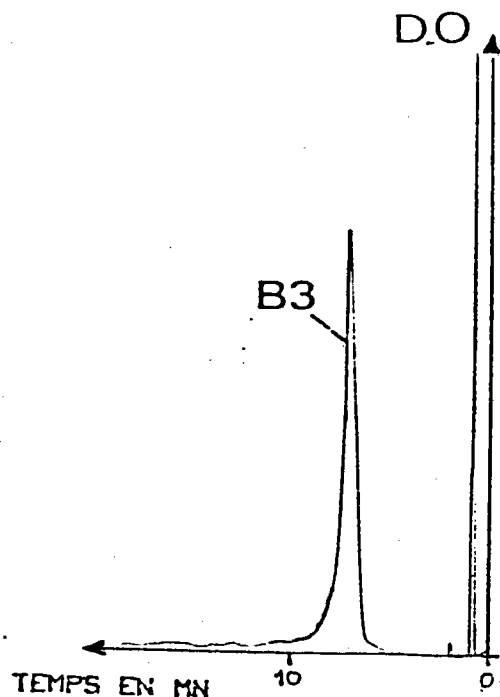
pH 6	TEMPS- 0 MN	TEMPS- 15 MN	TEMPS- 32 MN	TEMPS- 75 MN	TEMPS- 103 MN	TEMPS- 150 MN	TEMPS- 180 MN
B3 DISPARUE _{ppm}	0.00	4.30	8.60	19.00	27.60	40.60	51.80
CATECHINE FORMEE _{ppm}	0.00	1.20	1.70	3.50	4.40	5.20	5.50

Courbe XIV : Evolution de la B3 pendant
l'ébullition et à 80°C à pH 6.



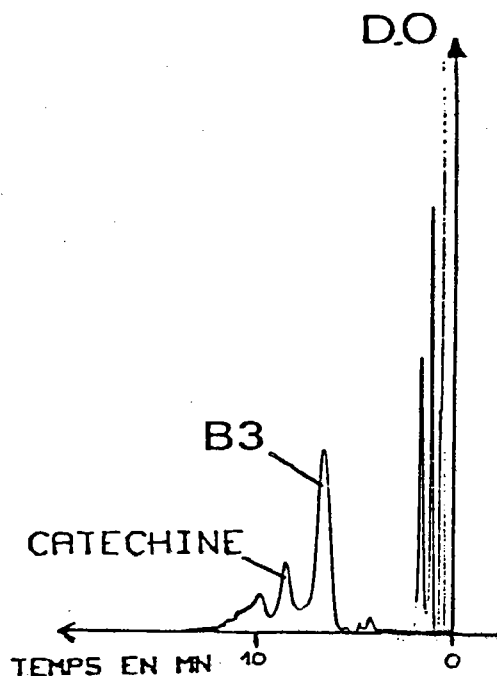
Chromatogramme I :

B3 avant réaction



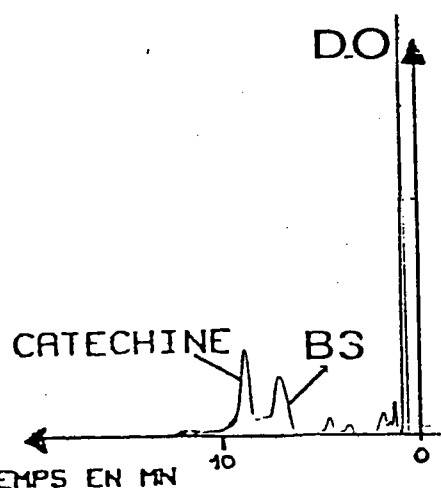
Chromatogramme II :

B3 après réaction à 80°C
durant 180 mn à pH 6



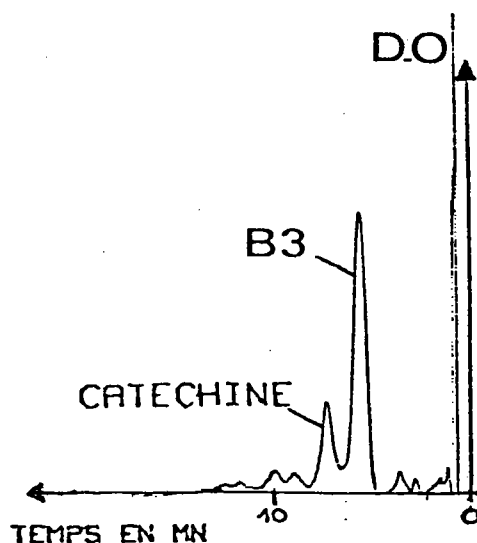
Chromatogramme III :

B3 après réaction à
100°C durant 80 mn
à pH 6



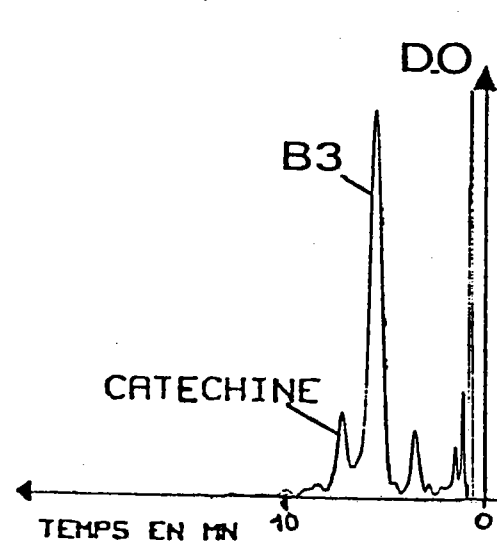
Chromatogramme IV :

B3 après réaction à
100°C durant 80 mn
à pH 5.1



Chromatogramme V :

B3 après réaction à
100°C durant 80 mn
à pH 4.1



CHAPITRE VII

ETUDE DE L'OXYDATION ENZYMATIQUE

PAR LA POLYPHENOLOXYDASE (PPO)

DE LA CATECHINE, EPICATECHINE, B3 ET B4

VII-1. Etude théorique de la réaction
enzymatique

Page 73

VII-2. Discussion des résultats
expérimentaux

Page 75

CHAPITRE VII

ETUDE DE L'OXYDATION ENZYMATIQUE

PAR LA POLYPHENOLOXYDASE (PPO)

DE LA CATECHINE, EPICATECHINE, B3 ET B4

Afin de mieux interpréter les phénomènes rencontrés lors du procédé de fabrication de la bière (principalement au cours du maltage) nous avons fait l'étude de l'oxydation enzymatique sur nos divers substrats polyphénoliques.

L'étude expérimentale se trouve en annexe V. La réaction a été étudiée de deux manières :

- par enregistrement de la bande d'absorption U-V (360 nm) caractéristique du produit formé lors de l'oxydation.
- par dosage de l'oxygène dissous consommé pendant la réaction.

Dans les deux suivis les conditions expérimentales sont identiques (concentration, pH, température...). Les résultats obtenus au cours des deux études sont donc comparables, on peut en déduire avec une bonne certitude deux points :

- les deux phénomènes enregistrés représentent bien la même réaction.
- les résultats obtenus par l'une et l'autre voie étant identiques la répétabilité de la réaction est bonne.

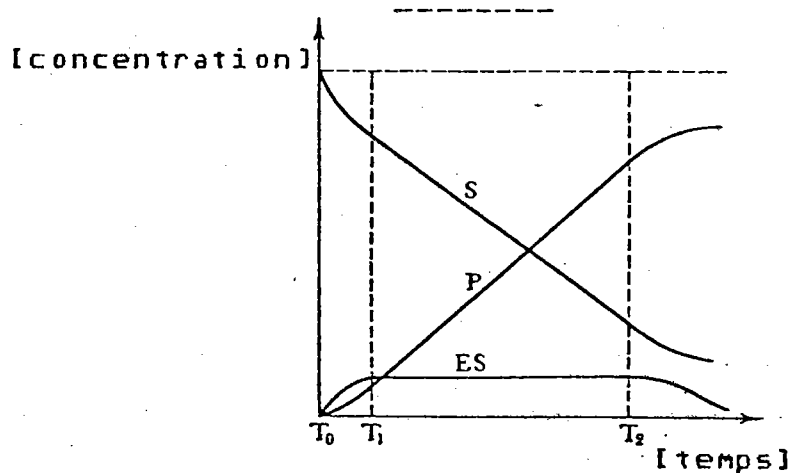
Nous ne reportons ici que les résultats obtenus par le suivi en U-V.

VII-1. Etude théorique de la réaction enzymatique :

Dans la réaction que nous avons étudiée, les différentes relations représentant l'action d'un enzyme (E) sur un substrat (S) sont bien vérifiées à savoir :

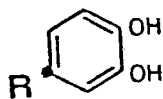
- la disparition en substrat (polyphénol) suit bien la courbe S
- la formation du produit (P) est bien représentée par la courbe P
- dans la phase stationnaire si on double la quantité d'enzyme la vitesse de la réaction est multipliée par deux.

Figure X

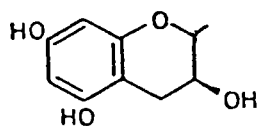


L'oxydation enzymatique par la PPO a été étudiée sur quelques substrats phénoliques (94). Notre étude portera sur quatre polyphénols :

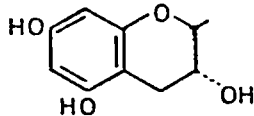
de structure générale



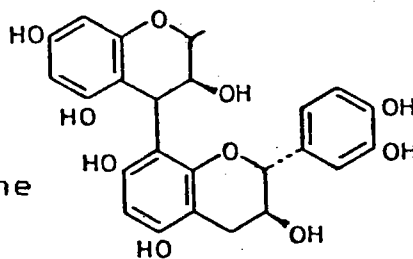
avec R =



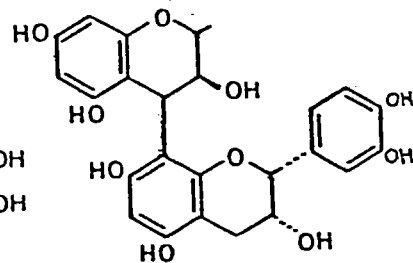
Catéchine



Epicatechine



B3



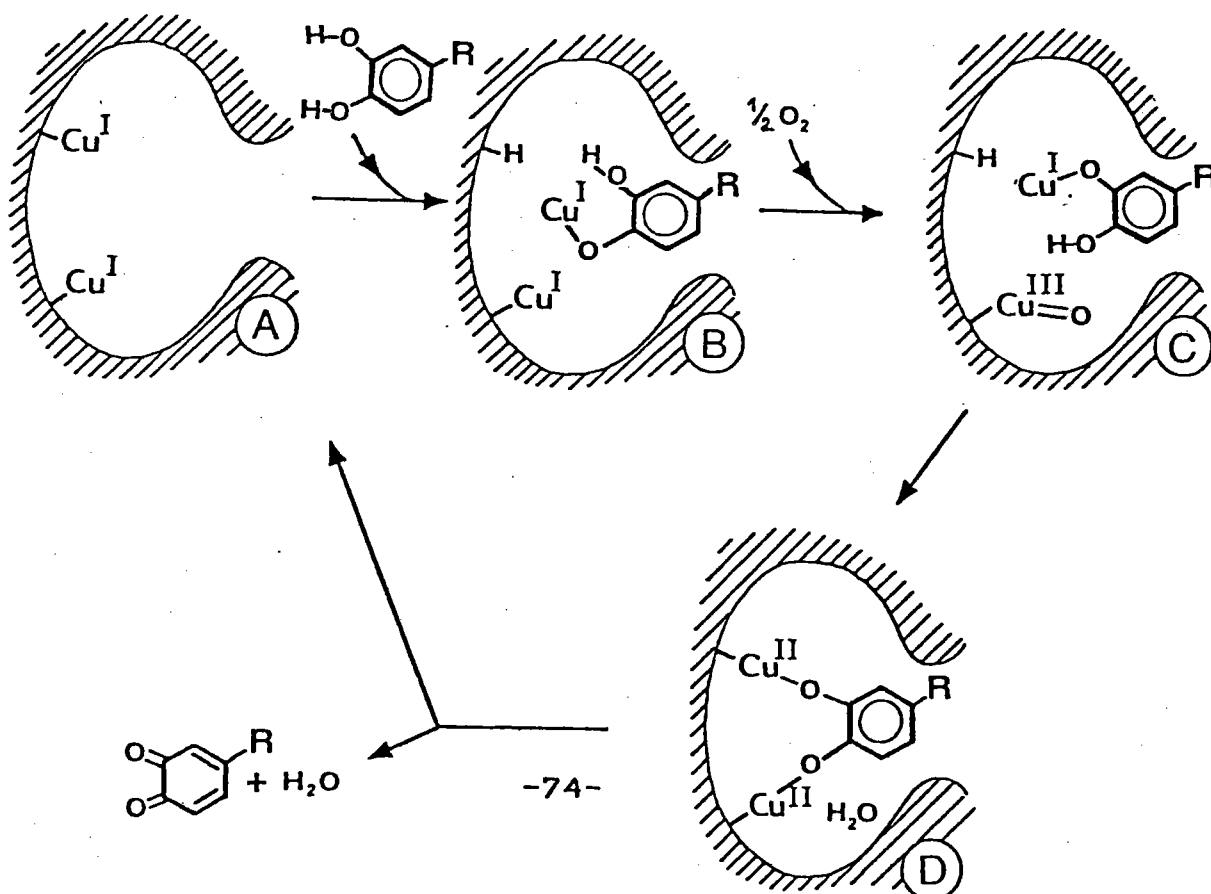
B4

D'après la littérature (95) on peut écrire pour la formation du complexe enzyme-substrat (E-S) ce qui suit :
(voir figure XI)

-[A] état initial, le site actif de l'enzyme est très grossièrement représenté par une cavité qui recèle deux atomes de cuivre au degré d'oxydation +1 (96). L'échange d'un proton phénolique avec un atome de cuivre Cu^{I} permet la formation d'un catécholate cuivreux (état [B]) ; ceci explique que le cuivre des tyrosinases ne subisse un échange isotopique (97) avec ^{64}Cu que lorsque l'enzyme est impliqué dans la réaction d'oxydation des phénols car les atomes de cuivre Cu^{I} se trouvent alors labilisés. Puis l'oxydation de l'état [B] fait passer le cuivre de l'enzyme au degré d'oxydation III. On a observé (98) que les catécholates cuivreux réagissent avec les sels cuivreux.

Le passage de l'état [C] à [D] correspond donc à une oxydo-réduction entre Cu^{I} et Cu^{III} avec formation de H_2O ; l'étape finale est l'oxydation du substrat catécholique en orthoquinone, qui régénère les deux atomes de Cu^{I} de l'état initial [A] et ferme ainsi le cycle catalytique.

Figure XI



VII-2. Discussion des résultats expérimentaux :

Tableau V : Km (constante de Michaelis), Vmax
(vitesse maximum), Ea. (énergie
d'activation).

	Km 10 ⁻³ mole	Vmax U/mg	Ea Kcal/mole
CATECHINE	1.12	95.20	25.00
EPICAT.	1.46	79.40	28.00
B3	1.22	4.90	12.00
B4	7.71	31.30	21.00

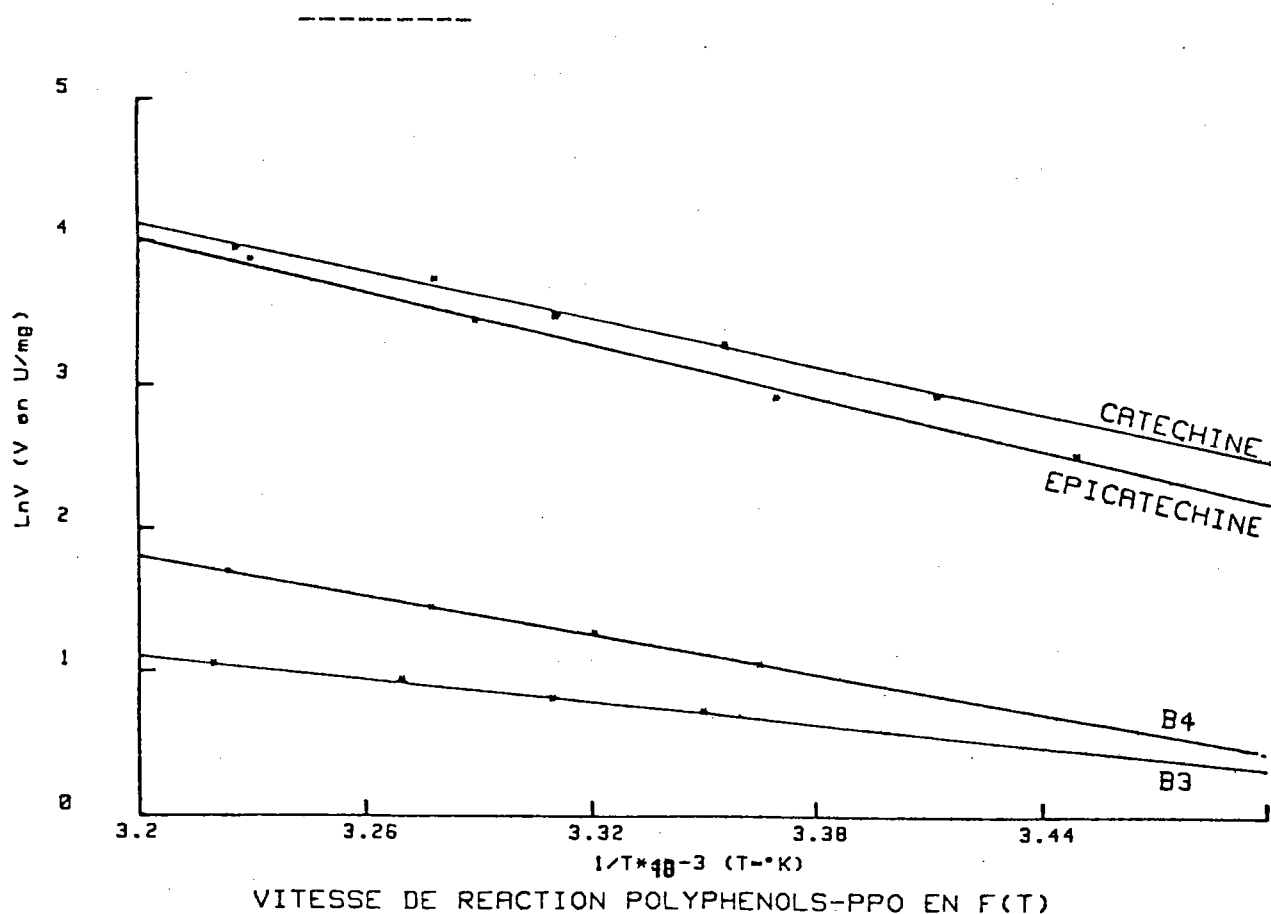
On notera tout d'abord sur les courbes donnant la vitesse de la réaction en fonction de la température (courbe XV) et en fonction de la concentration (courbe XVI) une différence nette entre les deux monomères d'une part et les deux dimères d'autre part. Les droites obtenues pour la catéchine et l'épicatéchine et les valeurs qui en découlent (tableau V), permettent de conclure que l'oxydation enzymatique sur les monomères est identique ceci semble être en accord avec leur structure qui ne diffèrent que par la position de l'hydroxyle en 3, celui-ci n'intervenant pas dans la réaction d'oxydation du noyau catécholique en 2.

Par contre les dimères B3 et B4 ont des vitesses d'oxydation beaucoup plus faibles. Toutefois la vitesse d'oxydation du dimère B4, intermédiaire entre celle des monomères et du dimère B3, traduit vraisemblablement son instabilité en milieu acide. Nous avons constaté en effet aux environs de pH6 la très grande fragilité de la liaison C₄-C₈'. La déshydratation avec rupture de cette liaison a déjà été mentionnée (page : 37). Tout ceci peut rendre compte d'une vitesse un peu plus élevée, due à une transformation préalable du dimère B4 en monomère.

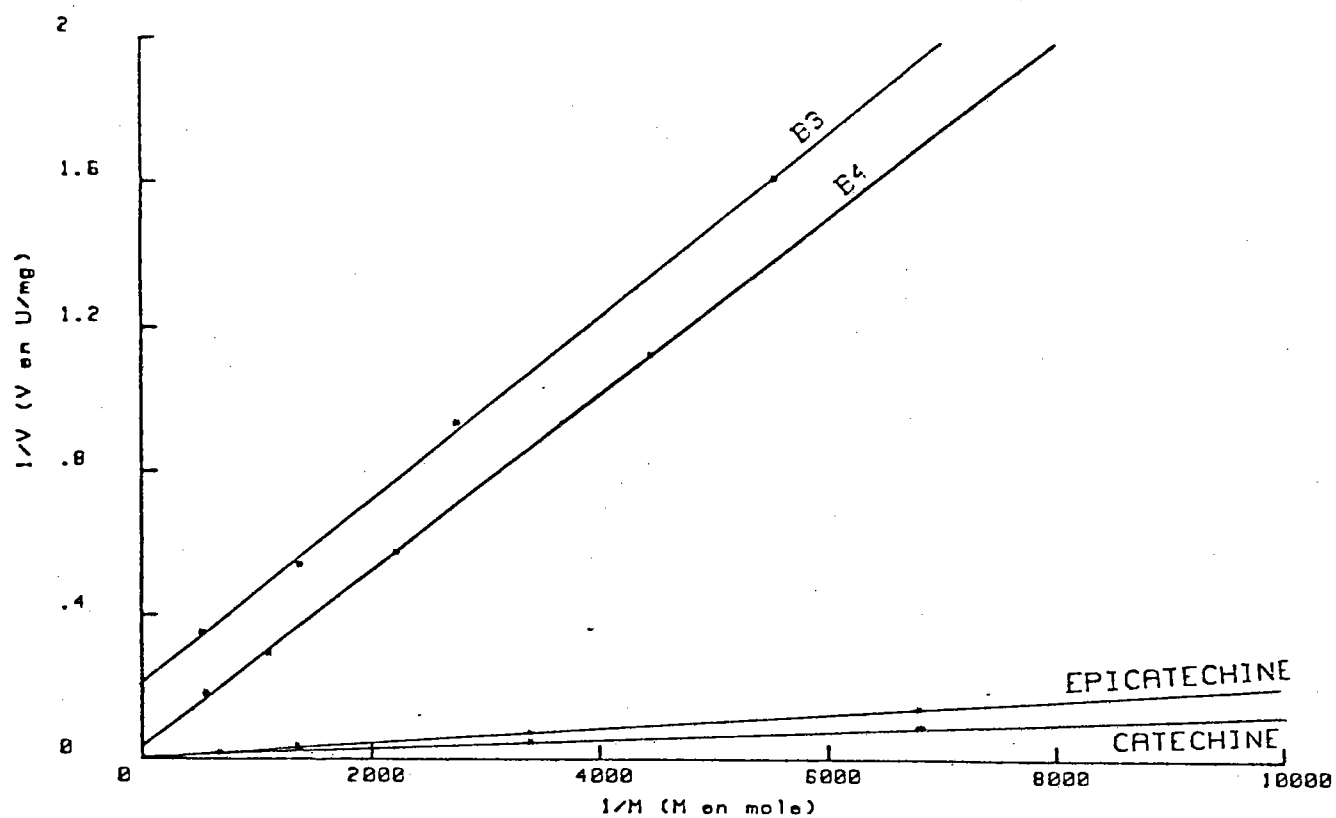
Mais de toute évidence les dimères B3 et B4 sont beaucoup plus difficiles à oxyder par voie enzymatique. ceci peut être mis sur le compte de l'empêchement stérique ne permettant pas leur fixation sur le site actif de l'enzyme.

