

Thèse

Thèse

Présentée par

Céline LEITAO

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Spécialité

Chimie analytique

Etude de composés à intérêts technologique et fonctionnel dans la bière

Soutenue le 28 mars 2011 devant la commission d'examen

**Pr. Eric MARCHIONI
Dr. Saïd ENNAHAR
Pr. Henri PORTUGAL
Pr. Miguel de la GUARDIA
Pr. Jean-Marc JELTSCH
Dr. Luc DIDIERJEAN**

**Directeur de thèse
Directeur de thèse
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Examineur
Examineur**

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'Equipe de Chimie Analytique des Molécules Bioactives, UMR 7178, Département des Sciences Analytiques de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC) sous la direction du Pr. Eric Marchioni et du Dr. Saïd Ennahar, mes deux directeurs de thèse, et en partenariat, par une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE), avec les Brasseries Kronenbourg sous la direction du Dr. Luc Didierjean. Merci à vous trois pour m'avoir guidée dans le monde de la chimie analytique et de la bière, pour votre encadrement scientifique, votre soutien dans les coups durs et vos conseils toujours avisés.

Je remercie également les Pr. Henri Portugal, Miguel de la Guardia et Jean-Marc Jeltsch d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Martine Bergaentzlé et Françoise Bindler pour leurs conseils et les longues discussions tant scientifiques que personnelles que nous avons pu avoir ensemble... Merci aussi à Minjie pour sa disponibilité et pour tout ce qu'elle m'a appris. Merci à Mimi de si bien s'occuper de nous, « qu'est-ce qu'on ferait sans toi ! ».

Merci à tous les doctorants ; les « docteurs » : Diane, Esther, Julie et Gildas, les « futurs » : Etienne, Li et Remmelt ; merci pour ton aide et bonne chance pour la suite. Merci à Michel de nous faire partager sa bonne humeur brésilienne et ses gâteaux pour le goûter. Merci à Carole et Christophe pour votre amitié, nos petites discussions sur la vie, grâce à vous, ces trois années m'ont paru un peu moins longues ; je vous souhaite beaucoup de bonheur. Merci à Omar, Eli et Erwan pour nos longues conversations « philosophiques » dans le bureau, nos crises de rire et nos petits délires ; Omar, le retour au Sénégal est proche... à très vite pour une petite visite ; Erwan, merci pour tes « sujets » de discussion, tes petites expressions et merci à ta petite famille (Julie et Margot); Eli, ma coloc' de bureau, merci pour ta précieuse aide avec les calculs, les figures..., merci d'avoir été là quand j'avais besoin de papoter et promis, tu pourras compter sur moi même à 500 km d'ici.

Je tiens à remercier sincèrement Jacques Gangloff et Jacques Gaucher pour toute leur aide au cours de mon projet, leurs réponses rapides à mes appels au secours, merci à Carole, Marc, Thérèse et toutes les autres personnes que j'oublis.

Je remercie tous mes copains de « l'Allier » pour m'avoir changé les idées quand je rentrais! Merci à Yoann et Audrey et à Manou et Aurel d'être à mes côtés depuis tout ce temps.

Merci à toute ma famille, ma sœur, mon père, mon frère, mes grands-parents, mes beaux-parents; ma Ju, bon courage pour la suite, promis je serais présente pour te changer les idées quand cela sera nécessaire ;). Merci à maman de m'avoir soutenue et sans qui tout cela n'aurait pas été possible.

Enfin, merci à Martin d'avoir traversé cette épreuve à mes côtés, pour tous les kilomètres que nous avons fait, et pour tous les kilomètres que l'on fera encore ensemble :).

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	7
CHAPITRE 1 : CONTEXTE DE L'ETUDE	11
1 PROCEDURE DE FABRICATION DE LA BIERE	12
1.1 MATIERES PREMIERES	12
1.1.1 <i>L'orge</i>	12
1.1.2 <i>Le houblon</i>	12
1.1.3 <i>L'eau</i>	14
1.1.4 <i>Les levures</i>	15
1.2 MALTAGE	15
1.3 BRASSAGE : PRODUCTION DE MOUT	16
1.4 FILTRATION ET CUISSON	16
1.5 FERMENTATION	16
1.6 GARDE, FILTRATION ET CONDITIONNEMENT	17
2 COMPOSITION ET PROPRIETES DE LA BIERE	18
2.1 LES COMPOSES PHENOLIQUES DE LA BIERE	18
2.1.1 <i>Structures générales</i>	18
2.1.1.1 Les acides phénoliques	18
2.1.1.2 Les flavonoïdes	19
2.1.2 <i>Les composés phénoliques du houblon</i>	21
2.1.3 <i>Les composés phénoliques de l'orge</i>	22
2.2 LES PROPRIETES DES COMPOSES PHENOLIQUES DE LA BIERE.....	23
2.2.1 <i>Propriétés dans la bière</i>	24
2.2.1.1 Propriétés organoleptiques	24
2.2.1.2 Propriétés colorantes	24
2.2.1.3 Propriétés antioxydantes.....	28
2.2.2 <i>Propriétés biologiques / santé pour l'homme</i>	31
3 EFFETS DES PROCEDES SUR LES COMPOSES PHENOLIQUES DE LA BIERE	32
3.1 CHAUFFAGE	32
3.2 FERMENTATION	33
3.3 FILTRATION	34
4 METHODES D'ANALYSES DES COMPOSES PHENOLIQUES	35
4.1 EXTRACTION.....	35
4.1.1 <i>Extraction liquide-liquide</i>	35
4.1.2 <i>Extraction sur phase solide</i>	35
4.2 ANALYSES	36
4.2.1 <i>Analyses spectrophotométriques</i>	36
4.2.2 <i>Analyses chromatographiques</i>	36
4.2.2.1 Chromatographie liquide.....	36
4.2.2.2 Chromatographie liquide couplée à l'analyse de l'activité antioxydante	37
4.2.2.2.1 Détection par chimiluminescence	37
4.2.2.2.2 Détection par électrochimie	38
4.2.2.2.3 Détection impliquant un radical stable.....	38
CHAPITRE 2 : DECOLORATION DE LA BIERE	41

1	INTRODUCTION	42
2	MATERIEL ET METHODES.....	44
2.1	REACTIFS, PRODUITS CHIMIQUES ET MATERIELS VEGETAUX	44
2.2	BRASSAGE A L'ECHELLE DU LABORATOIRE	44
2.3	DECOLORATION DU MOUT	45
2.3.1	<i>Choix de l'adsorbant.....</i>	45
2.3.2	<i>Décoloration du moût au charbon actif.....</i>	45
2.3.3	<i>Fermentation du moût décoloré.....</i>	45
2.4	DECOLORATION DE LA BIÈRE	46
2.5	EFFET DE LA DECOLORATION SUR LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU MOUT ET DE LA BIÈRE	46
2.5.1	<i>Analyse des composés phénoliques.....</i>	46
2.5.1.1	Dosage colorimétrique des composés phénoliques totaux.....	46
2.5.1.2	Extraction et analyse chromatographique des composés phénoliques	47
2.5.2	<i>Analyses de routine selon les protocoles Analytica EBC.....</i>	48
2.5.2.1	Acides aminés libres	48
2.5.2.2	Sucres fermentescibles.....	48
2.5.2.3	Minéraux	49
2.5.2.4	Couleur	49
2.5.2.5	Composés phénoliques totaux	49
2.5.2.6	Azote aminé libre.....	50
2.5.2.7	Sucres totaux.....	50
2.5.2.8	Atténuation limite	50
2.5.2.9	β -glucanes solubles	51
2.5.2.10	Volatils.....	51
2.5.2.11	Diacétyle et 2,3-pentanedione	51
2.5.2.12	Populations de levures	52
3	RESULTATS ET DISCUSSION	53
3.1	DECOLORATION DU MOUT	53
3.1.1	<i>Effet du temps de contact des adsorbants</i>	53
3.1.2	<i>Effet de la concentration en adsorbants</i>	54
3.1.3	<i>Effet de la décoloration du moût sur la quantité de composés phénoliques totaux</i>	56
3.1.4	<i>Extraction des composés phénoliques par le charbon actif.....</i>	57
3.2	FERMENTATION DU MOUT DECOLORE.....	59
3.3	DECOLORATION DE LA BIÈRE	62
3.4	EFFET DE LA DECOLORATION SUR LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU MOUT ET DE LA BIÈRE	62
4	CONCLUSION	67
CHAPITRE 3 : MISE AU POINT D'UNE METHODE D'ANALYSE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE		69
1	INTRODUCTION	70
2	MATERIEL ET METHODES.....	72
2.1	REACTIFS ET PRODUITS CHIMIQUES	72
2.2	SOLUTIONS STOCK.....	72
2.3	ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	73
2.3.1	<i>Extraction des composés phénoliques.....</i>	73
2.3.2	<i>Séparation chromatographique et identification des composés antioxydants</i>	73
2.3.3	<i>Limites de quantification</i>	73
2.4	ANALYSE BIOLOGIQUE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	74
2.4.1	<i>Lignée cellulaire.....</i>	74

2.4.2	<i>Effet des antioxydants sur la viabilité des cellules bêta pancréatiques</i>	74
2.5	ANALYSES STATISTIQUES	75
3	RESULTATS ET DISCUSSION	76
3.1	ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	76
3.1.1	<i>Extraction des composés phénoliques</i>	76
3.1.2	<i>Séparation chromatographique et identification des composés antioxydants</i>	77
3.2	COMPOSES PHENOLIQUES ET STRESS OXYDANT.....	80
3.3	COMPARAISON DES METHODES CHROMATOGRAPHIQUE ET BIOLOGIQUE.....	84
4	CONCLUSION	88
	CHAPITRE 4 : COMPOSES ANTIOXYDANTS DE LA BIÈRE	89
1	INTRODUCTION	90
2	MATERIEL ET METHODES	92
2.1	REACTIFS, PRODUITS CHIMIQUES ET MATERIEL VEGETAL	92
2.2	SOLUTIONS STOCK	92
2.3	ETUDE DES COMPOSES ANTIOXYDANTS A DIFFERENTES ETAPES DU PROCEDE DE FABRICATION DE LA BIÈRE	93
2.3.1	<i>Procédé de brassage</i>	93
2.3.2	<i>Extraction des composés phénoliques</i>	93
2.3.3	<i>Analyse chromatographique</i>	94
2.3.4	<i>Identification de composés phénoliques</i>	95
2.3.5	<i>Courbes de calibrage</i>	95
2.4	ETUDE DES BIERES DECOLOREES.....	95
2.4.1	<i>Décoloration de la bière</i>	95
2.4.2	<i>Coloration de la bière</i>	96
2.5	ANALYSES STATISTIQUES	96
3	RESULTATS ET DISCUSSION	97
3.1	ETUDE DES COMPOSES ANTIOXYDANTS A DIFFERENTES ETAPES DU PROCEDE DE FABRICATION DE LA BIÈRE	97
3.1.1	<i>Composés antioxydants au cours du maltage</i>	98
3.1.2	<i>Composés antioxydants au cours du brassage et de la fermentation</i>	102
3.1.3	<i>Impact du procédé de brassage sur l'activité antioxydante totale</i>	107
3.2	ETUDE DES BIERES DECOLOREES.....	110
3.2.1	<i>Composés antioxydants</i>	110
3.2.2	<i>Coloration des bières</i>	113
4	CONCLUSION	120
	PUBLICATION	121
	CONCLUSION GENERALE	129
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	135
	ANNEXES	145

Introduction générale

La bière est un breuvage universel et probablement le plus ancien jamais fabriqué par l'homme. Elle est si populaire qu'elle est la boisson alcoolisée la plus vendue au monde. L'histoire de la bière est intimement liée à celle de ses ingrédients, ainsi qu'aux avancées technologiques qui firent de cette boisson le breuvage que l'on connaît aujourd'hui. Les premières cultures de céréales, notamment de l'orge et de l'épeautre (une céréale proche du blé), ont été attestées en 8000 avant J.-C. en Mésopotamie, berceau de la bière. Les premières traces concrètes de la bière remontent à 4000 ans avant J.-C. Consommée en famille et utilisée comme moyen de paiement à Babylone, puis boisson des dieux en Égypte, la bière devint dans la Grèce antique et dans l'Empire romain celle du pauvre, et le vin celle des dieux. Elle resta cependant la boisson de choix des peuples du Nord, celtes et germains. L'utilisation de houblon ne se répandit qu'à partir du XV^{ème} siècle et devança très vite les autres plantes amères qui aromatisaient à l'époque la bière (gentiane, coriandre, absinthe, sauge ou lavande). Au niveau de la fabrication, il faudra attendre le milieu du XIX^e siècle pour assister à une évolution radicale des techniques grâce notamment au développement de la verrerie, des appareils de filtration, du soutirage sous-pression, de l'embouteillage et de la réfrigération. À la même époque, les recherches scientifiques sur les micro-organismes vont permettre de mieux comprendre et maîtriser le processus de la fermentation alcoolique, d'améliorer les conditions sanitaires des brasseries et de produire une boisson plus saine et plus claire. À cet effet, la contribution de Louis Pasteur a été très importante. Si l'histoire de la bière continue d'évoluer, les procédés de fabrication de la bière sont pérennisés, depuis l'ancienne Égypte, comprenant les étapes successives de maltage, de brassage, de fermentation et de garde.

La bière traditionnelle est faite à partir d'orge, de houblon, d'eau et de levures. Cette boisson possède un intérêt santé, notamment grâce à son contenu en minéraux et aux composés phénoliques connus pour leur activité antioxydante. Le houblon et l'orge maltée constituent une source importante de composés phénoliques dans la bière ; environ 20-30% proviennent du houblon, tandis que 70-80% sont dérivés de l'orge maltée. Au cours des étapes de fabrication de la bière, des co-produits, riches en composés phénoliques provenant soit des céréales, soit du houblon, sont formés. La fermentation entraîne une production importante de levures, dont les "levures brunes", dénomination liée à la présence de composés phénoliques fixés à leur surface. La filtration de la bière permet d'éliminer un résidu de protéines et de composés phénoliques non désirable dans le produit fini (entraînant l'apparition d'un trouble). Souvent, ces co-produits ne sont pas valorisés, or, étant donné leur activité antioxydante, ils possèdent des potentialités importantes pour lesquelles ils pourraient être utilisés, soit pour l'industrie cosmétique / pharmaceutique, soit pour produire une boisson maltée avec des bénéfices fonctionnels supplémentaires.

Dans ce contexte, les Brasseries Kronenbourg se sont associées à l'équipe de Chimie Analytique des Molécules Bioactives, afin de développer une boisson maltée originale qui se différencierait des produits existants sur le marché par ses propriétés organoleptiques, par son aspect incolore pour l'ajout de couleurs vives et/ou par la mise en évidence de ses propriétés nutritionnelles et fonctionnelles. L'objectif de ce travail a été de mettre au point des techniques performantes d'extraction, de concentration et de purification des composés phénoliques dès la première étape de fabrication (brassage), afin d'isoler et de concentrer les substances d'intérêts fonctionnels, qui sont généralement diluées et/ou perdues au cours du procédé, de faciliter certaines étapes délicates du procédé en limitant les quantités de ces substances et d'éliminer tous les composés colorés, ce qui permettraient de développer de nouvelles boissons maltées incolores.

En effet, obtenir des colorations particulières semble être un objectif extrêmement difficile à atteindre en partant d'un liquide naturel (moût ou bière) dont la gamme de couleurs, provenant principalement des composés phénoliques du malt ou du houblon, varie du jaune paille, dans le meilleur des cas, au marron foncé. C'est pour cela qu'il sera tout d'abord procédé à une décoloration préalable de la boisson, à un stade de fabrication à déterminer, et le produit clarifié obtenu pourra être coloré de façon originale et attrayante en utilisant des colorants alimentaires appropriés.

Par ailleurs, la concentration des substances d'intérêts fonctionnels va dans le sens du développement d'une boisson à allégation santé en tirant profit des vertus du malt et du houblon. A cet égard, la récupération et/ou la valorisation des composés phénoliques de la bière pour la santé des consommateurs constitue un aspect essentiel et le produit à développer répond au marché grandissant des produits alimentaires de types fonctionnels. La présence des composés phénoliques dans les matrices alimentaires et les boissons telles que la bière, est généralement mise en évidence par des méthodes chromatographiques de chimie analytique, toutefois, l'intérêt fonctionnel des composés identifiés, à savoir leur activité antioxydante, n'est pas souvent rapportée. Des méthodes analytiques ont été développées dans l'objectif de pouvoir identifier et quantifier les composés d'intérêt fonctionnel de la bière et de déterminer leur potentiel d'activité fonctionnelle.

Le manuscrit est divisé en quatre chapitres. Le premier chapitre présente le contexte de l'étude sur la bière, sa composition en composés phénoliques et les propriétés associées, l'effet des procédés sur les composés phénoliques et les différentes méthodes d'analyse des composés phénoliques. Le deuxième chapitre décrit les travaux de décoloration de la bière. Le troisième chapitre présente la mise au point d'une méthode d'analyse de l'activité antioxydante. Enfin, le quatrième chapitre décrit l'application de la méthode d'analyse de l'activité antioxydante à la bière et à ses différentes étapes de fabrication et également les différents essais de coloration de la bière.

Chapitre 1 :

Contexte de l'étude

1 Procédé de fabrication de la bière

La fabrication de la bière nécessite quatre ingrédients essentiels : les céréales, le houblon, l'eau et les levures. Les étapes de maltage et de brassage préparent les constituants des grains céréaliers (amidon et protéines essentiellement) pour qu'ils puissent être métabolisés lors de la fermentation par les levures qui produiront de l'alcool, du dioxyde de carbone ainsi que des arômes. L'ensemble de ce processus aboutit à une bière qui, après maturation et filtration, peut être pasteurisée et conditionnée. Le houblon est généralement ajouté au moment du brassage, il confère à la bière son amertume et son arôme. Ainsi pour fabriquer 1 L de bière, il faut 6 L d'eau, 140 g d'orge malté, 2 g de cônes de houblon et 10 g de levures. Les étapes de ce procédé sont présentées sur la **Figure 1.1**.

1.1 Matières premières

1.1.1 L'orge

L'orge appartient à la famille des graminées et au genre *Hordeum* qui comprend 31 espèces, mais seule *Hordeum vulgare* est couramment cultivée. Il a été l'une des premières cultures domestiquées, il y a 10 000 ans dans le croissant fertile du Moyen-Orient. L'orge est classée selon les types printemps ou hiver (sensible au gel ou au contraire résistant au froid environ jusqu'à -15°C), deux-rangs ou six-rangs (nombre de rangs de grains sur les épis d'orge), à grains nus ou à coque (absence ou présence de l'enveloppe extérieure du grain), et est utilisée principalement pour l'alimentation animale ou pour la brasserie¹.

1.1.2 Le houblon

Le houblon (*humulus lupulus*), appartenant à la famille des cannabinaées, est une espèce dioïque pérenne. Seules les plantes femelles sont cultivées pour la récolte de leurs fleurs appelées cônes qui sont les seuls constituants de la plante utilisés en brasserie. A l'intérieur, une fine poudre jaune appelée lupuline est produite, elle contient les substances actives de la fleur de houblon recherchées pour la bière. Le houblon peut être utilisé sous différentes formes : cônes, pellets et extraits de houblon. Il existe deux principales sortes de houblon : les houblons aromatiques et les houblons amérissants. Aujourd'hui, les brasseries utilisent essentiellement des extraits de houblon

dépourvus de composés phénoliques. En effet la biosynthèse des composés phénoliques tels que les proanthocyanidines dans le houblon semble inversement liée à celle des acides α , principaux responsables de l'amertume de la bière, ce qui explique que des variétés sans composés phénoliques aient été sélectionnées.

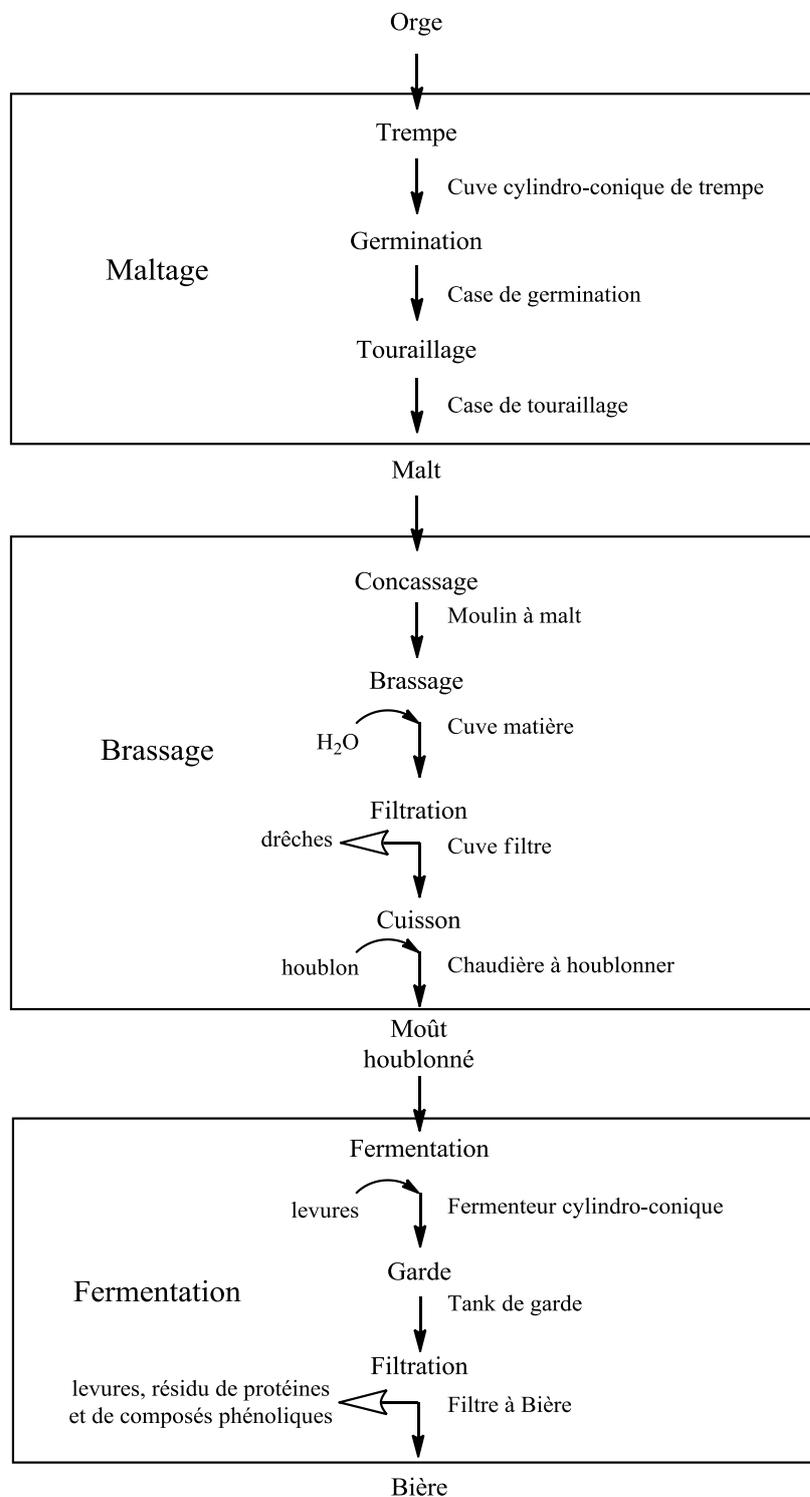


Figure 1.1 : Procédé de fabrication de la bière

La composition approximative du houblon séché est la suivante : humidité (10-11%), acides α (2-12%), acides β (2-10%), huiles essentielles (0,5-2%), composés phénoliques (2-5%), lipides et cires (2-4%), protéines (12-18%) et cellulose (40-50%). Les acides α , sesquiterpènes, en particulier l'humulone (35-70% des acides α totaux), la cohumulone (20-65%), et l'adhumulone (10-15%) sont considérés comme étant les constituants les plus importants dans la détermination de la qualité du houblon². Au cours de l'ébullition du moût, les acides α sont isomérisés pour former les acides iso- α , plus solubles et amers que les premiers (**Figure 1.2**). Chaque acide iso- α a deux isomères, *cis* et *trans*, avec différentes orientations de la chaîne latérale². Les acides β sont principalement constitués de lupulone et colupulone.

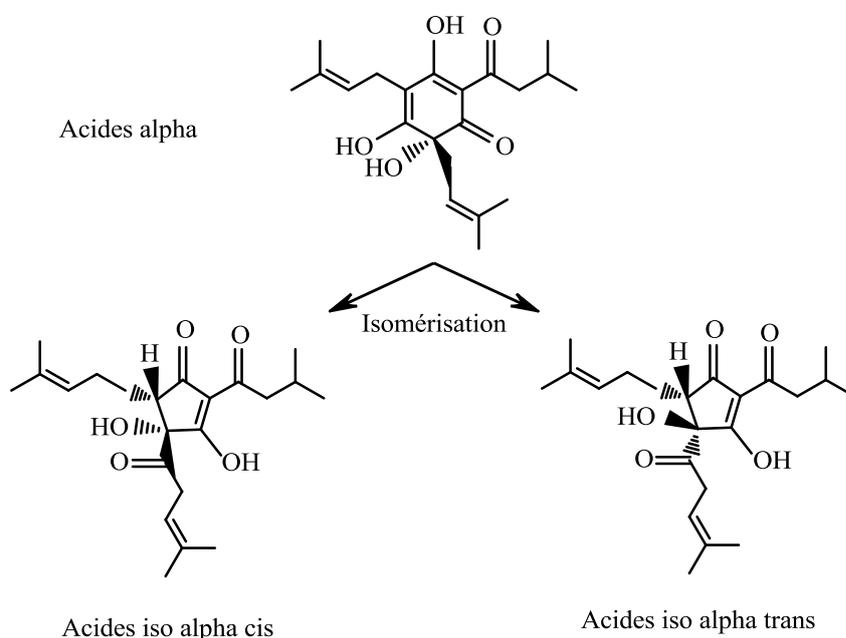


Figure 1.2 : Réaction d'isomérisation des acides α

1.1.3 L'eau

L'eau constitue 90 à 95% de la bière. Ses qualités sont donc très importantes. Elle doit être potable et non polluée. La composition ionique de l'eau, telle que sa composition en calcium, est également importante, car il a un effet acidifiant par réaction avec les phosphates, protège les α -amylases des destructions thermiques, permet la précipitation de l'acide oxalique, dérivé du malt, et évite ainsi des problèmes de trouble et de faux goût dans la bière. Par ailleurs le calcium est indispensable à la floculation de la levure en fin de fermentation².

1.1.4 Les levures

Les levures jouent un rôle primordial dans la préparation des boissons fermentées, elles interviennent dans la conversion du sucre en alcool, découverte faite par Pasteur en 1861. En principe, chaque brasseur possède ses propres souches de levures avec lesquelles ilensemence le moût. Les levures de brasseries sont de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* et englobent aussi bien les levures de fermentation haute (14 à 28°C, quelques jours) qui sont utilisées pour fabriquer des bières de type « ale » et les levures de fermentation basse (0 à 15°C, 1 à 2 semaines) qui servent à la production de bières dite « lager », les plus répandues dans le monde³.

1.2 Maltage

Le maltage consiste à transformer l'orge en malt par une étape de germination du grain (**Figure 1.1**). Cette transformation permet d'accumuler des groupes d'enzymes hydrolytiques qui dégraderont l'amidon et les protéines à l'étape suivante (le brassage), de donner sa friabilité au grain pour faciliter cette dégradation et de développer les arômes de l'orge. Avant le maltage, les grains d'orge sont séchés et ensilés ; ils sont ensuite calibrés et nettoyés de manière à éliminer tous contaminants (herbe, paille, cailloux, fragments de grains, etc.). Le procédé de maltage débute par des cycles de trempe et d'aération de plusieurs heures pour aérer les grains et amener leur humidité d'environ 12% à 45%. Cette étape induit la levée de la dormance et le démarrage de la germination des grains. Des conditions adaptées à ce processus (température de 15°C, humidité élevée de près de 100%) sont appliquées aux grains durant les 4 à 6 jours suivants. Les enzymes hydrolytiques nécessaires à la dégradation de l'amidon sont alors synthétisées. Ce processus est finalement stoppé par le touraillage : durant plusieurs heures, les grains sont chauffés par palier entre 45°C et 105°C. Cette étape finale du maltage permet de détruire le pouvoir germinatif, de sécher les grains qui perdent 25% de leur masse et 40% de leur humidité, de donner une couleur aux grains et aura un impact très fort sur la qualité organoleptique de la bière. Selon le type de bières, les brasseurs sélectionneront des malts pâles pour la fabrication de bières blanches ou blondes, des malts caramels pour les bières rousses ou ambrées et des malts bruns pour les bières brunes.

1.3 Brassage : production de moût

Le brassage permet la préparation du moût à partir de grains de malt d'orge (**Figure 1.1**). Des succédanés (regroupant les sirops de glucose et de saccharose) et d'autres céréales sous forme de grains crus (maïs, riz, blé, orge) pouvant être ajoutés, l'apport de malt doit être de 50% minimum, en France, pour avoir l'appellation bière. Les grains sont concassés et moulus, puis mélangés à de l'eau. Ce mélange, appelé maïsche, va subir des chauffages à différents paliers de températures correspondant aux températures optimales d'action des enzymes d'hydrolyse (protéases, glucanases et α/β amylases) et de gélatinisation en vue de transformer l'amidon en sucres fermentescibles et non fermentescibles.

1.4 Filtration et cuisson

La maïsche obtenue est filtrée pour éliminer les drêches (**Figure 1.1**). Ces drêches, résidu de grains de céréales, sont la plupart du temps destinées à l'alimentation animale. Le moût clair, obtenu après filtration, est additionné de houblon et porté à ébullition. Cette étape permet de donner à la bière son goût amer par isomérisation des acides α du houblon et ses arômes. Après ébullition, le moût houblonné stérile est refroidi à 5-6°C afin d'être préparé pour la fermentation.

1.5 Fermentation

La fermentation se déroule généralement dans des cuves verticales cylindro-coniques (Tank Out Door, TOD) de 1 000 à 10 000 hL et en deux phases successives. La première phase, qui dure environ sept jours, est la fermentation principale au cours de laquelle la levure consomme 90% des sucres fermentescibles et produit ainsi de l'éthanol et du dioxyde de carbone. Les hexoses et le saccharose sont assimilés en premier, puis les levures utilisent le maltose, sucre majoritaire dans le moût, et enfin le maltotriose. Durant la seconde phase de fermentation (2 à 3 jours), il y a accumulation d'esters et d'alcools supérieurs ainsi que réduction des faux-goûts dus à des composés qui se sont accumulés (dicétones, aldéhydes et composés soufrés). A la fin la température est diminuée jusqu'à 4°C ce qui induit la floculation des levures et leur précipitation au fond de la cuve (**Figure 1.1**).

Le taux d'ensemencement (nombre de cellules par mL) à la fin de l'entonnement (remplissage des fermenteurs par le moût) a un impact important sur la vitesse de fermentation. Une cible

d'ensemencement exprimée en millions de cellules par mL de moût est ainsi définie et est variable suivant la densité du moût. Un moût de 14°Plato est, par exemple,ensemencé à $1,4 \cdot 10^7$ cellules vivantes par mL. En fonction de la cible et du volume à ensemencer, il est possible de calculer le nombre total de cellules à inoculer dans le fermenteur. Il faut ensuite mesurer la concentration cellulaire de la levure grâce à un compteur automatique de cellules ainsi que la viabilité cellulaire qui se mesure par comptage des cellules mortes colorées au bleu de méthylène⁴. Il est ensuite possible de calculer la masse de levure correspondant au nombre de cellules vivantes à inoculer dans le fermenteur.

1.6 Garde, filtration et conditionnement

La bière subit encore une étape de stabilisation au cours de laquelle les arômes se développent, les sucres résiduels sont transformés en alcool et la saturation en gaz carbonique augmente (**Figure 1.1**). La stabilisation se déroule entre 0,5 et -1°C, sur une durée de sept jours. Elle provoque la floculation des protéines et des levures encore présentes qui seront finalement éliminées par filtration sur des filtres de Kieselguhr, fossiles de diatomées broyées. La bière clarifiée est conditionnée en bouteilles, en fûts ou en boîtes puis, généralement, pasteurisée à 60°C.

2 Composition et propriétés de la bière

Les matières premières telles que le malt, le houblon, l'eau de brassage et les levures fournissent à la bière des composants nutritionnels comprenant les sucres (maltose, glucose, fructose...), les acides aminés, les minéraux (potassium, calcium, magnésium...), les vitamines (thiamine, riboflavine...), les acides organiques (citrate, pyruvate...), les composés phénoliques (catéchine, épicatechine...), les composés amers (humulone, isohumulone...), les amines (tyramine, histamine...) et les acides nucléiques³.

Dans cette étude, l'intérêt s'est principalement porté sur les composés phénoliques de la bière.

2.1 Les composés phénoliques de la bière

Les composés phénoliques constituent une grande famille de molécules très largement répandues dans le monde végétal. Ce sont des métabolites secondaires synthétisés par la plante, de façon ubiquitaire, au cours du développement normal ou en réponse à des conditions de stress tels que les infections, les blessures et les radiations UV.

2.1.1 Structures générales

Les composés phénoliques sont constitués d'un noyau aromatique comportant une ou plusieurs fonctions hydroxyles ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyl ester, glycoside, etc.). Il en existe quatre grandes classes : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes. Les stilbènes et les lignanes ne sont pas présents dans la bière, ils ne seront donc pas développés ici.

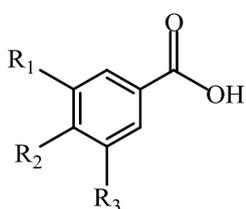
2.1.1.1 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques se distinguent en deux classes : les acides hydroxybenzoïques, dérivés d'acide benzoïque et les acides hydroxycinnamiques, dérivés d'acide cinnamique (**Figure 1.3**).

La teneur en acides hydroxybenzoïques dans les plantes est très faible, sauf exception de certains fruits rouges, radis noirs et oignons qui peuvent contenir jusqu'à plusieurs dizaines de milligrammes par kilogrammes de poids frais⁵. Les acides hydroxybenzoïques sont souvent des composants de structures complexes comme les tannins.

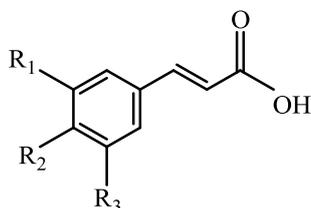
Les acides hydroxycinnamiques sont plus communs que les acides hydroxybenzoïques et sont constitués principalement des acides *p*-coumarique, caféique, férulique et sinapique. L'acide férulique est l'acide phénolique le plus abondant dans les céréales, notamment dans l'orge où il est présent sous forme *trans* et lié⁶.

Acides hydroxybenzoïques



- $R_1=R_2=R_3=H$: acide benzoïque (non phénolique)
- $R_1=R_3=H, R_2=OH$: acide *p*-hydroxybenzoïque
- $R_1=R_2=OH, R_3=H$: acide protocatéchuique
- $R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=H$: acide vanillique
- $R_1=R_2=R_3=OH$: acide gallique

Acides hydroxycinnamiques

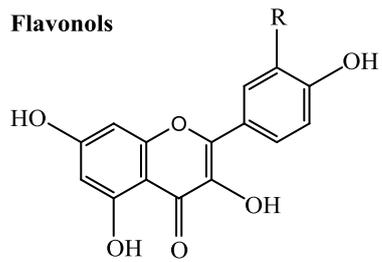


- $R_1=R_2=R_3=H$: acide cinnamique (non phénolique)
- $R_1=R_3=H, R_2=OH$: acide *p*-coumarique
- $R_1=R_2=OH, R_3=H$: acide caféique
- $R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=H$: acide férulique
- $R_1=R_3=OCH_3, R_2=OH$: acide sinapique

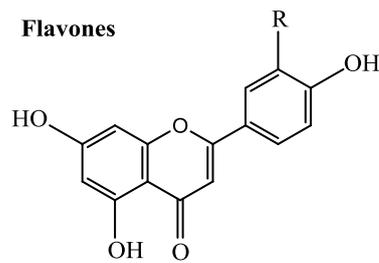
Figure 1.3 : Structures chimiques des acides phénoliques

2.1.1.2 Les flavonoïdes

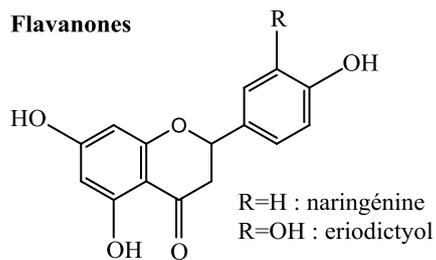
Les flavonoïdes peuvent être divisés en six grands groupes⁷ (**Figure 1.4**). Les **flavonols** sont les flavonoïdes les plus présents dans l'alimentation et les principaux représentants sont la quercétine et le kaempférol. Les **flavones** sont beaucoup moins communs que les flavonols dans l'alimentation. Ils consistent principalement en glycosides de lutéoline et apigénine. Les **flavanones** sont présents dans les tomates, certaines plantes aromatiques telles que la menthe, et en fortes concentrations dans le citron. Les **isoflavones** sont présents exclusivement dans les légumineuses telles que le soja.



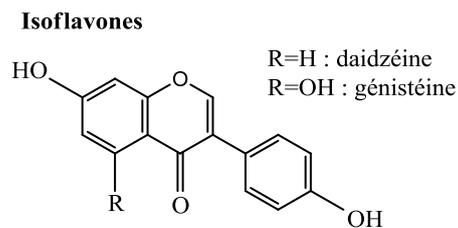
R=H : kaempférol
R=OH : quercétine



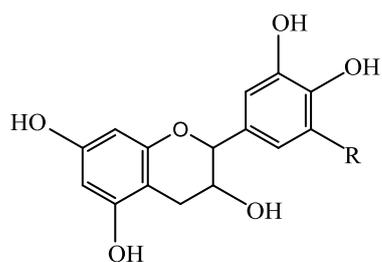
R=H : apigénine
R=OH : lutéoline



R=H : naringénine
R=OH : eriodictyol

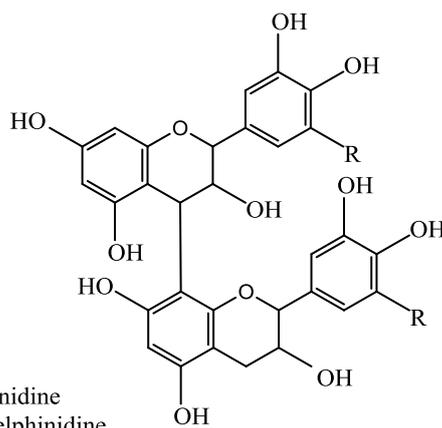


R=H : daidzéine
R=OH : génistéine

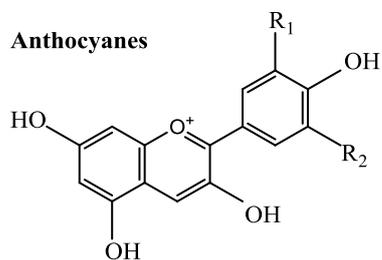


R=H :
catéchine, épicatechine
R=OH :
gallocatéchine

Flavanols



R=H : procyanidine
R=OH : prodelphinidine



R₁=R₂=H : pélargonidine
R₁=OH, R₂=H : cyanidine
R₁=R₂=OH : delphinidine

Figure 1.4 : Structures chimiques des flavonoïdes

Les **flavanols** sont présents sous formes de monomères (catéchines) et de polymères (proanthocyanidines). Le thé vert et le chocolat sont les aliments les plus riches en catéchine⁸. Les proanthocyanidines, aussi connus sous le nom de tannins condensés, sont des dimères, oligomères et polymères de catéchine. A travers la formation de complexe avec les protéines de la salive, les tannins condensés sont responsables du caractère astringent des fruits (raisins, pêches, pommes, poires, etc.) et des boissons (vin, cidre, thé, bière, etc.) et de l'amertume du chocolat⁹. Les **anthocyanes** sont des pigments de fleurs et de fruits, auxquels ils donnent des couleurs allant du bleu-violet au rouge en passant par l'orange et le jaune¹⁰. Ils existent sous différentes formes chimiques, colorées ou incolores, en fonction du pH. Ils sont présents dans le vin rouge, certaines variétés de céréales et certains légumes, mais ce sont dans les fruits qu'ils sont les plus abondants. L'intensité de la couleur de l'aliment est souvent proportionnelle à la teneur en anthocyanes présents.

2.1.2 Les composés phénoliques du houblon

La fleur de houblon possède 3 à 6% de composés phénoliques, principalement les acides phénoliques et les flavonoïdes. Les flavonoïdes du houblon sont constitués de flavonols aglycones (kaempférol, quercétine...), de quinones (sesquiterpènes : humulones, lupulones...), de proanthocyanidines (catéchine, épicatechine, proanthocyanidines B2, B3, B4, prodelfinidine...) et de prénylflavonoïdes¹¹.

Les prénylflavonoïdes du houblon les plus abondants sont le xanthohumol, l'isoxanthohumol, le 6-préynaringénine et 8-préynaringénine (**Figure 1.5**). Le 8-préynaringénine est connu comme étant le plus puissant des phytoestrogènes isolés à ce jour¹².

Le xanthohumol est le principal flavonoïde contenu dans la bière¹³. Il a été isolé, partiellement caractérisé et nommé la première fois par Power *et al.* en 1913. Le xanthohumol et d'autres prénylflavonoïdes ont reçu beaucoup d'attention au cours de ces dernières années en tant qu'agent de chimio-prévention du cancer¹³. Il peut inhiber la synthèse de l'ADN et la prolifération de cellules cancéreuses *in vitro*, inactiver les radicaux d'oxygène et induire l'apoptose cellulaire. Il protège également contre les dommages causés à l'ADN et contre le cancer induit par la mutagénèse des aliments cuits¹¹.

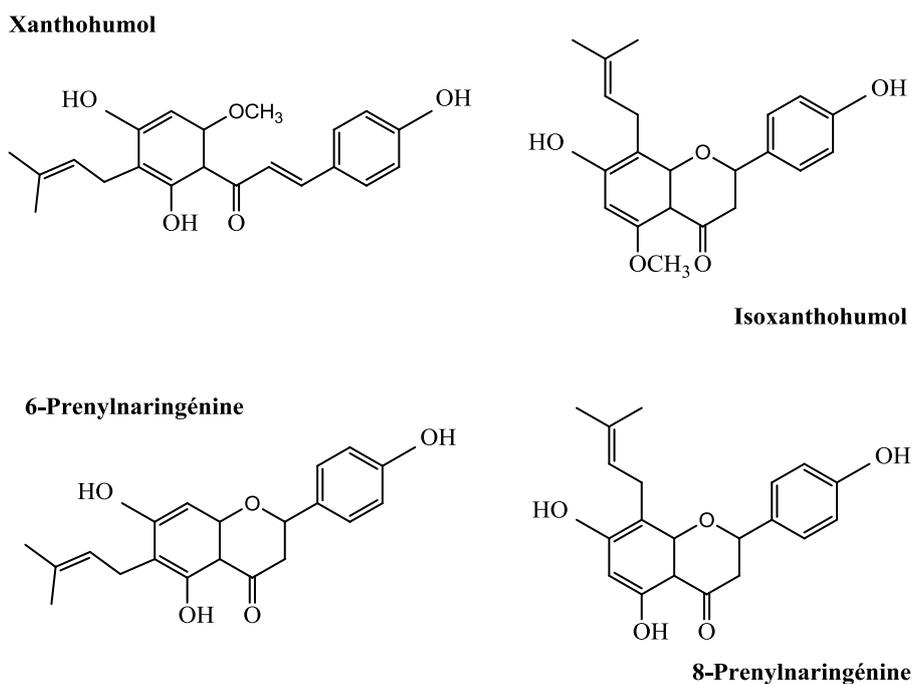


Figure 1.5 : Structures chimiques des composés du houblon

L'apport journalier de prénylflavonoïdes (0,14 mg) est relativement faible comparé aux composés phénoliques totaux de la bière (42 mg équivalents catéchine par jour)¹⁴. Ils contribueraient donc faiblement aux propriétés antioxydantes de la bière.

L'activité biologique potentielle des acides α et iso- α (**Figure 1.2**) a été largement caractérisée. En plus de leurs actions antibactériennes (activité bactériostatique)¹⁵, ils présentent des propriétés anticancéreuses, incluant l'inhibition de la prolifération des cellules leucémiques, l'induction de la différenciation et de l'apoptose cellulaire¹⁵⁻¹⁸, l'inhibition de l'oxydation¹⁹, l'inhibition de l'expression de la cyclo-oxygénase-2 et la réduction de la sécrétion de prostaglandine E_2 ^{20,21}. Les lupulones induisent l'apoptose des cellules du cancer du côlon et contrent ainsi le développement de tumeurs dans un modèle préclinique du cancer du côlon²².

2.1.3 Les composés phénoliques de l'orge

Les flavanols constituent la classe majoritaire des composés phénoliques de l'orge, suivi des flavonols et des acides phénoliques²³, présents sous formes libres et/ou glycosylées²⁴. Ils apparaissent sous formes de monomères, (+)-catéchine et (-)-épicatéchine, et sous formes de

polymères, ou proanthocyanidines, constitués principalement par des unités (+)-catéchine et (+)-gallocatéchine. Les dimères les plus abondants dans l'orge sont la prodelphinidine B3 (gallocatéchine-catéchine) et la procyanidine B3 (catéchine-catéchine)²⁵. Le principal trimère est la procyanidine C2 (trimère de catéchine). Les monomères, dimères et trimères de flavanols représentent 58 à 68% de la teneur totale en composés phénoliques de l'orge²⁶. Le composé qui présente la plus forte activité antioxydante de l'orge, quelle que soit la méthode testée, est la prodelphinidine B3^{23,27}.

Les flavonoïdes, notamment les proanthocyanidines, sont bien connus en raison de leur contribution au goût et à la couleur et de leur rôle dans la formation du trouble de la bière du à leur affinité pour les protéines.

Les acides phénoliques de l'orge sont principalement constitués de l'acide férulique, le plus abondant⁸, suivi des acides *p*-coumarique²⁷ et vanillique²³. Les acides hydroxycinnamiques et hydroxybenzoïques sont connus pour contribuer au potentiel antioxydant des grains de céréales²⁸.

L'orge et le malt contiennent également des caroténoïdes (lutéine et zéaxanthine) et des tocophérols²³. Le tocophérol, en particulier le γ -tocophérol, combiné à la lutéine inhibent la formation des groupements peroxy et par conséquent, participent à l'activité antioxydante des composés dont ils sont extraits. Dans les études de modèle d'oxydation, l'inhibition de la formation d'hydroperoxyde de triglycérides la plus forte est obtenue par combinaison de la lutéine et du γ -tocophérol²⁹.

Les composés phénoliques de l'orge sont moins bien caractérisés que les composés phénoliques de houblon. Et pourtant, il est reconnu que, dans la bière, 20-30% seulement des composés phénoliques proviennent du houblon alors que 70-80% proviennent de l'orge maltée^{30,31}.

2.2 Les propriétés des composés phénoliques de la bière

Dans la plante, les composés phénoliques peuvent agir en tant que attractants pour les pollinisateurs, contributeurs de la pigmentation de la plante, agent protecteur contre les radiations UV, phytoaléxines, antioxydants, antimutagènes, anticarcinogènes, antimicrobiens et anti-inflammatoires⁸.

Dans les aliments, ils peuvent contribuer à l'amertume, l'astringence, la couleur, la flaveur, l'odeur et la stabilité de l'oxydation de l'aliment.

Dans le corps humain, les composés phénoliques jouent un rôle important dans la prévention de nombreuses maladies associées au stress oxydatif, telles que les cancers et les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives³².

