SOMMAIRE

Introduction et but du travail ……1

***Première partie* : Présentation de la société et procédé de la fabrication de la bière**

Chapitre I *: Présentation de la société*

1. *Information générale…… ….2*
2. *Fiche signalétique ……2*
3. *Domaine d'activité ……3*
4. *Organigramme de la SBM……3*

Chapitre II *: Procédé de la fabrication de la bière*

- *Généralités sur la bière*

1. *Définition……4*
2. *Composition et propriétés de la bière…… 4*
3. *Processus de fabrication de la bière…… 5*

***Deuxième partie* : Effet des conditions de la fermentation sur la formation du diacétyle :**

I. *Définition……8*
   1. *Diacétyle dans la bière …… 8*
   2. *Apparition du diacétyle au cours de la fermentation ……9*

II. *Méthodes de dosage du Diacétyle ……10*
   Résultats du suivi de la concentration du diacétyl ……13

III. *Facteurs qui influencent la formation du diacétyle……18*
   1. *Contamination bactérienne……18*
   2. *Composition du moût, (en particulier la concentration en valine, isoleucine et leucine)…… 18*
   3. *Oxygène……19*
   4. *Température……19*

IV. *Solutions proposées……19*
   1. *Contrôle du taux d'oxygène pendant la fermentation principale……19*
   2. Fermentation sous pression ……19
   3. *Intégration de l'enzyme α-acétolactate décarboxylase ……20*
   4. *Ajout des acides aminés……20*
   5. *Gestion du temps/température…… 20*

Conclusion……21

Introduction

Lors de la fabrication de la bière, deux fermentations se succèdent : la fermentation principale qui a pour but de former de l'éthanol et des précurseurs d'arôme et la fermentation secondaire, ou maturation, qui a pour rôle d'équilibrer les arômes et principalement d'éliminer le diacétyle.

Le **diacétyle** ou **butane-2,3-dione** : $C_4H_6O_2$ est une cétone vicinale qui possède un seuil de gustation peu élevé, et donne une forte saveur de beurre qui est considérée comme un défaut dans plusieurs produits à base de bière.

Dans le présent travail, nous emploierons dans un premier temps à présenter la société des brasseries du nord marocain et ce, concernant tous les aspects de la société du point de vue général et organisationnel.

La deuxième partie exposera le sujet demandé, qui prend en considération l'effet des conditions de la fermentation sur la formation du diacétyle. L'intérêt de ce sujet consiste à déterminer l'impact de l'augmentation de la concentration du diacétyle dans la bière afin de diminuer son action sur les qualités organoleptiques de la bière d'où la nécessité du suivi de sa concentration .

◎Première partie:

Présentation de la société et Procédé de fabrication de la bière

Présentation de la Société des Brasseries du Maroc :

A-Informations générales :

La société des Brasseries SBM FES fait partie du groupe SBM (Société des Brasseries du Maroc) qui se trouve à Casablanca.

SBM est une société anonyme composée de deux centres : un centre de Fès qui a une grande importance par rapport au deuxième centre (celui d'Oujda) au niveau de la distribution, la gestion de la production, la prise de décision et qui a des relations directes avec la direction générale du groupe à Casablanca.

En effet, le centre de Fès s'est spécialisé dans la fabrication et la production du liquide.
En 1919, un groupe français « Castel » a crée la société BRANOMA, depuis
le 02 / 09 / 1948 . SBM FES a commencé son activité par le lancement du premier brassin.

- **Tableau 1 : Historique de la société :**

Evénement	*Date*
Date de creation	*1947*
Licence Heineken accordée à BRANOMA	*1979*
Arrêt de production des boissons gazeuses	*1982*
Arrêt de production de la Heineken	*1990*
Déménagement à la nouvelle usine	*Fin 2004*

B-Fiche signalétique :

- Raison sociale : Brasserie du Nord Marocain.
- Statut juridique : société anonyme (S.A).
- Adresse : Rue Ibn El khatib , Sidi Brahim - Quartier industriel- FES -BP : 2100
- Surface totale : 30 500 m².
- Capital social : 50 MDA.
- Actionnariat : société des brasseries du Maroc et autres
- Date de mise en service : 1947.
- Effectif : 151 personnes.
- Capacité de production : 200 000 HL/an.

C-Domaine d'activité :

Le domaine d'activité de la BRANOMA comprend la fabrication et le conditionnement des bières : Spéciale, Stork, Flag Piles, 33 Export et de l'eau minérale : Ain Ifrane

D-Organigramme de BRANOMA

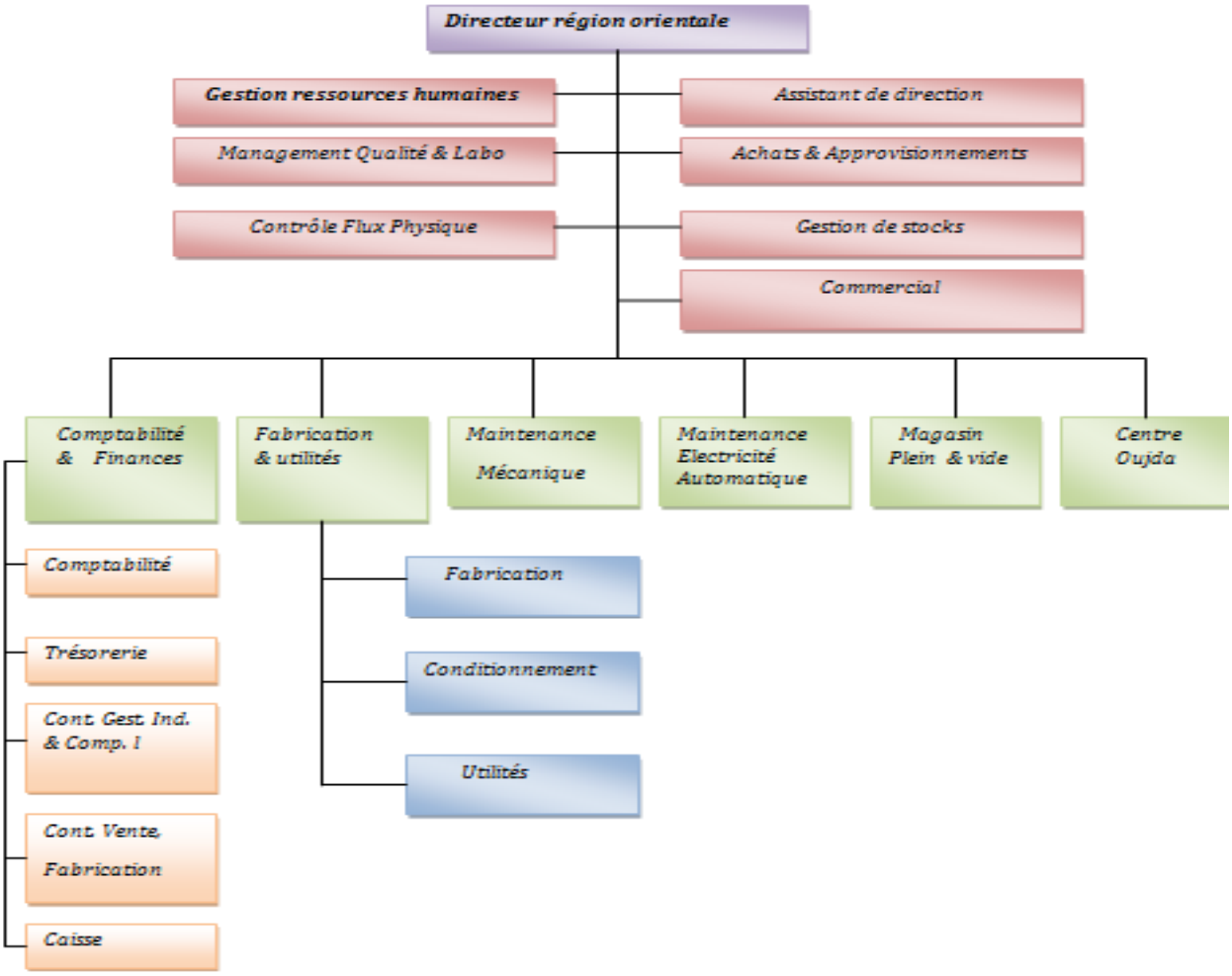

Figure 1 *: Organigramme de la Brasserie du Maroc (SBM)*

✦ Généralités sur la bière :

1) Définition :

La bière est une boisson fermentée légèrement alcoolisée(4°-6°), préparée à partir des céréales germées, principalement de l'orge (céréale la plus riche en amidon) et parfumée avec du houblon.

2) Composition et propriétés de la bière:

a) Composition :

Les quatres ingrédients principaux qui composent la bière sont :

L'eau constitue plus de 90% de la bière. Ses qualités déterminent la clarté et le goût de la bière. Elle encourage le malt et le houblon à libérer leurs sucres et arômes.