Pour mieux mettre en évidence la différence d'oxydation entre les monomères et dimères nous avons traité par ordinateur les courbes expérimentales de l'oxydation. Celui-ci a mis en équation les différentes réactions. On constate alors que pour les monomères la traduction mathématique du phénomène est donnée par une équation du type $e^{a+\frac{b}{x}}$ alors que pour les dimères l'équation est bx^c . Ceci montre donc encore la similitude de réaction entre la catéchine et l'épicatéchine d'une part et la B3 et la B4 d'autre part. L'étude expérimentale et la traduction mathématique se trouvent en Annexe V.

Courbe XV



Courbe XVI



VITESSE DE REACTION POLYPHENOLS-PP0 EN F(C)

CHAPITRE VIII

ETUDE DU TROUBLE PERMANENT DE LA BIERE

VIII-1. Introduction	Page 79
VIII-2. Recherche des Glucides	Page 80
VIII-3. Recherche des acides aminés	Page 81
VIII-4. Recherche des Polyphénols adsorbés	Page 81
VIII-5. Recherche des polyphénols liés	Page 84
VIII-6. Conclusion	Page 85

ETUDE DU TROUBLE PERMANENT DE LA BIÈRE

VIII-1. Introduction :

Les résultats présentés dans les chapitres précédents (cf Chapitre V) permettent de suivre, à travers divers échantillons de bières d'origines différentes, l'évolution des polyphénols dimères et monomères au cours des stades successifs de la fabrication et sur une période de conservation de quelques mois.

Il est clair que la teneur globale en ces polyphénols en fin de fabrication est faible (≈ 10 ppm) et ne subit guère d'évolution au cours de la conservation.

Comment expliquer dans ces conditions leur rôle dans l'apparition du trouble permanent ?

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons porté notre attention sur les troubles isolés à partir de bières âgées d'en moyenne cinq années. Après centrifugation, lavage et séchage ces troubles se présentent sous la forme de résidus noirâtres, totalement insolubles dans quel que solvant que ce soit.

Ils sont obtenus à raison de 100 mg en moyenne par litre de bière.

Dans un premier temps, nous avons recherché si les polyphénols étaient bien présents dans ces troubles, en particulier s'ils n'étaient pas simplement adsorbés par liaison hydrogène sur une matrice (par exemple protéique) jouant le rôle du nylon utilisé lors de notre protocole de dosage.

Cette hypothèse s'étant trouvée non confirmée et compte tenu de l'insolubilité totale de ces résidus, nous avons étudié leur hydrolyse soit enzymatique soit en milieu acide ou basique.

Sur l'hydrolysats nous avons recherché les amino acides, les glucides et les polyphénols de façon à établir un bilan quantitatif.

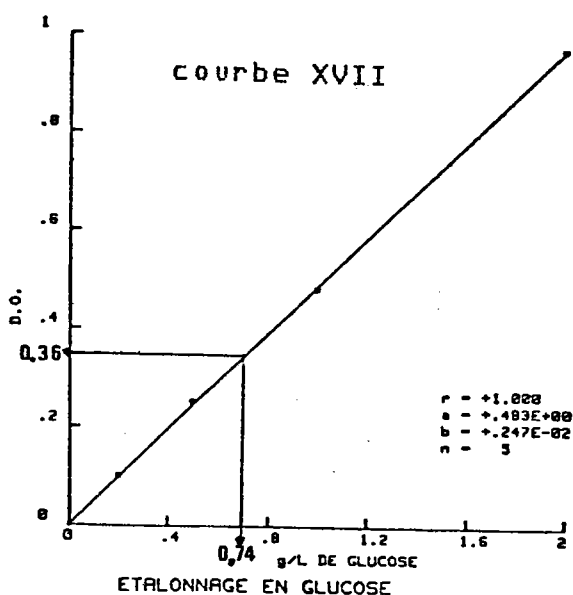
Les protocoles détaillés figurent en Annexe VI . Les analyses ont été effectuées sur cinq échantillons différents. Compte tenu de la grande similitude des résultats analytiques obtenus il semblerait que la constitution de ces échantillons soit indépendante du type de bière dont ils sont issus (Kronenbourg, Kanterbrau). De ce fait, les valeurs indiquées sont les moyennes des résultats portant sur ces cinq échantillons.

VIII-2. Recherche des Glucides :

L'hydrolyse a été conduite en milieu trifluoroacétique à 15 % et le dosage global des glucides réalisé de façon colorimétrique (cf Annexe VI).

Les résultats, exprimés en glucose, sont établis à partir de la droite d'étalonnage (cf Courbe XVII).

La valeur moyenne ainsi obtenue est de 32 %.



	D.O. 420 nm
Glucose 0 g/L	0.00
Glucose 0.2 g/L	.10
Glucose 0.3 g/L	.24
Glucose 1 g/L	.48
Glucose 2 g/L	.97
Hydrolysat	.36

VIII-3. Recherche des Acides aminés :

Nous avons réalisé une hydrolyse en milieu chlorhydrique (6N) et en milieu basique (soude 6N). Les hydrolysats ont été étudiés par l'analyseur d'acides aminés Beckman par chromatographie liquide sur résines échangeuses d'ions (cf Annexe VI).

La teneur en acides aminés du trouble figure sur le tableau VI et sur l'histogramme I ci-après. Le chromatogramme II montre une analyse type d'un mélange étalon et d'un trouble traité en milieu acide pendant 18 heures.

On constate après calcul que la quantité d'acides aminés correspond à 31.7 mg pour 100 mg de trouble. Soit à une quantité de protéines de 27.7 %.

VIII-4. Recherche des Polyphénols adsorbés :

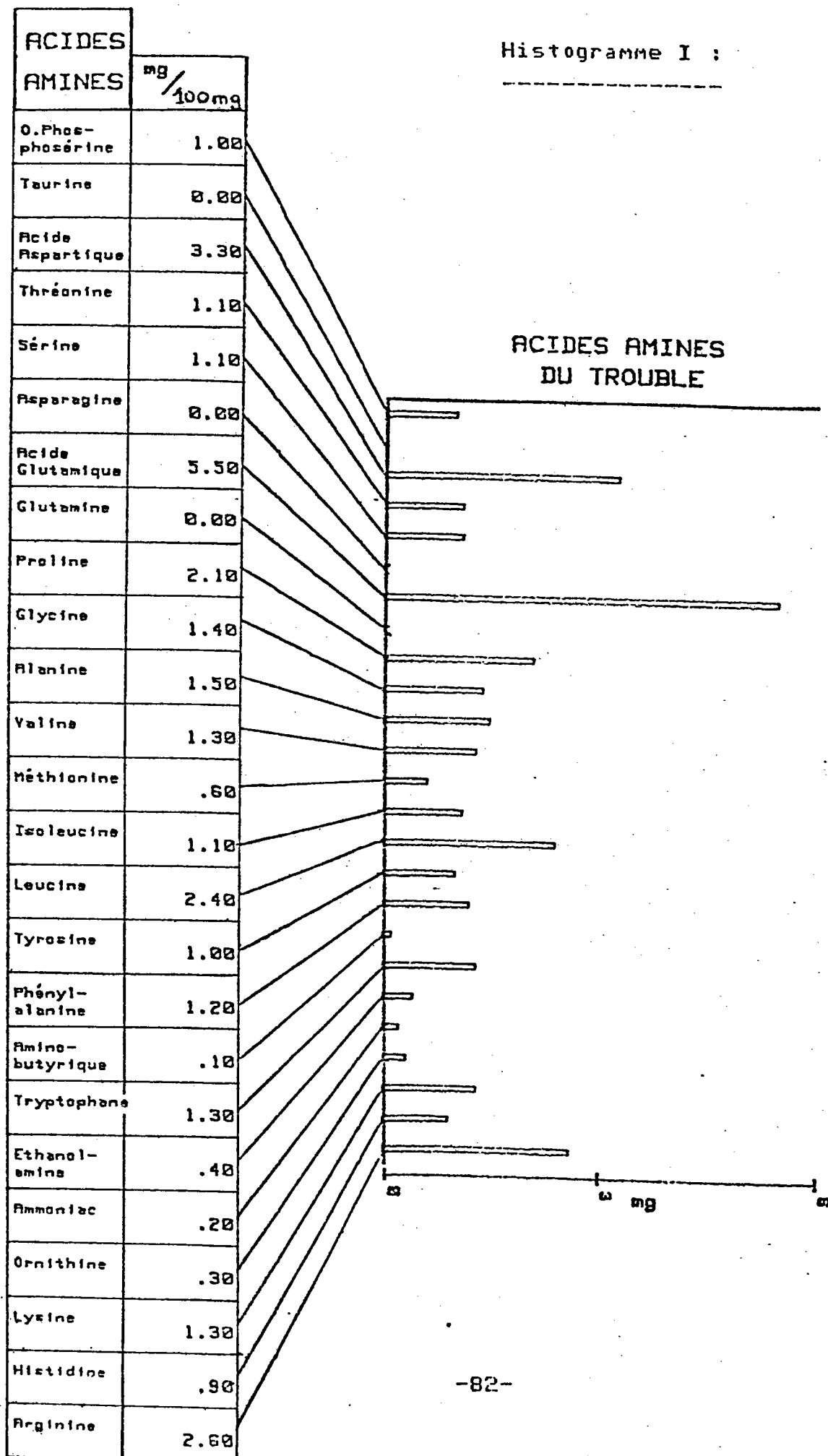
Nous avons appliqué, sans aucun résultat, la technique de désorption en milieu acétone/eau précédemment décrite (cf page 49).

Une démarche analogue a été suivie par TOUKAM-GHOMSI (99) sur des fractions de complexes protéines-proanthocyanidines isolées d'un moût après une heure d'ébullition. Ces complexes, obtenus par précipitation fractionnée au moyen de solutions de sulfate d'ammonium de concentrations variables, ont été traités soit par une solution d'urée (6M), dénaturant protéique classique agissant par rupture des liaisons hydrogène, soit par l'acétone, soit par un agent détergent telque le dodécyl sulfate de sodium.

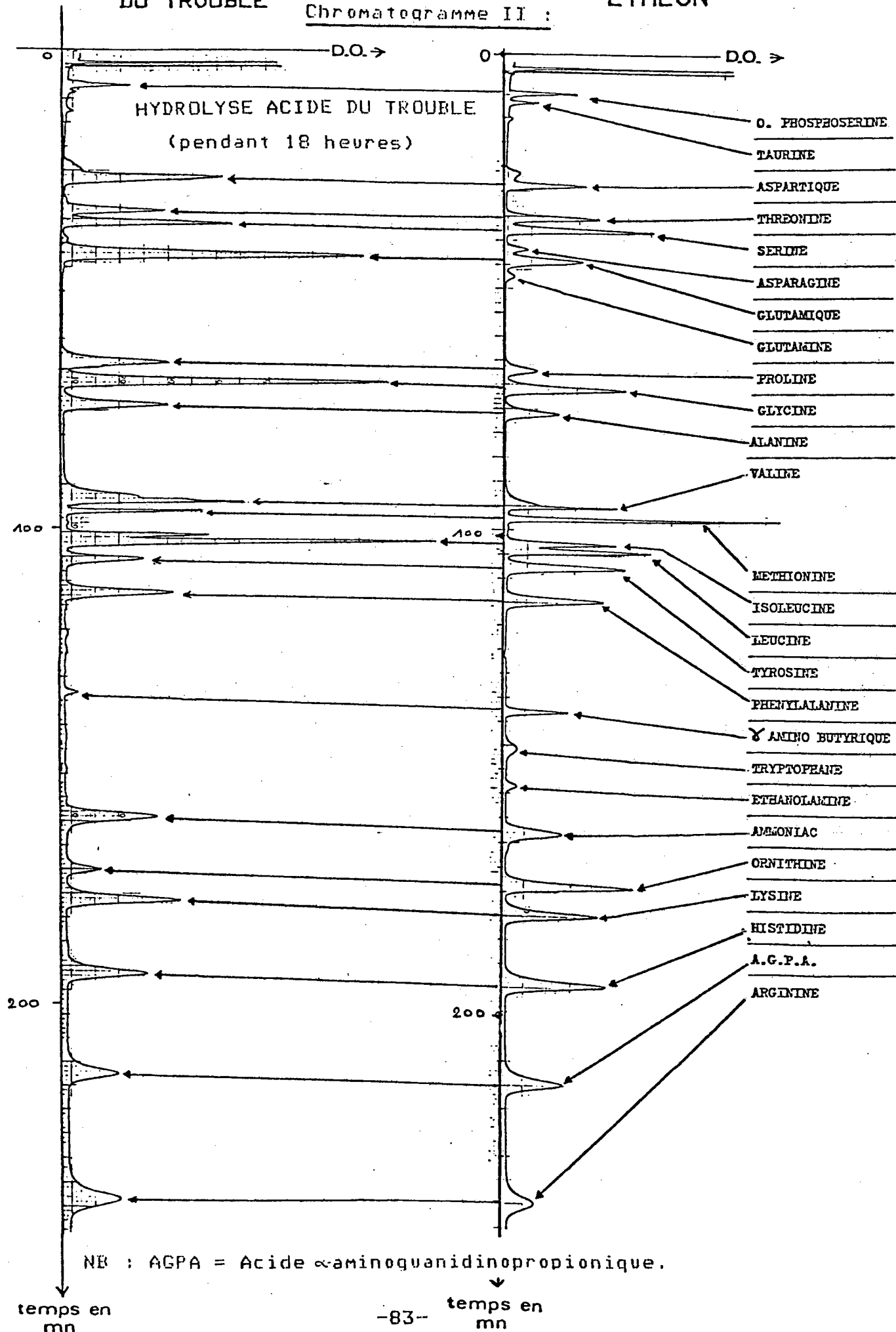
Aucune libération de polyphénols n'a été constatée dans ces diverses expériences.

Histogramme I :

ACIDES AMINES
DU TROUBLE



Chromatogramme II :



VIII-5. Recherche des Polyphénols liés :

VIII-5.1. Hydrolyse enzymatique :

L'hydrolyse par la protéinase K n'a donné que de l'ammoniac dans les conditions optimales de cet enzyme. Aucun acide aminé n'a été libéré. Ceci est certainement dû à l'action de l'enzyme qui n'est possible que si la protéine est soluble. Dans notre cas le précipité à faire réagir est totalement insoluble. L'attaque par la protéinase K n'a donc pu se faire qu'à la surface du trouble d'où la présence d'ammoniac.

VIII-5.2. Hydrolyse chimique :-

La recherche des polyphénols a été effectuée en milieu CF_3COOH à 15 % (cf Annexe VI).

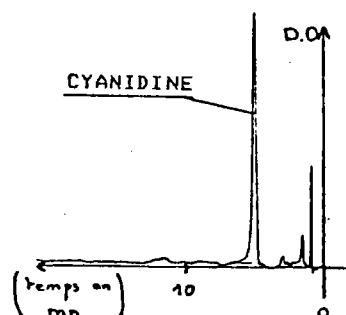
Dans ces conditions, ces composés sont transformés en cyanidine correspondante et dosés sous cette forme.

L'hydrolyse de 5.2 mg de trouble a donné 0.2 mg de résidu d'où 5 mg sont passés en solution. Sur ces 5.2 mg nous avons relevé la présence de 1.5 mg de polyphénols (exprimés en B3).

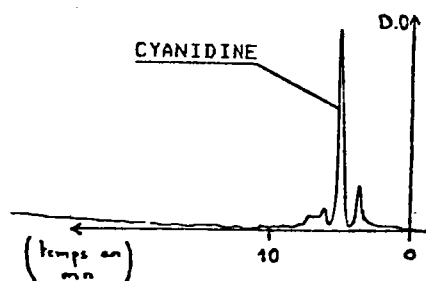
Dans un litre de bière la teneur moyenne en trouble est de l'ordre de 100 mg. La concentration en polyphénols du trouble correspondant à un litre de bière est donc de 28.8 mg.

Ci-dessous sont représentées les analyses HPLC de deux hydrolyses identiques l'une sur la B3 l'autre sur le trouble.

Hydrolyse de la B3



Hydrolyse du trouble



VIII-6. Conclusion :

L'étude de la composition des troubles issus de plusieurs échantillons de bière de cinq ans d'âge nous conduit aux résultats essentiels suivants :

-la composition apparaît indépendante de l'origine de la bière.

-les polyphénols constitutifs du trouble ne sont pas simplement adsorbés par interaction physico-chimique, une hydrolyse chimique (acide ou alcaline) est indispensable à leur libération. Dans ces conditions (acide) ils sont transformés en cyanidine X et la méthode de dosage précédemment décrite pour les polyphénols libres devient applicable au cas des polyphénols liés après étalonnage préalable au moyen du dimère B3.

-il devient clair que si les polyphénols interviennent dans la formation du trouble, ce qui semble bien être le cas, ce n'est pas par évolution des quelques polyphénols libres présents en fin de fabrication. La somme (B3 + Catéchine) disparue entre la bière finie et une période de conservation de 5 années ne représente en effet que 5 mg par litre de bière contre une teneur en polyphénols du trouble de 30 mg par litre.

Ces derniers doivent nécessairement préexister en fin de fabrication sous forme liée soluble.

Ceci conforte l'hypothèse de certains auteurs (64,69,70) selon laquelle la précipitation serait due à des complexes polyphénoliques solubles formés au cours du brassage et qui, au cours de la conservation, s'associent à d'autres constituants de la bière (acides aminés et protéines) pour provoquer le trouble permanent.

Il est à noter que l'analyse des acides aminés entre une bière de 7 jours et de 5 ans montre une nette décroissance de ceux-ci au cours du temps (cf Chromatogramme III, Tableau VII et Histogramme II qui suivent).

Ces constatations nous ont incité à suivre les polyphénols liés au cours de la fabrication de la bière.

Tableau VII :

	Bière de 7 jours	Bière de 5 ans
O.Phos- phosérine	50.60	44.20
Taurine	0.00	0.00
Acide Aspartique	.90	0.00
Thréonine	7.80	9.00
Sérine	1.80	3.00
Asparagine	6.90	1.20
Acide Glutamique	22.90	10.00
Glutamine	9.40	5.50
Proline	344.60	226.00
Glycine	28.90	13.60
Alanine	93.20	22.70
Valine	49.80	13.80
Méthionine	2.90	2.90
Isoleucine	11.80	3.60
Leucine	13.30	6.50
Tyrosine	56.00	13.90
Phényl- alanine	40.70	5.00
Amino- butyrique	100.50	71.30
Tryptophane	158.50	10.10
Ethanol- amine	12.20	10.50
Ammoniac	9.60	5.90
Ornithine	2.80	1.80
Lysine	3.20	3.60
Histidine	22.80	8.70
Arginine	12.70	12.30

Bière de
7 joursBière de
5 ans

Histogramme II :

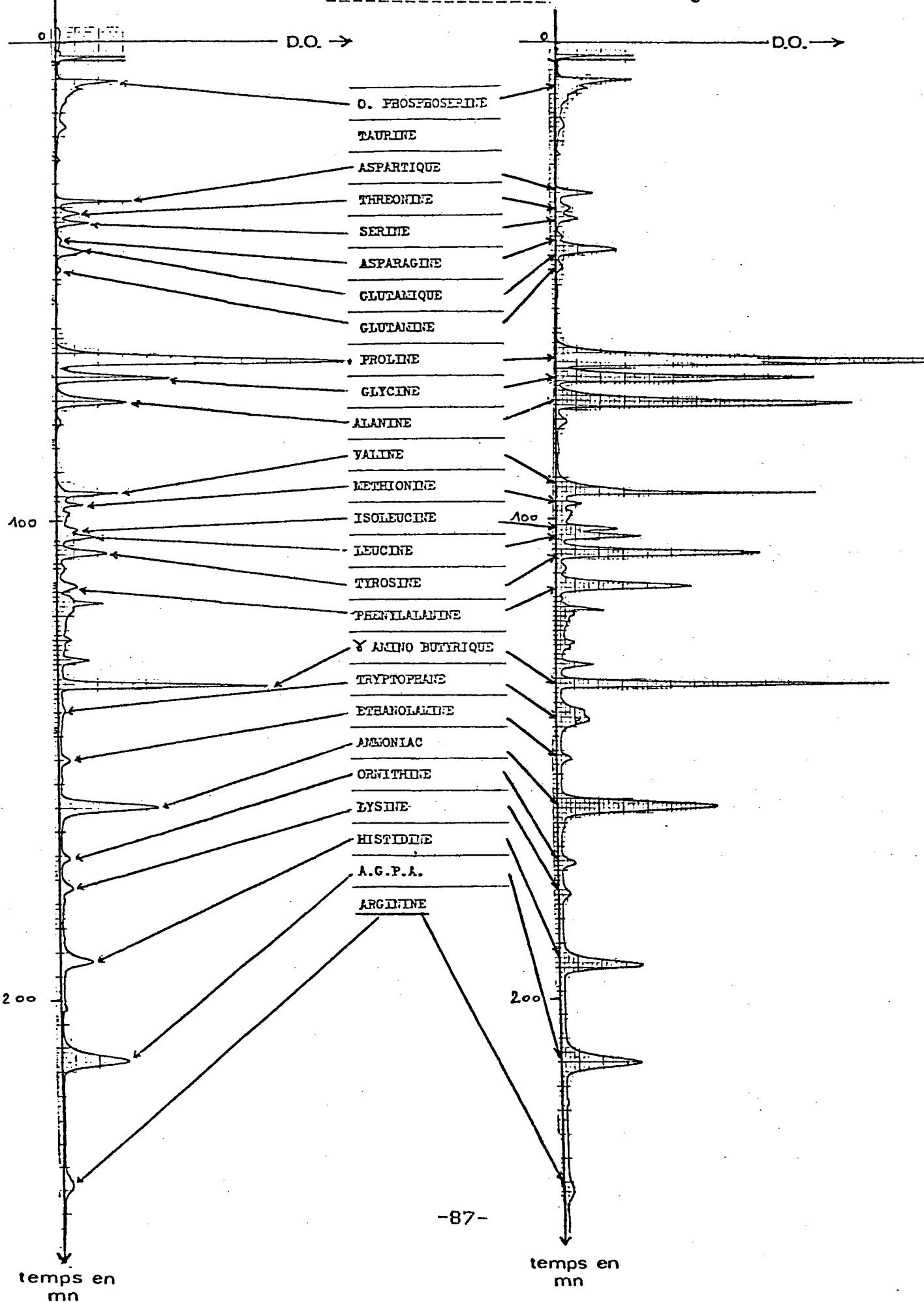
ACIDES AMINES DE BIÈRE

ACIDES AMINES

Bière de
3 ans

Chromatogramme III

Bière de
7 jours



CHAPITRE IX

EVOLUTION DES POLYPHENOLS LIBRES ----- ET LIES AU COURS DE LA FABRICATION DE ----- LA BIERE ET DE SA CONSERVATION -----

IX-1. Introduction

Page 89

IX-2. Résultats et interprétation.

Page 90

CHAPITRE IX

EVOLUTION DES POLYPHENOLS LIBRES

ET LIES AU COURS DE LA FABRICATION DE

LA BIERE ET DE SA CONSERVATION

IX-1. Introduction :

Comme nous l'avons vu précédemment 30 % environ du trouble est constitué par des polyphénols dont l'hydrolyse, en milieu acide trifluoroacétique, donne une cyanidine X dont la structure semble identique à celle produite par la B3 dans les mêmes conditions de réaction (à savoir : comportement similaire à l'adsorption sur nylon 66, à la désorption, à l'extraction par l'acétate d'éthyle, même temps de rétention en HPLC, coloration rouge par chauffage en milieu acide et coloration bleue avec la N, N' diméthylamino-cinnamaldéhyde (DMCA)).

