

3.7.6
1972
117
N°d'ordre: 132

50376

1972

117

MEMOIRE

présenté à l'Université des Sciences et Techniques de Lille
pour l'Obtention du grade de Docteur Ingénieur

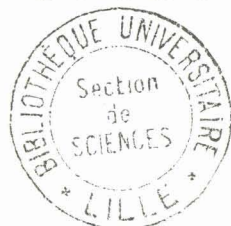
par

Jean Paul HEBERT

Ingénieur ESBMBA

Chef de Travaux à l'ENSIAA

Contribution à l'étude de la mousse de bière



Procédés de fractionnement d'une entité mousse positive

Présenté le 18 Octobre 1972
devant la Commission d'Examen

MM J. MONTREUIL

R. SCRIBAN

Melle G. SPIK

MM G. BISERTE

L. DUPONT (UGBF)

Président

Rapporteur

Examineur

Examineur

Membre Invité

Ce travail de recherche a été réalisé sous la direction de Monsieur René SCRIBAN, dans les Laboratoires de la Chaire de Malterie Brasserie de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires (Centre de DOUAI - 59509), en liaison avec Monsieur J. MONTREUIL, Professeur de Chimie Biologique à l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I.

Il a pu être entrepris grâce au concours financier de l'Union Générale Nationale des Syndicats de la Brasserie Française que nous remercions tout particulièrement, en la personne de son Président, Monsieur J. HATT, et de son secrétaire général, Monsieur P. FALCIMAIGNE.

A la mémoire de ma Mère,

A mon Père,

A tous les Miens.

A Monsieur R. SCRIBAN, Directeur de la Chaire de Malterie
Brasserie à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et
Alimentaires, en témoignage de notre respectueuse gratitude pour les
conseils et encouragements indispensables à l'aboutissement de ce
travail.

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL, Professeur de Chimie
Biologique à la Faculté des Sciences et des Techniques de LILLE, en
reconnaissance de sa bienveillante attention et de son intérêt porté
à notre recherche.

A Monsieur E. JAKUBCZAK, Maître Assistant à l'ENSIA, Chef de
Service de Biochimie Microbienne au Centre d'Etudes et de Recherches
Technologiques des Industries Alimentaires, qui nous a enseigné
notre métier de chercheur, en gage de notre estime.

A Mademoiselle G. SPIK, Maître de Conférences au Laboratoire de
Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille, toujours
disponible pour nous conseiller, en remerciement.

A Monsieur G. BISERTE, Professeur de Biochimie pathologique à
la Faculté de Médecine de Lille, qui nous a fait l'honneur d'accepter
de juger notre travail.

A Monsieur L. DUPONT, qui nous a fait l'honneur de représenter
l'UNION GENERALE DES SYNDICATS DE LA BRASSERIE FRANCAISE. Sans
l'appui des Industriels, cette recherche n'aurait pas pu être entre-
prise.

A Mademoiselle B. STROBBEL, pour sa précieuse
collaboration technique.

Qu'elle trouve ici l'expression de nos
remerciements et de notre sympathie.

UNIVERSITE DE LILLE - FACULTE DES SCIENCES

DOYENS HONORAIRES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. ARNOULT, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, DEHEUVELS, DEHORNE
DOLLE, FLEURY, P. GERMAIN, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE,
LELONG, Mme LELONG, MM. MAZET, MICHEL, NORMANT, PAUTHENIER, ROIG,
ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKY, CORDONNIER, PARISELLE.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie et Calcul Numérique
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	I.U.T. Lille
M. BLOCH Vincent	Psychophysiologie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Industrielle
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques
M. DEDECKER Paul	Mathématiques
M. le Doyen DEFRETIN René	Directeur du Laboratoire de Biologie Maritime de Wimereux
M. DEHORS	Automatique
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Animale
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique des Fluides
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LIEBAERT	I.U.T. Lille
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. MORIAMEZ Michel	I.U.T. Valenciennes
M. MARTINOT LAGARDE	Mécanique des Fluides
M. PEREZ Jean-Pierre	Physique
M. PHAM MAU QUAN	Mathématiques
M. POUZET Pierre	I.U.T. Lille
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Mathématiques
M. TILLIEU Jacques	Physique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Minérale Appliquée E.N.S.C.I.
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WATERLOT Gérard	Géologie et Minéralogie
M. WERTHEIMER Raymond	Physique

PROFESSEURS_A_TITRE_PERSONNEL

M. BENABOU Jean	Mathématiques
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. LEBRUN André	C.U.E.E.P.
M. PARREAU Michel	Mathématiques
M. SAVARD Jean	Chimie Générale
M. SCHALLER François	Biologie Animale
M. SCHILTZ René	Physique

PROFESSEURS_SANS_CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BODART Marcel	Biologie Végétale
M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique et Minérale 1er Cycle
M. DERCOURT Jean-Michel	Géologie et Minéralogie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GUILLAUME Jean	Biologie Végétale
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique
M. LINDER Robert	Biologie Végétale
Melle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Minérale Appliquée
M. PROUVOST Jean	Géologie et Minéralogie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques

MAITRES_DE_CONFERENCE (et chargés de fonctions)

M. ABBAR	I.U.T. Amiens
M. AUBIN Thierry	Mathématiques Pures
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BILLARD Jean	Physique
M. BKUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLET Pierre	Physique
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BRIDOUX Michel	I.U.T. Béthune
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Calcul Numérique
M. CHOQUET Marcel	I.U.T. Lille
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COULON Jean-Paul	Electrotechnique
Mme DRAN Raymonde	Chimie Organique
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GRUSON Laurent	Mathématiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD de la MARRE Pierre	Calcul Numérique
M. JOLY	Biologie Animale
Melle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie Générale
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANDAIS Jean	Chimie Organique
M. LAURENT François	Automatique
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques

Mme LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LEROY Jean-Marie	E.N.S.C.L.
M. LEROY Yves	I.U.T. Lille
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. MAES Serge	Physique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Sciences Appliquées
M. MONSIGNY Michel	Chimie Biologique
M. MONTEL Marc	Physique
M. MONTUELLE Bernard	I.U.T. Lille
Mme MORIAEZ BOILLET Claude	I.U.T. Valenciennes
M. NICOLE Jacques	E.N.S.C.L.
M. PANET Marius	Electrotechnique
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Fernand	Mécanique des Fluides
M. PONSOLLE	C.S.U. Valenciennes
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY	Radioélectrique
M. ROOS Philippe	I.U.T. Lille
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SAADA Georges	Physique
M. SAIMER Georges	Electronique
M. SMET Pierre	Physique
M. SEQUIER Guy	I.U.T. Béthune
M. THOMAS Daniel	C.S.U. Valenciennes
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Mathématiques

S O M M A I R E

	<u>Page</u>
INTRODUCTION	1
GENERALITES	
1° - LA MOUSSE DE LA BIÈRE	3
2° - LES PROTEÏNES ET LES "GLYCOPROTEÏNES EN LIAISON AVEC LA MOUSSE DE LA BIÈRE	18
3° - CONCLUSIONS	39
TRAVAUX PERSONNELS	
1° - PREPARATION DU MATERIEL D'ETUDE	41
2° - ETUDE D'UNE FRACTION BRUTE MOUSSE POSITIVE	49
3° - FRACTIONNEMENT DE L'ENTITE MOUSSE POSITIVE X	90
4° - FILIATION ENTRE DES CONSTITUANTS DE L'ENTITE MOUSSE POSITIVE X ET DES CONSTITUANTS DE L'ORGE	131
5° - INCIDENCES DE LA PASTEURISATION EN PRESENCE D'ENZYMES PROTEOLYTIQUES SUR L'ENTITE MOUSSE POSITIVE X	141
CONCLUSIONS GENERALES	147

PLAN

INTRODUCTION

GENERALITES

1° - LA MOUSSE DE LA BIÈRE

11 - CRITERES D'APPRECIATION DE LA MOUSSE p. 4

11.1 - La stabilité (Foam duration)

11.2 - Evaluation du collant de la mousse

11.3 - Conclusion

12 - INFLUENCE DES FACTEURS TECHNOLOGIQUES SUR LES QUALITES DE MOUSSE p. 7

12.1 - Maltage

12.2 - Brassage

12.3 - Fermentation

12.4 - Le phénomène de giclage (gushing)

12.5 - Améliorants synthétiques

13 - NATURE PHYSICOCHIMIQUE DE LA MOUSSE p.12

13.1 - Définition

13.2 - Classification

13.3 - Structure

13.4 - Inhibition

14 - ETUDES DES COMPOSES JOUANT UN ROLE VIS-A-VIS DE LA MOUSSE

p. 15

- 14.1 - Les mélanoidines
- 14.2 - Les lipides
- 14.3 - Les gommes et les glucanes
- 14.4 - Les protéines et les glycoprotéines

2° - LES PROTEINES ET LES " GLYCOPROTEINES "
EN LIAISON AVEC LA MOUSSE DE LA BIERE

21 - LES PROTEINES ET " GLYCOPROTEINES " DE LA BIERE

p. 19

- 21.1 - Généralités
- 21.2 - Historique des recherches
 - *Travaux de SCALLET et al 1953*
 - *Travaux de DAVIES et al 1956*
 - *Travaux de PIERCE et PURSELL 1959*
 - *Travaux de HARRIS et ANDERSON 1963)*
1966)
 - *Travaux de SIMMONDS 1966*
 - *Travaux de LEACH 1969*
- 21.3 - Le problème de la mousse en liaison avec le trouble colloïdal de la bière
 - *Généralités*
 - *Travaux de SAVAGE et al 1971*
 - *Travaux de GRABAR et al 1971*
 - *Conclusion*
- 21.4 - Conclusion

22 - PROTEINES ET " GLYCOPROTEINES " DES CEREALES UTILISEES
DANS LA FABRICATION DE LA BIERE

p. 34

- 22.1 - Généralités - Les glycoprotéines végétales
- 22.2 - Les glycoprotéines du blé, du maïs
- 22.3 - Les glycoprotéines de l'orge
- 22.4 - Conclusion

3° - CONCLUSIONS

p. 39

TRAVAUX PERSONNELS

p. 41

1° - PREPARATION DU MATERIEL
D'ETUDE

11 - MATERIEL

p. 41

11.1 - Bière Normale

11.2 - Bière Pur Malt

12 - METHODES

p. 42

12.1 - Détermination de la composition centésimale des protéines

12.2 - Dosage des Isohumulones

12.3 - Dosage des polyphénols

13 - RESULTATS

p. 43

13.1 - Conservation de la bière

- *Concentration par évaporation sous CO₂*

- *Lyophilisation*

13.2 - Préparation de bière de mousse

- *Généralités*

- *Méthode*

13.3 - Caractéristiques des bières de mousse

13.4 - Conclusion

2° - ETUDE D'UNE FRACTION BRUTE
MOUSSE POSITIVE

21 - PREPARATION D'UNE FRACTION ADIALYSABLE DE LA BIÈRE p. 49

21.1 - Matériel

21.2 - Préparation de fractions adialysables de la bière

- *Fractionnement original d'ANDERSON*

- *Fractionnement dérivé de la méthode d'ANDERSON*

22 - CARACTERISTIQUES PHYSIQUES DE LA FRACTION X p. 51

22.1 - Aspect physique

22.2 - Estimation du pouvoir moussant

- *Test E.N.S.I.A.*

- *Résultats*

23 - CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DE LA FRACTION X p. 53

23.1 - Méthodes

- *Méthodes générales d'analyses*

- *Dosage spécifique du glucose*

- *Dosage colorimétrique de pentoses en présence d'une grande quantité de glucose*

23.2 - Résultats : Composition chimique de la fraction X

- *Composition protéique*

- *Composition glucidique*

- *Nature non glycoprotidique de la fraction X*
- *Molécules adsorbées*

23.4 - Conclusion

24 - CARACTERISTIQUES ELECTROPHORETIQUES DE LA FRACTION X p. 62

24.1 - Introduction

24.2 - Electrophorèses classiques

- *Electrophorèse sur papier*
- *Electrophorèse sur gélose*
- *Electrophorèse sur gel de polyacrylamide*
- *Electrophorèse en acétate de cellulose*

24.3 - Electrofocalisation en gel de polyacrylamide

- *Introduction*
- *Principe de l'électrofocalisation en gel de polyacrylamide*
- *Mode opératoire : Constitution du gel*
- *Conduite de l'électrophorèse*
- *Résultats*
 - *gradient de pH*
 - *Visualisation des fractions*
- *Observation directe*
- *Coloration des substances P.A.S. positives*
- *Coloration des protides*
- *Coloration double : P.A.S. et Bleu Coomassie*
- *Conservation des gels électrofocalisation*
- *Conclusion*

25.1 - Introduction - Préparation des immunsérums

25.2 - Caractéristiques de la fraction X par immunodiffusion

25.3 - Caractéristiques immunoelectrophorétique de la fraction
X

- *Résultats*

25.4 - Dosages quantitatifs de la fraction X par des méthodes
immunologiques

- *Techniques utilisées*

- *Résultats*

25.5 - Conclusion.

3° - FRACTIONNEMENT DE L'ENTITE

MOUSSE POSITIVE X

31 - FRACTIONNEMENT DE L'ENTITE MOUSSE POSITIVE X PAR TAMISAGE

MOLECULAIRE

p. 91

- 31.1 - Introduction
- 31.2 - Mode opératoire
- 31.3 - Résultats

32 - FRACTIONNEMENT DE L'ENTITE MOUSSE POSITIVE X PAR CHROMATOGRAP-

PHIE D'ECHANGES D'IONS

p. 97

- 32.1 - Introduction
- 32.2 - Mode opératoire
- 32.3 - Résultats
- 32.4 - Conclusion

33 - FRACTIONNEMENT DE L'ENTITE MOUSSE POSITIVE X PAR ELECTROPHORESE

PREPARATIVE

p.105

- 33.1 - Principe
- 33.2 - Mode opératoire
- 33.3 - Résultats
- 33.4 - Conclusion

34 - FRACTIONNEMENT DE L'ENTITE MOUSSE POSITIVE X PAR ELECTROFOCA-

LISATION

p.113

- 34.1 - Introduction
- 34.2 - Etude préliminaire : Electrofocalisation à blanc

34.3 - Electrofocalisation d'un moût dialysé

- *Matériel d'étude*
- *Expérimentations*
- *Résultats et conclusions*

34.4 - Electrofocalisation de la fraction X

- *Matériel et méthode*
- *Résultats*
- *Etude de fractions issues de l'électrofocalisation de l'entité mousse positive X*
- *Electrofocalisation préparative de composés issus de la fraction X*

34.5 - Conclusions

4° - FILIATION ENTRE DES CONSTITUANTS
DE L'ENTITE MOUSSE POSITIVE X
ET DES CONSTITUANTS DE L'ORGE

41 - MATERIEL ET METHODES

p. 131

41.1 - Matériel

- *Entité mousse positive*
- *Extrait d'orge*

41.2 - Méthodes

- *La gel électrofocalisation avec raccordement
d'arcs*
- *L'analyse d'acides aminés des fractions*
- *Méthodes immunologiques*

42 - RESULTATS

p. 134

42.1 - Gel électrofocalisation avec raccordements d'arcs

42.2 - Analyses des Acides Aminés des fractions

42.3 - Analyses immunologiques

43 - CONCLUSIONS

p. 138

5° - INCIDENCES DE LA PASTEURISATION
EN PRESENCE D'ENZYMES PROTEOLYTIQUES
SUR L'ENTITE MOUSSE POSITIVE X.

- 51 - INTRODUCTION p. 141
- 52 - PASTEURISATION DE TYPE INDUSTRIEL p. 142
- 52.1 - Matériel et Méthodes
- *Matériel*
 - *Méthodes*
- 52.2 - **Résultats**
- 53 - PASTEURISATION EXPERIMENTALE DANS DES CONDITIONS DE SURACTIVITE
ENZYMATIQUE p. 143
- 53.1 - Mode expérimental
- 53.2 - Résultats
- 53.3 - Conclusion

CONCLUSIONS
GENERALES

p. 147

INTRODUCTION -

Le thème général de notre travail de recherche s'intitule
LE PROBLEME DE LA MOUSSE DE LA BIÈRE.

La bière est un liquide biologique complexe dérivant de la fermentation d'un jus sucré : LE MOUT. Ce moût aromatisé par du houblon résulte de l'extraction du malt d'orge. La mousse de la bière constitue un équilibre physico-chimique complexe. Les auteurs pensent que cet équilibre serait la résultante de l'interaction entre des substances mousse positives et des substances mousse négatives. Ces substances proviendraient de l'orge, du houblon et de composés produits par la levure pendant la fermentation.

Pour l'industriel, la mousse présente un intérêt commercial important. Aussi les études publiées sont-elles fort nombreuses et très diverses. Toutefois, elles ont porté pour la plupart sur les aspects technologiques de fabrication de la bière. Pour tenter de résoudre ce problème que d'aucuns considèrent comme le problème n° 2 en brasserie, l'EUROPEAN BREWERY CONVENTION a créé un groupe d'étude. Ce groupe mousse associé au groupe trouble doit coordonner les recherches des différents laboratoires européens. La naissance, en 1968, de cette commission à l'échelon international, montre l'acuité et la difficulté du problème.

.../...

Dans le présent mémoire, nous exposerons l'historique des recherches en nous attachant d'abord à l'aspect pratique, puis aux recherches plus spécifiques relatives aux constituants moussants obtenus à partir de la bière. Dans la deuxième partie, nous exposerons les résultats de nos travaux personnels.

.../...

GENERALITES -

Le lecteur trouvera le développement de l'historique des recherches ayant trait au problème de la mousse de bière, dans notre mémoire publié en Mars 1971.

Nous rappellerons dans ce présent ouvrage, les publications les plus marquantes et nous détaillerons les travaux publiés entre le 1er Octobre 1970 et le 31 Décembre 1971.

1° - LA MOUSSE DE LA BIÈRE

La mousse est une des qualités essentielles de la bière, l'amateur en apprécie visuellement et olfactivement les nuances. Les brasseurs s'attachent à fabriquer une mousse blanche, fine, stable. Aussi, les recherches qui ont porté sur ce sujet sont-elles très nombreuses et il n'entre pas dans notre intention de les décrire toutes en détail. Nous renvoyons aux revues générales les plus récentes de SCRIBAN (1), COOK (2) et HUDSON (3). CURTIS (4), quant à lui, établit un parallèle entre le trouble colloïdal de la bière et la mousse.

Nous nous sommes limités à préciser les quatre aspects principaux de ces études et nous décrirons successivement :

- Les critères d'appréciation de la mousse ;
- L'influence des matières premières et des facteurs technologiques sur la qualité de la mousse ;
- La nature physico-chimique de la mousse ;
- Les composants moussants de la bière, du moût, de l'orge et du blé.

.../...

11 - CRITERES D'APPRECIATION DE LA MOUSSE

Si COOK (5) a fait le point en 1971, rappelons que KREMKOW (6) a établi, en 1969, l'historique des méthodes proposées pour apprécier les qualités de mousse. Ce large panorama établi à partir de 1913, révèle 55 références, c'est dire combien le problème est complexe et qu'aucune méthode n'est satisfaisante. Le Comité " Trouble et mousse de la bière " de l'E.B.C. est lui-même perplexe quant aux mesures à utiliser. En 1972 une méthode de référence devrait cependant résulter des travaux de cette commission, en prenant pour méthodes provisoires celles de KLOPPER (7).

Parmi les caractères à distinguer : la stabilité et le collant sont les deux facteurs principaux qui préoccupent le brasseur à côté de l'aspect visuel.

11.1 - LA STABILITE (FOAM DURATION)

Elle correspond au temps d'affaissement de la mousse dans un verre ou un appareil conventionnel.