2.2.1 Propriétés dans la bière

2.2.1.1 Propriétés organoleptiques

Avec beaucoup d'autres composés de structures différentes (acides aminés et peptides, composés terpéniques...), les composés phénoliques peuvent être responsables de la sensation d'amertume présente dans la bière. Nombre de composés phénoliques présentent un goût amer. Cependant, il semble que seuls quelques uns, comme les flavanols contribuent de façon significative à ce caractère dans les produits alimentaires¹⁰. Le tyrosol et les flavonols pourraient, comme les acides phénoliques, contribuer à l'amertume des boissons.

Toutes ces molécules sont présentes dans la bière, mais leur incidence sur le plan gustatif y est probablement mineure, du fait de la concentration importante en acides iso- α , constituants fortement amers du houblon.

2.2.1.2 Propriétés colorantes

A côté des flavonoïdes et des pigments bruns découlant des phénomènes de brunissement, les pigments végétaux appartiennent à des groupes chimiques divers dont les chlorophylles (vertes), les caroténoïdes (jaunes, orangées ou rouges) et les bétalaïnes (la betterave rouge).

L'orge est une céréale colorée et il existe des variétés noires, bleues, rouges et pourpres en raison de la présence de mélanines et d'anthocyanes (**Figure 1.6**). Mais la couleur de la bière provient principalement des mélanoïdines, des caramels et de l'oxydation des composés phénoliques de l'orge et du houblon.



Figure 1.6 : Exemples de variétés d’orges rouges (en haut) et noires (en bas).

Les mélanoidines, polymères de hauts poids moléculaires, bruns, sont produites par la réaction de Maillard^{33,34}. La plupart des mélanoidines sont produites au cours du maltage et certaines au cours de l’ébullition du moût. La température, le temps de réaction, le pH, l’humidité, la concentration et la nature des précurseurs ainsi que la présence d’oxygène, de métaux et d’inhibiteurs influencent la réaction de Maillard³⁵. Elle est impliquée dans le développement des saveurs, la formation de couleurs, d’antioxydants et d’agents cancérigènes^{31,36}.

On peut subdiviser la réaction de Maillard en trois étapes principales (**Figure 1.7**). La première étape est bien documentée, il s’agit de réactions carbonyles-amines conduisant à la production de 1-amino-1-désoxy-2-cétose à partir d’un aldose à travers le réarrangement d’Amadori et à la formation de 2-amino-2-désoxy-aldose à partir d’une cétose *via* le réarrangement de Heyns. La seconde étape correspond à la dégradation des produits des réarrangements d’Amadori et de Heyns. Elle conduit, notamment, à la formation de composés hétérocycliques responsables des odeurs. Cette étape est moins connue étant donné la complexité et le nombre de combinaisons possible entre intermédiaires. La troisième étape correspond à la polymérisation d’intermédiaires réactionnels produits lors de la deuxième étape et conduit à la production de pigments, les mélanoidines³⁶.

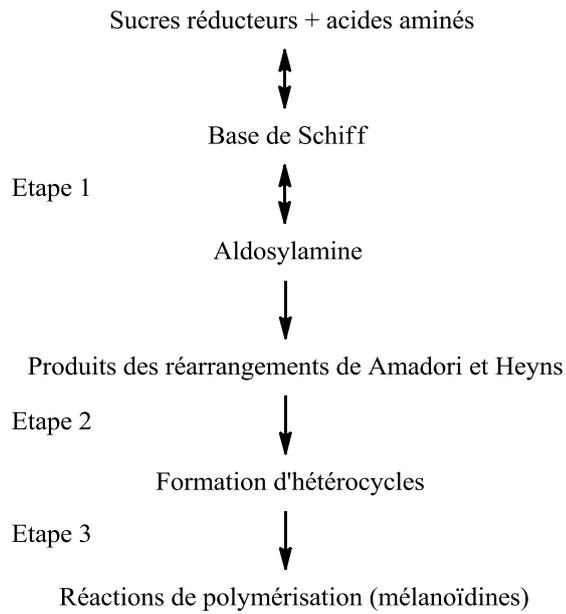


Figure 1.7 : Principales étapes de la réaction de Maillard

Les composés phénoliques oxydés sont produits au cours de la cuisson du moût par réaction avec l'O₂ pour former des polymères. Il y a alors apparition de pigments bruns, dont la formation résulte de deux types de réactions successives dans le temps¹⁰ (**Figure 1.8**).

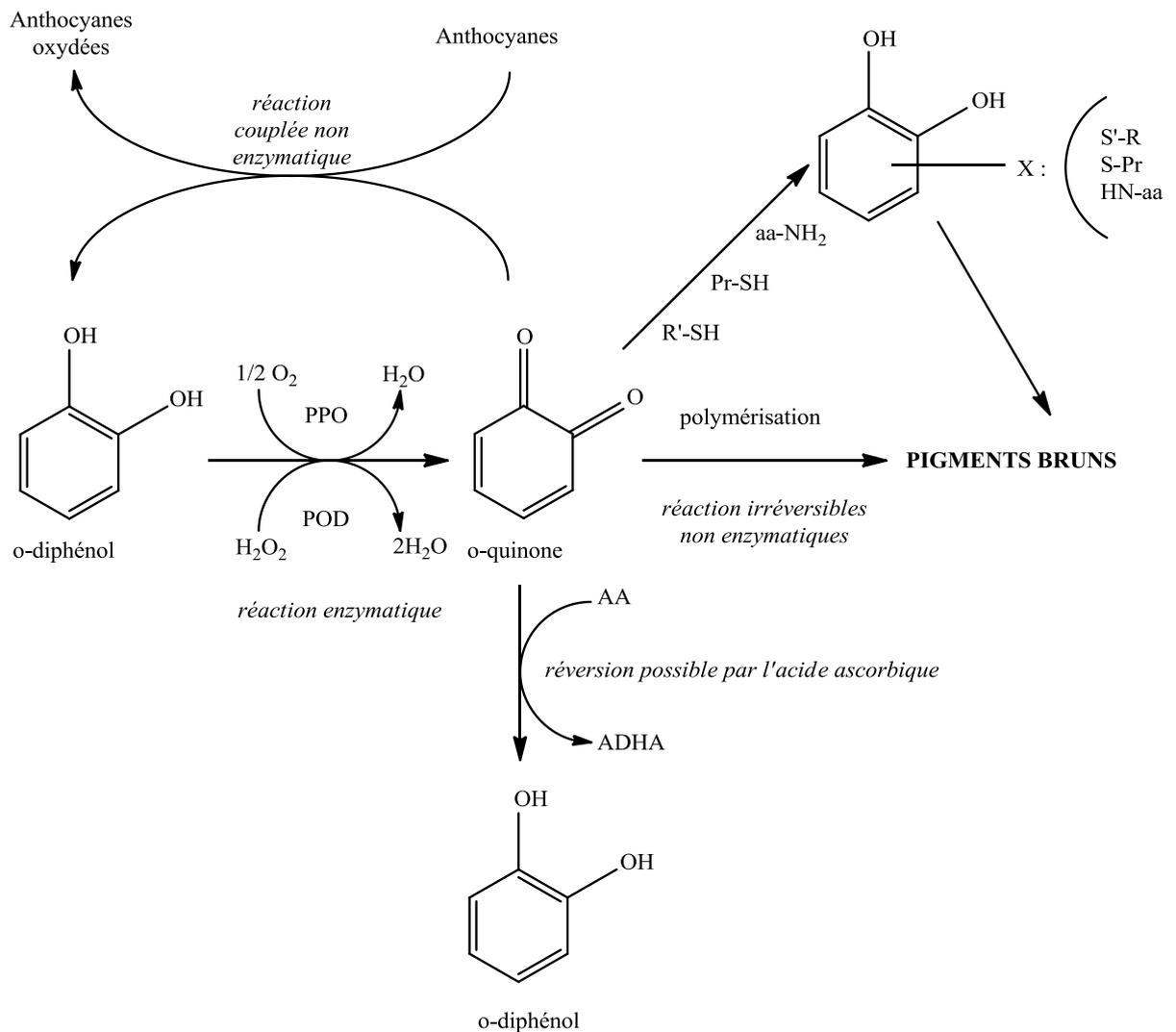


Figure 1.8 : Principales étapes du brunissement depuis l'oxydation enzymatique initiale des composés phénoliques jusqu'à la formation des pigments bruns³⁷. PPO: polyphénol oxydases; POD: peroxydases; aa-NH₂: acides aminés; Pr-SH: protéines; R'-SH: thiols.

La première réaction consiste en l'oxydation enzymatique des composés phénoliques natifs et se traduit par la formation de quinones dont la couleur dépend des substrats oxydés. Cette réaction se déclenche très rapidement dès que les conditions sont favorables et est réversible par exemple en présence d'antioxydants tels que l'acide ascorbique. Les composés les plus efficaces vis-à-vis du brunissement appartiennent à deux classes différentes : les acides hydroxycinnamiques, en particulier les dérivés de l'acide caféique, et certains flavonoïdes, essentiellement les flavanols catéchine, épicatechine¹⁰. Cette première réaction aboutit à la formation de quinones, espèces très instables et très réactives en milieux aqueux. La seconde réaction concerne leur polymérisation et/ou leur combinaison avec d'autres molécules présentes *in situ* telles que les acides aminés, les

peptides, les protéines ou d'autres composés phénoliques tels que les proanthocyanidines. Cela conduit alors à la formation de complexes relativement stables, de couleurs plus ou moins brunes. Ce deuxième groupe de réaction n'est ni enzymatique, ni réversible.

La couleur de la bière est déterminée par le comparateur d'échelle de couleur EBC (European Brewing Convention), développé pour classer les bières, les moûts et les malts en unités visuelles de 2 à 27.

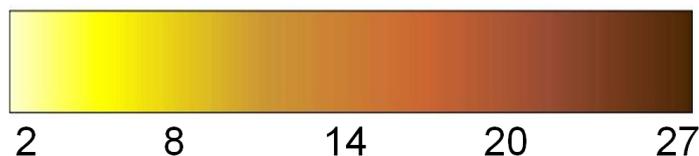


Figure 1.9 : Comparateur d'échelle de couleur EBC pour les bières, les moûts et les malts.

2.2.1.3 Propriétés antioxydantes

L'oxydation est l'une des plus importantes manifestations à l'origine du vieillissement des produits alimentaires. Les dégradations oxydatives affectent les qualités nutritionnelles et sensorielles des aliments et peuvent avoir des répercussions sur la santé du consommateur¹⁰.

Un bon antioxydant doit présenter plusieurs propriétés : efficacité à faible concentration, compatibilité physique et chimique avec le substrat qu'il est censé protéger, absence de toxicité. A côté de diverses autres molécules (caroténoïdes, acide ascorbique, glutathion, etc.), de nombreux composés phénoliques répondent à ces exigences^{37,38}. En effet, les composés phénoliques ont de fortes propriétés antioxydantes ; des études sur les relations structure-activité ont été publiées concernant l'inhibition de la peroxydation lipidique et le piégeage des radicaux libres³⁹. Dans la bière, l'oxydation des lipides, au cours du maltage et du brassage, induit la production de composé trans-2-nonenal, responsable d'un faux-goût « papier-carton ». Les composés phénoliques ont un effet bénéfique sur la qualité gustative de la bière en limitant les effets de l'enzyme responsable de la production de ce composé⁴⁰.

Rappelons que les cellules vivantes produisent naturellement des composés oxydants, accepteurs d'électrons et réducteurs, donneurs d'électrons. L'oxygène, accepteur d'électrons, est transformé en eau afin de générer des molécules énergétiques (ATP, adénosine triphosphate), dans

le cas contraire, il est dévié pour former des radicaux libres ou espèces activées de l'oxygène très réactives (**Figure 1.10**).

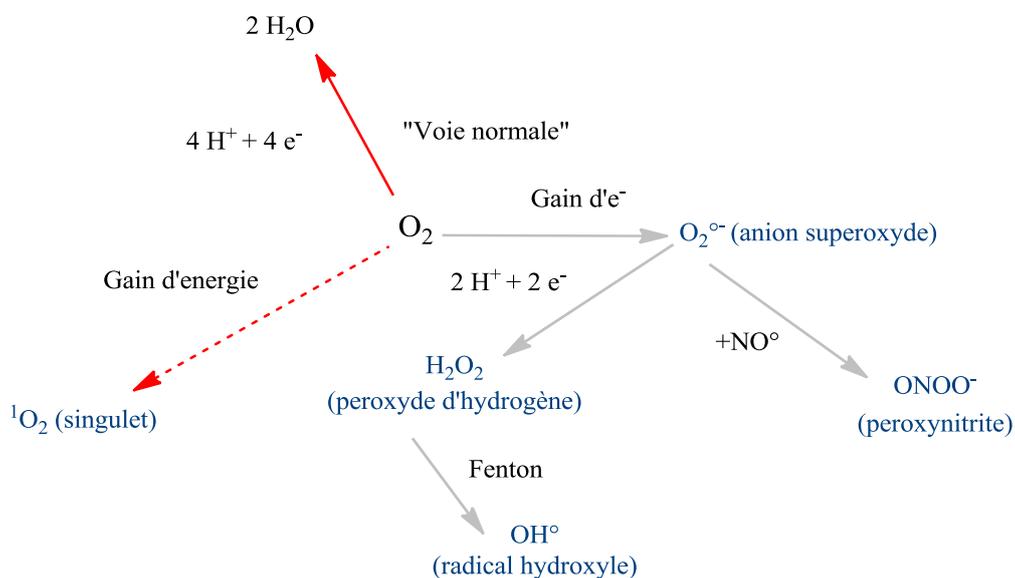


Figure 1.10 : Formation des espèces activées de l'oxygène

L'activité antioxydante des composés phénoliques réside dans leur capacité à donner un hydrogène ou électron et à délocaliser l'électron non apparié au sein de la structure aromatique (**Figure 1.11**). Cela confère aux composés phénoliques la capacité de complexer les métaux, de se combiner à des molécules nucléophiles et de faire des réactions d'oxydoréduction⁴¹. Le fort caractère réducteur et donneur d'atome H des composés phénoliques se manifeste par des réactions rapides avec les radicaux libres dont la production excessive (stress oxydant) est impliquée dans le développement de certaines pathologies dégénératives (maladies cardiovasculaires, cancers). Ils piègent et convertissent les radicaux libres en espèces non-toxiques.

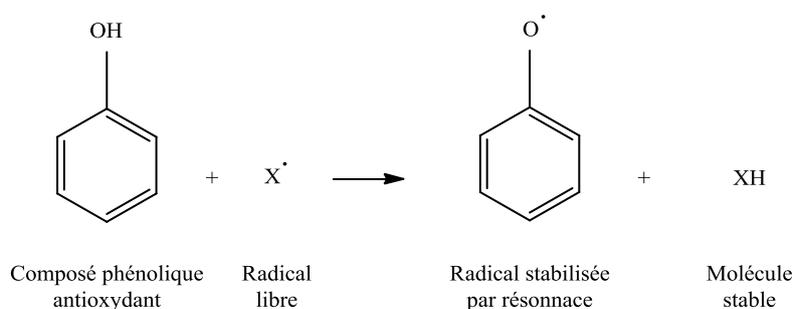


Figure 1.11 : Mécanisme antioxydant d'un composé phénolique

Les antioxydants phénoliques peuvent également protéger diverses molécules biologiques contre l'oxydation, telles que l'ADN, les protéines, les sucres et les lipides³⁷. L'auto-oxydation des lipides insaturés implique toute une chaîne de réactions (**Figure 1.12**) qui commence sous l'action de différents facteurs (lumière, chaleur, radiations ionisantes, espèces toxiques de l'oxygène, ions métalliques, etc.) avec la production de radicaux libres de natures lipidique. Elle s'amplifie ensuite par autoformation de nouveaux radicaux libres puis se terminent avec la formation de produits non radicalaires stables. Le caractère antioxydant des composés phénoliques se manifeste à différents niveaux de cette chaîne par leur action réductrice, leur capacité à piéger et neutraliser les formes toxiques d'oxygène et les formes radicalaires des lipides et par la chélation possible des ions métalliques³⁷. De nombreux composés phénoliques tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques présentent une activité antioxydante marquée, basée sur leur capacité à bloquer l'accumulation des radicaux lipidiques libres qui sont réduits dès leur formation pour redonner le lipide initial alors que le composé phénolique oxydé est en partie régénéré.

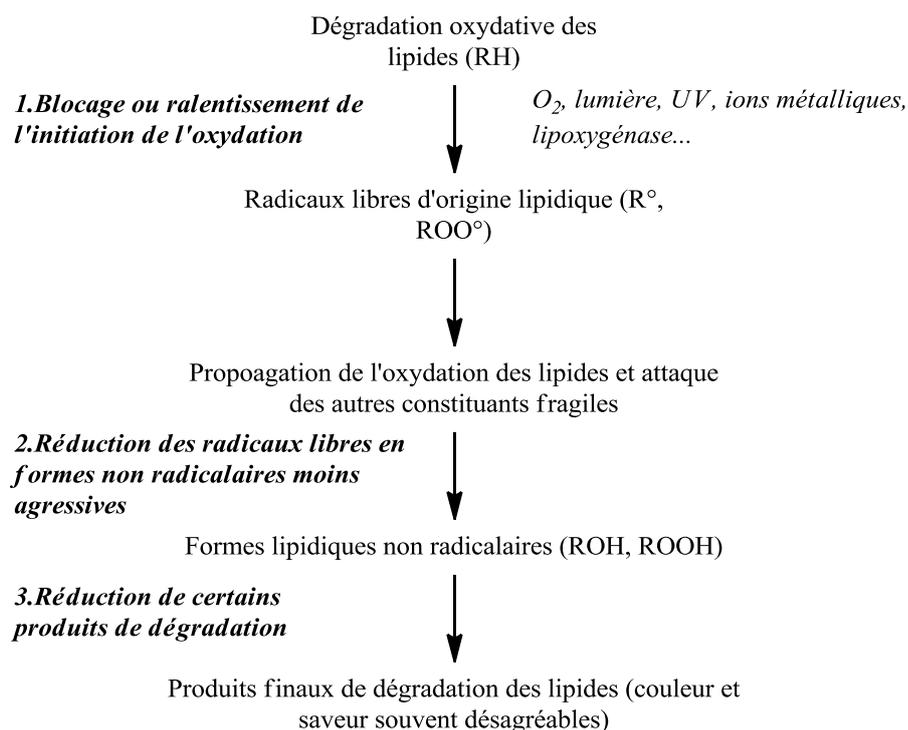


Figure 1.12 : Principaux points d'intervention des antioxydants phénoliques dans la protection des lipides contre la dégradation oxydative³⁷

De nombreux composés phénoliques fonctionnant comme antioxydants, peuvent également exercer des effets pro-oxydants tels que les procyanidines ou les mélanoidines^{42,43}.

2.2.2 Propriétés biologiques / santé pour l'homme

L'alimentation apporte une grande variété d'antioxydants jouant un rôle important comme facteur protecteur de la santé. Des preuves scientifiques suggèrent que les antioxydants réduisent les risques de maladies chroniques, telles que les maladies cardiovasculaires, certains cancers ou les diabètes de type 2³². Ainsi l'apport de composés à activité antioxydante dans les aliments n'a plus pour seul objet de préserver les qualités sensorielles du produit, mais également de renforcer sa valeur nutritionnelle.

La plupart des composés phénoliques présentent des propriétés antioxydantes responsables, pour une grande part, de leurs propriétés biologiques et de leur utilisation dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmacologiques³⁷. Les composés phénoliques, par leur activité antioxydante, sont capables de neutraliser les formes activées de l'oxygène ou les radicaux libres à caractère toxique issus de la peroxydation lipidique, des mutations de l'ADN, de la dégénérescence des neurones ou de l'hyperglycémie due au diabète. Les formes activées de l'oxygène sont pour la plupart des radicaux chimiques dérivés de l'oxygène, capables d'attaquer l'ADN, les enzymes, les protéines, les membranes cellulaires, etc. Ces attaques peuvent être responsables de problèmes lors de la réplication de l'ADN entraînant mutations et cancers, de perturbations au sein des cellules qui peuvent conduire à leur mort, de la destruction des membranes cellulaires ; ceci peut mener au durcissement et à l'épaississement des artères mais aussi à des crises cardiaques, de la détérioration du collagène et donc à la rigidité des tissus. Dans les cellules, ces espèces activées de l'oxygène se présentent, par exemple, sous la forme de radical hydroxyle OH^\bullet et de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (**Figure 1.11**).

Les radicaux libres dérivés de l'oxygène ou de l'azote sont en partie responsables de la destruction des cellules β dans le diabète de type 1 et de leur dysfonction dans le diabète de type 2. Les polyphénols du vin, le resvératrol *cis* et *trans* et l'épigallocatechine gallate ont un effet protecteur antioxydant vis-à-vis d'un stress oxydant induit sur les cellules β pancréatiques de rat^{44,45}.

La biodisponibilité des composés phénoliques, c'est-à-dire leur faculté à s'incorporer dans l'organisme, dépend de leur structure : les composés phénoliques hautement polymérisés traversent difficilement la paroi intestinale. Les petits polymères ont donc une action plus grande dans l'organisme.

3 Effets des procédés sur les composés phénoliques de la bière

Les composés phénoliques sont des espèces hautement instables qui subissent de nombreuses réactions dans le cadre de la transformation et du stockage des aliments. Les produits néoformés comptent pour une part importante de la composition en composés phénoliques dans certains aliments et certaines boissons, mais ils sont négligés dans la plupart des études portant sur la composition des aliments⁴⁶. Cependant, certains des nouveaux composés formés dans ces procédés peuvent présenter des propriétés particulières différentes de celles de leurs précurseurs.

Au cours des étapes de production de la bière, divers co-produits sont formés. Durant le brassage, on produit des drèches et un résidu d'ébullition, encore appelé trouble whirlpool, formé lorsque le moût est additionné de houblon et bouilli. Il est constitué principalement de protéines coagulées et de résidus du houblon⁴⁷. La fermentation entraîne une production importante de levures, dont les "levures brunes", dénomination liée à la présence de composés phénoliques fixés à leur surface. Enfin, la filtration de la bière permet d'éliminer un résidu de protéines et de composés phénoliques non désirable dans le produit fini (entraînant l'apparition d'un trouble). Il est important de noter que ces co-produits sont généralement riches en composés phénoliques provenant soit des céréales, soit du houblon.

3.1 Chauffage

Les méthodes thermiques et de préparation des aliments appliqués aux céréales améliorent leur texture, leur saveur et leur valeur nutritive par gélatinisation de l'amidon, dénaturation des protéines, augmentation de la disponibilité des nutriments, inactivation des composés toxiques thermolabiles et d'autres inhibiteurs d'enzymes. Toutefois, les informations concernant les effets du chauffage sur les composés phénoliques et l'activité antioxydante de l'orge sont encore limitées⁴⁸.

Des recherches antérieures dans les céréales ont indiqué qu'une partie importante des composés phénoliques est présente sous forme conjuguée, soluble ou sous forme liée, insoluble⁴⁹⁻⁵¹. Le traitement thermique induit l'hydrolyse des composés phénoliques conjugués, entraînant la libération des acides phénoliques libres et augmente ainsi la quantité de composés phénoliques bio-disponibles. Les acides cinnamiques tels que les acides caféique, férulique et *p*-coumarique se trouvent généralement dans une forme conjuguée et ils sont libérés après un processus d'hydrolyse tel que celui produit pendant le traitement thermique⁵².

Les réactions de brunissement non-enzymatique ou réaction de Maillard font parties des phénomènes les plus importants se produisant pendant la transformation des aliments, lors de leur traitement par des processus thermiques³³. La formation des produits colorés de la réaction de Maillard, lors des étapes de touraillage du malt et d'ébullition du moût^{31,42,53,54}, est fréquemment associée à la formation de composés antioxydants^{36,55} tels que les réductones et les mélanoidines.

Une étude a corrélé la teneur en prodelphinidine B3, procyanidine B3 et catéchine avec le degré de brunissement dans 42 variétés de pâtes d'orge⁵⁶. Les proanthocyanidines, la catéchine et l'acide caféique provoquent le brunissement par chauffage des pâtes d'orge et des solutions aqueuses d'extraits d'orge, mais l'acide férulique réduit le brunissement des pâtes d'orge. La catéchine et les proanthocyanidines, qui sont facilement auto-oxydé pendant le chauffage, sont les acteurs principaux du brunissement des produits de l'orge chauffés⁵⁶.

La concentration des proanthocyanidines diminue d'environ 70% au cours des étapes successives du procédé. Des pertes importantes de proanthocyanidines se produisent lors des étapes d'ébullition et de refroidissement du moût, du fait de leur coprécipitation avec les protéines et les polysaccharides mais aussi du fait de réactions de dégradation telles que des réactions de dépolymérisations puisque la concentration de monomères de flavanols augmente légèrement¹⁰.

3.2 Fermentation

Les composés phénoliques montrent divers degrés de tolérance aux procédés de fermentation dans les industries de la brasserie et sont capables de résister partiellement à ces procédés⁵⁷. La teneur des différents composés phénoliques change au cours de la fermentation avec une réduction constante de la teneur en tannins dans la bière⁵⁸. Cela est dû à un phénomène d'adsorption des composés phénoliques sur les levures au cours de la fermentation alcoolique. Bien que le mécanisme des interactions soit inconnu, il a été démontré que certaines levures retiennent les anthocyanes dans le vin^{59,60}, on parle de levures dites brunes. Mazauric et Salmon ont montré que très peu de composés phénoliques monomères restent adsorbés sur les levures et qu'il n'y a pas d'adsorption préférentielle entre les tanins de haut poids ou de faible poids moléculaire⁶¹. Les tanins condensés restés dans le vin contiennent moins d'unités épigallocatechine que les tanins initiaux, ce qui indique que les tannins condensés polaires sont préférentiellement adsorbés sur les levures.

3.3 Filtration

La filtration finale de la bière, pour éliminer les levures, se fait par filtration au kieselguhr. Le kieselguhr est une roche d'origine sédimentaire, constituée par l'agglomération des enveloppes siliceuses de diatomées, micro-organismes marins ou lacustres unicellulaires.

Pendant le stockage de la bière, un trouble peut être formé par l'interaction de protéines et de composés phénoliques. Afin de prévenir la formation du trouble et d'étendre ainsi la durée de conservation de la bière, les composés phénoliques sont partiellement éliminés de la bière par un traitement avec la résine polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)⁶². La suppression des composés phénoliques par le traitement à la PVPP diminue le pouvoir réducteur de 9 à 38%, mais cela ne rend pas la bière plus sensible à l'oxydation³¹.

4 Méthodes d'analyses des composés phénoliques

4.1 Extraction

La voie principale d'obtention des composés phénoliques est l'extraction des produits végétaux : fruits, légumes, céréales et plantes (feuilles, branches, racines). Le simple fait de faire macérer des végétaux dans de l'eau permet d'obtenir une solution contenant des composés phénoliques. Cependant des techniques modernes permettent d'extraire une quantité plus importante de composés phénoliques.

Avant extraction, les échantillons solides sont habituellement d'abord homogénéisés, ce qui peut être précédé d'une étape de lyophilisation ou de congélation à l'azote liquide, pour une meilleure conservation des composés à extraire et les échantillons liquides sont habituellement filtrés et/ou centrifugés⁶³.

4.1.1 Extraction liquide-liquide

Divers solvants comme le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'eau, l'acétate d'éthyle, l'éther diéthylique, etc. peuvent être utilisés⁶⁴. Mais l'extraction à l'acétate d'éthyle reste la méthode la plus largement utilisée pour l'extraction des composés phénoliques^{54,65,66}, même si la procédure d'extraction est classique. Le plus souvent, la force ionique de la solution à extraire est modifiée par ajout de chlorure de sodium et acidification à $\text{pH} < 2$ avant extraction. La plupart des composés phénoliques se retrouvent alors dans l'acétate d'éthyle qu'il est ensuite aisé d'éliminer sous vide afin de transférer la fraction phénolique correctement extraite dans le méthanol pour les analyses qualitatives et quantitatives ultérieures.

4.1.2 Extraction sur phase solide

Les extraits phénoliques peuvent être partiellement purifiés en utilisant des résines adsorbantes. Elles possèdent une structure de résine échangeuse d'ions mais sans site chimique actif greffé sur leur structure¹⁰. Leur squelette chimique poreux a la propriété d'adsorber certains types de molécules de manière similaire au charbon actif. Les résines les plus utilisées et les plus connues sont la PVPP⁶⁷ ou encore des résines basées sur des structures polyméthacrylate (XAD)⁶⁸. Les composés phénoliques ainsi adsorbés sur la résine sont ensuite élués à l'éthanol légèrement acidifié.

L'extraction en phase solide (solid phase extraction, SPE) est utilisée pour l'isolation et la concentration des composés phénoliques⁶⁹. Les composés de l'échantillon d'intérêt sont séparés des autres espèces par l'application de l'échantillon liquide sur un adsorbant solide approprié et par l'élution sélective des composés désirés⁷⁰. Dans la plupart des cas, l'adsorbant est de la silice sur laquelle des groupements C18 ont été greffés. L'échantillon et le solvant d'élution sont légèrement acidifiés.

4.2 Analyses

4.2.1 Analyses spectrophotométriques

De nombreuses méthodes spectrophotométriques ont été développées pour la quantification des composés phénoliques. La méthode de Folin-Denis est la méthode la plus largement utilisée pour la quantification des composés phénoliques totaux dans les plantes, mais la méthode de Folin-Ciocalteu est aussi largement utilisée⁶⁴. La méthode de la vanilline est utilisée pour la quantification des proanthocyanidines totales dans les plantes et les graines^{64,69}. Les réactifs des méthodes de Folin et de la vanilline ne sont pas spécifiques et peuvent interférer avec des substances absorbant dans l'UV telles que des protéines, des acides nucléiques et des acides aminés⁶⁹. Les méthodes spectroscopiques traditionnelles peuvent conduire à une surestimation des composés phénoliques présents dans les extraits en raison du chevauchement des réponses spectrales⁶⁴.

4.2.2 Analyses chromatographiques

Des techniques classiques de séparation comme la chromatographie gazeuse et la chromatographie sur couche mince peuvent être utilisées pour l'analyse des composés phénoliques. Cependant, ces techniques de séparation sont beaucoup moins utilisées que la chromatographie liquide pour la séparation des composés phénoliques et ne seront donc pas développées ici.

4.2.2.1 Chromatographie liquide

La présence des composés phénoliques dans les matrices alimentaires et les boissons telles que la bière, est généralement mise en évidence par des méthodes chromatographiques de chimie analytique telle que la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC). Ces méthodes sont,

de loin, les plus performantes et les plus utilisées pour la séparation et le dosage des composés phénoliques. Les séparations sont basées sur les polarités respectives des phases stationnaires utilisées, du solvant d'éluion et des composés phénoliques concernés et sont effectuées soit sur phase normale, soit sur phase inverse. La phase normale implique une chromatographie de composés phénoliques non polaires sur une phase stationnaire de silice avec éluion par un solvant apolaire. La phase inverse, qui est la plus couramment utilisées dans le monde des composés phénoliques, consiste en une phase mobile plus polaire que la phase stationnaire⁶⁴. L'échantillon injecté sera séparé grâce à un mécanisme de partition entre la phase stationnaire et la phase mobile et l'éluion sera basée sur la différence de polarité entre les différents composés du mélange.

Les composés phénoliques sont communément détectés, en sortie de colonne, en utilisant des détecteurs UV-visible, UV à barrette de diode (DAD) et de fluorescence UV^{69,71}. Les spectromètres de masse (MS) couplés à la HPLC sont couramment utilisés pour la caractérisation structurale des composés phénoliques⁷¹. Des informations supplémentaires sur la structure des composés peuvent également être obtenues par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)⁷¹.

4.2.2.2 Chromatographie liquide couplée à l'analyse de l'activité antioxydante

Les méthodes classiques d'identification de composés antioxydants dans des mélanges complexes impliquent généralement de longues procédures de fractionnement bio-guidée, suivie de l'identification des composés purifiés. De nouvelles méthodes d'analyses ont été conçues afin de non seulement séparer les composés phénoliques, mais aussi de déterminer leur potentiel d'activité fonctionnelle. Au cours des dix dernières années, plusieurs études sur l'analyse de l'activité antioxydante couplée à la HPLC ont été publiées^{72,73}.

4.2.2.2.1 Détection par chimiluminescence

Certaines études impliquent des interactions radicaux libres / substrats oxydables. L'activité antioxydante mesurée dans le système est liée à la compétition entre le substrat et l'antioxydant pour les radicaux libres. Des études de ce type ont été faites avec l'oxygène singulet, le peroxyde d'hydrogène et/ou l'anion superoxyde⁷⁴⁻⁷⁸. Ces essais sont basés sur la chimiluminescence initiée par les radicaux libres, mais utilisent des mécanismes d'initiation différents.

4.2.2.2 Détection par électrochimie

D'autres études impliquent la détection électrochimique comme méthode de détection de composés contenant un ou plusieurs groupes électroactifs tels que les antioxydants. La détection par électrochimie coulométrique implique l'utilisation d'un détecteur coulométrique multicanal pour obtenir des informations voltamétrique sur les composés élués de la colonne chromatographique⁷⁹. Pour chaque composé une réponse maximale est obtenue à une tension spécifique appelée potentiel dominant. La détection par électrochimie ampérométrique implique le fait que le potentiel d'oxydation d'un composé fournit une estimation de l'énergie nécessaire pour donner un électron : plus le potentiel d'oxydation est faible, plus le composé donne facilement un électron et plus l'activité antioxydante est élevée⁸⁰.

4.2.2.3 Détection impliquant un radical stable

Des études associent directement l'activité antioxydante à un potentiel d'oxydation et indiquent la facilité avec laquelle un antioxydant peut être oxydé par des radicaux libres. Les études les plus largement utilisées impliquent un radical coloré, relativement stable, comme le radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH*)⁸¹ ou le radical 2, 2-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS**)⁸², qui est ajouté, en post-colonne, au débit de HPLC. Les composés antioxydants sont alors détectés par une diminution de l'absorbance aux longueurs d'ondes visibles dues à la conversion des radicaux sous leurs formes réduites, non-colorées.

Le système HPLC pour la détection de l'activité antioxydante (LC-AOx), utilisant l'ABTS**, est destiné à cribler des composés ayant une activité antioxydante dans des extraits naturels d'une manière plus directe et plus rapide. Koleva *et al.* ont été les premiers à développer une méthode HPLC utilisant l'ABTS** pour la détection des radicaux libres dans des mélanges complexes de *Sideritis syriaca*⁸². Une comparaison de la sensibilité de cette méthode avec les méthodes du DPPH⁸¹ et de chimiluminescence⁷⁷ couplée à la HPLC a démontré que la méthode LC-AOx est la plus sensible et est moins analyte-dépendante que les deux autres. Le même système a été utilisé par Miliauskas *et al.* pour détecter des antioxydants de trois plantes différentes (*Geranium macrorrhizum*, *Potentilla fruticosa*, *Rhaponticum carthamoides*)⁸³⁻⁸⁵. Cano *et al.* ont décrit l'analyse de composés antioxydants très polaires tels que l'acide ascorbique provenant de jus d'orange ou de composés antioxydants non phénoliques, non polaires tels que le lycopène du jus de tomate⁸⁶. Cette équipe a souligné l'importance d'un temps de réaction d'au moins 1 minute pour obtenir une réaction complète de tous les antioxydants. Les données peuvent également être utilisées de manière quantitative par

construction d'une courbe de calibration (équivalent Trolox). Beekwilder *et al.* ont étudié les différentes étapes de maturation d'une variété de framboise et les fruits mûrs de 14 variétés de framboisiers par la méthode LC-AOx et plusieurs anthocyanines, ellagitannins et proanthocyanidines ont pu être identifiés⁸⁷. Cette équipe a notamment utilisé une longueur d'onde de détection de l'ABTS de 412 nm au lieu de 734 nm. La même méthode a été utilisée pour détecter les antioxydants de tomates⁸⁸ ou pour identifier, par combinaison de la capacité de réduction de l'ABTS avec les spectres UV et les temps de rétentions des différents composés, et quantifier, en équivalent Trolox, le potentiel antioxydant des thés vert et noir⁸⁹. La méthode LC-AOx a également été utilisée pour étudier les antioxydants des grains de café et identifier un grand nombre d'acides caffeoyl-, feruloyl- et dicaffeoylquinique (acide chlorogénique)⁹⁰. La sélectivité de la méthode a été bien illustrée par un chromatogramme d'un extrait de bois d'olivier dans lequel l'hydroxytyrosol, parmi d'autres composés, était difficilement observable par détection UV mais dont le pic dominait dans le profil antioxydant^{91,92}. Cassano *et al.* ont utilisé la méthode LC-AOx pour étudier l'influence du procédé de torréfaction sur l'activité antioxydante des grains de café⁹³. Le degré et la vitesse de torréfaction influence les propriétés antioxydantes des grains de café. Li *et al.* ont présenté pour la première fois la méthode LC-AOx couplée à la spectrométrie de masse pour l'identification de composés antioxydants d'un extrait d'*Angelica sinensis*⁹⁴. Les auteurs ont conclu que cette méthode était un outil puissant pour la détermination et l'identification rapide de composés antioxydants dans des extraits végétaux.

Concernant la bière, une étude de 2010 a permis de comparer les profils phénoliques et les activités antioxydantes de bières commerciales⁹⁵. Les auteurs ont analysé les corrélations entre les composés phénoliques individuels et totaux, et ont quantifié la contribution des différents composés phénoliques à l'activité antioxydante de la bière, mais n'ont pas utilisé de méthode de détection de l'activité antioxydante couplée à la HPLC. La méthode LC-AOx a alors été utilisée pour détecter et identifier les composés antioxydants à différentes étapes du procédé de la bière.

Chapitre 2 : Décoloration de la bière

1 Introduction

La couleur du moût, à l'origine de la couleur naturelle de la bière, est due principalement aux mélanoïdines et aux composés phénoliques de l'orge et du houblon. Cette couleur est un frein important au développement de produits innovants, comme par exemple des bières aux couleurs vives. Obtenir des couleurs attrayantes semble par conséquent être un objectif extrêmement difficile à atteindre en partant d'un liquide naturel (moût ou bière) dont la gamme de couleurs varie du jaune paille, dans le meilleur des cas, au marron foncé. Plusieurs facteurs interviennent dans le développement de la couleur de la bière dont le traitement subi par le malt et notamment le touraillage, responsable de la production de mélanoïdines par des réactions de Maillard, de produits de caramélisation, et de phlobaphènes colorés résultant de l'oxydation des composés phénoliques. L'élément majeur de la couleur du moût reste toutefois les composés phénoliques natifs, qu'ils proviennent du malt ou du houblon⁵. Le développement de techniques d'élimination des composés colorés du moût, permettrait d'améliorer la qualité technologique du moût par suppression de composés phénoliques, de glucanes et probablement aussi de certaines protéines qui, par complexation impliquant des liaisons hydrogènes, sont à l'origine de la formation de précipités et de troubles⁶², ce qui souvent complique certaines étapes délicates du procédé telles que la filtration. Ceci ouvrirait la voie au développement de nouvelles boissons maltées incolores d'un grand intérêt pour l'industrie brassicole.

La décoloration est une technique permettant d'éliminer la couleur, sans détériorer le produit, et d'obtenir un nouveau produit pouvant être recoloré de façon innovante. Elle est influencée par de nombreux facteurs physico-chimiques tels que, la nature de l'interaction composé coloré/adsorbant (adsorption ou échanges d'ions⁹⁶), la surface d'échange, la taille des particules adsorbantes, la température, le pH et le temps de contact⁹⁷. Le choix de l'adsorbant a donc toute son importance. Parmi les adsorbants les plus notoires, il y a **le charbon actif** dont l'utilisation est très courante dans la décoloration des eaux usées⁹⁸, mais qui peut également être utilisé pour la préparation de boissons maltées incolores et limpides. Word *et al.* ont ainsi réalisé la décoloration d'une bière maltée par mise en contact du moût bouilli non fermenté ou du produit fermenté avec le charbon actif⁹⁹. Dans les deux cas, 12 heures de contact au minimum ont été nécessaires à la décoloration. Rivera, Macapugay et De Carlos ont utilisé le charbon actif au cours du brassage à partir de la cuisson du moût ce qui a permis d'obtenir une période de contact supplémentaire et suffisamment longue pour décolorer le moût¹⁰⁰. Parmi les autres adsorbants les plus utilisés figure **la PVPP** qui est un polymère synthétique utilisé dans les procédés de décoloration de boissons riches en composés

phénoliques. Dans le cas de la bière, ces composés sont éliminés afin de prévenir la formation de complexes avec les protéines. Les mécanismes de formation de ces complexes sont similaires à ceux des complexes formés entre la PVPP et les composés phénoliques^{101,102}. **Les résines échangeuses d'ions** sont également utilisées dans les procédés de décoloration de boissons, telles que le vinaigre de vin¹⁰³. Ces résines peuvent être utilisées sous la forme de réacteurs régénérables au fonctionnement continu, ce qui permet d'automatiser le procédé de décoloration et de réduire la production de déchets solides. D'autres adsorbants, à faible coût, proviennent de déchets et sous-produits industriels et agricoles, il s'agit par exemple du chitosan, de la bentonite ou encore des rafles de maïs¹⁰⁴. **La chitine et le chitosan**, qui ont été utilisés comme adsorbants des composés phénoliques du vin¹⁰⁵, sont les deuxièmes polymères glucidiques naturels les plus abondants, derrière la cellulose. Ils sont produits à partir d'exosquelettes de crustacés tels que les crabes, les krills et les écrevisses, dont une grande quantité est disponible en tant que sous-produits de la transformation des aliments. **La bentonite**, une fine poudre d'argile, possède une grande surface spécifique ainsi qu'une grande capacité d'échange qui lui confère des propriétés adsorbantes notamment pour l'élimination des composés phénoliques à partir des eaux usées¹⁰⁶. **Les rafles de maïs** sont des déchets agricoles obtenus par broyage de la ceinture ligneuse des épis de maïs. Elles sont peu coûteuses, inertes, composées de grains homogènes et dépoussiérés, très riches en celluloses et hémicelluloses¹⁰⁷ (environ 80% de leur matière sèche), et sont utilisées comme adsorbants de composés colorés, par exemple dans l'industrie textile¹⁰⁸.

L'objectif de cette partie du travail est de mettre au point une technique d'élimination de la couleur naturelle de la bière qui serait appliquée avant ou après l'étape de fermentation. Pour cela, une large gamme d'adsorbants a été étudiée et leurs performances de décoloration ont été comparées. Une étude comparative entre le moût et la bière, a ensuite été réalisée afin d'évaluer, au niveau physico-chimique, l'influence de la décoloration sur la composition du moût et la qualité de la fermentation.

2 Matériel et méthodes

2.1 Réactifs, produits chimiques et matériels végétaux

Le charbon actif en poudre (DARCO KB-G et DARCO KB-WJ) et en granules (GAC), la bentonite, la chitine et le chitosan issus de carapaces de crabes, la PVPP, le kieselguhr, la carboxyméthylcellulose, l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et les acides 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique (acide férulique), 3,4-dihydroxycinnamique (acide caféique), 3,4,5-trihydroxybenzoïque (acide gallique), 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (acide vanillique), 3,4-dihydroxybenzoïque (acide protocatéchique), p-hydroxybenzoïque, chlorogénique, 4-hydroxycinnamique (acide p-coumarique), sinapique, m-coumarique et o-coumarique, ainsi que la catéchine et l'épicatéchine, de qualités HPLC, ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne). Les résines échangeuses d'ions Amberlite FPA98, FPA90, FPA40 et FPX68 ont été achetées chez Rhom and Haas (Paris, France). Les rafles d'épis de maïs EU GRITS 40/60, EU GRITS 100 et EU GRITS poudre ont été achetées chez EuroCob (Maubourguet, France). L'eau ultrapure est produite au laboratoire par un système de purification Synergy UV (Millipore, Molsheim, France). Le méthanol de qualité HPLC a été acheté chez VWR (Strasbourg, France). L'orge (*Hordeum vulgare*) malté, de variété Sunshine, provient de la micromalterie des Brasseries Kronenbourg (Strasbourg, France) où il a été brassé, puis fermenté pour former le moût et la bière de type Kronenbourg.

2.2 Brassage à l'échelle du laboratoire

Le malt (50 g) est moulu (Bühler Miag Disc Mill, DLFU, Etats-Unis), ajouté à 200 mL d'eau, puis maintenu à 45°C pendant exactement 30 minutes. La température du bain est ensuite augmentée de 1°C par minute pendant 25 minutes jusqu'à atteindre 70°C, puis maintenue pendant 1 h. Le moût obtenu est refroidi à température ambiante, puis filtré à travers un papier filtre Whatman n° 1 (Whatman, Paris, France).

2.3 Décoloration du moût

2.3.1 Choix de l'adsorbant

Les expériences de décoloration sont réalisées en utilisant 10 mL de moût (brassé à l'échelle du laboratoire) et 50 mg de différents adsorbants pendant 10, 20, 30, 60 et 120 minutes pour la détermination du temps de contact minimal et en utilisant 10 mL de moût et des adsorbants à différents concentrations de 0 à 10 g/L pendant 30 minutes pour la détermination de la concentration minimale en adsorbants, pour avoir le plus faible pourcentage d'adsorption. Les expériences sont réalisées dans des tubes de centrifugation en polypropylène Corning® (New York, USA) de 50 mL sur un agitateur giratoire (Fisher scientific, Illkirch, France) à 250 tr/min et à température ambiante. Après centrifugation des mélanges mûts-adsorbants (2500 g, 10 min), les surnageants obtenus sont filtrés (0,45 µm, Macherey-Nagel, Hoerdt, France) et l'absorbance du moût décoloré est mesurée à 430 nm (spectrophotomètre, Shimadzu, Champs-sur-Marne, France). Ces expériences sont répétées trois fois pour tous les adsorbants et les résultats sont exprimés en unité EBC de couleur selon le calcul suivant¹⁰⁹ :

$$\text{Couleur (EBC)} = \text{Absorbance}_{430\text{nm}} \times 25.$$

2.3.2 Décoloration du moût au charbon actif

Dix litres de moût de type Kronenbourg sont mélangés à 50 g de Kieselguhr et 100 g de charbon actif KB-WJ, puis agités pendant 30 min à 250 tr/min à température ambiante. Un filtre à Kieselguhr avec une membrane (5 µm, Millipore) est d'abord alluvionné avec 50 g de Kieselguhr dans 5 L d'eau distillée, puis le mélange (moût, Kieselguhr et charbon actif KB-WJ) est filtré, afin d'obtenir un moût décoloré.

2.3.3 Fermentation du moût décoloré

Les mûts non décoloré et décoloré au charbon actif KB-WJ sur le filtre à Kieselguhr, de 14°Plato de densité, sont fermentés, à 14°C, par des levures de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*,ensemencées à $1,4 \cdot 10^7$ cellules par mL de moût. Cette cible d'ensemencement a été déterminée comme nous avons pu le voir dans la partie 1.5 du chapitre 1. Le pH d'un moût décoloré (pH=4,29)

est ajusté à pH=5,04, pH du moût non décoloré, avec de la soude 1 M, préalablement à la fermentation.

La fermentation a été réalisée en utilisant 2 L de moût, pré-aéré pendant 30 min à température ambiante par saturation à l'air, soufflé dans le moût. Elle a également été réalisée avec 20 L de moût et une aération par saturation à l'oxygène dont l'utilisation cumule deux avantages : une grande efficacité d'aération (rapidité) et un débit très faible, ce qui évite la formation de mousse. Le débit d'oxygène est maintenu jusqu'à l'obtention de la cible d'aération qui correspond aux 100% sur la sonde de pression d'oxygène, préalablement étalonnée à 11 ppm d'O₂.

2.4 Décoloration de la bière

De la bière de type Kronenbourg est produite en fermentant 20 L de moût non décoloré. Une décoloration est ensuite réalisée comme nous l'avons vu précédemment pour le moût : dix litres de bière sont mélangés à 50 g de Kieselguhr et 100 g de charbon actif KB-WJ, puis agités pendant 30 min à 250 tr/min à température ambiante. Un filtre à Kieselguhr avec une membrane (5 µm, Millipore) est d'abord alluvionné avec 50 g de Kieselguhr dans 5 L d'eau distillée, puis le mélange (bière, Kieselguhr et charbon actif KB-WJ) est filtré, afin d'obtenir une bière décolorée.