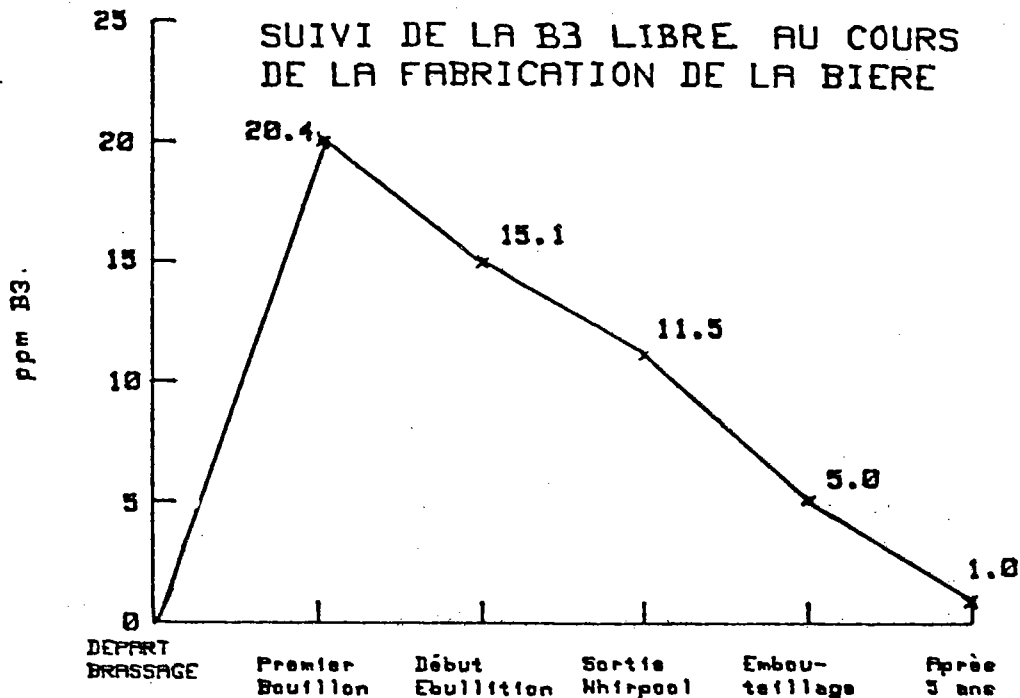
La disparition en B3 au cours de la conservation de la bière ne représente que 5 mg des 30 mg de polyphénols trouvés dans le trouble. Il nous est donc apparu fondamental de suivre l'évolution des proanthocyanidines libres et liées de la bière en utilisant l'hydrolyse en milieu acide trifluoroacétique à 15 % qui transforment en cyanidine X les unes et les autres.

IX-2. Résultats et interprétation :

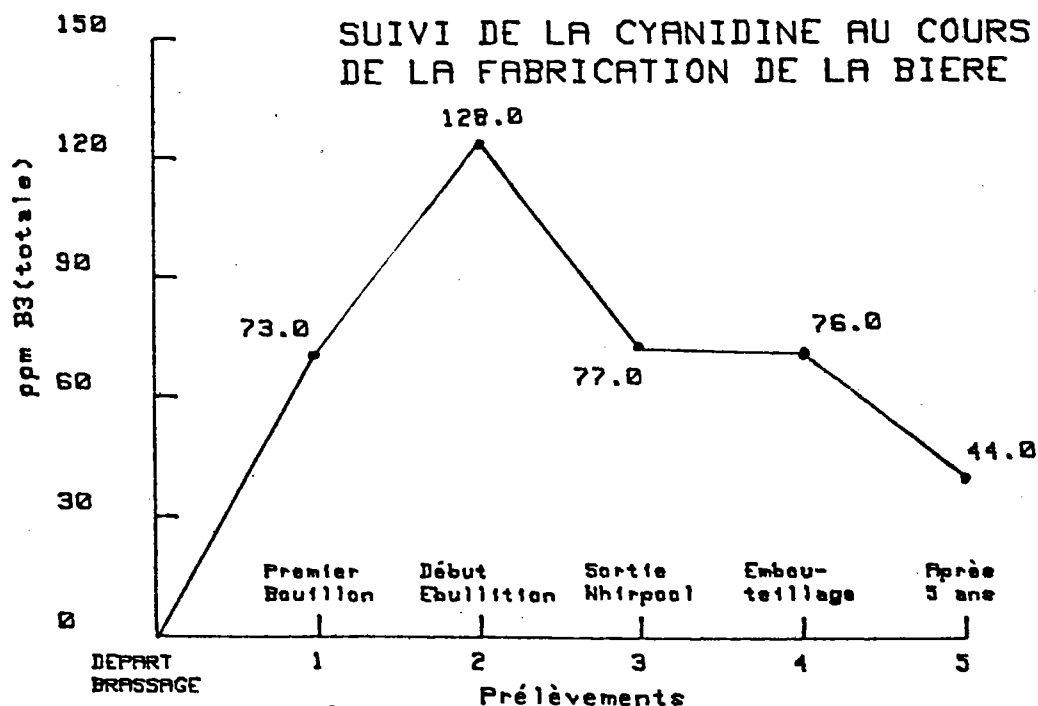
Sur les deux courbes qui suivent nous pouvons comparer les évolutions respectives de la B3 libre (Courbe XVIII) et de la somme B3 libre + B3 liée (Courbe XIX) :

NB: Pour des raisons de disponibilité du brassin nous n'avons pu faire des prélèvements qu'à partir du premier bouillon.

Courbe XVIII :



Courbe XIX :



On remarque tout d'abord une solubilisation des constituants polyphénoliques libres et liés jusqu'au premier bouillon. En ce qui concerne la B3 libre, nous avons vu sa diminution à partir du premier bouillon et au cours de la filtration (cf page 58).

L'interprétation que nous avons donnée de cette disparition est rappelons le (cf page 66) sa transformation en catéchine.

En ce qui concerne le suivi de la Cyanidine X (courbe XIX) qui comprend à la fois la B3 libre et la B3 liée, on constate son augmentation remarquable jusqu'au début de l'ébullition. Ceci peut-être interprété comme la conséquence d'une extraction continue des polyphénols liés lors des différents lavages des drèches.

A l'ébullition la quantité de polyphénols diminue sous les deux formes libre et liée. En effet on a constaté que le coagulat récupéré dans le Whirpool contenait des polyphénols non adsorbés mais liés. Ceux-ci précipitent pendant l'ébullition sous forme de complexes (certainement avec les protéines ou les glucides)

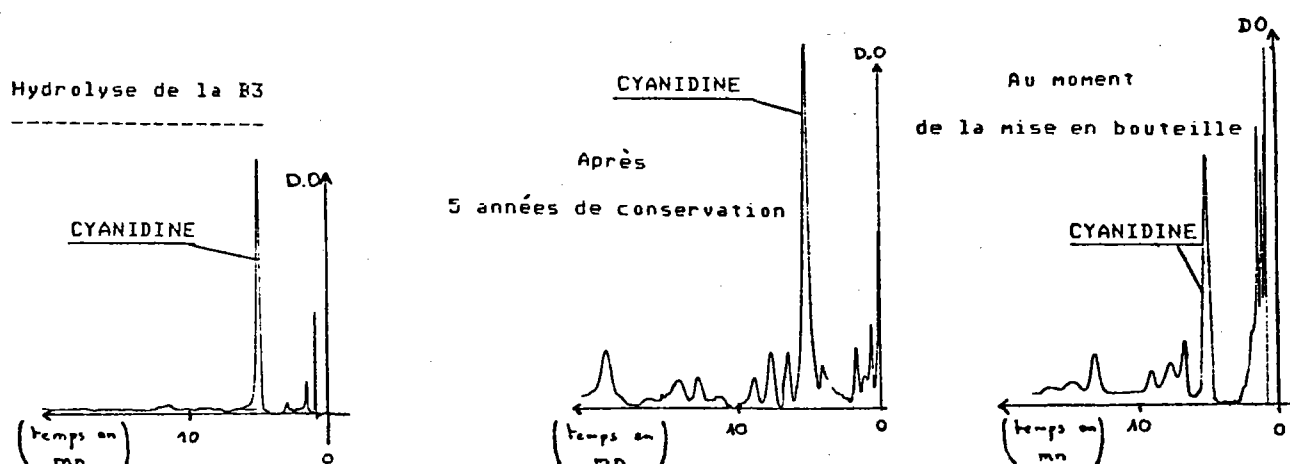
L'étude de l'action de la B3 sur les acides aminés dans les conditions de l'ébullition en cuve à houblonner n'a donné aucun résultat.

Lors des différentes étapes, de la fermentation à la mise en bouteille, il n'y a aucune évolution notable de la B3 liée alors que la B3 libre diminue légèrement.

La disparition au cours de la conservation reste un processus très lent environ 30 ppm sur cinq ans (de B3 libre et liée). Il est important de noter que la quantité disparue est intégralement retrouvée dans le trouble.

Chromatogramme IV :

Hydrolyse de la bière



CONCLUSION GENERALE

Cette étude a porté essentiellement sur le devenir des monomères Catéchine et Epicatéchine et des dimères Prodelphinidine et B3 au cours de la fabrication de la bière et de sa conservation. L'attention que nous avons portée à ces différents constituants est due à leur rôle prépondérant dans la formation du trouble non biologique de la bière, comme le montrent la plupart des travaux existants.

En premier lieu cette étude nécessitait de disposer de la procyanidine B3 et de la Prodelphinidine. La méthode extractive à partir de l'orge n'a pas donné des résultats satisfaisants (faible rendement pour une manipulation longue et difficile). Toutefois celle-ci nous a permis l'obtention des produits naturels pour une identification spectrale. Nous avons donc été conduits à mettre au point une méthode de synthèse du dimère B3 (et de son stéréoisomère B4). Nous nous sommes inspirés des travaux de la bibliographie en optimisant la méthode de EASTMOND. Le rendement de la réaction est passé de 20 à 50% en produit hydroxylé libre et pur.

Une fois cette partie du travail effectuée, nous avons mis au point une méthode de dosage rapide de ces composés tant dans les matières solides (orge, malt et houblon) que dans les solutions (moût et bière). Le temps de l'analyse est de une heure avec une très bonne répétabilité.

Notre dosage est basé sur une adsorption sélective des polyphénols considérés sur Nylon 66, puis d'une désorption quantitative par le mélange acétone/eau. L'extraction des polyphénols à l'acétate d'éthyle est suivie en dernier lieu par un dosage par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

L'étalonnage a été réalisé grâce aux échantillons issus de la synthèse précédente.

Ce protocole analytique a été appliqué tout au long du procédé de fabrication de la bière. Au cours du maltage, nous avons précisé l'évolution de la catéchine et de la procyanidine B3, par l'étude théorique de leur oxydation par la polyphénoloxydase en solution, cette enzyme étant particulièrement active lors de la germination des grains d'orge comme l'indique la littérature.

Ensuite, sur plusieurs variétés d'orge, nous avons suivi les différents polyphénols libres depuis le brassage jusqu'à la conservation des bières. Les conclusions ont été les suivantes :

- La variété d'orge influence les teneurs initiales en polyphénols.
- Les courbes de l'évolution sont similaires et convergent vers des teneurs faibles et voisines de l'ordre de 3 à 5 ppm en B3.
- On observe deux phases dans le brassin :
 - Le brassage durant lequel les polyphénols passent en solution tout au long des montées en température.
 - La filtration de la maische et le houblonnage où il y a décroissance des polyphénols dimères (Prodelphinidine et B3) et formation de catéchine et d'épicatéchine. En effet nous avons montré sur des solutions étalons (de Catéchine ou d'Epicatéchine ou de B3) dans les mêmes conditions de pH, de température et de durée, que les différentes variations observées ne sont dues qu'aux conditions opératoires et non à la présence des autres constituants du moût.

- Pendant la conservation, la teneur en polyphénols libres diminue lentement en fonction du temps pour atteindre des valeurs très faibles de 1 à 2 ppm (en B3 ou Catéchine).

Dans la dernière partie de nos travaux, nous avons déterminé la constitution du trouble permanent de la bière. Ceci a pu être effectué grâce à des échantillons de bière (Kronenbourg et Kanterbrau) de cinq ans d'âge.

Ce trouble étant insoluble dans les solvants à température ambiante, nous avons dû le dégrader par des hydrolyses acide et basique. Ainsi nous avons obtenu une teneur en sucres de 32 %, en protéines de 28 % et en polyphénols de 29 %. Les 11 % restant sont constitués par une matrice carbonée polymérique.

Nous constatons que le dépôt formé au cours de la conservation des bières contient 29 ppm de polyphénols (exprimés en B3). La disparition en Catéchine, Epicatéchine, B3 et prodelpinidine ne représente que 5 ppm environ. On peut alors penser que les complexes qui précipitent au cours du temps sont principalement dus aux polyphénols liés qui doivent nécessairement préexister en fin de fabrication sous forme soluble.

Afin de déterminer l'évolution de ces complexes au cours du procédé de fabrication de la bière, nous avons mis au point une méthode d'hydrolyse de ces substances et de dosage de la cyanidine X qui en résulte par chromatographie liquide haute performance. Nous avons conforté ainsi l'hypothèse de la présence de ces constituants et nous avons étudié leur évolution depuis le brassage jusqu'à dans le trouble formé pendant la conservation de la bière.

On peut émettre l'hypothèse que la précipitation des complexes constitutifs du trouble serait due à l'estérification (réaction lente) des groupements carboxyliques libres des acides aminés par les OH phénoliques. On rappelle à ce propos qu'une méthode classique d'activation de ces mêmes groupements, au cours de la synthèse protéique, comporte leur estérification par le para nitrophénol.

Ce travail a donné lieu à une première publication en cours de parution (100).

A

N

N

E

X

E

S

ANNEXE I

BIOSYNTHESE DES PROCYANIDINES OLIGOMERES

AI-1. Introduction	Page 96
AI-2. Schéma de Birch	Page 96
AI-3. Schéma de Haslam	Page 98
AI-4. Schéma de Roux	Page 100
AI-5. Hydroxyle sur le cycle B	Page 100

BIOSYNTHESE DES PROCYANIDINES OLIGOMERES

AI-1. Introduction :

La biosynthèse du squelette C6-C3-C6 des proanthocyanidines est en relation avec celui des autres flavonoïdes et provient de la condensation d'une unité C3-C6 avec trois unités acétates (14).

Le rôle de la phénylammoniumlyase (PAL) est admis, mais le mécanisme exact dans la régulation de la synthèse des proanthocyanidines de même que le mécanisme des changements dans la structure de l'unité C3 reste à définir en détail (15 à 23).

AI-2. Schéma de BIRCH :

En partant de l'hypothèse que la chalcone et la dihydroflavone sont des intermédiaires importants de la biosynthèse, BIRCH a proposé le schéma présenté dans la figure 1 (séquence A).

Comme il n'y a aucune certitude quant aux intermédiaires qui se retrouvent dans ce schéma, d'autres séquences ont été envisagées (24).

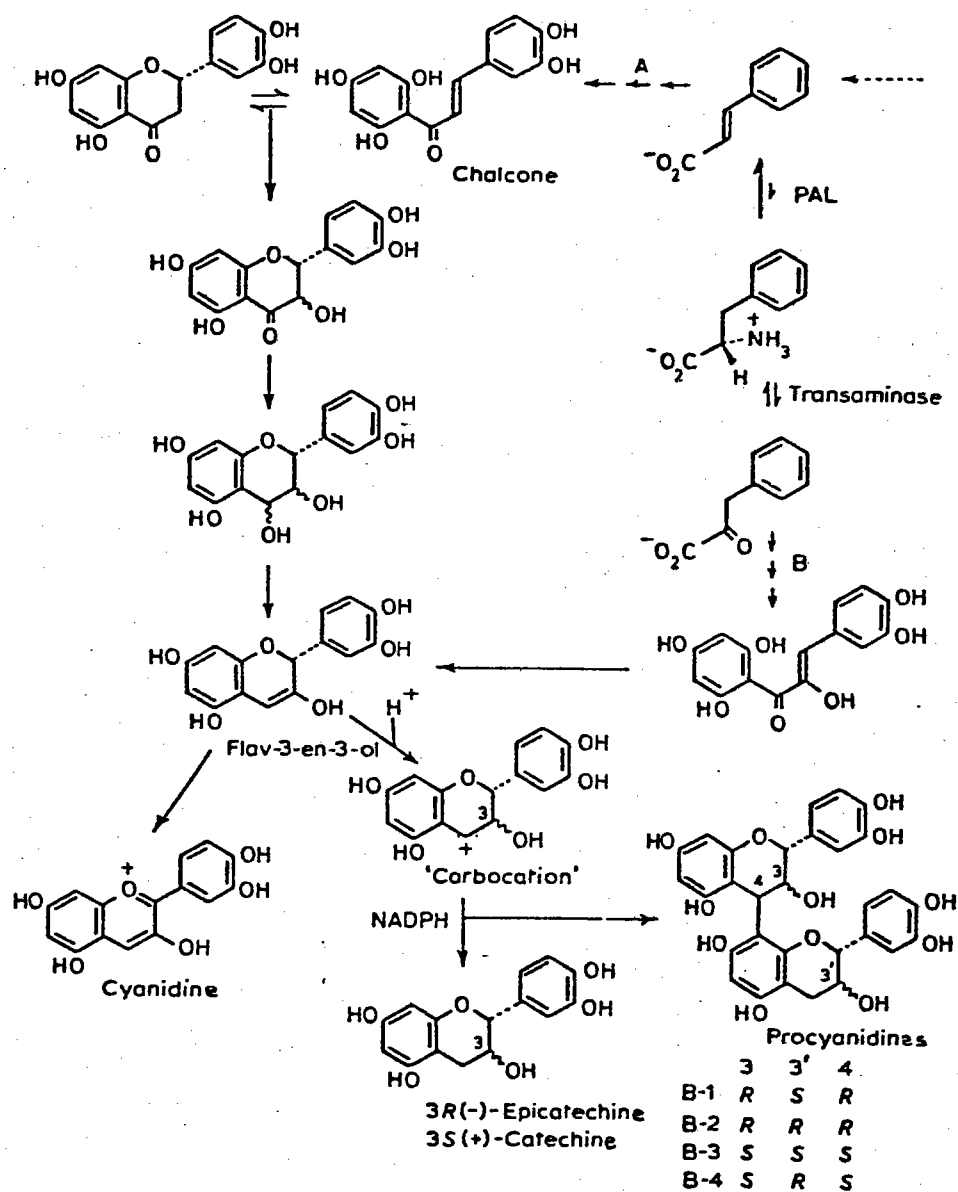


Figure 1 : A Schéma de la biogenèse selon BIRCH
B Schéma de la biogenèse selon HASLAM

AI-3. Schéma de HASLAM :

En 1977, HASLAM (24) a proposé une hypothèse qui cadre mieux avec les faits observés.

Le produit clé en serait le flavène-3 ol-3 (cf fig 1) et les proanthocyanidines seraient formées suivant la séquence B. La réduction de ce flavène-3 ol-3 donnerait les flavanes-3 ols tandis que l'oxydation donnerait les anthocyanidines (25, 26).

La protonation stéréospécifique du flavène-3 ol-3 conduirait à deux carbocations correspondant aux deux flavènes-3 ols de même configuration obtenues par réduction de la (+) catéchine avec la (-) épicatechine.

La condensation des carbocations avec les flavanes-3 ol se produit entre les sites nucléophiles C8 ou C6 du flavane-3 ol et le C4 électrophile de l'hétérocycle oxygené pour donner les proanthocyanidines correspondantes.

Par l'emploi de précurseurs marqués au tritium et au carbone 14, HASLAM (27) a montré que les deux unités qui forment un dimère de proanthacyanidine dérivent d'entités métaboliques différentes. Ceci fait penser que la formation de la (+) catéchine est le résultat de deux étapes successives. L'arrangement stéréospécifique qui se fait sur l'ion hybride de la figure 2a conduit au carbocation et ensuite à la formation stéréospécifique des produits de réduction. Le nucléotide réducteur (NADPH) confère un caractère régulateur à la formation des catéchines et épicatechines.

Les proanthocyanidines oligomères peuvent se former à partir des dimères par condensation répétée avec les carbocations. Les oligomères ainsi formés se disposent en hélice à pas gauche quand ils sont constitués d'épicatechines et en hélice à pas à droite lorsqu'ils sont constitués de catéchines (voir figure 2b).

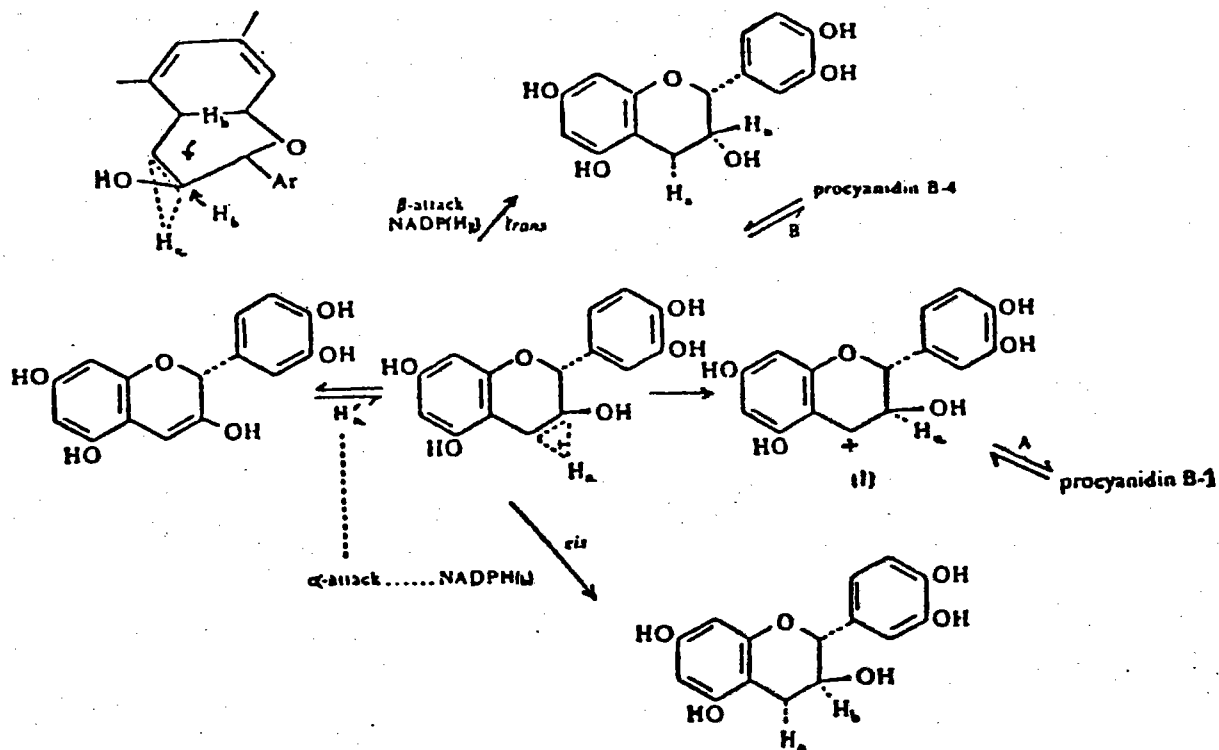
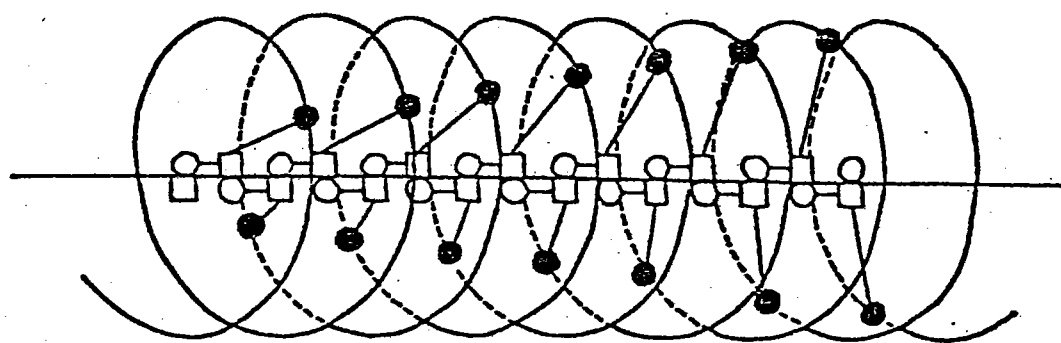


Figure 2a : Formation de différentes procyanidines à partir d'un même précurseur



Tannin condensé: Aspect schématique

- noyau phloroglucinal
- hétérocycle
- noyau pyrocatéchol ou pyrogallol

Figure 2b : Condensation en hélice selon HASLAM

AI-4. Schéma de ROUX :

L'hypothèse proposée par ROUX (30) est basée sur la découverte d'une α -hydroxychalcone et son rôle dans la biosynthèse des proanthocyanidines est explicitée dans la figure 3. Comme les proanthocyanidines comportent toutes une unité terminale flavane-3-ol reliée à la précédente par une liaison 8-4, la position 8 de la catéchine ou de l'épicatéchine représente le site nucléophile de l'unité terminale qui réagit avec le carbocation formé à partir d'une molécule de flavane-3, 4-diol (leucoanthocyanidine). Toutefois, comme il n'est pas possible d'isoler d'une plante en même temps la catéchine et la leucoanthocyanidine correspondante, cette hypothèse résiste mal à l'observation (31,32).