L'appréciation de la stabilité de la mousse fait l'objet d'une très grande variété de méthodes. Aussi faut-il admettre qu'aucune n'est parfaite. Les principes de mesure peuvent se rattacher à 4 types :

- par versement (HELM (8), CARLSBERG (9), DE CLERCK (10), HARTONG (11))
- par agitation (généralement pour des comparaisons immédiates) ;
- par adjonction de poudre de verre ou de sable ;
- par injection d'un gaz extérieur.

Il faut mentionner le travail de thèse d'ISSING (12).

.../...

L'auteur n'a pas pu mettre en évidence de corrélation statistique entre des mesures physiques, (viscosité et tension superficielle) et la stabilité de la bière.

Au laboratoire industriel, la méthode par versement dans un verre, standardisée par DE CLERCK et DEJICKER (13) est fréquemment utilisée. Elle donne une idée valable de ce que l'on observe dans la pratique.

Pour les méthodes d'injection de CO_2 , le choix est alors très large. En effet, depuis que BLOM et PRIP (14) ont trouvé que le logarithme du volume de mousse s'affaissant est une fonction linéaire du temps, de très nombreux auteurs ont présenté des méthodes de mesure de stabilité. Le principe reste le même. A l'aide d'une bougie poreuse, on injecte dans des conditions standardisées du CO_2 et l'on mesure le volume de bière résultant du drainage de mousse en fonction du temps. Les méthodes les plus employées sont celles de ROSS et CLARK (15) et de GRAY et STONE (16).

Toutefois, pour apprécier la stabilité de mousse d'une bière entière ou de fractions isolées de bière, PIERCE, PURSELL (17) et LAUWERS (18), proposent une méthode physico-chimique dynamique. La stabilité de mousse est alors définie en se référant au débit gazeux nécessaire pour obtenir un équilibre, entre la formation et l'essorage de la mousse.

11.2 - EVALUATION DU COLLANT DE LA MOUSSE

Le collant ou adhérence de la mousse définit sa capacité de laisser un film de bulles collées à la paroi du verre. Au fur et à mesure de son affaissement, la mousse laisse des anneaux successifs

correspondant à chaque stade de la dégustation. Ce film de bulles serait dû à des substances rendues insolubles par oxydation de polyphénols ou par dénaturation de protéines, la formation de ce film n'est pas encore connue.

Cette qualité mal définie est évaluée à l'aide de méthodes basées sur l'observation visuelle. On apprécie à l'oeil nu les dépôts sur les parois du verre. Récemment, des américains de l'équipe de HOLSTROM (19) ont mis au point une méthode évaluant la réflectance de la mousse séchée sur une lame de microscope.

11.3 - CONCLUSION

La mousse de bière est une entité mal définie. Aussi, pour la caractériser, de très nombreuses méthodes ont été proposées. Pratiquement, trois qualités sont à connaître : l'aspect visuel, la stabilité et le collant. Les appréciations restent très subjectives. Seule la stabilité peut être " mesurée " à 5 à 10 % près.

Les méthodes actuelles de l'industrie brassicole sont des méthodes empiriques satisfaisantes pour les besoins de la pratique mais non pour les travaux de laboratoire. Seuls LAUWERS (20) et RUYSSSEN (21) ont considéré le problème d'un point de vue physico-chimique.

12 - INFLUENCE DES FACTEURS TECHNOLOGIQUES SUR LES QUALITES DE
LA MOUSSE -

Le problème de la mousse de la bière est préoccupant pour le brasseur. Pratiquement, à chaque essai technologique on détermine son incidence sur la formation et la stabilité de la mousse.

De même, lorsqu'une nouvelle technique est proposée, les protagonistes envisagent dès les premiers essais, les répercussions sur la mousse. Ainsi, le brassage à l'aide d'orge non maltée et d'enzymes a fait l'objet de nombreuses publications (HARRISON (22), BREWNZYME (23), WIEG (24), WIELSEN (25)). D'ores et déjà, il semblerait que l'utilisation d'orge crue ne nuise pas à la mousse. De même l'utilisation de sirop d'orge ne se traduit pas par des phénomènes notables sur la mousse de la bière (JENKISS (26)).

L'influence des facteurs technologiques sur les qualités de la mousse fait l'objet d'études très nombreuses. Les faits rapportés vont de l'observation courante aux expériences réalisées :

- en usines ;
- en installations semi-industrielles ;
- en micromalterie et microbrasserie.

Ces études destinées à un public de techniciens tentent d'apporter des éléments de réponse, en faisant varier un paramètre unique dans le cycle de fabrication.

Toutefois, la fabrication de la bière est liée à tant de paramètres que l'interprétation des résultats est délicate et conduit parfois à des conclusions divergentes. Des essais

.../...

systématiques en micromalterie et microbrasserie seraient à mettre en oeuvre pour obtenir des conclusions valables.

SCRIBAN (26bis) a effectué récemment une étude bibliographique dont les conclusions mettent en lumière l'influence des principales étapes de la fabrication de la bière sur les qualités de mousse. On peut les résumer de la manière suivante :

12.1 - MALTAGE

La variété d'orge, les campagnes, et surtout les conditions de culture ont une répercussion sur les qualités de mousse.

La température de germination de l'orge en malt vert n'aurait pas d'influence alors qu'une température élevée du coup de feu au touraillage améliore le moussage.

Cette amélioration s'expliquerait par la formation de mélanoidines ou par l'inhibition de peptidases.

Les auteurs KRAUSS (27) et LAUWERS (28) montrent qu'il n'existe pas de corrélation statistique entre les principaux indices de désagrégation du malt (indices KOLBACH(29) et HARTONG (30)) et les stabilités de mousse correspondantes.

12.2 - BRASSAGE

La proportion optimale de grains crus (maïs, amidon de maïs, riz) est discutée. Toutefois, les anglais BRITWISTLE, HUDSON, MAC WILLIAM (31) et les finlandais ENARI et MIKOLA (32), ont trouvé une amélioration de la mousse de brassins

.../...

expérimentaux par l'emploi d'orge non maltée, voire de blé. Mais ces études transposées à l'échelon industriel donnent des résultats variables.

- Les conditions d'empatage du malt (suspension de la farine dans de l'eau chaude) n'auraient que peu d'influence.
- La cuisson du moût et le houblonnage sont des phases importantes de la fabrication de la bière.

Un nouveau paramètre intervient alors : le houblon. Le houblonnage améliore de façon considérable la stabilité et le collant de la mousse. Comme le suggèrent ANDERSON (33) et KAMM (34) les substances amères et les tannoïdes formeraient-ils des pontages entre molécules mousse positives ?

L'influence de l'emploi total ou partiel d'extraits de houblon est étudié dans la revue générale de HAUTKE (P) et PERRICEK (D) (35).

12.3 - FERMENTATION

Le métabolisme de la levure diminue les qualités de moussage, aussi bien en fermentation haute qu'en fermentation basse. Enfin, une filtration excessive, de même que tout moussage en cours de transport, provoquent une diminution de mousse.

Il est très intéressant de noter que le traitement raisonné par des enzymes protéolytiques à des doses normales, pour prévenir les troubles colloïdaux dus à des complexes protéotanniques, n'a pas d'influence sensible sur la mousse. Les substances mousse positives seraient donc différentes de celles affectant le trouble au froid de la bière.

12.4 - LE PHENOMENE DE GICLAGE

Le giclage est une maladie de la bière. Il se traduit par un débordement intempestif de la bière à l'ouverture de la bouteille, on parle aussi de bière sauvage. D'après RUDIN (35) et GJERSTEN (36) des ions Ni en excès induisent ce phénomène. A la suite d'accidents nombreux en 1964, les danois GJERSTEN, TROLLE et ANDERSEN (37) ont incriminé la récolte de l'orge pour expliquer le gushing. La microflore de l'orge et principalement une moisissure du genre *fusarium* sont responsables du giclage. Ces conclusions sont en accord avec celles de CURTIS (38) et des japonais de la Société KIRIN (39). Des produits de dégradation du houblon auraient un rôle anti-giclage pour GJERSTEN (40). Mais le rapport annuel 1970 de la BREWING INDUSTRY RESEARCH FOUNDATION, signale que la maladie du gushing pourrait provenir des substances dérivées des résines du houblon, notamment dans les extraits commerciaux isomérisés (41).

Cette dernière constatation souligne l'influence des différentes matières premières intervenant dans la fabrication de la bière, et rend compte de la complexité du problème posé par la mousse de la bière. Il ressort de ces études que l'obtention de la mousse et les qualités de celle-ci résultent d'un équilibre entre substances antagonistes agissant à dose infime. Le problème serait donc essentiellement d'ordre qualitatif ; il faut différencier les substances à action bénéfique et les substances à action inhibitrice vis-à-vis de la mousse.

12.5 - AMELIORANTS SYNTHETIQUES

En 1967, KLEBER (42) a dressé une revue très générale des améliorants synthétiques ; ils sont très nombreux mais leur usage est interdit en France.

A la suite des travaux de LUYKX et al (43), on connaît bien le rôle des ions Co et Ni. RUDIN (44) précise que ces sels n'ont d'effet qu'en présence d'isohumulones apportées par le houblon en donnant des chélatés. Toutefois une trop forte concentration de Ni induirait le phénomène de giclage.

Outre les ions métalliques Fe, Co, Ni situés dans la 8ème colonne côte-à-côte de la classification périodique des éléments, signalons l'emploi d'alginate, d'agar agar (RAIBLE (45)), de polyéthylène oxyde (RUCH et al (46)). SUNTRUP (47) fait une comparaison de ces améliorants synthétiques et envisage aussi le rôle néfaste de divers agents de nettoyage. WINTER (48) étudie les améliorants très efficaces que sont les propylène glycol alginates.

A côté de ces artifices " classiques " signalons les récents brevets américains : l'un préconise le traitement du malt avant touraillage par de la gomme arabique, l'autre recommande l'emploi de produits obtenus par hydrolyse à 100°C des drêches de malt et de houblon, (KURTH MALTING and Co, KAMM (49)), Enfin, d'après BRENNER et al (50), l'addition de mélanges de sulfate de zinc et d'alginate, contribuerait à améliorer le collant. Le rôle exact de tous ces adjuvants n'est pas connu.

13 - NATURE PHYSICOCHEMIQUE DE LA MOUSSE

13.1 - DEFINITION

Une mousse est une dispersion d'un gaz dans un liquide. Elle résulte de l'équilibre instable de plusieurs facteurs physiques et chimiques.

La mousse de bière est formée de bulles de gaz carbonique limitées par un film de matières tensioactives, donc de faible tension superficielle. La saturation de la bière définit la teneur en CO_2 dissous, comprise entre 4,5 et 5,5 g/l. Elle joue un rôle prépondérant vis-à-vis de la formation de la mousse. La rétention du CO_2 a fait l'objet d'une revue d'ensemble par ANDERSON (J.H) (51) Deux théories sont émises. KIEKENS (52) pense que le CO_2 a des possibilités de liaison avec des colloïdes protecteurs. Par contre GUGGENBERGER (53) et ZANGRANDRO (54) estiment que la carbonatation de la bière est un phénomène purement physique. Cette dispersion d'un gaz dans un liquide sous forme d'un entassement de bulles n'est possible que par l'action d'un agent de surface, de structure appropriée. Par adsorption de cet agent de surface, un film se constitue aux parois extérieure et intérieure d'une bulle.

Certaines propriétés physicochimiques de ce film conditionnent principalement la formation et les qualités des mousses ; citons : la tensioactivité, l'élasticité, la viscosité de surface, l'action électrostatique par les doubles couches électriques formées des deux côtés des lamelles, la dénaturation des protéines les colloïdes protecteurs.

.../...

13.2 - CLASSIFICATION

RUYSSEN (55) différencie les mousses stables, metastables, sphériques et polyédriques. Au début, la mousse de la bière est sphérique mais sous l'action de forces sur les couches lamellaires, forces qui tendent à réduire la surface externe et à égaliser les forces de tension, la mousse devient polyédrique. KAMM (56) définit un autre type de mousse à savoir la mousse " armée " ou mousse trois phases : liquide, gaz mais aussi solide. Cette phase solide est constituée de substances insolubles non mouillables. Les tan- nins pourraient jouer un rôle dans la composition d'une mousse armée.

13.3 - STRUCTURE

La mousse est un système colloïdal polydispersé et résulte de l'action de trois facteurs. SCHUSTER (57) les qualifie de :

- forces génératrices (schaumerzeugende)
- forces formatrices (schaumbildende)
- forces stabilisatrices (schaumerhaltende)

Ces composants, sous l'action de forces extérieures minimes, varient dans de larges proportions. KAMM (58) précise que l'action positive de deux substances génératrices de mousse ne s'additionne pas.

LUERS et MONINGER (59), dès 1935, ont étudié un modèle constitué de gélatine, d'alcools et de tannins. LAUWERS (60) quant à lui, prend pour modèle protéique de la β lactoglobuline. L'action

.../...

des sels métalliques est envisagée par SCHUSTER (61). Quant à DAENECKINDT et DE WACHTER (62) ils étudient l'influence du pH et de la force ionique sur la stabilité de mousse. Pour SUNTRUP (63) le pouvoir moussant d'une substance est soit total, soit limité selon que le passage d'un gaz divisé induit la transformation totale ou non du liquide en mousse.

13.4 - INHIBITION

Dès que la concentration de l'inhibiteur atteint une valeur critique, les molécules des agents moussants sont expulsées des couches superficielles et totalement remplacées par les molécules de l'inhibiteur. DAENECKINDT et DE WACHTER (64) déterminent l'inhibition induite par les produits volatils et les fractions lipidiques.

Comme pour les substances mousse positives, les substances inhibitrices de la mousse agissent à dose infime, et leurs actions résultent d'interactions complexes. Nous sommes là aussi, en face d'un problème qualitatif.

14 - ETUDES DES COMPOSES JOUANT UN ROLE VIS-A-VIS DE LA MOUSSE

De nombreuses substances sont impliquées dans la formation et la stabilité de la mousse. KLEBER et al (64 bis) en donne une revue générale en 1972.

14.1 - LES MELANOÏDINES

La formation de mélanoidines résulte de la combinaison d'un acide aminé et d'un sucre, lors de la réaction de MAILLARD. Très importante pour les produits alimentaires ayant subi un chauffage, cette réaction de brunissement a été étudiée d'un point de vue général par CAMPAGNE (65), MARKUSE (66), HOLTERMAND (67) et HODGE (68). Des études technologiques (KAISER (69), DWORSCHACK (70), MALZEN et al (71)), rattachent la formation de mélanoidines, aux diverses étapes de la fabrication du malt et de la bière. Le touraillage du malt à 85°C lors du coup de feu et la cuisson du moût lors du houblonnage jouent des rôles prépondérants.

Le rôle des mélanoidines sur la formation de la mousse est discuté. Pour PETIT (71 bis), elles induisent peu de mousse alors que pour CAMPAGNE (72), leur influence n'est pas négligeable. Notons, toutefois qu'une bière brune brassée à l'aide de malt brun a une mousse blanche.

14.2 - LES LIPIDES

La question des lipides est très discutée, elle a fait l'objet d'une revue générale récente de BANASIK (73). Selon DELIZE (74), l'extraction des matières lipidiques donne une amélioration

considérable de la mousse. Pour KOLBACH (75), cette amélioration est minime. Quant à AYRAPAA (76), la faible teneur en matières grasses présentes n'a pas d'influence.

Le récent travail de thèse de ZURCHER (76 bis) fait le point. Le rôle néfaste vis-à-vis de la mousse des acides gras inférieurs et de leurs esters est confirmé.

Le japonais WAKAIZUMI (77) a isolé, à partir de la mousse du moût, une β Lysolécithine qui aurait une influence favorable sur la formation et la tenue de mousse. KAMIMURA (78) a poursuivi l'étude en suivant le métabolisme de cette substance. Elle est dégradée dès les premiers stades de la fermentation, et ses produits de dégradation n'ont aucune influence sur la mousse. Des auteurs Allemands, SILBEREISEN et ANTHON (79) ont étudié les phospholipides de choline du malt, du moût, de la drèche et leur influence sur la stabilité de la mousse de la bière. Contrairement aux conclusions de WAKAIZUMI (80), la stabilité de la mousse est moindre après addition dans la bière de lysolécithine ; en effet, les phospholipases interviendraient.

14.3 - LES GOMMES ET LES GLUCANES

Si l'on se réfère à GLISKMAN (81), le terme gomme, définit tout polymère, qui dissous ou dispersé dans l'eau donne des solutions visqueuses ou des dispersions. Les glucanes et gommes bien que peu étudiées pourraient jouer un rôle intéressant vis-à-vis de la mousse comme le suggèrent SCHUSTER (82), KUNDIG (83) (pour le blé) LETTERS (84) et GJERSTEN (85).

.../...

14.4 - LES PROTEINES ET LES GLYCOPROTEINES

Les protéines et les glycoprotéines sont généralement considérées comme des substances mousses positives. Nous exposons à présent en détail l'histoire de leur découverte.

.../...

2° - LES PROTEINES ET LES " GLYCOPROTEINES "
EN LIAISON AVEC LA MOUSSE DE LA BIÈRE

Depuis la célèbre première étude générale par OSBORNE (85) en 1895, les protéines de l'orge ont été très étudiées. A mesure que de nouvelles méthodes étaient utilisées pour l'étude des albumines et des globulines, leur complexité apparaissait de plus en plus grande.

Devant la multiplicité des fractions protéiques isolées, le sous-comité des protéines de l'orge de l'E.B.C. (86), dans un souci de standardisation, a publié un système de référence, qui permet de caractériser par immunoélectrophorèse, 17 fractions protéiques solubles dans l'eau, et dans une solution aqueuse de sels.

Par contre, si les protéides de l'orge et du malt sont bien connus, ceux de la bière ont été très peu étudiés, et à fortiori, les constituants protéidiques responsables de la tenue de mousse. Cette carence peut s'expliquer par la faible teneur en azote de la bière (500 mg. par litre), la bière étant avant tout un liquide glucidique.

Nous envisagerons d'abord les travaux qui ont porté sur les fractions protéidiques mousse positives de la bière, puis nous décrirons les protéides de l'orge et des autres céréales qui, de près ou de loin, peuvent être impliqués dans le problème de la mousse de bière.

.../...

21 - LES PROTEINES ET " GLYCOPROTEINES " DE LA BIÈRE -

21.1 - GENERALITES

Une remarque préliminaire s'impose. L'existence de glycoprotéines n'a pas été démontrée. Des fractions constituées de protéine, et de polysaccharide ont été mises en évidence, mais leur homogénéité n'a pas été démontrée et une liaison glycanne-protide n'a pas été caractérisée. C'est pourquoi, le mot glycoprotéine sera écrit désormais entre guillemets.

21.2 - HISTORIQUE DES RECHERCHES

1° - En 1953, SCALLET, STANSBREY, SMALL et GIBBS (87) sont les premiers chercheurs qui aient isolé de la *bière* des composés protéidiques, et qui aient envisagé leurs rôles vis-à-vis de la mousse. Par saturation à 0°C de bière de fermentation basse, à l'aide de sulfate d'ammonium, les auteurs obtiennent un extrait hydrosoluble de protéines de bière. Ces protéines qui se révèlent hétérogènes en électrophorèse en veine liquide, sont soumises alors à un fractionnement éthanologique s'inspirant de la méthode de COHN (88), utilisée pour le plasma sanguin. Les sous-fractions sont alors étudiées en électrophorèse en veine liquide, et en ultracentrifugation. Elles s'y révèlent hétérogènes. Les caractéristiques de ces fractions sont rassemblées dans le tableau n° 1 p. 20 Les propriétés moussantes de s fractions sont illustrées par la figure 1. Des fractions protéidiques adialysables, de poids moléculaire élevé, compris entre 35 000 et 73 000 induisent donc un pouvoir moussant à la bière.