L'eau

On brasse de la bière avec différentes céréales (orge, blé, avoine, seigle, riz, maïs). L'orge transformée en malt permet d'obtenir un goût plus pur.

Le malt

Le houblon contient des acides qui stabilisent la bière et lui procurent son amertume ainsi que des huiles essentielles qui enrichissent sa palette aromatique.

Le houblon

Ce micro-organisme unicellulaire permet de transformer les sucres en alcool et en gaz carbonique, mais aussi de développer des arômes.

La levure

Plusieurs autres ingrédients peuvent être utilisés dans la bière, comme du sucre, du miel, des épices, etc…

b) Processus de fabrication de la bière :

La fabrication de la bière comporte 6 étapes essentielles, chacune de celles-ci comporte plusieurs variations.

La figure 2 montre les différentes étapes simplifiées du processus de fabrication de la bière.

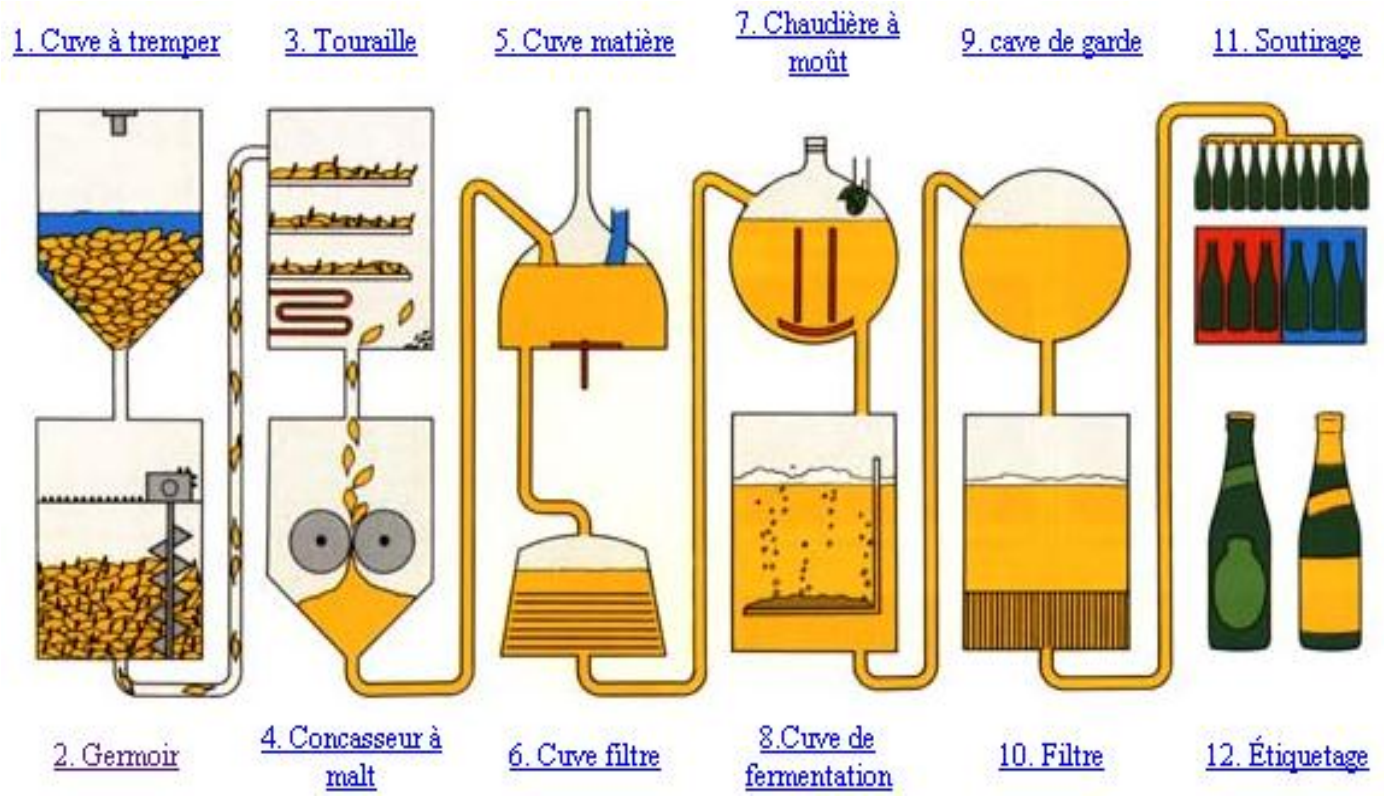

Figure 2 : Processus de fabrication de la bière

→ La fabrication de la bière commence par le concassage du malt.

- **Concassage** : Cette opération consiste à éclater les grains du malt, en évitant de faire de la farine, et en utilisant des moulins à 5 cylindres pour donner une mouture à 5 fractions différentes du malt : enveloppes, gros gruaux, petits gruaux, farine et fine farine. Cette étape demeure importante car une mouture trop fine ne permettrait pas une bonne filtration, une mouture trop grossière diminuerait le rendement .

- **Brassage** : Le but du brassage est de solubiliser la totalité de l'amidon et des sucres présents dans le malt. Après avoir mélangé le malt broyé dans de l'eau chaude, avec l'ajout de grains d'orge, on obtient le brassin ou maîsche. Pour favoriser les hydrolyses des enzymes, le maîsche est progressivement chauffé (jusqu'à 76°C) : c'est l'étape de

la saccharification qui permet d'obtenir des sucres simples : glucose et maltose.

- **Filtration du Maîsche** : Consiste à séparer le moût des écorces ou drêches et des parties d'amande non solubilisées en extrayant le maximum de matières premières dissoutes.

L'objectif attendu par cette opération est d'avoir un moût avec une faible turbidité.

- **Cuisson et houblonnage** : Le moût filtré est transvasé dans une cuve où il est porté à l'ébullition (100°C) pendant 90 minutes. On ajoute le houblon afin de donner à la bière son goût amer et ses arômes.

- **Clarification et refroidissement** : Pour obtenir un moût libéré du trouble, du houblon et des substances non dissoutes, le moût sorti de la cuve d'ébullition est pompé dans un bac tourbillonnaire appelé Whirlpool.

- **Fermentation** : A pour but la transformation des sucres fermentescibles en alcool avec un dégagement de CO_2 ainsi qu'une petite quantité d'énergie.

$$C_6H_{12}O_6 + \text{LEVURES} \rightarrow 2\,C_2H_5OH + 2CO_2 + H_2O \text{ ENERGIE}$$

- **Maturation/Garde**: C'est une étape de maturation pendant laquelle la bière subit dans les tanks fermés une seconde fermentation qui lui permet de s'affiner et de s'équilibrer : sucres et levures continuent de réagir, tout en produisant du gaz carbonique et la bière prend tous ses arômes.

- **Filtration** : C'est l'opération qui est nécessaire pour éliminer la levure et les particules colloïdales et pour donner à la bière la limpidité et la brillance recherchées. Après la filtration, la saturation avec du CO_2 se fait au moyen d'appareils appelés : saturateurs.

- **Conditionnement** : Une fois les bouteilles lavées (avec la soude, l'eau adoucie et l'eau de Javel) et inspectées, celles -ci doivent être remplies sans qu'il y ait de contact entre la bière et l'air ambiant (l'oxygène et les micro-organismes ambiants sont nocifs pour la bière). Ainsi les bouteilles sont remplies par du gaz carbonique

Rapport-Gratuit.com

puis par de la bière. En sortie de la soutireuse, le travail consiste à faire mousser la bière (pour que le volume du goulot soit occupé par de la mousse) par l'intermédiaire d'un fin jet d'eau. Ensuite la bouteille est encapsulée, pasteurisée pour être étiquetée et emballée.