AI-5. Hydroxyles sur le cycle B :

Ces hydroxyles jouent, probablement du fait de leur position, un rôle prépondérant dans la formation des liaisons hydrogènes qui provoquent le trouble au froid de la bière. Comme leur biosynthèse est différente, il serait intéressant de pouvoir en contrôler la biogénèse au niveau de la sélection.

On admet, en général, que l'hydroxylation en position 3' a lieu avant la formation des flavanes. Il se trouverait déjà sur le précurseur C6-C3 (33,34).

Le second hydroxyle dont la présence est plus dangereuse lors de la formation du trouble apparaîtrait à un stade ultérieur en position ortho. On montre par exemple que l'acide p-coumarique est un bon précurseur des flavonoïdes, tandis que les acides caféïques et féruliques ne le sont pas (35, 36, 26, 37).

ANNEXE II

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA METHODE D'ANALYSE

DES POLYPHENOLS

AII-1. Interaction PVP-Polyphénols	Page 103
AII-2. Interaction PVP-Nylon 66	Page 105
AII-3. Méthode d'analyse	Page 105

ANNEXE II

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA METHODE D'ANALYSE

DES POLYPHENOLS

AII-1. Interaction PVP-Polyphénols :

On prépare d'une part une solution étalon S1 contenant pour 50 ml d'eau :

- 16 mg de B3
- 17,6 mg de Catéchine

et d'autre part 8 solutions étalons de Polyvinylpyrrolidone soluble (S) ou insoluble (S') de concentrations variables ; 1, 10, 100, 1000 mg/L respectivement.

Les solutions dosées S_i, S'_i sont constituées par 2 ml de solution étalon S1 et le complément à 100 ml des solutions S (ou S').

Les solutions sont notées dans le tableau 1 qui suit :

TABLEAU 1

PVP conc. mg/l Solutions	1	10	100	1000
S ₂ S' ₂	S I			
S ₃ S' ₃		S I		
S ₄ S' ₄			S I	
S ₅ S' ₅				S I

S - Soluble
I - Insoluble

On obtient ainsi huit échantillons pour chromatographie comparative (voir page 111 et suivantes) avec l'échantillon de départ (2 ml de S1 dans 100 ml d'eau).

Les résultats sont regroupés dans les tableaux 2 et 3,

TABLEAU 2 : Etude de l'adsorption de la catéchine sur la PVP

	PVP 700 000 SOLUBLE			PVP 700 000 INSOLUBLE		
	Surface du pic	Surface disparue	% Catéchine adsorbée	Surface du pic	Surface disparue	% Catéchine adsorbée
Solution Etalon	730			730		
Solution 1 mg/l	710	20	3	695	35	5
Solution 10 mg/l	680	50	7	660	70	10
Solution 100 mg/l	649	81	11	486	244	34
Solution 1 g/l	505	225	31	58	672	91

TABLEAU 3 : Etude de l'adsorption de la B3 sur la PVP

	PVP 700 000 SOLUBLE			PVP 700 000 INSOLUBLE		
	Surface du pic	Surface disparue	% de B ₃ adsorbée	Surface du pic	Surface disparue	% de B ₃ adsorbée
Solution Etalon	530			530		
Solution 1 mg/l	430	100	19	406	124	23
Solution 10 mg/l	414	116	22	377	153	28
Solution 100 mg/l	308	222	47	126	404	76
Solution 1 g/l	100	430	81	0	530	100

AII-2. Interaction Nylon-Polyphénols :

- L'adsorption des polyphénols en solutions par le nylon a été déterminée. La concentration optimum à ajouter à la prise d'essai et sur le filtre a été étudiée de façon à obtenir une fixation totale des anthocyanidines sur le support.

- La désorption des polyphénols par le mélange acétone/eau (75/25) a donné un optimum pour trois lavages consécutifs de 50 ml.

- L'extraction totale par l'acétate d'éthyle est obtenue par 5 fois volume à volume avec la solution aqueuse des polyphénols.

- Il faut alors reprendre le résidu après évaporation de l'acétate d'éthyle par 2 ml de méthanol puis ajouter à cette solution 2ml d'eau distillée.

Dans le tableau II (page 49) nous avons réuni tous les résultats de nos études sur les diverses opérations qui précèdent.

AII-3. Méthode d'analyse :

AII-3.1. Objet et domaine d'application :

AII-3.1.1. En solution :

Cette méthode s'applique à des solutions de polyphénols contenant de 0 à 30 ppm de chacun des polyphénols.

AII-3.1.2. Pour l'orge, le malt et le houblon :

Cette méthode s'applique à ces substances solides. Elle permet une détermination quantitative de la procyanidine B3, la prodelphinidine, la catéchine et l'épicatéchine. Les autres polyphénols ne sont déterminés que qualitativement.

AII-3.2. Principe :

AII-3.2.1. Pour les solutions :

- adsorber tout d'abord les polyphénols de la solution par le nylon 66 en poudre.
- désorber par le mélange acétone/eau.
- évaporer l'acétone.
- extraire les polyphénols de la phase aqueuse par l'acétate d'éthyle.
- évaporer à sec puis reprendre le résidu par un mélange eau/méthanol.

AII-3.2.2. Pour les solides :

On reprend le protocole ci-dessus à partir de la désorption par le mélange acétone/eau appliquée dans ce cas à l'échantillon finement broyé.

AII-3.3. Réactifs :

Tous les réactifs doivent être de qualité reconnue. L'eau doit être distillée ou de pureté au moins équivalente.

AII-3.3.1. Produits purs :

- acide acétique pour analyse - Merck 63
- eau déminéralisée et filtrée sur membrane 0.45 μ
- acétone pour analyse Merck 14
- acétate d'éthyle pour analyse Merck 9623
- sulfate de sodium anhydre Merck 6648
- nylon 66 - Polypenco - lavé à l'acétone 75% dans l'eau, puis acétone et éther diéthylique et séché.

AII-3.3.2. Produits pour préparation des étalons:

- catéchine - Sigma C 1251
- épicatéchine Flucka 45300
- procyanidine B3 et prodelphinidine isolées de l'orge ou obtenues par synthèse chimique (cette étude)

AII-3.3.3. Solutions de titre défini :

Eluant chromatographique :

solution aqueuse d'acide acétique à 10% (v/v)

Eluant pour la préparation de l'échantillon :

solution aqueuse d'acétone à 75% (v/v)

AII-3.4. Appareillage :

AII-3.4.1. Appareillage chromatographique (HPLC) :

Chromatographe : Varian type 5000 avec gradient d'élution
----- (3 solvants) ou appareil similaire.

Injecteur : vanne à boucle - Valco ou similaire.

Colonne : Radial Pak C18 - 10 μ - diamètre intérieur 8 mm Waters
----- réf. 84720.

Détecteur : UV longueur d'onde : 280 nm Schoeffel SF 770.

Enregistreur : Sefram.

AII-3.4.2. Petit matériel nécessaire pour la préparation
de l'échantillon :

- évaporateur rotatif sous vide - Büchi
- ampoules à décanter : 250 ml - Sodilab
- ballons évaporateurs de 500 ml
- fiolle pour filtration sous vide 250 ml
- entonnoirs coniques à plaque filtrante Nr. 4

AII-3.5. Echantillonnage :

AII-3.5.1. Nature :

Bière, moût, malt, orge, houblon.

AII-3.5.2. Traitement de l'échantillon :

Cas des liquides :

-filtration ou centrifugation pour éliminer les petites particules.

Cas des solides :

-mouture très fine de l'échantillon (Buhler-Miag DLFU réf. 2).

AII-3.6. Mode opératoire :

Cas des liquides

AII-3.6.1. Adsorption des polyphénols :

- verser 100 ml de bière dans un bécher contenant 1 g (exactement) de Nylon 66, homogénéiser le mélange en agitant le bécher.
- mélanger 1 g (exactement) de Nylon 66 dans de l'eau déminéralisée (environ 10 ml). Verser cette bouillie sur le filtre fritté placé sur un erlenmeyer permettant de faire le vide.
- laisser se former une couche de Nylon sur le fritté.
- brancher le vide. Lorsque l'eau s'écoule à travers le filtre, verser la solution de bière + Nylon 66 préparée précédemment.
- rincer le bécher contenant la solution avec un peu d'eau déminéralisée que l'on verse de nouveau sur le filtre.
- bien essorer le gâteau de Nylon.

AII-3.6.2. Elution des polyphénols :

- remplacer l'erlenmeyer par un propre.
- verser 50 ml d'un mélange acétone/eau (75/25) sur le Nylon 66 contenu dans le filtre fritté.
- mettre en suspension le Nylon 66 dans l'acétone/eau avec une spatule.
- laisser le Nylon se déposer, reformant une couche.
- brancher le vide.
- répéter cette opération avec 50 ml du mélange acétone/eau.

AII-3.6.3. Récupération des polyphénols :

- évaporer l'acétone sous vide à environ 40°C.
- récupérer la phase aqueuse.
- extraire 5 fois les polyphénols à l'acétate d'éthyle volume à volume.
- sécher sur sulfate de sodium.
- évaporer à sec sous vide à 40°C.
- reprendre le résidu sec par :
 - 2 ml de méthanol que l'on fait bien circuler sur les parois du ballon pour tout dissoudre.
 - rajouter 2 ml d'eau pour permettre à la solution de se rapprocher du solvant d'élution chromatographique (ceci pour un prélèvement de bière).
 - pour un prélèvement de 10 g d'orge ou de malt, la dissolution se fera par 3 ml de méthanol, puis 3 ml d'eau.
 - pour un prélèvement de 2 g de houblon en granulés, on fera la dissolution dans 5 ml de méthanol puis 5 ml d'eau.

Cas des Solides

AII-3.6.4. Elution des polyphénols pour un échantillon solide :

- mélanger 10 g d'orge ou de malt (ou 2 g de houblon) dans 50 ml d'un mélange acétone/eau (75/25)(v/v).
- verser le tout pour une filtration sous vide.
- recommencer l'opération encore deux fois (ringage).
- recueillir le tout dans un ballon de 500 ml.
- la suite de l'opération est commune avec l'extraction à partir d'une solution.

AII-3.6.5. Récupération des polyphénols :

Voir précédemment AII-3.6.3.

AII-3.6.6. Analyse HPLC :

AII-3.6.6.1. Réglage de l'appareil :

Chromatographe :

- .Eluant A : eau déminéralisée filtrée sur membrane 0.45 μ .
- .Eluant B : eau/acide acétique (90/10).

L'élution est programmée suivant le protocole qui suit :

PROGRAMME D'ELUTION

TIME	CODE	VALUE
- 0	FLOW	2.0
- 0	%	20
- 0	RSVR	AB
- 0	EVNT	0
- 0.5	EVNT	5
- 0.6	EVNT	4
- 1.0	EVNT	0
- 40	%	100

Injecteur :

Vanne à boucle de 20 μ l.

Colonne :

-précolonne : L= 10 cm

----- ϕ = 1/4 "

ϕ intérieur= 2.1 mm

Support pelliculaire CO Pell ODS (30-38 μ m)

La précolonne doit être remplie à sec toutes les 30 analyses.

-colonne analytique : Radial Pak C18 10 μ

----- ϕ intérieur= 8 mm

L= 10 cm

La colonne est installée dans le système RCM indispensable pour son utilisation.

Détecteur :

Longueur d'onde : 280 nm.

Sensibilité : 0.1 DO pleine échelle.

Enregistreur :

Vitesse de déroulement du papier : 5 mm/mn.

Sensibilité : 10 mV.

Intégrateur :

Tout intégrateur de pics chromatographiques peut être utilisé.

AII-3.7. Expression des résultats :

AII-3.7.1. Etalonnage externe :

AII-3.7.1.1. Résultats : (voir tableau 4 et 5 qui suivent)

AII-3.7.1.2. Mode de calcul et formule :

L'échantillon de V grammes est repris dans v ml de méthanol plus v ml d'eau. Soit Se la surface du pic étalon contenant Me (mg/ml) du produit de référence, Sp la surface du pic échantillon, R (résultat) est donné par la formule ci-après :

$$R(\text{ppm}) = (Sp/Se) \times Me \times 2 \times v \times (1000/V)$$

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même opérateur ne doit pas excéder 5 % de la valeur moyenne.

Remarque : La solution étalon(1) est préparée à partir des produits de référence :

23.4mg de Catéchine

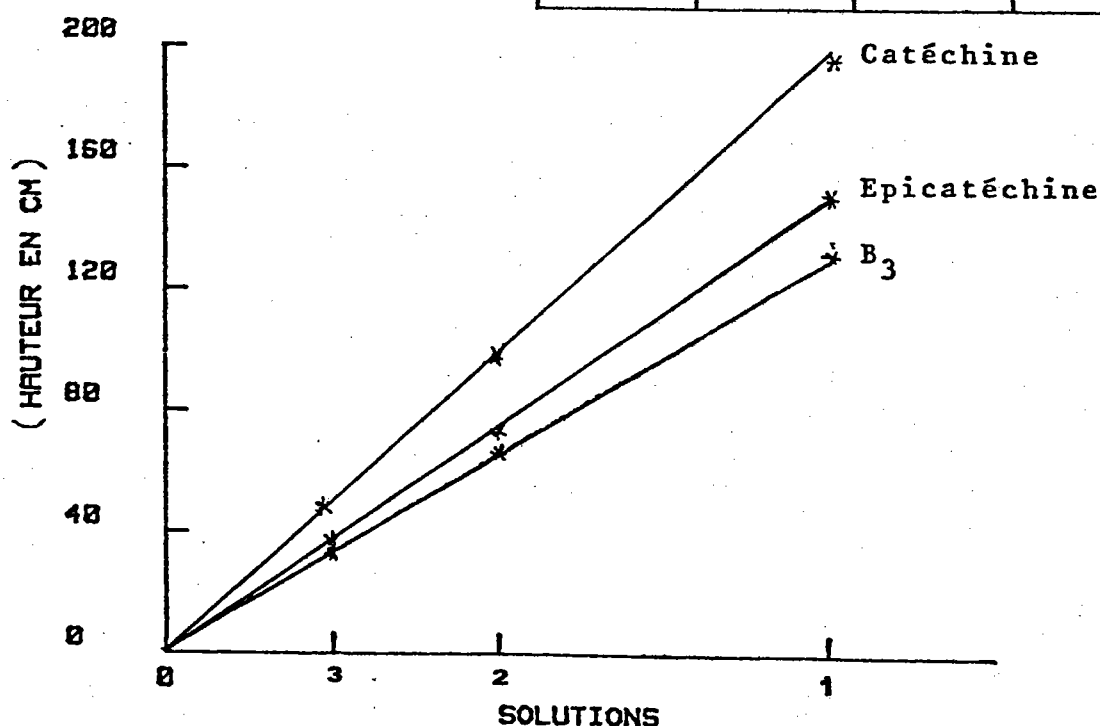
50 mg de B₃

15.3mg d'Epicatechine

solubilisés tout d'abord dans 50 ml de Méthanol auquel on rajoute 50 ml d'eau. La solution (2) est diluée au demi, la solution (3) au quart.

Tableau 4 : Relation entre concentration et hauteur du pic

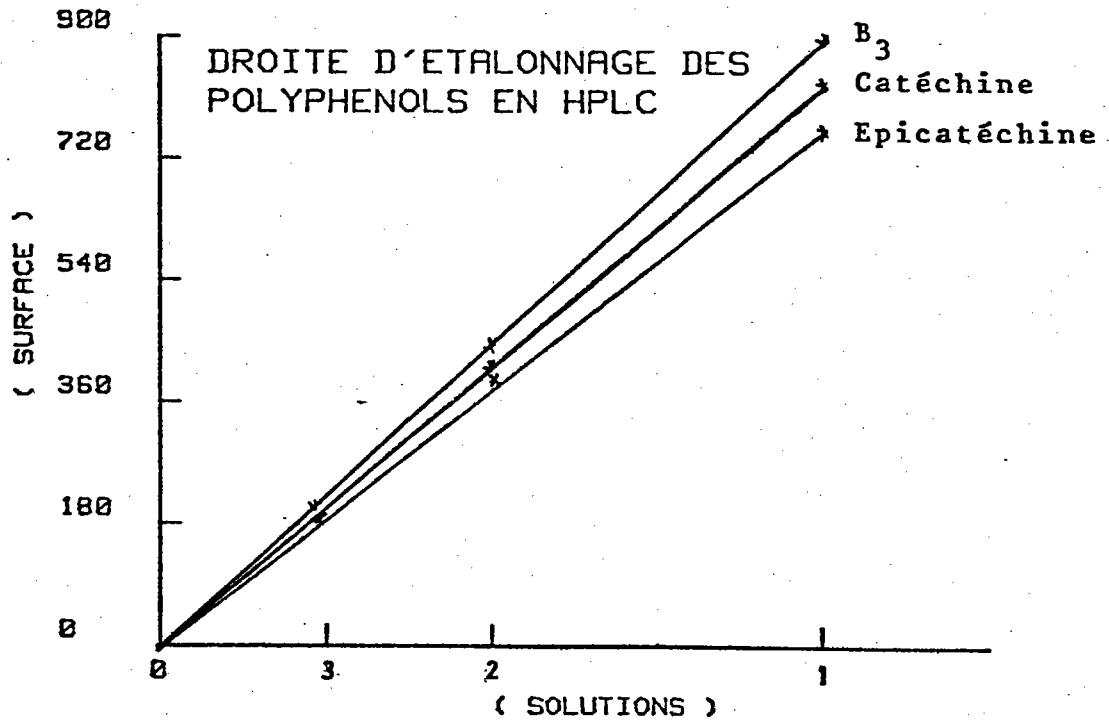
	SOLUTION 1	SOLUTION 2	SOLUTION 3	ERREUR EN %
HAUTEUR B ₃	132.00	66.00	35.00	6.00
HAUTEUR CATECHINE	192.00	96.00	51.00	6.00
HAUTEUR EPICAT.	136.00	73.00	37.00	9.00



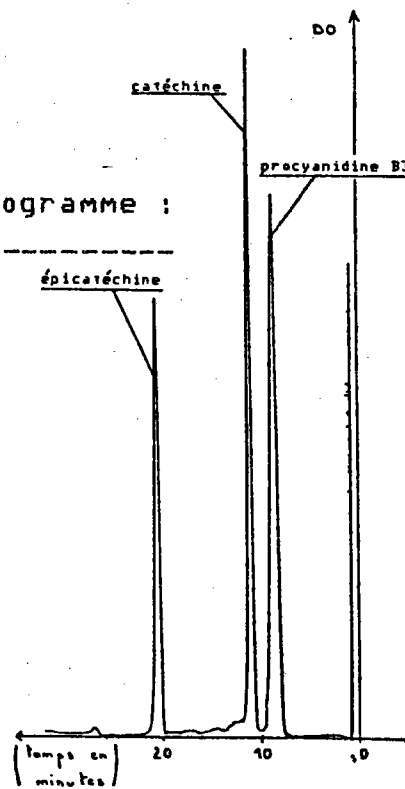
DROITE D'ETALONNAGE DES
POLYPHENOLS EN HPLC

Tableau 5 : Relation entre concentration et surface du pic

	SOLUTION 1	SOLUTION 2	SOLUTION 3	ERREUR EN %
SURFACE B3	897.00	445.00	218.00	3.00
SURFACE CATECHINE	841.00	414.00	196.00	4.50
SURFACE EPICAT.	782.00	391.00	193.00	1.00



Exemple de chromatogramme :



ANNEXE III

EVOLUTION DES POLYPHENOLS AU COURS DE

LA FABRICATION DE LA BIERE

AIII-1. Procédé de fabrication
de la bière en pilote :

Page 117

AIII-2. Tableaux et courbes résultants
du dosage des polyphénols au cours
du brassage et de la conservation : Page 121

ANNEXE III

EVOLUTION DES POLYPHENOLS AU COURS DE

LA FABRICATION DE LA BIÈRE

AIII-1. Procédé de fabrication de la bière en pilote :

AIII-1.1. Moutûre :

-débit : 100 kg/h

-granulométrie (fourchettes admises pour brassage)

Tamis (mm)	1.270	1.010	0.547	0.253	0.154	fin
% poids (refus)	8-10	14-17	44-52	13-18	4-6	5-7

AIII-1.2. Brassage :

-méthode par infusion sans trempe

-monomalt

-eau de brassage : eau du réseau

-versement : malt 260 kg

 eau 840 kg

-méthode figée par automate MODICON

diagramme de brassage :

- empâtage 37°C
- palier 50°C : 15 minutes
- palier 63°C : 15 minutes
- palier 75°C : 0 à 15 minutes (test de saccharification à l'iode)
(rampes : 1°C/mn)

AIII-1.3. Filtration :

-poids en cuve à houblonner (CH) après :

- premier bouillon : 600 kg
- premier lavage : 990 kg
- deuxième lavage : 1280 kg
- troisième lavage : 1600 kg (*)

* En fait, ajustement de la densité en chaudière début cuisson à 11.5°P par la dernière eau de lavage.

- débit de recyclage : 200 l/h
- débit de premier bouillon : 600 l/h
- débit de premier lavage : 750 l/h
- débit de deuxième lavage : 900 l/h
- débit de troisième lavage : 1000 l/h
- piochage (piocheurs préalablement placés en position deux)
si le débit devient inférieur à 300 l/h
- hauteur dans la bouteille à moût : 150 mm

AIII-1.4. Cuisson :

- pression atmosphérique (durée 80 minutes)
- densité début cuisson 11.5 Plato
- densité fin cuisson 13 Plato (soit un taux d'évaporation horaire de 8%)
- pH ajusté à 5.2 fin cuisson (par acide phosphorique)
- houblonnage en une seule fois (avec des extraits)

- diagramme d'évaporation : 15 minutes 4%
- 20 minutes 6%
- 30 minutes 8%
- 30 minutes 10%

AIII-1.5. Whirpool :

- stationnement : 30 minutes

AIII-1.6. Entonnement :

- débit : 1500 l/h
- aération (à l'air) : 8 ppm de O₂
- température : 12°C
- ensemencement : 0.5 kg de levure sèche par hl
- levure pré-diluée dans 30 litres de moût pendant tout l'ensemencement.