2.5 Effet de la décoloration sur les propriétés physico-chimiques du moût et de la bière

2.5.1 Analyse des composés phénoliques

2.5.1.1 Dosage colorimétrique des composés phénoliques totaux

Les composés phénoliques totaux sont dosés grâce à la méthode de la réaction colorée avec le citrate de fer en milieu alcalin (protocole EBC n° 9.11)^{110,111}. L'intensité de la coloration est lue à 600 nm et est proportionnelle à la concentration en composés phénoliques. Une solution est préparée par mélange de 10 g de carboxyméthylcellulose pure et de 2 g d'EDTA dans un volume de 800 mL d'eau distillée, puis agitation pendant une nuit jusqu'à dissolution complète. Le volume est ensuite ajusté à 1 L avec de l'eau distillée (solution A). Une deuxième solution (solution B) est préparée avec 3,5 g de citrate de fer ammoniacal, dissous dans 100 mL d'eau distillée. La solution est conservée à l'abri de la lumière et est renouvelée tous les jours. Une troisième solution (solution C) est préparée

avec 30 mL d'ammoniaque pur concentré mélangés à 60 mL d'eau distillée, puis conservée à 4°C à l'abri de la lumière pendant 1 mois. Une solution essai (10 mL de solution d'échantillon, 8 mL de solution A, 0.5 mL de solution B et 0.5 mL de solution C) et un blanc (10 mL de solution d'échantillon, 8 mL de solution A et 0.5 mL de solution C) sont préparés, puis ajustés à 25 mL avec de l'eau distillée. Au bout de 10 minutes, l'absorbance est lue à 600 nm contre de l'eau distillée et les valeurs obtenues converties en mg de composés phénoliques par litre de solution selon le calcul suivant ¹¹¹:

$$\text{Composés phénoliques (mg/L)} = [A_{\text{Essai}} - A_{\text{Blanc}}] \times 820$$

(A_{Essai} : Absorbance de l'essai ; A_{Blanc} : Absorbance du blanc).

2.5.1.2 Extraction et analyse chromatographique des composés phénoliques

Les expériences d'adsorption sont réalisées dans des tubes de centrifugation Corning® (New York, USA) de 50 mL contenant 9 mL d'eau auxquels sont rajoutés 1 mL d'un mélange de composés phénoliques à 150 µM chacun préparé dans un mélange méthanol/H₂O (50/50 ; v/v) et 100 mg de charbon actif KB-WJ. Le mélange est agité dans un agitateur giratoire à 250 tr/min pendant 30 minutes à température ambiante, puis centrifugé à 2500 g pendant 10 min. Le surnageant obtenu est évaporé à sec dans un évaporateur sous vide à froid (Savant SPD121P SpeedVac® Concentrator, ThermoScientific, Gometz le Châtel, France) et le résidu est dissous dans 1 mL de méthanol/eau (50/50 ; v/v), filtré sur membrane (0,45 µm, Macherey-Nagel) et injecté (20 µL) dans un système HPLC, constitué d'un contrôleur 600S, d'une pompe 616, d'un injecteur automatique 717 Plus et d'un détecteur UV-visible à photodiode 2996 (Waters, Saint-Quentin-Fallavier, France). Les séparations sont réalisées à température ambiante sur une colonne de chromatographie C18 Hypersil BDS (5 µm, 250 x 4,6 mm, ThermoScientific). La phase mobile, délivrée à 1 mL/min, consiste en un mélange d'eau (0,1% [v/v] d'acide formique) (éluant A) et de méthanol (éluant B) selon le gradient suivant: 0-25 min, 3-25% de B; 25-26 min, 25-18% de B; 26-29 min, 18% de B; 29-47 min, 18-30% de B; 47-57 min 30% de B; 57-67 min, 30-65% de B; 67-77 min, 65% de B, 77-78 min, 65-3% de B, 78-90 min 3% de B. La détection UV est réalisée à 254 nm. Les expériences sont répétées trois fois.

2.5.2 Analyses de routine selon les protocoles Analytica EBC

Les différentes méthodes d'analyses des moûts et des bières sont faites en routine au Laboratoire Centrale des brasseries Kronenbourg selon les méthodes Analytica EBC¹¹² : protocole n° 8.13.2, 9.2.1, 9.6, 9.7, 9.9.2, 9.10, 9.11, 9.12, 9.24.1, 9.26, 9.27, 9.35. Les méthodes correspondantes aux composés décrits sont détaillées ci-après.

2.5.2.1 Acides aminés libres

Les échantillons de moût ou de bière, filtrés sur membrane (0,20 µm), sont injectés (0,5 µL) dans un système HPLC (Waters). Les séparations sont réalisées sur une colonne de chromatographie ODS hypersil (5µm, 100 x 2,1 mm, ThermoScientific) en phase inverse chauffée à 40°C. Les acides aminés primaires, après traitement au fluoraldéhyde (20 µL, Merck), sont amenés en tête de colonne par la phase mobile qui consiste en un mélange d'eau (acétate de sodium 0,1 M, pH=8, Merck, Darmstadt, Allemagne) (éluant A) et de méthanol (éluant B) à un débit de 0,02 mL/min. Après un temps de réaction d'une minute, le débit passe à 0,35 mL/min et la séparation commence selon le gradient suivant : 0-5 min, 5-15% de B; 5-10 min, 15-25% de B; 10-13 min, 25-35% de B; 13-18 min, 35-55% de B; 18-20 min, 55-75% de B, 20-21 min, 75-5% de B, 21-30 min 5% de B. La détection UV est réalisée à 338 nm. Quinze acides aminés sont couramment étudiés dans la bière, leur ordre d'élution est le suivant : acide aspartique ; acide glutamique ; sérine ; histidine ; glycine ; thréonine ; arginine ; alanine ; tyrosine ; méthionine ; valine ; phénylalanine ; isoleucine ; leucine et lysine. Les acides aminés sont identifiés et quantifiés sur la base des temps de rétention des surfaces des pics des étalons. Vingt mesures sont réalisées par analyse. Le résultat est donné par le calcul suivant :

$$R (\mu\text{mol/L}) = (S_p/S_x) * M_x$$

(Sp : surface du pic échantillon, Sx : surface du pic étalon, Mx : concentration en µmol/L du pic étalon)

2.5.2.2 Sucres fermentescibles

Les échantillons de moût ou de bière, dégazés par agitation avec un barreau magnétique puis filtrés (0.22 µm), sont injectés (10 µL) dans un système de HPLC (Waters). La séparation des sucres

est réalisée à 40°C sur une colonne de chromatographie Asahipak NH₂ (5µm, 250mm x 4.6 mm, Interchim, Montluçon, France) pendant 20 min. La phase mobile consiste en un mélange isocratique d'eau (30%) et d'acétonitrile (70%, VWR) à 1 mL/min. La détection se fait par réfractométrie à 40°C. Le fructose, le glucose, le saccharose, le maltose et le maltotriose sont identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec ceux des étalons. Vingt mesures sont réalisées par analyse.

2.5.2.3 Minéraux

La teneur en minéraux des échantillons de moûts ou de bières est déterminée par un système de torche à plasma couplée à la Spectrométrie d'Emission Atomique (ICP-AES, *inductively coupled plasma by atomic emission spectrometry*) ICAP 6000 (Thermo Fisher Scientific). Avant l'analyse, les échantillons (2 mL), dégazés par agitation avec un barreau magnétique au moins 30 minutes à température ambiante, sont dissous dans un mélange acide contenant 2 mL d'acide nitrique (65%, Merck) et ajusté à 100 mL avec de l'eau distillée. L'analyse est réalisée entre 167 nm et 850 nm (315.887 nm et 422.673 nm pour le calcium, 285.213 nm pour le magnésium, 589.592 nm pour le sodium, 766.490 nm pour le potassium, 206.200 nm et 213.856 nm pour le zinc, 323.7 nm pour le cuivre et 238.204 nm et 259.940 nm pour le fer) après nébulisation des composés qui sont ensuite entraînés par un flux d'argon et injecté dans le plasma. Le solvant est évaporé et l'échantillon résiduel est décomposé en atomes et ions qui sont excités par l'énergie du plasma. Les minéraux (calcium, magnésium, sodium, potassium, fer, cuivre et zinc) ont été identifiés par comparaison de leur longueur d'onde avec celles des étalons (SCP Sciences, Courtaboeuf, France).

2.5.2.4 Couleur

Les échantillons sont traités et analysés selon la méthode décrite dans la partie 2.5.1.1.

2.5.2.5 Composés phénoliques totaux

Les échantillons sont traités et analysés selon la méthode décrite dans la partie 2.5.1.2.

2.5.2.6 Azote aminé libre

Les échantillons de bières et de moûts filtrés sur Whatman n° 1 (Whatman) sont distribués sur le plateau échantillonneur d'un analyseur à flux continu SKALAR SAN⁺⁺ (Breda, Pays-Bas) et décarboxylés par la ninhydrine (Merck) (10 g + 40 g d'acétate de sodium dans 500 mL d'eau distillée), en relarguant de l'ammoniaque. La ninhydrine réduite réagit avec la ninhydrine non réduite et l'ammoniac pour former un complexe coloré bleu jaune. L'addition d'iodate de potassium (2 g/L) stoppe la réaction et évite les réactions parasites. L'intensité de la coloration, mesurée à 570 nm, est proportionnelle à la teneur en azote aminé libre des échantillons et les résultats sont exprimés en mg/L.

2.5.2.7 Sucres totaux

La teneur en sucres totaux dans la bière ou le moût est déterminée par une méthode colorimétrique, grâce à un analyseur à flux continu SKALAR SAN⁺⁺ (Breda, Pays-Bas). Les échantillons de bières et de moûts filtrés sur Whatman n° 1 (Whatman) sont distribués sur le plateau échantillonneur et dilués dans l'acide chlorhydrique (400 ml de HCl à 37% dans 1 L d'eau distillée). Les sucres, hydrolysés à 95°C, sont mélangés à une solution de chlorure de sodium (36 g/L, Merck), puis dialysés contre une solution de carbonate de sodium (26,5 g/L, Merck). Les échantillons sont alors additionnés d'un réactif formé d'un mélange de néocuproïne et de cuivre (200 mg de chlorhydrate de néocuproïne, 100 mg de sulfate de cuivre, ajusté à 500 mL avec de l'eau distillée) (Merck) et à 97°C, les sucres réducteurs présents réduisent le complexe cuivre-néocuproïne pour former un complexe coloré jaune. L'intensité de la coloration, mesurée à 460 nm, est proportionnelle à la teneur en sucres des échantillons et les résultats sont exprimés en g/L.

2.5.2.8 Atténuation limite

L'atténuation limite, obtenue lorsque tous les sucres fermentescibles sont fermentés, permet de connaître la capacité maximum de fermentation d'un moût. Elle est calculée grâce à l'extrait limite qui correspond à la densité de la bière après mesurée après une fermentation avec agitation pour transformer rapidement les sucres fermentescibles en l'alcool. On mesure une densité apparente à 20°C (densité 20/20) au densimètre électronique qui déterminera l'extrait du moût ou de la bière après fermentation en g pour 100 g de moût et convertie en atténuation limite selon le calcul suivant :

$$A.L.en \% = \frac{\text{Extrait Primitif} - \text{Extrait Limite}}{\text{Extrait Primitif}} * 100$$

A.L. : Atténuation Limite ; Extrait primitif : densité du moût de départ ; extrait limite : densité du moût mesurée après fermentation)

2.5.2.9 *β*-glucanes solubles

La teneur en *β*-glucanes solubles dans les moûts et les bières est déterminée sur une chaîne à flux continu SKALAR SAN⁺⁺ (Breda, Pays-Bas). Les moûts et les bières sont dilués avec de l'eau distillée puis mélangés à un réactif au Calcofluor (Sigma) qui se lie aux *β*-glucanes. L'intensité de fluorescence de ce complexe calcofluor-*β*-glucanes, mesurée à 425 nm, est proportionnelle à la teneur en *β*-glucanes des échantillons pour une longueur d'onde d'excitation à 365 nm et les résultats sont exprimés en mg/L.

2.5.2.10 Volatils

Les composés volatils du moût et de la bière (l'acétaldéhyde, l'ethylacétate, le propanol, l'isobutanol, l'isoamylacétate et l'alcool isoamylique) sont analysés par chromatographie en phase gazeuse avec un système d'injection à espace de tête (headspace HS 40, Perkin Elmer Courtaboeuf, France) chauffé à 50°C. Les échantillons sont séparés sur une colonne CP-WAX 52 CB (25 m x 0,53 mm, 2 μ m, Varian) soumise à un gradient de température comme décrit ci-après : 2,5 min à 55°C, puis une augmentation de la température jusqu'à 90°C (8°C/min). Le gaz vecteur utilisé est l'hélium avec un débit fixé à 11 mL/min. La flamme du détecteur nécessite de l'air et de l'hydrogène. Les températures de l'injecteur et du détecteur par ionisation de flamme FID sont de 150°C et 250°C, respectivement. Les composés volatils ont été identifiés et quantifiés à l'aide d'un étalonnage réalisé avec des solutions étalons (Merck) contenant des concentrations connues de chacun des composés analysés.

2.5.2.11 Diacétyle et 2,3-pentanedione

L'analyse de ces deux composés se fait par chromatographie en phase gazeuse avec système d'injection à espace de tête et détection par capture d'électrons. Les échantillons de bière sont séparés sur une colonne de type Carbowax 20M à 10% sur Chromosorb PAW 80-100 mesh de

dimensions 4 m x 0,125 mm (Varian). La température initiale du four est fixée à 90°C isotherme. Le mélange argon/méthane (90/10) est utilisé comme gaz vecteur avec un débit fixé à 15 mL/min et comme gaz détecteur dans le détecteur à capture d'électrons (Ni 63) (Varian). La température de l'injecteur et du détecteur est de 150°C. Les composés volatils ont été identifiés et quantifiés à l'aide d'un étalonnage réalisé avec des solutions étalons (Sigma) contenant des concentrations connues de chacun des composés analysés.

2.5.2.12 Populations de levures

La détermination du nombre total de cellules dans un échantillon se fait au microscope grâce à une cellule de Malassez. L'échantillon de bière contenant les levures est agité afin d'homogénéiser les levures et de les séparer les unes des autres, puis une suspension de levure est déposée entre la cellule de Malassez et une lamelle. Après avoir placée la cellule sous le microscope (la combinaison oculaire-objectif doit réaliser un grossissement d'environ 500 fois), toutes les levures des cinq rectangles de la diagonale de la cellule sont comptées. Après avoir fait la moyenne du nombre de levures dans les rectangles comptés, on obtient le nombre de levures dans un volume de 1/100 mm³, exprimé en nombre de cellules/mL.

3 Résultats et discussion

3.1 Décoloration du moût

3.1.1 Effet du temps de contact des adsorbants

La couleur du moût en EBC a été mesurée après sa mise en contact avec différents adsorbants (KB-G, FPA40, PVPP, Chitosan, EU GRITS 40/60) à 5 g/L pendant des temps variables. La **Figure 2.1**, représente la couleur résiduelle du moût après différentes durées de traitement décolorant exprimée en pourcentage par rapport à la couleur initiale (100%). Comme on peut le voir, l'intensité de la couleur du moût diminue pour atteindre une valeur constante au bout d'un temps relativement court au-delà duquel la couleur n'est plus éliminée. L'intensité de couleur du moût obtenue à l'équilibre reflète la capacité maximale de décoloration des adsorbants dans ces conditions.

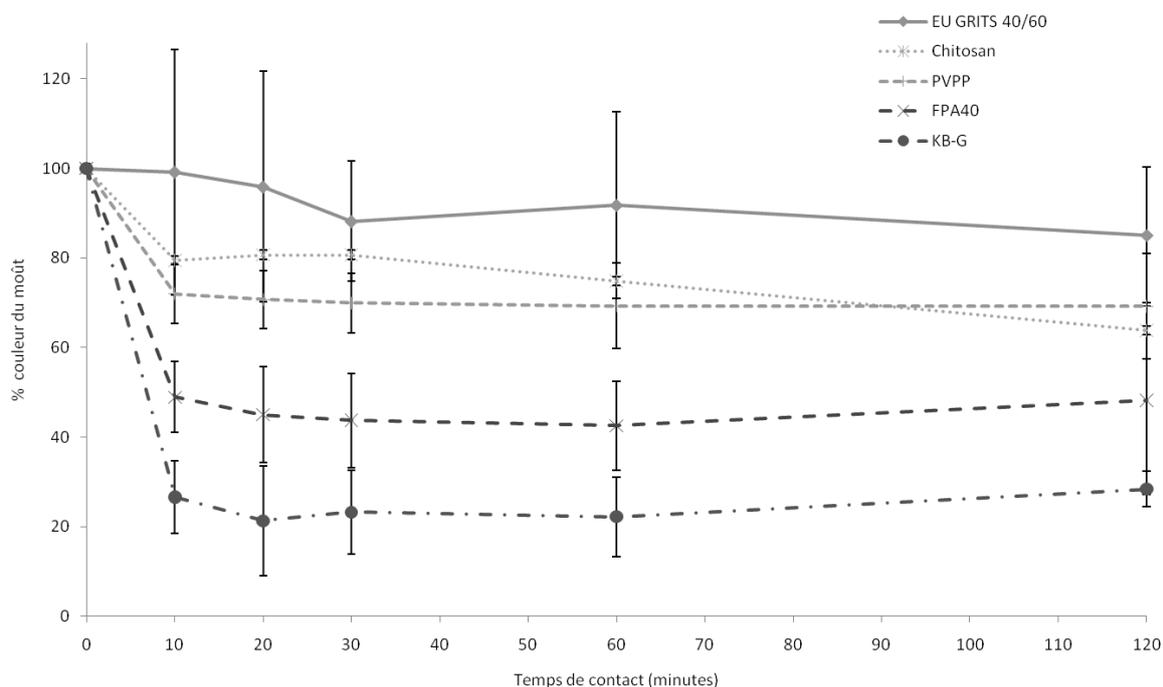


Figure 2.1 : Effet du temps de contact de différents adsorbants sur la couleur du moût (%)

Il apparaît ainsi qu'après 10 min de temps de contact entre le moût et le charbon actif (KB-G), la résine (FPA40), la PVPP et le chitosan, la couleur résiduelle du moût correspond, respectivement, à $27\pm 8\%$, $49\pm 8\%$, $72\pm 7\%$ et $80\pm 0\%$ de la couleur initiale. Pour ces adsorbants, l'équilibre semble avoir été atteint après 10 min de contact, voire bien avant, puisque des essais réalisés entre 0 et 10 min ont montré que l'adsorption des composés colorés pourrait être instantanée. Dans le cas du chitosan, une légère diminution de la couleur du moût a toutefois été observée au-delà de 30 min. Concernant l'EU GRITS 40/60, un temps de contact de 30 min est nécessaire pour atteindre une couleur relativement stable à $88\pm 13\%$. Ces deux adsorbants semblent adsorber plus lentement les composés colorés du moût. En effet, ce sont des polymères de grandes tailles qui ont une faible affinité pour ces composés¹¹³. Cela pourrait expliquer une adsorption plus lente, dans les conditions utilisées (concentration de l'adsorbant, temps de contact, température) par rapport aux autres adsorbants testés. En tenant compte de tous ces résultats, 30 min de temps de contact ont été choisis pour la suite des expériences.

3.1.2 Effet de la concentration en adsorbants

La **Figure 2.2** montre l'effet, sur la couleur du moût, d'adsorbants à différentes concentrations (0, 0,5, 2 et 10 g/L) et après un temps de contact de 30 min. Les adsorbants testés sont : le charbon actif (**Figure 2.2a**) ; la chitine, le chitosan et la bentonite (**Figure 2.2b**) ; les résines (**Figure 2.2c**) et les rafles de maïs (**Figure 2.2d**).

Les résultats montrent qu'avec l'augmentation de la concentration en adsorbant, l'intensité de la couleur résiduelle du moût diminue jusqu'à atteindre une valeur minimale à 10 g/L. En augmentant la quantité d'adsorbant, le nombre de sites d'adsorption disponibles augmente et, avec cela, l'efficacité de la décoloration^{113,114}. La capacité décolorante du GAC, du chitosan, de la chitine, de la bentonite et de l'EU GRITS poudre est visiblement très faible, puisqu'à 10 g/L, la couleur résiduelle du moût est encore, respectivement, de $92\pm 3\%$, $93\pm 6\%$, $94\pm 4\%$, $90\pm 4\%$ et $96\pm 3\%$ (**Figure 2.2a, b et d**). Les résultats sont à peine meilleurs avec le FPX68 et l'EU GRITS 40/60, avec une couleur résiduelle du moût de $87\pm 2\%$ et $88\pm 1\%$, respectivement, à 10 g/L (**Figure 2.2c et d**). Pour le FPA40, le FPA98, l'EU GRITS 100 et le FPA90, l'intensité de la couleur du moût diminue jusqu'à $71\pm 2\%$, $72\pm 2\%$, $74\pm 6\%$ et $75\pm 1\%$, respectivement, à 10 g/L (**Figure 2.2c et d**). La PVPP, le KB-G et le KB-WJ semblent être les adsorbants les plus efficaces avec des valeurs respectives de couleur résiduelle de $47\pm 3\%$, $25\pm 1\%$ et $8\pm 1\%$ à 10 g/L (**Figure 2.2a**).

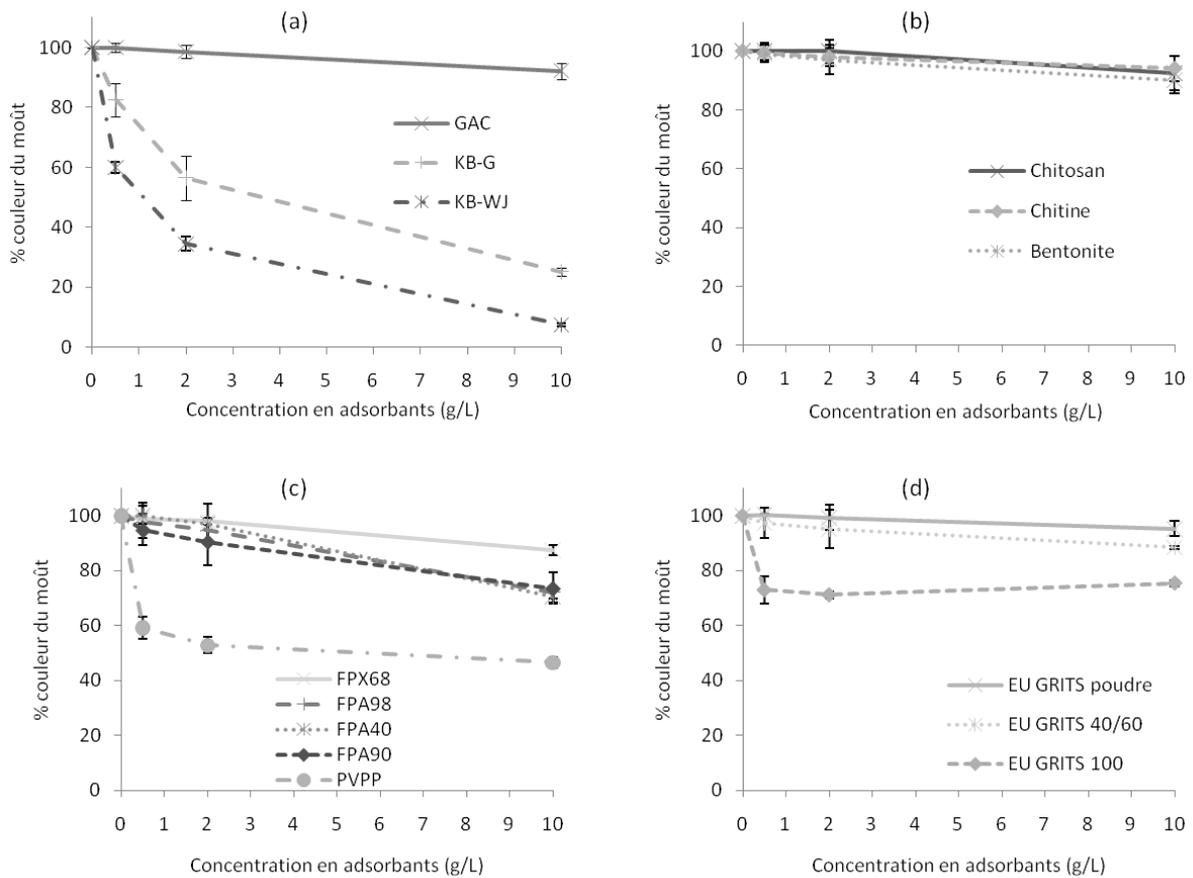


Figure 2.2 : Effet de la concentration de différents adsorbants sur la couleur du moût (%) : (a), le charbon actif KB-WJ, KB-G et GAC; (b), la chitine, le chitosan et la bentonite; (c), les résines PVPP, FPA98, FPA90, FPA40 et FPX68; (d), les rafles de maïs EU GRITS 100, 40/60 et poudre.

Un classement des différents adsorbants suivant leur capacité de décoloration est donné dans le **Tableau 2.1**. Ceux-ci peuvent ainsi être classés de la façon suivante, du plus fort pouvoir décolorant au plus faible : KB-WJ > KB-G > PVPP > FPA40 > FPA98 > FPA90 > EU GRITS 100 > FPX68 > EU GRITS 40/60 > bentonite > GAC > chitosan > chitine > EU GRITS poudre.

Tableau 2.1 : Capacité de décoloration du moût de différents adsorbants à 10 g/L

Adsorbant	Capacité de décoloration (%) (10 g/L)
KB-WJ	92 ± 1
KB-G	75 ± 1
PVPP	53 ± 3
FPA40	29 ± 2
FPA98	28 ± 2
FPA90	26 ± 6
EU GRITS 100	25 ± 1
FPX68	13 ± 2
EU GRITS 40/60	12 ± 1
Bentonite	10 ± 4
GAC	8 ± 3
Chitosan	7 ± 6
Chitine	6 ± 4
EU GRITS poudre	4 ± 3

3.1.3 Effet de la décoloration du moût sur la quantité de composés phénoliques totaux

L'effet d'un traitement décolorant de 30 min avec chacun des différents adsorbants (0, 0,5, 2 et 10 g/L) sur la teneur en composés phénoliques totaux a été étudié. Le pourcentage en composés phénoliques résiduels a été calculé en comparant les quantités de composés phénoliques avant et après traitement décolorant. Il apparaît que, pour toutes les phases testées, lorsque la concentration en adsorbant augmente, la teneur en composés phénoliques totaux diminue (**Figure 2.3**). Cette diminution se fait de manière parallèle à celle de la couleur du moût, ce qui confirme que l'intensité de la couleur du moût est étroitement liée à la présence des composés phénoliques⁵. D'un autre côté, les adsorbants dont la capacité de décoloration du moût est la plus élevée sont aussi ceux qui ont le plus fort impact sur la teneur des composés phénoliques totaux. Ainsi, le FPX68 (**Figure 2.3h**), l'EU GRITS 40/60 (**Figure 2.3i**), la bentonite (**Figure 2.3j**), le GAC (**Figure 2.3k**), le chitosan (**Figure 2.3l**), la chitine (**Figure 2.3m**) et l'EU GRITS poudre (**Figure 2.3n**) sont très peu efficaces pour l'adsorption des composés phénoliques totaux. Le FPA40 (**Figure 2.3d**), le FPA98 (**Figure 2.3e**), le FPA90 (**Figure 2.3f**) et l'EU GRITS 100 (**Figure 2.3g**) sont moyennement efficaces. Et, comme pour la décoloration, le KB-WJ (**Figure 2.3a**) est l'adsorbant le plus efficace lorsqu'il s'agit de fixer les composés phénoliques totaux, suivi par le KB-G (**Figure 2.3b**) et la PVPP (**Figure 2.3c**).

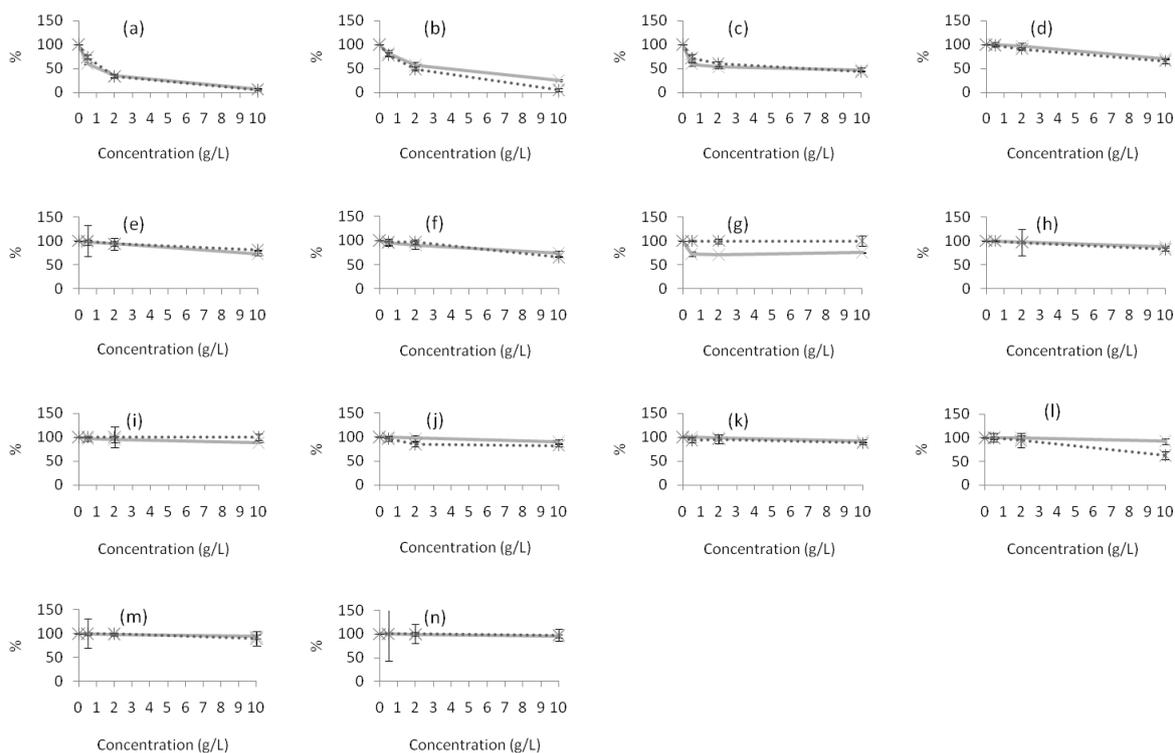


Figure 2.3 : Evolution de la couleur du moût et de la quantité de composés phénoliques en fonction de la concentration en adsorbant : (a), KB-WJ; (b), KB-G; (c), PVPP; (d), FPA40; (e), FPA98; (f), FPA90; (g), EU GRITS 100; (h), FPX68; (i), EU GRITS 40/60; (j), bentonite; (k), GAC; (l), chitosan; (m), chitine et (n), EU GRITS poudre.

—: Couleur du moût (%)

-----: Quantité de composés phénoliques (%)

3.1.4 Extraction des composés phénoliques par le charbon actif

Les résultats précédents ont montré que le charbon actif KB-WJ était l'adsorbant le plus efficace pour fixer les composés phénoliques. Afin de savoir quels sont les composés phénoliques ayant le plus d'affinité pour cette phase, un mélange d'étalons phénoliques représentatif des composés présents dans la bière a été utilisé (Chapitre 1 2.1). Il s'agit de treize composés phénoliques, à concentrations équimolaires, qui ont été mis en contact avec 10 g/L de KB-WJ pendant 30 min. Le mélange a ensuite été centrifugé afin de déterminer la quantité résiduelle de composés phénoliques dans le surnageant, permettant ainsi d'évaluer la quantité de composés adsorbés par le KB-WJ. La capacité d'adsorption des composés phénoliques, exprimée en pourcentage, a été obtenue par le rapport entre la teneur en composés phénoliques retrouvée dans le surnageant et la teneur de départ. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 2.2**.

Tableau 2.2 : Capacité d'adsorption des composés phénoliques par le charbon actif KB-WJ.

Adsorbant	Capacité d'adsorption (%)
Acide gallique	100,0 ± 0,0
Acide protocatéchuique	99,3 ± 0,1
Acide p-hydroxybenzoïque	99,2 ± 0,1
Catéchine	100,0 ± 0,0
Acide chlorogénique	100,0 ± 0,0
Acide vanillique	99,6 ± 0,0
Acide caféique	100,0 ± 0,0
Epicatéchine	100,0 ± 0,0
Acide p-coumarique	100,0 ± 0,0
Acide férulique	99,8 ± 0,2
Acide sinapique	100,0 ± 0,0
Acide m-coumarique	99,9 ± 0,1
Acide o-coumarique	100,0 ± 0,0

Parmi les composés phénoliques testés, les acides gallique, chlorogénique, caféique, p-coumarique, sinapique, o-coumarique, la catéchine et l'épicatéchine sont adsorbés à 100% sur le charbon actif KB-WJ. Les résultats sont légèrement inférieurs avec les acides protocatéchuique, p-hydroxybenzoïque, vanillique, férulique et m-coumarique avec une capacité d'adsorption sur le KB-WJ, respectivement, de 99,3%, 99,2%, 99,6%, 99,8% et 99,9%. Des facteurs comme la structure chimique, la solubilité et la taille des molécules jouent un rôle important dans la capacité d'adsorption des composés phénoliques par le charbon actif¹¹⁵. En particulier, il a été montré que le rôle de la solubilité était prépondérante dans l'adsorption des acides gallique, syringique et p-hydroxybenzoïque sur un charbon actif, les composés les plus solubles dans l'eau étant, moins adsorbés¹¹⁶. Par ailleurs, le mélange et l'adsorption combinée de différents composés semblent améliorer l'adsorption de certains d'entre eux, par rapport aux adsorptions séparées¹¹⁶. Ceci pourrait avoir contribué à l'excellente performance du charbon actif KB-WJ qui apparaît donc être un très bon adsorbant pour les composés phénoliques de la bière. Finalement, le KB-WJ a montré la plus grande efficacité d'adsorption des composants du moût responsables de sa couleur caractéristique, et qui sont essentiellement constitués de composés phénoliques. La décoloration de la bière par le KB-WJ aura donc nécessairement un impact sur ces derniers qu'il va falloir déterminer. Par ailleurs, le KB-WJ pourrait être très efficace pour l'extraction des composés phénoliques d'un point de vue analytique.

3.2 Fermentation du moût décoloré

Afin d'évaluer l'impact éventuel du procédé de décoloration sur la fermentescibilité du moût, des essais de fermentation ont été conduits sur un moût décoloré à environ 90% au charbon actif KB-WJ (**Figure 2.4**). Le pH du moût décoloré (pH=4,29) étant plus faible que celui d'un moût non décoloré (pH=5,04), un essai a également été réalisé avec un moût décoloré dont le pH a été ajusté à 5,04.

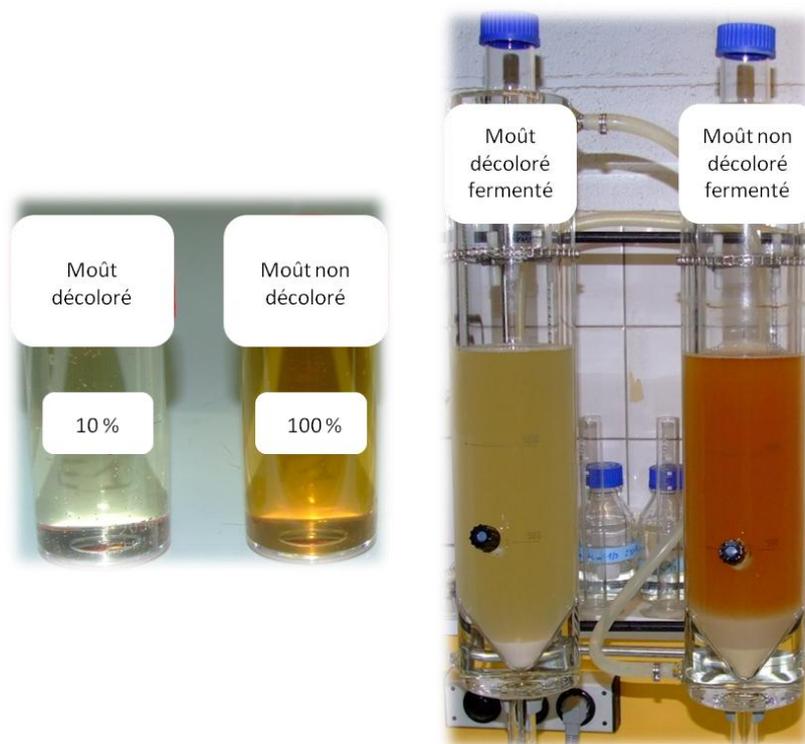


Figure 2.4 : Moûts décoloré (10%) et non décoloré (100%) avant et après fermentation.

Les premiers essais de fermentation dans un volume de 2 litres ont montré qu'il était possible de fermenter un moût décoloré, mais des essais de dégustation effectués aux Brasseries Kronenbourg, notant principalement l'intensité globale de la bière, le sucré, l'amer ou les faux goûts, ont révélé que le produit final n'avait pas toutes les propriétés sensorielles caractéristiques de la bière (**Figure 2.4**). La bière issue du moût décoloré au pH ajusté avait toutefois un goût moins acide.

Une fermentation à une échelle de production plus grande (un volume de 20 litres) a permis de confirmer ces résultats. Par ailleurs, pendant cette fermentation, divers paramètres ont été suivis

dont la densité (**Figure 2.5a**), la population de levures (**Figure 2.5b**), le pourcentage (v/v) d'alcool produit (**Figure 2.5c**) et les deux précurseurs d'arômes diacétyle (2,3-butanedione)¹¹⁷ et 2,3-pentanedione, responsables du faux-goût «beurre rance» de la bière et donc non désirables (**Figure 2.5d**). La fermentation est considérée comme terminée, une fois que la diminution de la densité ne dépasse plus 0,1°Plato par 24 h, toutefois la température de fermentation est maintenue tant que les taux du diacétyle et du 2,3-pentanedione sont supérieurs à 200 ppb, seuil de détection par l'homme.

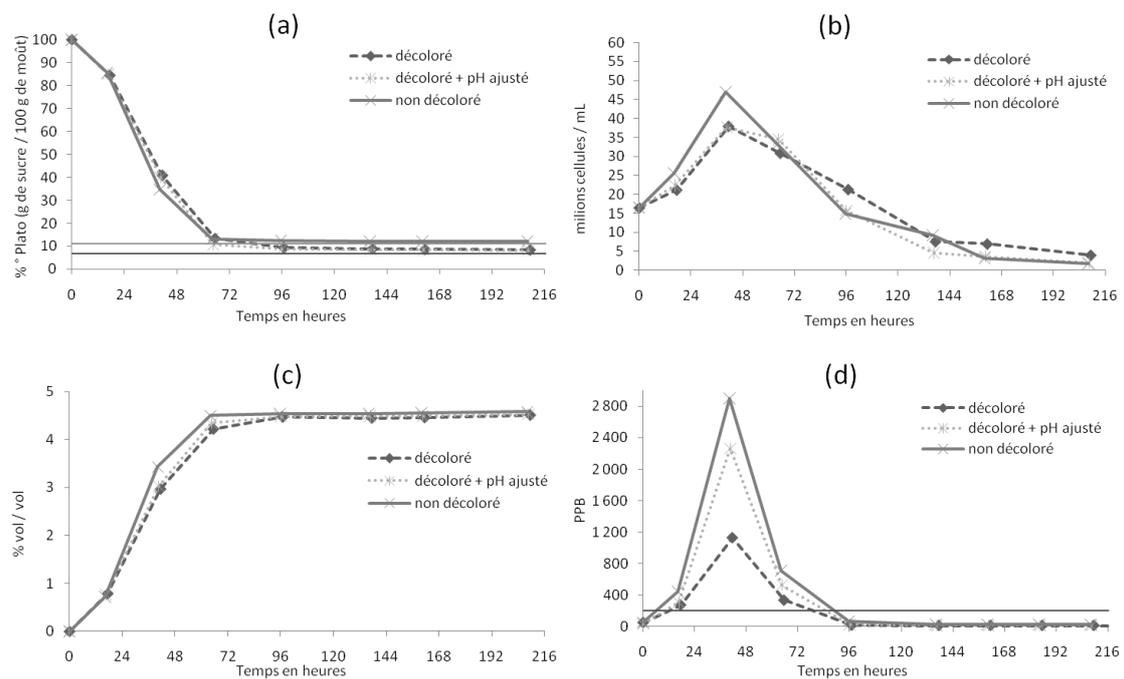


Figure 2.5 : Paramètres suivis au cours de la fermentation de moûts décoloré, décoloré au pH ajusté et témoin non décoloré : (a), densité du moût ; (b), population de levures « non déposées » ; (c), pourcentage d'alcool ; (d), quantité de diacétyle et de 2,3-pentanedione.

Au cours de la fermentation, la densité des trois moûts étudiés diminue à la même vitesse pour atteindre une valeur d'environ 13% à 65 heures et une valeur finale (densité limite) de 8,26% pour les moûts décolorés et de 11,19% pour le moût non décoloré (**Figure 2.5a**). Cette densité limite, ou limite de fermentation, correspond au pourcentage de sucres non-fermentescibles et donc encore présents dans le moût à la fin de la fermentation. Le pourcentage (v/v) d'alcool, dont l'évolution est inversement proportionnelle à la densité du moût, atteint 4,5% pour le moût non

décoloré et environ 4,25% d'alcool pour les moûts décolorés à 65 h de fermentation, puis 4,5% pour les trois moûts à la fin de la fermentation (**Figure 2.5c**).

Les populations de levures « non déposées » correspondent aux cellules en suspension, prélevées à mi-hauteur du fermenteur, celui-ci n'étant pas sous agitation, celles qui flocculent et sédimentent dans le fond ne sont pas comptabilisées. Les populations se développent et évoluent de façon identique au cours de la fermentation des différents moûts (**Figure 2.5b**). Au cours des quarante premières heures de la fermentation, les levures entrent en période de croissance exponentielle pour atteindre, à 40 h, un pic d'environ 38 millions de cellules/mL pour les moûts décolorés et de 47 millions de cellules/mL pour le moût non décoloré. Puis, les levures entrent en phase stationnaire, mais les populations de levures diminuent aussitôt pour les trois moûts jusqu'à atteindre, en fin de fermentation, 2 à 4 millions de cellules/mL, en raison de la tendance des cellules de levure à flocculer et sédimenter en absence d'agitation.

Les courbes correspondant au diacétyle et au 2,3-pentanedione représentent la somme des concentrations de ces deux composés qui évoluent de façon identique au cours de la fermentation des différents moûts (**Figure 2.5d**). Toutefois, la concentration de diacétyle et de 2,3-pentanedione à 40 h est plus faible pour le moût décoloré (1 132 ppb) que pour le moût non décoloré (2 898 ppb). Le pH semble jouer un rôle important dans cette différence, puisque quand celui du moût décoloré (pH=4,29) est ajusté au pH du moût avant décoloration (pH=5,04), la quantité de diacétyle et de 2,3-pentanedione produite est nettement plus élevée (2 263 ppb). La production de ces deux composés est donc plus faible lorsque le pH du moût est bas et le seuil de détection de 200 ppb est franchi plus rapidement (dès 70 h par rapport à 90 h). Pour les trois moûts étudiés néanmoins, les taux continuent de diminuer au delà de 96 h, pour atteindre 20 ppb après 200 h de fermentation.

Finalement, l'impact de la décoloration du moût sur le déroulement de la fermentation semble être très faible, dans la mesure où le léger ralentissement de la croissance de la population de levures ne se ressent pas sur la densité finale et le taux d'alcool de la bière. D'un autre côté, l'effet positif consistant en une plus faible production des précurseurs de diacétyle et 2,3-pentanedione se résorbe assez rapidement. Si l'on considère le fait, que la fermentation est typiquement arrêtée au bout d'une dizaine de jours (plus de 200 h), les effets observés n'auraient pas de réel impact sur la qualité du produit final.

3.3 Décoloration de la bière

Les paramètres optimaux de la décoloration, déterminés en utilisant le moût, à savoir le charbon actif KB-WJ à 10 g/L pendant 30 min, ont été appliqués à la bière (moût fermenté et filtré). La décoloration appliquée à la bière permet de ne pas influencer le déroulement de la fermentation et de ne pas avoir d'impact sur les métabolites de la bière au cours de la fermentation. Une étude comparative entre le moût et la bière, permettrait d'évaluer l'effet de l'étape de fermentation sur l'efficacité de la décoloration, mais aussi sur ses répercussions sur les constituants du moût. Les changements de la composition du moût suite aux activités métaboliques de la levure, pourront par ailleurs aider à expliquer les éventuelles différences.

3.4 Effet de la décoloration sur les propriétés physico-chimiques du moût et de la bière

Après avoir décrit les changements de paramètres grossiers caractéristiques du moût ou de la bière (couleur, alcool, densité, levures, ...) suite à la décoloration, nous pouvons maintenant examiner ces changements de manière plus détaillée au niveau physico-chimique.

En ce qui concerne les acides aminés, les résultats de l'analyse quantitative des acides aminés après la décoloration montrent très peu de changements sauf pour la méthionine, la tyrosine et la phénylalanine dont les concentrations respectives ne sont plus que de 81%, 64% et 64% suite à la décoloration du moût (**Tableau 2.3**). L'analyse des acides aminés de la bière avant et après décoloration montre des différences similaires à celle du moût, notamment pour la méthionine (35%), la tyrosine (80%) et la phénylalanine (78%) (**Tableau 2.3**).

La méthionine a comme particularité la présence d'une chaîne latérale avec un groupement sulfhydryle, la tyrosine et la phénylalanine sont des acides aminés aromatiques (la tyrosine est de nature phénolique)¹¹⁸, ces différences pourraient expliquer la forte adsorption de ces trois composés sur le charbon actif contrairement aux autres acides aminés.

Il apparaît toutefois que l'impact de la décoloration sur la composition en acides aminés de la bière est moins important lorsque ce procédé est appliqué au produit fini que lorsqu'il est appliqué au moût. En effet, la teneur totale en acides aminés est plus élevée pour la bière décolorée (95%) que pour la bière issue du moût décoloré (58%) proportionnellement à leurs témoins respectifs.

Tableau 2.3 : Effet de la décoloration du moût et de la bière sur la teneur pour 15 acides aminés exprimée en pourcentage de la teneur initiale dans le produit avant décoloration. Les résultats pour le moût décoloré puis fermenté sont également montrés.

Acides aminés	Groupe	Moût décoloré	Moût décoloré fermenté	Bière décolorée
Acide Aspartique	I	92	64	96
Acide Glutamique	I	99	56	97
Sérine	I	100	93	105
Histidine	II	100	15	94
Glycine	III	98	43	104
Thréonine	I	107	70	114
Arginine	I	93	82	104
Alanine	III	98	80	105
Tyrosine	III	64	130	80
Méthionine	II	81	11	35
Valine	II	100	44	104
Phénylalanine	III	64	48	78
Isoleucine	II	95	79	103
Leucine	II	98	27	105
Lysine	I	102	31	103

Gras, changements suite à la décoloration.

les acides aminés peuvent être classés en trois groupes selon leur ordre d'assimilation dans le moût¹¹⁹ (**Tableaux 2.3**) : l'assimilation des acides aminés du groupe I est immédiate et complète au bout 20 heures de fermentation, celle des acides aminés du groupe II est plus graduelle, alors que dans le groupe III, les acides aminés commencent à être assimilés à la fin de l'assimilation de ceux du groupe I.