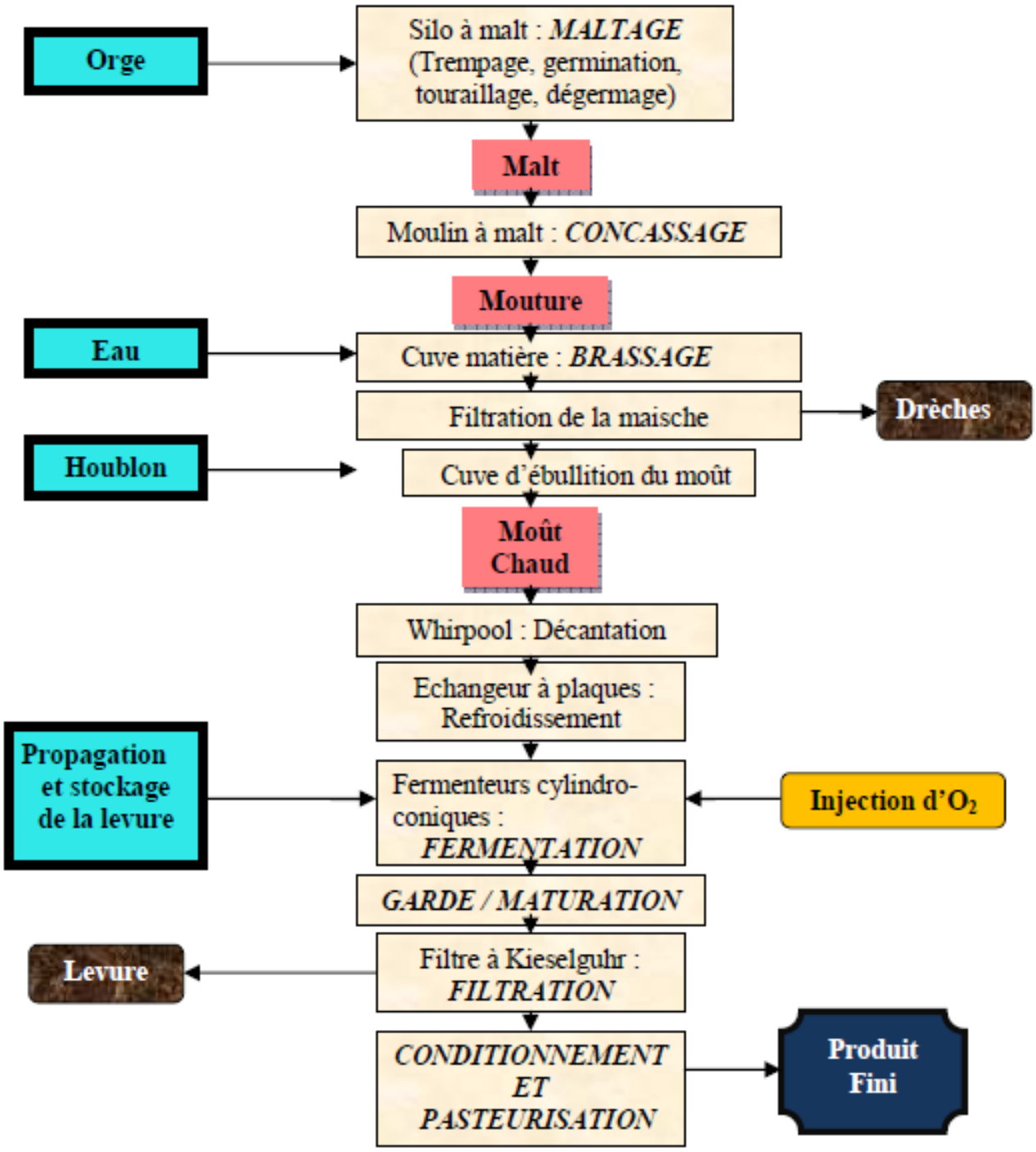

Figure3 :Diagramme de la fabrication de la bière

◎Deuxième partie:

Effet des conditions de la fermentation sur la formation du diacétyle

I. Définition :

Le diacétyle est une cétone de formule $C_4H_6O_2$ (*Figure 4):* Liquide jaune verdâtre dégageant une odeur de beurre rance ou légèrement chlorée lorsqu'elle est sous forme de vapeur. Produit secondaire de la fermentation.

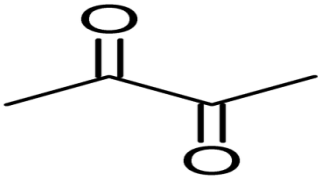

Figure4 *: Diacétyle*

Tableau 2 : Caractéristiques physicochimiques du diacétyle

Nom systématique	*2,3-butanedione*
Autres Noms	*Diacétyle, Butadione*
Formule moléculaire	$C_4H_6O_2$
Masse molaire	*86.09 g/mol*
Aspect	*Liquide*
Propriétés	
Point de fusion	*-2 à -4*°C
Point d'ébullition	*88*°C

1) Diacétyle dans la bière :

Le Diacétyle peut être le résultat d'une fermentation anormale mais aussi celui d'une contamination bactérienne. Il est produit au début de la fermentation par les levures et transformé en 2-3 butanediol et acétoine (Figure: 5) pendant la maturation et la garde.Si les levures sont mal réactivées et le moût peu oxygéné, on risque de provoquer une production importante du diacétyle avant même que la fermentation primaire ne se fasse.

Dans ce cas il y a plus de diacétyle que les levures ne peuvent le consommer (à la fin de la fermentation avant la transformation à la garde).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

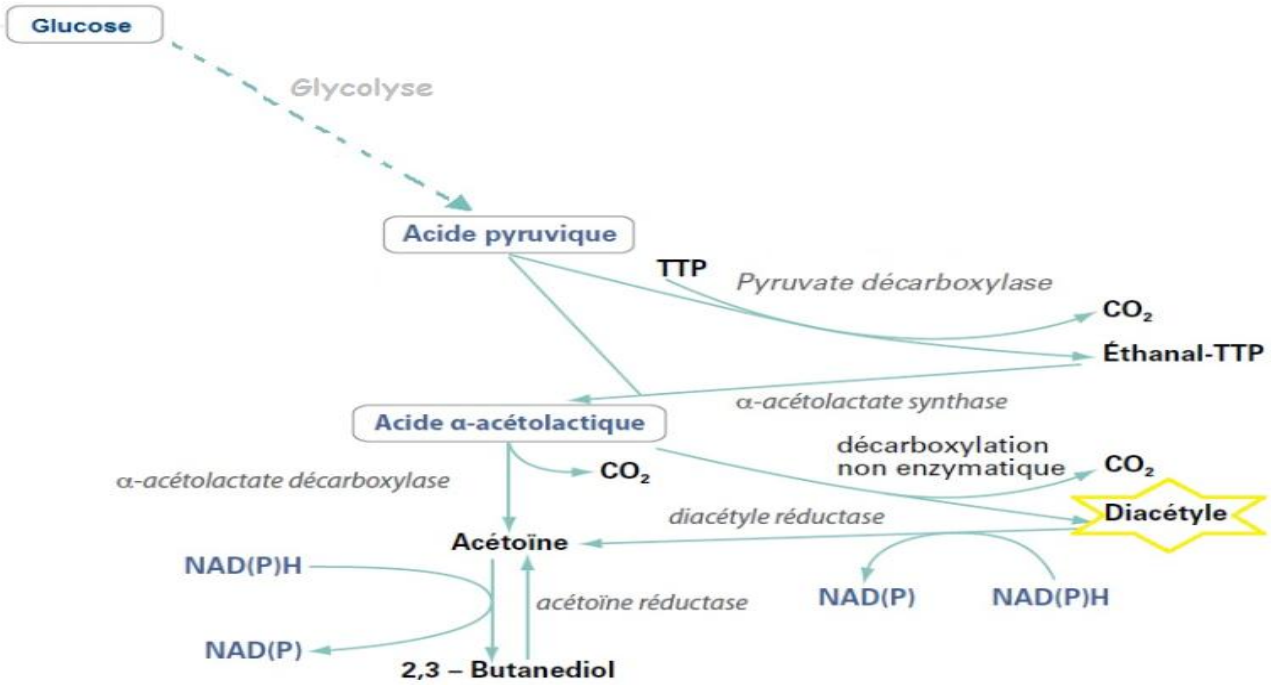

***Figure 5* : Voies métaboliques de la formation du diacétyle dans la bière**

2) Apparition du diacétyle au cours de la fermentation :

Durant la fermentation de la bière, les glucides sont la principale source carbonée des levures. Ils sont dégradés par la voie de la glycolyse et aboutissent à la formation de pyruvate.

- Le pyruvate peut subir différentes transformations :

• il peut être dirigé vers le cycle de Krebs,

• il peut être dégradé en éthanol et en dioxyde de carbone,

• être dégradé en α-acétohydroxyacides(α-acétohydroxybutyrate et α-acétolactate)

L' α-acétolactate est exctrété par la levure, après quoi une décarboxylation oxydative non enzymatique le transforme en diacétyle. En parallèle, dans la voie biosynthètique de l'isoleucine, la 2,3-pentanedione est transformée hors de la cellule à partir de l'intermédiaire α-acétohydroxybutyrate, selon une réaction non enzymatique similaire de décarboxylation. Les celulles de levures ne peuvent pas assimiler les acétohydroxyacides extracellulaires, mais elles peuvent absorber le diacétyle et la 2,3-pentadione qui subissent une conversion enzymatique, respectivement, en acétoine et en 3-hydroxy-α-pentanone. L'acétoine est encore convertie, par voie enzymatique, en 2,3-pentanediol, comme on peut le voir sur la figure : 6.