AIII-1.7. Fermentation :

- entonnement : 12°C
- fermentation 3 jours à 15°C
- garde chaude 3 jours à 15°C
- refroidissement à 4°C en 24 heures (soit 0.46°C/h)
- stationnement à 4°C : 24 heures
- chillage à -1°C : 12 heures
- garde froide à -1°C : 5 jours

pression : -entonnement : 0

- montée naturelle en 24 heures : 0.4 bar
- après 5 jours passage à 1.2 bar

AIII-1.8. Filtration et traitements :

Filtration

- précouche (en eau perdue) en mélange (1) débit de formation
1350 l/h dose : 1 kg/m
- débit initial de filtration : 800 l/h
- adjuvants (CBL3) par tank : 300 l
- tanks de bière filtrée : sous CO₂ (remplis initialement d'eau
qui est chassée au CO₂ (pression 1.2 bar))
- contre-pression de filtration : 1.2 bar (=pression des TBF)

(1) 50% CBRI + 50% CBRB

Traitement sortie filtre

- collupuline double : 2g/hl
- acide ascorbique : 2g/hl
- métabisulfite de potassium : 1g/hl

AIII-1.9. Soutirage et pasteurisation :

- en 33 cl "Appolinaris"
- 120 bouteilles minimum par essai
- pasteurisation : 12 à 15 UP

AIII-2. Tableaux et courbes résultant du dosage des polyphénols au cours du brassage et de la conservation :

Sur les courbes en abscisse nous avons les prélèvements de 1 à 14 avec :

- 1.orge et malt
- 2.début empâtage
- 3.palier 50°C (fin palier)
- 4.palier 63°C (fin palier)
- 5.palier 75°C (fin palier)
- 6.premier bouillon
- 7.début ébullition
- 8.fin ébullition
- 9.premier jour de fermentation
- 10.sixième jour de fermentation
- 11.fin garde
- 12.embouteillage
- 13.un mois après embouteillage
- 14.six mois après embouteillage

En ordonnée nous avons les teneurs en ppm avec :

- *---* : Prodelphinidine
- o---o : B3
- +---+ : Catéchine
- .---. : Epicatéchine

Les tableaux 6 à 9 donnent les valeurs en ppm de polyphénols pour les différents prélèvements et selon la variété.

Tableau 6 : Evolution de la prodelphinidine
par variété :

	DETRICE (1)	MENUET (2)	CARINA (3)	TRIUMPH (4)	SONIA 1 (5)	SONIA 2 (6)	PLAISANT C (7)	PLAISANT B (8)	CLARET (8)
ORGE	24.77	34.22	32.44	35.28	23.17	23.17	37.79	32.97	31.19
MALT	23.78	34.76	31.37	33.86	24.24	23.88	36.72	34.84	32.26
PALIER 58°C	7.78	7.78	7.67	7.99	5.73	6.21	7.18	7.78	5.19
PALIER 68°C	11.82	12.03	13.98	9.88	8.98	7.91	10.74	10.71	8.55
PALIER 75°C	13.98	15.28	13.21	13.35	9.53	9.48	14.52	10.79	9.52
PREMIER BOUILLON	12.68	10.38	11.46	10.81	8.98	8.17	8.89	8.37	7.84
DEBUT EBULLIT.	6.21	6.44	6.57	5.27	3.59	5.25	6.59	6.38	5.74
FIN EBULLIT.	5.31	5.03	5.08	4.84	2.89	3.86	4.21	4.74	3.98
1 JOUR DE FERMENTAT.	3.29	3.32	3.98	3.72	3.18	3.55	3.48	2.87	3.17
6 JOUR DE FERMENTAT.	3.32	3.14	3.68	3.58	2.88	2.38	3.23	2.16	2.76
FIN GARDE	3.18	2.98	3.55	2.68	2.83	2.38	3.88	1.99	2.73
EMBOUTEILLAGE	2.91	2.23	2.48	2.28	1.78	2.28	2.88	1.86	2.45
1 MOIS DE CONSERVA.	2.72	1.81	2.28	1.88	1.56	2.19	2.28	1.82	1.51
6 MOIS DE CONSERVA.	1.81	.76	.73	.68	.39	.65	.68	.71	.68

Tableau 7 : Evolution de la B3
par variété :

	BEATRICE (1)	MENUET (2)	CARINA (8)	TRIUMPH (4)	SONIA 1 (5)	SONIA 2 (8)	PLAISANT C (7)	PLAISANT B (8)	CLARET (8)
ORGE	44.91	48.12	27.09	36.36	54.54	54.54	52.58	45.98	34.40
MALT	43.31	49.37	29.41	37.79	54.36	54.36	50.80	49.19	37.07
PALIER 58°C	14.22	15.97	6.88	10.93	12.74	13.68	12.87	11.59	5.91
PALIER 68°C	21.11	20.46	10.77	13.50	21.54	20.46	21.14	16.26	9.31
PALIER 75°C	24.87	24.98	11.22	17.17	23.27	24.51	22.44	16.83	10.71
PREMIER BOUILLON	17.81	20.33	10.55	15.28	20.82	19.51	17.62	13.01	9.08
DEBUT EBULLIT.	15.26	15.10	6.50	10.06	15.57	17.90	15.67	12.95	8.98
FIN EBULLIT.	12.32	13.22	5.01	7.55	12.33	12.26	10.42	8.76	6.76
1 JOUR DE FERMENTAT.	7.89	8.65	3.88	6.17	10.42	10.86	7.23	6.03	5.15
8 JOUR DE FERMENTAT.	7.12	7.82	3.86	6.26	6.37	6.38	5.92	5.83	3.73
FIN GARDE	7.05	5.64	3.81	4.68	5.77	6.32	5.25	4.85	3.73
EMBOU- TEILLAGE	4.86	3.17	2.92	3.84	5.19	5.55	4.48	3.98	3.47
1 MOIS DE CONSERVA.	4.13	3.00	2.77	3.64	3.57	4.93	4.20	3.86	3.41
6 MOIS DE CONSERVA.	1.52	1.35	1.01	1.35	1.18	1.77	2.18	2.84	2.18

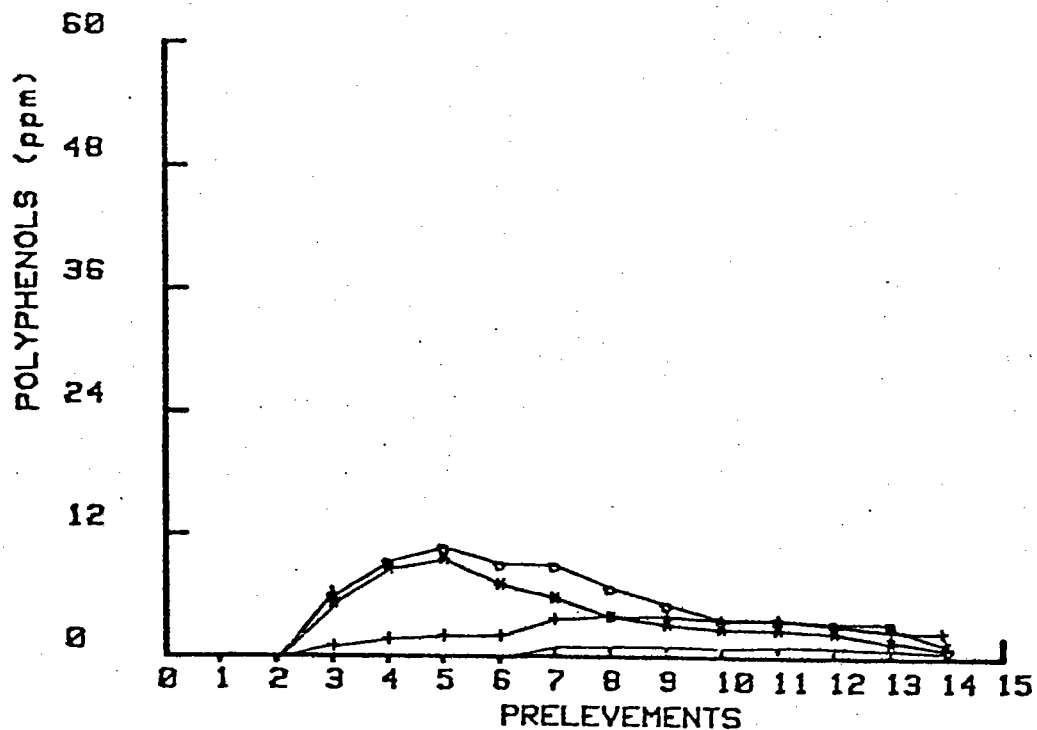
Tableau 8 : Evolution de la catéchine
par variété :

	BEATRICE (1)	MENUET (2)	CARINA (3)	TRIUMPH (4)	BONIA 1 (5)	BONIA 2 (6)	PLAISANT C (7)	PLAISANT B (8)	CLARET (9)
ORGE	7.16	6.54	5.01	5.33	7.40	7.40	8.47	6.97	7.84
MALT	2.30	2.16	2.50	2.30	3.15	2.82	2.96	2.69	2.35
PALIER 50°C	1.05	.78	.73	.74	1.08	1.17	1.17	1.03	.98
PALIER 63°C	1.75	1.49	1.51	1.47	2.31	2.05	2.27	1.97	1.69
PALIER 75°C	2.39	2.11	1.92	2.01	2.82	2.61	2.66	2.49	2.01
PREMIER BOUTILLON	2.33	2.09	2.23	2.42	3.01	2.82	2.62	2.41	2.05
DEBUT EBULLIT.	4.49	5.07	3.63	4.01	4.39	4.75	4.74	5.06	3.78
FIN EBULLIT.	4.59	4.86	3.62	4.28	4.36	4.89	4.55	4.98	4.02
1 JOUR DE FERMENTAT.	4.68	4.73	3.70	4.23	4.26	4.55	4.60	5.28	4.02
8 JOUR DE FERMENTAT.	3.93	4.54	3.91	4.22	3.63	3.82	4.38	4.72	3.67
FIN GARDE	4.13	4.57	3.73	3.82	3.94	4.35	4.34	4.43	3.76
EMBOUT- TEILLAGE	4.10	3.28	3.47	3.74	4.46	4.06	3.95	3.66	3.45
1 MOIS DE CONSERVA.	3.97	3.14	3.33	3.58	3.20	3.81	3.24	3.51	3.41
6 MOIS DE CONSERVA.	3.27	3.20	3.08	3.05	3.00	3.29	3.24	3.50	3.41

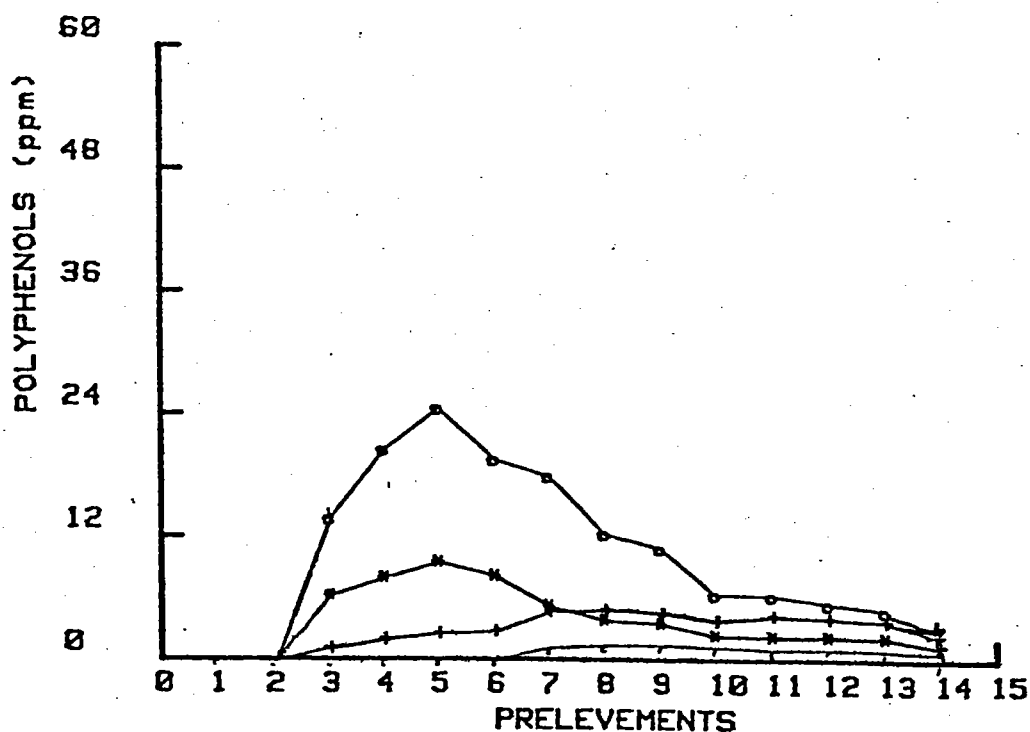
Tableau 9 : Evolution de l'épicatéchine
par variété :

	BETRICE (1)	HENRIET (2)	CARINA (3)	TRIUMPH (4)	BONIA 1 (5)	BONIA 2 (6)	PLAISANT C (7)	PLAISANT B (8)	CLARET (9)
ORGE	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
MALT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PALIER 38°C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PALIER 65°C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PALIER 75°C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PREMIER BOUILLON	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DEBUT EBULLIT.	.98	1.43	.79	.76	.82	1.17	1.28	.93	.99
FIN EBULLIT.	1.23	1.55	1.06	1.07	1.20	1.41	1.63	1.41	1.07
1 JOUR DE FERMENTAT.	1.30	1.15	1.06	1.00	1.27	1.45	1.71	1.29	1.07
6 JOUR DE FERMENTAT.	1.40	1.17	.95	1.09	1.12	1.25	1.26	1.31	.94
FIN GARDE	1.06	1.13	1.11	.93	1.13	1.06	1.29	1.41	1.14
EMBOUTILLAGE	.99	.88	1.04	1.11	.95	1.10	1.21	1.29	1.04
1 MOIS DE CONSERVA.	.96	.87	.94	.97	1.10	1.01	1.20	1.17	.84
6 MOIS DE CONSERVA.	.53	.53	.50	.43	.58	.62	.64	.70	.64

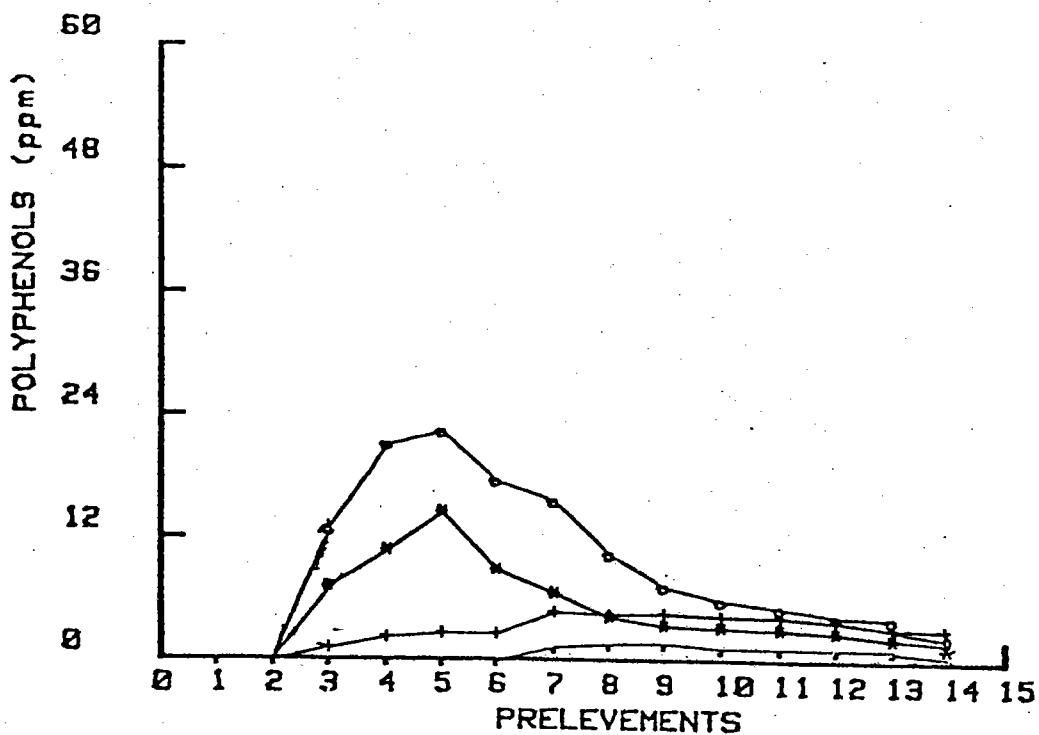
Courbe 1 à 8 : Evolution prodelphinidine, B3,
catéchine et épicatechine par malt :