TABLEAU I

TRAVAUX DE SCALLET

FRACTIONNEMENT ET CARACTERISTIQUES
DES PROTEINES HYDOSOLUBLES DE LA BIERE

1°) Obtention d'un extrait de protéines hydrosolubles par saturation de bière à 0°C en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

2°) Fractionnement de cet extrait, en sous fractions

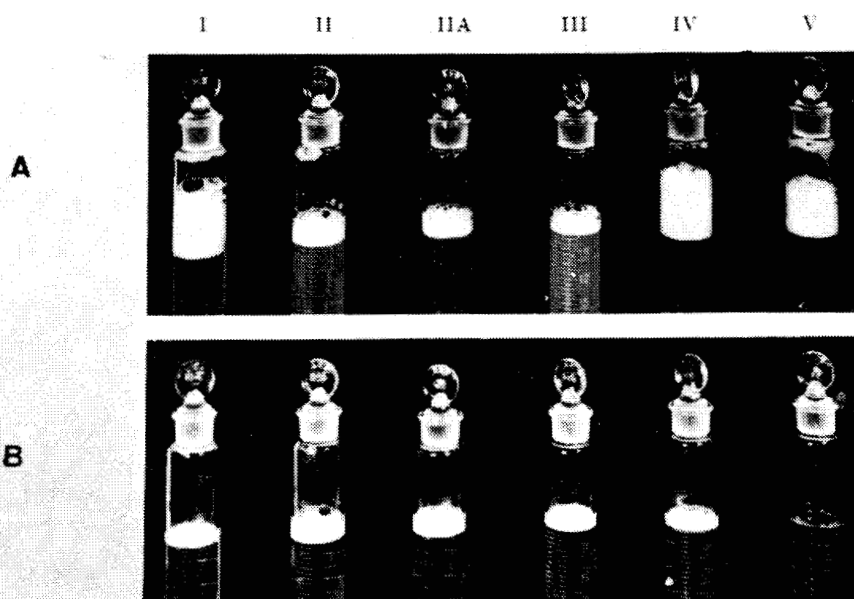
N° des Sous fractions	I	II	II _A	III	IV	V
Obtention :						
Concentration en ETOH en volume	16	(10 ⁴⁵ C)	(0 ⁴⁵ C)	60	80	a
Rendement (mg/l bière)	25	20	17	20	50	95
Azote (Kjeldahl) p 100	13	6	4	6	10	12
Soufre(Carius) p 100	1.0	0.4	0.2	Traces	1.4	1.2
Constante de sédimentation x10 ⁻¹³	1.00	1.07	1.24	1.20	1.11	
* Poids moléculaire (fiabilité 95%)	34000 ±3500	52000 ±6000	73000 ±19000	38000 ±5000	50000 ±7000	
**Mousse	1.1	1.1	0.4	1.1	1.1	3

a) Fraction V soluble dans 80% d'ETOH obtenue par dialyse et lyophilisation

* Déterminé par osmométrie

** Concentration minimale en mg dans 100 ml pour l'obtention d'une mousse stable





: Propriétés moussantes des fractions hydrosolubles de la bière

A) Formation de mousse après secouage uniforme

B) Stabilité de moussé après repos de 12 mn

Figure n°1



FIGURE n°1

TRAVAUX de SCALLET

2° - En 1956, DAVIES et al (89) à partir de produits obtenus en microbrasserie expérimentale (moût élaboré par infusion, bière de fermentation haute) ont effectué un travail de fractionnement de protéines. Dans une première série de recherches, ils (90) ont déterminé l'action d'agents précipitant les protéines : acides tannique et phosphomolybdique préconisés par LUNDIN (91), sulfate de magnésium et acétate d'uranium utilisés par MYRBACK (92). DAVIES (93) a substitué aux techniques précitées jugées trop brutales, la méthode de COHN (94) modifiée par SCHMID (95) pour étudier le pouvoir moussant des fractions protéiques. Il a utilisé des solutions d'éthanol à 20 %, en présence d'acétate de sodium ou de zinc, à concentration variable, de pH compris entre 5,8 et 9,0 à des températures de 0°C ou - 5°C. Après précipitation chimique isolant 6 fractions le surnageant est passé sur un couple d'échangeur d'ions Amberlite IR 120 et Amberlite IR 4 B. Il a obtenu au total 9 fractions dont les pouvoirs moussants sont étudiés selon la technique de RUDIN (96). Les 6 fractions, obtenues par précipitation chimique, contiennent entre 20 et 49 % de protéines non dialysables et toutes des glucides. Elles sont toutes mousse positives. Quant aux fractions éluées des résines échangeuses d'ions, elles ne jouent aucun rôle vis-à-vis de la mousse. Les sous-fractions I à VI ont une activité moussante dans le moût non houblonné, dans le moût houblonné et également dans la bière correspondante. Elles proviennent vraisemblablement du malt et de l'orge. En utilisant directement, sur le moût et la bière, les conditions expérimentales nécessaires à l'obtention de la fraction VI (Ethanol 20 % en volume, - 5°C, pH 9, 0 AcNa 0,02 M, Zn Cl₂ 0,02 M) on concentre en une seule fraction les facteurs mousse positifs. Ils constituent moins de 14 % des solides originaux de la bière.

Les résultats de DAVIES et Coll. confirment ceux de SCALLET ; des fractions protéidiques non dialysables présentes en quantité minime sont mousse-positives, elles contiennent en outre des glucides.

3° - En 1959, les irlandais PIERCE et PURSELL (97) ont isolé des constituants mousse positifs à partir d'une bière brassée par infusion en microbrasserie. Ils ont confirmé l'importance des composés adialysables.

L'étude du pouvoir moussant est réalisée selon une nouvelle technique, mise au point par les auteurs, basée sur la vitesse de résorption de la bière. La fraction la plus mobile, brune, est la plus active vis-à-vis de la mousse. Elle constitue en poids 12 % des solides non dialysables de la bière mais contient 45 % de l'azote total.

4° - En 1963, ANDERSON et HARRIS (98) ont poursuivi les travaux de DAVIES et al (99). Ils ont utilisé la technique de gel filtration. Le matériel de départ dénommé fraction X est obtenu par fractionnement à 0°C de bière de fermentation haute à l'aide d'éthanol 80 % contenant de l'acétate de sodium 0,16 M et du chlorure de zinc 0,08 M à pH 7,0. Cette fraction X correspond à l'ensemble des fractions I à VI rassemblant toutes les propriétés moussantes signalées par DAVIES (100). Une solution aqueuse de X est fractionnée par tamisage moléculaire sur Sephadex G 25 par élution à l'eau. La gel filtration donne 5 fractions distinctes.

La fraction A, la plus lourde (Poids moléculaire supérieur à 10 000 déterminé par ultracentrifugation) serait la plus

.../...

homogène. Les deux dernières fractions seraient, d'après les spectres d'absorption dans l'ultra violet, des nucléoprotéines ou des acides nucléiques. Le rôle vis-à-vis de la mousse des substances isolées par gel filtration est envisagé par secouage de solutions diluées et par addition de ces composés à des bières diluées à 25 %. La majeure partie de l'activité vis-à-vis de la mousse est concentrée dans environ 10 % de la fraction de départ X et représente moins de 1 % des solides de la bière totale. Elle constitue la fraction A exclue du gel de Sephadex G25. L'ensemble des résultats d'ANDERSON est présenté figure 2a et au tableau II pages 25 et 26.

La fraction A, qui a un rôle prépondérant vis-à-vis de la mousse est un complexe " protéine-sucre " comportant 50 % de protéines et 50 % de polysaccharides. Elle est à nouveau fractionnée par chromatographie d'échange d'ions, sur DEAE cellulose forme borate, comme l'illustre la figure 2b page 25. Des 4 sous-fractions obtenues seules les fractions contenant des protéines et des glucides jouent un rôle mousse positif.

En 1966 ANDERSON (101) améliore le fractionnement du composé A, exclu du Séphadex G 25. Il emploie du stabifix, adsorbant utilisé industriellement, pour éliminer les protéines non fixées de ce composé. Le surnageant est alors chromatographié sur DEAE cellulose, en tampon acetate de sodium, pH 4, 0, μ : 0,02. La fraction fixée sur l'échangeur d'anions, puis éluee, contient alors 30 % de sucres et 70 % de protéines. Cette fraction " glycoprotéique " est très mousse positive ; elle contient des acides phénoliques dont l'un est identifié à de l'acide férulique. Le tableau III page 28 récapitule les données expérimentales d'ANDERSON.

.../...

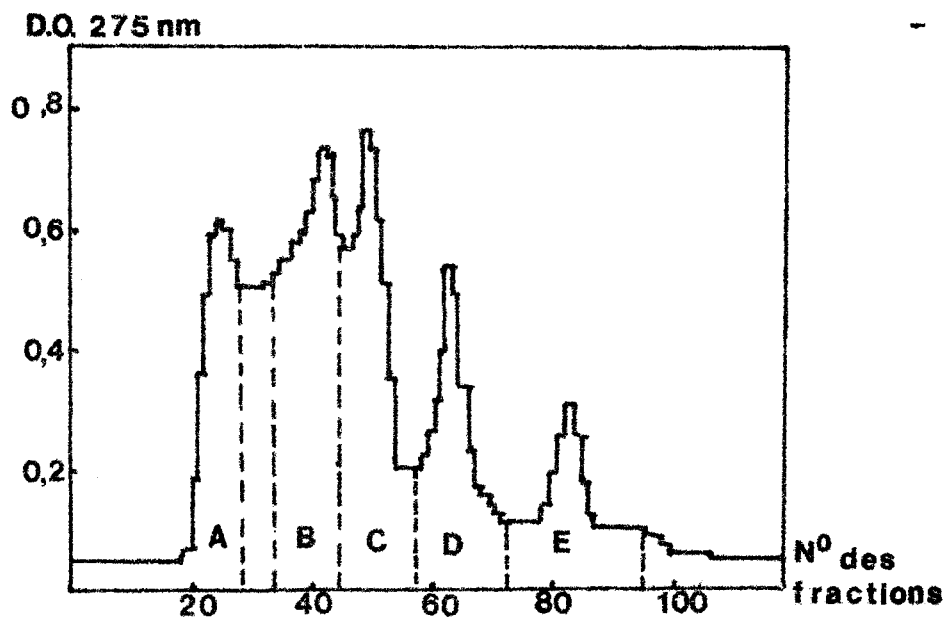


Fig 2a: FRACTIONNEMENT SUR SEPHADEX G25 DE LA FRACTION X D'ANDERSON

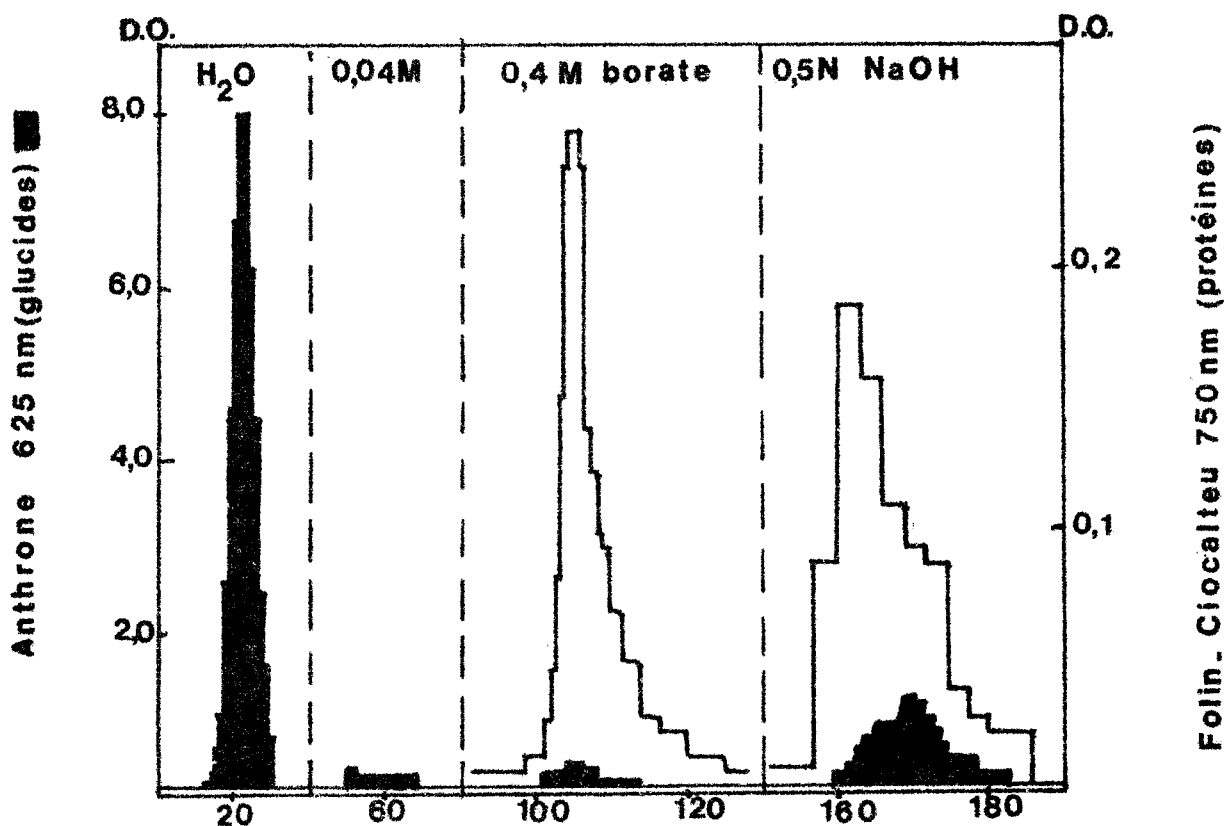


Fig 2b: RECYCLAGE SUR DEAE-CELLULOSE DE LA FRACTION MOUSSANTE A

FIGURE 2



TABLEAU II

TRAVAUX D'ANDERSON ET HARRIS

CARACTERISTIQUES DES FRACTIONS
ISOLEES PAR GEL FILTRATION

FRACTION	X initiale	A	B	C	D	E
Rendement		9.5	36	36	1.3	0.5
Azote p 100 (Kjeldahl)	5.2	5.0	4.6	5.2		
Glucides p 100 (Anthrone)	13	52	14	1.3		
Oses présents		glucose pentoses	glucose	glucose		
Formation de mousse		+ + +	+ +	0	0	+
Stabilité de mousse		+ + +	+ +	0	0	0



L'auteur envisage alors un travail relatif aux protéines de l'orge en liaison avec le pouvoir moussant des composés " glycoprotéiques " isolés de la bière. Nous détaillerons dans le paragraphe suivant les perspectives entrevues grâce à ce travail.

Donc pour ANDERSON, un composé A exclu sur Sephadex G 25, représentant 10 % en poids de la fraction brute de départ X, obtenue par relargage à l'éthanol, est doué d'un haut pouvoir moussant. Ce composé hétérogène en chromatographie d'échange d'ions contient des protéines et des glucides en proportions égales.

5° - En 1966 SIMMONDS (102) a déterminé le poids moléculaire d'une fraction " protéine-sucre " de bière.

A partir de bière industrielle, l'auteur a fractionné les protéines adialysables par chromatographie sur DEAE cellulose à l'aide d'un gradient de pH et de force ionique. Il s'est inspiré d'une part des techniques de ENARI et MIKOLA (103), utilisées pour le fractionnement des protéines de l'orge, et d'autre part de celles utilisées pour le blé par COATES (104). De cette chromatographie sur échangeur d'anions tamponné par un tampon phosphate de sodium 5×10^{-3} M, 2 fractions sont étudiées : la fraction A non retenue à pH 7,5 et la fraction G retenue puis éluée à pH 4,0. Ces deux fractions se révèlent très hétérogènes en ultracentrifugation. La fraction A est étudiée par la technique d'équilibre de sédimentation. Le poids moléculaire au ménisque décroît en fonction du temps de 19600 à 9650 témoignant d'une grande hétérogénéité. Cette fraction A " protéine-sucre " joue un rôle mousse positif important et a les mêmes propriétés chromatographiques qu'une fraction albumine de l'orge. Comme il semble