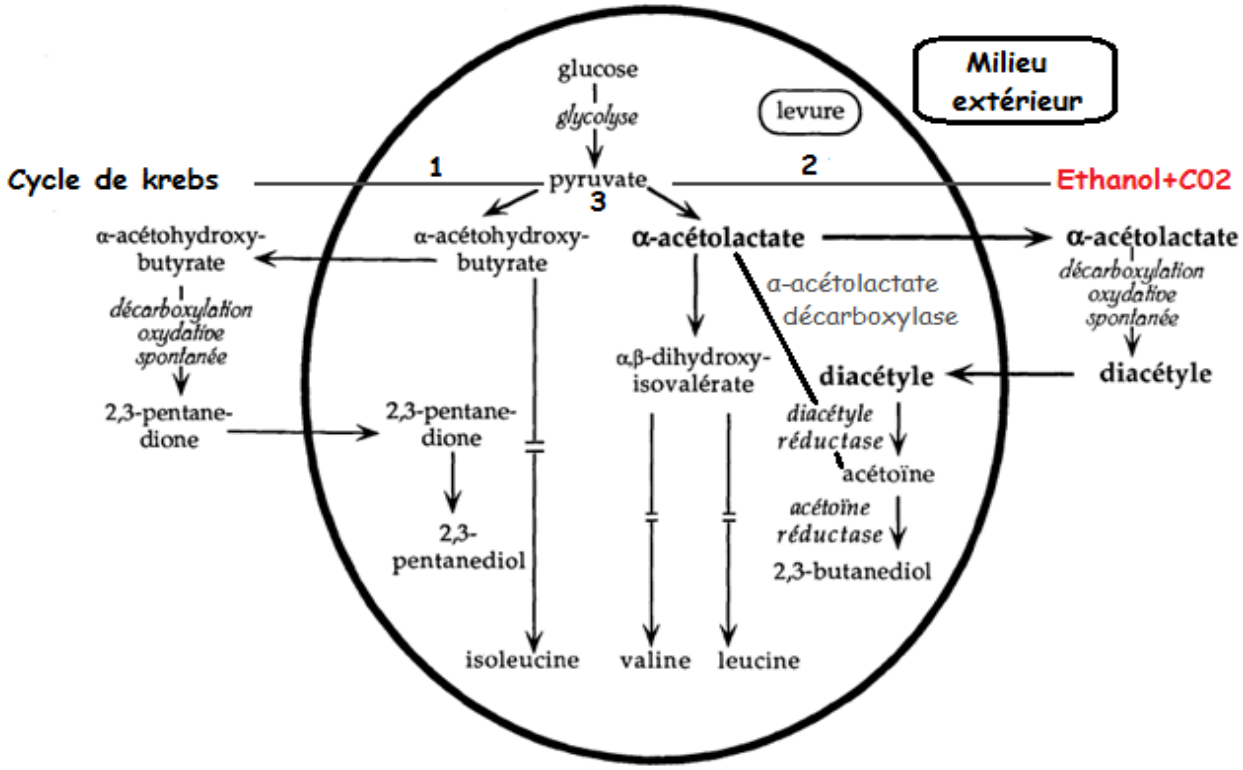

Figure 6 : Métabolisme de la levure et formation du diacétyle

II. Méthodes de dosage du diacétyle :

Il existe plusieurs méthodes de dosage du diacétyle :

- Méthode gravimétrique de kunze.
- Méthodes de PIEN et AL.
- Méthode de VOGES-PROSKAUER.

→ La plus utilisée est la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).

1) *Chromatographie en phase gazeuse : (C.P.G)*

Le mode opératoire de cette methode est détaillé dans l'annexe.

- Le principe de la séparation par C.P.G. consiste à partager l'échantillon à analyser entre deux phases :
- L'une de ces phases est un liquide stationnaire uniformément réparti sous forme d'une pellicule mince sur un solide inerte de grande surface spécifique, tandis que l'autre phase est un gaz mobile qui s'écoule à travers l'ensemble stationnaire.

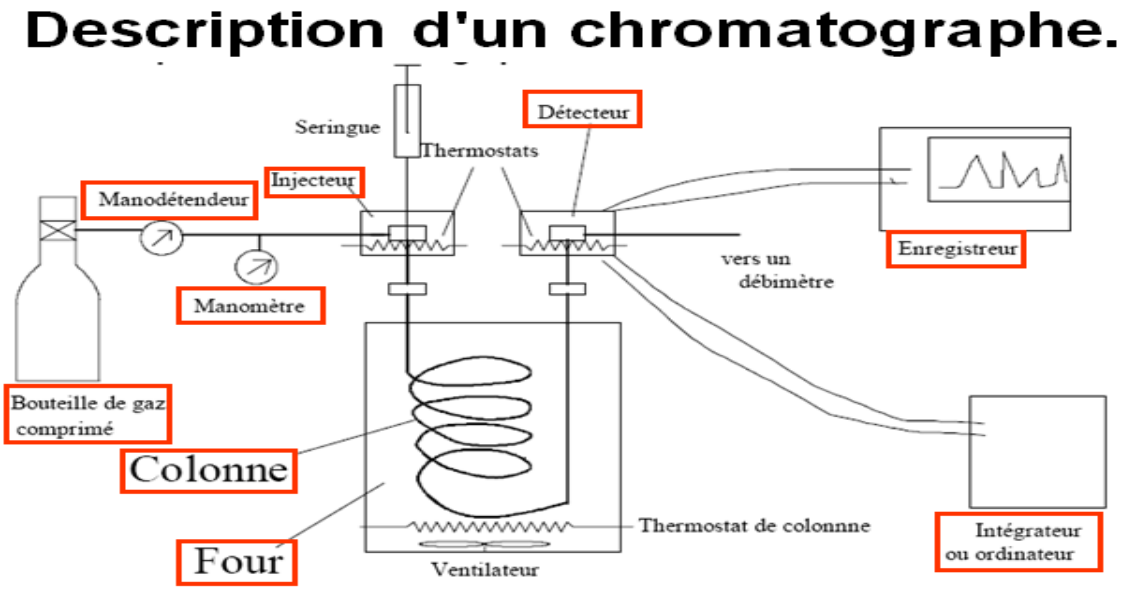

Figure 7: Chromatographe

➢ Un chromatographe (Figure 7) est constitué en première approximation de trois organes essentiels: l'injecteur, le détecteur, et la colonne.

✦ ***Injecteur*** :

- L'**injecteur** est logé dans un bloc métallique dont la température est régulée afin d'assurer une bonne homogénéité thermique du système. L'échantillon va être introduit, à travers une pastille auto-obturante appelée septum, par l'intermédiaire d'une micro seringue. L'échantillon sera vaporisé et les solutés traverseront l'injecteur à travers un tube en verre (parfois métallique) appelé liner (ou insert), grâce au gaz porteur (hélium, hydrogène, azote), jusqu'à la tête de la colonne.

✦ ***Détecteur :***

- Il permet de mettre en évidence le passage des différents gaz séparés par la colonne.
- La détection peut être basée sur des techniques de mesures différentes.
- Les détecteurs les plus utilisés :

→ **FID** : détecteur à ionisation de flamme : une tension de l'ordre de la centaine de volts est maintenue entre la buse de la flamme et une électrode entourant cette dernière. Lorsque les molécules traversent la flamme, elles sont ionisées ce qui provoque entre les électrodes un courant électrique qui est ensuite amplifié : Esters (Composés organiques)

→ **ECD :** détecteur à absorption électronique : des électrons sont émis, en général par une source radioactive (rayonnement bêta), et traversent le gaz : lorsqu'un électron

rencontre une molécule de gaz, il peut être capturé, ce qui fait varier l'intensité du courant d'électrons. Cette intensité étant mesurée en continu ⇨ Diacétyle (Composés halogènes).

✦ Colonne :

La colonne est placée dans un four pour maintenir une température suffisante afin de garder les solutés en phase gazeuse pendant l'analyse.

La colonne est constituée d'un tube plus ou moins long (qui peut être en silice, acier inoxydable...) garni d'un support solide inerte (comme par exemple un zéolite) et en particules assez fines. Ce support est imprégné chimiquement d'un produit appelé phase stationnaire dont l'affinité avec les composants du produit à analyser est la plus grande.