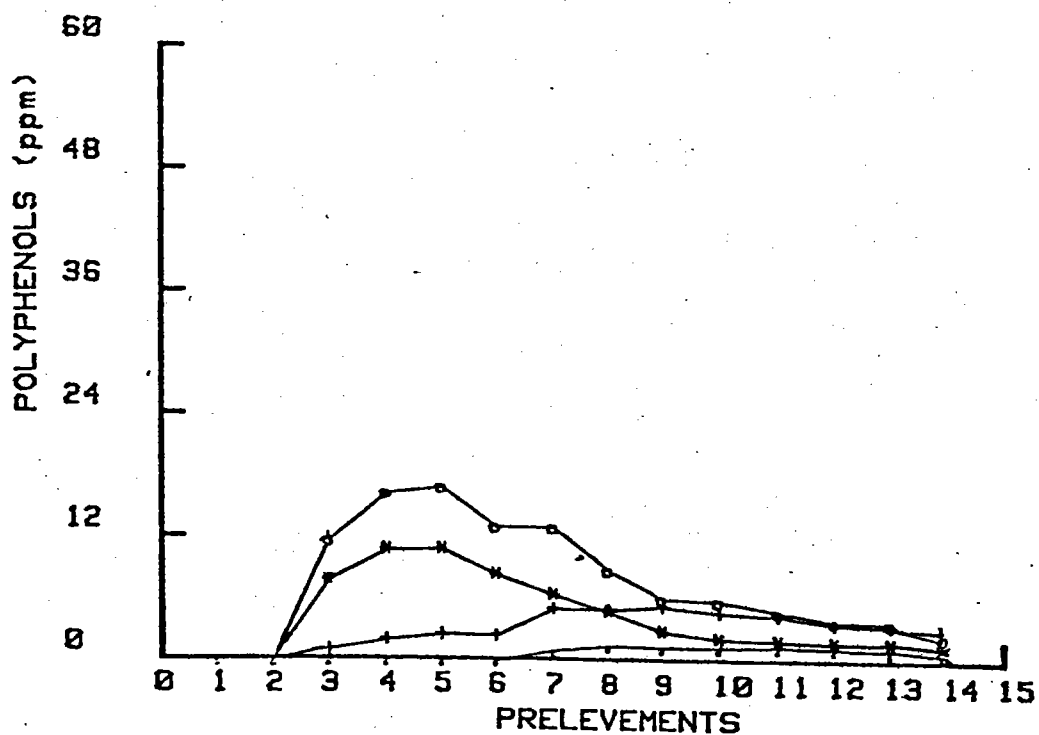
EVOLUTION SUR MALT CLARET



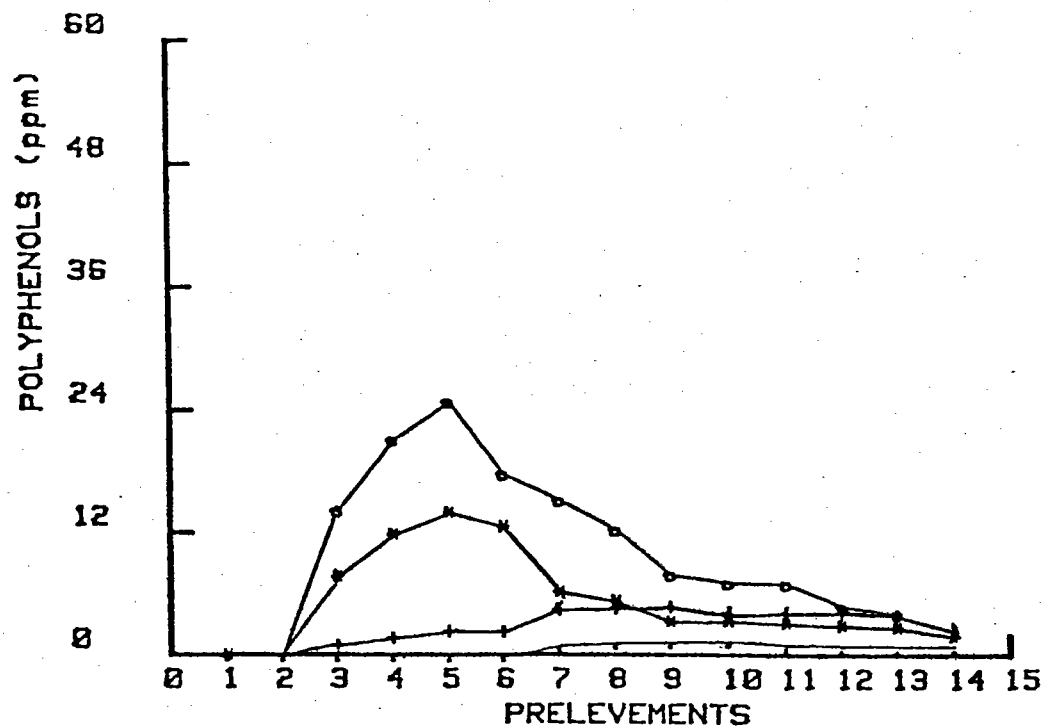
EVOLUTION SUR MALT SONIA 2



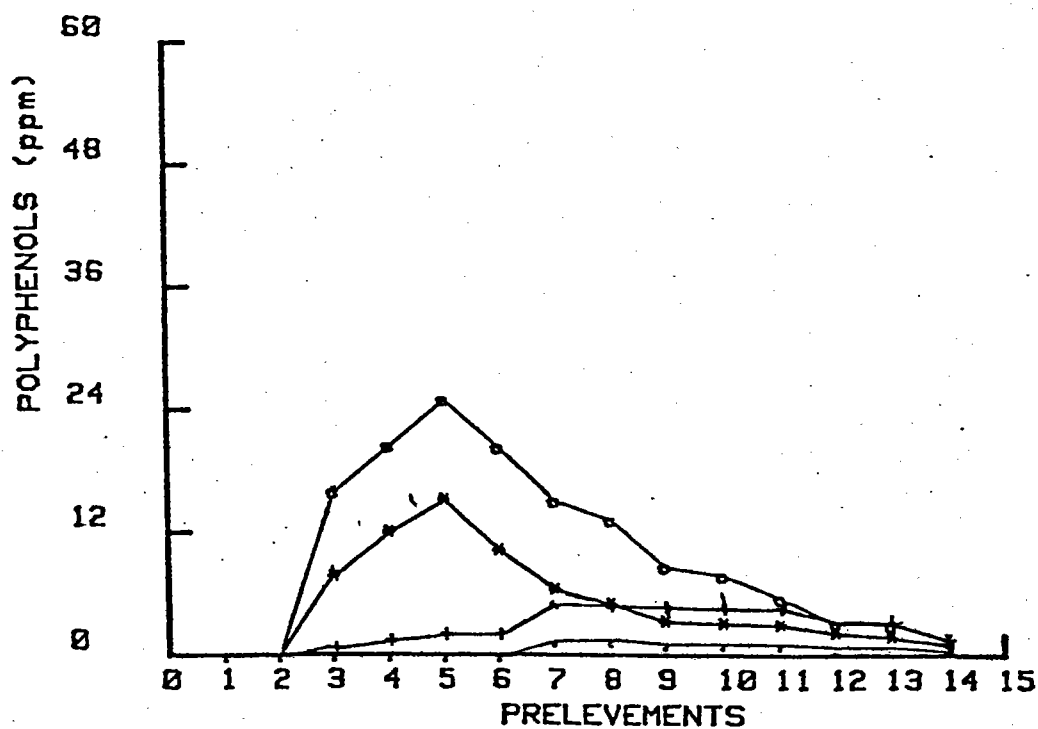
EVOLUTION SUR MALT PLAISANT C



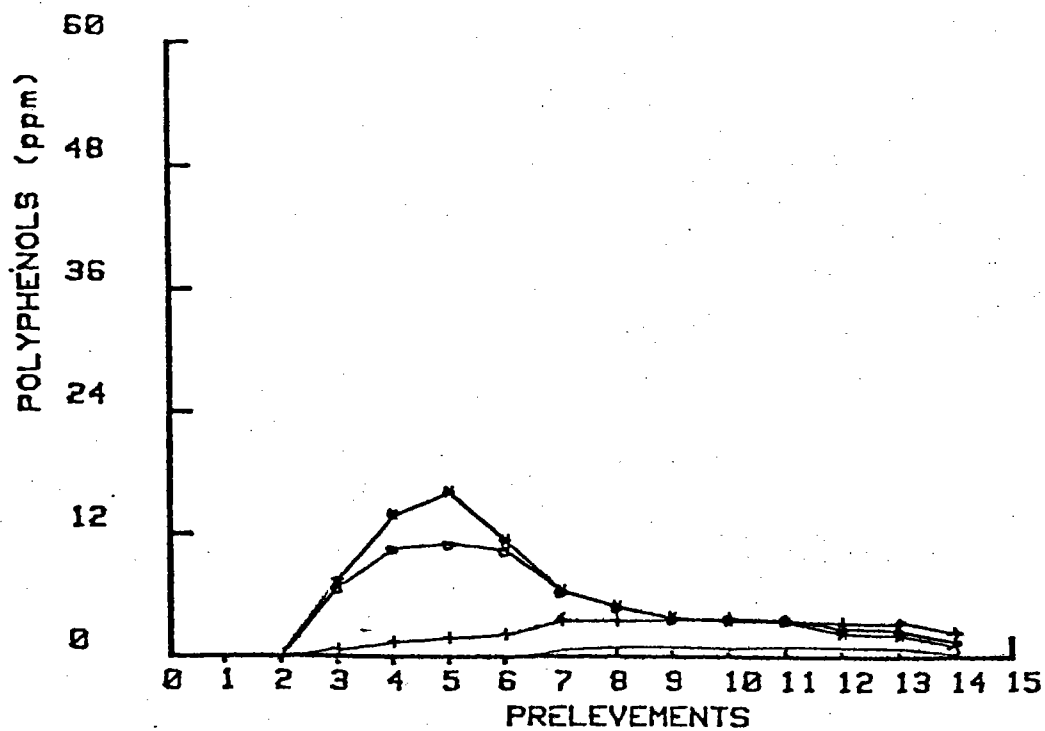
EVOLUTION SUR MALT PLAISANT B



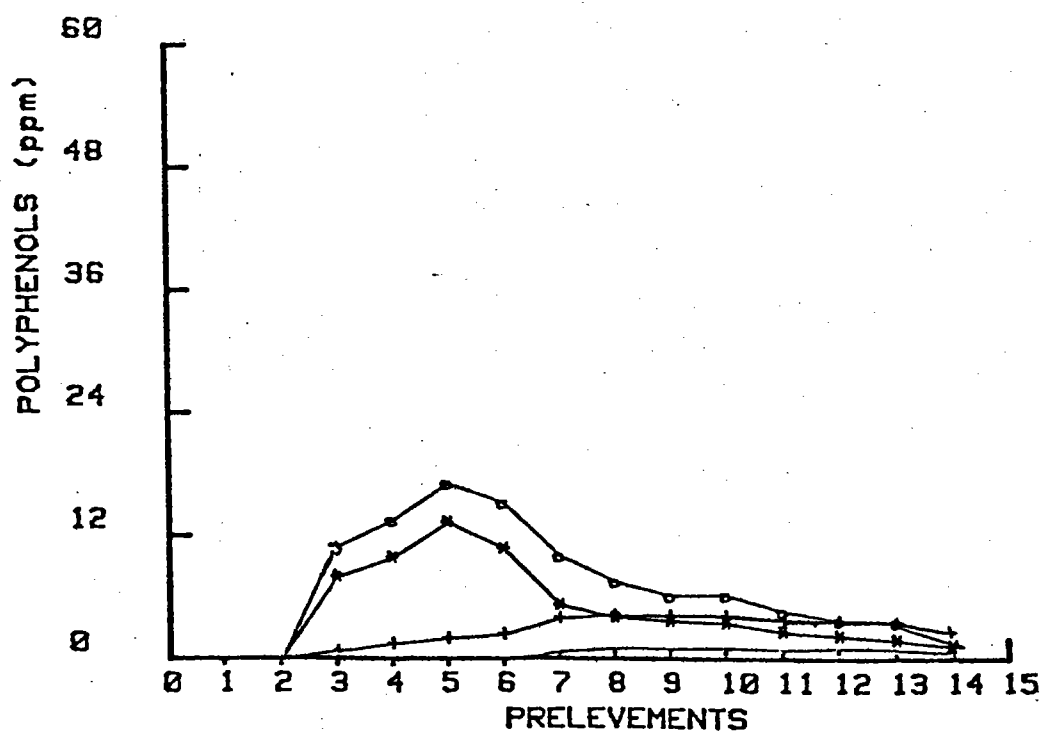
EVOLUTION SUR MALT BEATRICE



EVOLUTION SUR MALT MENUET



EVOLUTION SUR MALT CARINA



EVOLUTION SUR MALT TRIUMPH

ANNEXE IV

TENEUR EN POLYPHENOLS SUR LES HOUBLONS ET ----- EXTRAITS UTILISES POUR LES ESSAIS PILOTES -----

AIV-1. Introduction	Page 131
AIV-2. Interprétation et résultats	Page 131
AIV-3. Chromatogrammes	Page 132

ANNEXE IV

TENEUR EN POLYPHENOLS SUR LES HOUBLONS ET

EXTRAITS UTILISES POUR LES ESSAIS PILOTES

AIV-1. Introduction :

Pour mieux comprendre l'influence du houblonnage sur la teneur en polyphénols des bières finies, il nous est apparu fondamental de connaître la quantité de B3, B4, Catéchine, Epicatéchine et trimère C1 dans la matière première.

AIV-2. Interprétation et résultats :

Plusieurs remarques importantes sont à faire :

- Les extraits par le CO₂ ne contiennent que de la B3 en faible quantité.
- L'extrait éthanol contient tous les polyphénols étudiés, mais du fait de la faible quantité utilisée lors du houblonnage l'apport en polyphénols est négligeable.
- Les cônes et les pellets ont une forte teneur en B3, B4, Catéchine, Epicatéchine et trimère C1.
- Par contre la répartition des proanthocyanidines étudiées est très différente suivant la provenance de la matière première (voir tableau et histogrammes).

AIV-3. Chromatogrammes : (pages 135 et 136)

On constate une dérive de la ligne de base ceci est du au gradient d'élution (de 1 à 10% en acide acétique en 40 minutes) qui est détecté par le spectrophotomètre U-V à 282 nm.

Chacun des chromatogrammes représente un échantillon du houblon utilisé lors des essais pilote sur le houblonnage. On peut comparer entre eux les résultats des échantillons car nous sommes partis d'un même poids et avons utilisé les mêmes conditions quelle que soit la texture de la matière première.

Tableau 10 : Teneur en polyphénols des houblons et extraits

	B3 en ppm	Catechine en ppm	Epicat. en ppm	B4 en ppm	C1 en mm H. de pic
Extrait Ethanol	1394.50	45.30	80.70	105.65	69.00
Extrait CO2 Pauls.	295.80	0.00	0.00	0.00	0.00
Extrait CO2 Hops.	507.10	0.00	0.00	0.00	0.00
Cônes Midkent	2620.00	452.90	666.00	1014.20	67.00
Cônes Brewers.	2408.70	332.20	302.70	507.10	129.00
Pellets Hallertau	2197.40	1056.90	302.70	1014.20	27.00