TABLEAU III

TRAVAUX D'ANDERSON

BIERE

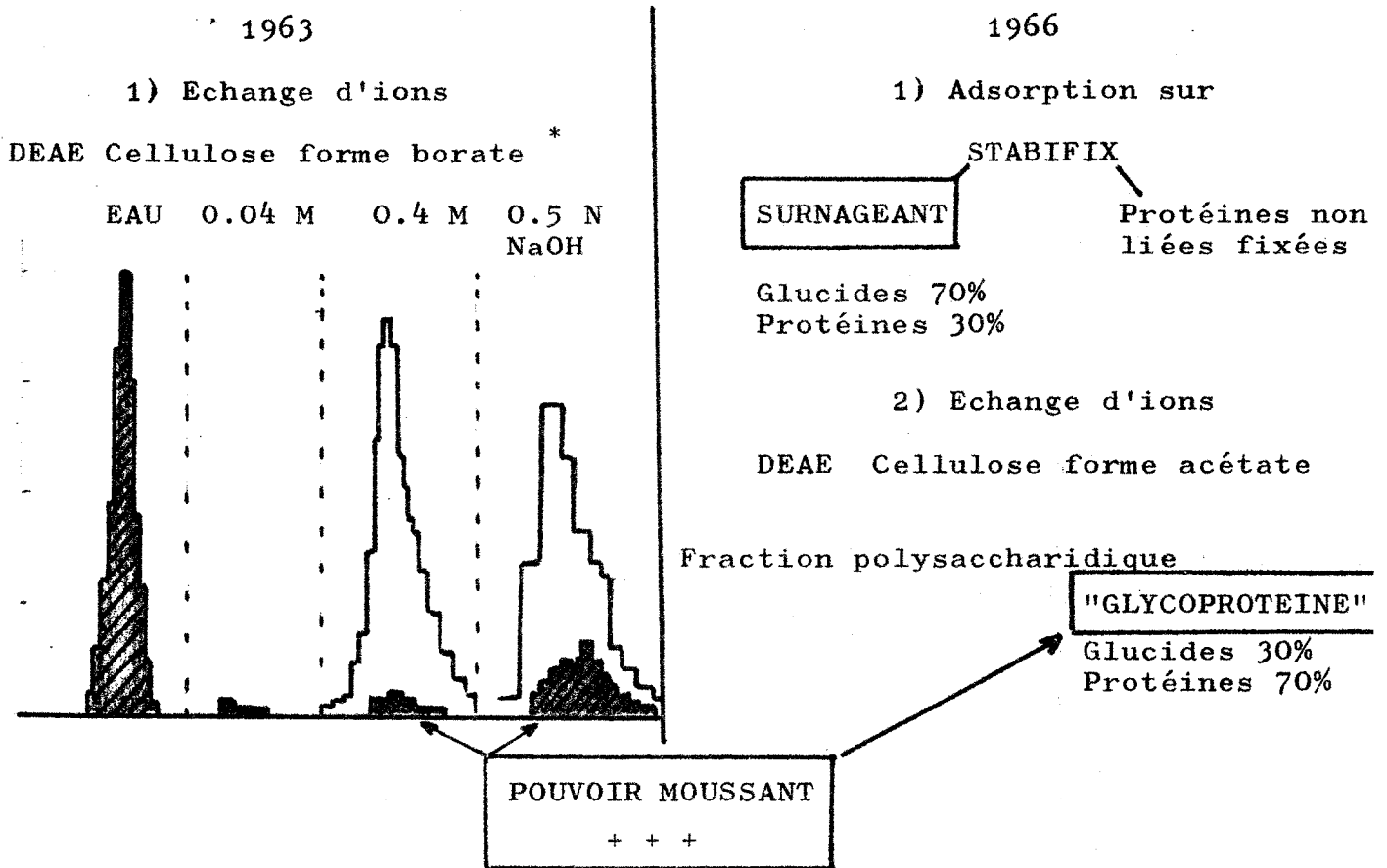
Relargage à l'ETOH

FRACTION X

Gel filtration sur Sephadex G25 Elution à l'eau

FRACTION A

Exclue sur G25 Glucides 50 % Protéines 50%



* Protéines Glucides

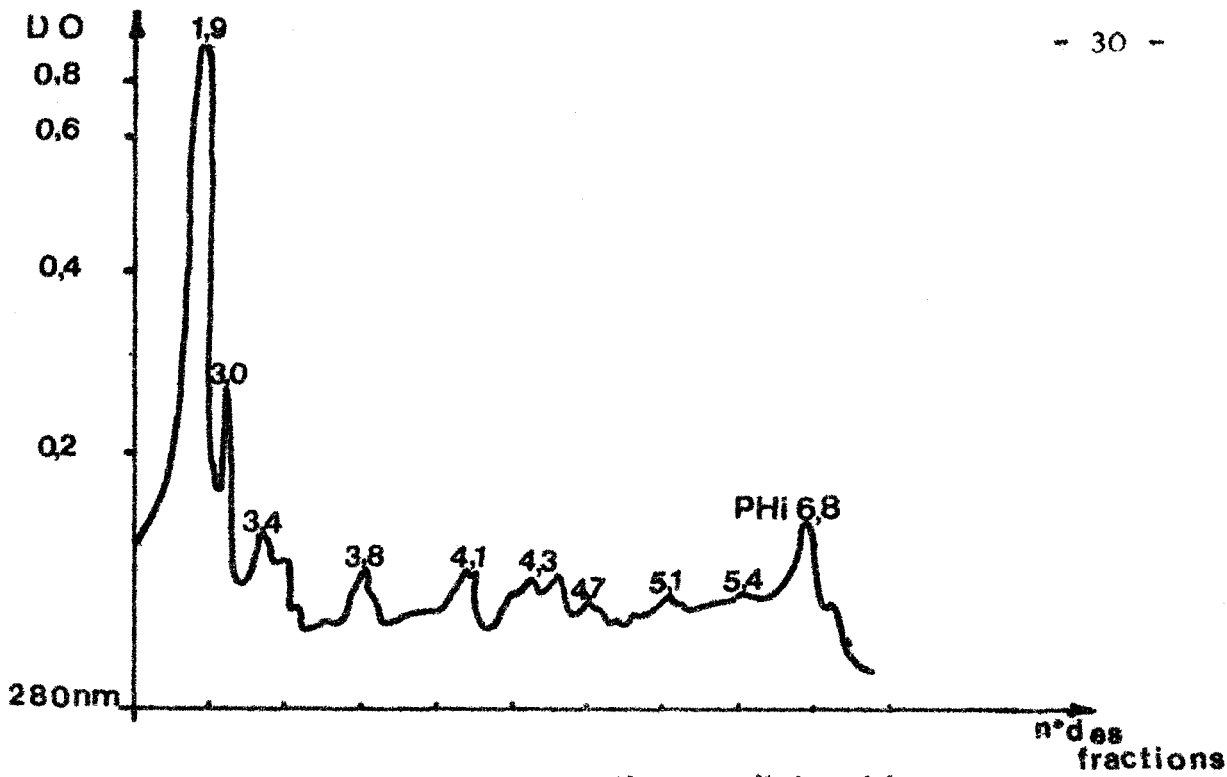


improbable que cette fraction albumine traverse les opérations de maltage, brassage et fermentation, sans changement, SIMMONDS (105) a conclu que la fraction A " glycoprotéique " consisterait en un agrégat de produits de dégradation de protéines liées à des polysaccharides. Ces polysaccharides plus ou moins complexes contiennent les sucres : glucose, xylose, arabinose. Les chromatographies et les ultracentrifugations suggèrent que le système " protéine-polysaccharide " non dialysable de la bière est non seulement très polydispersé mais aussi capable de donner des unités plus petites sous l'influence de forces purement physiques.

6° - En 1969, LEACH (106) a utilisé la nouvelle technique d'électrofocalisation. Les protéines adialysables du moût et de la bière sont fractionnées. Des diagrammes sont comparables et révèlent six composés dont les pH isoélectriques sont supérieurs à 5,0 comme l'illustrent les figures 3 et 4 page 30.

L'auteur a étudié l'influence du brassage sur la mousse de la bière, des matières premières : malt ou succédanés (orge, maïs, blé). Par rapport aux bières pur malt, les moûts et les bières brassées à partir de mouture contenant de la farine de froment possédaient des quantités plus grandes de protéines de pH isoélectrique 7,2. Les mousses de ces bières étaient de qualité supérieure.

.../...



Fractionnement de protéines adialysables

Figure 3

de mout par électrofocalisation

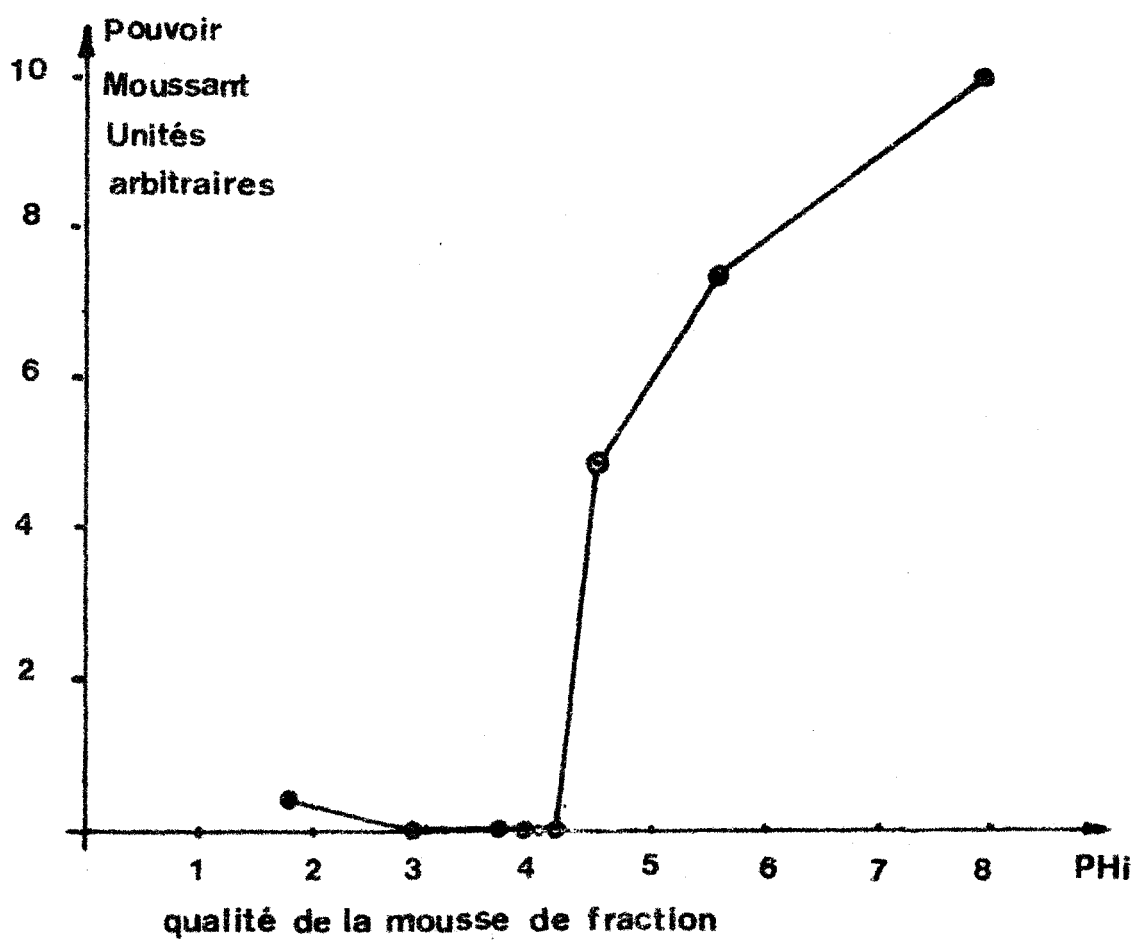


Figure 4

isolées par électrofocalisation



FIGURES 3 et 4

21.3 - LE PROBLEME DE LA MOUSSE DE LA BIÈRE EN LIAISON AVEC
LE TROUBLE COLLOÏDAL -

Généralités -

Le trouble colloïdal définit le trouble qui se dépose après un très long séjour de plusieurs mois d'une bière en bouteille. Ce problème, aux incidences commerciales de première importance, a fait l'objet de nombreuses études. Dans le cadre de l'Européan Brewery Convention, une commission " Trouble de la bière " a été créée dès 1956 . CURTIS (107) et COOK (108) ont établi un parallèle entre la mousse et le trouble.

Le trouble consiste principalement en substances protéiques et polyphénoliques.

Les traitements qui scindent les protéines ou réduisent le taux de polyphénols permettent d'améliorer la stabilité des bières. Toutefois, on ignore si les complexes protéotanniques existent tels quels dans le matériel brut et traversent les diverses étapes technologiques sans altération ou si les complexes se forment à partir d'entités séparées.

De toutes façons, il est établi que l'oxygène du col de la bouteille joue un rôle néfaste en induisant la formation de trouble, ce qui explique le traitement par des antioxydants de la bière. Comme des matières azotées complexes semblent jouer un rôle à la fois dans le trouble colloïdal et la mousse, les brasseurs sont toujours perplexes ; en éliminant des protéines responsables du trouble, ne lèse-t'on pas le pouvoir moussant ? Dans

.../...

quelle mesure la protection par l'emploi d'enzymes protéolytiques, ne nuit-elle pas à la mousse ?

Les substances responsables spécifiquement du trouble ou de la mousse n'étant pas isolées, il est difficile de conclure formellement.

Travaux de SAVAGE -

Il a fallu attendre la fin 1971, pour disposer d'une technique simple permettant de visualiser les fractions issues de bière. SAVAGE (109) par électrofocalisation en gel a pu étudier l'influence des traitements industriels sur les fractions bière. Les traitements utilisés pour assurer une meilleure stabilité à la bière sont : adjonction d'acide tannique, utilisation d'enzyme protéolytique (papaïne), ajout d'agent industriel A.T. Les gels électrofocalisation montrent des différences selon le mode de stabilisation employé. Par contre, la mousse n'est pas affectée.

Travaux de GRABAR et DAUSSANT -

A l'inverse des conclusions de SAVAGE, GRABAR et DAUSSANT (110) établissent une identité entre deux fractions issues de mousse et des fractions du trouble. Les raccordements d'arcs en immunoélectrophorèse utilisant un sérum anti trouble prouvent que deux fractions provenant de l'albumine et de l'hordeine sont communes au trouble et à la mousse. Une troisième fraction mineure pourrait aussi être commune au trouble et à la mousse.

.../...

Signalons en outre, que LOISA et al (111) à l'aide d'immunserum anti trouble, propose une technique d'immunoélectrophorèse quantitative, permettant de déterminer dans une bière la quantité de protéines intervenant dans le trouble.

Conclusion -

Des constituants protéiques sont responsables du trouble colloïdal, et de la mousse de la bière.

L'identité de ces protéines et leurs importances relatives restent posées.

21.4 - CONCLUSION

En 1953, le chercheur Américain SCALLET (112) a le premier fractionné par voie chimique les protéines de la bière. Il a étudié leur rôle vis-à-vis de la mousse. Suite à une série d'expérimentations s'étalant sur 15 ans, les chercheurs anglais de la Brewing Industry Research Foundation sont arrivés aux conclusions suivantes : dans la bière, des composés adialysables " protéine-sucre " de poids moléculaire supérieur à 10 000 sont mousse positifs. Une fraction de composition similaire, isolée de l'orge et du blé a elle aussi un rôle mousse positif.

Une filiation entre les " glycoprotéines " des céréales utilisées comme matières premières pour la fabrication de la bière et les " glycoprotéines " de la bière responsables de la mousse est-elle possible ? Analysons donc les études relatives aux " glycoprotéines " de l'orge, du blé, du maïs.

.../...

22 - PROTEINES ET GLYCOPROTEINES DES CEREALES UTILISEES DANS LA
FABRICATION DE LA BIÈRE -

22.1 - GENERALITES : LES GLYCOPROTEINES VEGETALES

Nous citerons dans cette courte étude bibliographique, les références ayant trait aux glycoprotéines végétales. Nous développerons les rares travaux réalisés sur le blé, le maïs, l'orge : céréales entrant dans la composition de la bière.

La quantité des informations relatives à la composition, structure et synthèse des glycoprotéines animales progresse de façon exponentielle. En contraste il n'existe que très peu de publications sur la présence et la nature de glycoprotéines végétales. Les rares végétaux étudiés possèdent des propriétés importantes justifiant l'étude de leurs composés glycoprotidiques.

- Ainsi, l'ananas a été étudié pour la broméline qu'il renferme. Les équipes groupées autour de MURACHI (113), OTA (114) FEINSTEIN (115) SCOCCA (116) ont étudié la structure glycoprotidique de cette broméline.

- Le soja, souvent utilisé dans les aliments, (WOLF 117) a été étudié pour son composé responsable d'hémagglutination. LIS et al (118) décrivent l'isolement d'un glycopeptide de soja.

- PUSZTAI (119), quant à lui, rapporte l'isolement à partir d'haricot, d'une glycoprotéine et d'un inhibiteur de l'action trypsinique. Il fractionne et caractérise des glycoprotéines contenant de l'hydroxyproline à partir de feuilles d'haricot (120). D'un haricot rouge BORSESON et al (121) isole une glycoprotéine stimulant la mitose.

- Par analogie avec les cellules animales, il est vraisemblable que les parois des cellules végétales soient glycoprotidiques. LAMPORT (122) signale une liaison hydroxyproline O glycosidique d'une glycoprotéine de paroi de cellule de tomate.

- Les travaux les plus nombreux sur les glycoprotéides végétaux sont relatifs aux parois des levures.

L'historique de la question est développé par PHAFF (123) et MAC WILLIAM (124). Un composé glycoprotéidique a été isolé de la membrane de cellule de levure, une mannane-protéine a été extraite de la paroi de diverses variétés de levures, (KORN et NORTHCOTE (125) - SENTANDREU et NORTHCOTE (126)). Les chaînes latérales de mannane varient selon les souches de levure. Cette substance est importante car par pontages mettant en jeu du calcium et des groupes phosphate, les levures de bière flocculent. La configuration de cette glycoprotéine pourrait expliquer les différences de flocculence des diverses souches de levure (LYONS et HOUGH (127)).

Pour MAC WILLIAM et CLAPPERTON (128) la levure libère dans le moût des glucomannanes-protéines et ces composés mis en solution à 1 % sont tensioactifs et mousse positifs. La synthèse de ces composés est très variable selon l'âge et la souche de levure. Le métabolisme de cette substance exudée n'est pas connue, et la teneur dans la bière de mannane protéine serait de quelques mg par litre.

Signalons en outre que l'invertase de la levure localisée extérieurement sur la paroi cellulaire est une glycoprotéine contenant une liaison glucosylaminylasparagine (NEUMAN 129).

Cette structure expliquerait d'après STUMEYER (130) la résistance de l'invertase à la dénaturation par les tannins. Il est connu à la suite des travaux de CHAPON (131) que les tannins s'associent fortement avec les polyamides, les polypeptides et les protéines par des ponts hydrogène. Ces interactions perturbent la conformation de la protéine native et conduisent à une précipitation. Pour les glycoprotéines, une protection de l'armature protéique par les polysaccharides rendent l'accessibilité des tannins aux polypeptides plus difficile. En outre, il est à penser que les tannins se lient plus facilement à la partie polysaccharidique. Le complexe lié est rendu ainsi plus faible et plus facilement réversible.

Les glycoprotéines de la paroi cellulaire de la levure de bière sont donc susceptibles de laisser diffuser en quantité infime dans la bière, des composés glycoprotidiques qui pourraient jouer un rôle dans la mousse de bière.

Développons maintenant les travaux relatifs au glycoprotéines des céréales pouvant entrer dans la composition de la bière.

22.2 - LES GLYCOPROTEINES DU BLE ET DU MAIS

Définition

On appelle succédanés amylicés ou grains crus, les céréales susceptibles de remplacer le malt d'orge au brassage. Les plus fréquemment utilisés sont le maïs et le riz. L'utilisation de blé a montré une sensible amélioration de la qualité de la mousse aussi bien en microbrasserie qu'industriellement.

(HARRIS (132) - BRITWISTLE (133) LEACH (134)). L'utilisation d'orge

crue comme succédané envisagée par les finlandais ENARI et MIKOLA (135) aurait-elle aussi un rôle bénéfique vis-à-vis de la mousse?

Les glycoprotéines des céréales n'ont été que très peu étudiées.

- Le maïs

BOUNDY et al (136) ont étudié le maïs. Un complexe protéine-polysaccharidique est isolé du péricarpe de maïs, il pourrait s'agir d'un mucopolysaccharide. L'hydroxyproline, la serine et la thréonine constitue le tiers des acides aminés de ce complexe.

La copule polysaccharidique est essentiellement glucidique et présente des traces de galatose, arabinose, xylose et glucosamine.

- Le blé

ANDERSON (137) signale une fraction " glycoprotéique " du blé douée d'un pouvoir moussant élevé. Etant donné le rôle mousse positif attribué au blé il nous a paru intéressant de mentionner les travaux de KUNDIG, NEUKOM et DEUEL (138). Ces auteurs ont isolé à partir d'un extrait aqueux de farine de blé cinq fractions dont quatre sont des complexes protéines-sucres. En présence d'oxydants, l'extrait aqueux de farine de blé se gélifie. Cette gélification est due à une seule fraction " glycoprotéique " contenant des acides phénoliques dont de l'acide férulique. Les auteurs supposent que la réaction d'oxydation provoquent la formation d'un réseau complexe tridimensionnel qui augmente considérablement la viscosité et facilite ainsi la gélification.

L'hypothèse formulée par KUNDIG (139) pourrait expliquer l'amélioration de la mousse de bière lorsqu'on emploie du blé au brassage. ANDERSON (140) a repris cette supposition pour expliquer le rôle mousse positif d'une fraction " protéine sucre " de la bière, contenant elle aussi de l'acide férulique.

22.3 - LES GLYCOPROTEINES DE L'ORGE

ANDERSON (141) a mis en évidence un composé " glycoprotéique " isolé de la bière. Il a retrouvé dans un extrait aqueux d'orge, une fraction semblable douée d'un pouvoir moussant intéressant. Nous exposerons dans ce paragraphe les travaux de WALDSCHMIDT-LEITZ et coll. (142). En effet, ces auteurs ont montré l'existence de glycoprotéines dans l'orge.

En 1961, ces chercheurs ont isolé à partir de l'albumine de l'orge, des constituants glycoprotéïdiques dont la teneur en glucides variait de 4,4 à 30,4 %. HOCHSTRASSER (143) a proposé un mode de liaison glycanne-protide du type ester : alanyl 4 - xylose, puis en 1963 des modes de liaison O - glycosidique où les acides aspartique et glutamique interviendraient. Dès 1961 extrapolant les résultats de l'orge au blé, au maïs et au riz, WALDSCHMIDT-LEITZ (144) avait émis l'hypothèse que la présence d'un maillon glycanne protide constituerait la preuve de l'emploi de grains crus dans la bière. L'absence de maillon glycanne-protide dans la bière pur-malt semblait normale aux auteurs car déclaraient-ils " ce maillon est de toute évidence détruit au maltage ". La présence de " glycoprotéine " dans la bière pur malt n'est pas possible d'après WALDSCHMIDT-LEITZ et coll. (145).