Après la fermentation, il y a une diminution globale de la teneur en acides aminés liée à leur consommation par la levure. Cependant cette diminution est encore plus importante pour l'histidine (85%), la glycine (57%), la méthionine (89%), la valine (56%), la phénylalanine (52%), la leucine (73%) et la lysine (69%) dont les teneurs dans le moût décoloré fermenté sont inférieures à 50% de celle de la bière témoin (**Tableau 2.3**). *Saccharomyces cerevisiae* est capable de synthétiser des acides aminés nécessaires à sa croissance, à partir des sources d'azote présentes dans le milieu et, en absence de ces composés, elle puise directement les acides aminés disponibles dans le moût³³, ce qui pourrait expliquer la diminution des teneurs de certains acides aminés suite à la fermentation du moût décoloré.

Plusieurs autres paramètres ont également été suivis afin d'évaluer les répercussions de l'étape de la décoloration sur les constituants du moût et de la bière. Comme nous avons pu le voir précédemment, la couleur, les composés phénoliques totaux, le pH et la densité limite sont à des

niveaux faibles dans le moût décoloré. La bière qui en est issue et la bière décolorée présente des résultats similaires (**Tableau 2.4**).

Tableau 2.4 : Effet de la décoloration du moût et de la bière sur les teneurs en différents constituants exprimées en pourcentage des teneurs initiales dans le produit avant décoloration. Les résultats pour le moût décoloré puis fermenté sont également montrés.

Composés	Moût décoloré	Moût décoloré fermenté	Bière décolorée
Somme Sucres Fermentescibles	107	93	100
Fer	814	200	1600
Cuivre	82	100	43
Calcium	115	115	102
Magnésium	100	102	101
Potassium	102	105	101
Sodium	107	107	107
Zinc	150	100	250
Couleur	7	6	5
Composés Phénoliques Totaux	12	18	7
Azote Aminé libre	90	68	87
Ph	85	90	93
Densité limite	57	-	-
β -Glucanes Solubles	30	-	-
Diacétyle	-	48	102
2,3-pentanedione	-	67	80
Acétaldéhyde	-	46	126
Somme Alcools Totaux	-	116	87
Volume d'alcool	-	98	100

Gras, changements suite à la décoloration; -, non analysé.

La concentration en fer est élevée dans les trois produits décolorés (le moût, le moût fermenté et la bière), ce qui est sans doute dû à un relargage du fer contenu dans le charbon actif (**Tableau 2.4**). Des teneurs élevées en fer ne sont toutefois pas souhaitées dans la production de la bière car ceci risque de favoriser des réactions d'oxydations. La teneur en azote aminé libre est affectée à la fois par la décoloration, que ce soit du moût ou de la bière, et par la fermentation, puisqu'elle diminue dans le moût décoloré suite à sa fermentation (**Tableau 2.4**). Ces diminutions seraient dues à la perte de sources azotées, essentiellement des acides aminés, suite à leur adsorption par le charbon actif, ainsi qu'à leur utilisation par les levures (**Tableau 2.3**). En ce qui concerne les β -glucanes, fibres solubles présentes dans l'orge, leur concentration est plus faible dans le moût décoloré (30%) que dans le moût témoin (**Tableau 2.4**). Ces molécules de structure

(1,3)(1,4)- β -D-glucanes sont connues pour provoquer, à des concentrations élevées, un trouble et des problèmes de filtration¹²⁰. A ce titre, la décoloration au charbon actif aurait un effet bénéfique sur le moût en améliorant sa qualité technologique.

Les quantités de diacétyle et de 2,3-pentanedione, composés responsables du faux-goût «beurre rance» de la bière et donc non désirables, sont, comme nous avons pu le voir précédemment, faibles dans le moût décoloré fermenté (48% et 67%) (**Tableau 2.4**). La production et l'utilisation du diacétyle et du 2,3-pentanedione sont étroitement liées à l'évolution du métabolisme des acides aminés au cours de la fermentation. Ainsi, la production de diacétyle est-elle par exemple liée à celle de la valine. Au début de la fermentation, la levure utilise les acides aminés du groupe I et synthétise de la valine, acide aminé du groupe II, ainsi qu'un intermédiaire de sa voie de synthèse, l' α -acétolactate qui est alors excrété de la cellule et décarboxylé pour former le diacétyle^{121,122} (**Figure 2.6**). Quand la levure débute l'assimilation des acides aminés du groupe II, la valine inhibe sa propre synthèse et la production de l' α -acétolactate cesse¹¹⁸. En fin de fermentation, le diacétyle est réabsorbé par la levure et réduit en acétoine, composé sans propriétés organoleptiques. Une voie similaire est impliquée dans la production de 2,3-pentanedione ; le précurseur est l' α -acétohydroxybutyrate, et l'acide aminé en concurrence est la leucine.

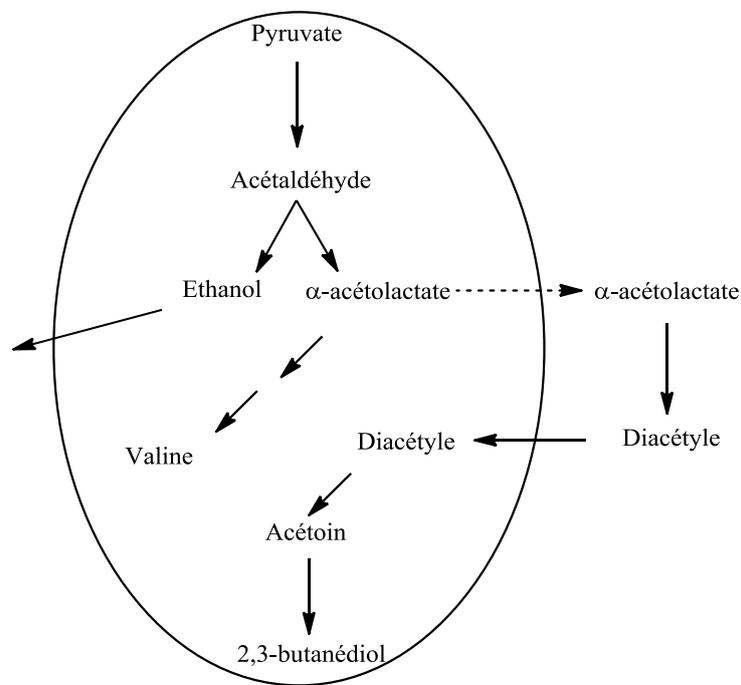


Figure 2.6 : Voie de formation du diacétyle dans une cellule de levure¹²².

L'utilisation importante de la valine par la levure au cours de la fermentation du moût décoloré (**Tableau 2.3**) permettrait d'inhiber les voies de synthèse de la valine et de l' α -acétolactate et donc de limiter la synthèse du diacétyle. Cela aurait comme conséquence de réduire l'apparition du faux-goût liée à cette synthèse. Le processus de décoloration ne semble pas avoir d'effet sur la teneur en diacétyle une fois celui-ci produit, comme cela est montré par la valeur inchangée dans la bière décolorée par rapport à une bière témoin. Toutefois, il semble avoir un effet sur la teneur en pentanedione, puisque sa concentration diminue de 20% après la décoloration de la bière. Cependant cet effet ne semble pas être dû à l'adsorption de la leucine par le charbon actif (**Tableau 2.3**).

Visiblement, la décoloration du moût au charbon actif résulte en une bière avec une teneur en acétaldéhyde 54% plus faible (**Tableau 2.4**). L'acétaldéhyde est en effet un intermédiaire de la fermentation alcoolique produit par décarboxylation enzymatique du pyruvate et qui est, à son tour, réduit en éthanol via l'alcool déshydrogénase (**Figure 2.6**). La faible teneur en acétaldéhyde dans la bière issue du moût décoloré ne peut pas s'expliquer par une fermentation plus efficace qui résulterait en une stabilisation plus rapide, car comme nous avons pu le voir dans la **Figure 2.5a**, la fermentation des moûts, décoloré et non décoloré, évolue à la même vitesse et aboutit à des taux d'alcool équivalents. Par conséquent, une quantité suffisante d'acétaldéhyde, nécessaire à la production d'alcool, doit être générée au cours de la fermentation. En revanche, comme l'autre voie de synthèse nécessitant l'acétaldéhyde, celle de la valine et du diacétyle, est plus ou moins inhibée par une utilisation plus importante de la valine par la levure dans la bière issue du moût décoloré, la quantité finale d'acétaldéhyde en serait réduite. Le processus de décoloration ne semble pas avoir d'effet sur la teneur en acétaldéhyde une fois celui-ci produit, comme cela est montré par la valeur inchangée dans la bière décolorée par rapport à une bière témoin.

Tous les autres composés analysés dans le moût et les bières ne semblent pas être affecté par la décoloration (**Annexe 1 et 2**).

Finalement, il apparaît que, si l'on excepte l'augmentation importante de la quantité de fer due à l'utilisation du charbon actif, l'effet de la décoloration sur la composition de la bière est relativement modéré. Il l'est d'autant plus lorsque cette décoloration est appliquée après l'étape de fermentation du moût. Ainsi, dans le cas des acides aminés, les pertes en teneur totale ne dépassent pas 5% lors de la décoloration de la bière, comparativement à 42% lors de la décoloration du moût.

4 Conclusion

L'objectif de cette partie du travail était de développer une méthode d'extraction des composés colorés du moût afin de produire une bière incolore par élimination des composés phénoliques et autres molécules colorées, pouvant servir au développement d'un produit malté clarifié. Une telle transformation sensorielle devait avoir une conséquence technologique importante, celle de faciliter l'étape de filtration du moût en réduisant la quantité de composés phénoliques et de glucanes qui ont une tendance à former des précipités et des troubles, seuls ou en combinaison. Pour ce faire, divers adsorbants de qualité alimentaire ont été expérimentés. La décoloration avec du charbon actif KB-WJ à une concentration de 10 g/L avec un temps de contact de 30 minutes a permis de réaliser une décoloration du moût de près de 90% par rapport au moût de départ. Les essais de décoloration ont ensuite été réalisés à des échelles plus grandes. Des volumes de 2 et de 20 L de moût ont été traités et des essais de fermentation ont été menés. Une étude comparative entre le moût et la bière, a ensuite été réalisée afin d'évaluer, au niveau physico-chimique, l'influence de la décoloration sur la composition du moût et sur la qualité de la fermentation. La décoloration du moût a permis d'obtenir une concentration en composés phénoliques de 12% et en β -glucanes de 30% par rapport au moût de départ et une concentration en diacétyle et 2,3-pentanedione, dans le produit fermenté, de 48% et 67%, respectivement. La décoloration du moût permet donc d'obtenir un produit toujours fermentescible, mais amélioré technologiquement dans la mesure où il présente moins de trouble et donc moins de problèmes liés à la filtration, et sensoriellement dans la mesure où il est clarifié et où la production des composés responsables du faux-goût «beurre rance» de la bière y est nettement réduite. Toutefois, cette décoloration semble avoir plus d'impact sur la composition chimique du produit final, notamment sa composition totale en acides aminés, en comparaison avec une décoloration qui serait appliquée après la fermentation, c'est-à-dire à la bière. Dans les deux, l'obtention d'une bière clarifiée et décolorée offre à l'industriel une plus grande marge d'innovation, notamment lorsqu'il s'agit de développer des produits ayant des couleurs originales. Il faut noter finalement, qu'au début de l'année 2009, alors que les résultats de cette étude venaient d'être validés, le charbon actif a été autorisé en France comme agent de décoloration dans le procédé de fabrication de la bière¹²³.

Chapitre 3 : Mise au point d'une méthode d'analyse de l'activité antioxydante

1 Introduction

Des études épidémiologiques récentes ont montré une association inverse entre la consommation de certaines boissons riches en composés phénoliques et le risque de maladies chroniques, telles que les maladies coronariennes et certains cancers¹²⁴⁻¹²⁷. Ces composés qui font l'objet d'un intérêt croissant sont présents dans les aliments végétaux tels que les fruits et légumes, mais aussi dans les céréales, comme l'orge et ses dérivés. Il s'agit notamment des acides phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque et cinnamique), des proanthocyanidines, des tanins, des flavonols, des chalcones, des flavones et des flavanones²³. Les effets observés sont attribués à l'activité antioxydante de ces molécules qui agissent en piégeant des radicaux libres et en complexant des pro-oxydants¹²⁸⁻¹³⁰. Ceci confère une protection contre les dommages causés à l'ADN, la carbonylation des protéines et la peroxydation lipidique qui conduisent à une variété de problèmes de santé, comme le cancer, le vieillissement, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer¹³¹.

La présence de ces composés phénoliques dans les matrices alimentaires est généralement mise en évidence en chimie analytique par des méthodes HPLC utilisant une détection par photométrie d'absorption basée sur la présence de chromophores dans leurs structures. Cette méthode permet une assez bonne quantification de ces molécules lorsque les étalons analytiques sont disponibles, toutefois, l'activité antioxydante des composés séparés, et donc leur intérêt fonctionnel, sont souvent négligés. Or, les études montrent que tous les composés phénoliques ne présentent pas une activité antioxydante, que certains sont plus actifs que d'autres¹³². Par ailleurs, parmi les antioxydants que l'on peut retrouver dans un extrait naturel, seule une fraction correspond à ces composés connus, le reste des composés biologiquement actifs et responsables d'une grande partie de l'activité totale n'étant pas encore identifiés¹³³. Cela montre la nécessité d'une alternative plus pragmatique qui mettrait l'accent sur la détection et la quantification de l'activité biologique, plutôt que sur celles de la molécule elle-même.

Au cours des dix dernières années, plusieurs études portant sur le développement de méthodes de chromatographie liquide combinant la détection des molécules séparées et celle de leur activité antioxydante suite à une réaction post-colonne ont été publiées^{72,82,134}. Plusieurs de ces méthodes sont basées, pour l'évaluation de l'activité antioxydante, sur la mesure de la réduction d'un radical libre stable. Un exemple est le radical cation 2,2'-azinobis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS^{•+}), dont l'absorbance à 734 nm diminue en présence d'un agent réducteur^{82,135}. Ceci est associé à la capacité de la molécule d'intérêt à piéger les radicaux et donc à son activité biologique. L'activité de piégeage de radicaux est généralement évaluée contre un antioxydant

standard, tel que le dérivé synthétique de la vitamine E, soluble dans l'eau, l'acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique (Trolox)^{87,89}. Cette évaluation en ligne de l'activité antioxydante permet de séparer des mélanges complexes par HPLC et d'évaluer séparément la contribution antioxydante de chaque composé⁸⁹. Elle permet également la mise en évidence de nouvelles molécules ayant des activités antioxydantes mais dont les étalons ne sont pas disponibles ou qui ne répondraient aux longueurs d'ondes de détection photométrique utilisées.

L'objectif de ce travail est d'évaluer directement l'activité antioxydante des différents composés phénoliques, éléments majeurs de la couleur de la bière. Pour cela un système HPLC couplé à un système post-colonne de détection de l'activité antioxydante (LC-AOx) a été mis au point. Une étude comparative avec une analyse biologique de l'activité antioxydante a ensuite été réalisée afin d'évaluer la méthode LC-AOx.

2 Matériel et méthodes

2.1 Réactifs et produits chimiques

L'acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS^{•+}), l'acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique (Trolox), l'acide 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique (acide férulique), l'acide 3,4-dihydroxycinnamique (acide caféique), l'acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque (acide gallique), l'acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (acide vanillique), l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque (acide protocatéchuique), l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide chlorogénique, l'acide 4-hydroxycinnamique (acide p-coumarique), l'acide sinapique, l'acide m-coumarique, l'acide o-coumarique, la catéchine, l'épicatéchine, l'épigallocatechine gallate (EGCG) et l'acide ascorbique (vitamine C) sont de qualité HPLC et ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne). La procyanidine B2 a été achetée chez Extrasynthèse (Genay, France). L'éthanol, le méthanol et l'acétate d'éthyle, de qualité HPLC, le chlorure de sodium, l'acide chlorhydrique (HCl 37%) et le persulfate de potassium ont été achetés chez VWR (Strasbourg, France). L'eau ultrapure est produite au laboratoire par un système de purification Synergy UV (Millipore, Molsheim, France).

2.2 Solutions stock

Une solution stock d'ABTS^{•+} stable est préparée en mélangeant une solution aqueuse d'ABTS et une solution de persulfate de potassium de concentration finale respective de 7 mmol/L et 2,5 mmol/L (une nuit, à l'obscurité et à 4°C)^{82,134}. Avant son utilisation, la solution stock d'ABTS^{•+} est diluée dans l'éthanol ou le tampon PBS (Phosphate-buffered saline, 8mM à pH 7,4)¹³⁶ pour atteindre une absorbance de 0,70 (\pm 0,02) AU à 734 nm. Les solutions stock d'étalons de composés phénoliques sont préparées par dissolution des composés dans le méthanol (1 mg/mL) et sont ensuite stockées à l'obscurité à -20°C. Avant utilisation, les solutions stock sont diluées dans un mélange méthanol/eau (50/50, v/v).

2.3 Analyse chromatographique de l'activité antioxydante

2.3.1 Extraction des composés phénoliques

Les échantillons (10 mL) sont d'abord acidifiés à pH 2,0 par ajout de HCl (37%), puis 0,5 g de chlorure de sodium sont ajoutés. Trois extractions successives sont ensuite réalisées dans des tubes de centrifugation en polypropylène Corning® (New York, USA) de 50 mL avec 10 mL d'acétate d'éthyle sur un agitateur giratoire à 200 tr/min^{66,86} pendant 15 min. Après centrifugation des mélanges (2500 g, 10 min), les surnageants sont groupés et évaporés à sec sous vide (30°C, 80 mbar). Le résidu obtenu est dissous dans 1 mL de méthanol/eau (50/50, v/v), filtré sur membrane (0,45 µm, Macherey-Nagel, Hoerdt, France) et injecté (20 µL) dans le système chromatographique.

2.3.2 Séparation chromatographique et identification des composés antioxydants

L'analyse utilisant l'ABTS a été effectuée en utilisant la méthode développée par Koleva al.⁸², Dapkevicius et al.¹³⁴ et Re et al.¹³⁶. Le système HPLC (Waters, Saint-Quentin-Fallavier, France) utilisé est constitué d'un contrôleur 600S, d'une pompe 616, d'un injecteur automatique 717 Plus, d'un détecteur UV-visible à photodiode 2996, d'un détecteur UV-visible 486 pour la détection de l'ABTS^{••}, et d'une pompe HPLC supplémentaire utilisée pour la distribution de la solution d'ABTS^{••}. Après mélange de cette dernière avec la phase mobile sortant de la colonne, la réaction a lieu pendant 1 min, le temps nécessaire pour parcourir un tube en PEEK de 7 m de long et 0,5 mm de diamètre. Les séparations sont réalisées à température ambiante sur une colonne de chromatographie C18 hypersil BDS (5 µm, 250 x 4,6 mm, ThermoScientific, Gometz le Châtel, France). La phase mobile, délivrée à 1 mL/min, consiste en un mélange d'eau à 0,1% (v/v) d'acide formique (éluant A) et de méthanol (éluant B) selon le gradient suivant : 0-25 min, 3-25% de B; 25-26 min, 25-18% de B; 26-29 min, 18% de B; 29-47 min, 18-30% de B; 47-57 min 30% de B; 57-67 min, 30-65% de B; 67-77 min, 65% de B. La solution d'ABTS^{••} est délivrée à 0,5 mL/min. La détection des composés séparés est réalisée à 254 nm, alors que celle de l'ABTS^{••} réduit l'est à 412 nm.

2.3.3 Limites de quantification

Les limites de quantification sont estimées par dilutions successives des étalons, et en considérant un rapport signal/bruit de 10. La précision et la justesse de la méthode sont déterminées sur la base du coefficient de variation et du recouvrement (concentration trouvée /

concentration attendue) calculés à partir de trois injections successives. Les limites de quantification sont acceptables si le coefficient de variation est inférieur à 10% et si le recouvrement est d'environ $100\pm 5\%$.

2.4 Analyse biologique de l'activité antioxydante

2.4.1 Lignée cellulaire

Les cellules cancéreuses de l'insulinôme de rat, RINm5F (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, USA) sont issues d'un clone de cellules β RIN-m qui produisent et sécrètent de l'insuline. Les cellules sont cultivées en milieu RPMI-1640 (Sigma, St Louis, USA) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (Sigma) et de 1% de solution antibiotique-antimycotique (ABAM, Gibco®, Invitrogen, Grand Island, USA) comprenant 10 000 U/mL de pénicilline G associée à 10 mg/mL de streptomycine et 25 μ g/mL d'amphotéricine B. Les cellules sont incubées à 37°C sous atmosphère enrichie à 5% en CO₂. Lorsque les cellules sont en phase de pré-confluence (80% de confluence), elles sont trypsinées à l'aide de trypsine EDTA à 0,05% (Sigma). Le milieu est changé toutes les 48 heures.

2.4.2 Effet des antioxydants sur la viabilité des cellules bêta pancréatiques

Le screening des composés antioxydants a été réalisé par l'équipe du Centre Européen d'Etude du Diabète (CEED), à l'aide d'un test de cytotoxicité mesurant la viabilité cellulaire (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega Corporation, Madison, USA). Il s'agit d'une méthode colorimétrique basée sur la réduction du composé tétrazolium [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], appelé MTS, en un produit coloré, le formazan. La réaction est permise grâce à des enzymes de la famille des déshydrogénases présentes dans les cellules métaboliquement actives. La quantité de formazan produite est proportionnelle à l'activité cellulaire et peut être extrapolée à la prolifération cellulaire. Des cellules RINm5F sont pour celaensemencées dans des micro-plaques 96 puits traitées (BD Falcon™, Franklin Lakes, USA) à raison de 30 000 cellules par puits dans un volume de 200 μ L de milieu de culture supplémenté et incubées pendant 48 heures avant le test.

Dans un premier temps, les composés antioxydants sont testés seuls pendant une heure à différentes concentrations (1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400 et 500 μ g/mL). Dans un second

temps, les tests sont réalisés avec une pré-incubation des cellules RINm5F en présence des composés antioxydants à ces mêmes concentrations pendant une heure, puis une molécule générant un stress oxydant, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), est ajoutée à une concentration de 40 $\mu\text{mol/L}$. La durée d'incubation est de 30 minutes. Le H_2O_2 est préparé extemporanément à partir d'une solution commerciale à 33% (Sigma) diluée dans du milieu de culture.

Après le traitement, les puits sont rincés à l'aide de PBS (Gibco®, Invitrogen), puis 100 μL de milieu de culture supplémenté et 20 μL de MTS sont ajoutés. Les plaques de culture sont incubées 2 heures à 37°C en atmosphère enrichie à 5% en CO_2 , et l'absorbance est mesurée à 490 nm sur un lecteur de micro-plaque 96 puits Metertech 960 (Metertech Inc., Taipei, Taiwan). Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport au témoin négatif qui correspond à des cellules sans traitement.

2.5 Analyses statistiques

Les données sont analysées par le test ANOVA (au seuil de signification de 95%) à l'aide du logiciel Statgraphics Plus. Trois analyses sont effectuées par échantillon.

3 Résultats et discussion

3.1 Analyse chromatographique de l'activité antioxydante

3.1.1 Extraction des composés phénoliques

Etant donnée la richesse du moût et de la bière en composés phénoliques, la méthode d'extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle a été mise au point sur un ensemble de composés sélectionnés afin de se rapprocher au plus près des conditions réelles. La précision de cette méthode a été déterminée d'après les quantités de composés phénoliques issues de trois extractions consécutives. Le **Tableau 3.1** donne les valeurs moyennes et les déviations standards des quantités extraites de composés phénoliques suite à plusieurs répétitions ($n \geq 3$). Trois extractions successives aboutissent à un taux de recouvrement d'au moins $73 \pm 5\%$ des composés phénoliques, sauf pour les acides protocatéchuique, chlorogénique et l'épicatéchine qui ne sont pas extraits à plus de $64 \pm 9\%$, $51 \pm 6\%$ et $49 \pm 10\%$, respectivement (**Tableau 3.1**).

Tableau 3.1 : Taux de recouvrement moyen des composés phénoliques étudiés dans le moût (trois déterminations de trois extractions à l'acétate d'éthyle).

Composés phénoliques	Taux de recouvrement (%)
Acide gallique	93 \pm 16
Acide protocatéchuique	64 \pm 9
Acide p-hydroxybenzoïque	83 \pm 10
Catéchine	75 \pm 5
Acide chlorogénique	51 \pm 6
Acide vanillique	94 \pm 7
Acide caféique	73 \pm 5
Epicatéchine	49 \pm 10
Acide p-coumarique	73 \pm 10
Acide férulique	87 \pm 5
Acide sinapique	79 \pm 16
Acide m-coumarique	125 \pm 6
Acide o-coumarique	88 \pm 9

Si l'on exclut ces derniers, l'extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle donne de bons résultats pour un procédé d'extraction multi-composés. Aujourd'hui, cette méthode, bien que classique, reste la méthode la plus largement utilisée pour l'extraction des composés phénoliques^{54,65,66,137}, alors que d'autres composés pourraient être extraits par cette méthode. Il a été admis que les composés extraits à l'acétate d'éthyle représentaient principalement les composés

phénoliques d'une matrice. D'autres méthodes, telles que l'extraction en phase solide, sont utilisées pour l'extraction des composés phénoliques. Ainsi, Del Alamo *et al.* ont démontré que l'utilisation de cartouches C18 greffées avec des groupements hydroxyles permettait d'obtenir un taux de recouvrement d'au moins 88% d'un mélange concentré d'étalons de composés phénoliques, alors que dans le vin rouge les mêmes composés ne sont que partiellement retenus¹³⁸. Bien que nous ayons appliqué cette méthode à nos composés, dans les concentrations proches de celle que l'on retrouverait dans le moût, les résultats ont été moins satisfaisants que ceux obtenus avec l'extraction liquide-liquide lorsque l'on considère l'ensemble des composés. Par ailleurs, nous avons vu dans le chapitre précédent que le charbon actif était un très bon adsorbant pour les composés phénoliques. Cependant, Soto *et al.* ont démontré que la désorption sélective de ces composés du charbon actif était difficile et que l'utilisation de l'éthanol n'était pas appropriée¹³⁹. Nous avons également mené des essais de désorption de ces composés du charbon actif avec des solvants tels que le méthanol et l'acétate d'éthyle, mais les résultats n'ont pas été satisfaisants.

3.1.2 Séparation chromatographique et identification des composés antioxydants

Les méthodes classiques pour identifier des composés antioxydants dans des mélanges complexes impliquent généralement de longues étapes de fractionnement bio-guidé, suivies de l'identification des composés purifiés. Le système utilisé ici est destiné à détecter les composés ayant une activité antioxydante dans les extraits naturels d'une façon plus directe et plus rapide. Après séparation par HPLC en phase inverse avec un gradient linéaire eau/méthanol, les composés passent par un détecteur UV-visible pour l'identification à 254 nm (détection UV), puis sont dirigés vers un détecteur UV-visible supplémentaire, après avoir réagi en ligne avec une solution du radical ABTS^{•+} (détection AOX) (**Figure 3.1a**). Ce détecteur supplémentaire permet de détecter la forme réduite de ce radical à 412 nm et donc la présence de composés ayant une activité antioxydante. La longueur d'onde choisie correspond au maximum d'absorption du radical ABTS^{•+}, toutefois certains auteurs préfèrent détecter le radical ABTS^{•+} à 734 nm à cause d'interférences chromatographiques⁸⁷, problème que nous n'avons pas rencontré. La combinaison d'une boucle de réaction de 7 m de long et de 0,5 mm de diamètre interne avec un débit de 0,5 mL/min donne un temps de réaction d'environ 1 min ce qui explique les temps de rétention plus longs et l'obtention de pics plus larges dans le chromatogramme inférieur. Cependant, ce temps de réaction de 1 min est nécessaire, dans ces conditions, pour obtenir une réaction complète de tous les antioxydants⁸⁶.

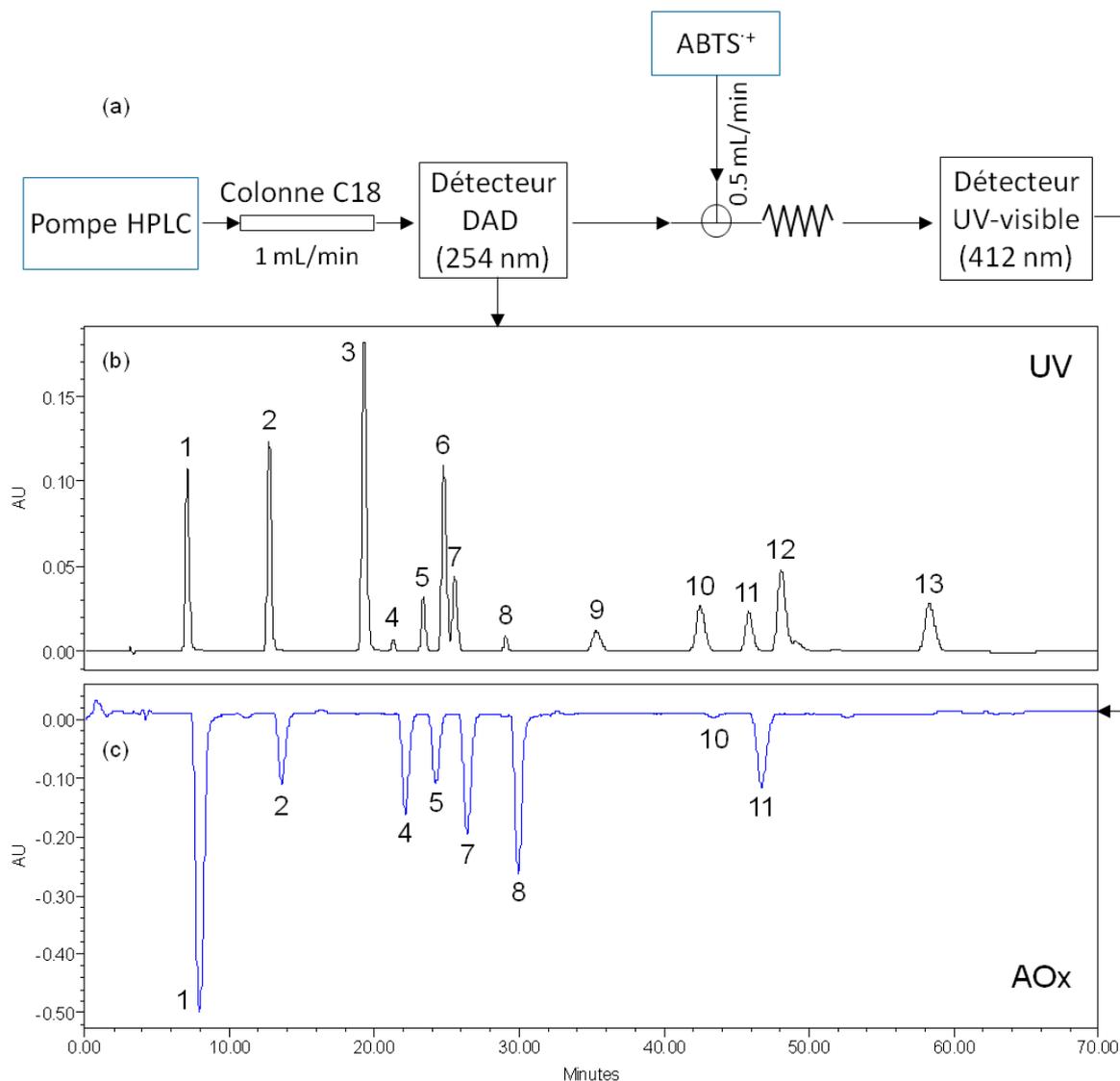


Figure 3.1 : Séparation et détection chromatographique des composés phénoliques : (a) schéma expérimental ; (b) étalons de composés phénoliques à 30 µg/mL dans un mélange eau/méthanol (50/50, v/v) et (c) leur activité antioxydante correspondante. Les pics sont comme suit : 1, acide gallique ; 2, acide protocatéchuique ; 3, acide p-hydroxybenzoïque ; 4, catéchine ; 5, acide chlorogénique ; 6, acide vanillique ; 7, acide caféique ; 8, épicatechine ; 9, acide p-coumarique ; 10, acide férulique ; 11, acide sinapique ; 12, acide m-coumarique ; 13, acide o-coumarique.

La séparation chromatographique des composés phénoliques présents dans des mélanges naturels complexes nécessite habituellement un gradient linéaire d'élution. Dans cette étude, la proportion de méthanol a été diminuée à 25 min, puis augmentée à nouveau à 29 min, afin de permettre une meilleure séparation des acides vanillique et caféique sans trop allonger le temps

d'éluion. La méthode a été testée sur un mélange d'étalons de composés phénoliques (30 µg/mL chacun) (**Figure 3.1b**).

La limite de quantification déterminée avec la détection UV des composés phénoliques varie de 2 pmol pour l'acide chlorogénique à 216 pmol pour la catéchine et l'épicatéchine (**Tableau 3.2**). Cette valeur élevée pour la catéchine et l'épicatéchine, comparativement à d'autres composés, pourrait s'expliquer par le fait que 254 nm n'est pas leur longueur d'onde de détection optimale (280 nm), leur coefficient d'extinction est donc plus petit à cette longueur d'onde. La limite de quantification correspondant à la détection de l'activité antioxydante (AOx) varie de 54 pmol pour l'épicatéchine à 2575 pmol pour l'acide férulique (**Tableau 3.2**). Ceci indique que la détection UV est globalement plus sensible que la détection AOx, à l'exception de l'acide gallique et de l'épicatéchine, mais la comparaison entre les deux méthodes de détection est difficile puisque les molécules absorbant le plus à la longueur d'onde sélectionnée ne sont pas les plus antioxydantes et inversement. Toutefois, lorsque l'intérêt est d'isoler des molécules antioxydantes, la détection AOx permet de faire abstraction du coefficient d'extinction de la molécule, et de pouvoir ainsi détecter des molécules antioxydantes absorbants peu ou pas à la longueur d'onde sélectionnée. De telles molécules pourraient passer inaperçues dans les méthodes classiques de fractionnement bio-guidé.

Tableau 3.2 : Limites de quantification de composés phénoliques dans un mélange eau/méthanol (50/50, v/v) pour les méthodes de détection UV et AOx.

Composés phénoliques	Limite de quantification (pmol)	
	Détection UV	Détection AOx
Acide gallique	94	59
Acide protocatéchuïque	10	779
Acide p-hydroxybenzoïque	29	nAOx
Catéchine	216	103
Acide chlorogénique	2	141
Acide vanillique	15	nAOx
Acide caféique	4	167
Epicatéchine	216	54
Acide p-coumarique	190	nAOx
Acide férulique	7	2575
Acide sinapique	14	268
Acide m-coumarique	98	nAOx
Acide o-coumarique	39	nAOx

nAOx, non antioxydant.

Avec cette méthode, certains composés tels que les acides p-hydroxybenzoïque, vanillique, p-coumarique, m-coumarique, et o-coumarique n'ont montré aucune activité antioxydante ou cette

dernière était trop faible pour être détectée (**Figure 3.1b, c**). L'activité antioxydante est calculée par rapport à la concentration de Trolox nécessaire pour produire une activité antioxydante équivalente et est exprimée en équivalent Trolox (μM). A concentrations équimolaires, les composés phénoliques testés ont présenté des activités antioxydantes variables, l'acide gallique (340 μM) est le plus actif. Un classement des composés phénoliques, à concentrations équimolaires (150 μM), en fonction de leur activité antioxydante a donc été établi (**Tableau 3.3**). Ce classement est en accord avec celui de Kim *et al.* qui, en utilisant également l'ABTS^{•+}, ont montré que l'acide gallique était le composé testé le plus antioxydant¹⁴⁰.

Tableau 3.3 : Classement par la méthode LC-AOx des composés antioxydants à concentrations équimolaires (150 μM). L'activité antioxydante est exprimée en équivalent Trolox (μM).

Composés phénoliques	équivalent Trolox (μM)
Acide gallique	340
Acide caféique	239
Acide chlorogénique	217
Epicatéchine	212
Acide sinapique	199
Catéchine	179
Acide protocatéchuique	67
Acide férulique	11

3.2 Composés phénoliques et stress oxydant

Afin de confirmer les résultats de la méthode chromatographique, le travail s'est poursuivi par l'application, à l'étude de l'activité antioxydante des composés phénoliques, d'une méthode biologique basée sur la mesure de l'influence d'un stress oxydant sur la croissance des cellules β du pancréas, impliquées dans le diabète de type 2. L'effet des composés antioxydants a été testé sur la viabilité de ces cellules à des concentrations de 1 à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant une heure (**Annexe 3**). A titre d'exemple, nous détaillons ici le cas de la catéchine. Malgré des pertes de viabilité entre 0,6 et 23,3% aux différentes concentrations, aucun des résultats obtenus n'est significatif ($p > 0,05$) (**Tableau 3.4 / Figure 3.2a**). On ne peut donc pas conclure que la catéchine ait un quelconque effet toxique sur les cellules β .

Tableau 3.4 : Effet de la catéchine sur la viabilité des cellules β du pancréas (n=3) en absence et en présence de H_2O_2 à 40 μM (n=3).

Concentrations en catéchine ($\mu g/mL$)	Viabilité cellulaire (%)	
	Sans H_2O_2	Avec H_2O_2
CTL	100 \pm 0	100 \pm 0
H_2O_2	-	33,5 \pm 6,5
1	99,4 \pm 26,8	72,0 \pm 21,8
5	114,1 \pm 34,5	64,1 \pm 8,9
10	90,8 \pm 33,4	72,2 \pm 11,4
20	78,0 \pm 26,2	55,9 \pm 10,2
50	81,0 \pm 37,5	59,2 \pm 10,1
100	79,2 \pm 26,0	56,0 \pm 9,5
200	76,7 \pm 34,3	51,6 \pm 10,9
300	81,6 \pm 15,9	50,7 \pm 10,9
400	80,7 \pm 19,2	60,3 \pm 13,9
500	82,5 \pm 40,8	65,5 \pm 7,4

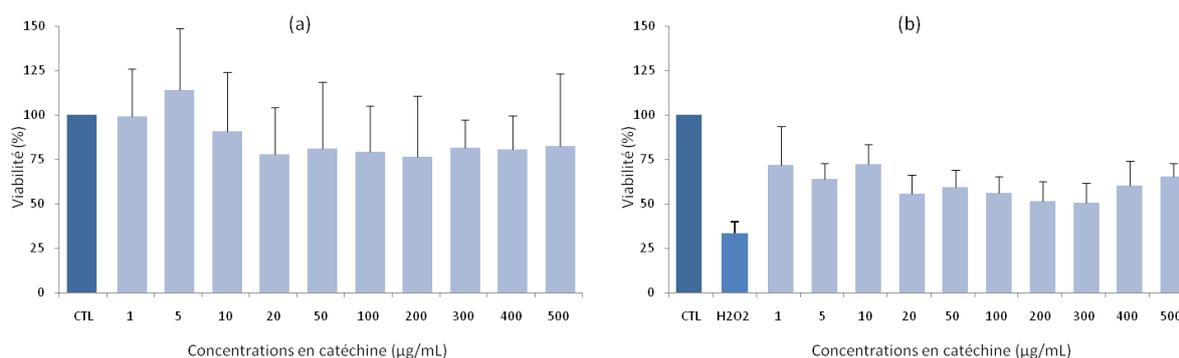


Figure 3.2 : Effet de la catéchine sur la viabilité des cellules β du pancréas (n=3) en absence (a) et en présence de H_2O_2 à 40 μM (n=3) (b).

L'effet d'une pré-incubation en présence des composés phénoliques a ensuite été testé sur des cellules β du pancréas soumises ensuite à un stress oxydant de 30 min provoqué par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 40 μM . Ainsi, lorsque les cellules ne sont pas pré-incubées en présence des composés phénoliques, leur viabilité diminue significativement à 33,5 \pm 6,5% lorsqu'elles sont soumises au H_2O_2 par rapport au témoin sans traitement (100%) (**Tableau 3.4 / Figure 3.2b**). En présence de composés phénoliques, la viabilité cellulaire est nettement améliorée pour tous les composés par rapport au témoin H_2O_2 seul (**Annexe 3**). Dans le cas de la catéchine, la viabilité

cellulaire est augmentée à 50,7±10,9% (300 µg/mL) jusqu'à 72,2±11,4% (10 µg/mL). La catéchine a bien un pouvoir antioxydant limitant la perte de viabilité des cellules β en conditions de stress par H₂O₂, cependant, la viabilité cellulaire ne semble pas être dépendante de la concentration de la molécule.

Douze composés ont ainsi été étudiés séparément afin de déterminer leur impact sur la viabilité cellulaire en présence et en absence de H₂O₂ (**Annexe 3**). Ils ont été classés en fonction de leur plus faible concentration, limitant significativement, la perte de viabilité cellulaire et traduisant donc le plus fort pouvoir antioxydant de la molécule (**Tableau 3.5**). A chaque concentration est associée la viabilité cellulaire, ainsi que la toxicité de la molécule vis-à-vis des cellules β, correspondant à la concentration la plus faible induisant une perte de viabilité cellulaire significative.

Tableau 3.5 : Classement des composés antioxydants, du plus fort antioxydant au plus faible, selon la méthode biologique (n = 3). A chaque concentration est associée la viabilité cellulaire ainsi que la toxicité de la molécule vis-à-vis des cellules β du pancréas.

Composés	Concentration antioxydante (µM)	Viabilité cellulaire (%)		Concentration toxique (µM)
		Témoin H ₂ O ₂ seul	H ₂ O ₂ + composé	
Catéchine	4	33,5 ± 6,5	72,0 ± 21,8	nt
Acide sinapique	5	35,9 ± 2,8	57,8 ± 2,8	892
Procyanidine B2	9	48,3 ± 8,2	61,9 ± 8,9	nt
Vitamine C	28	43,9 ± 6,2	53,9 ± 5,4	568
Epicatéchine	34	35,1 ± 2,9	55,9 ± 8,6	nt
Acide férulique	51	35,4 ± 9,0	51,2 ± 5,1	nt
Acide caféique	56	24,1 ± 16,5	54,5 ± 14,3	555
Trolox	400	12,5 ± 5,7	25,5 ± 2,6	nt
Acide protocatéchuique	649	36,0 ± 10,8	55,5 ± 6,0	nt
EGCG	654	20,1 ± 4,9	35,2 ± 10,6	109
Acide gallique	nAOx			29
Acide chlorogénique	nAOx			nt

nAOx, non antioxydant. nt, non toxique.

En ce qui concerne l'activité antioxydante, les résultats montrent que la catéchine est le composé présentant la plus forte activité puisqu'elle permet, à 4 µM, d'augmenter la viabilité cellulaire à 72,0±21,8% alors que l'EGCG présente l'activité antioxydante la plus faible avec une augmentation de la viabilité cellulaire à partir de 654 µM seulement (**Tableau 3.5**). Parmi les douze

composés testés, deux composés, les acides gallique et chlorogénique, ne sont pas antioxydants vis-à-vis des cellules β . En ce qui concerne la toxicité, il apparaît que cinq composés induisent une perte de viabilité cellulaire (**Tableau 3.5**). Les acides sinapique, caféique et la vitamine C sont toxiques pour les cellules à partir de 892 μM , 555 μM et 568 μM , respectivement, ce qui ne les empêche pas d'augmenter la viabilité cellulaire à 57,8 \pm 2,8% à 5 μM , à 54,5 \pm 14,3% à 56 μM et à 53,9 \pm 5,4% à 28 μM , respectivement. Deux autres composés, l'acide gallique et l'EGCG, sont toxiques dès 29 μM et 109 μM , respectivement ; l'acide gallique n'est pas antioxydant alors que l'EGCG montre un effet à partir de 654 μM (**Tableau 3.5**). L'acide chlorogénique est le seul composé testé à n'être ni toxique pour les cellules, ni antioxydant, puisqu'il ne permet pas d'augmenter significativement ($p > 0,05$) la viabilité cellulaire (51,9 \pm 20,3% à 282 μM) en présence de H_2O_2 par rapport au témoin H_2O_2 seul (34,6 \pm 12,5%).

Des études récentes ont montré que des aliments riches en composés phénoliques produisent des concentrations considérables d' H_2O_2 , responsables des effets pro-oxydants des molécules, au cours de leur préparation et de leur stockage à température ambiante¹⁴¹. Chedea *et al.* ont souligné l'effet pro-oxydant d'un extrait de pépin de raisin en fonction de la concentration et de la durée de l'étude¹⁴². Frankel *et al.* ont démontré que de fortes concentrations en extrait de thé vert induisaient une oxydation¹⁴³. Parmi les principaux composés phénoliques, il y a l'acide caféique dans le café et l'EGCG dans le thé, qui à des concentrations élevées et sous certaines conditions, sont capables de produire du peroxyde d'hydrogène^{144,145}.

Les effets pro-oxydants impliquent souvent des réductions de métaux, tels que Fe^{3+} et Cu^{2+} en Fe^{2+} et Cu^+ , respectivement¹⁴⁶. Zheng *et al.* ont démontré que les acides hydroxycinnamiques tels que les acides caféique, chlorogénique et sinapique ont une forte activité pro-oxydante due à la chélation entre leurs groupements hydroxyle et le Cu^{2+} ¹⁴⁷. La production de H_2O_2 , responsable de l'activité pro-oxydante et donc de la toxicité de la molécule, pourrait être directement proportionnelle au nombre total de groupements hydroxyles dans la structure chimique de la molécule. Ces groupements sont impliqués dans les phénomènes d'oxydation des composés phénoliques en quinones correspondantes, en présence de dioxygène et d'ions métalliques de transition¹⁴⁸.

Les résultats de notre étude montrent qu'à faibles concentrations, les composés antioxydants ont un effet positif sur la viabilité des cellules β . Cependant, à fortes concentrations, une perte de viabilité significative peut être observée pour certaines molécules, telles que les acides sinapique et caféique et la vitamine C. Ceci va dans le sens des résultats des études précédentes citées et suggère que tout antioxydant peut devenir pro-oxydant si les doses utilisées sont élevées.

Toutefois, d'autres études impliquant l'acide gallique et l'EGCG notamment ont souligné que de faibles concentrations en antioxydant pouvaient induire un effet pro-oxydant. Ainsi, des concentrations en EGCG comprises entre 5 et 100 μM peuvent induire une perte de viabilité cellulaire^{149,150} et générer la formation de H_2O_2 dans un milieu de culture RPMI en absence de cellules¹⁵¹. Yen *et al.* ont montré que l'acide gallique et la vitamine C, à 4,0 mM, montrent un effet protecteur vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène et à des concentrations de 4 à 240 μM , montrent, au contraire, une induction de peroxyde d'hydrogène ce qui suggère qu'à faibles concentrations, l'acide gallique augmente le niveau de peroxyde d'hydrogène dans les cellules induisant ainsi un stress oxydant¹⁵². Nous avons obtenu des résultats similaires avec l'EGCG qui, dès 109 μM , est toxique vis-à-vis des cellules, alors qu'il montre un effet antioxydant à partir de 654 μM (**Tableau 3.5**).

Il semblerait donc que de nombreux composés phénoliques possèdent à la fois des propriétés antioxydantes et pro-oxydantes. Bien que ces propriétés dépendent de la concentration de ces composés, il est difficile de déterminer dans quel sens évoluent l'un ou l'autre des deux effets, et des résultats contradictoires sont souvent rapportés. D'autres paramètres interviennent sûrement, tels que la structure chimique, le test et le substrat utilisés pour déterminer leur activité¹⁴⁶. Cette différence de comportement en fonction du test utilisé est particulièrement visible avec l'acide chlorogénique, par exemple, qui ne présente ni activité antioxydante, ni activité pro-oxydante avec notre méthode. Alors que Roche *et al.* ont démontré des activités antioxydantes pour l'acide chlorogénique¹⁵³ et Zheng *et al.*, des activités pro-oxydantes¹⁴⁷.

3.3 Comparaison des méthodes chromatographique et biologique

La méthode chromatographique et la méthode biologique de mesure de l'activité antioxydante ont été appliquées à l'analyse de composés antioxydants à des concentrations équimolaires (150 μM). L'étude a porté sur douze composés différents qui ont présenté des activités antioxydantes variables. Les résultats sont exprimés en équivalent Trolox pour la méthode LC-AOx et pour la méthode biologique, ils sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport au témoin H_2O_2 seul (sans traitement) (**Tableau 3.6**).