RESULTATS

*Résultats du suivi de la concentration du diacétyle au cours de la fermentation par C.P.G :

Les résultats du suivi de la concentration du diacétyle au cours de la fermentation par la C.P.G sont donnés par les figures (8,9) et tableaux (3,4) :

***Tableau 3* : Concentration du diacétyle en fonction du temps, température, et de densité dans la Cuve10**

Nombre de jours	Concentration du diacétyle en (µg/L)	Température (C°)	Densité(°P)
1	--	9	14
2	5,6	10	13,95
3	30,84	11	11,86
4	20	11,2	9,84
5	17,97	12	7,5
6	60	12,5	5,5
7	40,5	13	4
8	90,32	13,5	3
9	70,45	14,5	3
10	51,88	15	2,99
11	46	15	2,95
12	22,85	15	2,8
13	17,3	15	2,4
14	16	15	2,4
15	15,1	15	2,4
16	15	4	2,4
17	14,97	1,4	2,4
18	14,65	0	2,4
19	14,4	0	2,4
20	14,2	0	2,4
21	14	0	2,4

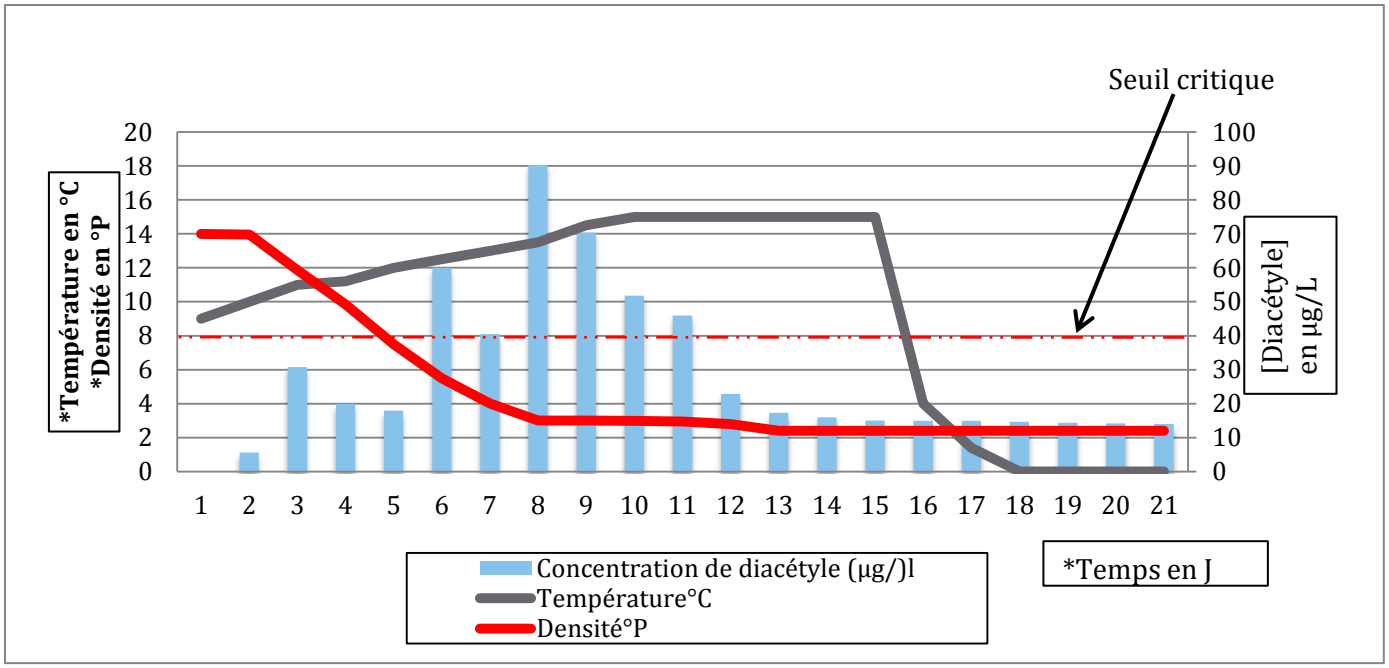

Figure 8: Suivi de la concentration de diacétyle au cours de la fermentation en fonction du temps/densité/température

***Tableau 3* : Concentration du diacétyle en fonction du temps, température, et de densité dans la Cuve10**

Nombre de jours	Concentration de diacétyle en (µg/L)	Température(C°)	Densité(°P)
1	--	9	14
2	--	10	13,95
3	8,3	11	11
4	30,3	11,2	9,84
5	22	12	7,5
6	50,8	12,5	5,5
7	42,1	13	4
8	100	13,5	3
9	80	14,5	3
10	71,1	15	2,99
11	60	15	2,95
12	47	15	2,8
13	28	15	2,4
14	20	15	2,4
15	17,5	15	2,4
16	16,89	4	2,4
17	16,52	1,4	2,4
18	16,4	0	2,4
19	15,99	0	2,4
20	15,67	0	2,4
21	15	0	2,4

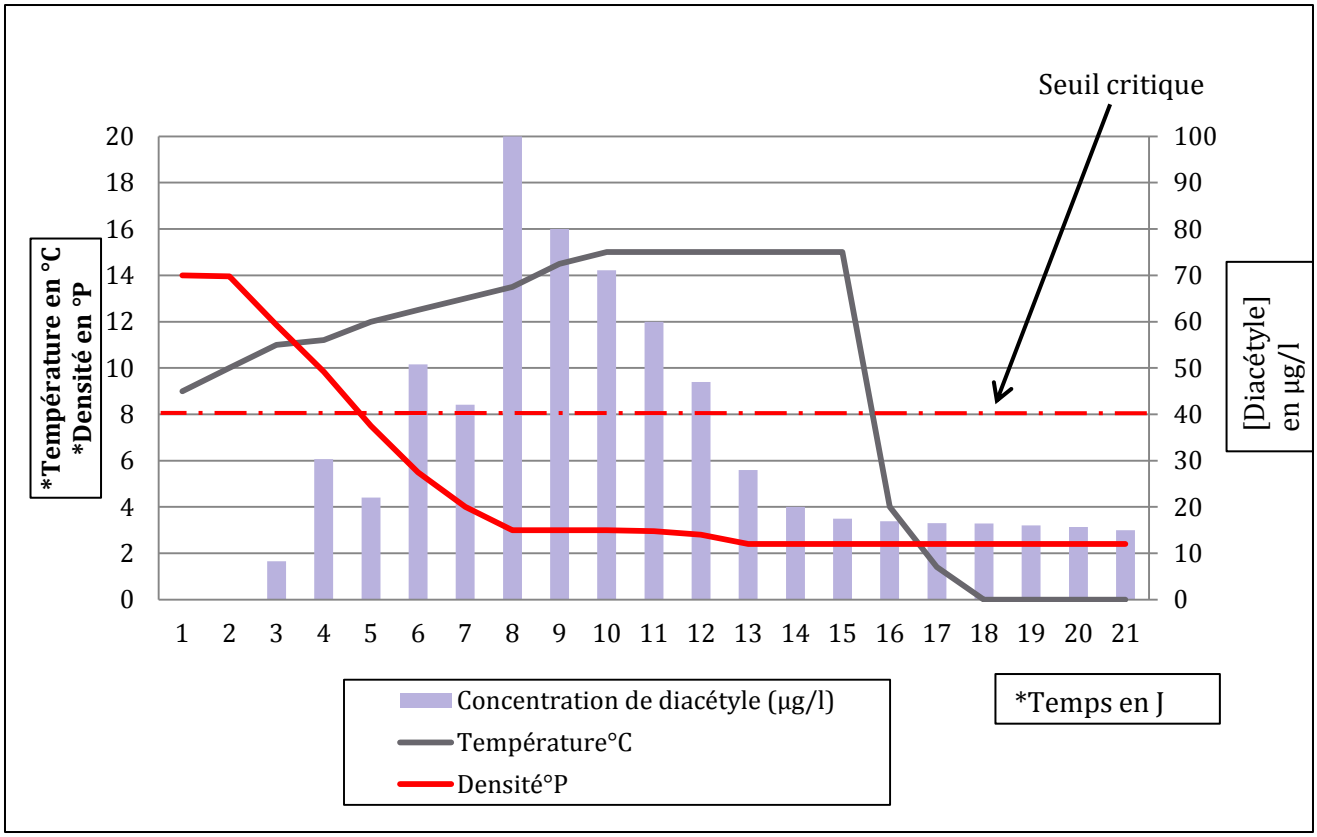

Figure 9: Suivi de la concentration de diacétyle au cours de la fermentation en fonction du temps/densité/température

*Interprétation et discussion des résultats :

- **Tableau 3 et figure 8 :**

Au début : on a une température d'entrée du moût de (9°C) avec une densité de (14°P).

→ Dans cette zone, on a absence de production du diacétyle, puisque la fermentation n'a pas encore démarrée.

Dans le 3ème jour : on remarque une intersection entre la température et la densité à (11°C/11°P) avec une concentration du diacétyle de (30,84 µg/L).

→ A partir de ce jour, on observe une augmentation de la température avec une chute excessive de la densité, expliquée par le fait de la dégradation des sucres fermentescibles, leur consommation par les cellules de la levure,et par la production d'alcool, CO_2, énergie, et une petite quantité des sous-produits d'où la présence du diacétyle.

A partir du 3ème J → 8ème J : la température passe à (13,5°C), la densité montre une chute jusqu'à (3°P), et la concentration du diacétyle varie de (30,84 µg/L→90,32 µg/L).