.../...

22.4 - CONCLUSION

L'étude des composés glycoprotéidiques des céréales utilisées dans la fabrication de la bière, nous apportent deux éléments intéressants. KUNDIG (146) à la suite de ses travaux sur le blé émet une hypothèse qui pourrait expliquer la formation d'une mousse. L'oxydation d'un composé glycoprotéique peut se traduire par un changement spectaculaire de structure, à savoir une gélification d'une solution. WALDSCHMIDT-LEITZ et Coll. (147) trouve des glycoprotéines dans l'orge que l'on ne retrouve pas dans la bière pur malt.

3° - CONCLUSIONS

La revue générale des composés protéiques et glycoprotéiques éventuellement responsables de la mousse de la bière, nous permet de conclure. La formation de mousse de bière résulte d'un équilibre entre composés mousse positifs et mousse négatifs. Les interactions physicochimiques sont multiples et nous sommes en face d'un problème qualitatif et non quantitatif.

Des composés adialysables, protéidiques, riches en polysaccharides sont mousse positifs. Toutefois la nature glycoprotéidique de ces composés n'a pas été démontrée.

En outre, une contradiction apparaît. En effet, deux groupes de chercheurs, adoptant deux voies expérimentales inverses aboutissent à des conclusions différentes. A partir de bière,

.../...

ANDERSON (148) a montré le rôle moussant positif d'une fraction " protéine-sucre ". Une fraction moussante, de composition similaire a été retrouvée dans l'orge, et l'auteur, émet l'hypothèse d'une filiation possible entre ces deux composés. A partir d'orge WALDSCHMIDT-LEITZ (149) a montré l'existence de composés albumines glycoprotéidiques. Ces composés ne se retrouvent pas dans la bière pur malt, et l'existence d'un maillon glycanne-protidique constitue la preuve de l'emploi de grains crus.

L'étude bibliographique nous montre qu'il a fallu attendre 1953 pour que des fractionnements de bière soit envisagés en liaison avec le problème de la mousse de la bière. Les travaux sont peu nombreux sur les protéides de la bière, car ce milieu est avant tout glucidique. De plus, les chercheurs se sont heurtés à deux difficultés majeures :

- la mousse résulte d'un équilibre physico-chimique complexe difficile à apprécier ;
- les fractions isolées de bière sont difficilement " visualisables ", par une technique simple d'électrophorèse de zone par exemple. Aussi les données bibliographiques sont généralement éparses.

Dans nos travaux personnels, nous nous sommes efforcés :

- de fractionner une entité mousse positive ;
- de faire un lien entre des constituants mousse positifs et l'orge
- enfin, dans une dernière partie, nous avons cherché à nous rapprocher du monde industriel, en envisageant les répercussions de traitements de la bière, sur les composés moussants.

.../...

TRAVAUX PERSONNELS

1° - PREPARATION DU MATERIEL
D'ETUDE

11 - MATERIEL

11.1 - BIERE NORMALE -

Notre matériel de départ est la bière bock de la brasserie des ENFANTS DE GAYANT de DOUAI. Elle est brassée classiquement selon une méthode par décoction à une trempe de grains crus. Les versements sont de 800 kg. de maïs pour 3 200 kg. de malt pour un volume au lâcher de 250 hectolitres. La trempe de grains crus (Maïs), est liquéfiée à l'aide d'enzymes amylolytiques commerciales du type Superclastase (détruites ensuite à l'ébullition du moût). La fermentation est une fermentation basse. La bière obtenue n'est pas pasteurisée.

11.2 - BIERE PUR MALT -

Les bières aujourd'hui sont toutes fabriquées en utilisant du malt d'orge et une fraction de succédanés amylicés appelés grains crus. Néanmoins, pour fabriquer des immunosérums anti-bière pur malt, nous avons pu obtenir de la bière pur malt. Elle fût brassée également à l'aide d'enzymes amylolytiques commerciales, du type superclastase.

Ces deux types de bière ne sont pas pasteurisés. Aussi pour les conserver longtemps, nous avons cherché à les concentrer. Il faut signaler que les enzymes du malt sont détruites lors de la

cuisson du moût. Les seules enzymes susceptibles d'être encore présentes dans la bière proviendraient de la levure Saccharomyces Carlsbergensis et sont des phosphatases et de l'invertase.

12 - METHODES

Nous ne citerons que les méthodes spécifiques de notre industrie.

12.1 - DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTESIMALE DES PROTEINES

La teneur en azote est déterminée à l'aide de la méthode KJELDAHL. L'azote protéique est minéralisé et dosé sous forme d'ions ammonium. Les protéines de l'orge et du malt contiennent en moyenne 16 % d'azote. On multipliera la teneur en azote par 100/16 soit 6,25 pour avoir la teneur en protéines.

12.2 - DOSAGE DES ISOHUMULONES -

Les isohumulones de la bière dérivent des acides amers apportés par le houblon au brassage. Elles sont dosées selon la technique de l'E.B.C. (150) après extraction de la bière par de l'iso octane et lecture au spectrophotomètre à 255 nm.

12.3 - DOSAGE DES POLYPHENOLS -

Les polyphénols de la bière dérivent principalement des enveloppes du malt et des folioles de houblon. La méthode de dosage utilisée est actuellement en cours de standardisation par le Comité des analyses de l'E.B.C. (151).

A 10 ml. de bière sont ajoutés :

- 8 ml. d'une solution à 1 % de carboxy-méthylcellulose sodique contenant 0,2 % d'EDTA disodique.
- 0,5 ml. d'un réactif à 2,5 % de citrate ferrique ammoniacal.
- 0,5 ml. d'ammoniaque dilué au 1/3. On complète à 25 ml. et après agitation vigoureuse et 10 mn. de repos, les lectures sont effectuées à 600 nm. La concentration en polyphénol exprimée en ppm est donnée par la formule : $DO \times 820$.

13 - RESULTATS

Notre matériel d'étude de départ est constitué de bières industrielles susceptibles de ne pas conserver des caractéristiques constantes. Ces bières ne sont pas pasteurisées. Il nous a fallu constituer un stock homogène, inaltérable.

13.1 - CONSERVATION DE LA BIÈRE -

Concentration par évaporation sous CO_2

L'évaporation sous pression réduite de CO_2 a été abandonnée en raison :

- des volumes importants à évaporer ;
- du moussage incontrôlé provoqué au début d'évaporation.

Toutefois, nous avons pu mettre en évidence l'estimation de la concentration d'une bière en réalisant un spectre d'absorption du concentrat, en mesurant le minimum de densité optique à 745 nm.

.../...

Lyophilisation

La bière contient un faible taux d'alcool, environ 3,5 degrés GAY LUSSAC. Toutefois, aux pressions extrêmement réduites de lyophilisation, les vapeurs d'alcool représentent un volume important que brasse la pompe à vide inutilement. Le temps de lyophilisation passe alors de 24 à 32 heures.

Pour remédier à cette surcharge de la pompe à vide, il faut, après 6 heures de lyophilisation, repasser en congélation, casser le vide et éliminer les eutectiques de l'alcool condensés sur le piège froid. On purge la pompe. L'ensemble des opérations de lyophilisation dure alors 26 heures. La bière donne une poudre jaune claire. L'extrait sec par litre est d'environ 26,5 g.

13.2 - PREPARATION DE BIÈRE DE MOUSSE -

Généralités

Il est connu depuis longtemps que les constituants de certaines solutions sont entraînés par les mousses que ces solutions peuvent produire. Des techniques de moussage ou de moussage et d'essorage ont permis des fractionnements (ABRIBAT (152)). Certains auteurs, SCHUTZ (153) BADER (154), ont utilisé cette technique pour fractionner des solutions protéiques. Comme nous cherchons à enrichir la bière en composés mousse positifs, nous avons préparé de la bière de mousse.

Méthode

Nous avons substitué à la technique discontinue de GRAY et STONE (155) une méthode en continu pour produire de la bière

.../...

de mousse. La bière de mousse résulte du drainage de mousse de bière essorée, elle est produite dans une tour de mousse construite selon les plans aimablement mis à notre disposition par GJERSTEN (156) de chez CARLSBERG.

Cette tour de mousse nous permet l'obtention en continu de bière de mousse. A partir d'un fût de 50 litres de bière initiale l'autonomie de fonctionnement est supérieure à 10 heures. Nous avons modifié l'admission de bière initiale et l'évacuation de bière résiduelle de façon à rendre la production de bière de mousse quasi-automatique. Une pompe péristaltique admet la bière en raison d'1,5 litre à l'heure et simultanément évacue la bière épuisée. Le moussage est réalisé par diffusion d'azote sous pression de 7 cm. de mercure à travers un verre fritté n° 3. La bière initiale du fût est sous une contre-pression de gaz carbonique de 15 cm. de mercure. Il faut signaler toutefois que le niveau de bière dans la tour de mousse est difficilement stable. Aussi, faut-il le corriger par siphonnage 1 à 2 fois toutes les 8 heures.

La photo n° 5 (P. 46) montre la réalisation de cette tour de mousse.

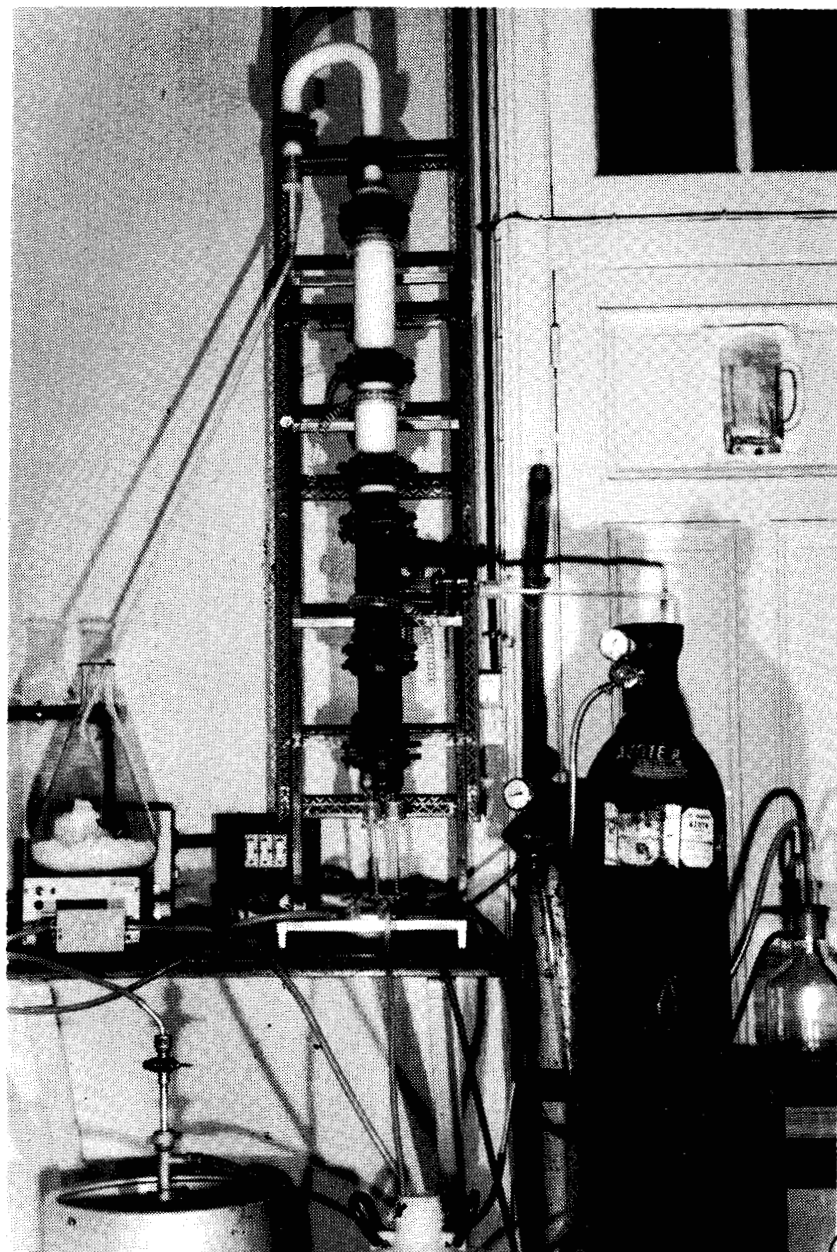
13.3 - CARACTERISTIQUES DES BIERES DE MOUSSE -

Les différentes caractéristiques des bières obtenues par moussage puis essorage sont rassemblées dans le tableau IV p. 47 Plusieurs points sont à souligner :

- la bière de mousse résulte du drainage de la mousse. Il est important d'éviter l'oxydation des constituants du film des bulles de mousse ; c'est pourquoi, nous réalisons le moussage et la récupération sous azote.

TOUR DE MOUSSE

FABRICATION EN CONTINU DE BIÈRE DE MOUSSE



Bière
de
Mousse

Difuseur

Azote
pour
Moussage

CO₂
contre
pression



Pompe péristaltique

admission

Fut 50 litres

refoulement

Bière normale

Bière résiduelle

FIGURE 5

TOUR DE MOUSSE SELON GSERSTEN

TABLEAU IV

CARACTERISTIQUES DES BIERES DE MOUSSE

BIERE	Méthode discontinue 2 Moussages			Méthode continue Tour GJERSTEN		
	Initiale A	Mousse	Concentration	Initiale B	Mousse	Concentration
Volume	5.000 ml.	500 ml.	10	50 l/	3,8 l.	13
Azote mg / l Kjeldahl	403	700	1,7	392	509	1,3
Oses totaux						
Orcinol g/ l	22,3	16,3	0,73	21,6	18,9	0,87
Isohumulone unités						
EBC	19,3		7	18,5	-	7
Extrait sec lyophilisé						
g / l	26,5		-	26,5		-
	18 H 1er moussage		5.000 ml.			
			2.000 ml.			
	8 H 2ème moussage		500 ml.			



- La bière de drainage présente toujours un léger trouble et des dépôts brunâtres. Ce trouble est dû à des complexes protéotanniques.
- La bière de mousse est considérablement enrichie (7 à 10 fois) en matière amères provenant du houblon.
- Du point de vue teneur en azote , la bière récupérée après deux moussages successifs est enrichie 1,7 fois alors que la bière de mousse fabriquée en continu n'est enrichie qu'1,3 fois. L'essorage lors du drainage de la mousse joue à notre avis un rôle important.

Nous avons choisi la fabrication de bière de mousse en continu car la fabrication est plus régulière, beaucoup plus reproductible et plus pratique.

13.4 - CONCLUSION -

Notre matériel de départ est constitué de bière industrielle. Pour travailler sur un lot homogène et inaltérable, nous avons lyophilisé la bière et constitué un stock conservé au congélateur.

Pour étudier ultérieurement les constituants responsables de la mousse de bière, nous avons pensé concentrer ces constituants en fabriquant de la bière de mousse, résultant du drainage de la mousse. Nous avons adopté pour des raisons pratiques, une méthode de fabrication en continu. La bière de mousse est alors lyophilisée.

Nous avons donc à notre disposition de la bière liquide et de la bière " en poudre " lyophilisée.

2° - ETUDE D'UNE FRACTION BRUTE
MOUSSE POSITIVE

21 - PREPARATION D'UNE FRACTION ADIALYSABLE DE LA BIÈRE

21.1 - MATERIEL -

Comme nous l'avons défini dans le paragraphe précédent, notre matériel d'étude est constitué par :

- de la bière normale liquide ;
- de la bière normale concentrée, reconstituée après lyophilisation
- de la bière de mousse liquide ;
- de la bière de mousse concentrée, reconstituée après lyophilisation.

21.2 - PREPARATION DE FRACTIONS ADIALYSABLES DE LA BIÈRE -

Les recherches antérieures présentées dans l'historique, montrent que les composés responsables de la mousse de la bière seraient :

- adialysables ;
- des complexes protéine-sucre

Nous exposerons uniquement la technique retenue pour la suite de notre travail. En effet, les méthodes de précipitation chimiques classiques, au sulfate d'ammonium, au phénol, n'ont pas conduit à des fractions moussantes intéressantes. Les techniques inspirées de celles décrites par BOURGEOIS (157), utilisées pour

obtenir des composés glycoprotidiques à partir de blanc d'oeuf de poule, n'ont pas conduit à des résultats valables.

Fractionnement original d'ANDERSON (158)

Préparation de la fraction -

- Cette méthode s'inspire du mode de fractionnement de COHN (159) pour le plasma sanguin, en utilisant de l'éthanol contenant des sels à 0°C.

- 767 ml. d'éthanol (80 % V/V à 0°C), contenant de l'acétate de sodium 0,16 M et du chlorure de zinc 0,08 M, sont ajoutés sous agitation à 2,3 litres de bière refroidie à 0°C. Après ajustage du pH à 7,0 à l'aide d'un tampon ammoniacque, le précipité se déposant pendant trois heures à 0°C est récupéré par centrifugation. Le culot de précipitation est dissous dans 700 ml. d'EDTA à 3 % (poids/volume). La solution brune est mise à dialyser en présence de merseptyl pendant trois jours contre eau distillée ; l'adialysable est alors lyophilisé. Ce mode opératoire est utilisé tant sur la bière normale, que sur la bière de mousse.

Fractionnement dérivé de la méthode d'ANDERSON.

Préparation de la fraction X -

- Le chercheur britannique de la Brewing Industry Research Foundation, dispose comme matériel de départ, de bière brassée par infusion de fermentation haute obtenue en microbrasserie. Nous utilisons quant à nous, de la bière industrielle brassée par décoction, de fermentation basse. Nous avons exposé les raisons (p.43) qui nous ont amené à lyophiliser la bière pour disposer d'un stock homogène inaltérable.

- Nous reconduisons l'expérimentation d'ANDERSON sur de la bière reconstituée, à partir de poudre de bière lyophilisée. Disposant de " bière en poudre ", nous avons reconstitué la bière normale en la concentrant selon des proportions variables. La bière concentrée trois fois fut utilisée systématiquement, car elle conduisait à des fractions adialysables comparables à celles obtenues selon le procédé original, et en outre, le rendement en poids est plus intéressant.

- 75 g. de poudre de bière sont solubilisés dans 825 ml. d'eau distillée. Après refroidissement à 0°C, on ajoute sous agitation, 275 ml. d'alcool et sels, et l'on continue le protocole original décrit précédemment. Ce mode opératoire est utilisé tant sur la bière normale lyophilisée, que sur la bière de mousse lyophilisée.

22 - CARACTERISTIQUES PHYSIQUES DE LA FRACTION X

22.1 - ASPECT PHYSIQUE -

Cette fraction lyophilisée se présente sous forme de poudre brun pâle. Bien que limpide avant la lyophilisation, elle laisse, en solution à 10 %, apparaître un trouble. Celui-ci de 6 à 8 % en poids est d'origine protéotannique et sa teneur en azote par rapport à la poudre initiale est enrichie de 1,6 fois. De plus, la solution abandonnée 24 heures à 2°C laisse apparaître un nouveau trouble à rapprocher vraisemblablement du trouble au froid des industriels brasseurs.

.../...

Selon les pH, les solutions à 10 % prennent des aspects différents :

<u>pH</u>	
2	Solution limpide brun clair
3	((Solution opalescente brun clair ((
↓	
9	
10	Solution limpide brun très foncé

22.2 - ESTIMATION DU POUVOIR MOUSSANT -

Test E.N.S.I.A.