Tableau 3.6 : Evaluation et comparaison des activités antioxydantes des composés à 150 μM avec les méthodes chromatographique et biologique (n = 3).

Composés antioxydants	Méthode chromatographique	Méthode biologique	
	Equivalent Trolox (μM)	viabilité cellulaire (%)	
		Témoin H_2O_2 seul	H_2O_2 + composé
Acide gallique	322 \pm 46	36,8 \pm 2,3	19,4 \pm 9,1
Procyanidine B2	279 \pm 40	48,3 \pm 8,2	67,8 \pm 11,7
EGCG	255 \pm 36	20,1 \pm 4,9	7,6 \pm 5,4
Acide caféique	226 \pm 32	24,1 \pm 16,5	41,0 \pm 17,6
Acide chlorogénique	205 \pm 29	34,6 \pm 12,5	45,7 \pm 23,9
Epicatechine	201 \pm 29	35,1 \pm 2,9	63,3 \pm 5,9
Vitamine C	190 \pm 27	43,9 \pm 6,2	57,4 \pm 4,2
Acide sinapique	188 \pm 27	35,9 \pm 2,8	72,5 \pm 12,5
Catéchine	169 \pm 24	33,5 \pm 6,5	59,2 \pm 10,1
Trolox*	141 \pm 20	12,5 \pm 5,7	12,7 \pm 5,8
Acide protocatéchuique	62 \pm 9	36,0 \pm 10,8	38,0 \pm 7,2
Acide férulique	9 \pm 4	35,4 \pm 9,0	49,6 \pm 6,0

*Test biologique non concluant

A 150 μM , l'acide gallique et l'EGCG sont parmi les composés les plus antioxydants avec la méthode chromatographique, mais ne présentent aucune activité antioxydante avec la méthode biologique, au contraire, ils diminuent la viabilité cellulaire par rapport au témoin H_2O_2 seul (**Tableau 3.6**). La procyanidine B2 est le deuxième composé le plus antioxydant avec la méthode LC-AOx, mais ne permet d'augmenter la viabilité cellulaire qu'à 67,8 \pm 11,7% par rapport au témoin H_2O_2 seul (48,3 \pm 8,2%). Les acides caféique et chlorogénique, à 150 μM , présente une activité antioxydante de, respectivement, 226 \pm 32 μM et 205 \pm 29 μM équivalent Trolox, mais ne permettent pas d'augmenter significativement la viabilité cellulaire. L'épicatechine et la vitamine C ont des activités significativement équivalentes de respectivement 201 \pm 29 μM et 190 \pm 27 μM équivalent Trolox ($p > 0,05$) avec la méthode chromatographique (**Tableau 3.6**). Ces deux composés permettent une augmentation importante de la viabilité cellulaire en présence de H_2O_2 par rapport au témoin H_2O_2 seul. Les résultats des deux méthodes concernant ces molécules semblent donc relativement cohérents. Les activités antioxydantes de l'acide sinapique et de la catéchine sont relativement équivalentes avec chacune des deux méthodes. Les effets de ces deux molécules sont toutefois faibles avec la méthode chromatographique et parmi les plus fortes avec la méthode biologique. En ce qui concerne l'acide férulique l'activité antioxydante avec la méthode LC-AOx (9 \pm 4 μM équivalent Trolox) est la plus faible. Une étude précédente a reporté l'utilisation d'un tampon PBS à pH 7,4 comme solvant de dilution du radical ABTS, au lieu de l'éthanol⁷². Il est apparu que l'utilisation du

PBS, avec la méthode LC-AOx, augmentait la réponse antioxydante de l'acide férulique à $148 \pm 25 \mu\text{M}$ équivalent Trolox. On peut donc estimer que l'acide férulique, qui est parmi les cinq composés les plus antioxydants avec la méthode biologique, aurait un comportement antioxydant équivalent avec les deux méthodes. L'acide protocatéchuique est le composé qui répond le moins bien aux deux méthodes, puisqu'il est le moins antioxydant avec la méthode LC-AOx (exclusion faite de l'acide férulique) et avec la méthode biologique puisqu'il ne permet pas d'augmenter la viabilité cellulaire par rapport au témoin H_2O_2 seul.

La comparaison des activités antioxydantes des différents composés testés montre que les acides férulique et protocatéchuique, l'épicatéchine et la vitamine C ont une capacité antioxydante équivalente avec les méthodes chromatographique et biologique. Ces résultats semblent mettre en évidence une corrélation entre la capacité antioxydante des composés et le niveau de stress oxydatif des cellules en présence des mêmes composés. Toutefois, d'autres composés tels que l'acide sinapique et la catéchine montrent des degrés d'activité antioxydante différents et les acides gallique, caféique et chlorogénique, la procyanidine B2 et l'EGCG réagissent de façons très différentes avec les méthodes testées. Nous ne pouvons donc pas conclure qu'il existe une corrélation entre les deux méthodes pour ces composés.

Au vu de ces résultats, l'utilisation d'une méthode chromatographique sur des composés isolés ne semble pas pouvoir refléter la réalité des activités des composés naturels. D'après Frankel *et al.*, chaque évaluation de composé antioxydant devrait être menée dans différentes conditions d'oxydation, en utilisant plusieurs méthodes¹⁵⁴. Cependant, l'utilisation de la méthode chromatographique combinée à la méthode biologique nous a permis de mettre en évidence des activités antioxydante et pro-oxydante pour un même composé, tel que pour l'acide gallique ou l'EGCG. Un antioxydant peut être défini comme une substance qui, lorsqu'elle est présente à des concentrations faibles comparées à celle d'un substrat oxydable, empêche ou retarde de manière significative une oxydation du substrat ; un pro-oxydant est une substance toxique qui peut causer des dommages oxydatifs des lipides, des protéines et des acides nucléiques^{155,156}. Toutefois, dans la pratique des effets pro-oxydants peuvent également être bénéfiques, car, en imposant un faible degré de stress oxydatif, les niveaux de défenses antioxydants pourraient être élevés, conduisant à une protection globale¹⁵⁷. Dans l'organisme humain, ni les activités antioxydantes, ni les activités pro-oxydantes des composés phénoliques n'ont encore été clairement établies, probablement en raison des faibles teneurs retrouvées *in vivo* après la consommation d'aliments riches en ces composés¹⁵⁶, mais aussi en raison de la complexité du milieu biologique qui ne peut être représenté par une cellule, et encore moins par une seule réaction. D'un autre côté, il y a la complexité du

milieu alimentaire dont les effets et les multiples interactions ne peuvent, eux, être réduits aux propriétés d'un seul composé. Plutôt que de s'intéresser aux composés purs, la priorité devrait être portée sur l'ensemble de la matrice alimentaire avec ses composés phénoliques et ses autres composants qui pourraient moduler le stress oxydatif^{158,159}.

4 Conclusion

L'objectif de ce travail était de détecter dans un mélange les composés ayant une activité antioxydante d'une façon directe et rapide. L'utilisation de la méthode LC-AOx a permis, après séparation en chromatographie liquide classique, d'identifier les composés grâce à un détecteur UV-visible, puis un détecteur UV-visible supplémentaire a été utilisé pour mettre en évidence leur activité antioxydante après réaction avec le radical ABTS^{•+}. Cette méthode de dosage de l'activité antioxydante permet donc d'identifier les molécules par détection UV et de détecter, en même temps et directement, leur activité antioxydante afin de pouvoir associer une activité antioxydante à un composé. Toutefois, la comparaison de cette méthode à une méthode de mesure de l'activité antioxydante à travers le suivi de la survie de cellules β du pancréas soumises à un stress oxydant a permis de révéler des effets antioxydants et pro-oxydants pour une même molécule. En effet, à concentrations équimolaires, certains composés pouvaient montrer une activité antioxydante importante avec la méthode chromatographique, et peu d'activité, voire des effets toxiques, comme pour l'acide gallique avec la méthode biologique. Globalement, il semblerait que tout composé possède à la fois des propriétés antioxydantes et pro-oxydantes qui dépendent de sa concentration et de sa structure et l'une ou l'autre des propriétés sera révélée en fonction des tests et substrats utilisés pour déterminer son activité.

Il est évident que la méthode chromatographique de détection de l'activité antioxydante ne reflète pas la totalité des activités des composés naturels. Cependant, elle permet de détecter et d'identifier rapidement des composés antioxydants dans des mélanges complexes sans étapes préalables de purification ou de fractionnement bio-guidé. L'application de cette méthode aux aliments permettrait d'identifier les composés antioxydants, connus ou non, en une seule chromatographie. Dans le cas de la bière, cela permettrait non seulement de déterminer ses composés antioxydants, mais également d'évaluer l'effet du procédé de décoloration sur ces mêmes composés.

Chapitre 4 : Composés antioxydants de la bière

1 Introduction

L'orge est l'une des céréales les plus anciennes et les plus cultivées, principalement (80-90%) destinée à l'alimentation animale et à la production de malt¹⁶⁰. L'intérêt santé de l'orge et du malt est principalement dû à l'activité antioxydante de leurs composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes et les acides hydroxycinnamiques¹⁶¹. Cette activité semble être plus importante dans le malt que dans l'orge non maltée correspondante⁵⁴, ce qui suggère que le procédé de maltage, en particulier les derniers stades de la germination et du touraillage, pourrait avoir une influence sur l'augmentation de l'activité antioxydante et de la teneur des composés phénoliques disponibles¹⁶². Par ailleurs, les étapes suivantes de fabrication de la bière qui sont de natures thermique et biochimique telles que le brassage, la cuisson et la fermentation, sont également susceptibles de transformer les composés phénoliques, espèces hautement instables. Il est donc important de pouvoir suivre l'évolution des composés phénoliques au cours du procédé de fabrication de la bière afin de déterminer l'impact du chauffage et de la fermentation sur ces composés et l'activité antioxydante qui leur est associée.

Les études qui ont été réalisées sur l'orge et le malt tendent toutes à montrer une augmentation de la teneur en composés phénoliques et de l'activité antioxydante au cours du maltage, particulièrement durant l'étape de touraillage¹⁶². Lorsqu'il s'agit de malt pale, l'activité antioxydante provient principalement des composés phénoliques de l'orge^{131,163}. Toutefois, dans du malt brun, une bonne partie de cette activité est issue des produits de la réaction de Maillard¹⁶³. D'autres étapes de nature thermique, telles que le procédé de brassage, peuvent aussi augmenter l'activité antioxydante, comme cela a été montré pour le café¹⁶⁴. En plus de l'activité antioxydante totale, une augmentation de la teneur en composés phénoliques libres par décomplexation thermique n'est pas à exclure.

L'activité antioxydante est en général étudiée globalement, sans séparation des composés individuels, et parfois dans des mélanges complexes constitués de composés naturels dans leur matrice environnante. Comme cela a été dit au chapitre précédent, cette approche présente l'avantage de prendre en considération la complexité de cette matrice et les interactions qui peuvent y avoir lieu, et donc de se rapprocher de ce que peut être l'activité antioxydante d'un aliment. Cependant, d'un point de vue analytique, une telle approche rend l'identification des composés responsables de l'activité et l'étude d'éventuels changements dûs aux procédés des tâches particulièrement difficiles.

Le recours à la séparation des composés individuels ou encore à une simple réduction de l'effet de la matrice peut donc s'avérer très utile et permettre des déterminations plus aisées et parfois plus précises. Ainsi, l'utilisation de la méthode LC-AOx permet de séparer des mélanges complexes par HPLC et d'évaluer individuellement la contribution des différents antioxydants^{72,82,134}. Cette méthode qui a déjà été appliquée à l'évaluation de l'activité antioxydante de la bière¹³², pourrait être utilisée pour l'étude de l'effet du procédé de fabrication sur cette activité. Par ailleurs, une simplification de la matrice telle que l'utilisation d'extraits polyphénoliques, et non du moût, comme support de brassage permettrait une évaluation plus aisée de l'impact du procédé sur l'activité antioxydante de certains composés phénoliques.

L'objectif de cette partie du travail est donc de déterminer l'effet des diverses étapes du procédé de fabrication de la bière sur la teneur et l'activité antioxydante des composés phénoliques. Des extraits à l'acétate d'éthyle d'orge, de malt et de bière à différentes étapes de sa fabrication, (brassage, cuisson et fermentation) sont analysés par la méthode LC-AOx pour la teneur et l'activité antioxydante des composés phénoliques qu'ils contiennent. Des extraits de malt ont aussi été soumis au traitement thermique du brassage afin d'évaluer de manière précise l'effet de celui-ci sur l'activité antioxydante des composés phénoliques. De la même manière, l'effet sur le profil antioxydant de la bière du procédé de décoloration développé au cours de ce travail a également été étudié en comparant des extraits de bière témoin et de bière décolorée au charbon actif KB-WJ. Pour finir, la bière décolorée a été recolorée en utilisant des colorants naturels dans l'objectif de valoriser le produit pour l'industrie brassicole.

2 Matériel et méthodes

2.1 Réactifs, produits chimiques et matériel végétal

L'acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS^{•+}), l'acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique (Trolox), l'acide 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique (acide férulique), l'acide 3,4-dihydroxycinnamique (acide caféique), l'acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (acide vanillique), l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque (acide protocatéchique), l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide chlorogénique, l'acide 4-hydroxycinnamique (acide p-coumarique), l'acide sinapique, la catéchine et l'épicatéchine, de qualités HPLC, le kieselguhr et le charbon actif DARCO KB-WJ ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne). L'acide carminique (E120), le rouge de betterave (E162), les anthocyanes de chou rouge (E163), la chlorophylle (E140) et le lycopène (E160) ont été achetés chez Nactis-Sofral (Strasbourg, France). Le méthanol, l'éthanol, l'acétonitrile de qualités HPLC, le persulfate de potassium, l'acétate d'ammonium, le chlorure de potassium (KCl), le chlorure de sodium (NaCl) et l'acide chlorhydrique (HCl) ont été achetés chez VWR (Strasbourg, France). L'eau ultrapure est produite au laboratoire par un système de purification Synergy UV (Millipore, Molsheim, France). L'orge (*Hordeum vulgare*) malté, de variété Sunshine, provient de la micromalterie des Brasseries Kronenbourg (Strasbourg, France) où il a été brassé, puis fermenté. Le houblon a été acheté chez Yakima Chief, Inc (Suunyside WA, Etats-Unis) sous la forme d'une résine riche en acides α et β et huiles, produite par extraction supercritique au CO₂.

2.2 Solutions stock

Les solutions stock d'ABTS^{•+} et des différents étalons de composés phénoliques sont préparées selon la méthode décrite dans le chapitre 3. Une solution stock d'ABTS^{•+} stable est préparée en mélangeant une solution aqueuse d'ABTS et une solution de persulfate de potassium de concentration finale respective de 7 mmol/L et 2,5 mmol/L (une nuit, à l'obscurité et à 4°C)^{82,134}. Avant son utilisation, la solution stock d'ABTS^{•+} est diluée dans l'éthanol pour atteindre une absorbance de 0,70 (\pm 0,02) AU à 734 nm. Les solutions stocks d'étalons de composés phénoliques sont préparées par dissolution des composés dans le méthanol (1 mg/mL) et sont ensuite stockées à l'obscurité à -20°C. Avant utilisation, les solutions stocks sont diluées dans un mélange méthanol/eau (50/50, v/v).

2.3 Etude des composés antioxydants à différentes étapes du procédé de fabrication de la bière

2.3.1 Procédé de brassage

Le malt est brassé avec de l'eau pour obtenir le moût (13°Plato) selon le diagramme de brassage suivant : 0-20 min, 37°C; 20-34 min, 37-50°C; 34-44 min, 50°C; 44-59 min, 50-65°C; 59-69 min, 65°C; 69-82 min, 65-76°C; 82-92 min, 76°C. Le moût est bouilli sans houblon (1 h, 100°C) pour obtenir le moût bouilli, puis fermenté pour obtenir le moût bouilli fermenté. Le moût est également bouilli avec du houblon (1 h, 100°C) pour obtenir le moût bouilli houblonné, puis fermenté pour obtenir la bière. Le houblon utilisé est sous la forme d'une résine produite par extraction supercritique au CO₂ ne contenant pas de polyphénols, mais il est l'ingrédient le plus couramment ajouté dans le moût des brasseries industrielles. La procédure d'extraction est appliquée après chacune des étapes précédentes.

Le procédé de brassage a également été appliqué à l'extrait de malt obtenu par extraction des composés du malt à l'acétate d'éthyle. L'extrait de malt brassé (EMB) est obtenu par mélange de l'extrait de malt (EM) avec de l'eau (mélange correspondant à 10 mL de moût à une densité finale de 13°Plato) et brassé selon le diagramme de brassage décrit ci-dessus. L'extrait de malt brassé et bouilli (EMBB) est obtenu en faisant bouillir l'extrait de malt brassé (EMB) (1 h, 100°C). L'extrait de malt brassé bouilli et houblonné (EMBBH) est obtenu en faisant bouillir l'extrait de malt brassé (EMB) avec l'extrait de houblon (EH) (1 h, 100°C). La même expérience est réalisée sur l'extrait de houblon (EH) avec de l'eau pour obtenir un extrait de houblon bouilli (EHB) (**Figure 4.1**, page 95). Les échantillons sont évaporés à sec dans un évaporateur sous vide à froid (Savant SPD121P SpeedVac® Concentrator, ThermoScientific, Gometz le Châtel, France) et les résidus, dissous dans 1 mL de méthanol/eau (50/50, v/v), sont filtrés sur membrane (0,45 µm, Macherey-Nagel) et injectés (20 µL) dans le système chromatographique.

2.3.2 Extraction des composés phénoliques

La procédure d'extraction des composés phénoliques utilisée est adaptée de celle de l'équipe de Samaras *et al.* avec de légères modifications¹⁶³. Les échantillons d'orge et de malt sont finement broyés dans un broyeur cryogénique (6870 Freezer/Mill, Spex CertiPrep, Stanmore, Royaume-Uni) pendant 9 minutes (3 x 3 minutes) à une fréquence de 20 impacts/seconde. Les échantillons broyés (1,63 g) sont mis en suspension dans un tampon acétate (acétate d'ammonium, 50 mM, pH 5,4,

10,72 mL) et homogénéisés pendant 2 min à l'aide d'un pilon et d'un mortier (conservé dans la glace). Après centrifugation (920 g, 10 min), le surnageant est filtré à travers un papier filtre Whatman n° 1 (Whatman, Paris, France), pour enlever les éventuelles particules et obtenir ainsi l'extrait au tampon acétate. La proportion d'orge moulu dans le tampon acétate (1,63 g dans 10,72 mL) est équivalente à 10 mL de moût à une densité finale de 13°Plato. Les composés phénoliques sont extraits à l'acétate d'éthyle, à partir des extraits au tampon acétate d'orge et de malt, des différents échantillons de bière et de la résine de houblon, selon la méthode décrite dans le chapitre 3. Les échantillons (10 mL) sont d'abord acidifiés à pH 2,0 par ajout de HCl (37 %), puis 0,5 g de chlorure de sodium sont ajoutés. Trois extractions successives sont ensuite réalisées dans des tubes de centrifugation en polypropylène Corning® (New York, USA) de 50 mL avec 10 mL d'acétate d'éthyle sur un agitateur giratoire à 200 tr/min^{66,86} pendant 15 min. Après centrifugation des mélanges (2500 g, 10 min), les surnageants sont groupés et évaporés à sec sous vide (30°C, 80 mbar). Le résidu obtenu est dissous dans 1 mL de méthanol/eau (50/50, v/v), filtré sur membrane (0,45 µm, Macherey-Nagel, Hoerd, France) et injecté (20 µL) dans le système chromatographique. Dans le cas de l'extrait de malt, utilisé pour appliquer le procédé de brassage, le résidu est dissous dans 1 mL d'eau.

2.3.3 Analyse chromatographique

L'analyse chromatographique a été effectuée selon la méthode décrite dans le chapitre 3. Le système HPLC (Waters, Saint-Quentin-Fallavier, France) utilisé est constitué d'un contrôleur 600S, d'une pompe 616, d'un injecteur automatique 717 Plus, d'un détecteur UV-visible à photodiode 2996, d'un détecteur UV-visible 486 pour la détection de l'ABTS^{••}, et d'une pompe HPLC supplémentaire utilisée pour la distribution de la solution d'ABTS^{••}. Après mélange de cette dernière avec la phase mobile sortant de la colonne, la réaction a lieu pendant 1 min, le temps nécessaire pour parcourir un tube en PEEK de 7 m de long et 0,5 mm de diamètre. Les séparations sont réalisées à température ambiante sur une colonne de chromatographie C18 hypersil BDS (5 µm, 250 x 4,6 mm, ThermoScientific, Gometz le Châtel, France). La phase mobile, délivrée à 1 mL/min, consiste en un mélange d'eau à 0,1% (v/v) d'acide formique (éluant A) et de méthanol (éluant B) selon le gradient suivant : 0-25 min, 3-25% de B; 25-26 min, 25-18% de B; 26-29 min, 18% de B; 29-47 min, 18-30% de B; 47-57 min 30% de B; 57-67 min, 30-65% de B; 67-77 min, 65% de B. La solution d'ABTS^{••} est délivrée à 0,5 mL/min. La détection des composés séparés est réalisée à 254 nm, alors que celle de l'ABTS^{••} réduit l'est à 412 nm.

2.3.4 Identification de composés phénoliques

L'étude qualitative des composés phénoliques est réalisée par HPLC couplée à la spectrométrie de masse équipée d'une source d'ionisation (ESI). Les spectres de masse à haute résolution (HRMS) sont réalisés par le Service Commun d'Analyses de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg en utilisant un spectromètre de masse de type Q-TOF 6520 (Agilent, Massy, France). Les composés analysés sont préalablement séparés à l'aide d'un système HPLC constitué d'un module de distribution de solvants 1200 (Agilent) et d'une colonne de chromatographie en phase inverse C18 (1,9 μm , 100 x 1 mm). La phase mobile est constituée d'un mélange isocratique eau/acétonitrile additionné de 0,01% (v/v) d'acide formique.

2.3.5 Courbes de calibrage

Les courbes de calibrage de chaque composé phénolique, sont établies à partir des données de trois injections (20 μL) de mélanges étalons obtenus par dilutions des solutions mères (méthanol/eau (50/50, v/v)). Les courbes (six points de données, n=3) sont linéaires avec des valeurs R^2 supérieures à 0,99. La concentration de chaque composé phénolique connu est déterminée par référence à l'absorbance de son étalon, alors que le potentiel antioxydant est calculé par rapport à la concentration de Trolox nécessaire pour produire une activité antioxydante équivalente et est exprimé en équivalent Trolox (μM).

2.4 Etude des bières décolorées

2.4.1 Décoloration de la bière

La bière est décolorée selon la méthode décrite dans le chapitre 2. Dix litres de bière sont mélangés à 50 g de Kieselguhr et 100 g de charbon actif KB-WJ, puis agités pendant 30 min à 250 tr/min à température ambiante. Un filtre à Kieselguhr avec une membrane (5 μm , Millipore) est d'abord alluvionné avec 50 g de Kieselguhr dans 5 L d'eau distillée, puis le mélange (bière, Kieselguhr et charbon actif KB-WJ) est filtré, afin d'obtenir une bière décolorée.

2.4.2 Coloration de la bière

Des bières avant et après décoloration sont additionnées de différents colorants : la chlorophylle (500 mg/L) ; le lycopène (100 mg/L) ; la poudre de betterave (500 mg/L) ; l'acide carminique (10 mg/L) et les anthocyanes de chou rouge (125, 250 et 500 mg/L). Ces deux derniers colorants ont été testés aux pH 4,4 et 6,4. Ces deux pH permettant d'obtenir différentes couleurs, ont été déterminés grâce à une solution de KCl 0,25M ajustée à différents pH (avec NaOH ou HCl) et additionnée d'acide carminique ou d'anthocyanes à 10 mg/L. La couleur de chaque solution est analysée par spectrophotométrie UV-visible (UV-2401 PC, Shimadzu, Champs-sur-Marne, France) et les différences de couleur entre les deux bières ont été analysées par le système des couleurs L*a*b*.

2.5 Analyses statistiques

Les données sont analysées par le test ANOVA (au seuil de signification de 95%) à l'aide du logiciel Statgraphics Plus. Tous les échantillons sont analysés en triple exemplaire.

3 Résultats et discussion

3.1 Etude des composés antioxydants à différentes étapes du procédé de fabrication de la bière

La méthode LC-AOx a été appliquée à la séparation des composés phénoliques extraits à différentes étapes du procédé de fabrication de la bière et à l'évaluation de leur activité antioxydante. Cela a permis de suivre les profils des composés phénoliques et des molécules antioxydantes à chaque étape du procédé, de l'orge à la bière, en passant par le malt et le moût (Figure 4.1).

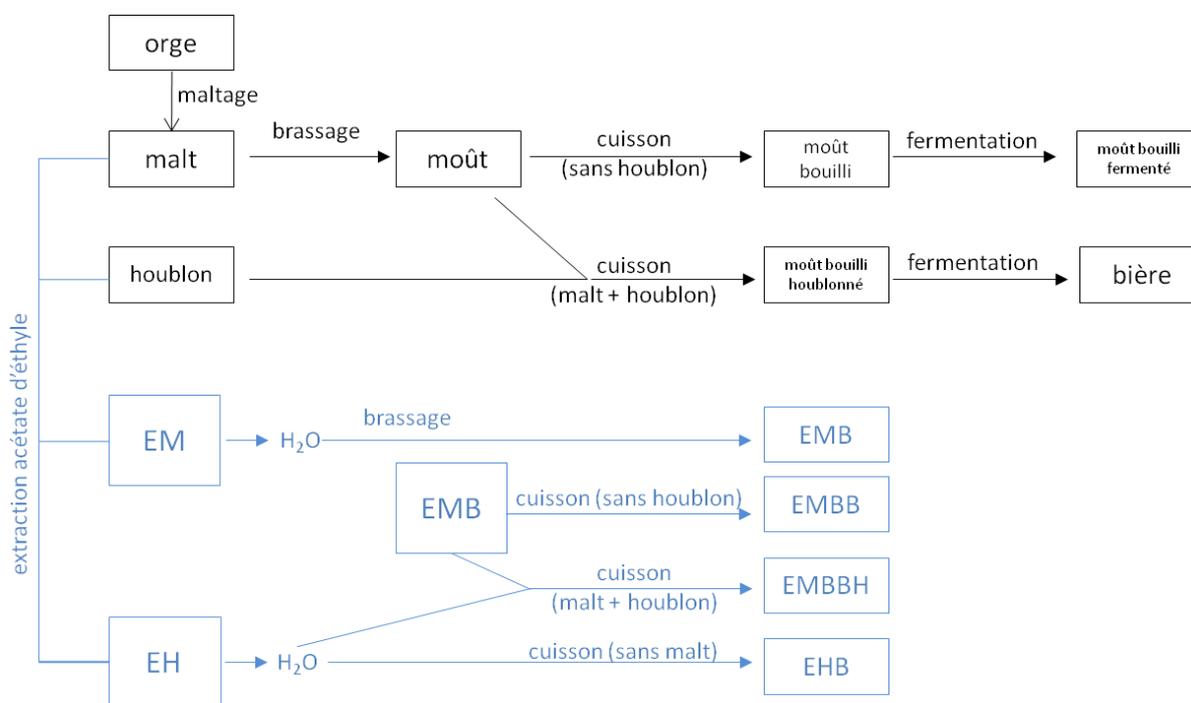


Figure 4.1 : Les différentes étapes du procédé de fabrication de la bière : maltage, brassage, cuisson et fermentation avec ou sans houblon ; brassage et cuisson appliqué aux extraits de malt et de houblon obtenus après extraction à l'acétate d'éthyle (EM, extrait de malt ; EH, extrait de houblon ; EMB, extrait de malt brassé ; EMBB, extrait de malt brassé et bouilli ; EMBBH, extrait de malt brassé, bouilli et houblonné ; EHB, extrait de houblon bouilli).

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'étape du maltage afin de comparer les teneurs en composés phénoliques et les activités antioxydantes de l'orge et du malt. Puis, afin de

différencier les apports en composés phénoliques et antioxydants des deux matières premières de la bière (le malt et le houblon), nous avons suivi les étapes de brassage, de cuisson et de fermentation. Le moût, le moût bouilli et houblonné et la bière représentent le procédé normal de fabrication de la bière, tandis que le moût bouilli et le moût bouilli et fermenté représentent un procédé excluant l'étape de houblonnage. Enfin, dans l'objectif d'étudier l'influence des températures appliquées lors des procédés de brassage et de cuisson, ces derniers ont été appliqués, non aux matières premières (malt et houblon), mais à leurs extraits respectifs à l'acétate d'éthyle (**Figure 4.1**). L'EMB, l'EMBB et l'EMBBH servent à évaluer l'impact du brassage, de la cuisson et du houblonnage sur l'EM. De même, l'EHB a été utilisé pour évaluer l'impact du procédé de cuisson sur l'EH.

3.1.1 Composés antioxydants au cours du maltage

La **Figure 4.2** montre les chromatogrammes LC-AOx correspondant aux extraits à l'acétate d'éthyle d'orge et de malt et leurs activités antioxydantes. La partie supérieure de chaque chromatogramme représente principalement les composés phénoliques de l'orge (**Figure 4.2a**) et du malt (**Figure 4.2c**), détectés à 254 nm, tandis que la partie inférieure est obtenue par détection UV à 412 nm, après réaction post-colonne et représente l'activité antioxydante des composés extraits de l'orge (**Figure 4.2b**) et du malt (**Figure 4.2d**).

A partir des profils de l'orge et du malt, dix composés phénoliques ont pu être identifiés en utilisant des standards de chromatographie : l'acide protocatéchique (3) ; l'acide p-hydroxybenzoïque (5) ; la catéchine (6) ; l'acide chlorogénique (7) ; l'acide vanillique (8) ; l'acide caféique (9) ; l'épicatéchine (10) ; l'acide p-coumarique (11) ; l'acide férulique (12) et l'acide sinapique (13). Parmi ces composés, seuls les acides p-hydroxybenzoïque, vanillique et p-coumarique ne sont pas antioxydants (**Figure 4.2**). Cinq autres composés (1, 2, 4, 14 et 15), non identifiés en utilisant des standards de chromatographie, présentent également des activités antioxydantes.

Les composés 2 et 4 ont pu être identifiés par analyse LC-ESI-MS, en mode positif, et par HRMS comme dimères de procyanidine et prodelfinidine²⁵. Le composé 2 montre une $[M+H]^+$ à 595 m/z et une masse exacte de 595,14534 et correspond à la prodelfinidine B3, un dimère (gallocatéchine-catéchine). Le composé 4 montre une $[M+H]^+$ à 579 m/z et une masse exacte de 579,15039 et correspond à la procyanidine B3, un dimère (catéchine-catéchine)^{23,25,165}. Les composés 1, 14 et 15 n'ont quant à eux pas été identifiés, bien que des tentatives d'identification aient été faites, notamment du (2R,3S)-catéchine-7-O- β -D-glucopyranoside, retrouvé par Friedrich *et al.*³⁰

dans l'orge et le malt. Cependant l'utilisation de l'analyse LC-ESI-MS ne nous a pas permis d'identifier ce glucoside.

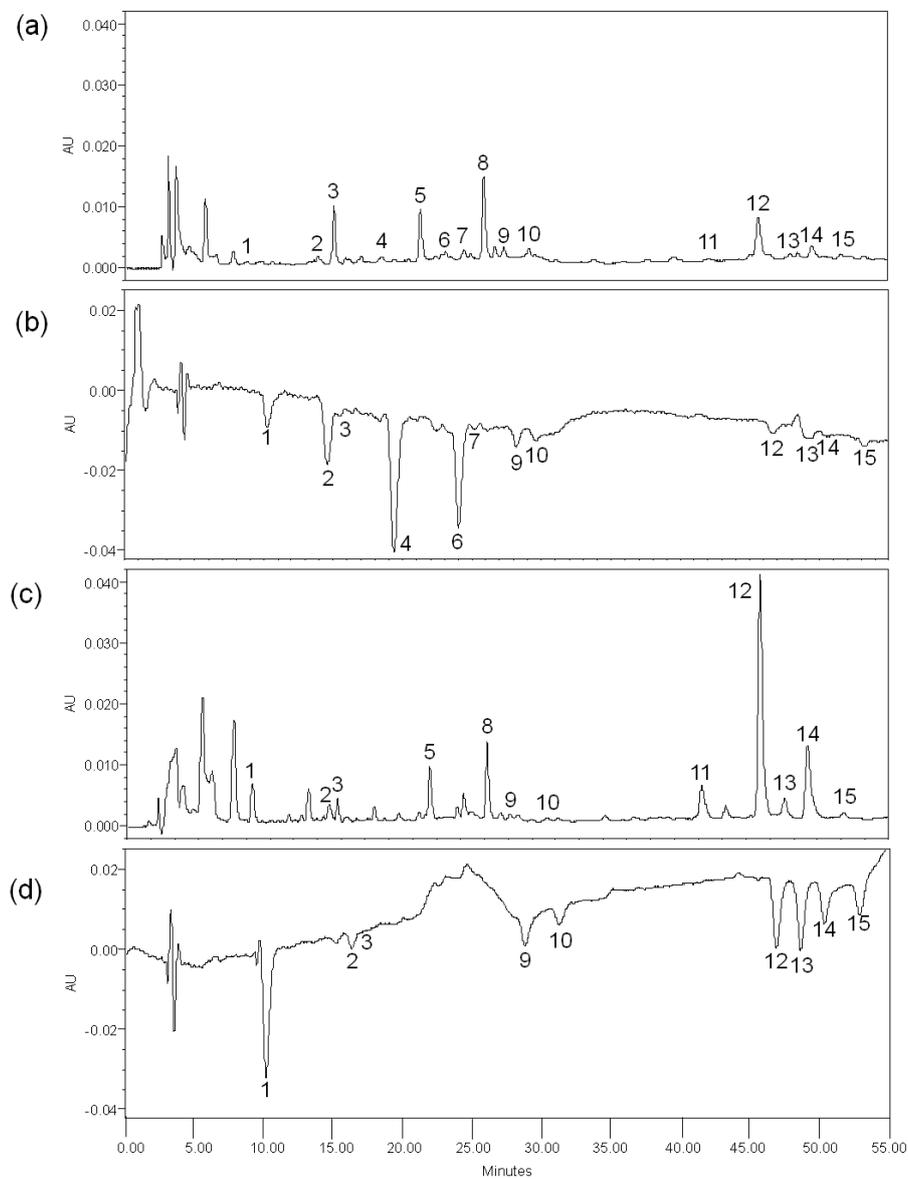


Figure 4.2 : Détermination chromatographique des composés phénoliques et de leurs activités antioxydantes correspondantes dans l'orge (a, b) et le malt (c, d). Les pics sont comme suit: 1, composé non identifié; 2, prodelphinidine B3; 3, acide protocatéchuïque; 4, procyanidine B3; 5, acide p-hydroxybenzoïque ; 6, catéchine ; 7, acide chlorogénique ; 8, acide vanillique ; 9, acide caféique ; 10, épicatechine ; 11, acide p-coumarique ; 12, acide férulique ; 13, acide sinapique ; 14 et 15, composés non identifiés.

L'activité antioxydante dans l'orge provient en grande partie de la prodelphinidine B3, de la procyanidine B3 et de la catéchine qui ensemble correspondent à 53% de l'activité totale (**Tableau 4.1**). D'après Zhao *et al.*, les composés de structure catéchine sont plus antioxydants que les autres composés phénoliques⁹⁵. Cependant, nous avons vu dans le chapitre 3 qu'avec la méthode LC-AOx les acides caféique, chlorogénique et sinapique sont plus antioxydants que la catéchine. La contribution de la prodelphinidine B3, de la procyanidine B3 et de la catéchine à l'activité antioxydante totale de l'orge semble plutôt due à leurs teneurs élevées. Ceci est en accord avec les études montrant que la catéchine et les composés de structure flavonoïde sont généralement les plus abondants dans l'orge²³.

Tableau 4.1 : Teneur et activité antioxydante des composés de l'orge et du malt (n=9)

Composés phénoliques	Orge		Malt	
	UV Conc. (μM)	AOx éq. Trolox (μM)	UV Conc. (μM)	AOx éq. Trolox (μM)
1	nq	2 \pm 1	nq	10 \pm 3
Prodelphinidine B3	nq	5 \pm 2	nq	2 \pm 1
Acide protocatéchuique	12 \pm 1	3 \pm 1	3 \pm 1	2 \pm 1
Procyanidine B3	nq	10 \pm 6	nd	nd
Acide p-hydroxybenzoïque	7 \pm 0	nAOx	5 \pm 1	nAOx
Catéchine	15 \pm 8	7 \pm 3	nd	nd
Acide chlorogénique	5 \pm 0	2 \pm 0	nd	nd
Acide vanillique	17 \pm 1	nAOx	10 \pm 1	nAOx
Acide caféique	3 \pm 0	2 \pm 1	1 \pm 0	3 \pm 1
Epicatéchine	24 \pm 7	2 \pm 0	15 \pm 3	3 \pm 1
Acide p-coumarique	3 \pm 1	nAOx	30 \pm 8	nAOx
Acide férulique	20 \pm 2	2 \pm 1	73 \pm 7	6 \pm 2
Acide sinapique	1 \pm 0	2 \pm 1	8 \pm 2	6 \pm 1
14	nq	2 \pm 0	nq	5 \pm 1
15	nq	2 \pm 0	nq	5 \pm 2

nAOx, non antioxydant ; nq, non quantifié (pas d'étalons) ; nd, non détecté.

A l'inverse de l'orge, l'acide chlorogénique, la catéchine et la procyanidine B3 ne sont pas détectées dans le malt, et l'activité liée à la prodelphinidine B3 y est plus faible (**Tableau 4.1**). La diminution de la teneur en catéchine suite au maltage est conforme aux résultats d'études précédentes. Goupy *et al.* ont montré que la teneur en composés de type catéchine diminuait après le maltage et plus encore pour les monomères que pour les dimères²³. La même observation a été faite par Friedrich *et al.* avec en plus une augmentation de la teneur en catéchine glucoside³⁰. Une

glycosylation de la catéchine au cours du maltage pourrait expliquer le fait qu'elle ne soit plus détectée par la méthode LC-AOx.

Ce sont les acides férulique et sinapique, ainsi que le composé 1, non identifié, qui contribuent le plus (52%) à l'activité antioxydante du malt. L'activité liée au composé 1 et aux acides férulique et sinapique est, respectivement, cinq et trois fois plus importante dans le malt que dans l'orge. En réalité, ce sont les teneurs en ses composés qui ont considérablement augmenté suite au maltage, ce qui a également été observé pour l'acide p-coumarique. Les acides férulique et p-coumarique sont présents sous forme liée dans les grains d'orge⁶. Une libération de ces composés durant le touraillage, rendrait leur extraction plus facile et serait responsable de l'augmentation observée⁴².

Globalement, les mêmes tendances que celle observée avec l'activité antioxydante sont observées avec les teneurs totales en composés phénoliques. Toutefois, on observe quelques problèmes de linéarité entre les résultats des composés phénoliques et de l'activité antioxydante, pour l'acide caféique et l'épicatéchine. Ceci pourrait être dû à l'effet de la matrice qui affecterait la réponse antioxydante.

En considérant les différents extraits, les aires des pics de chaque chromatogramme ont été additionnées et les moyennes \pm écart-types ont été déterminées à partir de trois déterminations répétées trois fois. La **Figure 4.3** montre la teneur totale en composés phénoliques (**Figure 4.3a**) et l'activité antioxydante totale (**Figure 4.3b**) de l'orge et du malt.

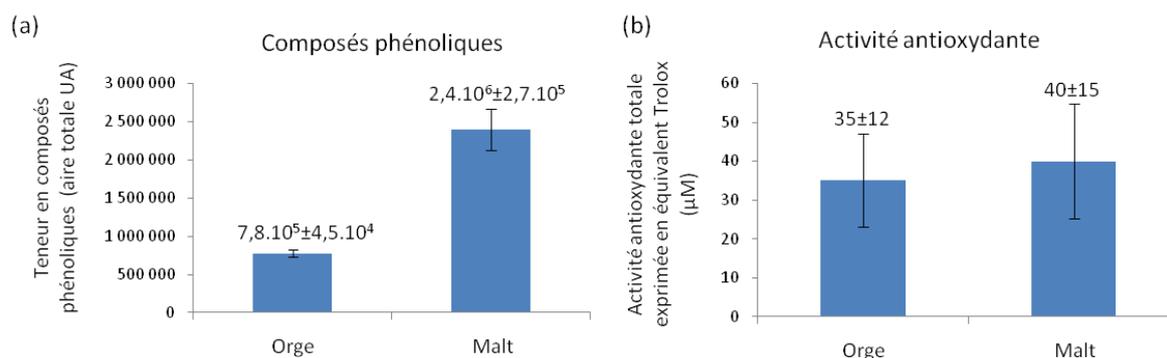


Figure 4.3 : Teneur en composés phénoliques (a) et activité antioxydante (b) totales de l'orge et du malt.

La teneur totale en composés phénoliques est trois fois plus élevée dans le malt que dans l'orge (**Figure 4.3a**), ce qui est conforme aux résultats obtenus par Maillard *et al.* (1996)⁵⁴. Cette différence est due, en grande partie, à l'augmentation importante des quantités des acides p-coumarique, férulique et sinapique (**Tableau 4.1**). Ces trois composés correspondent en effet à 22% de la teneur totale en composés phénoliques de l'orge et à 77% de celle du malt.

L'activité antioxydante totale, exprimée en équivalent Trolox (μM), ne suit pas la même tendance que la teneur totale en composés phénoliques, car aucune différence significative ($p > 0,05$) n'est observée entre l'orge et le malt (**Figure 4.3b**). Cependant, les deux profils chromatographiques d'activité antioxydante ne sont pas similaires dans la mesure où la disparition de certains pics a été compensée par l'apparition d'autres (**Figure 4.2b, d**). Cette compensation est en grande partie due à l'activité des acides férulique et sinapique et des composés 1, 14 et 15 dont les teneurs ont augmenté.

3.1.2 Composés antioxydants au cours du brassage et de la fermentation

La **Figure 4.4** montre les chromatogrammes LC-AOx obtenus avec des extraits à l'acétate d'éthyle de moût (**Figure 4.4a**), de moût bouilli (**Figure 4.4b**), de moût bouilli et houblonné (**Figure 4.4c**), de moût bouilli et fermenté (**Figure 4.4d**) et de bière (**Figure 4.4e**) et leurs activités antioxydantes. Les composés suivants ont été détectés : la prodelphinidine B3 (2), l'acide protocatéchique (3), la procyanidine B3 (4), l'acide p-hydroxybenzoïque (5), la catéchine (6), l'acide chlorogénique (7), l'acide vanillique (8), l'acide caféique (9), l'épicatéchine (10), l'acide p-coumarique (11), l'acide férulique (12), l'acide sinapique (13) et le composé 1 non identifié. Quatre nouveaux composés non identifiés ont été détectés au cours de la transformation de la bière et ont été nommés a, b, c et x. Seuls les composés 14 et 15 de l'orge et du malt ne semblent pas présents ou sont présents en quantités trop faibles pour être détectés.

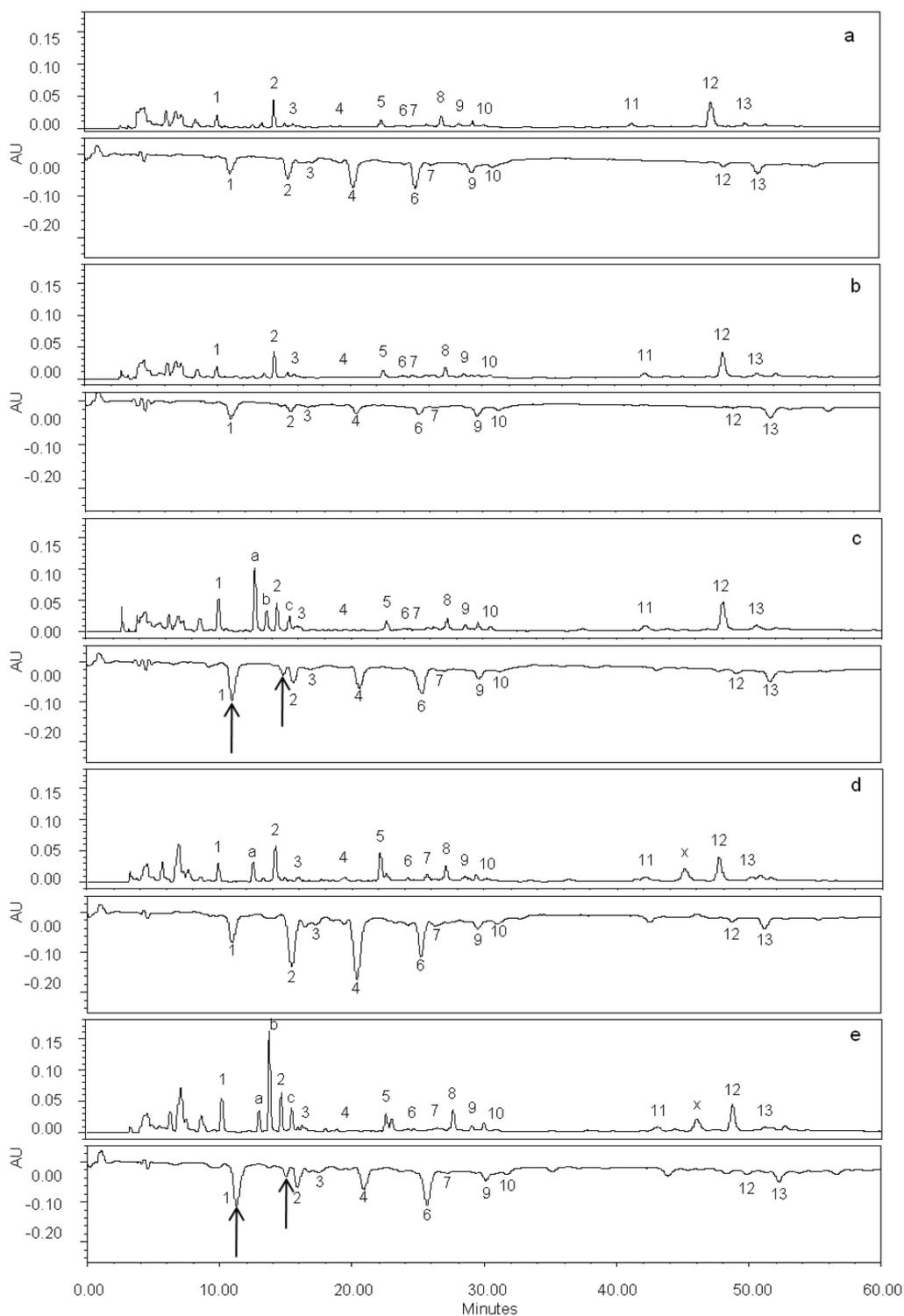


Figure 4.4 : Détermination chromatographique des composés phénoliques et de leurs activités antioxydantes correspondantes dans : le moût (a); le moût bouilli (b); le moût bouilli et houblonné (c); le moût bouilli et fermenté (d) et la bière (e). Les pics sont comme suit: 1, composé non identifié; 2, prodéphinidine B3; 3, l'acide protocatéchique; 4, procyanidine B3; 5, l'acide p-hydroxybenzoïque ; 6, catéchine ; 7, acide chlorogénique ; 8, acide vanillique ; 9, l'acide caféique ; 10, épicatechine ; 11, l'acide p-coumarique ; 12, acide férulique ; 13, acide sinapique ; a, b, c, et x, composés non identifiés.

Les chromatogrammes de la teneur en composés phénoliques du moût (**Figure 4.4a**) et du moût bouilli (**Figure 4.4b**) sont similaires. Avec le moût bouilli et houblonné (**Figure 4.4c**), les concentrations de quatre composés semblent être plus élevées que dans les autres profils : a (12,5 min), b (13,8 min), 2 (14,2 min) et c (15,5 min). Avec le moût bouilli et fermenté (**Figure 4.4d**), la concentration du composé a diminue et celle du composé x (46,1 min) augmente. Avec la bière (**Figure 4.4e**), on retrouve les pics correspondant aux composés a, b, c et x, mais le pic b (13,8 min) est trois fois plus important que celui du moût bouilli et houblonné. Cette augmentation peut être liée à une meilleure extraction des composés grâce à la présence de l'éthanol produit lors de la fermentation.