3000

ppm

1500

0

1500

ppm

750

0

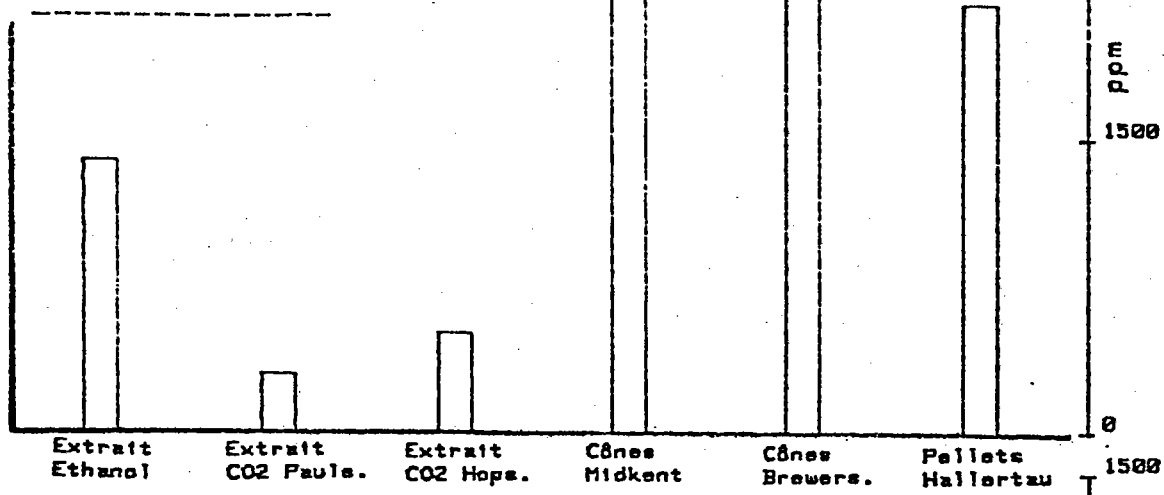
1500

ppm

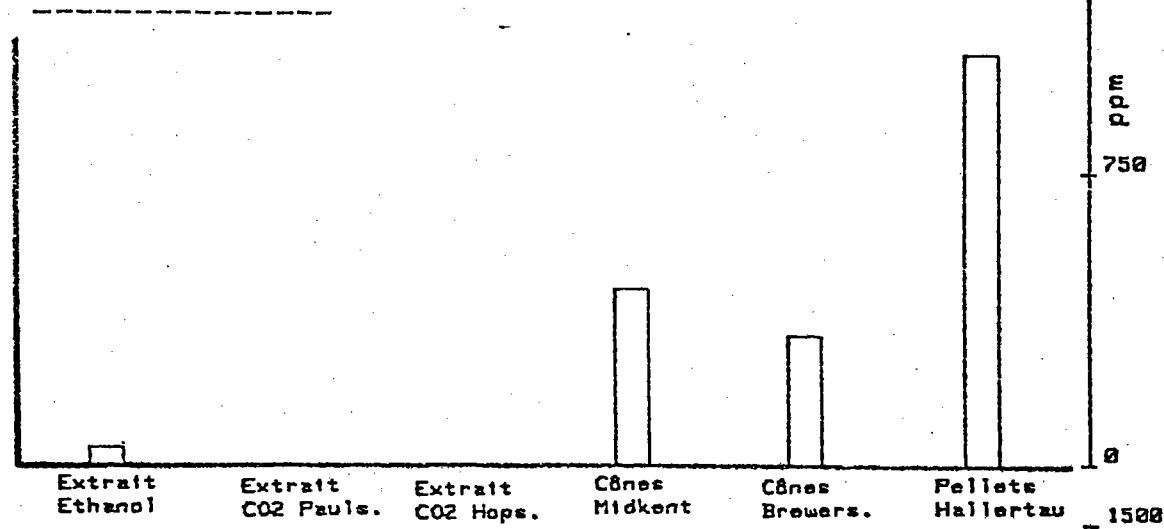
750

0

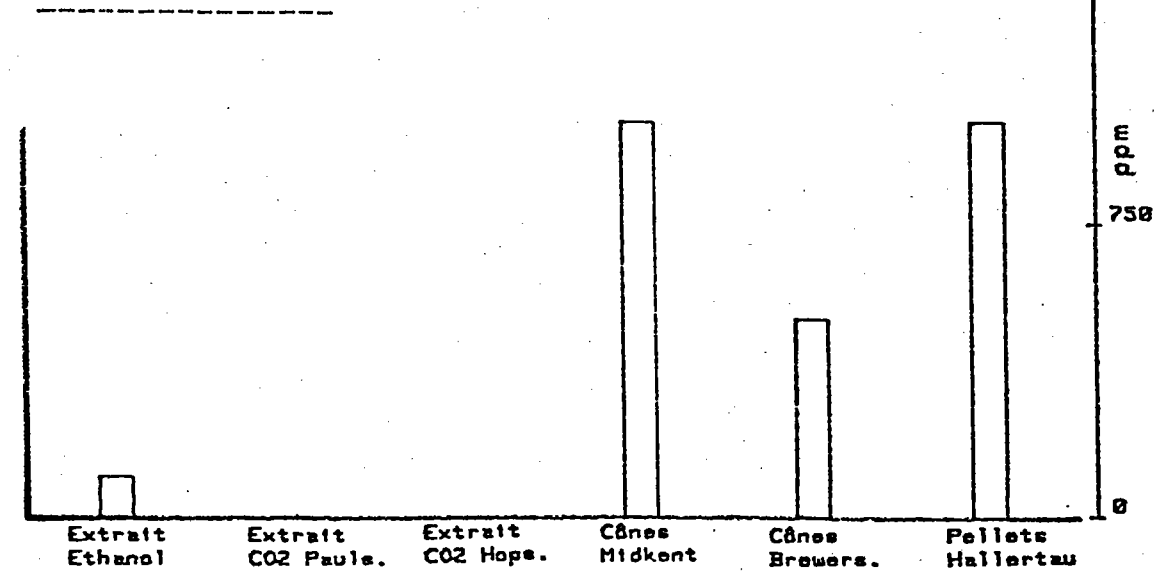
Histogramme 1 : Teneur en B3



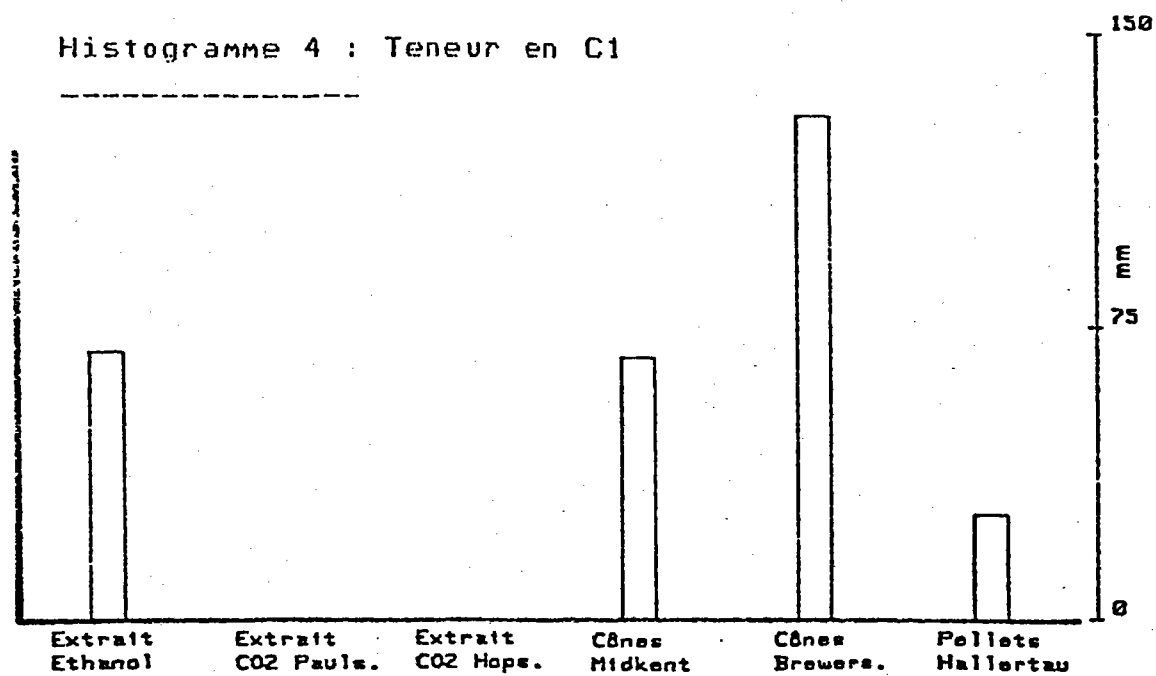
Histogramme 2 : Teneur en Catéchine



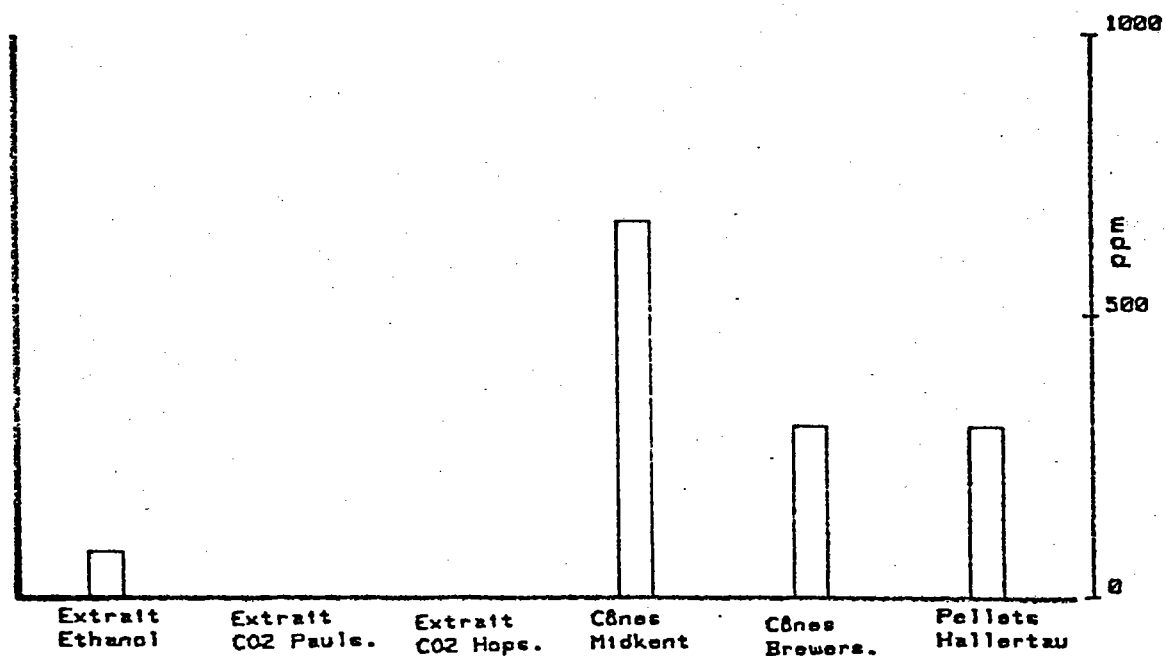
Histogramme 3 : Teneur en B4



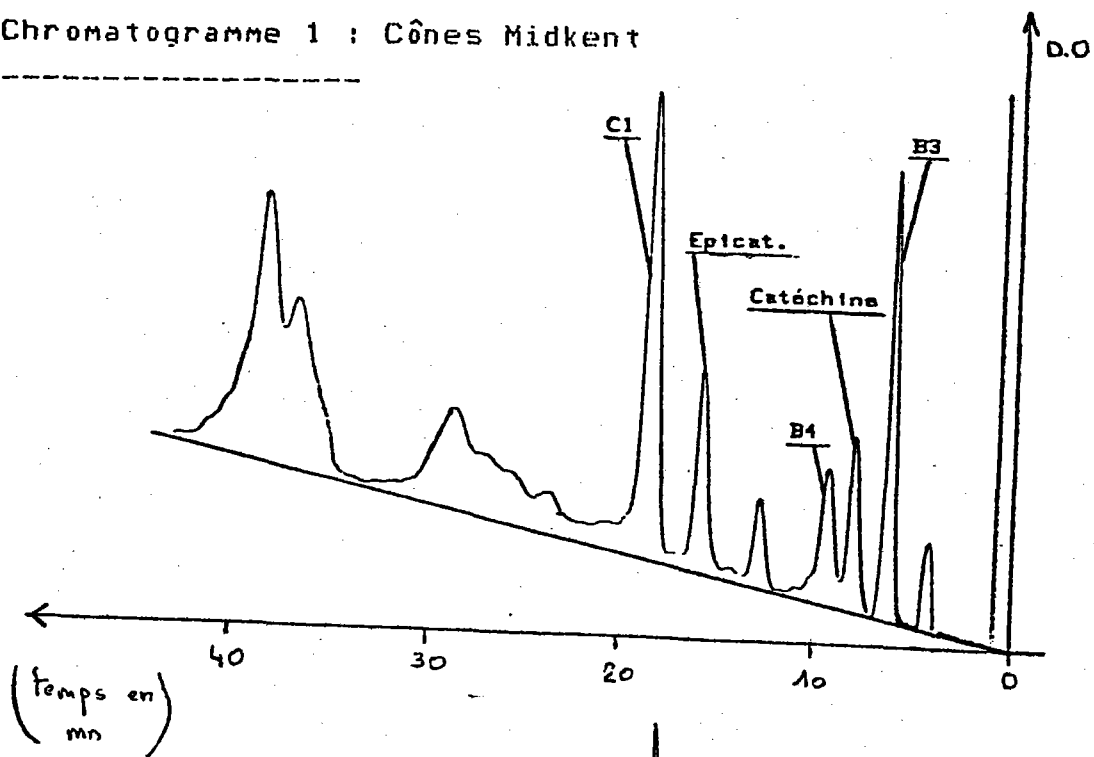
Histogramme 4 : Teneur en C1



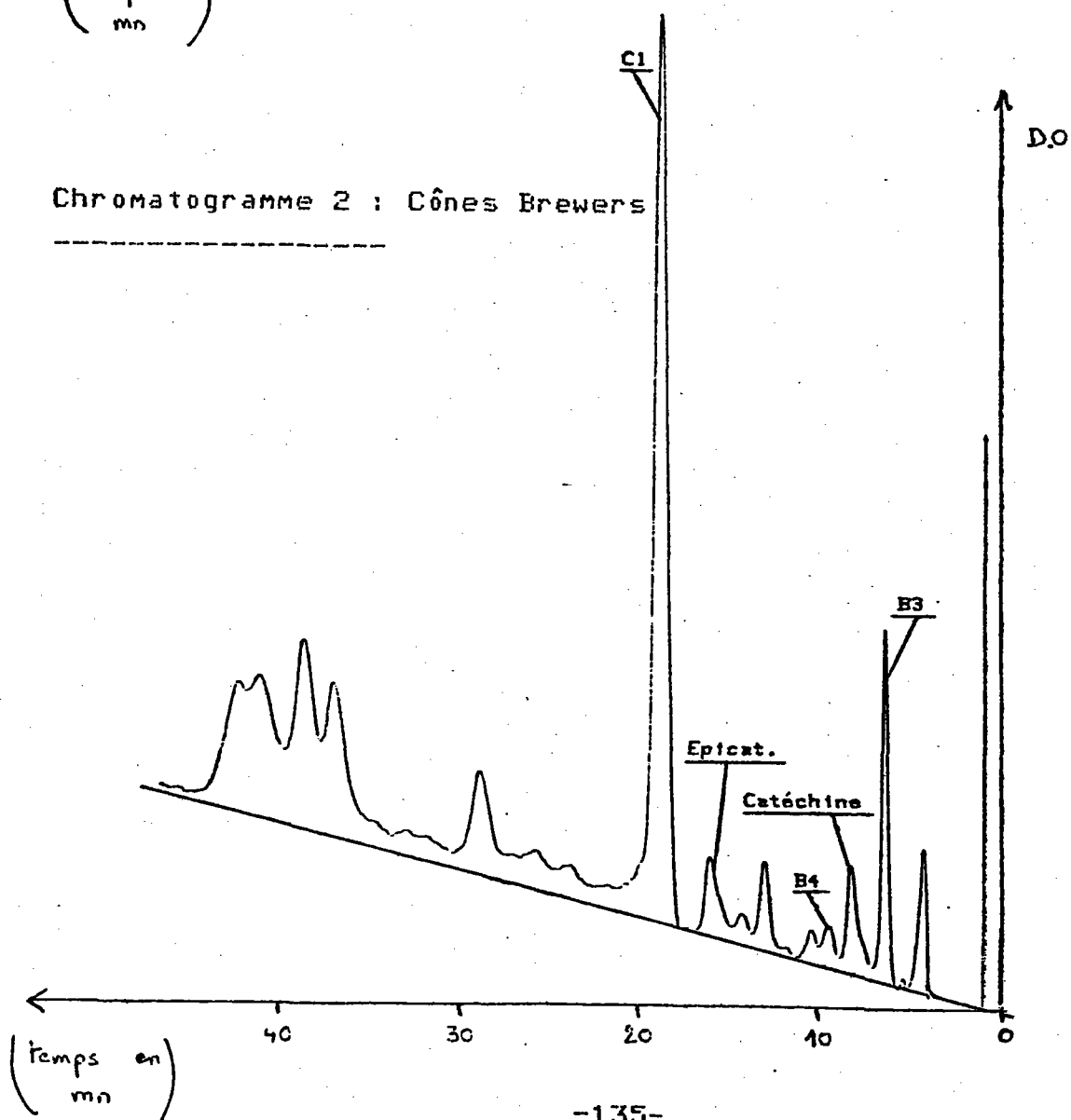
Histogramme 5 : Teneur en Epicatéchine



Chromatogramme 1 : Cônes Midkent

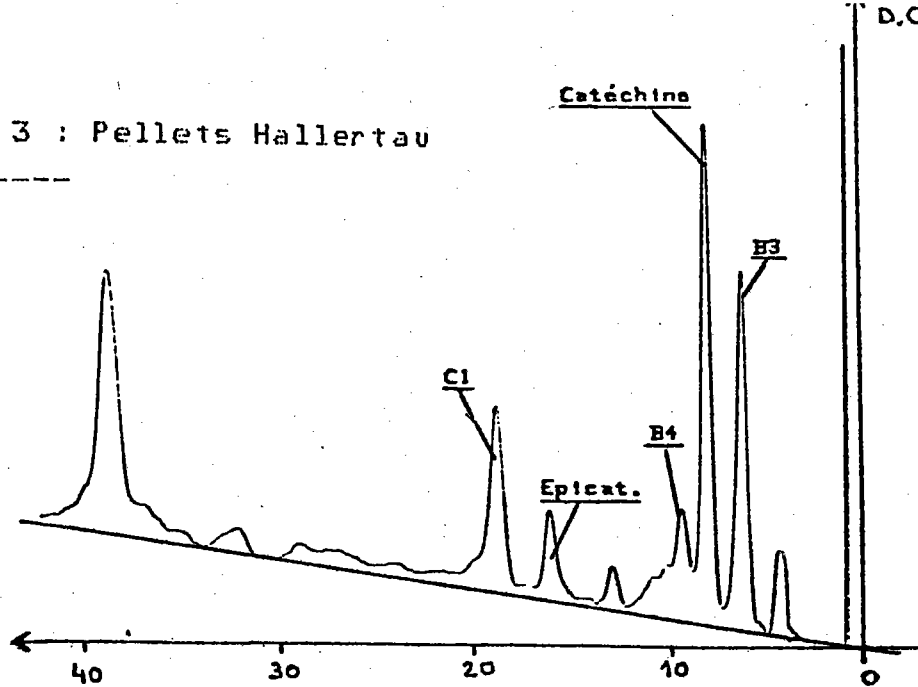


Chromatogramme 2 : Cônes Brewers



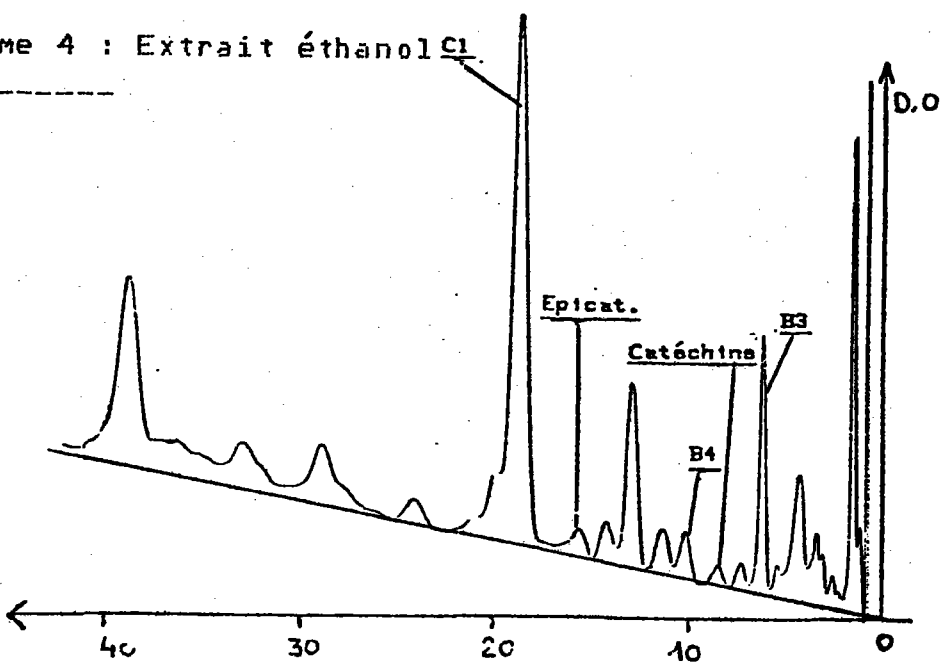
Chromatogramme 3 : Pellets Hallertau

(Temps en mn)



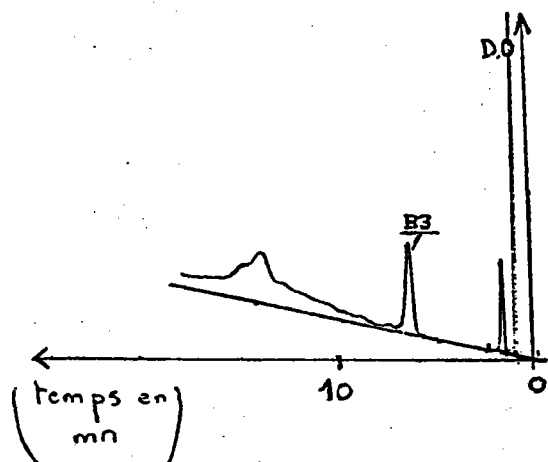
Chromatogramme 4 : Extrait éthanol C1

(Temps en mn)



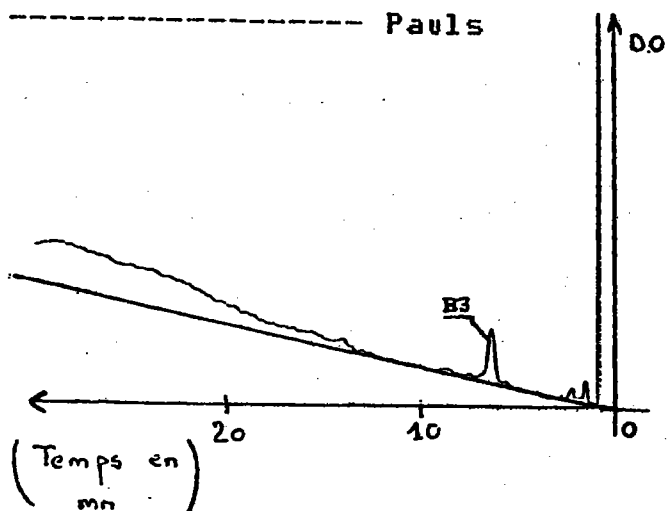
Chromatogramme 5 : Extrait CO₂

Hopstabil



Chromatogramme 6 : Extrait CO₂

Pauls



ANNEXE V

ETUDE EXPERIMENTALE DE L'OXYDATION PAR

LA POLYPHENOLOXYDASE (PPO) DE LA

CATECHINE, EPICATECHINE, B3 ET B4

AV-1. Matériels et méthode

Page 138

AV-2. Résultats et courbes

Page 140

ETUDE EXPERIMENTALE DE L'OXYDATION PAR

LA POLYPHENOLOXYDASE (PPO) DE LA

CATECHINE, EPICATECHINE, B3 ET B4

Pour cette étude nous nous sommes placés dans les conditions d'activité optimale de l'enzyme à savoir :

-température 37°C

-pH 6

AV-1. Matériels et méthode :

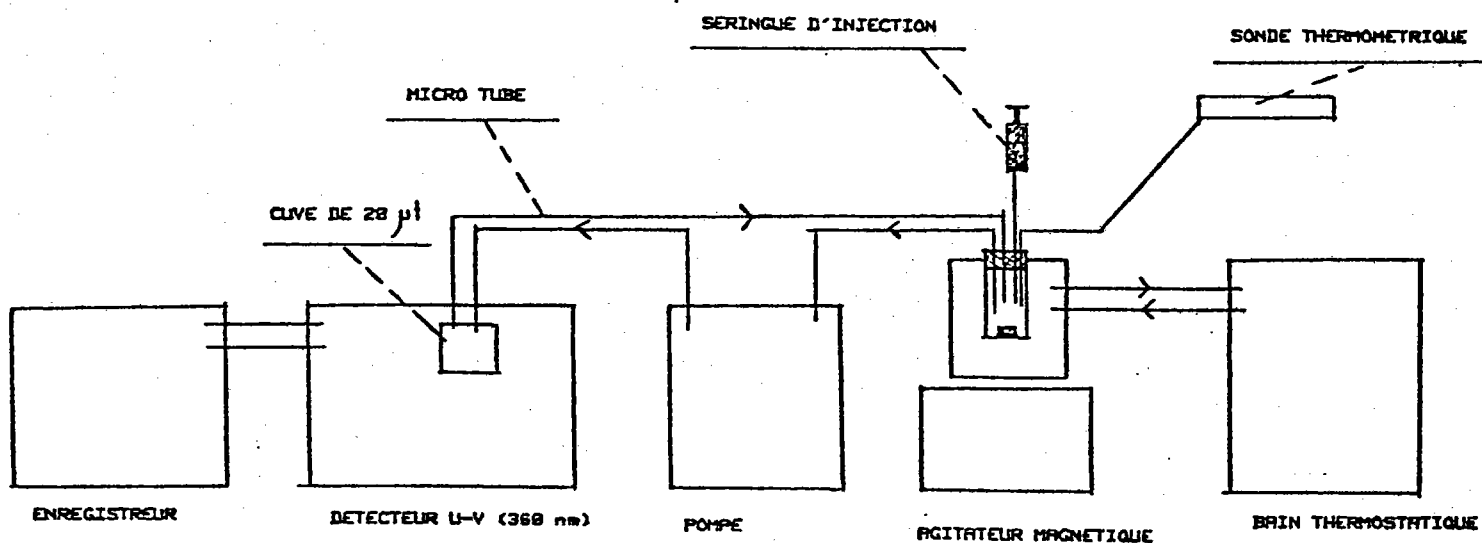
AV-1.1. Matériels :

Les solution à pH 6 sont obtenues en ajoutant à une solution 0.1 M de phosphate disodique (Na_2HPO_4) une solution 0.1 M d'acide citrique jusqu'à obtention du pH désiré.

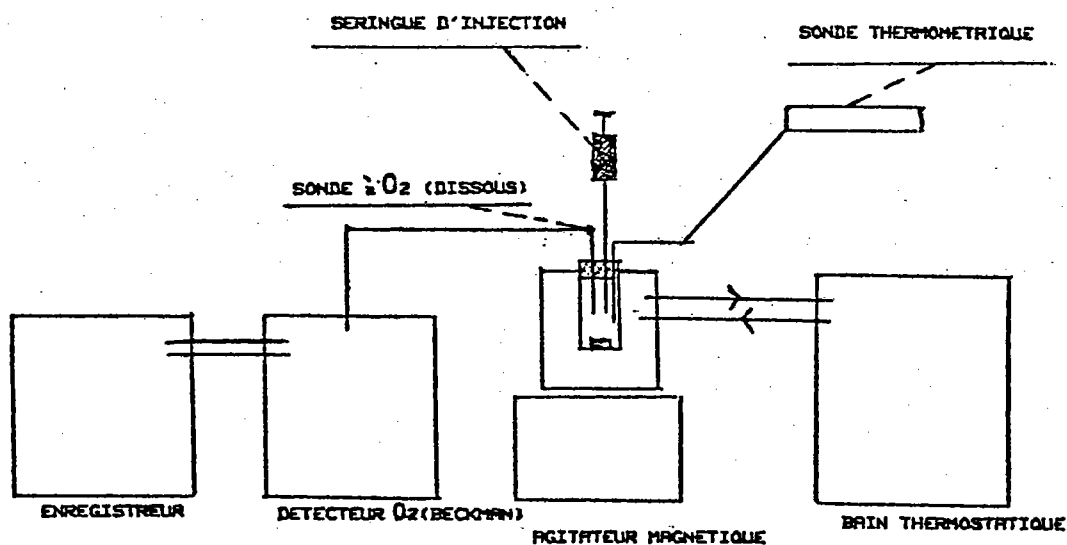
La PPO provient de la firme SERVA.

Les différents appareils utilisés et leur disposition sont représentés dans les schémas qui suivent :

-détermination de la vitesse d'oxydation par la détection UV
du produit d'oxydation



-détermination de la vitesse d'oxydation par la mesure de
l'oxygène dissous consommé par la réaction



AV-1.2. Méthode :

L'étalonnage de l'appareil Beckman à O₂ dissous a été
réalisé au moyen de solutions étalons (dosées par voie chimique).

L'étalonnage de la bande d'adsorption en U-V a été effectué en mesurant la disparition de la catéchine au cours du temps par HPLC.

Lors de la réaction d'oxydation les solutions sont à l'abri de l'air (oxygène). Les volumes des réactifs sont de l'ordre de 50 ml de la solution à pH 6 contenant les substrats à oxyder (catéchine, épicatechine, B3 ou B4) (concentration de la solution mère 1000ppm environ) et de 500 μ l de la solution de PPO (concentration 1000ppm environ).

L'oxydation a lieu dans un réacteur d'une contenance de 100 ml à double parois permettant d'effectuer la réaction à t^cste.

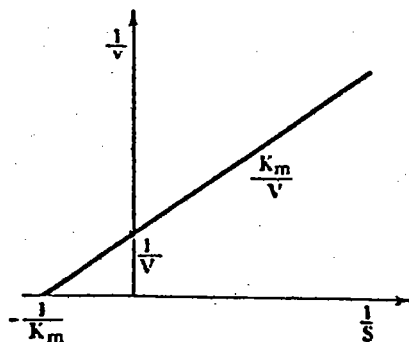
AV-2. Résultats et courbes :

Nous avons étudié deux fonctions pour chaque substrat :

-la vitesse en fonction de la concentration qui permet par l'intermédiaire de la relation de Lineweaver et Burk de donner la constante de Michaelis de la réaction (K_m) et la vitesse maximum (V_m).

En effet on porte sur un graphe $1/S$ (avec S concentration en substrat en mole par litre) en abscisse et en ordonnée les inverses des valeurs de la vitesse trouvées pour chaque concentration.

On établit ainsi une représentation comme celle qui suit :



dont l'équation de la droite est : $1/v = K_m/V \times (1/S) + 1/V$

Les résultats obtenus à partir des droites expérimentales sont regroupés dans le tableau 11. Les valeurs de K_m et V_m sont dans le tableau V et les droites sur la courbe XVI dans le chapitre VII.

-la vitesse en fonction de la température permet d'obtenir par l'équation d'Arrhenius l'énergie d'activation de la réaction. En effet selon l'équation $\log v$ est linéaire en fonction de $1/T$ (T température en degré Kelvin) et la pente de la droite vaut :
 $-0.219 E_a$ (E_a énergie d'activation)

Les résultats expérimentaux se trouvent au tableau 12 Les valeurs de E_a étant dans le tableau V du chapitre VII de même que les droites sur la courbe XV.

Les courbes d'oxydation traitées par ordinateur et les équations qui en découlent sont à la suite des tableaux 11 et 12.

Tableau 11

VITESSE DE REACTION POLYPHENOLS-PPO EN F(C)

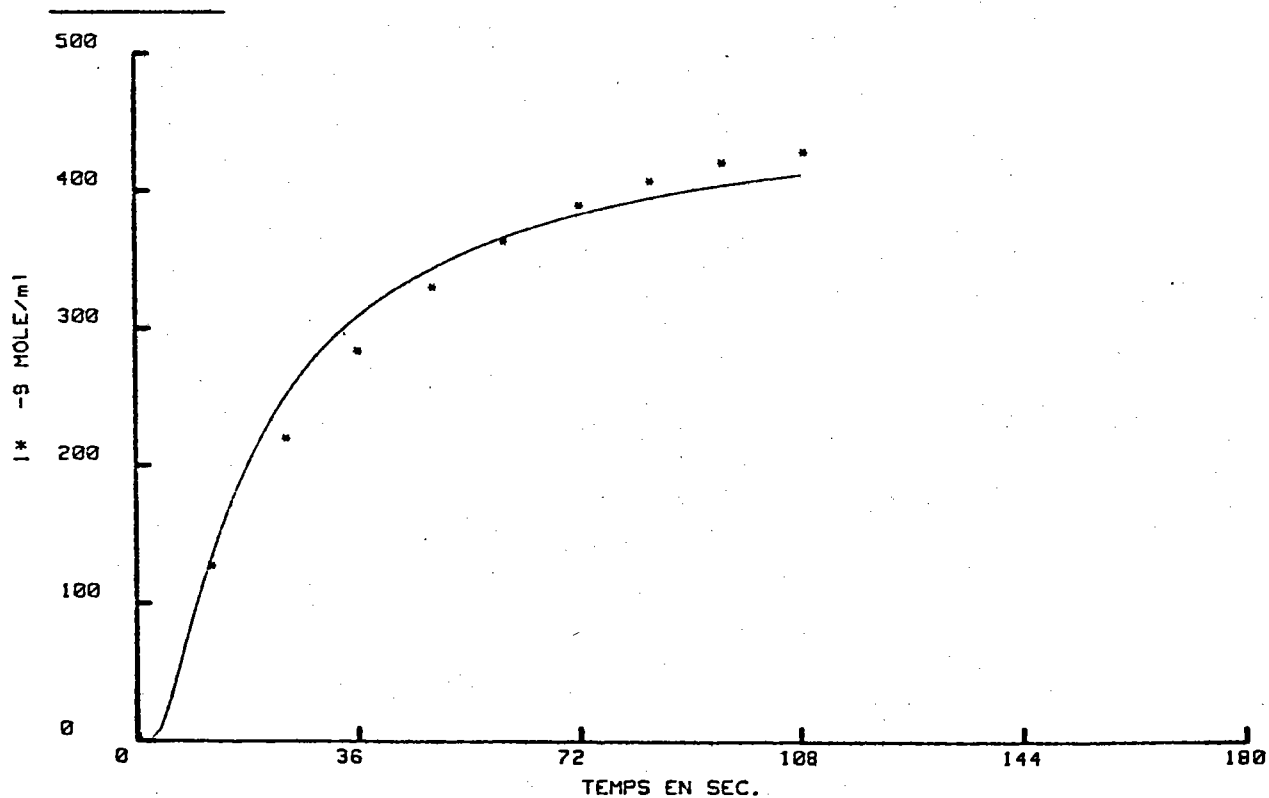
CATECHINE		EPICATECHINE		B3		B4	
1/M M en mole	1/V V en U/mg	1/M M en mole	1/V V en U/mg	1/M M en mole	1/V V en U/mg	1/M M en mole	1/V V en U/mg
680.00	.02	680.00	.02	522.00	.35	556.00	.18
1365.00	.03	1360.00	.04	1384.00	.54	1112.00	.29
3410.00	.05	3410.00	.08	2762.00	.93	2224.00	.57
6820.00	.09	6820.00	.14	5523.00	1.61	4448.00	1.13

Tableau 12

VITESSE DE REACTION POLYPHENOLS-PPO EN F(T)

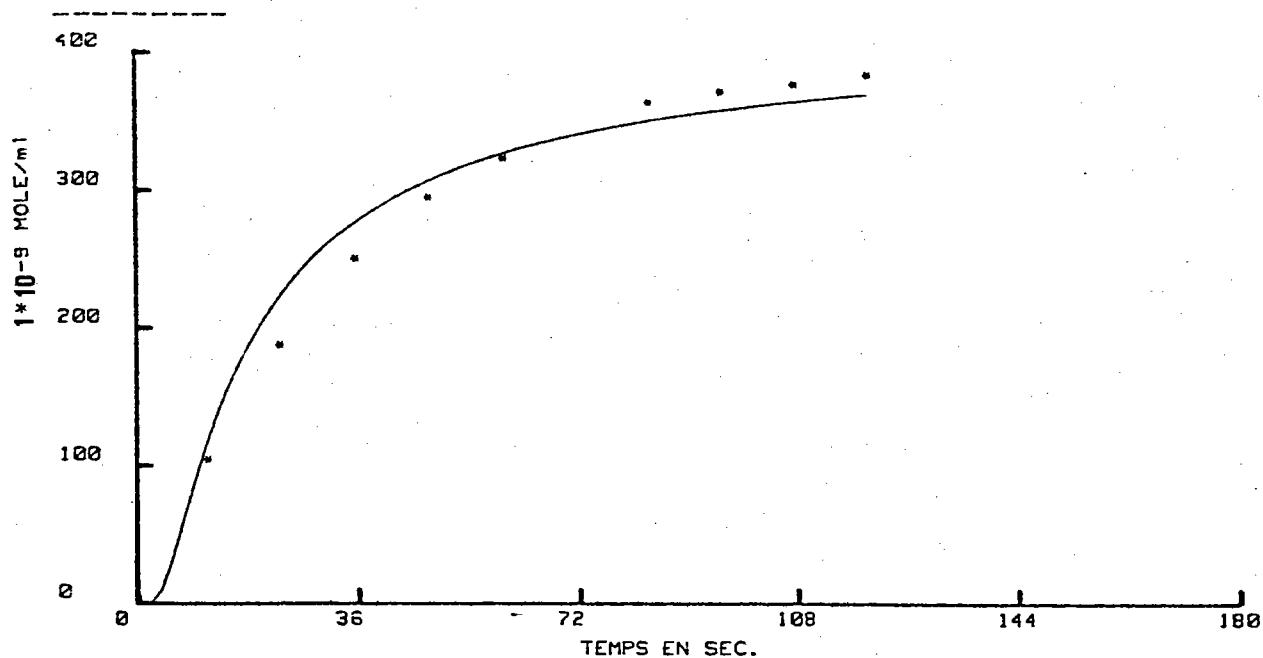
CATECHINE		EPICATECHINE		B3		B4	
$1/T \times 10^{-3}$ T en °K	LnV V en U/mg	$1/T \times 10^{-3}$ T en °K	LnV V en U/mg	$1/T \times 10^{-3}$ T en °K	LnV V en U/mg	$1/T \times 10^{-3}$ T en °K	LnV V en U/mg
3.23	3.95	3.23	3.87	3.22	1.05	3.22	1.70
3.28	3.73	3.29	3.45	3.27	.94	3.28	1.45
3.31	3.48	3.37	2.92	3.31	.81	3.32	1.27
3.36	3.29	3.45	2.52	3.35	.72	3.36	1.05

Courbe 9 OXYDATION DE LA CATECHINE.