Pour suivre l'aspect mousse positif des fractions isolées à partir de bière, nous avons mis au point un dispositif simple consommant peu de produits. Ce test est préféré aux mesures longues de viscosité selon HOPPLER (160), car les corrélations viscosité pouvoir moussant, sont très discutées (KRAUSS (161) LAUWERS (162)).

3 ml. d'une solution à 0,2 % sont mis à mousser dans un tube cylindro-conique rigoureusement propre et soigneusement bouché. Le moussage est produit par agitation pendant 3 minutes à l'aide d'un vortex de laboratoire à vitesse maximale. Après repos d'une minute et d'une heure, des photos sont prises, ce qui permet de visualiser la formation et la stabilité des mousses.

Résultats

La figure⁶(p. 54) illustre les résultats obtenus à l'aide du test E.N.S.I.A.

En comparant la fraction X à de la bière normale reconstituée, de la bière de mousse reconstituée et à des fractions obtenues par des méthodes de précipitation au phénol, on se rend compte combien la fraction X se distingue par son aptitude à former de la mousse stable.

23 - CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DE LA FRACTION X

23.1 - METHODES -

- Méthodes générales d'analyses

Pour les méthodes classiques, on se reportera aux monographies de MONTREUIL et Coll. (163). Les dosages de polyphénols et d'isohumulones spécifiques à notre industrie, sont décrits page 42 .

Nous développerons la méthode de dosage du glucose et celle de pentoses en présence d'une grande quantité de glucose. Ces méthodes peu connues nous ont donné satisfaction.

- Dosage spécifique du glucose

Principe

Le glucose est dosé colorimétriquement selon SCRIBAN (16) à l'aide d'une glucose oxydase spécifique : LE FERMCOTEST *. Le Fermcotest mis dans le commerce, prêt à l'emploi, contient une substance chromogène et une glucose aérodeshydrogénase (dépourvue de maltase, d'invertase ou d'amylase), et en outre des substances tampons.

.../...

* FERMCOTEST : Fournisseur SEMPA CHIMIE : 20, rue des Fossés St Jacques - PARIS (5°)

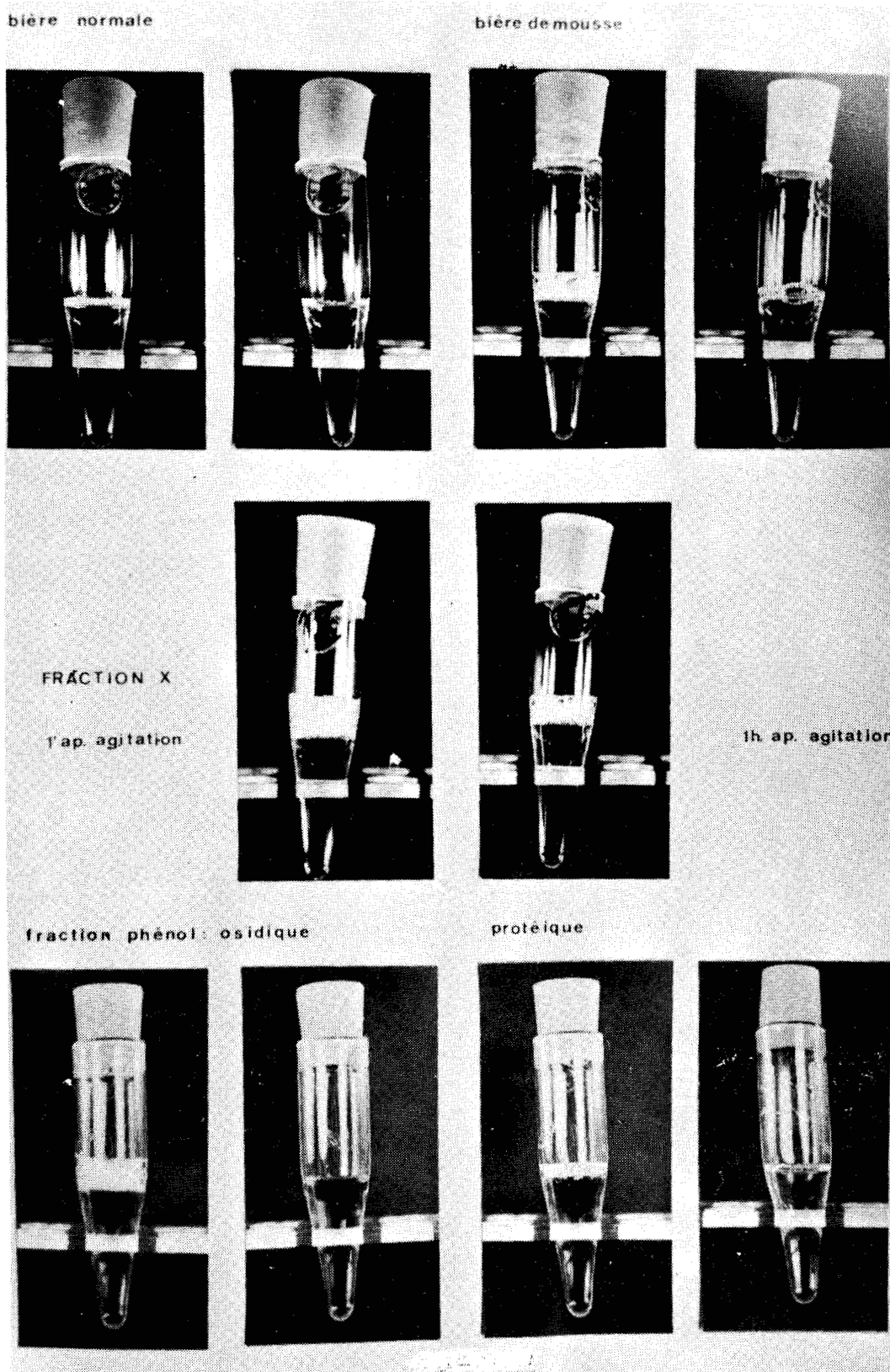


FIGURE 6
POUVOIR MOUSSANT DE LA FRACTION X
TEST E.N.S.I.A.



Protocole expérimental

- A 2 ml. de solution contenant entre 40 µg et 200 µg de glucose libre, on ajoute 1 ml de solution de Fermcotest. Après séjour de 30 minutes au bain-marie à 30 °C, la réaction est bloquée par 12 ml d'H₂SO₄ à 20 %.

- La lecture est réalisée en densité optique à 540 nm.

Les peptides et sels n'interférant pas, on peut utiliser le fermcotest sur un hydrolysât d'osides, évaporé 3 fois et repris dans l'eau distillée en prenant soin d'établir la courbe de référence au même pH que l'hydrolysât.

- Dosage colorimétrique de pentoses en présence d'une grande quantité de glucose -

Après hydrolyse chlorhydrique de la fraction X et purification de l'hydrolysât, la chromatographie sur papier révèle qu'à côté du glucose, il n'existe que des pentoses. La quantité de glucose étant la plus importante, nous avons cherché une technique autorisant le dosage des pentoses dans ces conditions. Ne disposant pas de méthodes enzymatiques spécifiques, nous avons utilisé une méthode colorimétrique à l'aniline.

Principe et protocole expérimental -

La technique de dosage des pentoses est due à TRACEY (165), les sucres, l'aniline en excès, l'oxygène, prendraient part à la réaction colorée qui ne serait pas due à des dérivés du furfural.

.../...

- 2 ml. de solution renfermant 50 μ g. de pentoses sont mélangés à 6 ml. de réactif contenant 100 ml. d'acide acétique glacial, 10 ml. d'acide oxalique à 5% (poids/volume), 24 ml. d'eau distillée, 16 ml. d'aniline.

Le réactif est filtré avant emploi. La coloration se développe pendant 24 h. à l'obscurité et à température ambiante. La coloration orange est mesurée à 475 nm. La loi de BEER-LAMBERT est respectée pour des taux de pentoses compris entre 10 et 100 γ et de 100 à 1000 γ pour le glucose. La figure 7 p. 57 présente les spectres d'absorption des pentoses et de mélange glucose-pentoses. Le glucose donne une légère coloration jaune, son interférence, à poids égal de xylose, se chiffre à 1,7 % comme le rapporte le tableau V p. 58.

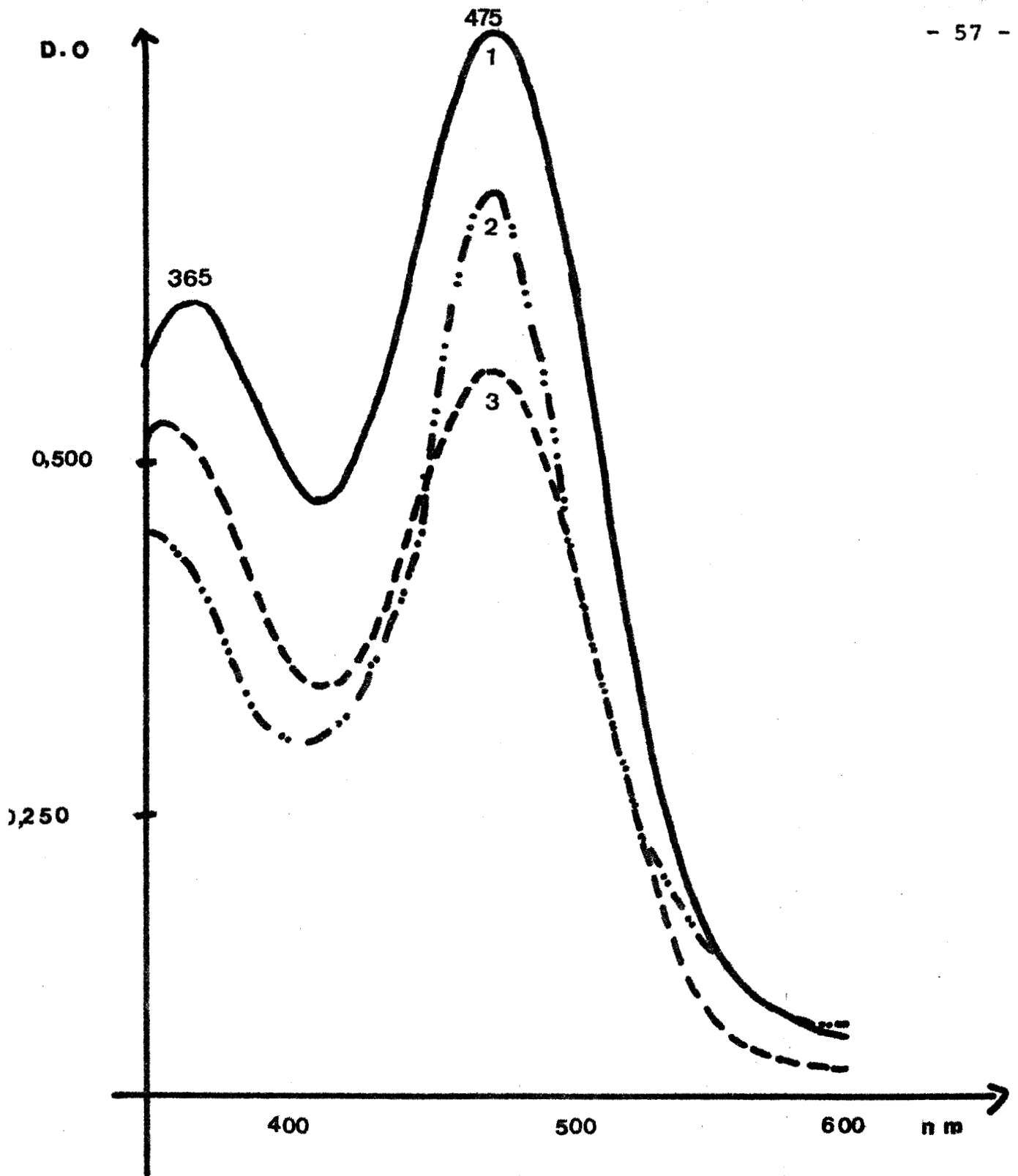
Pour accélérer la réaction, on peut jouer sur le couple temps-température. Les meilleurs résultats sont obtenus en 6 heures à 30 ° C. En augmentant la température, le temps de réaction est réduit au détriment de la sensibilité de la technique, l'interférence du glucose croissant.

23.2 - RESULTATS : COMPOSITION CHIMIQUE DE LA FRACTION X -

Les dosages sont effectués sur de la poudre lyophilisée, desséchée sous vide en présence d'anhydride phosphorique.

- Composition protéique

Le dosage Kjeldahl donne un taux de 46,8 p. 100 (N x 6,25



SPECTRES D'ABSORPTION DES PENTOSES

Methode à l'aniline pour 50 µg cuve 1cm

1 Xylose, 50 µg

3 Arabinose, 50 µg

2 Xyl - 1 Ara 1 - glc 5 : 25 µg. 25 µg 250 µg



FIGURE 7

DOSAGE DES PENTOSES SELON TRACEY

TABLEAU V

DOSAGE DES PENTOSES A L'ANILINE

DENSITE OPTIQUE à 475 nm CUVE 1 cm POUR 100 µg DE PENTOSSES

100 µg de pentoses	D.O. 475 nm	Coefficient par rapport au Xylose
Xylose	1.50	100
Arabinose	1.15	76
Xylose 1 Arabinose 1	1.32	88
Xylose 1 Arabinose 1 Glucose 5	1.385	92.3
Xylose 1 Arabinose 1 Glucose 10	1.45	96.6
Glucose	0.026	1.7



- Composition glucidique

Le taux d'oses totaux est de 51,3 %.

Après purification sur couple de résines échangeuses d'ions, un hydrolysat chlorhydrique (500 mg. dans 50 ml. HCL 2 N pendant 2 heures à 100°C) de la fraction X est étudié :

- par chromatographie sur papier (figuré sur les photographies numéros 11 et 12 p. 77 et 78 de notre mémoire).
- par dosages.

Les chromatographies sur papier Whatman n° 1 en tampon pyridine et sur papier Whatman n° 3 en tampon de Partridge ne révèlent à côté du glucose que deux autres oses : le xylose et l'arabinose. Nous n'avons pas trouvé de rhamnose signalé par KAMM (166) ; quant à l'éventuelle présence de galactose signalé par HOCHSTRASSER (167) dans des fractions d'orge, ou de mannose, il ne nous est pas possible d'émettre un avis, le magma de glucose gêne l'interprétation des chromatogrammes. L'élution des chromatogrammes avant révélation et dosage ultérieur à la méthode au ferricyanure (MONTREUIL (J) SCHEPPLER (N) 168) fournit les résultats suivants :

- Glucose : 90,6 % - Arabinose : 4,6 % - Xylose : 4,8 %

- Les dosages spécifiques du glucose et des pentoses sont évalués à :

- Glucose : 87,6 % - Pentoses : 8,9 %

En rapprochant les valeurs trouvées par les deux techniques, nous proposons comme rapports :

- Glucose : 18 - Arabinose : 1 - Xylose : 1

.../...

- Nature non glycoprotidique de la fraction X

La fraction X préparée selon la technique modifiée d'ANDERSON contient à la fois un groupement protidique et un groupement polysaccharidique. L'auteur Britannique emploie le terme de " *glycoprotéine* " sans en avancer la démonstration. Pour prouver l'éventuelle nature glycoprotidique de ce composé nous avons recherché :

- les oses substitués généralement présents dans les glycoprotéines
- une liaison glycanne-protide. Nous renvoyons à notre mémoire (169) pour les détails expérimentaux.

- La reconnaissance d'oses dérivés du type acide uronique, acide sialique ou osamine, constituerait un indice quant à la nature glycoprotidique de la fraction X:or,

- L'absence d'acide uronique est montrée par la méthode de DISCHE (170).

- L'absence d'osamines est montrée de deux façons :

- par un dosage global selon ELSON et MORGAN (171) après hydrolyse par HCl 4 N à 100°C pendant des temps de 2, 4, 8 heures.
- par un dosage automatique sur auto-analyseur Technicon *

- L'absence d'acides sialiques est indiquée :

- par dosage direct à la diphénylamine de WERNER et ODIN (172)
- par dosage, selon AMINOFF (173) après action de la neuraminidase.

.../...

* Nous tenons à remercier Monsieur CHARRET du Laboratoire de Chimie Biologique de Lille qui a effectué ces analyses.

Pour tenter de trouver une liaison glycanne-protide, et atteindre le ou les maillons glycopeptidiques, nous avons utilisé une dégradation enzymatique à l'aide de pronase. Nous avons reproduit la méthode de IAMASHINA et MAKINO (174) et conduit 4 digestions pronasiques. Après érosion de la partie protidique, nous avons abouti à une fraction purement polysaccharidique.

Donc, par digestion pronasique, nous n'avons pas pu mettre en évidence de maillon de jonction glycanne-protide, la fraction X protéine-sucre ne nous apparaît pas comme une glycoprotéine.

- Molécules adsorbées -

La fraction X est obtenue après une dialyse de trois jours pour éliminer les agents précipitants. Pourtant des petites molécules, qui devraient dialyser, subsistent. Nous avons dosé les polyphénols et les isohumulones selon les méthodes EBC décrites p. 42.

- Isohumulones : 2,3 %

- Polyphénols : 0,12 %

Les polyphénols peuvent être liés à des protéines. Quant aux isohumulones, produits apportés par le houblon on peut supposer qu'elles sont " adsorbées " sur des molécules supports.

.../...

23.4 - CONCLUSION -

- La fraction X est un composé protéine-sucre (protéines 47,0 % et oses 51 %) dont la nature glycoprotidique n'est pas prouvée. L'absence d'oses dérivés du type acides uroniques, sialiques ou osamines et l'échec résultant de l'hydrolyse pronasique pour mettre en évidence des glycopeptides, prouverait le contraire.

- LETTERS (175) étudiant les précipités polysaccharidiques de la bière déclare que les α glucanes semblent préférentiellement être sédimentés avec la fraction protéine polyphénol. Or, à la suite des travaux de CRAMER (176) et de HENNRICH (177), il est connu que les oligosaccharides dérivant de l'amidon peuvent se plier en de larges anneaux formant des cyclodextrines. Ces larges anneaux peuvent insérer d'autres composés stables en solution. La fraction X ne serait-elle pas un complexe polysaccharidique enfermant dans sa trame composés protéiques et phénoliques ?

Nous nous sommes attachés à mieux connaître cette fraction X par des méthodes électrophorétiques et immunologiques.

24 - CARACTERISTIQUES ELECTROPHORETIQUES DE LA FRACTION X

24.1 - INTRODUCTION

A l'exception des électrophorègrammes en veine liquide publiés par SCALLET (178) aucun auteur à notre connaissance n'a présenté de diagrammes simples visualisant des fractions isolées de bière.

.../...

Il a fallu attendre 1971 et les travaux de SAVAGE et THOMPSON (171) de DRAWERT et RADOLA (180) pour obtenir un électrophorégramme de composés isolés de bière. Nous avons repris cette technique en gel électrofocalisation. Comme nous avons apporté des modifications et des méthodes originales de coloration, nous détaillerons le mode opératoire paragraphe 243 p.66.

Auparavant, nous rappellerons nos premières expérimentations :

24.2 - ELECTROPHORESES CLASSIQUES

- *Electrophorèse sur papier*

Des essais réalisés en tampon véronal pH 8,2 - pH 8,65 montrent une traînée colorable à l'amidoschwarz se déplaçant vers l'anode (+). La coloration à l'oxalate d'aniline révèle une tâche à l'emplacement du dépôt.

- *Electrophorèse sur gelose*

En tampon Véronal pH 8,65 - pH 8,2 par coloration à l'amidoschwarz, on décèle deux zones diffuses. La plus importante migre vers l'anode et l'autre vers la cathode. Le changement de la position du dépôt par rapport aux électrodes n'améliore guère l'individualisation des zones.