→ Ceci traduit que les sucres fermentescibles sont consommés, avec une activité maximale de la levure : ce qui provoque une production élevée du diacétyle

((max toléré) = 90,32 µg/L).

Du 8ème → 15ème J : on a une température de (13,5°C à 15°C), la densité passe de(3°P à 2,4°P), et une concentration du diacétyle qui diminue de (90,32 µg/L à 15,1 µg/L).

→ Cette zone est une étape intermédiaire entre la fermentation et la garde caractérisée par une longue durée de séjour à une température de (15°C) et une densité de(2,3°P) , ce qui favorise les réactions chimiques dans le milieu, ainsi la débute de la dégradation de la concentration de diacétyle de (90,32 µg/L jusqu'à 15,1 µg/L).

15ème →21ème J : on a une chute de température de (15°C à 0°C), la densité reste stable à (2,4°P), et une concentration du diacétyle de (15,1 µg/L à 14 µg/L).

→ On remarque une stabilité de densité d'où la nécessité de l'ouverture de froid a fin de préparer la cuve à la phase de garde pour d'éliminer la levure.

- **<u>Tableau 4 et figure 9 :</u>**

Au début : on a une température d'entrée du mout de (9°C) avec une densité de (14°P).

→ Dans cette zone on a absence de production du diacétyle, puisque la fermentation n'a pas encore démarrée.

Dans le 3ème jour : on remarque qu'à l'intersection entre la température et la densité à (11°C/11°P) , la concentration du diacétyle est de (8,3 µg/L).

→ A partir de ce jour, on observe une augmentation de la température avec une chute excessive de la densité, expliquer par le faite de dégradation des sucres fermentescibles, et la consommation des cellules de la levure, par la production d'alcool, CO_2, énergie, et une petite quantité des sous produit d'où la présence du diacétyle.

A partir du 3ème jour au 8ème jour : la température passe à(13,5°C), la densité montre une chute jusqu'à 3°P, et une variation de la concentration du diacétyle de (8,3 µg/L à 100µg/L).

→ Ceci traduit que les sucre fermentescibles sont consommés, avec une activité maximal de la levure →ce qui provoque une production élevée de la concentration du diacétyle (max=100 µg/L).

De 8ème au 15ème jour : on a une température de (13,5°C à 15°C), la densité de(3°P à 2,4°P) et une concentration du diacétyle qui diminue de (100 µg/L à 17,5 µg/L).

→ Cette zone est une étape intermédiaire entre la fermentation et la garde caractérisée par une longue durée de séjour à une température de 15°C et une densité de 2,3°P , ce qui favorise les réactions chimiques dans le milieu, ainsi que la dégradation du diacétyle (diminution de la concentration du diacétyle de 100 µg/L à 17,5 µg/L).

Du 15ème au 21ème jour : on a une chute de température de (15°C à 0°C), la densité reste stable à (2,4°P), et la concentration du diacétyle passe de (17,5 µg/L à 15 µg/L).

→ On remarque une stabilité de la densité d'où la nécessité de refroidissement afin de préparer la cuve à la phase de garde pour éliminer les levures.

Rapport-Gratuit.com

Discussion :

Le premier pic (figures : 8 et 9) de la concentration en diacétyle apparait normalement tôt lors du déroulement de la fermentation classique. La concentration en diacétyle est ensuite réduite quand la levure assimile le diacétyle et le convertit par voie enzymatique en acétoine, qui à son tour est ensuite métabolisée. En particulier, on pense que le diacétyle est un sous-produit de la biosynthèse des acides aminés impliquant une relation entre la biosynthèse des acides aminés et la formation d'acétolactate, le précurseur du diacétyle.

Le 2ème pic (figures : 8 et 9) quand la concentration est élevée du diacétyle expliquée par la diminution des sucres fermentescibles et une activité maximale de la levure, d'où une concentration en diacétyle proportionnelle à la multiplication de la levure et à la dégradation des sucres fermentescibles (production associée à la croissance) .

Cependant, des problèmes surviennent quand des fluctuations métaboliques continuelles conduisent à une production par fermentation tardive de diacétyle en des quantités qui créent un 3ème pic (figures : 8 et 9) qui peut être dû à la présence d'une concentration élevée en diacétyle dans le mout de bière.

Les taux du diacétyle plus élevés résultant d'une production par fermentation tardive ne peuvent pas être réduits en dessous de son seuil gustatif dans le temps imparti.

La concentration totale en diacétyle dans le mout de la bière à un temps donné pendant et après la fermentation résulte de la combinaison de la vitesse de formation du α-acétolactate, de sa vitesse de conversion, et de la vitesse de réduction du diacétyle en 2,3-butanediol et en acétoine. Toute latence de concentration élevée en diacétyle résultant d'une production par fermentation tardive ne peut être réduite avant que la bière subisse un traitement supplémentaire, ce qui peut nécessiter une maturation prolongée ou d'autres traitements ou mesures de correction pour amener la concentration finale en diacétyle à l'intérieur de la spécification cible du produit final souhaité (la Norme : [0-40]).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

III. Facteurs influençant la formation du diacétyle :

Les facteurs qui influencent la formation du diacétyle sont :

- La contamination bactérienne
- La composition du moût, en particulier la concentration en valine, isoleucine et leucine
- l'oxygène
- La temperature

1. *Contamination bactérienne :*

Une contamination est due à la présence d'un grand nombre de bactéries ou de levures sauvages, elle résulte le plus fréquemment d'un manque d'hygiène pendant la préparation du moût.

Une bière contaminée ne présente **aucun danger létal** pour le consommateur, au pire, celui-ci s'en tirera avec quelques désagréments intestinaux momentanés. De part son pH élevé, la présence d'acide du houblon qui sont des bactériostatiques naturels, et l'absence d'oxygène dès le démarrage de la fermentation, la bière est relativement peu colonisable par les bactéries, et on dénombre cependant quelques unes.

- **Lactobacillus**
  Goût acide prononcé, atténuation anormalement élevée de la bière, parfois voile sur la surface et/ou augmentation de la viscosité.
- **Pédiocoques**
  Odeur de beurre rance hors fermentation (Diacétyle), acidité, viscosité.

2. *Composition du moût, en particulier la concentration en valine, isoleucine et leucine:* *(référence 1)*

La voie de synthèse de diacétyle est intimement liée à la voie de synthèse des acides aminés. Ainsi la teneur en acides aminés libres dans le mout va influencer la quantité de diacétyle non réduite.

La nature d'acide aminé joue également un rôle, notamment la valine et l'isoleucine, vu que l'α-acétolactate et α-acétohydroxybutyrate (principaux précurseurs de dicétone vicinale) sont des métabolites intermédiaires de la voie de synthèse de valine et d'isoleucine.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

3. ***Oxygène :*** *(référence 4)*

L'oxygène assure une bonne multiplication des cellules. L'oxygénation se fait soit en faisant déborder et éclabousser le moût contre les parois du fermenteur, soit par aération du moût au cours du refroidissement, soit par injection directe d'air stérile dans le moût. A cette étape, l'hygiène est primordiale car l'aération peut entraîner le développement de bactéries.

L'oxygénation se fait dans les 12 premières heures de la fermentation (12 ppm). Aération du moût augmente les niveaux d'aldéhyde et favorise la formation de diacétyle.

4. ***La température :*** *(référence 4)*

La température est un facteur clé du succès de la fermentation. La température recommandée pour chaque souche (mentionnée sur l'emballage ou la feuille de spécifications) doit être respectée. Plus la température est élevée, plus vite la fermentation se déroulera. La fermentation à des températures plus élevées augmente la formation de diacetyle et d'esters. Pour permettre la réabsorption du diacetyle il est nécessaire d'augmenter la température en fin de fermentation. Enfin, pour permettre une bonne floculation de la levure, il est recommandé de refroidir la bière en fin de fermentation.

IV. Solutions proposées :

Actuellement, pour éviter le diacétyle, on propose la limitation de l'étape de la garde ce qui peut aboutir à la réduction de la teneur en diacétyle.

Des solutions ont donc été cherchées par les brasseurs pour éviter ou minimiser la formation de diacétyle afin d'accélérer la garde.

1. Contrôle du taux d'oxygène pendant la fermentation principale :

Il semble qu'un contrôle du niveau d'oxygène pendant la fermentation principale peut être un outil pour éviter l'apparition de diacétyle.

2. Fermentation sous pression :

Une fermentation sous pression permettrait de réduire la formation d’acétolactate et aboutirait à une réduction plus rapide du diacétyle (10 jours).

3. Intégration de l'enzyme α-acétolactate décarboxylase : (référence6)

L' α-acétolactate décarboxylase (α-ALDC) est une enzyme qui n'est pas normalement présente dans la levure. Or, cette enzyme transforme l' α-acétolactate directement en acétoïne.

Plusieurs études ont montré que l'ajout d'α-acétolactate décarboxylase dans le moût en début de fermentation permettait d'éviter la formation de diacétyle.