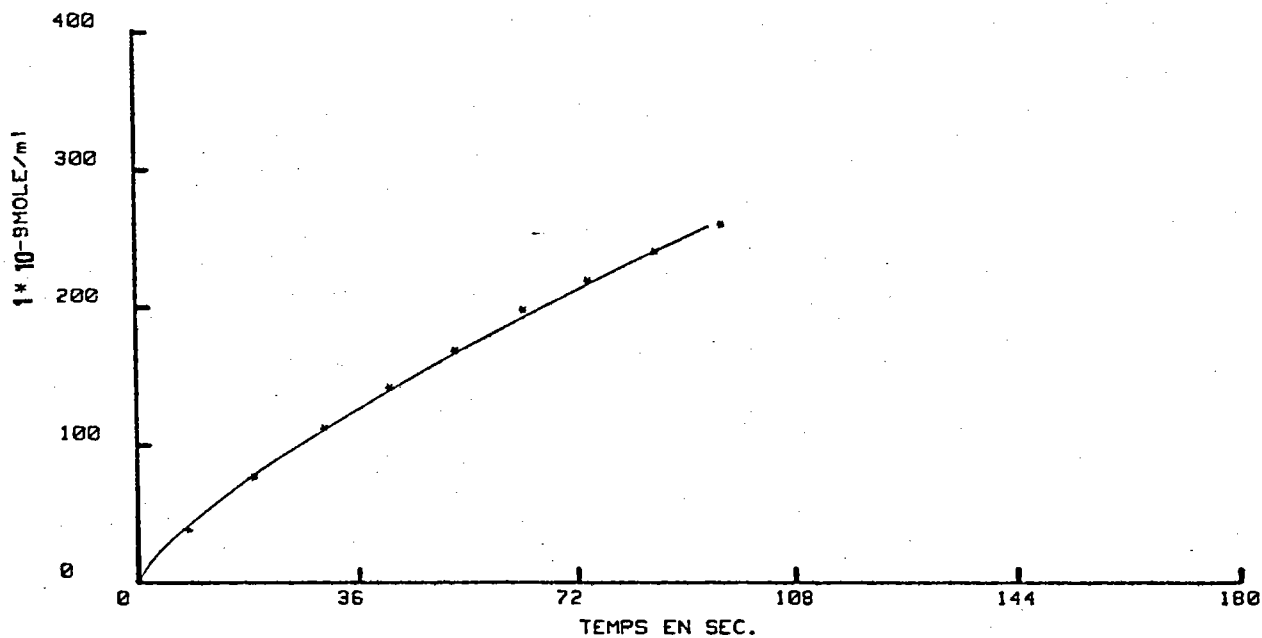
CHOIX : $e^{A + \frac{B}{X}}$
 $A = +.6167E+01 \quad B = -.1571E+02$

Courbe 10 OXYDATION DE L'EPICATECHINE



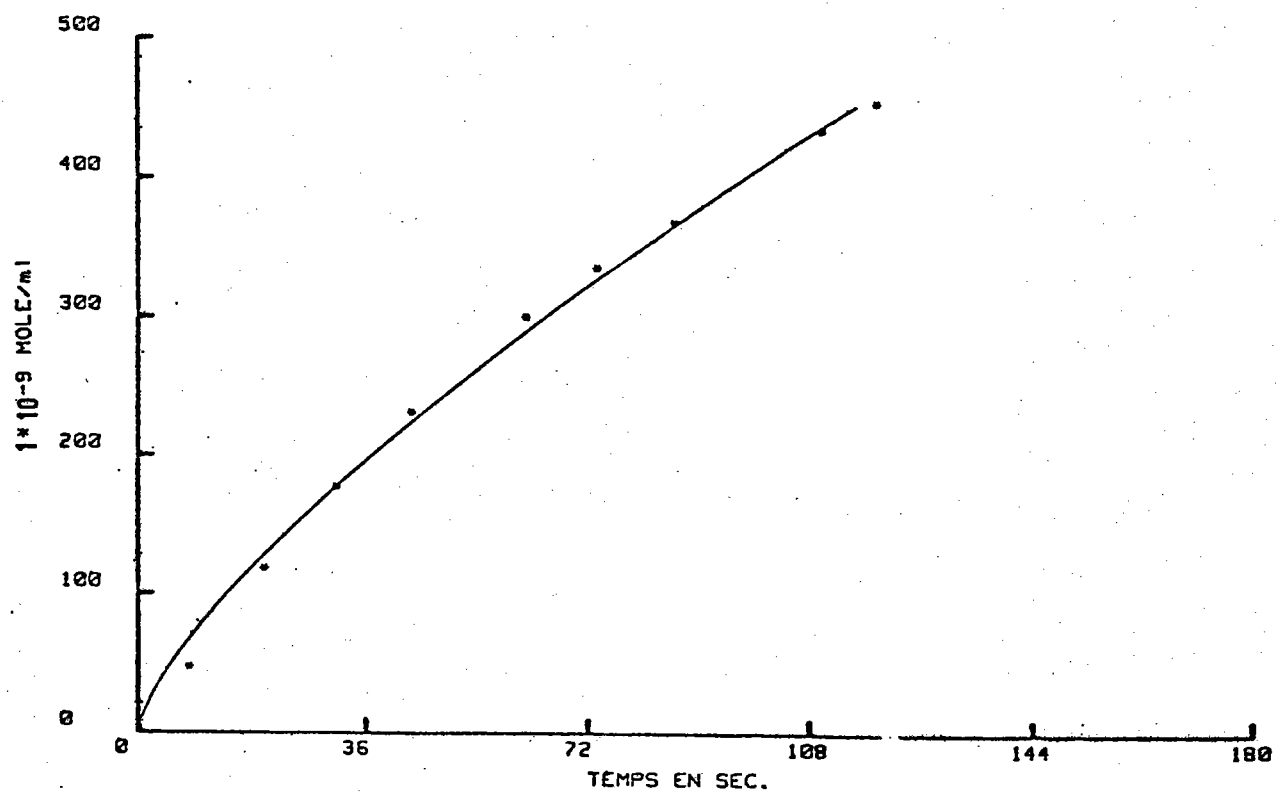
CHOIX : $e^{A + \frac{B}{X}}$
 $A = +.6037E+01 \quad B = -.1469E+02$

Courbe 11 OXYDATION DE LA B3



CHOIX : BX^C
 $B = +.8396E+01 \quad C = +.7552E+00$

Courbe 12 OXYDATION DE LA B4



CHOIX : BX^C

$B = +.1497E+02$ $C = +.7177E+00$

ANNEXE VI

METHODES D'ANALYSES DU TROUBLE

AVI-1. Sucres	Page 146
AVI-2. Acides Aminés (protéines)	Page 147
AVI-3. Polyphénols	Page 148

ANNEXE VI

METHODES D'ANALYSES DU TROUBLE

AVI-1. Sucres :

Mode opératoire :

L'hydrolyse a été effectuée au moyen de l'acide trifluoroacétique à 15% à une température de 110°C pendant 3 heures sous vide (tube scellé). On fait réagir environ 7 mg (exactement) de trouble dans 3 ml d'acide. Puis après réaction, on centrifuge la solution, prélève 1 ml de celle-ci et évapore au rotavapor à 30°C. Le résidu est laissé 24 heures dans un dessiccateur à vide en présence de NaOH. Puis on reprend par 1 ml d'eau distillée.

Etalonnage :

Pour déterminer la teneur en sucre de l'échantillon, nous avons utilisé la méthode Technicon (Méthodologie glucose AAII02). Les molécules de sucre réduisent le chélate de néocuproïne cuivrique en un complexe coloré de néocuproïne cuivreux, ceci en milieu alcalin (Na_2CO_3) en chauffant à 87°C. On mesure la coloration à 420 nm.

Le réactif néocuproïne-cuivre est préparé dans une fiole de 500 ml contenant 250 ml d'eau distillée. Dissoudre 0.2 g de néocuproïne hydrochlorure et 0.1 g de sulfate cuivrique ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), agiter et compléter avec de l'eau distillée.

On prépare la solution de carbonate de sodium en solubilisant 13.25 g de celui-ci dans une fiole de 500 ml contenant 400 ml d'eau distillée puis on complète au trait de jauge.

La droite d'étalonnage est effectuée à partir de solutions de glucose à 0.2, 0.5 ,1 et 2 g par litre.

On effectue la réaction à 87°C dans un ballon de 100 ml contenant 30 ml de la solution de Na_2CO_3 , 30 ml du réactif néocuproïne-cuivre et 200 μl de la solution étalon de glucose ou de l'échantillon.

AVI-2. Acides aminés :

Mode opératoire :

L'hydrolyse par l'acide chlorhydrique (6N) à 110°C en tube scellé et sous vide des protéines libèrent quantitativement les acides aminés (sauf exceptions voir ci-dessous).

De façon à déterminer les conditions optimums d'hydrolyse nous avons opéré à des temps variables :

le temps de 18 heures correspond à cet optimum à l'exclusion de Thréonine de la Sérine et du Tryptophane détruits partiellement et en totalité à 72 heures.

On fait donc réagir 5 mg de trouble dans 2 ml d'HCl pendant 8, 18 ou 72 heures. Après évaporation et séchage au dessiccateur on reprend le résidu par une solution pH 2.2 + étalon interne(acide α -aminoguanidinopropionique AGPA) que l'on injecte sur l'analyseur d'acides aminés Beckman (Amino Acid Analyser 119CL).

La sérine, la thréonine et le tryptophane sont déterminés par hydrolyse en milieu alcalin par la soude (6N) en procédant comme ci-dessus.

La teneur en acides aminés des bières est déterminée par injection directe en présence de l'étalon interne.

AVI-3. Polyphénols :

Mode opératoire :

Nous utilisons pour l'hydrolyse l'acide trifluoroacétique à 15 % qui ne détruit pas les cyanidines et qui permet une meilleure solubilisation du trouble.

Pour un échantillon de trouble, le prélèvement est de environ 5 mg (exactement) dans 2 ml d'acide trifluoroacétique à 15% à une température de 110°C pendant 3 heures (tube scellé).

Pour un échantillon de bière, le mélange réactionnel est constitué par 85 ml de bière et 15 ml d'acide trifluoroacétique pur.

L'étalonnage est effectué sur des solutions de B3 dans l'acide trifluoroacétique à 15 %.

Chacune des solutions est portées à ébullition pendant une heure.

Après refroidissement on utilise la méthode de dosage des polyphénols décrite dans l'Annexe II.

La méthode permet donc le dosage des polyphénols liés sous forme de cyanidine X, après étalonnage préalable à l'aide de solutions du dimère B3.

B

I

B

L

I

O

G

R

A

P

H

I

E

BIBLIOGRAPHIE

1. P. RIBEREAU et G. AYON, Les composés phénoliques des végétaux, Arnod, 1968.
2. T.A. GEISSMAN et E. HINREINER, Bot. Rev., 1952, 18, 77, 164.
3. K. FREUDENBERG et K. WEINGES, Tetraedron, 1960, 8, 336.
4. M. TSWETT, Biochem. Z., 1914, 58, 225.
5. K. WEINGES, W. BAHR, W. EBERT, K. GORITZ et H.D. MARX, Fortsch. Chem. Org. Naturst., 1969, 27, 158.
6. The flavonoids édité par J.B. HARBORNE, T.J. MABRY, publié par CHAPMAN and HALL, Londres, 1965.
Chap. 10 : Natural Proanthocyanidins par E. HASLAM, 505.
7. G. HARRIS et R.W. RICKETTS, J. Inst. Brew., 1959, 65, 252.
8. J. JERUMANIS, Cerevisia, 1979, 1, 9.
9. K. WEINGES, Chem. Ber., 1961, 94, 3032.
10. K. WEINGES, Angew. Chem., 1962, 74, 514.
11. K. WEINGES et coll., Justus Liebigs. Ann. Chem., 1968, 711, 184.
12. K. WEINGES, H. GORISSEN et R. LONTIE, Ann. Physiol. Veg., 1969, 11, 67.
13. R.S. THOMSON, D. JACQUES, E. HASLAM et R.J.N. TANNER, J. Chem. Soc. (Perkin I), 1972, 1387.
14. S. RASH, S. LIE, Proc. Eur. Brew. Conv. Estoril, 1971, 9.

15. N. AMRHEIN, K-H. GODEKE, Plant Science Letters, 1977, 8, 313.
16. N. AMRHEIN, K-H. GODEKE, V.I. KEFELI, Ber. Deutsch Bot. Ges. Bd., 1976, 89, 247.
17. R.A. DIXON, T. BROWNE, M. WARD, Planta, 1980, 150, 279.
18. S. FONTAINE, G. ALIBERT, A-M. BOUDET, C.R. Groupe Polyphénols, 1978, 91.
19. W.G.C. FORSYTH, J.B. ROBERTS, Biochem J., 1960, 374.
20. E.A. HAVIR, K. HANSON, Biochemistry, 1968, 7, 1404.
21. G. HRAZDINA, F. KREUZALER, K. HAHLBROCK, H. GRISEBACH, Arch. Biochem. Biophys., 1976, 175, 392.
22. L. MIKOLA, J. MIKOLA, Planta, 1980, 149, 149.
23. R. SCHMIDT, H. MOHR, Planta, 1981, 151, 541.
24. E. HASLAM, C.T. OPIE, L.J. PORTER, Phytochem., 1977, 16, 99.
25. E. HASLAM, Biochem. J., 1974, 594.
26. D. JACQUES, C.T. OPIE, L.J. PORTER, E. HASLAM, J. Chem. Soc. Trans Perkin I, 1977, 1637.
27. E. HASLAM, Phytochemistry, 1980, 19, 2557.
28. A.C. FLETCHER, L.J. PORTER, E. HASLAM, J. Chem. Soc., Chem. Comm., 1976, 627.

29. A.C. FLETCHER, L.J. PORTER, E. HASLAM, J. Chem. Soc. Perkin I, 1977, 1628.
30. D.G. ROUX, D. FERREIRA, Phytochemistry, 1974, 2039.
31. J.J. BOTHA, D. FERREIRA, D.G. ROUX, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1979, 510.
32. D.G. ROUX, D. FERREIRA, J.J. BOTHA, J. Agric. Food Chem., 1980, 28, 216.
33. K.F.F. KHO, A.C. BOLSMAN-LOUWEN, J.C. VUIK, G.J.H. BENNINK, Planta, 1977, 135, 109.
34. A.J.H. TABAK, H. MEYER, G.J.H. BENNINK, Planta, 1978, 139, 67.
35. G. FORKMANN, Planta, 1980, 148, 157.
36. T.A. GEISSMAN, N.N. YOSHIMURH, Tetraedron Letters, 1966, 24, 2669.
37. G. SCHULTZ, D. KEIL, H. KRUGER, " Topics in Flavonoid Chemistry and Biochemistry ", Elsevier, 1975, 214.
38. J.R. HUDSON, Proc. Eur. Brew. Conv. Copenhagen, 1981, 421.
39. N.S. CURTIS, A.G. CLARK, J. Inst. Brew., 1960, 66, 226.
40. N.L. HANSEN, Proc. Eur. Brew. Conv. Copenhagen, 1981, 435.
41. H. KRINGSTAD, E. DAMM, Proc. Eur. Brew. Conv. Stockholm, 1965, 129.
42. W.D. Mc FARLANE, P.T. SWORD, G. BLINOFF, Proc. Eur. Brew. Conv. Bruxelles, 1963, 174.
43. C.A. MASSCHELEIN, M.S. BATUM, Proc. Eur. Brew. Conv. Copenhagen, 1981, 359.

44. J. POSADA, R. SEGURA, J.B. PEREZ, J.L. MARTINEZ, Proc. Eur. Brew. Conv. Copenhagen, 1981, 443.
45. R. VANCRAENENBROECK, R. LONTIE, D. EYBEN, Ind. Chim. Belge, 1967, 32, 780.
46. R. VANCRAENENBROECK, M. NEOBADIN, J. DE CLERCK, Bull. Anc. Et. Brass. Louvain, 1972, 68, 1.
47. L. WALLERSTEIN, Wallerstein Lab. Comm., 1956, 19, (65), 95.
48. A. MACEY, K.C STOWELL, H.B. WHITE, Proc. Amer. Soc. Brew. Chem., 1964, 22.
49. D. VON WETTSTEIN, B. JENDESTRID, B. AHRENST-LARSEN, J.A. SORENSEN, Carlsberg Res. Commun., 1977, 42, 341.
50. J.W. GRAMSHAW, J. Inst. Brew., 1969, 75, 61.
51. K. SILBEREISEN et F. KRAFFCZYK, MBAA. Techn. Quart., 1968, 5, (2) 135.
52. J.W. GRAMSHAW, J. Inst. Brew., 1967, 73, 238.
53. L.J. GOMEZ et M.J. LEWIS, Proc. Am. Soc. Brew. Chem., 1969, 142.
54. R. STEINER et H.R. STOCKER, Proc. Eur. Brew. Conv. Madrid, 1967, 407.
55. J.B. WOOF et J.S. PIERCE, Proc. Eur. Brew. Conv. Madrid, 1967 363.
56. J.D. Mc GUINNESS, D.R.J. LAWS, R. EASTMOND et R.J. GARDNER, J. Inst. Brew., 1975, 81, 237.
57. R. EASTMOND et R.J. GARDNER, J. Inst. Brew., 1974, 80, 192.

58. H. SOGAWA, Report of the Research Lab. of the Kirin Brewery, 1971, 14, 21.
59. H. SOGAWA, Report of the Research Lab. of the Kirin Brewery, 1972, 15, 17.
60. H. SOGAWA, Report of the Research Lab. of the Kirin Brewery, 1973, 16, 25.
61. J.W. GRAMSHAW, MBAA Techn. Quart., 1969, 6, (4), 239.
62. J.W. GRAMSHAW, MBAA Techn. Quart., 1970, 7, (2), 122.
63. J.W. GRAMSHAW, MBAA Techn. Quart., 1970, 7, (3), 167.
64. M. DADIC, J.E.A. VAN GHELUWE et Z. VALY, J. Inst. Brew., 1970 76, 267.
65. L. CHAPON, B. CHOLLOT et E. URION, Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 429.
66. T.L. OWADES et J. JAKOVAC, Proc. Am. Soc. Brew. Chem., 1966, 18.
67. J.D. Mc GUINNESS, R. EASTMOND, D.R.J. LAWS et R.J. GARDNER, J. Inst. Brew., 1975, 81, 237.
68. W.O.S. MEREDITH et R. TKACHUK, J. Inst. Brew., 1964, 70, 410.
69. L. CHAPON, Brauwissenschaft, 1963, 16, 225.
70. R.J. GARDNER et J.D. Mc GUINNESS, MBAA Techn. Quart., 1977, 14, (4), 250.
71. M. DADIC et C. BELLEAU, Proc. Am. Soc. Brew. Chem., 1973, 10, 60.

72. L. CHAPON, S. CHAPON, R. SEYER et C. LOUIS, Proc. Eur. Brew. Conv. Cong. Nice, 1973, 423.
73. G. FONKNECHTEN, D.E.A. Chimie Moléculaire "Extraction et Synthèse du dimère B3", NANCY I, 1981.
74. R.J. GARDNER et J.D. GUINNESS, Technical Quarterly 1977, 14, 250 (et références incluses).
75. R. EASTMOND, J. Inst. Brew., 1974, 80, 192.
76. J.J. JERUMANIS, Proc. Eur. Brew. Conv. Cong. Berlin, 1979, 309.
77. K. WEINGES, W. KALTENHAUSER, H.D. MARX, E. NADER, J. PERNER et D. SEILER, Liebigs Annalen, 1968, 711, 184.
78. K. WEINGES, K. GORITZ et F. NADER, Liebigs Annalen, 1968, 715, 164.
79. K. WEINGES, H.D. MARX et K. GORITZ, Chem. Ber., 1970, 103, 2336.
80. R.S. THOMSON, D. JACQUES, E. HASLAM et R.J.N. TANNER, J. Chem. Soc. (Perkin I), 1979, 1387.
81. P. MULKAY, R. TOUILLAX et J.J. JERUMANIS, Journal of Chromatography, 1981, 208, 419.
82. K. WEINGES, Phytochem., 1964, 3, 263.
83. J.W. GRAMSHAW, J. Inst. Brew., 1968, 74, 20.
84. J. MICHAUD, J. MASQUELIER et A.M. ROUDGE, Ann. Pharm. France, 1973, 31, 385.

85. R. PHAN TAN LUU, D. BAZAR, R. FLAYEUX, J.M. LEHUEDE, M. PARISOT, T. VINH et M. MOLL, Ind. Alim. Agricoles, 1979, (N35), 441 (et références citées).
86. H. OUTTRUP et K. SCHAUMBURG, Carlsberg Res. Comm., 1981, 46, 43.
87. G.C. LEVY et G.L. NELSON, C NMR for Organic Chemists Willey Interscience NY, 1972.
88. The flavonoids édité par J.B. HARBORNE, T.J. MABRY, publié par CHAPMAN and HALL, Londres, 1975, 115.
89. F.M. DEAN, Naturally occuring oxygen ring compounds, Butterworth, 1963, 430.
90. B. EISTERT : Newer methods of preparative organic chemistry, T.I., 1948, 564.
91. M. MOLL, Brewing Science Vol. 3 ed. J.R.A. Polloch, Academic Press, New-York sous presse (références incluses).
92. W.D. Mc FARLANE, Proc. Am. Soc. Brew. Chem., 1958, 119.
93. R. SEYER, Thèse, Université de NANCY, 1976.
94. N. MAKINO, P. Mc MAHILL, H.S. MASON et T.H. MOSS, J. Biol. Chem., 1974, 249, 6062 ; K. LERCH, F.E.B.S. Letter, 1976, 69, 157 ; W.H. VANNESTE et A. ZUBER BUHLER, in "Molecular mechanisms of oxygen activation", O. MAYAISHI ed. Academic Press, 1974, 374 et références citées.
95. P. CAPDEVIELLE et M. MAUMY, Tetraedron Letters, vol.23, N315, p. 1573-1576, 1982.
96. P. KERTESZ et R. ZITO, Biochim. Biophys. Acta, 96, 447 (1965).

97. H. DRESSLER et C.R. DAWSON, Biochim. Biophys. Acta, 45, 515, (1960).
98. M. MAUMY, P. CAPDEVIELLE, P. DOSTERT et M. LANGLOIS : brevet français, n° de dépôt 81.21606 (18 novembre 1981).
99. M. TOUKAM-GHOMSI, Thèse, Institut National Polytechnique de Lorraine, 1980.
100. G. FONKNECHTEN, M. MOLL, D. CAGNIANT, G. KIRSCH et J.F. MULLER, J. Inst.-Brew, (en cours de parution).