- *Electrophorèse sur gel de polyacrylamide*

A l'aide de cyanogum en tampon Tris- acide borique de pH 8,4 un gel vertical de polyacrylamide de 5 % à 15 % ne donne pas de séparation valable en présence ou non d'urée 6 M.

- Electrophorèse en acétate de cellulose

Après l'étude systématique de différents tampons, il s'avère que le tampon classique véronal pH 8,65, force ionique 0,05 donne les meilleurs résultats après migration pendant 1h.30, sous une différence de potentiel de 170 V. Pour des dépôts de 10 µl d'une solution à 10 %, la coloration à l'amidoschwarz montre une zone anodique diffuse et une zone cathodique présentant deux bandes.

La coloration P.A.S. (Periodic Acid Schiff) marque les zones cathodiques et montre une tache à l'extrémité de la zone anodique. Ce mode de visualisation utilisé dans le milieu médical pour déceler les glycoprotéines du sérum serait-il un indice quant à la présence de glycoprotides dans la bière ?

La première étape de ce mode de coloration P.A.S. implique une oxydation par l'acide périodique à 7,25 %. L'oxydation ouvre un maillon glucose, permettant alors la fixation du colorant. Les polysaccharides purs doivent donc réagir positivement au P.A.S. Nous avons conduit dans les conditions décrites ci-dessus, une électrophorèse sur acétate de cellulose à l'aide de fractions polysaccharidiques les plus pures possibles : amidon soluble, glycogène, inuline (Merck), amidon de maïs, amilys, produits industriels de la société ROQUETTE * contenant moins de 0,01 % de protéines. Les résultats sont présentés figure 8 page 65. Les polysaccharides non seulement réagissent positivement à la coloration P.A.S. mais aussi se déplacent sous l'effet de la rhéophorèse.

.../...

Nous tenons à remercier Monsieur HUCHETTE pour l'envoi des échantillons.

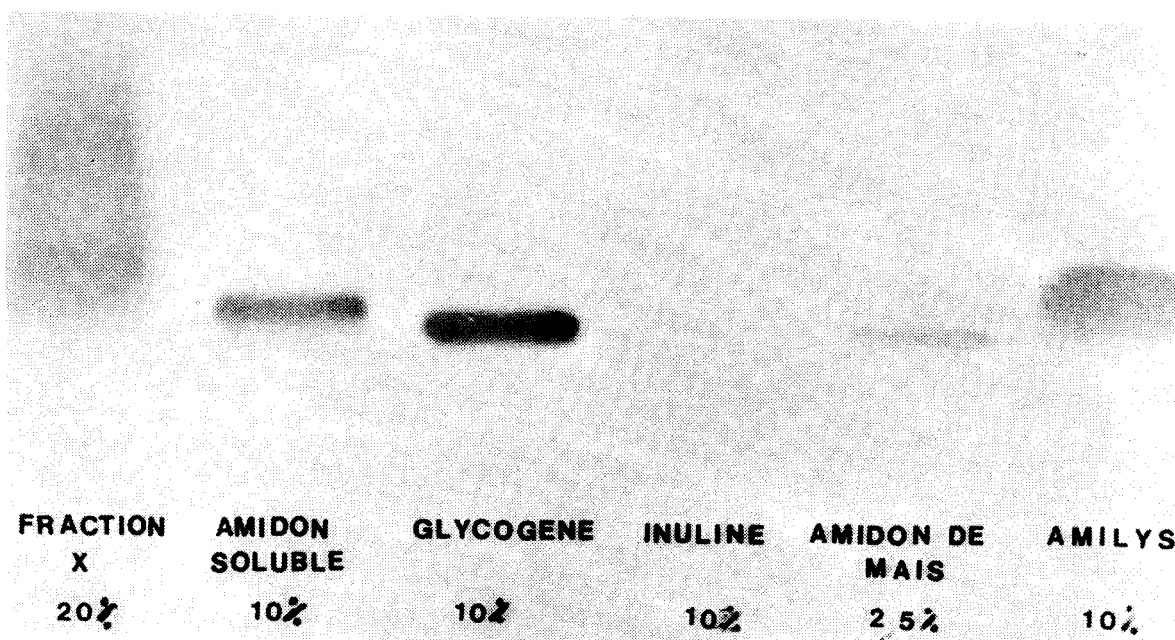


FIGURE 8

ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE
COLORATION PAS.

Véronal pH 8,65 - μ : 0,05 - 10V/cm 1h.30



L'électrophorèse sur acétate de cellulose constituait avant l'avènement de l'électrofocalisation en gel de polyacrylamide le mode de visualisation le moins mauvais pour des fractions issues de bière.

La récente technique d'électrofocalisation en gel a apporté enfin une méthode d'analyse très fine.

24.3 - ELECTROFOCALISATION EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

Les méthodes de gel électrofocalisation ouvrent une nouvelle voie à la séparation et à la caractérisation de protéines.

D'après LAMY (181) la technique en disque est due à DALE et LATNER (182). Mais pratiquement en même temps, en 1968, d'autres auteurs WRIGLEY (183) CATSIMPOOLAS (184) ont publié des méthodes analogues. La technique d'électrofocalisation en gel de polyacrylamide en plaque fut préconisée par ADWEH (185). Les auteurs britanniques SAVAGE et THOMPSON (186) sont les premiers à avoir utilisé fin 1971 ce procédé de fractionnement pour les protéines de bière. Nous avons apporté des modifications à la méthode originale. Nous avons pu colorer les gels de façon spécifique, enfin il nous est possible de les vitrifier et de conserver ainsi des électrophorégrammes sous forme de film.

- Principe de l'électrofocalisation en gel de polyacrylamide -

Un gel à 5 % de polyacrylamide est coulé en présence de 1 % à 2 % (poids/volume) d'ampholines dans la gamme de pH 3.10. Après photopolymérisation, le gel est placé horizontalement dans une cuve à électrophorèse normale.

L'électrophorèse dure 16 à 20 heures à 4°C.

.../...

Les fractions séparées sont alors repérées :

- soit par observation directe des zones précipitées à l'acide trichloracétique ;
- soit par coloration des protides par le bleu Coomassie, selon un mode rapide ou selon un mode lent ;
- les polysaccharides sont repérés par le P.A.S. ;
- enfin, une double coloration est possible combinant bleu Coomassie et P.A.S.

Les gels sont alors vitrifiés pour la conservation.

- Mode opératoire : Constitution du gel

L'utilisation de cyanogum et la polymérisation chimique n'ont pas donné de résultats valables.

Le gel est coulé dans un moule de plexiglass, recouvert d'une plaque de verre soigneusement dégraissée, selon le mode opératoire présenté tableau VI page 68. Après polymérisation le gel se décolle du moule restant adhérent au verre. Les bords latéraux sont découpés à l'équerre. Un gel de dimensions utiles 210 x 180 x 1 mn est obtenu.

Les dépôts, 35 µl d'une solution à 10-20 % sont réalisés dans des fentes de 15 x 1 x 1 mn, à 4 cm de la cathode. La méthode du carré de papier d'1 cm². imprégné de l'échantillon et posé directement sur le gel ne nous a pas donné satisfaction.

- Conduite de l'électrophorèse

L'électrophorèse se déroule pendant 16 à 20 heures à 4°C. La cuve est une cuve normale * tandis que la méthode originale requiert une cuve spéciale.

.../...

* Chemetron 2000 Fournisseur SEBIA - 3, Bd Exelmans PARIS 16°

Les contacts électriques sont assurés par des ponts de papier MN 271 plongeant dans la zone cathodique (-) contenant de l'éthylène diamine 5 % et la zone anodique constituée d'acide phosphorique 0,06 %. Les solutions électrodes de pH 2,8 et 11,3 ont une résistivité comparable de 740 mhos.

- Le tableau VII p. 70 résume les caractéristiques électriques d'une gel électrofocalisation. Les ampholines se répartissent selon un gradient de pH au cours des 5 premières heures. Le voltage de 20V/cm au départ, varie bien que l'on utilise une alimentation stabilisée LKB Ref. : 3371 D. Il atteint après les 16 à 20 heures d'électrofocalisation 23,5 V/cm.

- *Résultats*

A l'arrêt de l'électrophorèse, il se peut que le gel présente des " vagues " ; crêtes de gel perpendiculaires au champ électrique. Il faut alors procéder à la purification de l'acrylamide et du bis acrylamide, selon MAURER (187).

Le gradient de pH à l'intérieur du gel est déterminé de façon indirecte. Le gel est découpé latéralement à l'aide d'un perce-bouchon. Les disques obtenus sont mis en suspension dans 1 ml d'eau distillée pour laisser diffuser les ampholines. Bien qu'en toute rigueur, il faudrait les lire à 4°C, température de l'électrofocalisation, les pH sont mesurés à 20°C. Le gradient de pH présenté figure 9 p. 73 enregistré pour l'utilisation d'ampholines dans la gamme 10-3 n'est pas rigoureusement linéaire. THOMPSON (188) incrimine le CO₂, qui se dissolverait dans l'eau de diffusion. Quant à VESTERBERG (189) il obtient un gradient quasi

TABLEAU VII

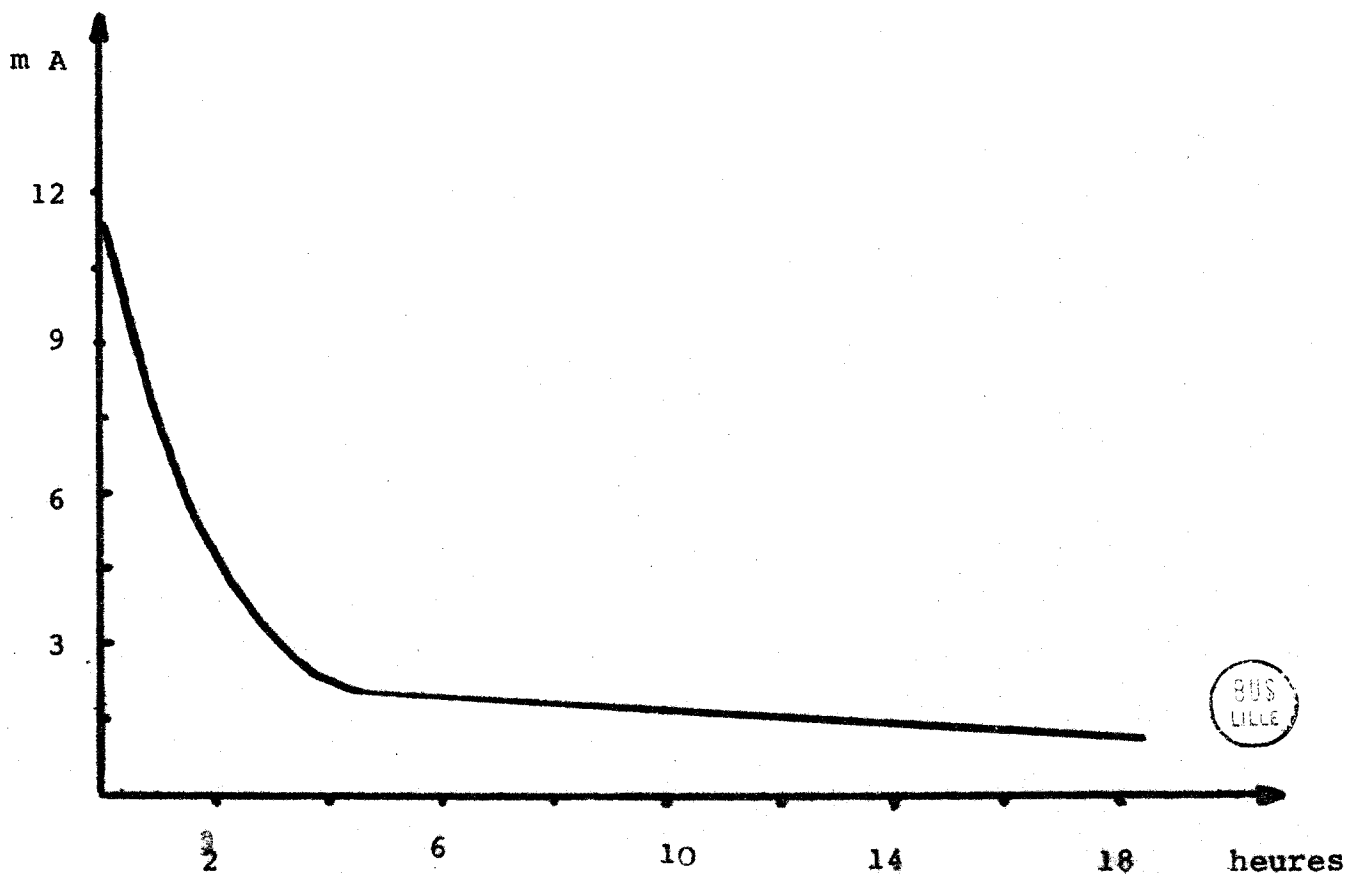
CARACTERISTIQUES ELECTRIQUES D'UNE GEL
ELECTROFOCALISATION

<u>ELECTRODES</u>	anode +	H_3PO_4	0,06 %	2,8	mhos	580
	cathode -	$C_2H_8N_2$	5 %	11,3		

GEL : 210 x 180 x 1 mm.

<u>Temps</u>	<u>E</u>	<u>i</u>	<u>R</u>
heure	Volt/cm	mA/cm	KΩ
0	20	0,78	60
4	23,5	0,07	-
20	23,5	0,06	300

CHUTE D'INTENSITE EN FONCTION DU TEMPS



linéaire entre pH 4,0 et 8,0 en mélangeant plusieurs gammes d'ampholines de pH 3,10 - 5,7 - 4,6 - 8,10 respectivement dans les proportions : 7 - 1 - 1 - 1

- *Visualisation des fractions*

- Malgré son excellent pouvoir de résolution, l'électrofocalisation en gel de polyacrylamide n'a pas eu le retentissement prévisible. Nous y voyons trois raisons :

- son prix (l'analyse de 6 échantillons revient à 20,00 francs) ;
- l'absence de méthodes de coloration ;
- la conservation difficile du gel qui se présente toujours sous forme d'une masse visqueuse.

- En effet, de nombreux auteurs, dont RILEY (190), ADWEH (191), SAVAGE (192) ont signalé des difficultés de coloration des protides séparés. La présence d'ampholines intégrées dans le gel provoque des réactions de précipitation.

- Cependant, nous avons pu mettre au point des techniques de coloration pour des extraits d'orge et de bière, transposables au sérum humain et à l'adialysable urinaire. Enfin, après l'expérimentation, il nous est possible de vitrifier le gel, qui se présente alors sous la forme d'un film archivable.

Nous disposons donc de quatre modes de visualisation :

- Observation directe après précipitation à l'acide trichloracétique (ATCA) ;
- Coloration de substances P.A.S. (Periodic Acid Schiff) positives ;
- Coloration de protides par le bleu de Coomassie ;
- Enfin, une double coloration est réalisable : P.A.S. et bleu Coomassie.

.../...

Ces techniques constituant un apport original, nous détaillerons leurs modes opératoires. Le fractionnement de l'entité mousse positive X est présenté sur la photo 9 p. 73.

- Observation directe

Après une heure, les bandes protéiques précipitées par l'acide trichloracétique 12,5 % sont photographiées sur fond noir à éclairage rasant. Des bandes de la Fraction X, issue de bière irisées de couleur brune témoignent de la présence de polyphénols.

Au total 25 bandes peuvent être dénombrées sur les 20 cm. de longueur du gel témoignant de la grande hétérogénéité de cette entité mousse positive X.

- Coloration des substances P.A.S. positives

La coloration P.A.S. (Periodic Acid Schiff) est utilisée dans le domaine médical pour révéler les glycoprotéines du sang.

Bien que délicate, nous obtenons des résultats reproductibles à l'aide du protocole expérimental, schématisé tableau VIII p. 74.

Les fractions issues de bière présentent de nombreuses bandes P.A.S. positives. Pour la fraction X, 10 sont dénombrables et sont réparties sur toute la longueur du gel. Suite aux restrictions apportées page 64, sur l'interprétation à donner à ce caractère P.A.S. positif, nous avons reconduit une gel électrofocalisation sur des fractions purement polysaccharidiques. Ces fractions se présentent alors sous forme de tâche P.A.S. positive diffusant dans l'ensemble du gel. En aucun cas il n'apparaît de bande qui pourrait

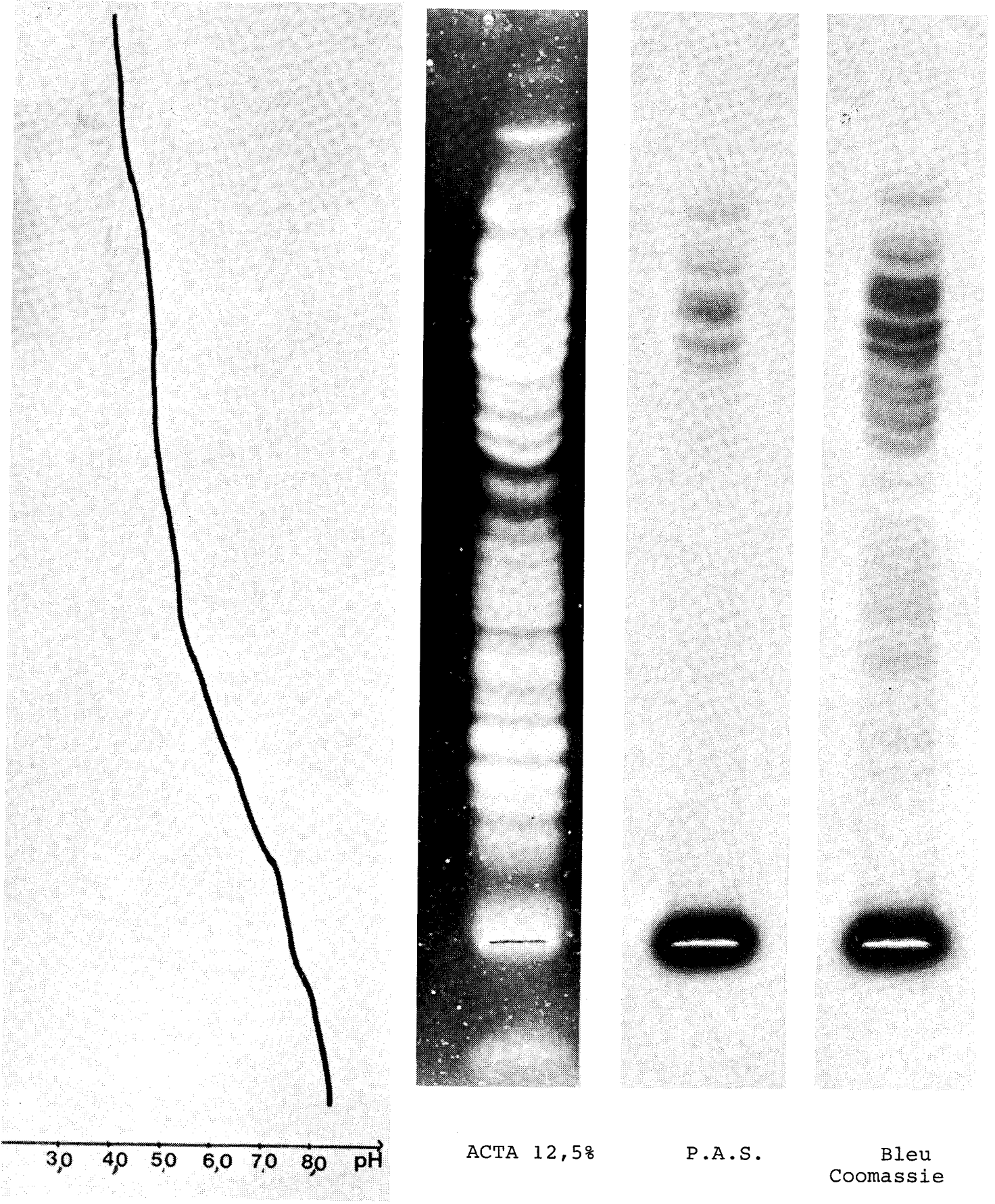


FIGURE 9
ELECTROFOCALISATION
EN GEL DE POLYACRYLAMIDE
DE LA FRACTION X

TABLEAU VIII

GEL ELECTROFOCALISATION

COLORATION P.A.S.