Les profils de l'activité antioxydante sont assez similaires pour tous les chromatogrammes. Pour le moût bouilli et houblonné (**Figure 4.4c**) et la bière (**Figure 4.4e**), le composé antioxydant 1 (11 min) a une concentration un peu plus élevée et un pic émerge à 14,9 min (deuxième flèche), correspondant au composé b à 13,8 min dans les profils de détection UV. Ces différences entre les chromatogrammes peuvent être dues à la présence de composés, autres que phénoliques, formés au cours de la cuisson avec houblon et qui absorbent dans l'UV, mais ne semblent pas être dues à l'apparition de nouveaux composés phénoliques qui serait due à l'addition de houblon ou de la fermentation. En effet, l'extrait de houblon a été produit par extraction supercritique au CO₂ et le CO₂, non-polaire, n'est pas un bon solvant d'extraction des composés phénoliques polaires¹⁶⁶.

L'acide férulique est le composé phénolique dont la teneur est la plus importante tout au long du procédé de fabrication de la bière (**Tableau 4.2**). Cependant, la contribution antioxydante la plus importante provient de la prodelphinidine B3, de la procyanidine B3 et de la catéchine, qui ensemble correspondent à 54% de l'activité antioxydante totale du moût, 59% de celle du moût bouilli, 37% de celle du moût bouilli et houblonné, 45% de celle du moût bouilli et fermenté et 25% de celle de la bière. Ces trois composés sont donc présents dans les étapes de brassage, de cuisson et de fermentation alors qu'ils ne l'étaient pas ou peu dans le malt. Ces composés ne semblent donc pas être dégradés dans le malt. D'après Friedrich *et al.*, ces composés ont pu être glycosylés dans le malt³⁰. La glycosylation de ces composés augmente leur solubilité dans l'eau et cette solubilité augmente avec l'augmentation de la température¹⁶⁷. Leur présence dans le moût peut être due à l'étape de brassage qui correspond à une extraction des composés du malt à l'eau à 37°C et plus. Les différents paliers de températures du brassage correspondent aux températures optimales d'action des hydrolases telles que les amylases ; ces enzymes vont permettre la déglycosylation des composés qui pourront alors être détectés dans le moût par la méthode LC-AOx.

Au cours du procédé, on observe que la teneur des acides p-hydroxybenzoïque, chlorogénique et vanillique est multipliée, respectivement par trois et par deux au cours de la fermentation avec et sans houblon (**Tableau 4.2**). L'activité antioxydante des composés 1 et b est multipliée par deux au cours de l'étape de cuisson avec houblon.

L'activité antioxydante de la prodelphinidine B3 et de la procyanidine B3 augmente au cours de la cuisson car la solubilité des composés est augmentée dans l'eau à température élevée. Cependant leur activité antioxydante diminue respectivement de 43% et 62% au cours de l'étape de fermentation avec houblon. Cette diminution de l'activité antioxydante peut être liée à une diminution de la teneur de ces composés suite à leur adsorption par les levures utilisées lors de la fermentation. En effet, Razmkhab *et al.* ont démontré que les composés de type catéchine étaient significativement retenus par les levures au cours de la fermentation¹⁶⁸.

Tableau 4.2 : Teneur et activité antioxydante des composés antioxydants dans les différentes étapes du procédé de fabrication de la bière (n=9)

	Moût		Moût bouilli		Moût bouilli et houblonné		Moût bouilli et fermenté		Bière	
	UV	AOx	UV	AOx	UV	AOx	UV	AOx	UV	AOx
	Conc. (µM)	éq.Trolox (µM)	Conc. (µM)	éq.Trolox (µM)	Conc. (µM)	éq.Trolox (µM)	Conc. (µM)	éq.Trolox (µM)	Conc. (µM)	éq.Trolox (µM)
1	nq	24±10	nq	32±8	nq	53±10	nq	45±12	nq	60±12
a	nq	8±4	nq	1±0	nq	4±0	nq	8±4	nq	8±1
b	nq	5±0	nq	7±5	nq	12±3	nq	8±1	nq	15±7
Prodelphinidine B3	nq	49±34	nq	73±46	nq	35±18	nq	58±30	nq	20±13
c	nq	8±5	nq	8±3	nq	10±4	nq	8±4	nq	10±3
Acide protocatéchique	21±10	6±2	7±3	3±1	17±7	11±5	9±4	11±3	27±13	10±5
d	nq	8±3	nq	8±8	nq	9±0	nq	6±1	nq	11±8
Procyanidine B3	nq	74±51	nq	113±76	nq	58±40	nq	74±38	nq	22±17
e	nq	5±3	nd	nd	nq	7±0	nq	4±0	nd	nd
Acide p-hydroxybenzoïque	8±2	nAOx	11±3	nAOx	7±3	nAOx	38±15	nAOx	18±2	nAOx
f	nq	5±3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Catéchine	35±18	38±19	37±18	47±23	33±10	44±31	29±12	43±13	38±21	32±19
Acide chlorogénique	4±2	5±3	5±1	nd	6±3	9±1	13±12	10±0	11±2	nd
Acide vanillique	16±10	nAOx	19±3	nAOx	17±7	nAOx	34±13	nAOx	33±5	nAOx
Acide caféique	13±5	15±1	13±3	17±6	12±4	15±2	13±5	14±8	10±6	11±7
g	nq	8±2	nq	13±2	nq	10±2	nq	14±6	nq	11±5
Epicatéchine	35±19	2±1	nd	nd	14±9	13±1	49±0	11±0	19±7	23±3
h	nd	nd	nd	nd	nq	13±7	nq	17±2	nd	nd
i	nd	nd	nd	nd	nq	16±0	nd	nd	nd	nd
Acide p-coumarique	70±31	nAOx	84±26	nAOx	64±16	nAOx	45±23	nAOx	60±12	nAOx
j	nq	3±1	nq	9±0	nq	9±2	nq	5±1	nq	17±9
Acide férulique	129±52	8±5	133±23	11±5	118±49	9±2	115±49	12±1	114±11	11±6
Acide sinapique	18±7	15±8	22±3	21±6	28±10	20±4	10±4	21±7	11±2	16±9

nAOx, non antioxydant ; nq, non quantifié (pas d'étalons) ; nd, non détecté.

Pour chaque extrait, les aires des pics de chaque chromatogramme ont été additionnées et la moyenne \pm écart-type a été déterminée à partir de trois déterminations répétées trois fois. La **Figure 4.5** montre la teneur totale en composés phénoliques (**Figure 4.5a**) et l'activité antioxydante totale (**Figure 4.5b**) des extraits de moût, de moûts bouilli, bouilli et houblonné, bouilli et fermenté et de bière.

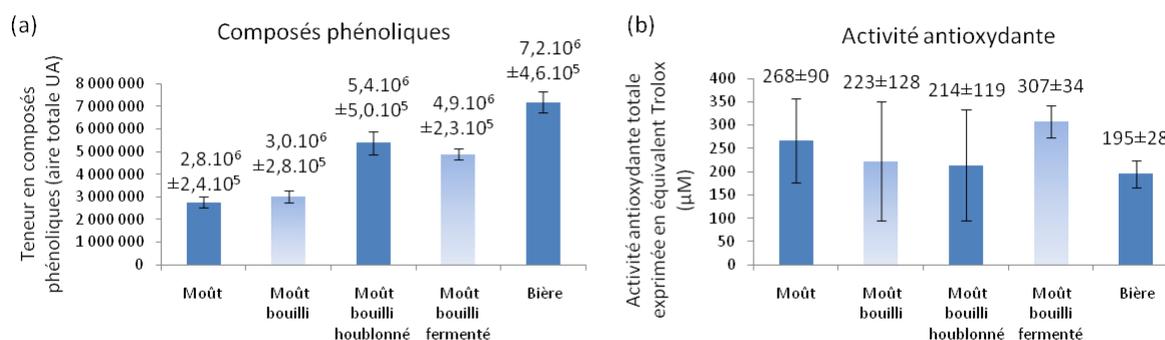


Figure 4.5 : Teneurs en composés phénoliques (a) et activité antioxydante (b) totales à différentes étapes du procédé de fabrication de la bière.

La teneur totale en composés phénoliques ne semble pas être affectée par l'étape de brassage (**Figure 4.3a et 4.5a**), ni par l'étape de la cuisson sans houblon, mais elle est multipliée par deux suite à l'étape de houblonnage (**Figure 4.5a**). Cette augmentation ne peut être due ni à l'apparition de nouveaux composés phénoliques qui serait due à l'addition de houblon, puisque la résine de houblon utilisée est dépourvue de composés phénoliques, ni à l'augmentation de la teneur en composés naturels connus, d'après le **Tableau 4.2**. Cependant, la teneur des composés phénoliques non identifiés 1, a, b et c semble augmenter à l'étape du houblonnage (**Figure 4.4c**). Cette augmentation pourrait être due à la présence de composés absorbant dans l'UV. L'étape de fermentation augmente également la teneur totale en composés phénoliques (**Figure 4.5a**), probablement à cause de l'augmentation des quantités des composés 1 et b (**Figure 4.4e**) et des acides p-hydroxybenzoïque, chlorogénique et vanillique (**Tableau 4.2**).

L'activité antioxydante totale ne suit pas la même tendance que la teneur totale en composés phénoliques. Elle est multipliée par six entre le malt et le moût (**Figure 4.3b et 4.5b**). Cette augmentation est principalement due à la présence de la prodelphinidine B3, de la procyanidine B3 et de la catéchine qui contribuent à 54% de l'activité antioxydante totale du moût, alors qu'elles sont absentes du malt. Cependant, aucune des étapes de transformation de la bière n'a d'effet significatif

($p > 0,05$) sur l'activité antioxydante totale (**Figure 4.5b**). La variation de l'activité antioxydante individuelle des composés au cours du procédé ne semble pas affecter l'activité totale de chaque étape. Toutefois, on constate une grande variation dans la répétabilité des résultats de l'activité antioxydante, contrairement à la teneur en composés phénoliques, ce qui suggère que la matrice affecte la réponse antioxydante des composés.

3.1.3 Impact du procédé de brassage sur l'activité antioxydante totale

Les procédés de brassage et de cuisson ont été appliqués aux extraits à l'acétate d'éthyle de malt et de houblon, dans l'objectif d'étudier l'influence des températures appliquées lors du brassage sur les teneurs totales en composés phénoliques et les activités antioxydantes correspondantes. Ainsi, la méthode LC-AOx a été appliquée à l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de malt (EM), de malt brassé (EMB), de malt brassé et bouilli (EMBB), de malt brassé, bouilli et houblonné (EMBBH), de houblon (EH) et de houblon bouilli (EHB).

Au cours du procédé de brassage, la teneur totale en composés phénoliques de l'EM diminue de 62% (**Figure 4.6a**). Elle ne varie pas pendant l'étape de cuisson sans houblon, mais diminue de 20% durant l'étape de cuisson avec houblon (**Figure 4.6a**). Il n'y a pas de composés phénoliques dans l'EH, la résine de houblon ayant été produite par extraction supercritique au CO_2 , alors que la teneur en composés phénoliques de l'EHB n'est pas nulle, ce qui confirme la présence de composés, autres que phénoliques, formés au cours de la cuisson et qui absorbent dans l'UV.

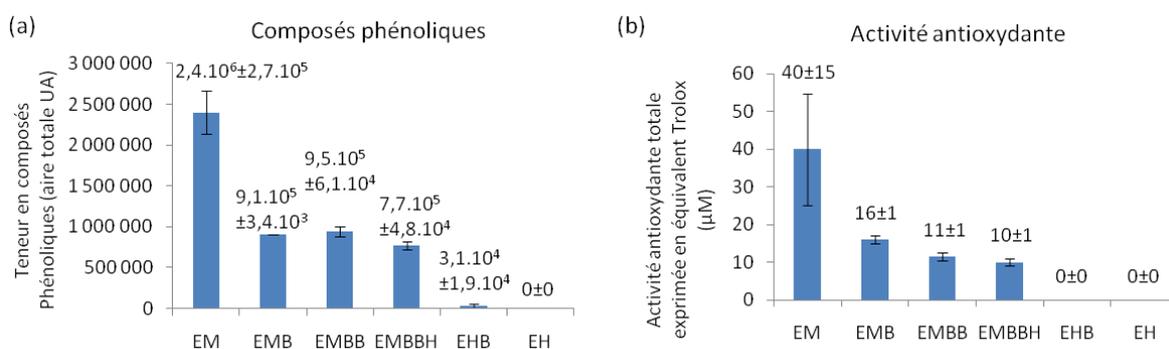


Figure 4.6 : Teneurs en composés phénoliques (a) et activités antioxydantes (b) totales de : EM, extrait de malt ; EMB, extrait de malt brassé ; EMBB, extrait de malt brassé et bouilli ; EMBBH, extrait de malt brassé bouilli et houblonné ; EHB, extrait de houblon bouilli ; EH, extrait de houblon.

L'activité antioxydante totale suit la même tendance que la teneur totale en composés phénoliques. Lors de l'étape de brassage, l'activité antioxydante totale diminue de 60% (**Figure 4.6b**). Mais contrairement à la teneur totale en composés phénoliques qui reste constante, l'activité antioxydante totale diminue de 30% durant l'étape de cuisson sans houblon. Toutefois, elle n'est pas affectée par l'ajout du houblon. Les composés de l'EHB ne présentent pas d'activité antioxydante.

Au cours de l'étape de brassage, les teneurs des composés phénoliques individuels connus diminuent, ce qui pourrait expliquer la diminution de 60% de la teneur en composés phénoliques et de l'activité antioxydante totales entre l'EM et l'EMB (**Tableau 4.3**). Toutefois, la teneur de l'acide p-hydroxybenzoïque est constante et celle de l'acide sinapique est quatre fois plus élevée. Au cours des étapes de cuisson avec ou sans houblon, on n'observe pas de changement par rapport à l'EMB.

En ce qui concerne l'activité antioxydante, on observe la même diminution que pour la teneur en composés phénoliques sauf pour l'acide sinapique dont l'activité reste constante tout au long du procédé (**Tableau 4.3**).

Tableau 4.3 : Teneur et activité antioxydante des composés antioxydants de l'EM à différentes étapes du procédé de brassage (n=9)

	EM		EMB		EMBB		EMBBH	
	UV	AOx	UV	AOx	UV	AOx	UV	AOx
	Conc. (μM)	éq. Trolox (μM)	Conc. (μM)	éq. Trolox (μM)	Conc. (μM)	éq. Trolox (μM)	Conc. (μM)	éq. Trolox (μM)
1	nq	10 \pm 3	nq	6 \pm 2	nd	nd	nd	nd
Prodelphinidine B3	nq	2 \pm 1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acide protocatéchuique	3 \pm 1	2 \pm 1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Procyanidine B3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acide p-hydroxybenzoïque	5 \pm 1	nAOx	5 \pm 1	nAOx	4 \pm 1	nAOx	4 \pm 0	nAOx
Catéchine	nd	nd	nd	3 \pm 0	nd	nd	nd	nd
Acide chlorogénique	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acide vanillique	10 \pm 1	nAOx	5 \pm 0	nAOx	5 \pm 1	nAOx	5 \pm 1	nAOx
Acide caféique	1 \pm 0	3 \pm 1	nd	1 \pm 0	nd	nd	nd	nd
Epicatechine	15 \pm 3	3 \pm 1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acide p-coumarique	30 \pm 8	nAOx	21 \pm 2	nAOx	19 \pm 2	nAOx	22 \pm 4	nAOx
Acide férulique	73 \pm 7	6 \pm 2	37 \pm 3	1 \pm 1	40 \pm 2	2 \pm 1	40 \pm 5	2 \pm 0
Acide sinapique	8 \pm 2	6 \pm 1	31 \pm 5	6 \pm 1	20 \pm 4	5 \pm 1	24 \pm 5	4 \pm 2
14	nq	5 \pm 1	nq	2 \pm 1	nq	1 \pm 0	nq	3 \pm 1
15	nq	5 \pm 2	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nAOx, non antioxydant ; nq, non quantifié (pas d'étalons) ; nd, non détecté.

D'après les résultats de l'étude des extraits de malt et de houblon, seuls l'acide p-hydroxybenzoïque, composé de l'EM, ne semblent pas être affectés par le brassage. Toutefois, la prodelphinidine B3, la procyanidine B3 et la catéchine qui ne sont pas détectés dans l'EM (ou faiblement), le sont dans le moût, comme nous l'avons vu précédemment (partie 3.1.2 p.102), mais pas dans l'EMB, l'EMBB et l'EMBBH. Il semble donc difficile de transposer cette étude à ce qui se passe dans la matrice.

Dans cette étude la méthode LC-AOx a été utilisée pour la détermination des composés phénoliques au cours de la fabrication de la bière. Cette méthode est plus complète que l'HPLC classique, car elle est destinée non seulement à séparer les composés phénoliques, mais aussi à déterminer leur intérêt fonctionnel potentiel, à travers la mesure de leur activité antioxydante. En utilisant cette méthode, il a été possible de mettre en lumière deux composés représentant la plus grande partie de l'activité antioxydante de l'orge, du moût et de la bière et pour lesquels aucun standard de chromatographie n'était disponible. Il s'agit de la prodelphinidine B3 et la procyanidine B3. Cette étude a également permis de montrer qu'au cours du procédé de fabrication de la bière, la teneur totale en composés phénoliques augmentait alors que l'activité antioxydante totale restait constante.

3.2 Etude des bières décolorées

Le traitement décolorant développé et décrit dans le chapitre 2 et consistant en une mise en contact avec le charbon actif KB-WJ à 10 g/L de bière pendant 30 min, a permis d'obtenir un produit fonctionnel d'un point de vue technologique et clarifié. Dans cette partie de l'étude, l'extraction des composés phénoliques et la méthode LC-AOx ont été appliquées à la séparation et l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques de la bière avant et après la décoloration. Puis, différents colorants de qualité alimentaire ont été testés sur la bière décolorée afin d'obtenir un produit aux couleurs originales.

3.2.1 Composés antioxydants

La **Figure 4.7** montre les chromatogrammes obtenus avec des extraits à l'acétate d'éthyle de la bière avant (**Figure 4.7a**) et après décoloration (**Figure 4.7c**), ainsi que les activités antioxydantes correspondantes (**Figure 4.7b et d**). En comparant les deux profils, on constate que la décoloration provoque la diminution de la teneur des composés phénoliques (**Figure 4.7a, c**), seuls la prodelphinidine B3, l'acide p-hydroxybenzoïque et les composés 1, a, b et c sont détectés. En ce qui concerne l'activité antioxydante, seul le composé 1 montre encore une activité détectable et sa teneur est diminuée de moitié (**Figure 4.7b, d**). Ces résultats sont conformes à ceux du chapitre 2 démontrant que les composés phénoliques connus dans la bière sont adsorbés par le charbon actif KB-WJ.

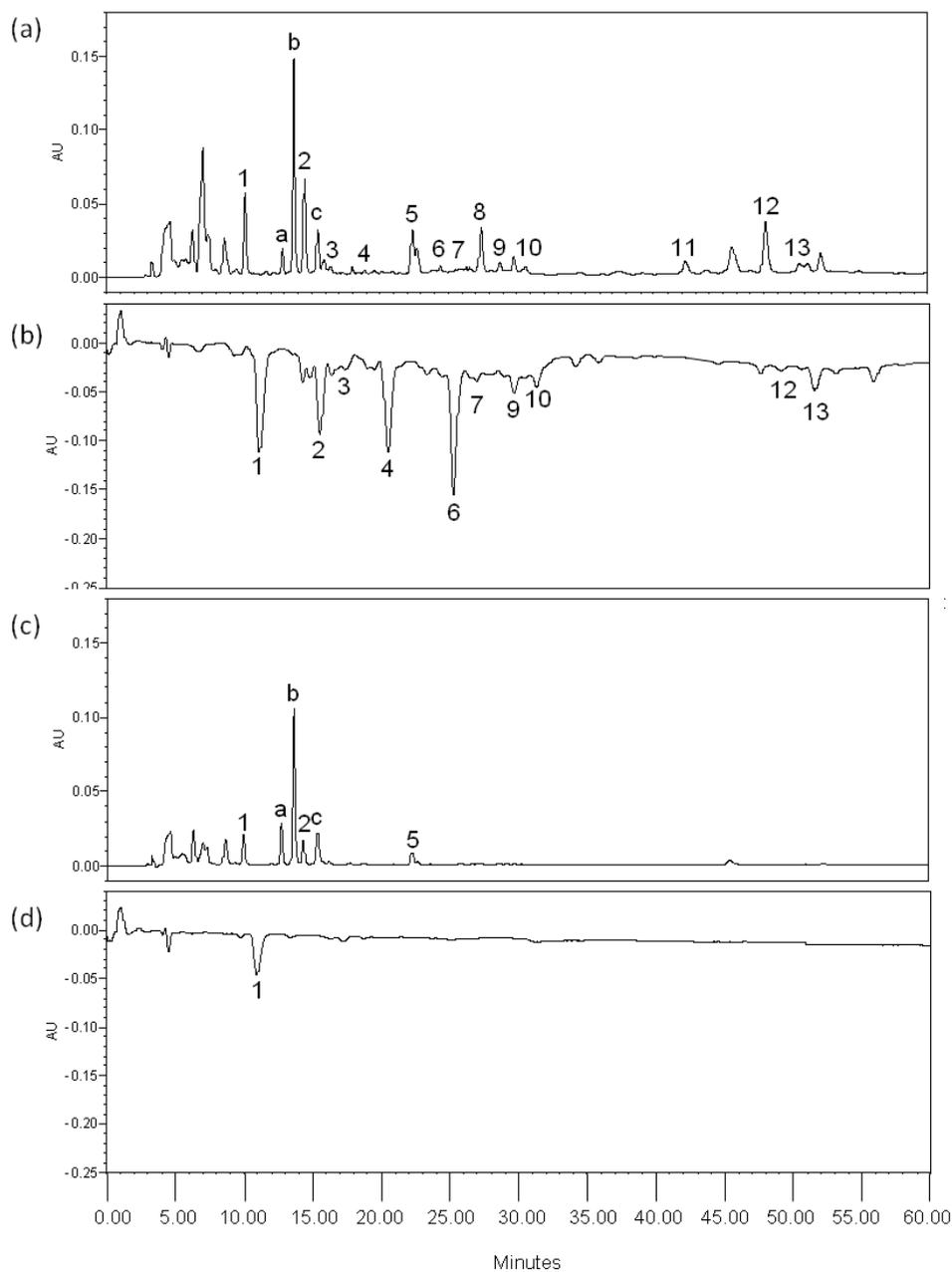


Figure 4.7 : Détermination chromatographique des composés antioxydants et de leurs activités antioxydantes correspondantes dans la bière (a, b) et la bière décolorée (c, d). Les pics sont comme suit: 1, composé non identifié; 2, prodeldphinidine B3; 3, acide protocatéchuique; 4, procyanidine B3; 5, acide p-hydroxybenzoïque ; 6, catéchine ; 7, acide chlorogénique ; 8, acide vanillique ; 9, acide caféique ; 10, épicatechine ; 11, acide p-coumarique ; 12, acide férulique ; 13, acide sinapique ; a, b et c, composé non identifiés.

Les aires des pics de chaque chromatogramme ont été additionnées et les moyennes \pm écarts-types ont été déterminées à partir de trois déterminations répétées trois fois. La **Figure 4.8** montre la teneur totale en composés phénoliques (**Figure 4.8a**) et l'activité antioxydante totale (**Figure 4.8b**) des extraits de bière avant et après décoloration.

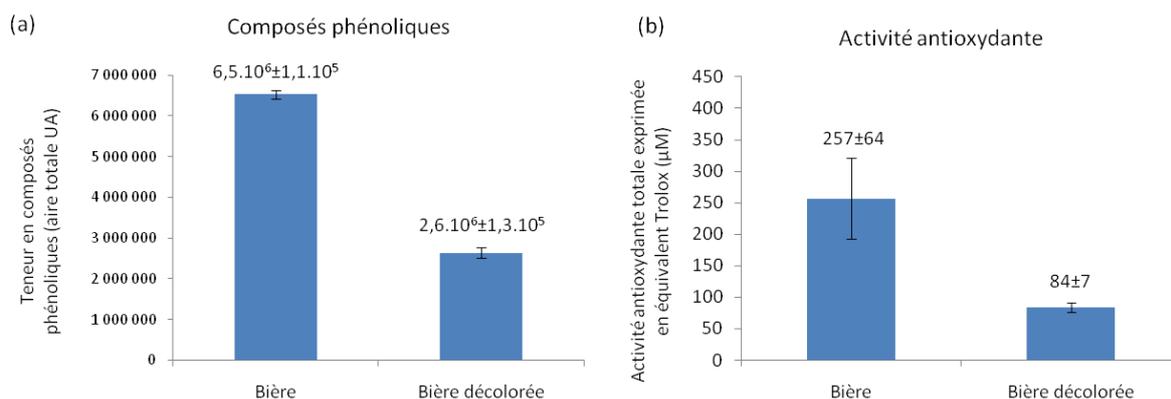


Figure 4.8 : Teneur en composés phénoliques (a) et activité antioxydante (b) totales de la bière avant et après décoloration.

La teneur en composés phénoliques diminue de 60% suite à l'étape de décoloration de la bière (**Figure 4.8a**). L'activité antioxydante totale suit la même tendance, puisqu'elle diminue de 67% (**Figure 4.8b**). La décoloration de la bière par le charbon actif KB-WJ entraîne donc une perte des composés phénoliques de la bière et de l'activité antioxydante correspondante. Il s'agit à notre connaissance de la première étude rapportant l'effet de la décoloration au charbon actif sur l'activité antioxydante de la bière. En effet, bien que des études (brevets) aient été publiées concernant d'une part la décoloration de la bière, et d'autre part l'adsorption des polyphénols par le charbon actif, il n'y a pas eu d'études préalables sur l'effet de la décoloration par le charbon actif sur les composés phénoliques et l'activité antioxydante de la bière.

3.2.2 Coloration des bières

Après l'étude de l'effet de la décoloration sur les composés polyphénoliques de la bière, les travaux se sont poursuivis par le développement de bières aux couleurs vives. Des expériences de coloration ont donc été réalisées sur des moûts fermentés, puis clarifiés (décoloré au charbon actif) en utilisant des colorants issus d'extraits alimentaires, tels que le rouge de betterave, la chlorophylle, le lycopène et les anthocyanes de chou rouge (**Figure 4.9**).



Figure 4.9 : Gamme de couleurs obtenues pour la bière et la bière décolorée.

La comparaison de la couleur de la bière avant et après décoloration montre que celle-ci passe du jaune foncé avant décoloration au transparent après décoloration (**Figure 4.10a**). L'ajout de chlorophylle donne une couleur verte aux deux bières, mais la bière décolorée est beaucoup plus claire que la bière témoin qui est vert foncé (**Figure 4.10b**). L'ajout de lycopène, à une concentration plus faible (100 mg/L) que celle de la chlorophylle afin de pouvoir dissoudre correctement ce colorant, donne une couleur légèrement rosée à la bière décolorée alors que la bière non décolorée n'est pas différente du témoin sans colorant (**Figure 4.10c**). L'ajout de poudre de betterave donne

une couleur rose à la bière décolorée par rapport à la bière non décolorée qui est rouge (**Figure 4.10d**).

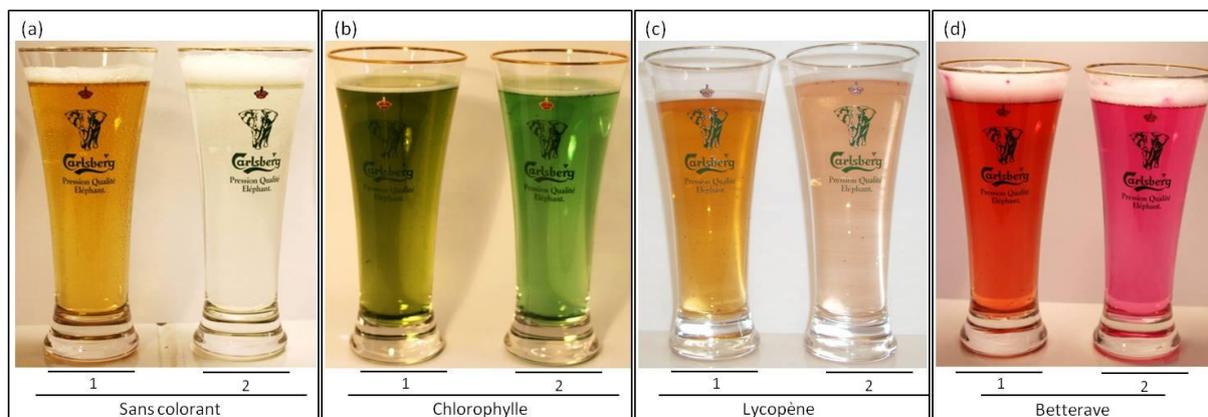


Figure 4.10 : Couleur de la bière (1) et de la bière décolorée (2) en absence de colorant (a), en présence de chlorophylle à 500 mg/L (b), de lycopène à 100 mg/L (c) et de poudre de betterave à 500 mg/L (d).

Pour valider la différence de couleur entre deux bières, le système des couleurs $L^*a^*b^*$ (auss appelé CIELAB) a été utilisé. Ce système, l'un des plus employés actuellement, permet de corréler la distance entre deux points (deux couleurs) à la différence de couleur telle qu'elle est perçue. La composante chromatique L^* y représente la clarté (indice de luminosité relatif allant de 0 pour le noir à 100 pour le blanc absolu), a^* représente la composante chromatique rouge-vert (rouge, valeur positive ; vert, valeur négative ; gris, 0) et b^* représente la composante chromatique jaune-bleu (jaune, valeur positive ; bleu, valeur négative ; gris, 0). Le point situé au centre du diagramme est achromatique (c'est à dire de couleur blanche) et quand les valeurs a^* et b^* augmentent, le point considéré s'éloigne du centre du disque et la saturation de la couleur correspondante augmente.

La différence de l'indice de luminosité ΔL^* entre la bière et la bière décolorée est négative (-4), ce qui indique que la bière est plus foncée que la bière décolorée (**Tableau 4.4**). La différence de composante chromatique rouge-vert Δa^* est négative (-4), celle de la composante chromatique jaune-bleu Δb^* est positive (19) et permet de confirmer la couleur jaune de la bière par rapport à la bière décolorée.

Tableau 4.4 : Coordonnées L*a*b* de la bière avant et après décoloration en fonction des différents colorants ajoutés.

Colorant		Bière	Bière décolorée	Différence entre la bière et la bière décolorée
Sans colorant	L*	96	100	ΔL^* -4
	a*	-4	0	Δa^* -4
	b*	21	2	Δb^* 19
Chlorophylle (500 mg/L)	L*	96	98	ΔL^* -2
	a*	-15	-15	Δa^* 0
	b*	14	13	Δb^* 2
Lycopène (100mg/L)	L*	94	94	ΔL^* 0
	a*	2	1	Δa^* 0
	b*	4	3	Δb^* 0
Betterave (500 mg/L)	L*	93	100	ΔL^* -7
	a*	18	19	Δa^* -1
	b*	-6	-6	Δb^* 0

La différence de luminosité des bières colorées à la chlorophylle, déjà bien visible à l'œil nu est confirmée par le ΔL^* négatif (-2) (**Tableau 4.4**). L'indice de luminosité L^* de la bière est égal à celui de la bière décolorée en présence de lycopène (**Tableau 4.4**) et les composantes chromatiques rouge-vert a^* et jaune-bleu b^* sont positives pour les deux bières et supérieures pour la bière par rapport à la bière décolorée. Ces résultats indiquent que la bière est plus rouge et plus jaune que la bière décolorée. La différence de luminosité des bières colorées à la poudre de betterave est confirmée par le ΔL^* négatif (-7), la couleur rouge de la bière par rapport à la bière décolorée est confirmée par le Δa^* négatif (**Tableau 4.4**). La décoloration de la bière avant l'ajout de différents colorants permet donc d'obtenir un produit généralement plus clair avec des couleurs plus vives.

Des expériences de coloration ont également été menées sur de la bière, décolorée ou non, en utilisant des colorants naturels pouvant présenter un virage de coloration dans les plages de pH de la bière. En effet, l'acidification de la bière par addition d'acide citrique (jus de citron) pourrait entraîner une modification immédiate de la couleur à l'ajout d'une rondelle de citron dans la bière colorée. Afin de mesurer l'impact réel de l'acide citrique sur le pH de la bière, des volumes de 1 à 5 mL de jus de citron (on estime le volume du jus d'un citron à 35 mL et celui d'une rondelle à 5 mL) ont été ajoutés à 25 cL de bière à température ambiante. Le pH mesuré du jus est de 2,3 et la variation de pH n'est que de 0,7 unité pour 5 mL de jus de citron ajouté (**Tableau 4.5**).

Tableau 4.5 : pH de 25 cL de bière en fonction du volume de jus de citron ajouté.

Volume du jus de citron (pH=2,3) (mL)	0	1	2	3	4	5
pH de la bière	4,32	4,15	3,99	3,88	3,69	3,63

En considérant les valeurs de pH de la bière après acidification, on peut estimer que la zone de virage des colorants qui seront testés doit être comprise entre 4,5 et 3,5. Parmi les colorants alimentaires naturels, l'acide carminique (E120) et la poudre de chou rouge (mélanges non purifiés d'anthocyanes) (E163) sont des cibles intéressantes pour essayer d'obtenir un changement de couleur en fonction du pH. Les résultats obtenus avec ces deux colorants indiquent que le virage de couleur de l'acide carminique est plus visible que celui des anthocyanes (**Figure 4.11**). Toutefois, pour les deux colorants, la zone de virage se situe entre les pH 6,4 et 4,4, c'est-à-dire dans une plage trop élevée pour être exploitée facilement dans la bière.

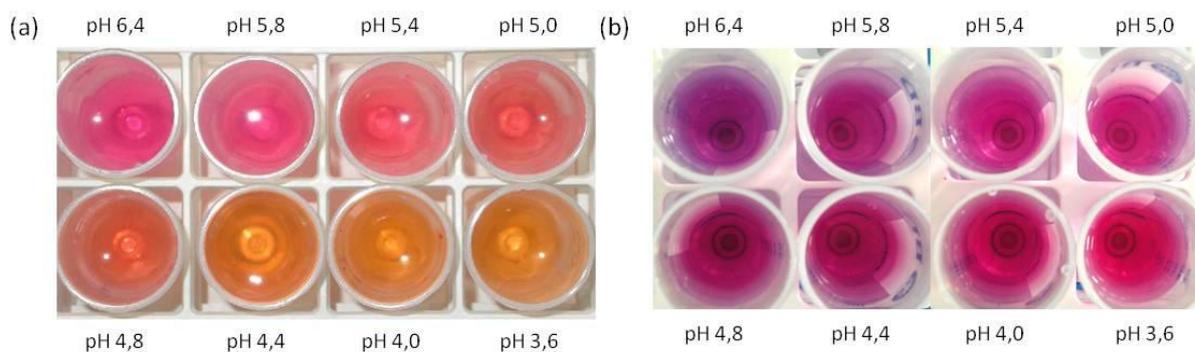


Figure 4.11 : Coloration en fonction du pH de l'acide carminique (a) et d'anthocyanes issus de la poudre de chou rouge (b).

Des expériences de coloration ont néanmoins été faites sur de la bière, décolorée ou non, en utilisant l'acide carminique et la poudre de chou rouge dont la couleur peut varier en fonction du pH. L'acide carminique a été ajouté à la bière et à la bière décolorée à une concentration de 10 mg/L afin de pouvoir corrélérer les résultats aux expériences précédentes (**Figure 4.11**). En présence d'acide

carminique, la couleur de la bière préalablement décolorée est plus claire que celle de la bière qui est jaune-orangée foncée (**Figure 4.12**). Le changement de pH à pH=6,4 modifie la couleur des deux bières en présence d'acide carminique. La couleur de la bière passe du jaune-orangé foncé (pH 4,4) au rouge foncé (pH 6,4) (**Figure 4.12**), mais dans ce cas le virage de coloration est peu visible, les pigments de la bière atténuant fortement la coloration apportée par l'acide carminique. La bière décolorée passe du jaune-orangé (pH 4,4) au rose (pH 6,4) (**Figure 4.12**), le virage de couleur obtenu est donc plus visible grâce à la décoloration de la bière.



Figure 4.12 : Coloration, en fonction du pH, de la bière (1) et de la bière décolorée (2) en présence d'acide carminique à 10 mg/L et en présence de poudre de chou rouge à 500, 250 et 125 mg/L à pH 4,4 et 6,4.

L'ajout de poudre de chou rouge à 500, 250 et 125 mg/L a permis d'obtenir un dégradé de couleurs qui varie du rose foncé au rose clair pour la bière décolorée et du rouge foncé au rouge clair pour la bière (**Figure 4.12**). Le changement de pH à pH=6,4 modifie la couleur des deux bières en présence de poudre de chou rouge. La bière décolorée passe du rose (pH 4,4) au bleu-violet (pH 6,4) et la bière passe du rouge (pH 4,4) au marron (pH 6,4). Le virage de couleur est beaucoup plus visible dans le cas de la bière décolorée, car les pigments de la bière atténuent fortement la

coloration apportée par la poudre de chou rouge (**Figure 4.12**). Ainsi, l'ajout de poudre de chou rouge à pH 6,4 permet d'obtenir un dégradé de couleurs qui varient, du bleu-violet foncé au violet clair pour la bière décolorée et du marron foncé au marron clair pour la bière (**Figure 4.12**).

La différence de luminosité des bières en présence d'acide carminique à pH 4,4 est confirmée par le ΔL^* négatif (-1) (**Tableau 4.6**). La composante chromatique rouge-vert a^* est positive pour les deux bières, mais supérieure pour la bière par rapport à la bière décolorée ($9 > 8$) ; et la composante chromatique jaune-bleu b^* est positive pour les deux bières, mais inférieure pour la bière par rapport à la bière décolorée ($10 < 12$). La bière décolorée est donc plus claire que la bière en présence d'acide carminique, moins rouge et plus jaune. La composante b^* est négative pour les deux bières, mais elle est légèrement supérieure pour la bière par rapport à la bière décolorée ($-6 > -7$) en présence d'acide carminique à pH 6,4 (**Tableau 4.6**). La bière décolorée est donc moins jaune que la bière non décolorée.

A pH 4,4, pour les trois concentrations de poudre de chou rouge testées, le ΔL^* est nul ou négatif (0, -6, -6), le Δa^* est négatif (-13, -6, -6) et le Δb^* est positif (1, 0, 1) (**Tableau 4.6**), ce qui confirme que la bière décolorée en présence de poudre de chou rouge est plus claire, plus rouge et moins jaune que la bière. A pH 6,4, le ΔL^* est négatif (-5, -8, -8), le Δa^* est en moyenne nul et le Δb^* est positif (7, 3, 4), ce qui confirme que la bière décolorée en présence de poudre de chou rouge est plus claire et plus bleue que la bière (**Tableau 4.6**).

Tableau 4.6 : Coordonnées L*a*b* de la bière avant et après décoloration en fonction des différents colorants ajoutés et du pH.

Colorant		Bière	Bière décolorée	Différence entre la bière et la bière décolorée	
Acide carminique (10 mg/L + pH 4,4)	L*	94	96	ΔL^*	-1
	a*	9	8	Δa^*	1
	b*	10	12	Δb^*	-2
Acide carminique (10 mg/L + pH 6,4)	L*	86	87	ΔL^*	0
	a*	17	17	Δa^*	0
	b*	-6	-7	Δb^*	1
Chou rouge (500 mg/L + pH 4,4)	L*	81	80	ΔL^*	0
	a*	31	44	Δa^*	-13
	b*	-18	-20	Δb^*	1
Chou rouge (500 mg/L + pH 6,4)	L*	75	79	ΔL^*	-5
	a*	-9	-8	Δa^*	-2
	b*	-17	-24	Δb^*	7
Chou rouge (250 mg/L + pH 4,4)	L*	91	98	ΔL^*	-6
	a*	17	24	Δa^*	-6
	b*	-11	-11	Δb^*	0
Chou rouge (250 mg/L + pH 6,4)	L*	88	96	ΔL^*	-8
	a*	3	1	Δa^*	2
	b*	-10	-13	Δb^*	3
Chou rouge (125 mg/L + pH 4,4)	L*	98	104	ΔL^*	-6
	a*	8	14	Δa^*	-6
	b*	-5	-6	Δb^*	1
Chou rouge (125 mg/L + pH 6,4)	L*	96	104	ΔL^*	-8
	a*	1	1	Δa^*	0
	b*	-3	-7	Δb^*	4

4 Conclusion

Le premier objectif de cette partie du travail était d'appliquer l'extraction et la méthode LC-AOx à l'étude des composés antioxydants au cours du procédé de fabrication de la bière. Cette méthode, plus spécifique que l'HPLC classique, est destinée non seulement à séparer les composés phénoliques, mais aussi à déterminer leur activité antioxydante. En mettant l'accent sur cette dernière plutôt que sur la réponse des molécules au détecteur utilisé, il est ainsi possible de révéler plus facilement et plus rapidement des composés ayant un intérêt antioxydant.

En comparant les différents extraits d'orge, de malt, de moût et de bière, on a pu constater que les profils chromatographiques de l'activité antioxydante sont assez similaires à toutes les étapes, sauf à la suite du maltage. La contribution antioxydante la plus importante provient de la prodelphinidine B3, de la procyanidine B3, de la catéchine, des acides férulique et sinapique, et d'un composé non identifié (composé 1). Ces six composés représentent en moyenne $69\pm 8\%$ de l'activité antioxydante totale sur l'ensemble des étapes de fabrication de la bière. Exception faite du malt, où elles ne sont pas détectées, la catéchine, la prodelphinidine B3 et la procyanidine B3 représentent quant à elles $45\pm 13\%$ de l'activité antioxydante totale.

Le second objectif était d'appliquer la même méthode à l'étude de la bière décolorée. Nous avons montré que l'utilisation du charbon actif KB-WJ permettait d'adsorber les composés phénoliques de la bière, ce qui, bien sûr, a une incidence sur l'intérêt santé de la bière puisque l'activité antioxydante de ces composés est perdue. Cependant, cette utilisation, dont le but premier est de décolorer, permet d'éliminer les pigments de la bière qui atténuant l'effet d'une coloration apportée par l'ajout de colorants, réduisent fortement les possibilités d'innovation par les brasseurs. Les résultats obtenus ont montré que, contrairement aux bières non décolorées, les bières préalablement décolorées ont permis d'obtenir par recoloration des produits aux couleurs vives et variées telles que le rose, le vert ou le bleu. Un nouveau panel de couleurs est donc envisageable pour l'industrie de la bière et des boissons maltées.

Publication

Effects of Processing Steps on the Phenolic Content and Antioxidant Activity of Beer

Céline Leitao,^{†,§} Eric Marchioni,^{*,†} Martine Bergaentzlé,[†] Minjie Zhao,[†] Luc Didierjean,[§] Behnam Taidi,[§] and Saïd Ennahar[†]

[†]Equipe de Chimie Analytique des Molécules BioActives, UMR 7178 – Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien Université de Strasbourg – Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67400 Illkirch, France

[§]Carlsberg Group, Brasseries Kronenbourg, 68 route d'Oberhausbergen, B.P. 13, 67037 Strasbourg Cedex 2, France

ABSTRACT: A new analytical method (liquid chromatography–antioxidant, LC-AOx) was used that is intended to separate beer polyphenols and to determine the potential antioxidant activity of these constituents after they were allowed to react online with a buffered solution of the radical cation 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}). Using the LC-AOx method, it was possible to demonstrate that the extent of the antioxidant activity was very much dependent on the phenolic compound considered. The method was also applied to the analysis of beer extracts and allowed the evaluation of their antioxidant activity at different steps of beer processing: brewing, boiling, and fermentation. This study showed that the total antioxidant activity remained unchanged throughout beer processing, as opposed to the polyphenolic content, which showed a 3-fold increase. Hopping and fermentation steps were the main causes of this increase. However, the increase measured after fermentation was attributed to a better extraction of polyphenols due to the presence of ethanol, rather than to a real increase in their content. Moreover, this method allowed the detection of three unknown antioxidant compounds, which accounted for 64 ± 4% of the total antioxidant activity of beer and were individually more efficient than caffeic acid and epicatechin.

KEYWORDS: Beer, polyphenol, liquid chromatography, antioxidant activity, ABTS

INTRODUCTION

Plant-based diets rich in fruits and vegetables are associated with a reduced risk of chronic diseases including coronary heart disease and some cancers.¹ Plant foods contain numerous molecules that, by acting through various mechanisms, provide protection against such diseases. Among these molecules, attention is particularly directed toward phenolic compounds with antioxidant activity. Polyphenols are present not only in fruits and vegetables but also in cereal crops, such as barley and its products, which are the focus of increasing interest due to their high content in phenolic acids (e.g. benzoic and cinnamic acid derivatives), proanthocyanidins, tannins, flavonols, chalcones, flavones, flavanones, and amino phenolic compounds.² Barley is among the most ancient and most widely consumed cereal crops, mainly (80–90%) destined to animal feed and malt production.³ Even after malting, barley seems to retain high amounts of phenolic compounds and an associated antioxidant potential.^{4,5}

Phenolic compounds constitute the main class of natural antioxidants present in plant foods and may function as reducing agents, free radical scavengers, singlet oxygen quenchers, and potential complexers of prooxidants. They also confer protection against biological macromolecular damage, significantly prevent the decrease of antioxidant enzyme activity in the aging brain and liver, decrease brain and liver malondialdehyde level and carbonyl content, and improve the total antioxidant capability in the organism.⁴

Phenolic and polyphenolic compounds are usually investigated by liquid chromatography coupled with detection by absorption photometry, due to the presence of chromophores in their structures. Although this allows a fairly good quantitative assessment of the compounds, when chemical standards are

available, the antioxidant activity of the analyzed compounds, which varies as a function of their chemical structures, is often overlooked. Given that not all polyphenols present an antioxidant activity and that some are more active than others,⁶ inconsistencies regarding the actual interest of many polyphenols and their nutritional allegations are widespread in scientific documents. Furthermore, studies of the antioxidant activity of natural extracts show that known antioxidants account for only a fraction of the total activity and that a large part of biologically important compounds is still unknown.⁷ This shows the need for a more pragmatic alternative that would focus on detecting and quantitating the biological activity, rather than the molecule itself.