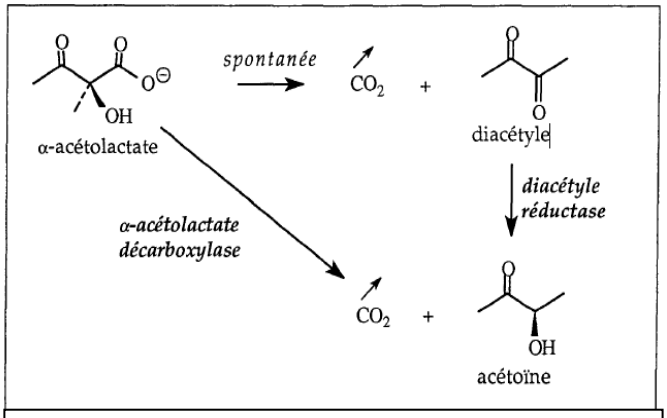

Figure 10 *: Réaction catalysée par l'α-acétolactate décarboxylase*

4. Ajout des acides aminés :

L'ajout d'acides aminés modifie la régulation enzymatique de la voie biosynthétique de l'isoleucine-valine pour atténuer les problèmes liés au diacétyle. Il a généralement été trouvé que les taux de diacétyle et du 2,3-pentanedione tout au long de la fermentation étaient associés aux concentrations initiales des acides aminés libres.

Cependant, seul l'ajout de valine au mout de bière réduit de manière conséquente la quantité de diacétyle tout au long de la fermentation , aucun autre ajout d'acides aminés dans le mout de bière n'a eu le même effet. L'ajout d'isoleucine augmente le diacétyle et /ou le α-acétolactate, mais supprime le 2,3-pentanedione.

5. Gestion du temps / Température :

La gestion du temps de maturation et/ou de l'accroissement de la température sont des procédés destinés à réduire le taux de diacétyle. Un procédé de traitement thermique pendant l'étape primaire de fermentation anaérobie peut ralentir le procédé de maturation puisque la condition anaérobie permet de convertir l'α-acétolactate directement en acétoine.

Conclusion

La présence de cette fameuse cétone dans la bière à une certaine concentration, dégage une odeur de beurre rance ou légèrement chlorée lorsqu'elle est sous forme de vapeur, ce qui peut nuire à la qualité organoleptique de cette boisson d'où était l'objectif de mon travail de faire un suivi de ce paramètre.

En étudiant les différents facteurs responsables de la formation du diacétyle, on a pu proposer quelques solutions afin d'éviter une augmentation de sa concentration dans la bière.

C'était un stage au cours duquel j'ai acquis plusieurs connaissances , surtout sur le procédé de la fabrication de la bière qui a été pour moi un mystère. Il m'a permis de mettre mes connaissances théoriques à l'épreuve pratique afin de faire une comparaison entre les deux et particulièrement dans la phase de la fermentation qui comprend une multitude de réactions du métabolisme qui aboutissent à la formation du diacétyle.

En résumé, le stage dans une telle société était une grande opportunité qui, à travers ses secteurs d'activités permet de réussir à faire le lien entre la pratique et la théorie acquise pendant les études universitaires.

Références bibliographiques

* ***Pour les articles :***

1. **Kristoffer Krogerus & Brian R. Gibson.** (2013). Influence of valine and other amino acids on total diacetyl and 2,3-pentanedione levels during fermentation of brewer's wort.
2. **P.VOSSWINKEL**.(2006).Méthodes, procédés et compositions de mout associes à une évolution de dicétone vicinale et en particulier à une formation de diacétyle dans le brassage de la bière.
3. **Arthur Constant Zebre, Rose Koffi-Nevry, Marina Koussémon, Koné Yacouba Celah Kakou.**(2011). Effet du nombre de recyclages de la biomasse de Saccharomyces uvarum sur quelques paramètres de la fermentation primaire au cours de la production de la bière.
4. **N Bassit, E Latrille, CY Boquien, D Picque, G Corrieu.**(1994). Effet combiné de l'oxygène et de la température sur l'acidification et les productions de diacétyle et d'acétoine par Lactococcus lactis subsp lactis biovardiacetylactis.
5. **Arthur Constant Zebre, Rose Koffi-Nevry, Marina Koussémon, Koné Yacouba Celah Kakou.**(2011).Effet du nombre de recyclages de la biomasse de *Saccharomyces uvarum* sur quelques paramètres de la fermentation primaire au cours de la production de la bière en Côte d'Ivoire.

Pour les thèses :

6. **Claire DULIEU, née PÉROLS**.(1998). Encapsulation d' acétolactate décarboxylase. Application à la brasserie.Thèse de Doctorat, Spécialité : Biotechnologies et Industries alimentaires. Institut National Polytechnique de Lorraine,École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires.
7. **CélineLEITAO.**(2011).L'étude de composés à interets technologique et fonctionnel dans la bière .Thèse de Doctorat,Spécialité : Chimie analytique. Université de Starsbourg.

Annexe

Mode opératoire de la C.P.G : (Chromatographie en phase gaseuze)

Etendu :

La détermination du diacétyle et les autres sous-produits (DMS,ESTER,ALCOOLS SUP...) dans le « headspace » du produit semi fini et fini par la C.P.G.

Champ d'application :

Cette méthode peut etre appliquée à toutes les bières pour lesquelles le pourcentage d'éthanol est 5%(v /v) environ. Les autres bières devraient être ajustées à 5%(v/v) d'éthanol environ.

Principe :

Après équilibration de la bière à une température prédéterminée (40°C), une partie du « headspace » est injectée dans la C.P.G.

Pour le calcul des concentrations un standard interne est ajouté aux échantillons de la bière.

Intégration :

L'intégration localise les pics dans un signal et calcul leur taille. C'est une étape nécessaire pour la quantification. Lorsqu'un « signalest » est intégré, le signal :

- Identifie un temps de début et fin pour chaque pic et marque ces points avec des graduations verticales.
- Trouve le sommet de chaque pic, c.à.d. le temps de rétention/migration.
- Construit une ligne de basse.
- Calcul l'air, la hauteur et la largeur pou chaque pic.

Ce processus est contrôlé par des paramètres appelés événements d'intégration.

Le ¨ chemStation ¨ possède deux algorithmes d'intégration :

- L'algorithme d'intégration traditionnel.

- L’algorithme d’intégration amélioré.

Méthodes :

Une méthode comprend tous les paramètres nécessaires pour l’acquisition et l’analyse des données. Une méthode est identifiée par un nom contenant un maximum de huit caractères alphanumérique. Le nom du fichier est toujours suivi de l’extension M pour l’identifier comme une méthode.

Séquence :

Une séquence est une suite d’instuctions destinées à automatiser l’analyse des échantillons.

Vous pouvez utiliser une séquence pour injecter manuellement chaque échantillon, acquérir et analyser les données d’après la méthode que vous avez spécifiée pour cet échantillon. Chaque flacon d’échantillon dans une séquence peut etre analysé avec une méthode analytique différente, et donc utiliser différentes combinaisons de conditions chromatographiques.

Appareils et Gaz :

Une chromatographie en phase gazeuse dérie 6890 équipée de :

- La colonne DB-5.125-505j, montée au « frond » du C.P.G.
  L=50m, Diamètre int=0.53mm, T°limites= -60 à 300°C(320°Cmax) pour l’analyse du Diacétyle et Pentanedione.
- La colonne DB-WAX.125-7062, montée au « Back »du C.P.G.
  L=60m, Diamètre int=0.53mm, T°limites=20 à 230°C (240°Cmax) pour l’analyse des esters, alcools, acétaldéhyde et DMS.
- Bain marie réglé à 40°C.
- Centrifugeuse.
- Hydrogène pureté=99.99.
- Azote pureté=99.99.
- Air synthétique.

Verrerie :

- Bouteilles d’infusion de 300mL. Eprouvette de 250mL.

- Pipette jaugées de 2mL, 5mL et 25mL.
- Seringue pour gaz/liq de 250µL et 1mL.
- Fiole de 50mL, 100mL, 200mL et 250mL.
- Béchers en plastiques de 500mL.

1. Solution standard mère de l'hexanedione : « A »

150µL 2,3-hexanedione dans 100mL d'éthanol.

Préparation :

- Verser approximativement 90mL d'éthanol froid à 0°C dans une fiole de 100mL.
- Placer la fiole dans un bécher contenant de l'eau froide.
- Ajouter 150µL 2,3-hexanedione en utilisant une seringue de 250µL.
- Compléter à 100mL à 0°C avec de l'éthanol à 0°C.
- Noter sur la fiole la date de préparation et S.I mère diac.(S.I :standard interne).

→ **Stabilité :**1 semaine dans un réfrigérateur.

2. Solution standard interne fille : « B »

2mL de la solution standard mère « A » dans 200ml d'ethanol à 5%(V/V).