In the past 10 years, several sensitive postcolumn HPLC methods (liquid chromatography–antioxidant, LC-AOx) for the analysis of the antioxidant activity have been published.^{8–10} One of these methods requires a stable model free radical system, such as the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation (ABTS^{•+}), the absorbance of which at 734 nm decreases upon reaction with a reducing agent.^{8,11} This reaction is associated with the ability of the molecule of interest to trap radicals and in turn with its biological activity. The radical scavenging activity is generally assessed against a standard antioxidant, such as the water-soluble synthetic vitamin E derivative 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox).^{12,13} This online

Received: October 19, 2010

Accepted: December 23, 2010

Revised: December 19, 2010

Published: January 24, 2011

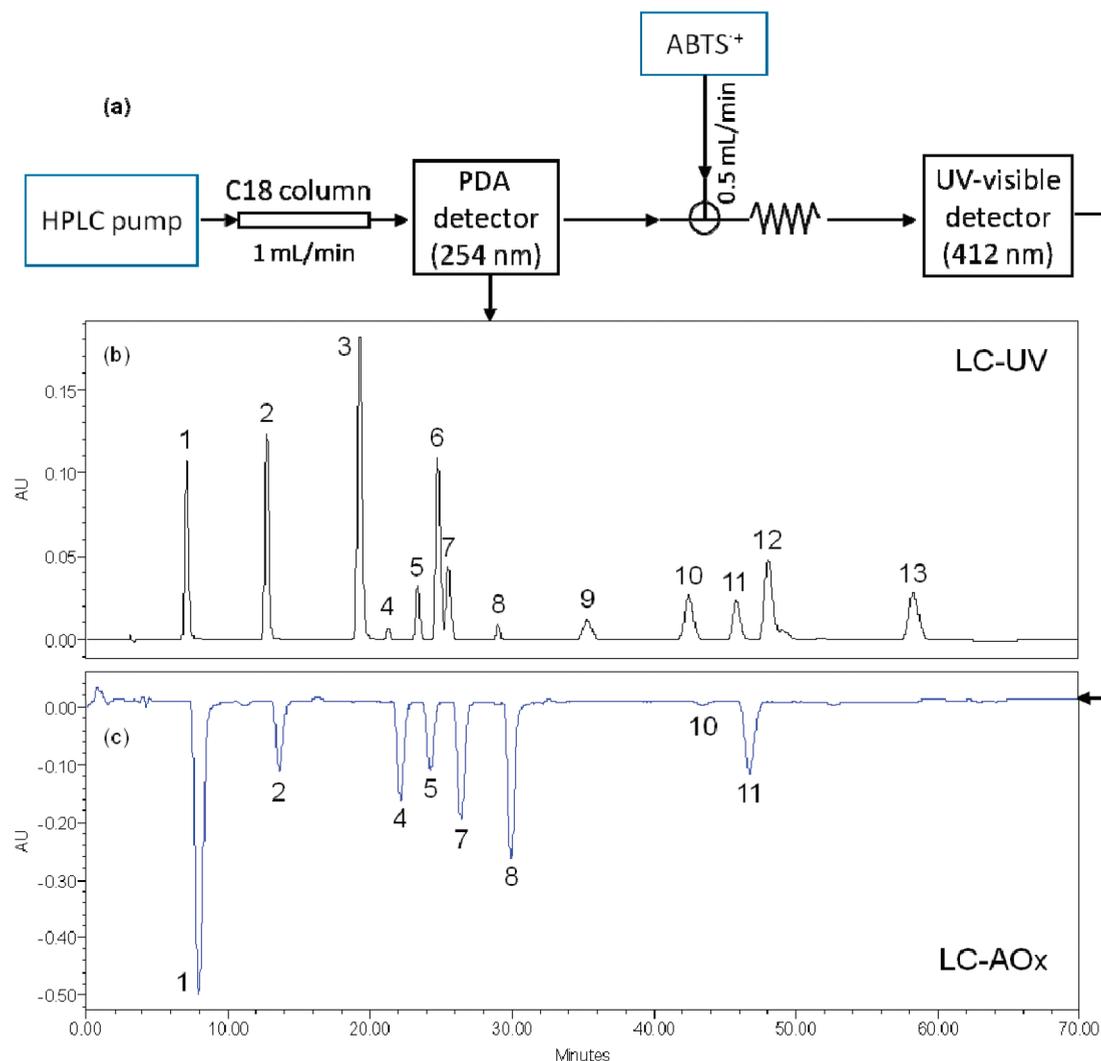


Figure 1. Chromatographic separation and detection of phenolic compounds: (a) experimental chart; (b) polyphenol standards at 30 $\mu\text{g/mL}$ in methanol/water (50:50, v/v); (c) their corresponding antioxidant activity. Peaks: 1, gallic acid; 2, protocatechuic acid; 3, *p*-hydroxybenzoic acid; 4, catechin; 5, chlorogenic acid; 6, vanillic acid; 7, caffeic acid; 8, epicatechin; 9, *p*-coumaric acid; 10, ferulic acid; 11, sinapic acid; 12, *m*-coumaric acid; 13, *o*-coumaric acid.

assessment of antioxidant activity allows complex mixtures to be separated by HPLC and the antioxidant contribution of individual components to be separately evaluated.¹² In addition, the detection of unknown molecules with antioxidant activities in such mixtures will be made much easier.

In the present study, ethyl acetate extracts of beer at different stages of its processing were analyzed for their content in antioxidant compounds using an HPLC system linked to an ABTS^{•+}-based postcolumn antioxidant detection system (LC-AOx). Zhao et al. showed that the brewing process might have a considerable impact on the ABTS radical cation scavenging activity of beer.¹⁴ The purpose was to directly investigate the effect of the various processing steps on both the content and the antioxidant activity of beer phenolic compounds.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Products. ABTS^{•+}, Trolox, 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (ferulic acid), 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid), 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (gallic acid), 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (vanillic acid), 3,4-dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid),

p-hydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, 4-hydroxycinnamic acid (*p*-coumaric acid), sinapic acid, *m*-coumaric acid, *o*-coumaric acid, catechin, and epicatechin were purchased from Sigma-Aldrich (Seelze, Germany). All chemicals and solvents used were of HPLC grade and were purchased from VWR (Strasbourg, France). Ultrapure water was produced by a Synergy UV purification system (Millipore, Molsheim, France). Barley was of the Sunshine variety and was malted, brewed, and fermented by Brasseries Kronenbourg (Strasbourg, France). Hop was purchased from Yakima Chief, Inc. (Sunnyside, WA) in the form of a resinous phase of α -acids, β -acids, oils, and uncharacterized resins produced by CO₂ supercritical extraction and used as a bittering extract added at the final brewing step.

Stock and Working Solutions. A stable stock solution of ABTS^{•+} was produced by mixing a 7 mmol L⁻¹ aqueous solution of ABTS with a 2.5 mmol L⁻¹ solution of potassium persulfate (final concentration) and allowing the mixture to stand in the dark at 4 °C overnight.^{8,9} Before use, an ABTS^{•+} working solution was obtained by diluting the stock solution in ethanol to reach an absorbance of 0.70 (± 0.02) AU at 734 nm. Stock solutions of phenolic standards were prepared by dissolving the compounds in methanol (1 mg/mL) and were then stored in the dark at -20 °C. Before use, working solutions were prepared by diluting the stock solutions in methanol/water (50:50, v/v).

Table 1. Quantification Limits of Some Phenolic Compounds in Methanol/Water (50:50, v/v) for the LC-UV and the LC-AOx Detection Methods

phenolic compound	quantification limit (pmol)	
	LC-UV	LC-AOx
gallic acid	94	59
protocatechuic acid	10	779
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	29	^a
catechin	54	103
chlorogenic acid	2	141
vanillic acid	15	—
caffeic acid	4	167
epicatechin	541	54
<i>p</i> -coumaric acid	190	—
ferulic acid	7	2575
sinapic acid	14	268
<i>m</i> -coumaric acid	98	—
<i>o</i> -coumaric acid	39	—

^a—, no antioxidant activity.

Sampling and Extraction at Different Stages of Beer Processing. Malt was brewed with water to obtain wort (13 °Plato) under the following brewing diagram: 0–20 min, 37 °C; 20–34 min, 37–50 °C; 34–44 min, 50 °C; 44–59 min, 50–65 °C; 59–69 min, 65 °C; 69–82 min, 65–76 °C; 82–92 min, 76 °C. Wort was boiled without hop (1 h, 100 °C) to obtain boiled wort and then was fermented to obtain fermented boiled wort. Wort was boiled with hop (1 h, 100 °C) to obtain boiled hopped wort and then was fermented to obtain beer. Hop used was resinous extracts obtained by CO₂ supercritical extraction, and even if it contains no polyphenols, it is the most commonly used ingredient added in wort by industrial brewers.

Extraction of Phenolic Compounds. Phenolic compounds were extracted after each previous production step. Sample solutions (10 mL) were first set at pH 2.0 by the addition of HCl (37%), and then 0.5 g of sodium chloride was added. Extraction was carried out in 50 mL Corning centrifuge tubes with 10 mL of ethyl acetate (three times, for periods of 15 min) on a gyratory shaker at 200 rpm.^{5,15} The obtained phenolic extract was centrifuged (5000 rpm, 10 min) and supernatant was evaporated to dryness under vacuum (30 °C, 80 mbar). The residue was dissolved in 1 mL of methanol/water (50:50, v/v), membrane-filtered (0.45 μm, Macherey-Nagel, Hoerd, France), and injected (20 μL) in the chromatographic system.

Recovery Rates. The recovery rates of the extraction method were determined by comparison of data obtained from wort extract and data obtained from the same extract with preliminary addition of phenolic standard compounds. These compounds were added to wort at two different concentrations for each compound. The range of values was from 7 to 200 μM. These concentrations were representative of values of each compound obtained in extracts at different processing steps. The average recovery rates were calculated.

HPLC Analysis. HPLC coupled with ABTS (LC-AOx) assay was performed by using the method developed by Koleva et al.⁸ and Dapkevicius et al.⁹ with slight modifications. The block scheme of the instrumental setup is presented in Figure 1a. The HPLC system (Waters, Saint-Quentin-Fallavier, France) consisted of the following: a 616 controller; a 2996 photodiode array detector to UV detection; a 486 tunable absorbance detector to ABTS^{•+} detection; a 717 plus autosampler; and an additional HPLC pump used for the delivery of the ABTS^{•+} solution. The reaction coil used was made of PEEK tubing of 7 m × 0.5 mm i.d. UV detection was carried out at 254 nm. Detection of

Table 2. Average Recovery Rates of the Studied Compounds in Wort (Recovery Rates from Six Ethyl Acetate Extractions in LC-UV)

phenolic compound	recovery rate (%)
gallic acid	93 ± 16
protocatechuic acid	64 ± 9
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	83 ± 10
catechin	75 ± 5
chlorogenic acid	51 ± 6
vanillic acid	94 ± 7
caffeic acid	73 ± 5
epicatechin	49 ± 10
<i>p</i> -coumaric acid	73 ± 10
ferulic acid	87 ± 5
sinapic acid	79 ± 16
<i>m</i> -coumaric acid	125 ± 6
<i>o</i> -coumaric acid	88 ± 9

ABTS^{•+} reduction was carried out at 412 nm. Separations were carried out at room temperature on a Hypersil BDS C18 HPLC column (5 μm particle size, 250 × 4.6 mm i.d., Fisher Scientific, Illkirch, France). The mobile phase, delivered at 1 mL/min, consisted of a gradient mixture of water containing 0.1% formic acid (eluent A) and methanol (eluent B). The following gradient was used: 0–25 min, 3–25% B; 25–26 min, 25–18% B; 26–29 min, 18% B; 29–47 min, 18–30% B; 47–57 min, 30% B; 57–67 min, 30–65% B; 67–77 min, 65% B. The ABTS^{•+} solution was delivered at 0.5 mL/min.

Calibration Graphs. Calibration graphs for each phenolic compound were drawn from data of three replicate injections of 20 μL of standard mixtures obtained by dilution (methanol/water (50:50, v/v)) at various levels of the stock standard solutions. The curves (six data points, *n* = 3) were linear with *R*² values of >0.99. Each phenolic compound was quantified by reference to its appropriate authentic standard for UV detection, whereas the antioxidant potential was calculated as the concentration of Trolox required to produce an equivalent peak area and expressed as Trolox equivalent (μM).

Quantification Limits. The quantification limits were estimated following successive dilutions of standards and considering a signal-to-noise ratio of 10 (Table 1). The precision and trueness of the method were determined on the basis of the coefficient of variation and the recovery (found concentration/expected concentration) calculated from three successive injections. Quantification limits were acceptable only if the coefficient of variation was <10% and the recovery about 100 ± 5%.

Statistical Analysis. Data were analyzed by ANOVA (at a significance level of 95%) using Statgraphics Plus software. All samples were analyzed in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

Separation and Identification of Antioxidant Products. HPLC separation of phenolic compounds from complex natural mixtures usually requires a long linear elution gradient. Because beer extracts are rich in phenolic compounds, the separation was first performed on standards to try to separate them with the highest resolution possible. The used gradient, which started from 3% with an increase of 0.88%/min of methanol, did not allow a good separation of vanillic and caffeic acids. The methanol content was then decreased before being increased again toward the end of the separation, which allowed a much better separation of the two compounds at 30 μg/mL each (Figure 1b).

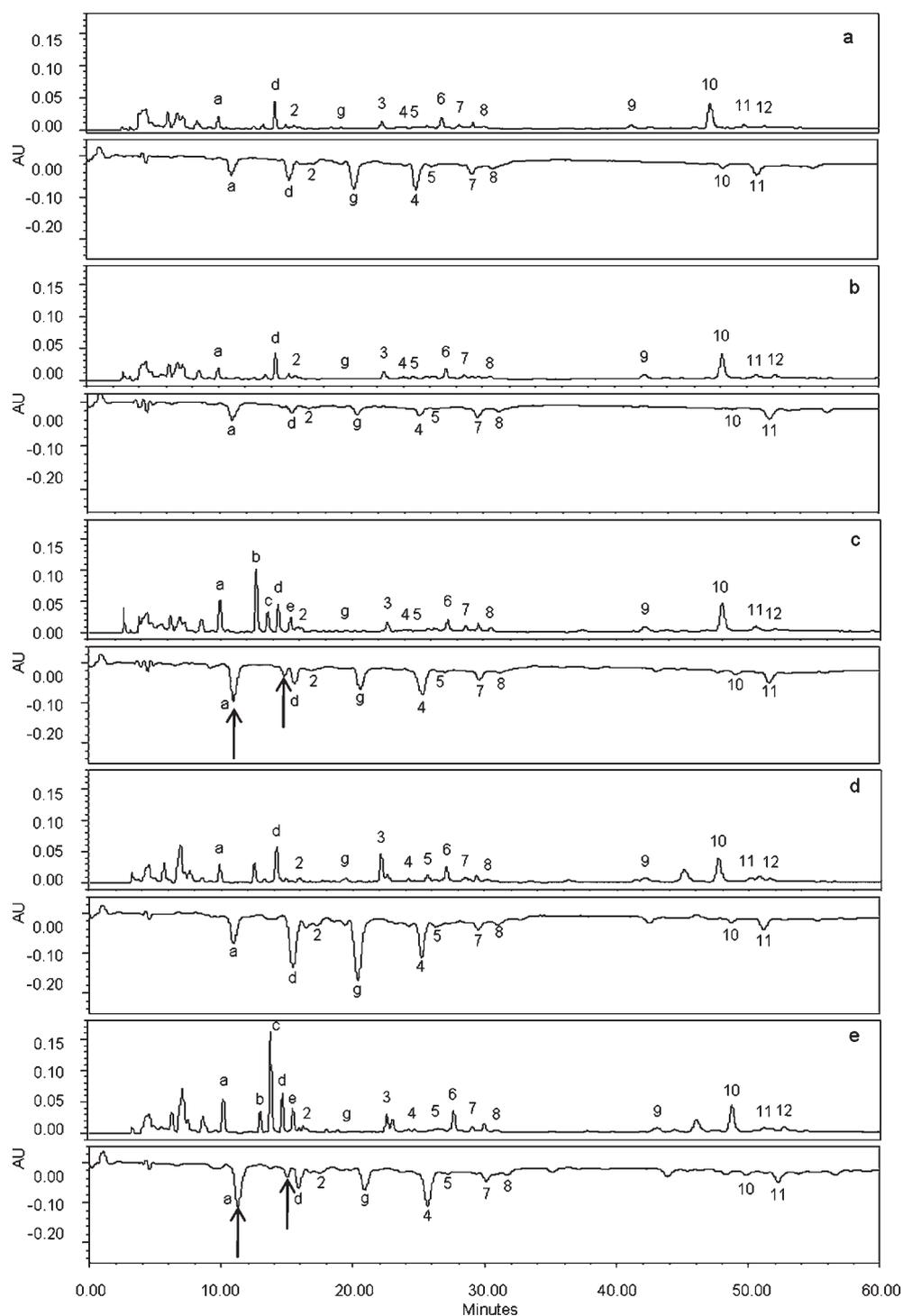


Figure 2. Chromatographic determination of antioxidant compounds (upper chromatogram) and their corresponding antioxidant activity (lower chromatogram) in extracts of (a) wort, (b) boiled wort, (c) boiled hopped wort, (d) fermented boiled wort, and (e) beer. Peaks: a–e and g, unknown compounds; 2, protocatechuic acid; 3, *p*-hydroxybenzoic acid; 4, catechin; 5, chlorogenic acid; 6, vanillic acid; 7, caffeic acid; 8, epicatechin; 9, *p*-coumaric acid; 10, ferulic acid; 11, sinapic acid; 12, *m*-coumaric acid.

Conventional methods for identifying antioxidant compounds in complex mixtures typically involve time-consuming assay-guided fractionation procedures, followed by identification of the purified compounds. The system described here (LC-AOx) is meant to screen for compounds with antioxidant activity in natural extracts in a more direct and rapid fashion. Following chromatographic separation, compounds of an

extract were mixed online with a stabilized solution of the $ABTS^{•+}$ radical, which was directed to a UV–vis detector. Beekwilder et al.¹³ detected $ABTS^{•+}$ at 734 nm because of chromatographic interferences. In this work the detector was set at 412 nm because it is the wavelength of maximum absorption of the $ABTS$ cation. The presence of antioxidants, acting as radical scavengers, results in a reaction with $ABTS^{•+}$

and a subsequent decrease in absorption detected as a negative peak at 412 nm.

Antioxidant compounds, even at low concentrations, could be quantified. The quantification limits with LC-UV detection varied from 2 pmol for chlorogenic acid to 541 pmol for epicatechin (Table 1). This high limit of quantification for epicatechin, compared with other compounds, was due to a high coefficient of variation at lower concentrations probably because it was monitored at 254 nm, which is not its optimal detection wavelength (280 nm). The quantification limits with LC-AOx detection varied from 54 pmol for epicatechin to 2575 pmol for ferulic acid (Table 1). The LC-UV detection was generally more sensitive than this of LC-AOx except for gallic acid and epicatechin.

Panels b and c of Figure 1 show chromatograms obtained with a standard mixture of phenolic compounds (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each) and their corresponding antioxidant activity. The upper part was obtained with direct UV detection at 254 nm, whereas the lower part was obtained with visible detection at 412 nm after post-column reaction. The combination of a delay coil of 7 m length, 0.5 mm internal diameter, with a flow rate of 0.5 mL/min gave a reaction time of about 1 min. This delay along with the passage through the coil explains the shift in retention time and the wider peaks obtained in the bottom chromatogram; however, it was necessary, in these conditions, to achieve a complete reaction with all antioxidants.¹⁵ Using this method, standard phenolic compounds tested did not show equal antioxidant activities; in particular, *p*-hydroxybenzoic, vanillic, *p*-coumaric, *m*-coumaric, and *o*-coumaric acids showed no antioxidant activity at all or had an antioxidant activity too small to be detected with the LC-AOx. Among the active compounds, the relative antioxidant activity of these compounds was as follows: gallic acid > epicatechin > caffeic acid > catechin > sinapic acid > chlorogenic acid > protocatechuic acid > ferulic acid. This is in agreement with results obtained by Kim et al., who, using the same radical, showed the following antioxidant activity order: gallic acid > epicatechin > catechin > chlorogenic acid.¹⁶ Gallic acid, with the best antioxidant response, was approximately 75 times more potent than ferulic acid, the least active compound.

Extraction. The extraction method accuracy was validated by monitoring the amount of phenolic compounds extracted over three consecutive extractions of wort. Concentrations of extracted phenolic compounds were given as mean \pm standard deviation (SD) from at least three determinations ($n \geq 3$). Except with protocatechuic acid, chlorogenic acid, and epicatechin, for which recovery rates did not exceed 64 ± 9 , 51 ± 6 , and $49 \pm 10\%$, respectively, three successive extractions were enough to obtain recovery rates above 75% (Table 2). Even if the liquid–liquid extraction with ethyl acetate did not allow a good extraction of each individual compound, 75% seems to be quite a good result for a multicomponent extraction process. Today, this method remains the most widely used method for the extraction of polyphenols,^{5,17–19} even if the extraction procedure is classical. Although we tested other methods, such as solid-phase extraction on wort, the results were less satisfactory when the whole range of compounds was considered (data not shown).²⁰ In view of the various compounds in the different extracts of beer, there were a lot of unknown compounds without data of recovery rate. Therefore, the recovery rate correction was not applied to the extraction method data. The recovery rate measurement was used to highlight the extraction method efficiency.

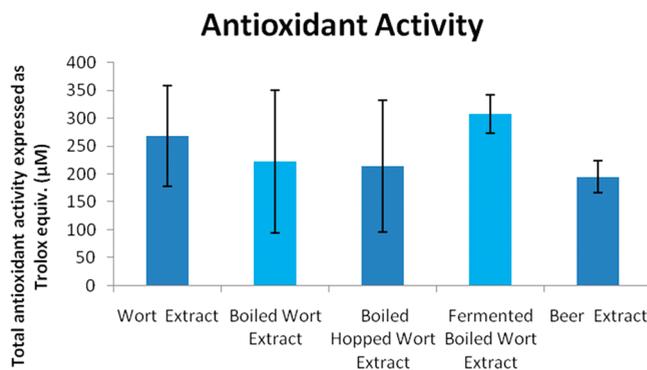


Figure 3. Total antioxidant activity at different steps of beer processing: wort extract, boiled hopped wort extract, and beer extract correspond to normal process; boiled wort extract and fermented boiled wort extract correspond to process excluding the hopping steps.

Analysis of Beer Processing Compounds. The LC-AOx method was applied to the separation and the evaluation of the antioxidant activity of compounds from extracts at different steps of beer processing: brewing, boiling, and fermentation. This allowed the direct monitoring of the antioxidant activity of polyphenolic fractions separated from extracts of wort, boiled wort, boiled hopped wort, boiled hopped wort, fermented boiled wort, and beer. Wort, boiled hopped wort, and beer represented the normal processing of beer, whereas boiled wort and fermented boiled wort represented a process that would exclude the hopping step.

Figure 2 shows chromatograms obtained with ethyl acetate extracts of wort (a), boiled wort (b), boiled hopped wort (c), fermented boiled wort (d), and beer (e). The UV absorption chromatograms between wort (Figure 2a), boiled wort (Figure 2b), and fermented boiled wort (Figure 2d) were quite similar. With boiled hopped wort (Figure 2c) four peaks seemed in higher concentration than in the other profiles: b (12.5 min), c (13.8 min), d (14.2 min), and e (15.5 min). With beer (Figure 2e), the same peaks were present, but peak c (13.8 min) was 3 times higher than the boiled hopped wort one. This increase may be linked to a better extraction of compounds due to the presence of ethanol.

For each step, peak areas of chromatograms for the LC-AOx detection system were summed and represented as average \pm SD from triplicates of three determinations (Figure 3). The total antioxidant activity results were expressed as Trolox equivalent (μM). It was affected neither by the brewing process nor by the fermentation process, because there was no significant difference ($p > 0.05$) between the different steps (Figure 3). The antioxidant activity profiles were quite similar for all chromatograms. With boiled hopped wort (Figure 2c) and beer (Figure 2e), the first antioxidant activity peak at 11 min (first arrow) was in a little bit higher concentration and a peak emerged at 14.9 min (second arrow). This peak corresponds to the one at 13.8 min in LC-UV profiles. These differences between chromatograms may be due to the increased content of natural compounds due to the depolymerization of antioxidant compounds during the process. It might not be due to the appearance of new polyphenols due to hop addition or fermentation. Indeed, hop extract was produced by CO_2 supercritical extraction. Because CO_2 is nonpolar, it is not a good solvent for polar polyphenols.²¹ Moreover, hop extract did not show polyphenol content with LC-AOx method (data not shown).

Among the polyphenols with antioxidant activity, seven compounds could be identified using chromatographic standards: protocatechuic acid (2), catechin (4), chlorogenic acid (5),

Table 3. Content and Antioxidant Activity of Antioxidant Compounds in Extracts at Different Stages of Beer Processing ($n = 9$)

	wort extract		boiled wort extract		boiled hopped wort extract		fermented boiled wort extract		beer extract	
	LC-UV concn (μM)	LC-AOx Trolox equiv (μM)	LC-UV concn (μM)	LC-AOx Trolox equiv (μM)	LC-UV concn (μM)	LC-AOx Trolox equiv (μM)	LC-UV concn (μM)	LC-AOx Trolox equiv (μM)	LC-UV concn (μM)	LC-AOx Trolox equiv (μM)
	a, unknown	nq ^a	24 ± 10	nq	32 ± 8	nq	53 ± 10	nq	45 ± 12	nq
b, unknown	nq	8 ± 4	nq	1 ± 0	nq	4 ± 0	nq	8 ± 4	nq	8 ± 1
c, unknown	nq	5 ± 0	nq	7 ± 5	nq	12 ± 3	nq	8 ± 1	nq	5 ± 0
d, unknown	nq	49 ± 34	nq	73 ± 46	nq	35 ± 18	nq	58 ± 30	nq	15 ± 7
e, unknown	nq	8 ± 5	nq	22 ± 3	nq	10 ± 4	nq	10 ± 4	nq	20 ± 13
protocatechuic acid	21 ± 10	6 ± 2	7 ± 3	3 ± 1	17 ± 7	11 ± 5	9 ± 4	11 ± 3	27 ± 13	10 ± 5
f, unknown	nq	8 ± 3	nq	8 ± 8	nq	9 ± 0	nq	6 ± 1	nq	11 ± 8
g, unknown	nq	74 ± 51	nq	113 ± 76	nq	58 ± 40	nq	74 ± 38	nq	22 ± 17
h, unknown	nq	5 ± 3	nd ^b	nd	nq	7 ± 0	nq	4 ± 0	nd	nd
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	8 ± 2	— ^c	11 ± 3	—	7 ± 3	—	38 ± 15	—	18 ± 2	—
i, unknown	nq	5 ± 3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
catechin	35 ± 18	38 ± 19	37 ± 18	47 ± 23	33 ± 10	44 ± 31	29 ± 12	43 ± 13	38 ± 21	32 ± 19
chlorogenic acid	4 ± 2	5 ± 3	5 ± 1	nd	6 ± 3	9 ± 1	13 ± 12	10 ± 0	11 ± 2	nd
vanillic acid	16 ± 10	—	19 ± 3	—	17 ± 7	—	34 ± 13	—	33 ± 5	—
caffeic acid	13 ± 5	15 ± 1	13 ± 3	17 ± 6	12 ± 4	15 ± 2	13 ± 5	14 ± 8	10 ± 6	11 ± 7
j, unknown	nq	8	nq	13 ± 2	nq	10 ± 2	nq	14 ± 6	nq	11 ± 5
epicatechin	35 ± 19	2 ± 1	nd	nd	14 ± 9	13 ± 1	49 ± 0	11 ± 0	19 ± 7	23 ± 3
k, unknown	nd	nd	nd	nd	nq	13 ± 7	nq	17 ± 2	nd	nd
l, unknown	nd	nd	nd	nd	nq	16 ± 0	nd	nd	nd	nd
<i>p</i> -coumaric acid	70 ± 31	—	84 ± 26	—	322 ± 86	—	45 ± 23	—	60 ± 12	—
m, unknown	nq	3 ± 1	nq	9 ± 0	nq	9 ± 2	nq	5 ± 1	nq	17 ± 9
ferulic acid	129 ± 52	8 ± 5	133 ± 23	11 ± 5	118 ± 49	9 ± 2	115 ± 49	12 ± 1	114 ± 11	11 ± 6
sinapic acid	18 ± 7	15 ± 8	22 ± 3	21 ± 6	28 ± 10	20 ± 4	10 ± 4	21 ± 7	11 ± 2	16 ± 9
<i>m</i> -coumaric acid	7 ± 5	—	12 ± 5	—	6 ± 2	—	11 ± 5	—	14 ± 9	—
n, unknown	nq	5 ± 1	nq	10 ± 6	nq	7 ± 3	nq	10 ± 4	nq	10 ± 8
o, unknown	nq	7 ± 2	nq	10 ± 6	nq	8 ± 4	nq	9 ± 4	nq	12 ± 4

^a nq, not quantified (no standards). ^b nd, not detected. ^c —, no antioxidant activity.

caffeic acid (7), epicatechin (8), ferulic acid (10), and sinapic acid (11). The largest antioxidant contribution came from catechin, caffeic acid, ferulic acid, sinapic acid, and three other compounds (a, d, and g), which could not be identified using chromatographic standards (Table 3). The total antioxidant activity of each extract was measured, and these three compounds, present in all extracts, accounted for 64 ± 4% of the total. Catechin was important to beer antioxidant activity because it made considerable contributions to the antioxidant activity of beer. Compounds with flavonoid structure such as catechin generally showed higher antioxidant activity than nonflavonoid compounds.¹⁴ Whittle et al. reported the general observation that the higher the content of gallic acid in gallic acid polymers is, the earlier the compounds elute.²² Due to the high antioxidant activity of compounds a, d, and g, and on the basis of their retention times, they are probably compounds with flavonoid structure such as polymers of gallic acid.

The LC-AOx method was used for the determination of phenolic compounds during beer processing. For reactive antioxidants, this method may prove to be more sensitive than the classical HPLC with UV detection. It is also more specific because it is intended not only to separate and detect polyphenols, but also

to determine their potential functional interest, namely, their antioxidant activity. Unknown antioxidant compounds could be detected, which accounted for the larger part of the antioxidant activity of the extracts. Work is underway to identify these unknown compounds.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +33 368 854 326. Fax: +33 368 854 325. E-mail: eric.marchioni@unistra.fr.

REFERENCES

- (1) Duthie, G. G.; Duthie, S. J.; Kyle, J. A. M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr. Res. Rev.* **2000**, *13*, 79–106.
- (2) Goupy, P.; Hugues, M.; Boivin, P.; Amiot, M. J. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 1625–1634.
- (3) Liu, Q.; Yao, H. Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food Chem.* **2007**, *102*, 732–737.
- (4) Qingming, Y.; Xianhui, P.; Weibao, K.; Hong, Y.; Yidan, S.; Li, Z.; Yanan, Z.; Yuling, Y.; Lan, D.; Guoan, L. Antioxidant activities of malt

extract from barley (*Hordeum vulgare* L.) toward various oxidative stress in vitro and in vivo. *Food Chem.* **2010**, *118*, 84–89.

(5) Madhujith, T.; Shahidi, F. Antioxidative and antiproliferative properties of selected barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars and their potential for inhibition of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5018–5024.

(6) Pellegrini, N.; Del Rio, D.; Colombi, B.; Bianchi, M.; Brighenti, F. Application of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay to a flow injection system for the evaluation of antioxidant activity of some pure compounds and beverages. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 260–264.

(7) Cao, G.; Booth, S. L.; Sadowski, J. A.; Prior, R. L. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *68*, 1081–1087.

(8) Koleva, I. I.; Niederländer, H. A. G.; van Beek, T. A. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC Eluates. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3373–3381.

(9) Dapkevicius, A.; van Beek, T. A.; Niederländer, H. A. G. Evaluation and comparison of two improved techniques for the on-line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates. *J. Chromatogr., A* **2001**, *912*, 73–82.

(10) Niederländer, H. A.; van Beek, T. A.; Bartasiute, A.; Koleva, I. I. Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1210*, 121–134.

(11) Cano, A.; Hernández-Ruiz, J.; García-Cánovas, F.; Acosta, M.; Arnao, M. B. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem. Anal.* **1998**, *9*, 196–202.

(12) Stewart, A. J.; Mullen, W.; Crozier, A. On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 52–60.

(13) Beekwilder, J.; Jonker, H.; Meesters, P.; Hall, R. D.; van der Meer, I. M.; Ric de Vos, C. H. Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3313–3320.

(14) Zhao, H.; Chen, W.; Lu, J.; Zhao, M. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chem.* **2010**, *119*, 1150–1158.

(15) Cano, A.; Alcaraz, O.; Acosta, M.; Arnao, M. B. On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS.+ assay. *Redox Rep.* **2002**, *7*, 103–109.

(16) Kim, D.; Lee, K. W.; Lee, H. J.; Lee, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3713–3717.

(17) Bravo, M.; Silva, S.; Coelho, A.; Vilas Boas, L.; Bronze, M. Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 84–92.

(18) Maillard, M.; Soum, M.; Boivin, P.; Berset, C. Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **1996**, *29*, 238–244.

(19) Wang, Y.; Catana, F.; Yang, Y.; Roderick, R.; van Breemen, R. B. An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 431–435.

(20) del Álamo, M.; Casado, L.; Hernández, V.; Jiménez, J. J. Determination of free molecular phenolics and catechins in wine by solid phase extraction on polymeric cartridges and liquid chromatography with diode array detection. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1049*, 97–105.

(21) Adil, I. H.; Çetin, H.; Yener, M.; Bayındırlı, A. Subcritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. *J. Supercrit. Fluids* **2007**, *43*, 55–63.

(22) Whittle, N.; Eldridge, H.; Bartley, J. Identification of the polyphenols in barley and beer by HPLC/MS and HPLC/electrochemical detection. *J. Inst. Brew.* **1999**, *105*, 89–99.

Conclusion générale

La bière est une boisson riche en composants nutritionnels divers comprenant sucres, acides aminés, minéraux, vitamines et composés phénoliques. Ces derniers participent à la coloration de la bière, mais également à ses propriétés santé, notamment à travers leur activité antioxydante. L'étude présentée dans le cadre de cette thèse de doctorat s'est attachée à traiter ces deux aspects de la présence des composés phénoliques dans bière.

En ce qui concerne le premier aspect, l'objectif, qui est de nature technologique, consistait à explorer les moyens et les modalités d'application d'une élimination des composés colorés, essentiellement constitués de composés phénoliques, de la bière. La couleur de la bière est en effet un frein important au développement de produits innovants par les brasseurs. La réduction ou l'élimination des composés phénoliques devait servir un autre objectif technologique qui est de réduire la formation de précipités et de troubles dus à des complexations entre ces composés et les protéines et qui souvent complique les étapes délicates de filtration.

Une quinzaine d'adsorbants de qualité alimentaire ont alors été expérimentés et leurs performances de décoloration ont été comparées. Le charbon actif en poudre à une concentration de 10 g/L avec un temps de contact de 30 minutes a permis d'obtenir une décoloration du moût de près de 90%. L'étude a montré que les composés phénoliques ont une affinité particulière pour cet adsorbant. Les essais de décoloration ont ensuite été réalisés à des échelles plus grandes avec des volumes de 2 et de 20 L de moût et des essais de fermentation ont pu être menés. Ce procédé de décoloration a également été appliqué avec succès à la bière. Les résultats des analyses physico-chimiques ont montré qu'en comparaison avec une décoloration du moût, la décoloration de la bière a moins d'impact sur la composition du produit final.

Ce produit a ensuite été utilisé afin de développer une boisson maltée aux couleurs originales. Des colorants alimentaires tels que la chlorophylline et le lycopène, ont été ajoutés, ainsi que d'autres colorants issus d'extraits alimentaires, tels que le rouge de betterave ou le jus de chou rouge (mélanges non purifiés d'anthocyanes) dont la couleur peut varier en fonction du pH. Cela nous a permis d'obtenir une gamme de nouvelles boissons maltées aux couleurs vives et variées allant du rose au bleu.

Concernant le deuxième aspect de la présence des composés phénoliques dans la bière, celui de leur intérêt santé, notre objectif consistait à mettre au point une méthode analytique afin d'identifier et de quantifier ces composés, mais qui serait également capable de déterminer leur activité antioxydante. Les méthodes classiques d'identification des composés antioxydants dans des mélanges complexes impliquent en effet de longues procédures de fractionnement bio-guidé,

suivie de l'identification des composés purifiés. Une étape d'extraction liquide-liquide a été appliquée à un mélange de composés phénoliques représentatif de la bière. La séparation des composés extraits a été faite par HPLC en phase inverse couplée à un détecteur UV-visible pour l'identification et à un détecteur UV-visible supplémentaire utilisé pour surveiller l'activité antioxydante de ces composés, après avoir réagi en ligne avec une solution du radical ABTS^{•+}. A des concentrations équimolaires, l'acide gallique a été identifié comme le composé le plus antioxydant, les acides p-hydroxybenzoïque, vanillique, p-coumarique, m-coumarique, et o-coumarique quant à eux n'ont montré aucune activité antioxydante détectable.

Cette méthode chromatographique a ensuite été testée en comparaison avec une méthode biologique de mesure de l'activité antioxydante consistant à mesurer la modulation d'un stress oxydant sur la croissance des cellules β du pancréas, impliquées dans le diabète de type 2. Ceci permis de révéler qu'en plus de son effet antioxydant, une même molécule pouvait montrer un effet toxique, sans doute pro-oxydant. En effet, à concentrations équimolaires, certains composés pouvaient montrer une activité antioxydante importante avec la méthode chromatographique, et peu d'activité, voire des effets toxiques, comme pour l'acide gallique, avec la méthode biologique. La concentration semble jouer un rôle dans l'expression de l'un ou l'autre des deux effets, et sans doute d'autres paramètres tels que la structure chimique et le substrat utilisé pour déterminer l'activité. Néanmoins, des résultats concordant entre les deux méthodes ont été obtenus pour certains composés tels que l'acide férulique, l'acide protocatéchuique et l'épicatéchine.

La méthode chromatographique d'analyse de l'activité antioxydante a ensuite été appliquée à la séparation et à la détection des composés d'intérêt extraits à différentes étapes du procédé de fabrication de la bière: le maltage, le brassage, la cuisson et la fermentation. Cela nous a permis d'étudier l'effet des procédés sur la composition phénolique et les profils antioxydants de la bière. Globalement, il est apparu, que la teneur totale en composés phénoliques augmentait suite aux étapes de maltage, de houblonnage et de fermentation, alors que l'activité antioxydante totale restait constante. Parmi les composés phénoliques à activité antioxydante, neuf composés ont pu être identifiés, avec une contribution antioxydante importante ($69\pm 8\%$ en moyenne) provenant de la prodelphinidine B3, de la procyanidine B3, de la catéchine, des acides férulique et sinapique, et d'un composé non identifié (composé 1). Mis à part le malt, la prodelphinidine B3, la procyanidine B3 et la catéchine sont présentes à chaque étape de fabrication de la bière et contribuent en moyenne de $45\pm 13\%$ à l'activité antioxydante. L'impact du procédé de décoloration sur l'activité antioxydante de la bière a également été évalué par la méthode chromatographique de détection de l'activité antioxydante. Cela nous a permis de confirmer que l'utilisation du charbon actif permet d'éliminer la

majeure partie des composés phénoliques de la bière, ainsi que l'activité antioxydante qui leur est associée.

Dans l'organisme humain, le devenir des composés phénoliques, ainsi que leurs activités antioxydantes et sans doute pro-oxydantes n'ont encore été clairement établis, et ceci principalement en raison de la complexité du milieu biologique. Il est donc évident que cette complexité ne peut être représentée par une seule réaction, telle que la réduction du radical ABTS^{•+}, ni même par une cellule β pancréatique. Un autre élément de complexité est le milieu alimentaire dont les effets et les multiples interactions ne peuvent quant à eux, être réduits aux propriétés d'un seul composé. Il y a donc un intérêt à considérer, pour les études des effets sur la santé « le milieu réel », et donc à s'intéresser, plutôt qu'aux composés purs, à l'ensemble de la matrice alimentaire avec ses polyphénols et ses autres composants qui pourraient moduler le stress oxydatif, et plutôt qu'aux essais *in vitro* et aux réactions isolées, aux essais *in vivo*.

De telles approches présentent l'avantage de prendre en considération la complexité des milieux biologiques et alimentaires, et les interactions qui peuvent y avoir lieu, et donc de se rapprocher de la réalité des effets biologiques. Cependant, d'un point de vue analytique, cela rend l'identification des composés responsables des activités et l'étude d'éventuels changements dus aux procédés des tâches particulièrement difficiles. Il est évident que la méthode chromatographique de détection de l'activité antioxydante ne reflète pas la totalité des activités des composés naturels. Cependant, elle permet de détecter et d'identifier rapidement des composés antioxydants dans des mélanges complexes sans étapes préalables de purification ou de fractionnement bio-guidé.

Ce travail est une première étape dans la mise en place de techniques rapides d'analyses de l'activité antioxydante dans des mélanges complexes, tels que la bière, et l'application au procédé de fabrication pour le suivi de l'activité antioxydante. Toutefois de nombreux aspects restent à étudier, aussi bien au niveau de la chimie que de la biologie. Le choix du radical semble primordial, car l'ABTS (ou le DPPH) n'est pas un radical naturel que l'on retrouve dans l'organisme humain. D'autres auteurs ont proposé l'utilisation de radicaux plus physiologiques tels que le peroxyde d'hydrogène ou l'ion superoxyde^{169,170}. Les conditions chromatographiques peuvent également être améliorées par la modification de la forme, de la température et de la position de la boucle de réaction, ou encore de la composition de la phase mobile. L'étude des composés bioactifs doit également tenir compte de la biodisponibilité du composé : fixation à la matrice alimentaire et non libération dans le tractus digestif, résistance du produit vis-à-vis de l'acidité gastrique, transformations métaboliques induites par le transit digestif. Pour cela, ce modèle pourra également être appliqué comme méthode de détection de composés actifs présents dans le plasma d'animaux de laboratoire après

qu'ils aient été nourris de produits d'intérêt. Il est bien connu que certains extraits présentent à la fois des effets toxiques et protecteurs en fonction de la concentration à laquelle ils sont employés. Selon nos derniers résultats, il est clairement apparu que l'EGCG présente une forte activité dès la dose de 30 µg/mL avec la méthode chromatographique, alors qu'il ne se montre actif qu'au-delà de 200 µg/mL avec la méthode biologique, dose bien supérieure aux concentrations plasmatiques retrouvées pour ce composé. Il apparaît donc important de travailler à des concentrations proches de ce que l'on retrouve dans l'organisme humain.

Grâce aux méthodes de screening et d'analyses de molécules antioxydantes mises en place au laboratoire, nous savons quels composés sont responsables de l'activité antioxydante, il serait intéressant de savoir de la même manière quels composés sont responsables de la couleur. Une des perspectives est également de rechercher d'autres composés ou molécules issus de l'alimentation, qui pourraient avoir des effets antioxydants, tels que des composés d'intérêt hydrophiles (ex : polyphénols) mais également lipophiles (ex : acides gras polyinsaturés, vitamines liposolubles, lycopène, ...). Ainsi, il a récemment été mis en place un projet collaboratif avec entre autre, l'équipe du Dr. Séverine Sigrist du CEED de Strasbourg. Ce projet a pour but d'évaluer le pouvoir antioxydant des fruits et légumes cultivés en Alsace et d'en valider l'activité biologique par la méthode LC-AOx comparée avec les analyses de survie des cellules β pancréatiques soumises à un stress oxydatif (H_2O_2) en prenant une attention toute particulière à réaliser les études dans des conditions physiologiques de concentrations. Enfin, il est aujourd'hui bien admis que ces composés peuvent avoir une action synergique ou antagoniste. A ce propos, une intéressante étude clinique a été publiée dans la revue Nature¹⁷¹ et fait état d'interactions fortes entre les composés phénoliques du chocolat (épicatéchine) et les protéines du lait démontrant de façon assez simple que le lait éventuellement présent dans le chocolat ou consommé avec lui était responsable de l'inhibition de la (bio)activité des composés en question. Comme cela a été rappelé, il est donc fondamental que l'étape ultime de toute étude analytique des effets biologiques considère d'une part l'aliment dans son ensemble, principe actif et matrice environnante, promotrice ou inhibitrice de ces effet, et d'autre part le milieu biologique et donc les tests *in vivo*.

Références bibliographiques

1. Baik, B.-K. & Ullrich, S.E. Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science* **48**, 233-242 (2008).
2. Bamforth, C.W. Beers – Chemistry of Brewing. *Encyclopedia of Food Sciences & Nutrition* 440-447 (2003).
3. Moll, M. *Bières et coolers : Définition, fabrication, composition*. (Tech.& Doc./Lavoisier: 1991).
4. Fachverlag, H.C. Analytica-Microbiologica-EBC. European Brewery Convention, Section 3, Method 3.2.1.1. (2001).
5. Shahidi, F. & Naczk, M. *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications, 2nd Edition*. (CRC - Press:) à <<http://www.informaworld.com/978-1-58716-138-4>>
6. Nordkvist, E., Salomonsson, A.C. & Aman, P. Distribution of insoluble bound phenolic acids in barley grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **35**, 657-661 (1984).
7. Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* **96**, 67-202 (2002).
8. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. & Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**, 727-747 (2004).
9. Xie, D.-Y. & Dixon, R.A. Proanthocyanidin biosynthesis - still more questions than answers? *Phytochemistry* **66**, 2127-2144 (2005).
10. Sarni-Manchado, P. & Cheynier, V., Collectif *Les polyphénols en agroalimentaire*. (Tec & Doc Lavoisier: 2005).
11. Ferik, F. et al. Xanthohumol, a prenylated flavonoid contained in beer, prevents the induction of preneoplastic lesions and DNA damage in liver and colon induced by the heterocyclic aromatic amine amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline (IQ). *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **691**, 17-22 (2010).
12. Milligan, S.R. et al. Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **84**, 2249-2252 (1999).
13. Stevens, J.F. & Page, J.E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* **65**, 1317-1330 (2004).
14. Vinson, J.A., Mandarano, M., Hirst, M., Trevithick, J.R. & Bose, P. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Beers and the Effect of Two Types of Beer on an Animal Model of Atherosclerosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 5528-5533 (2003).
15. Gerhäuser, C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur. J. Cancer* **41**, 1941-1954 (2005).
16. Honma, Y., Tobe, H., Makishima, M., Yokoyama, A. & Okabe-Kado, J. Induction of differentiation of myelogenous leukemia cells by humulone, a bitter in the hop. *Leukemia Research* **22**, 605-610 (1998).
17. Tobe, H., Kubota, M., Yamaguchi, M., Kocho, T. & Aoyagi, T. Apoptosis to HL-60 by humulone. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **61**, 1027-1029 (1997).
18. Chen, W.-J. & Lin, J.-K. Mechanisms of Cancer Chemoprevention by Hop Bitter Acids (Beer Aroma) through Induction of Apoptosis Mediated by Fas and Caspase Cascades. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 55-64 (2004).
19. Zhao, F., Nozawa, H., Daikonnya, A., Kondo, K. & Kitanaka, S. Inhibitors of nitric oxide production from hops (*Humulus lupulus* L.). *Biol. Pharm. Bull* **26**, 61-65 (2003).
20. Yamamoto, K., Wang, J., Yamamoto, S. & Tobe, H. Suppression of cyclooxygenase-2 gene transcription by humulon. *Adv. Exp. Med. Biol* **507**, 73-77 (2002).
21. Nozawa, H., Nakao, W., Zhao, F. & Kondo, K. Dietary supplement of isohumulones inhibits the formation of aberrant crypt foci with a concomitant decrease in prostaglandin E2 level in rat colon. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 772-778 (2005).
22. Lamy, V. et al. Chemopreventive effects of lupulone, a hop β -acid, on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **28**, 1575 -1581 (2007).

23. Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P. & Amiot, M.J. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *Journal of Science and Food Agricultural* **79**, 1625-1634 (1999).
24. Kim, M.-J. et al. Relationship between Phenolic Compounds, Anthocyanins Content and Antioxidant Activity in Colored Barley Germplasm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 4802-4809 (2007).
25. McMurrough, I., Madigan, D. & Smyth, M.R. Semipreparative Chromatographic Procedure for the Isolation of Dimeric and Trimeric Proanthocyanidins from Barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 1731-1735 (1996).
26. McMurrough, I., Loughrey, M.J. & Hennigan, G.P. Content of (+)-catechin and proanthocyanidins in barley and malt grain. *J. Sci. Food Agric.* **34**, 62-72 (1983).
27. Dvorakova, M. et al. Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3-ols from barley and malt by liquid chromatography–ultraviolet detection–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1189**, 398-405 (2008).
28. Adom, K.K., Sorrells, M.E. & Liu, R.H. Phytochemical Profiles and Antioxidant Activity of Wheat Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 7825-7834 (2003).
29. Haila, K.M., Lievonon, S.M. & Heinonen, M.I. Effects of Lutein, Lycopene, Annatto, and γ -Tocopherol on Autoxidation of Triglycerides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 2096-2100 (1996).
30. Friedrich, W. & Galensa, R. Identification of a new flavanol glucoside from barley (*Hordeum vulgare* L.) and malt. *European Food Research and Technology* **214**, 388-393 (2002).
31. Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H. & Derdelinckx, G. The chemistry of beer aging - a critical review. *Food Chemistry* **95**, 357-381 (2006).
32. Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. & Jiménez, L. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **45**, 287 (2005).
33. Maillard, L.C. Action des acides amines sur les sucres : formation des melanoidines par voie methodique. *Council of Royal Academy Science Series 2* **154**, 66-68 (1912).
34. Ames, J.M., Defaye, A.B., Bailey, R.G. & Bates, L. Analysis of the non-volatile Maillard reaction products formed in an extrusion-cooked model food system. *Food Chemistry* **61**, 521-524 (1998).
35. Ames, J.M. Applications of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chemistry* **62**, 431-439 (1998).
36. Machiels, D. & Istasse, L. La réaction de Maillard : importance et applications en chimie des aliments = Maillard reaction: importance and applications in food chemistry. *Annales de médecine vétérinaire* **146**, 347-352 (2002).
37. Macheix, J.-J., Fleuriet, A. & Jay-Allemand, C. *Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. (PPUR: 2005).
38. Rice-Evans, C., Miller, N. & Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* **2**, 152-159 (1997).
39. Goupy, P., Dufour, C., Loonis, M. & Dangles, O. Quantitative Kinetic Analysis of Hydrogen Transfer Reactions from Dietary Polyphenols to the DPPH Radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 615-622 (2003).
40. Boivin, P. Relationship between polyphenols and beer flavour stability. (2009).à <<http://www.uclouvain.be/cps/ucl/doc/inbr/documents/Boivin.pdf>>
41. Rice-Evans, C. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochemical Society Symposia* **61**, 103-116 (1995).
42. Woffenden, H.M., Ames, J.M., Chandra, S., Anese, M. & Nicoli, M.C. Effect of Kilning on the Antioxidant and Pro-oxidant Activities of Pale Malts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 4925-4933 (2002).
43. Yen, G.-C., Chen, H.-Y. & Peng, H.-H. Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Various Tea Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 30-34 (1997).

44. Auberval, N. et al. P153 Effet antioxydant des extraits de polyphénols et du resvératrol trans et CIS sur des cellules RINm5F après induction d'un stress oxydant. *Diabetes & Metabolism* **35**, A64 (2009).
45. Auberval, N., Dal-Ros, S., Schini-Kerth, V., Pinget, M. & Sigrist, S. P170 Effet antioxydant des extraits de polyphénols de vin rouge et de thé vert sur des cellules RINm5F après induction d'un stress oxydant. *Diabetes & Metabolism* **36**, A79 (2010).
46. Cheynier, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr* **81**, 223S-229 (2005).
47. Mikyska, A., Hrabak, M., Haskova, D. & Srogl, J. The role of malt and hop polyphenols in beer quality, flavour and haze stability. *Journal of the Institute of Brewing* **108**, 78-85 (2002).
48. Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzman, N.E., Gonzalez-Laredo, R.F. & Pulido-Alonso, J. Effect of processing on the antioxidant properties of extracts from Mexican barley (*Hordeum vulgare*) cultivar. *Food Chemistry* **119**, 903-906 (2010).
49. Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K. & Liu, R.H. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 3010-3014 (2002).
50. Randhir, R., Kwon, Y.-I. & Shetty, K. Effect of thermal processing on phenolics, antioxidant activity and health-relevant functionality of select grain sprouts and seedlings. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **9**, 355-364 (2008).
51. Ranilla, L.G., Genovese, M.I. & Lajolo, F.M. Effect of Different Cooking Conditions on Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Some Selected Brazilian Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 5734-5742 (2009).
52. Clifford, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1033-1043 (2000).
53. Maillard, M.-N. & Berset, C. Evolution of Antioxidant Activity during Kilning: Role of Insoluble Bound Phenolic Acids of Barley and Malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 1789-1793 (1995).
54. Maillard, M.-N., Soum, M.-H., Boivin, P. & Berset, C. Antioxidant Activity of Barley and Malt: Relationship with Phenolic Content. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **29**, 238-244 (1996).
55. Manzocco, L., Calligaris, S., Mastrocola, D., Nicoli, M.C. & Lerici, C.R. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science & Technology* **11**, 340-346 (2000).
56. Kohyama, N. et al. Effects of phenolic compounds on the browning of cooked barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 6402-6407 (2009).
57. Giriwono, P.E. et al. Extract of fermented barley attenuates chronic alcohol induced liver damage by increasing antioxidative activities. *Food Research International* **43**, 118-124 (2010).
58. Fantozzi, P. et al. In vitro antioxidant capacity from wort to beer. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **31**, 221-227 (1998).
59. Lopez-Toledano, A., Mayen, M., Merida, J. & Medina, M. Yeasts used to delay browning in white wines. *Food Chemistry* **97**, 498-504 (2006).
60. Salmon, J.-M. Interactions between yeast, oxygen and polyphenols during alcoholic fermentations: Practical implications. *LWT - Food Science and Technology* **39**, 959-965 (2006).
61. Mazauric, J.-P. & Salmon, J.-M. Interactions between Yeast Lees and Wine Polyphenols during Simulation of Wine Aging: I. Analysis of Remnant Polyphenolic Compounds in the Resulting Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 5647-5653 (2005).
62. McMurrough, I., Madigan, D. & Smyth, M.R. Adsorption by Polyvinylpyrrolidone of Catechins and Proanthocyanidins from Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 2687-2691 (1995).
63. de Rijke, E. et al. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* **1112**, 31-63 (2006).

64. Naczki, M. & Shahidi, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**, 1523-1542 (2006).
65. Bravo, M.N., Silva, S., Coelho, A.V., Vilas Boas, L. & Bronze, M.R. Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. *Analytica Chimica Acta* **563**, 84-92 (2006).
66. Madhujith, T. & Shahidi, F. Antioxidative and Antiproliferative Properties of Selected Barley (*Hordeum vulgare* L.) Cultivars and Their Potential for Inhibition of Low-Density Lipoprotein (LDL) Cholesterol Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 5018-5024 (2007).
67. Magalhães, P.J. et al. Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1217**, 3258-3268 (2010).
68. Llorach, R., Gil-Izquierdo, A., Ferreres, F. & Tomás-Barberán, F.A. HPLC-DAD-MS/MS ESI Characterization of Unusual Highly Glycosylated Acylated Flavonoids from Cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) Agroindustrial Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 3895-3899 (2003).
69. Naczki, M. & Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* **1054**, 95-111 (2004).
70. Michalkiewicz, A., Biesaga, M. & Pyrzynska, K. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A* **1187**, 18-24 (2008).
71. Schoefs, B. Determination of pigments in vegetables. *Journal of Chromatography A* **1054**, 217-226 (2004).
72. Niederländer, H.A.G., van Beek, T.A., Bartasiute, A. & Koleva, I.I. Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1210**, 121-134 (2008).
73. Shi, S.-Y. et al. Coupling HPLC to on-line, post-column (bio)chemical assays for high-resolution screening of bioactive compounds from complex mixtures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **28**, 865-877 (2009).
74. Niederländer, H.A.G., de Jong, M.M., Gooijer, C. & Velthorst, N.H. Flow injection system for determination of singlet oxygen quenching efficiencies utilizing on-line dioxetane chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta* **290**, 201-214 (1994).
75. Ogawa, A., Arai, H., Tanizawa, H., Miyahara, T. & Toyo'oka, T. On-line screening method for antioxidants by liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta* **383**, 221-230 (1999).
76. Toyo'oka, T., Kashiwazaki, T. & Kato, M. On-line screening methods for antioxidants scavenging superoxide anion radical and hydrogen peroxide by liquid chromatography with indirect chemiluminescence detection. *Talanta* **60**, 467-475 (2003).
77. Dapkevicius, A., van Beek, T.A., Niederländer, H.A.G. & de Groot, A. On-Line Detection of Antioxidative Activity in High-Performance Liquid Chromatography Eluates by Chemiluminescence. *Analytical Chemistry* **71**, 736-740 (1999).
78. Kool, J. et al. An on-line post-column detection system for the detection of reactive-oxygen-species-producing compounds and antioxidants in mixtures. *Analytical and bioanalytical chemistry* **388**, 871-879 (2007).
79. Guo, C., Cao, G., Sofic, E. & Prior, R.L. High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Coulometric Array Detection of Electroactive Components in Fruits and Vegetables: Relationship to Oxygen Radical Absorbance Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 1787-1796 (1997).
80. Mannino, S., Brenna, O., Buratti, S. & Cosio, M.S. A new method for the evaluation of the antioxidant power of wines. *Electroanalysis* **10**, 908-912 (1998).
81. Koleva, I.I., Niederländer, H.A.G. & van Beek, T.A. An On-Line HPLC Method for Detection of Radical Scavenging Compounds in Complex Mixtures. *Analytical Chemistry* **72**, 2323-2328 (2000).

82. Koleva, I.I., Niederländer, H.A.G. & van Beek, T.A. Application of ABTS Radical Cation for Selective On-Line Detection of Radical Scavengers in HPLC Eluates. *Analytical Chemistry* **73**, 3373-3381 (2001).
83. Miliauskas, G., van Beek, T.A., Venskutonis, P.R., Linssen, J.P.H. & de Waard, P. Antioxidative activity of Geranium macrorrhizum. *European Food Research and Technology* **218**, 253-261 (2004).
84. Miliauskas, G. et al. Antioxidant activity of Potentilla fruticosa. *J. Sci. Food Agric.* **84**, 1997-2009 (2004).
85. Miliauskas, G., van Beek, T.A., de Waard, P., Venskutonis, R.P. & Sudhölter, E.J.R. Identification of Radical Scavenging Compounds in Rhaponticum carthamoides by Means of LC-DAD-SPE-NMR. *Journal of Natural Products* **68**, 168-172 (2005).
86. Cano, A., Alcaraz, O., Acosta, M. & Arnao, M.B. On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS.+ assay. *Redox Report* **7**, 103-109 (2002).
87. Beekwilder, J. et al. Antioxidants in Raspberry: On-Line Analysis Links Antioxidant Activity to a Diversity of Individual Metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 3313-3320 (2005).
88. Schijlen, E. et al. Pathway engineering for healthy phytochemicals leading to the production of novel flavonoids in tomato fruit. *Plant Biotechnology J* **4**, 433-444 (2006).
89. Stewart, A.J., Mullen, W. & Crozier, A. On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea. *Molecular Nutrition Food Research* **49**, 52-60 (2005).
90. Stalmach, A., Mullen, W., Nagai, C. & Crozier, A. On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **18**, 253-262 (2006).
91. Pérez-Bonilla, M. et al. Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (*Olea europaea*) wood. *Journal of Chromatography A* **1112**, 311-318 (2006).
92. Pérez-Bonilla, M. et al. Isolation of antioxidative secoiridoids from olive wood (*Olea europaea* L.) guided by on-line HPLC-DAD-radical scavenging detection. *Food Chemistry* **124**, 36-41 (2011).
93. Cassano, M., Doualé, G.A. & Zapp, J. Determination of Radical Scavenging Capacities in Differently Roasted Coffees by On-line Combination of High-performance Liquid Chromatography with ABTS Decolorization. *Colloquium of Coffee Chemistry and Quality* **21st** 264 (2006).
94. Li, S.-Y., Yu, Y. & Li, S.-P. Identification of Antioxidants in Essential Oil of Radix Angelicae Sinensis Using HPLC Coupled with DAD-MS and ABTS-Based Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 3358-3362 (2007).
95. Zhao, H., Chen, W., Lu, J. & Zhao, M. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry* **119**, 1150-1158 (2010).
96. Slokar, Y.M. & Majcen Le Marechal, A. Methods of decoloration of textile wastewaters. *Dyes and Pigments* **37**, 335-356 (1998).
97. Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. & Nigam, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology* **77**, 247-255 (2001).
98. Allen, S.J. & Koumanova, B. Decolourisation of water/wastewater using adsorption. *Journal of the university of chemical technology and metallurgy* **40**, 175-192 (2005).
99. Word, K.M., Pflugfelder, R.L., Neu, J.A., Head, G.P. & Patino, H. WO9418304 Colorless flavored malt beverage and method for making the same. (1994).
100. Rivera, A.D., Macapugay, E.S. & De Carlos, J.Y. WO2006046879 Method of making colorless and artificially colored clear beer. (2006).

101. Siebert, K.J. & Lynn, P.Y. Comparison of Polyphenol Interactions with Polyvinylpyrrolidone and Haze-Active Protein. *Journal of the American Society of brewing Chemists* **56**, 24-31 (1998).
102. Laborde, B. et al. PVPP–Polyphenol Complexes: A Molecular Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 4383-4389 (2006).
103. Achaerandio, I., Güell, C. & López, F. New approach to continuous vinegar decolourisation with exchange resins. *Journal of Food Engineering* **78**, 991-994 (2007).
104. Bailey, S.E., Olin, T.J., Bricka, R.M. & Adrian, D.D. A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. *Water Research* **33**, 2469-2479 (1999).
105. Spagna, G. et al. The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan. *Food Research International* **29**, 241-248 (1996).
106. Marsal, A., Bautista, E., Ribosa, I., Pons, R. & García, M.T. Adsorption of polyphenols in wastewater by organo-bentonites. *Applied Clay Science* **44**, 151-155 (2009).
107. Garg, U.K., Kaur, M.P., Garg, V.K. & Sud, D. Removal of hexavalent chromium from aqueous solution by agricultural waste biomass. *Journal of Hazardous Materials* **140**, 60-68 (2007).
108. Nigam, P., Armour, G., Banat, I.M., Singh, D. & Marchant, R. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. *Bioresource Technology* **72**, 219-226 (2000).
109. Seaton, J.C. & Cantrell, I.C. The determination of beer colour. *Journal of the Institute of Brewing* **99**, 21-23 (1993).
110. Bernard, M. Determination of repeatability and reproducibility of EBC accepted methods : V - Beer. *Journal of the Institute of Brewing* **106**, 135-138 (2000).
111. Bishop, L.R. Analysis committee of the European Brewery Convention: the measurement of total polyphenols in worts and beers. *Journal of the Institute of Brewing* **78**, 37-38 (1972).
112. Analytica-EBC. (2006).
113. Ahmaruzzaman, M. Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* **143**, 48-67 (2008).
114. Garg, V.K., Gupta, R., Kumar, R. & Gupta, R.K. Adsorption of chromium from aqueous solution on treated sawdust. *Bioresource Technology* **92**, 79-81 (2004).
115. Richard, D., Delgado Núñez, M. de L. & Schweich, D. Adsorption of complex phenolic compounds on active charcoal: Adsorption capacity and isotherms. *Chemical Engineering Journal* **148**, 1-7 (2009).
116. Garcia-Araya J. F, Beltran F. J & Alvarez P, , et , Masa F. J Activated Carbon Adsorption of Some Phenolic Compounds Present in Agroindustrial Wastewater. *Adsorption* **9**, 107-115 (2003).
117. Wainwright, T. A review part I - analytical and biochemical considerations; part II - brewing experience. *Journal of the Institute of Brewing* **79**, 451-470 (1973).
118. European Brewery Convention *Manual of good practice : Fermentation and Maturation*. **7**, (2000).
119. Jones, M. & Pierce, J.S. Absorption of amino acids from wort by yeasts. *Journal of the Institute of Brewing* 307-315 (1964).
120. Vis, R.B. & Lorenz, K. [beta]-Glucans: Importance in Brewing and Methods of Analysis. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **30**, 331-336 (1997).
121. Yamauchi, Y. et al. Rapid maturation of beer using an immobilized yeast bioreactor. 1. Heat conversion of [alpha]-acetolactate. *Journal of Biotechnology* **38**, 101-108 (1995).
122. Yamauchi, Y. et al. Rapid maturation of beer using an immobilized yeast bioreactor. 2. Balance of total diacetyl reduction and regeneration. *Journal of Biotechnology* **38**, 109-116 (1995).
123. Afssa Saisine n°2008-SA-0385 *Avis de l'Agence de sécurité sanitaire des aliments relatif à la demande d'autorisation d'emploi de charbon actif en tant qu'auxiliaire technologique en brasserie*. (2009).
124. Duthie, G.G., Duthie, S.J. & Kyle, J.A.M. Plant Polyphenols in Cancer and Heart Disease: Implications as Nutritional Antioxidants. *Nutrition Research Reviews* **13**, 79-106 (2000).

125. Manach, C. et al. Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutrition Research* **16**, 517-544 (1996).
126. Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev* **56**, 317-333 (1998).
127. Scalbert, A. & Williamson, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition* **130**, 2073S -2085S (2000).
128. Hanasaki, Y., Ogawa, S. & Fukui, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* **16**, 845-850 (1994).
129. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. & Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **20**, 933-956 (1996).
130. Cao, G., Sofic, E. & Prior, R.L. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biology and Medicine* **22**, 749-760 (1997).
131. Qingming, Y. et al. Antioxidant activities of malt extract from barley (*Hordeum vulgare* L.) toward various oxidative stress in vitro and in vivo. *Food Chemistry* **118**, 84-89 (2010).
132. Pellegrini, N., Del Rio, D., Colombi, B., Bianchi, M. & Brighenti, F. Application of the 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Radical Cation Assay to a Flow Injection System for the Evaluation of Antioxidant Activity of Some Pure Compounds and Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 260-264 (2003).
133. Cao, G., Booth, S.L., Sadowski, J.A. & Prior, R.L. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am. J. Clin. Nutr* **68**, 1081-1087 (1998).
134. Dapkevicius, A., van Beek, T.A. & Niederländer, H.A.G. Evaluation and comparison of two improved techniques for the on-line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates. *Journal of Chromatography A* **912**, 73-82 (2001).
135. Cano, A., Hernández-Ruiz, J., García-Cánovas, F., Acosta, M. & Arnao, M.B. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem. Anal.* **9**, 196-202 (1998).
136. Re, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med* **26**, 1231-1237 (1999).
137. Wang, Y., Catana, F., Yang, Y., Roderick, R. & van Breemen, R.B. An LC-MS Method for Analyzing Total Resveratrol in Grape Juice, Cranberry Juice, and in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 431-435 (2002).
138. del Álamo, M., Casado, L., Hernández, V. & Jiménez, J.J. Determination of free molecular phenolics and catechins in wine by solid phase extraction on polymeric cartridges and liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A* **1049**, 97-105 (2004).
139. Soto, M.L., Moure, A., Domínguez, H. & Parajó, J.C. Charcoal adsorption of phenolic compounds present in distilled grape pomace. *Journal of Food Engineering* **84**, 156-163 (2008).
140. Kim, D.-O., Lee, K.W., Lee, H.J. & Lee, C.Y. Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 3713-3717 (2002).
141. Long, L.H., Lan, A.N., Hsuan, F.T. & Halliwell, B. Generation of hydrogen peroxide by « antioxidant » beverages and the effect of milk addition. Is cocoa the best beverage? *Free Radic. Res* **31**, 67-71 (1999).
142. Chedea, V.S., Braicu, C. & Socaciu, C. Antioxidant/prooxidant activity of a polyphenolic grape seed extract. *Food Chemistry* **121**, 132-139 (2010).
143. Frankel, E.N., Huang, S.-W. & Aeschbach, R. Antioxidant activity of green teas in different lipid systems. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society* **74**, 1309-1315 (1997).
144. Park, S. et al. -Ascorbic acid induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells via hydrogen peroxide-mediated mechanisms. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 2180-2195 (2004).

145. Long, L.H., Clement, M.V. & Halliwell, B. Artifacts in Cell Culture: Rapid Generation of Hydrogen Peroxide on Addition of (-)-Epigallocatechin, (-)-Epigallocatechin Gallate, (+)-Catechin, and Quercetin to Commonly Used Cell Culture Media. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **273**, 50-53 (2000).
146. Maurya, D.K. & Devasagayam, T.P.A. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food and Chemical Toxicology* **48**, 3369-3373 (2010).
147. Zheng, L.-F., Dai, F., Zhou, B., Yang, L. & Liu, Z.-L. Prooxidant activity of hydroxycinnamic acids on DNA damage in the presence of Cu(II) ions: Mechanism and structure-activity relationship. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 149-156 (2008).
148. Akagawa, M., Shigemitsu, T. & Suyama, K. Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **67**, 2632-2640 (2003).
149. Suh, K.S. et al. Prooxidative effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate on the HIT-T15 pancreatic beta cell line. *Cell Biol. Toxicol* **26**, 189-199 (2010).
150. Yin, S.-T. et al. Epigallocatechin-3-gallate induced primary cultures of rat hippocampal neurons death linked to calcium overload and oxidative stress. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol* **379**, 551-564 (2009).
151. Isbrucker, R.A., Bausch, J., Edwards, J.A. & Wolz, E. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 1: Genotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* **44**, 626-635 (2006).
152. Yen, G.-C., Duh, P.-D. & Tsai, H.-L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry* **79**, 307-313 (2002).
153. Roche, M., Dufour, C., Mora, N. & Dangles, O. Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 423 (2005).
154. Frankel, E.N. & Finley, J.W. How To Standardize the Multiplicity of Methods To Evaluate Natural Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 4901-4908 (2008).
155. Prior, R.L. & Cao, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods1. *Free Radical Biology and Medicine* **27**, 1173-1181 (1999).
156. Halliwell, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics* **476**, 107-112 (2008).
157. Fahey, J.W. & Kensler, T.W. Role of Dietary Supplements/Nutraceuticals in Chemoprevention through Induction of Cytoprotective Enzymes. *Chemical Research in Toxicology* **20**, 572-576 (2007).
158. Adhami, V.M. & Mukhtar, H. Polyphenols from green tea and pomegranate for prevention of prostate cancer. *Free Radic Res* **40**, 1095-1104 (2006).
159. Vinson, J.A. et al. Chocolate Is a Powerful ex Vivo and in Vivo Antioxidant, an Antiatherosclerotic Agent in an Animal Model, and a Significant Contributor to Antioxidants in the European and American Diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 8071-8076 (2006).
160. Liu, Q. & Yao, H. Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food Chemistry* **102**, 732-737 (2007).
161. Hernanz, D. et al. Hydroxycinnamic Acids and Ferulic Acid Dehydrodimers in Barley and Processed Barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 4884-4888 (2001).
162. Lu, J. et al. Evolution of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity during Malting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 10994-11001 (2007).
163. Samaras, T.S., Camburn, P.A., Chandra, S.X., Gordon, M.H. & Ames, J.M. Antioxidant Properties of Kilned and Roasted Malts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 8068-8074 (2005).
164. Parras, P., Martínez-Tomé, M., Jiménez, A.M. & Murcia, M.A. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. *Food Chemistry* **102**, 582-592 (2007).

165. McMurrugh, I. & Baert, T. Identification of proanthocyanidins in beer and their direct measurement with a dual electrode electrochemical detector. *Journal of the Institute of Brewing* **100**, 409-416 (1994).
166. Adil, I.H., Çetin, H.I., Yener, M.E. & Bayındırlı, A. Subcritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. *The Journal of Supercritical Fluids* **43**, 55-63 (2007).
167. Srinivas, K., King, J.W., Howard, L.R. & Monrad, J.K. Solubility of Gallic Acid, Catechin, and Protocatechuic Acid in Subcritical Water from (298.75 to 415.85) K. *Journal of Chemical & Engineering Data* **55**, 3101-3108 (2010).
168. Razmkhab, S. et al. Adsorption of Phenolic Compounds and Browning Products in White Wines by Yeasts and Their Cell Walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 7432-7437 (2002).
169. Huang, D., Ou, B. & Prior, R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1841-1856 (2005).
170. Quick, K.L., Hardt, J.I. & Dugan, L.L. Rapid microplate assay for superoxide scavenging efficiency. *Journal of Neuroscience Methods* **97**, 139-144 (2000).
171. Serafini, M. et al. Plasma antioxidants from chocolate. *Nature* **424**, 1013 (2003).

Annexes

Annexe 1

Composition	Unités	Moût témoin	Moût décoloré	Bière témoin	Bière décolorée
Acide Aspartique	μmol/l	279	258	14	9
Acide Glutamique	μmol/l	329	326	18	10
Serine	μmol/l	438	436	151	140
Histidine	μmol/l	188	188	26	4
Glycine	μmol/l	260	255	122	53
Threonine	μmol/l	298	348	10	7
Arginine	μmol/l	566	529	33	27
Alanine	μmol/l	655	645	81	65
Tyrosine	μmol/l	358	228	10	13
Methionine	μmol/l	101	82	76	8
Valine	μmol/l	509	511	34	15
Phénylalanine	μmol/l	467	299	21	10
Isoleucine	μmol/l	291	276	14	11
Leucine	μmol/l	655	639	37	10
Lysine	μmol/l	426	433	35	11
Somme AA Classe 1	μmol/l	1445	1450	269	174
Somme AA Classe 2	μmol/l	2540	2214	282	1044
Somme AA Classe 3	μmol/l	1835	1789	131	52
Fructose (P/V)	g/dl	0,09	0,1	0,04	0,03
Glucose (P/V)	g/dl	0,67	0,72	0	0
Saccharose (P/V)	g/dl	0,15	0,17	0	0
Maltose (P/V)	g/dl	5,29	5,67	0	0
Maltotriose (P/V)	g/dl	1,08	1,13	0,1	0
Somme Sucres Fermentescibles	g/dl	7,28	7,79	0,14	0,03
Somme Sucres invertis (F+G+Sa)	g/dl	0,76	0,83	0,05	0,04
Fer	mg/l	0,064	0,521	0,005	0,01
Cuivre	mg/l	0,022	0,018	0	0,008
Calcium	mg/l	68,83	79,3	70,37	81,15
Magnesium	mg/l	58,6	58,8	52,7	53,9
Potassium	mg/l	312	319	258	270
Sodium	mg/l	14,7	15,7	14,7	15,8
Zinc	mg/l	0,1	0,15	0,02	0,02
Couleur	EBC	3	0,2		
Polyphénols Totaux	mg/l	86	10	93	17
Flavonoïdes	mg/l	20,4	0	26,8	0
Azote Total	mg/dl	56,8	28,6	36,2	12,7
Azote Amine Libre	mg/l	106,7	95,8	25,7	17,4
Ph		5,04	4,29	3,87	3,48
Sucres Totaux	g/dl	9,65	9,14	-	-
Extrait Limite	°Pl	1,1	0,63	-	-
Atténuation Limite	%	88,8	93,24	-	-
Extrait Mout	°Pl	9,82	9,31	-	-
B-Glucanes Solubles	mg/l	23	7	-	-
Densité 20/20		1,03933	1,03723	1,00445	1,00295
Acétaldéhyde	ppm	-	-	90,4	41,5
Ethylacétate	mg/l	-	-	14,8	18,6
Propanol	mg/l	-	-	10,8	10,6
Isobutanol	mg/l	-	-	13,5	17,4
Isoamylacétate	mg/l	-	-	1,9	2,5
Alcool Iso Amylique	mg/l	-	-	78,4	90,9

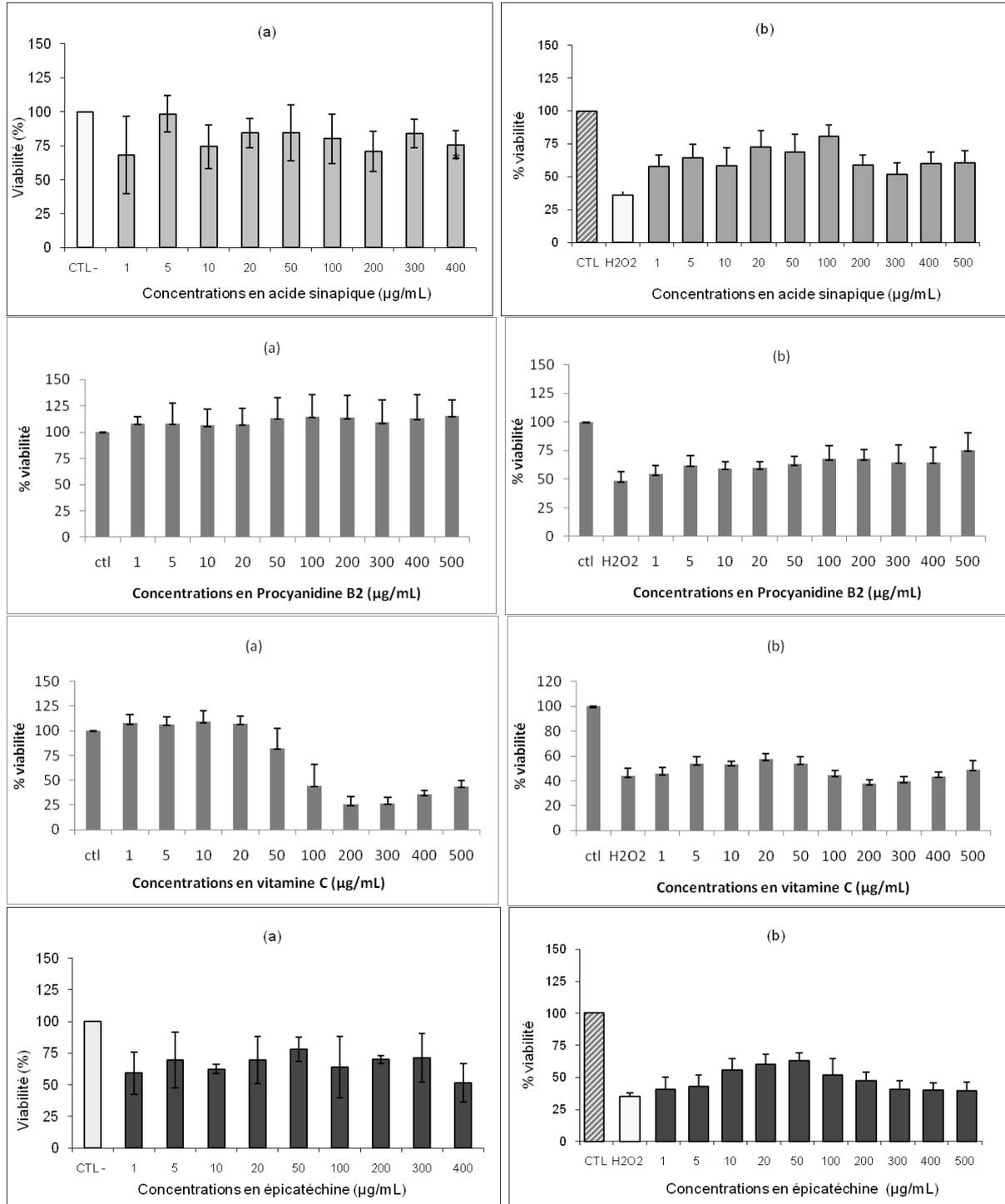
Caproate d'Ethyle	mg/l	-	-	0,2	0,2
Caprylate d'Ethyle	mg/l	-	-	0	0
Somme Alcools totaux	mg/l	-	-	102,7	118,9
Somme Esters	mg/l	-	-	16,9	21,3
Volume d'alcool EBC	%	-	-	4,68	4,59
Viscosité A 20 °C	c.p.	1,5	1,44	-	-
Diacétyle + Précurseurs	ppb	-	-	21	10
2,3 Pentanedione + Précurseurs	ppb	-	-	6	4

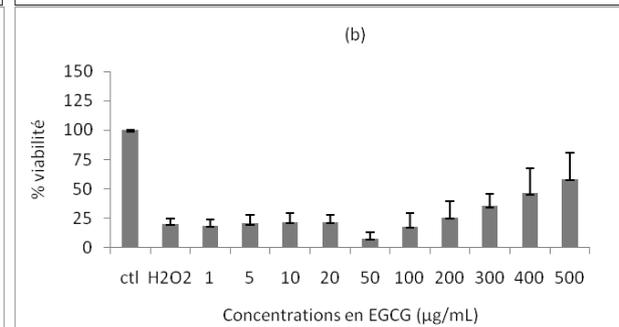
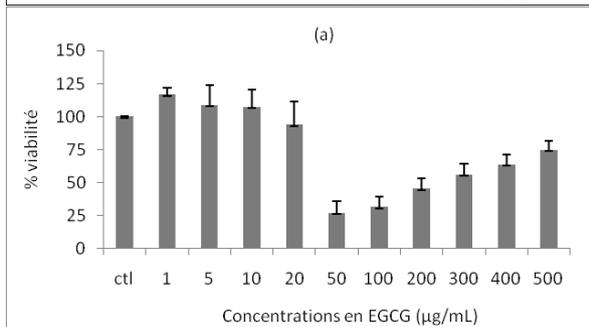
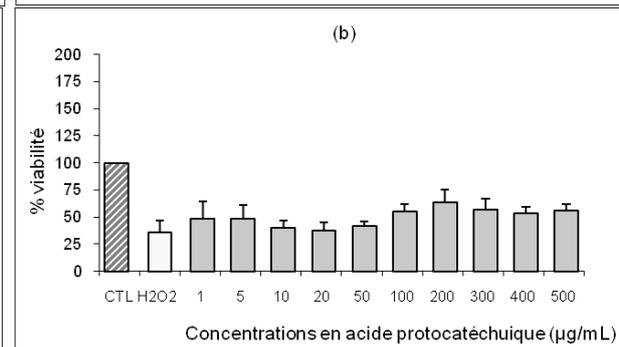
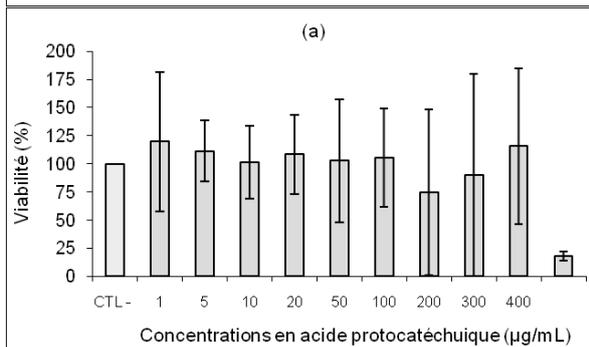
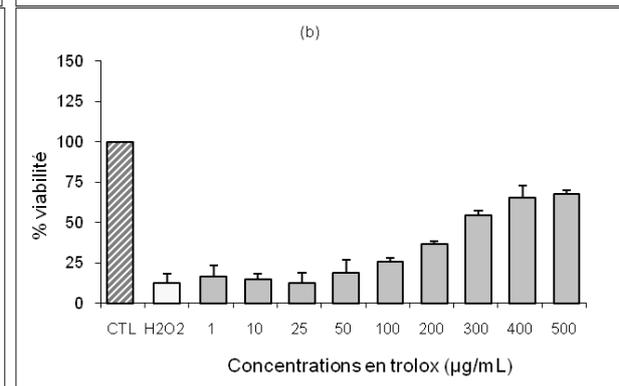
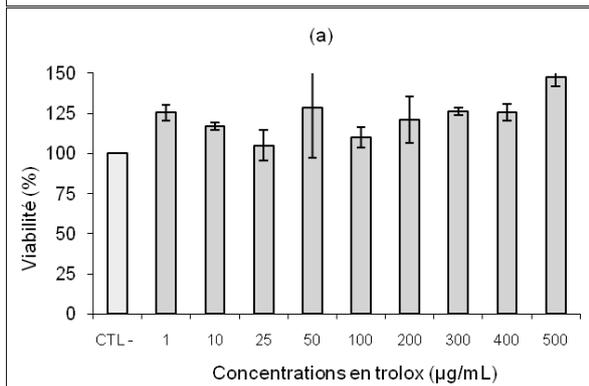
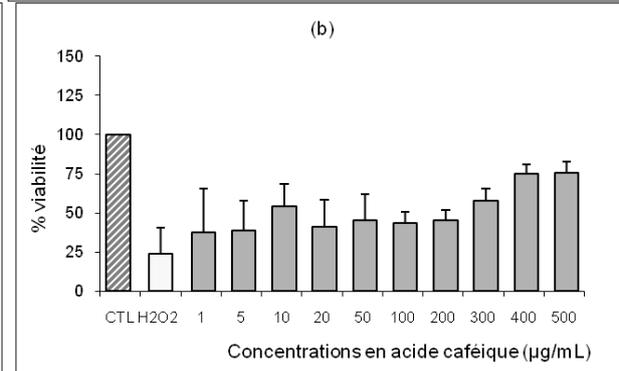
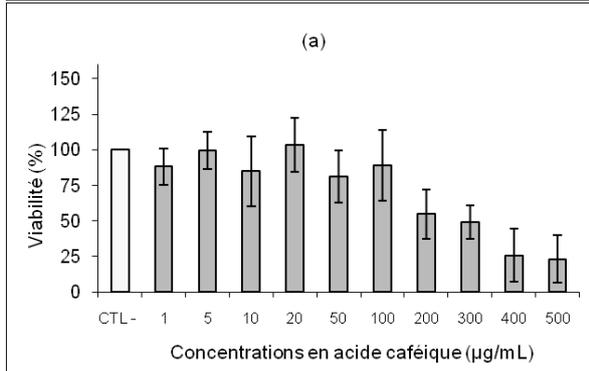
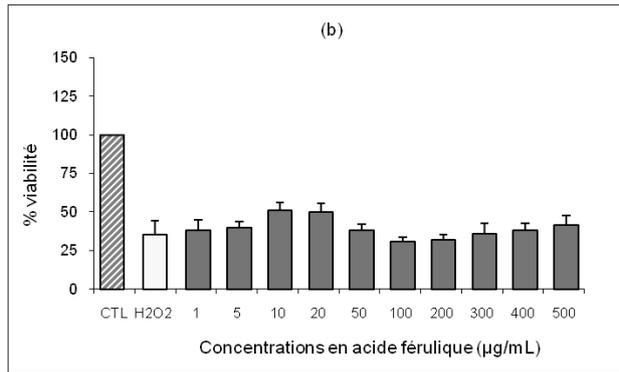
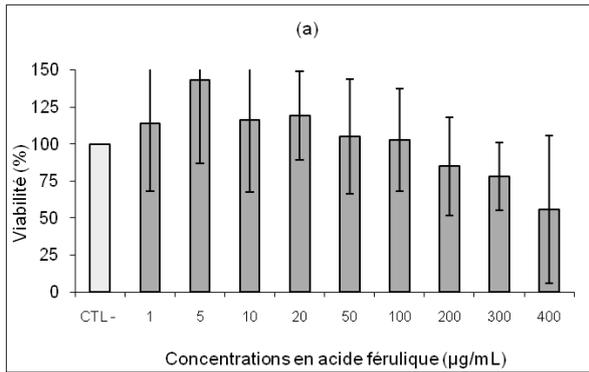
Annexe 2

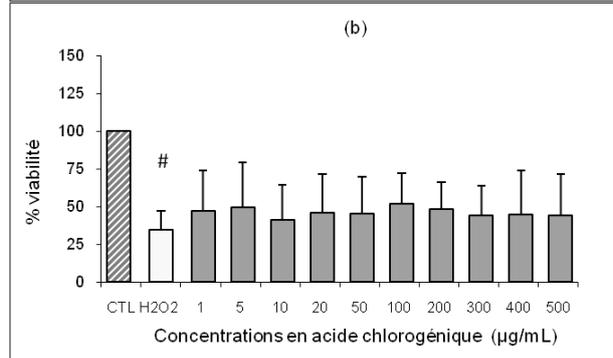
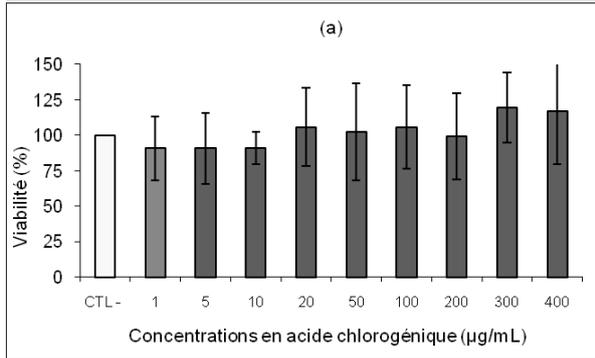
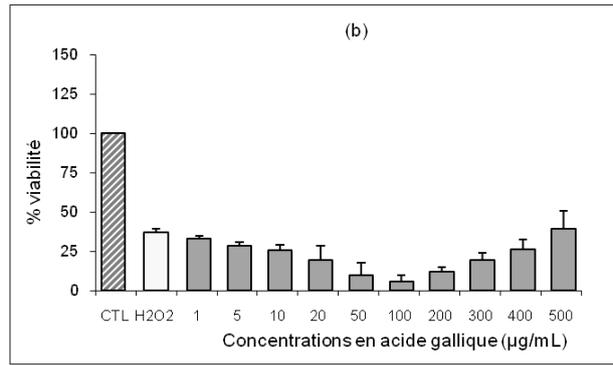
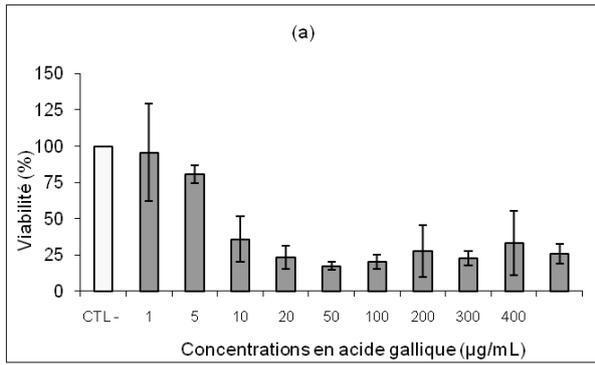
Composition	unités	Bière témoin	Bière décolorée
Fructose	g/dl	0,05	0,05
Glucose	g/dl	0	0
Saccharose	g/dl	0,02	0,02
Maltose	g/dl	0	0
Maltotriose	g/dl	0,04	0,04
Somme Sucres Fermentescibles	g/dl	0,11	0,11
Somme Sucres invertis (F+G+Sa)	g/dl	0,08	0,08
Fer	mg/l	0,011	0,276
Cuivre	mg/l	0,042	0,018
Calcium	mg/l	70,67	71,88
Magnesium	mg/l	90,5	91,4
Potassium	mg/l	618	623
Sodium	mg/l	15,7	16,8
Zinc	mg/l	0,02	0,05
Couleur	EBC	7,8	0,4
Composés Phénoliques Totaux	mg/l	244	16
Flavonoïdes	mg/l	43,7	0,3
Azote Total	mg/dl	81,9	42,4
Azote Amine Libre	mg/l	143,3	124,1
pH		4,64	4,32
Acétaldéhyde	ppm	3,8	4,8
Ethylacétate	mg/l	21,3	19,5
Propanol	mg/l	11,1	10,8
Isobutanol	mg/l	13,4	13,1
Isoamylacétate	mg/l	2,5	0,3
Alcool Iso Amylique	mg/l	65,2	54,3
Caproate d'Ethyle	mg/l	0,2	0
Caprylate d'Ethyle	mg/l	0	0
Somme Alcools totaux	mg/l	89,7	78,2
Somme Esters	mg/l	24	19,8
Volume d'alcool EBC	%	5,58	5,56
Diacétyle	ppb	51	52
2,3-Pentanedione	ppb	82	66

Annexe 3 :

Effet des différents composés sur la viabilité des cellules β du pancréas ($n = 3$) en absence (a) et en présence de H_2O_2 à $40 \mu M$ ($n = 3$).







Liste des abréviations

ABTS :	radical 2, 2-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate)
ADN :	acide désoxyribonucléique
AOx :	antioxydant
CEED :	centre européen d'étude du diabète
CIFRE :	convention industrielle de formation par la recherche
HPLC :	chromatographie liquide à haute performance
DPPH :	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
EBC :	european brewing convention
EDTA :	acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGCG :	épigallocatechine gallate
EH :	extrait de houblon
EHB :	extrait de houblon bouilli
EM :	extrait de malt
EMB :	extrait de malt brassé
EMBB :	extrait de malt brassé et bouilli
EMBBH :	extrait de malt brassé, bouilli et houblonné
ESI :	source d'ionisation electrospray
MS :	spectrométrie de masse
PBS :	phosphate buffered saline
PVPP :	polyvinylpolypyrrolidone
SPE :	solid phase extraction
TOD :	tank out door

Publications et communications scientifiques

Publications:

- ✓ Thomas Louveau, Celine Leitao, Sol Green, Cyril Hamiaux, Benoît van der Rest, Odile Dechy-Cabaret, Ross G. Atkinson, Christian Chervin, **Predicting the substrate specificity of a glycosyltransferase implicated in the production of phenolic volatiles in tomato fruit**. 2011, *FEBS Journal*, 278, 390–400.
- ✓ Céline Leitao, Eric Marchioni, Martine Bergaentzlé, Minjie Zhao, Luc Didierjean, Behnam Taidi, Saïd Ennahar, **Effects of the processing steps on the polyphenolic content and the antioxidant activity of beer**. 2011, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (4), 1249-1255.
- ✓ Céline Leitao, Eric Marchioni, Martine Bergaentzlé, Minjie Zhao, Luc Didierjean, Saïd Ennahar, **Comparison of the polyphenolic content and the antioxidant activity of barley and malt and study of the impact of brewing process on the total antioxidant activity**. En rédaction.

Communication par oral:

- ✓ Céline Leitao, **Study of polyphenolic profiles and antioxidant activity of beer**. “Symposium and Workshop on Polyphenols”, 26 mai 2010, Copenhagen (Danemark).

Communications par affiche:

- ✓ Céline Leitao, Eric Marchioni, Martine Bergaentzlé, Minjie Zhao, Luc Didierjean, Behnam Taidi, Saïd Ennahar, **Effects of process on the polyphenolic profiles and antioxidant activity of beer**. “5th International Conference on Polyphenols Applications”, 29-30 octobre 2009, Saint Julian (Malte).
- ✓ Céline Leitao, Eric Marchioni, Martine Bergaentzlé, Minjie Zhao, Luc Didierjean, Behnam Taidi, Saïd Ennahar, **Chromatographic detection of antioxidant compounds during beer processing**. “25th International Conference on Polyphenols”, 24-27 août 2010, Montpellier (France).

Etude de composés à intérêts technologiques et fonctionnels dans la bière

Résumé : L'objectif de ce travail était de développer une boisson maltée originale qui se différencierait des produits existants sur le marché par ses propriétés organoleptiques, notamment par son aspect incolore ou l'ajout de couleurs vives et par la mise en évidence de ses propriétés nutritionnelles et fonctionnelles. Une décoloration avec du charbon actif en poudre a permis d'obtenir une bière décolorée qui pourra aboutir à un produit aux couleurs originales. Le travail s'est poursuivi par l'étude des propriétés bénéfiques pour la santé des composés phénoliques de la bière, représentées par leur activité antioxydante. Le radical ABTS^{•+} a été utilisé en post-colonne d'un système CLHP afin d'identifier les composés phénoliques et de déterminer leur activité antioxydante. Ceci a permis de comparer directement et simultanément l'activité de douze composés phénoliques. Cette méthode a ensuite été appliquée à la bière afin de suivre l'évolution des composés phénoliques et leur activité antioxydante correspondante au cours du procédé de fabrication (maltage, brassage, ébullition, houblonnage et fermentation). Nous avons déterminé que, contrairement à l'activité antioxydante, la teneur en composés phénoliques évolue au cours du procédé de fabrication.

Mots-clés : bière, composés phénoliques, couleur, activité antioxydante, chromatographie liquide.

Study of technologic and functional interest compounds in beer

Abstract: The aim of this work was to develop an original malted beverage which was different by its organoleptic properties, including its colorless appearance or brightly colors addition and its nutritional and functional properties. Decoloration with active carbon powder produced a decolored beer which could give a product with original colors. This work continued through the study of the health benefits of beer phenolic compounds, i.e. their antioxidant activity. The radical ABTS^{•+} was used post-column in an on-line HPLC method for the identification of phenolic compounds and the determination of there antioxidant activity. This method allowed comparing directly and simultaneously the antioxidant activity of twelve compounds. The method was then applied to beer in order to follow the evolution of phenolic compounds and their corresponding antioxidant activity during the process (malting, brewing, boiling, hopping and fermentation). Thus, contrary to the antioxidant activity, variations were determined in the phenolic content during the process.

Keywords: beer, phenolic compounds, color, antioxidant activity, liquid chromatography.