Préparation :

- Préparer 200mL d'une solution éthanol/eau à 5%(V/V) à 0°C(éthanol, eau à 0°C).
- Verser environ 50mL à 0°C d'éthanol/eau à 5 %(V/V) dans une fiole de 200mL.
- Pipeter dans la fiole 2mL de la solution standard mère à 0°C.
- Compléter à200mL avec la solution d'éthanol/eau à 5%(V/V) à 0°C et mélanger.
- Noter sur la fiole la date de préparation et S.I fille diac..(S.I :standard interne).

→ **Stabilité :**1 semaine dans un réfrigérateur.

3. Solution standart mère de 4-heptanon et n-butanol : « C »

3mL 4-heptanon et 30mL de n-butanol dans 100mL d'éthanol à 50%(V/V).

Préparation :

- Verser 50mL d'éthanol froid (0°C) dans une fiole de 100mL.
- Placer la fiole fans l'eau à 0°C.
- Pipeter 3mL 4-heptanon et 30mL de n-butanol dans la fiole.
- Compléter à 0°C avec de l'eau distillée à 0°C.

- Noter sur la fiole la date de préparation de S.I mère.(S.I :standard interne).

→ **Stabilité :**1 mois dans un réfrigérateur.

4. Solution standard interne fille : « D »

5mL de la solution mère de 4-heptanon et n-butanol « C » dans 250mL d'éthanol à 5%(V/V).

Préparation :

- Verser 10mL d'éthanol froid (0°C) et environ 100mL de l'eau distillée dans une fiole de 250mL.
- Pipeter 5mL de la solution mère de 4-heptanon et n-butanol dans la fiole.
- Compléter à 250mL de l'eau distillé à 0°C et mélanger.
- Noter sur la fiole la date de préparation et S.I fille.(S.I :standard interne).

→ **Stabilité :**2 semaine dans un réfrigérateur.

Préparation des échantillons :

1. Echantillonnage :

C'est important de garder le headspeace aussi petie que possible pendant l'échatillonnage soit pour le produit fini ou produit en vrac.

2. Conservation de l'échantillon :

Le produit fini pasteurisé peu etre entreposé àà température de pièce dans le noir pour une période maximale de 4 mois.

Parce que l'analyse est faite avec la bière froide (0-10°C), et pour prévenir la formation de mousse, les échantillons sont entreposés de préférence dans le réfigérateur à l'écart des composés du calibrage. Les échantillons qui sont à température de pièce ont besoin d'etre refroidi ai moins 3 heures dans le réfrigérateur avant analyde, ou bien dans l'eau à 0°C pour approximativement 20min.

Les échantillons en vrac peuvent etre entreposés dans le réfrigérateur pour 1semaine.

❖ La procédure normale pour la préparation de l'échantillon est comme suit :

- Placer les solutions standards internes filles « B » et « D » dans un bécher contenant de l'eau froide.

Rapport-Gratuit.com

- Remplir lentement une éprouvette de 250mL avec l'échantillon de la bière à 0-10°C.
- Enlever l'excès de bière et/ou mousse en utilisant une pompe aspirante pour obtenir 250mL.
- Pipeter 2mL de la solution standard interne fille « B » et 2mL de la solution standard interne fille « D » dans une bouteille d'infusion.
- Immédiatement ajouter l'échantillon de la bière dans la bouteille d'infusion.
- Fermer et mélanger avec soin.

Dans ce chemin les échantillons sont préparés un par un. Après une série d'échantillon, chaque bouteille de l'infusion de l'infusion devrait être gardée au moins 5min sur paillasse et mise ensuite dans de réfrigérateur loin des réactifs et des solutions standards mères et de dilution.

Les échantillons préparés peuvent etre entreposés dans le réfrigérateur pour 2 jours.

Pour les échantillons de bière en garde (présence de levure) centrifuger pendant 10min à grande vitesse.

❖ **Procédure :**

✓ **Préparation des échantillons :**

- Régler de bain à 40$\pm$2°C.
- Préparer les échantillons
- Laisser environ 50mL du 250mL de l'échantillon préparé.
- Fermer et placer dans le bain marie réglé à 40$\pm$2°C.
- Placer un $\ll vinyle - couvert \gg$ autour du cou de la bouteille pour qu'elle ne flotte pas.
- Percer une aiguille jetable à travers le septum pour prévenir la surpression.
- Après 30min, Injecter environ 0.75mL du headspace.

✓ **Démarrage du C.P.G :**

En principe la C.P.G est allumé 24 /24 heures et 7/7 jours.

- Cliquer sur Start, Programs, Chemstations, Instrument 1 Online.
- Dans la fenêtre qui apparait $\ll Change\ Access\ Level \gg$ entrer le mot de passe pour le Manager ou passer à l'operator et confirmer.

✓ **Création d'une séquence :**

Cliquer sur séquence, dans le menu contextuel cliquer sur « New sequence ». OK

Cliquer sur séquence, dans le menu contextuel cliquer sur « sequence parametre »…

Sur la fenetre qui apparait, cocher prefix /conter, sur les signaux 1 et 2, enter respectivement Diac et Est et sur Subdirectory entrer la date d'analyse. Cliquer sur OK et en fin sur OK.

- ✓ **Création d'une liste d'analyse/enregistrement :**
  - Cliquer sur séquence, dans le menu contextuel cliquer sur sequence table
  - Identifier les échantillons en précision leur référence (date de production, RB,SB,Garde…)et commençant toujours par Air et bière de référence.
  - Dans Methode name, choisir DIASTE.
  - Dans inj /location, entrer pour tous les échantillons.
  - Sélectionner le tableau, cliquer sur copy, cocher Back, cliquer sur past, changer location et cliquer sur OK.
  - Cliquer sur séquence, dans le menu contextuel cliquer sur save as.
  - Nommer la séquence avec 8 caractères maximum. Cliquer sur OK.
  - Cliquer sur séquence, dans le menu contextuel save sequence.
  - Cliquer sur Start.
- ✓ **Impression :**
  - Cliquer sur séquence, dans le menu contextuel cliquer sur séquence « print ».
  - Cocher séquence « parameter et method and injection info part »
- ✓ **Injection de échantillons :**

Procéder à l'injection des échantillons en commençant avec la bouteille d'infusion qui contient de l'air ambiant, suivi par l'échantillon du référence et après les échantillons à analyser, avec un maximum de 10. Echantillon de contrôle et échantillons à analyser avec un maximum de 10, Ect…

L'air ambiant est injecté pour vérifier les composés volatils dans l'air ambiant et pour un nettoyage efficace de la seringue et des deux colonnes.

Pour une meilleure reproductibilité, toujours stocker la serinque d'injection dans une place chaude(par exemple une zone chaude sur la C.P.G) et il faut toujours vérifier si la seringue marche avant et après chaque injection.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

✓ **Analyse des données :**

- **Méthode dite ≪ $\boldsymbol{Batch}$ ≫ :**

Pendant l'exécution d'une séquence, un fichier ≪ $\boldsymbol{Batch}$ ≫ avec une extension.b est automatiquement crée etplacée dans le répertoire ≪ $\boldsymbol{Data}$ ≫ avec les fichiers de données brutes.

Au chargement du lot, l'opérateur ne choisit que la méthode à utiliser pour le batch, puis sélectionne un à un les fichiers de données à traiter dans le lot.

- **Procédure :**

- Cliquer sur Batch, ensuite sur Lood batch.
- Double clique sur Data et ensuite double clique sur la séquence, en fin double clique sur le fichier.
- Dans le tableu ≪ $set\ up\ batch$ ≫ ocher tous les Diac ou Tous les esters.
- Cliquer sur Other Method, Diacetyl ou Ester et sur OK.
- Sélectionner un à un les fichiers de données à traiter dans le lot. L'intégration est faite automatiquement.
- On peut vérifier la précision de l'étalonnage, les performances de l'instrument et les intégrations individuelles avant d'approuver les résultats.

✓ **Calibration du C.P.G :**

- **Préparation des solutions de calibration :**

  - <u>Solution mère de diacétyle :</u>

- Verser environ 90mL d'éthanol (température de chambre) dans une fiole de 100mL.
- Placer la fiole sur une balance et remettre à 0.
- Ajouter environ 850μL de diacétyle en untilisant une seringue de 1000 μL, et en l'injectant lentement dans le liquide.
- Noter le poids ajouté.
- Compléter à 100 avec de l'éthanol.

→ **Stabilité : jour de préparation+1jour dans le réfrigérateur.**

  - <u>Solution de dilution de diacétyle :</u>

- Verser environ 45mL d'éthanol(température de la chambre) dans une fiole de 50mL.
- Ajouter 2mL de solution mère de diacétyle.
- Compléter à 50mL avec l'éthanol.

→ **Stabilité : jour de préparation**