MANIPULATION DU GEL	TEMPS (mn)
- Fixation des protéines et élimination des ampholines	
- Lavage du gel dans ATCA 12,5%	30 à 60
- Rinçage à l'eau distillée	0,25
- Oxydation périodique	
- Acide périodique 1% en solution acétique à 3% (fabriqué extemporanément)	50
- Lavage : eau distillée	
Le rinçage est vérifié par Ag NO_3 0,1 M	
- Coloration de Schiff	
- Réactif de Schiff	50
- Lavage : métabisulfite de Na 0,5%	3 x 10
- Rinçage à l'eau distillée jusqu'à élimination de l'excès de colorant	

COMPOSITION DU REACTIF DE SCHIFF *

4,5 g Fuchsine basique pour 1.500 ml

. Après dissolution ajouter :

9,6 g Métabisulfite de K puis

40 ml H_2SO_4 6 N

. Bien mélanger et laisser reposer 1 nuit à 4° C

. Décoloration par 3 g. de charbon actif

. Filtration sur Büchner

* Ce réactif jaune paille, très sensible à l'oxydation est conservé à 4° C à l'obscurité.

traduire la formation de complexes de molécules d'ampholines et de polysaccharides purs.

- Coloration des protides

Le bleu Coomassie (Coomassie Brilliant Blue Gurr) permet une coloration satisfaisante. Deux techniques sont proposées par MAURER (193), l'une lente nécessitant un séjour d'une nuit dans le colorant, l'autre rapide, moins résolutive, mais qui permet d'interpréter les électrophorégrammes 1 h.20 après la fin de la migration. Nous utiliserons à la suite d'essais sur des extraits d'orge présentés figure 27, p. 135, la méthode lente.

Le tableau IX précise les protocoles expérimentaux de ces modes de coloration.

Les fractions issues de bière, se colorent au bleu Coomassie, 27 bandes sont dénombrées. En outre, il est à remarquer que certaines bandes sont P.A.S. positives et fixent le Bleu Coomassie. Cette double coloration repose le problème de la présence de glycoprotides dans la bière. La technique de gel électrofocalisation nous permet d'envisager le problème sous un angle nouveau, discuté en conclusion de ce paragraphe.

Les gels électrofocalisation colorés au bleu Coomassie sont conservés sans perte de couleur en milieu acétique 10 %.

- Coloration double : P.A.S. et Bleu Coomassie

Il est possible de réaliser une coloration double P.A.S. Bleu Coomassie difficilement réalisable sur d'autres supports.

Nous conduisons les colorations de façon classique en commençant par la coloration P.A.S. définie ci-dessus, puis par la coloration Bleu Coomassie, méthode lente.

- Conservation des gels électrofocalisation

Pour réduire la consommation d'ampholines, produits coûteux, nous coulons des gels d'1 mm d'épaisseur. La teneur en 5 % d'acrylamide donne un gel flexible, fragile. Il est possible de vitrifier ce gel en coulant au-dessus de l'agarose à 1 % et en le recouvrant ensuite d'une feuille de papier ou d'acétate de cellulose humide. Après trois jours, les gels sont secs, ils se décollent et se présentent sous forme de film.

La vitrification du gel est réalisée plus simplement, en plaçant le gel après coloration dans du glycerol à 2 % et en disposant au-dessus une feuille de papier cellophane trempée dans du glycerol à 3 %.

- Conclusion

Grâce à la technique de gel électrofocalisation et aux méthodes de colorations spécifiques que nous avons mis au point, nous disposons maintenant d'une technique très fine d'analyse de fractions d'orge et de bière.

- Cette nouvelle méthode analytique ouvre de nouveaux horizons à la recherche brassicole. Pour la première fois, des fractions issues de bière sont visualisables facilement. Un problème reste néanmoins posé, les ampholines ne forment-elles pas des complexes avec certaines fractions ? Pourtant il faut mettre en exergue les points suivants :

.../...

- la méthode est parfaitement reproductible ;
- la variation de la position des dépôts, la variation de la teneur en ampholines dans le gel conduisent toujours aux mêmes diagrammes ;
- si, après une première électrofocalisation en gel, on élue une zone que l'on soumet à une seconde analyse, les résultats restent inchangés.

Enfin, des essais préliminaires montrent d'autres possibilités inexplorées telles que :

- l'insertion d'une solution à analyser dans toute la masse du gel ;
- l'inclusion d'un gel polymérisé contenant un échantillon dans une nouvelle plaque ;
- la séparation bidimensionnelle.

25 - CARACTERISTIQUES IMMUNOLOGIQUES DE LA FRACTION X

25.1 - INTRODUCTION - PREPARATION DES IMMUNSERUMS

- Les techniques utilisées d'immunodiffusion et d'immuno-électrophorèse ont nécessité la fabrication d'immunsérum.

- Nous avons préparé :

- un immunsérum anti-bière normale ;
- un immunsérum anti-bière pur malt.

Le milieu injecté pose des problèmes. En effet, d'une part, la bière est un milieu glucidique et d'autre part, des composés polyphénoliques ou tanniques peuvent induire des phénomènes

TABLEAU IX

GEL ELECTROFOCALISATION
COLORATION DES PROTIDES

Méthode au bleu Coomassie

<u>METHODE LENTE</u>	20°C	TEMPS
- Fixation des protéines et élimination des ampholines		
. A.T.C.A. 12,5%		
ou		30 à 60 mn
. Acide sulfosalicylique 20%		
- Coloration		
. Bleu Coomassie R 0,01% dans un mélange éthanol,		
eau, acide acétique 7.11.2		1 nuit
- Décoloration		
. Sous agitation dans un mélange éthanol, eau, acide		
acétique, glycérol 5:13:2:5		2 heures
<u>METHODE RAPIDE</u>	65°C	
- Fixation et élimination des ampholines		
. Voir ci dessus		
- Coloration		
. Bleu Coomassie R. 0,2% dans un mélange éthanol, eau,		
acide acétique 45:45:10		30 mn
- Décoloration		
. Mélange éthanol, eau, acide acétique 25:65:10		20 mn
<u>VITRIFICATION</u>		
- Rinçage eau distillée		3 x 20 mn
- Glycérol 3%		5 mn
- Papier cellophane imprégné de glycérol 3% posé sur le gel.		

d'enkystement ou d'abcès. Malgré tout, les lapins supportent bien l'injection du mélange de 1 ml d'adjuvant de FREUND et de 1 ml. de bière reconstituée après lyophilisation et concentrée 2 fois.

- La fraction X issue de bière et intéressante pour la mousse, a été utilisée pour préparer un immunosérum anti-fraction X.

- Enfin, pour établir une éventuelle filiation entre les composés mousse positifs et l'orge, nous avons fabriqué un immunosérum anti-orge E.N.S.I.A.. En outre, l'EBC (194) met à la disposition des chercheurs, deux immunosérums anti-orge, présentés sous forme lyophilisées, préparés par GRABAR (195) et ENARI (196) Le premier immunosérum standard EBC obtenu à partir d'un lapin équivalait à l'immunosérum E.N.S.I.A. Par contre, le second sérum anti-malt anti-orge, obtenu récemment par immunisation d'un cheval donne une meilleure résolution.

25.2 - CARACTERISTIQUES DE LA FRACTION X PAR IMMUNODIFFUSION

Des essais préliminaires d'immunodiffusion classique et d'immunodiffusion selon OUCHTERLONY (197) montre que la fraction X réagit immunologiquement.

- Contre les immunosérums anti-bière pur malt et anti-bière normale, une réaction est visible pour une concentration aussi faible que 1,25 %. La meilleure résolution est obtenue pour une concentration de 10 et 15 %.

- Contre l'immunosérum EBC cheval, anti-malt anti-orge, la fraction X montrent plusieurs arcs à des concentrations supérieures à 2,5 %.

La fraction X riche en polysaccharides réagit en immunodiffusion contre les sérums anti-bière et anti-orge. Par extension, nous avons injecté cette fraction X en solution à 10 % à des lapins. Ces animaux donnent un immunosérum anti-fraction X. Un extrait d'orge et la fraction X réagissent dès 1,25 % contre cet immunosérum alors qu'il faut des concentrations supérieures à 30 mg/ml de bière lyophilisée pour obtenir une réponse.

Les expériences préliminaires de diffusion montrent donc le pouvoir antigénique de composants de la fraction X.

25.3 - CARACTERISTIQUES IMMUNOELECTROPHORETIQUES DE LA FRACTION X -

Les immunoélectrophorèses sont réalisées selon la méthode classique de GRABAR et coll. (198) modifiée par SCHEIDEGGER (199). En tampon véronal pH 8,2 μ : 0,05, l'électrophorèse sur lame de microscope en gélose à 2,5 % dure 2 heures dans un champ électrique de 4,5 V/cm. Après réactions immunologiques et élimination de l'excès de sérum, les plaques sont colorées à l'amido-Schwarz.

- Résultats

Les photos présentées figure 10 illustrent les réactions immunologiques de la fraction X, contre les immunosérums, anti-bière normale, anti-bière pur malt, anti-fraction X. (p. 82).

Contre le sérum anti-bière normale trois arcs sont discernables. L'arc majeur est anodique, un autre arc très resseré sur lui-même entoure le dépôt quant au troisième arc, très peu marqué, il est très légèrement cathodique.

Contre l'antisérum bière pur malt la fraction X réagit en donnant deux arcs. L'arc majeur anodique apparaît bifide, l'autre arc mineur est aussi cathodique, par contre, l'arc entourant le dépôt n'existe plus. L'utilisation de grains crus (maïs) pourrait induire d'après DONNHAUSER (199bis) la formation de ce troisième arc existant pour la bière normale. Il convient de rester circonspect, les qualités des immunosérums anti-bière sont très variables selon les lapins. Pour répondre de façon formelle à la question, il nous aurait fallu dériver notre étude sur l'étude d'extrait de maïs.

Contre l'antisérum anti-fraction X, un arc très anodique est révélé.

25.4 - DOSAGES QUANTITATIFS DE LA FRACTION X PAR DES METHODES IMMUNOLOGIQUES -

- Techniques utilisées

Le dosage de fractions par des méthodes immunologiques peut se rattacher à deux types :

- méthode par diffusion dans un gel contenant l'immunosérum ;
- méthode par immunoelectrophorèse quantitative.

Le principe de l'immunoelectrophorèse quantitative est dû à LAURELL (200) ; l'antigène migre sous l'effet d'un champ électrique dans un gel contenant l'immunosérum. Pour un anti-sérum donné, les arcs de précipitation dessinent un cône dont la hauteur

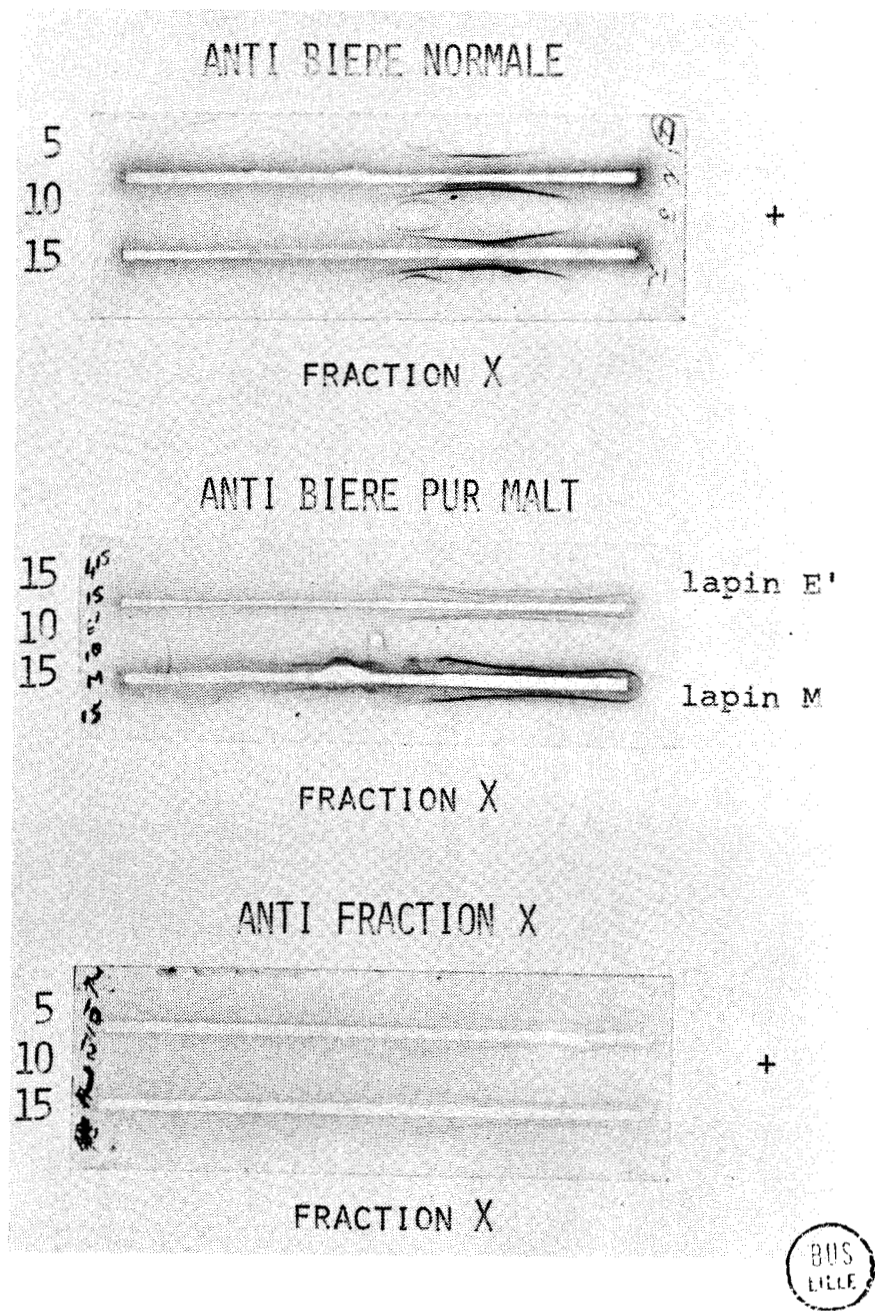


FIGURE 10
IMMUNOELECTROPHORESSES
DE LA FRACTION X
Véronal pH 8,2 μ 0,05 4V/cm 2 h.

est proportionnelle à la quantité d'antigènes.

- En recherche brassicole, deux auteurs ont repris cette technique : LOISA et COLL. (201) pour la détermination quantitative des protéines intervenant dans la formation des troubles de la bière; GRABAR et DAUSSANT (202) pour étudier la réaction des bières de mousse et résiduelle contre un immunosérum anti-trouble de la bière.

- Parallèlement à la technique originelle de LAURELL (203) nous avons utilisé une autre méthode quantitative, baptisée technique de LOISA modifiée E.N.S.I.A.

Pour économiser les immunosérums, nous avons inversé la répartition antigène et anticorps. L'échantillon à analyser est inclu dans le gel coulé sur la plaque de microscope. 5 μ l d'immunosérum sont déposés dans un puits de 2 mm. de diamètre. Pour que les rapports antigènes anticorps soient convenables, nous diluons l'immunosérum au 1/2 et au 1/3 par du tampon véronal pH 8,2.

- Résultats

Les méthodes de dosage quantitatif par des réactifs immunologiques sont illustrées par les photos n° 11 p. 85 Elles appellent les commentaires suivants :

- L'immunodiffusion radiale montre (figure 11 a p. 85) que la fraction X réagit en solution à 2, 5, 10, 15, 20 % pour des dépôts de 5 μ l, dans une gélose contenant 5, 10, 20 % d'immunosérum anti-orge anti-malt EBC. Les meilleurs résultats sont obtenus dans une gélose contenant 10 % d'immunosérum EBC. Trois cercles

.../...

concentriques sont décelés et pour des concentrations de la fraction X supérieures à 10 %, deux cercles se dédoublent. Le composé X contient donc au moins trois constituants réagissant avec l'immunsérum anti-orge.

- L'immunoélectrophorèse quantitative selon LAURELL (204) reprise par LOISA (205) nécessite de couler une gélose contenant 5,10 ou 20 % d'un immunsérum. Les meilleurs résultats sont enregistrés pour une gélose contenant 10 % d'un immunsérum anti-fraction X les dépôts représentant 5 μ l d'une solution X à 10, 5, 2 %. Deux cônes de hauteur proportionnelle aux dépôts sont visibles sur la photo 11 b p. 85. Pour mener à bien cette technique, nous utilisons de l'indubiose 37°C * à 2 %. L'électrophorèse a lieu pendant 18 heures à 4°C sous 4,5 V/cm. Pour éviter des phénomènes parasites de réophorèse, une demi-heure après le départ de la migration, la gélose est recouverte d'un plastique Saran wrap.

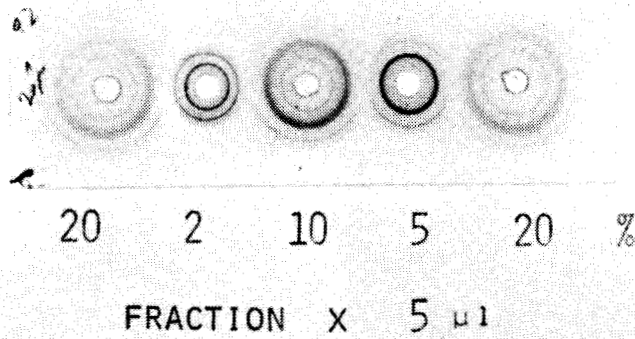
- Pour économiser les précieux immunsérums antifraction X nous avons modifié la technique d'immunoélectrophorèse quantitative. L'échantillon à analyser la fraction X est coulé dans de l'indubiose 37°C fabriquée en tampon véronal pH 8,2 μ 0,05. Le dépôt est alors constitué de 5 μ l de l'immunsérum anti-fraction X, tel quel ou dilué 2 ou 3 fois. Les photos 11 c montrent la sensibilité et la finesse de la technique. Deux cônes sont décelés pour des échantillons coulés dans le gel représentant 0,05 ml, 0,02 ml et 0,01 ml de fraction X à 10 % dans le tampon d'électrophorèse. La migration électrophorétique se déroule comme citée ci-dessus.

Grâce aux techniques immunologiques, nous disposons

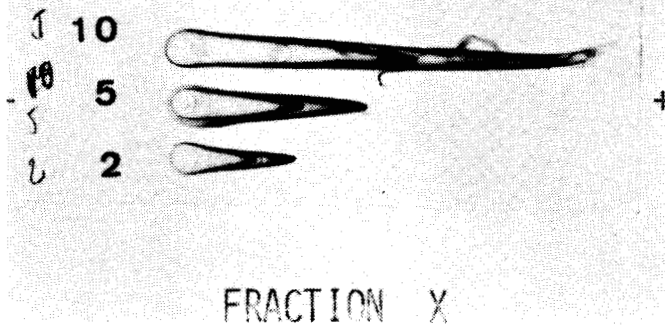
.../...

* Fournisseur : l'Industrie biologique française : 36-49, Quai du Moulin de Cage - 92 GENNEVILLIERS

ANTI ORGE E.B.C. 0.2 ml



ANTI FRACTION X 0.2 ml



FRACTION X DANS LE GEL

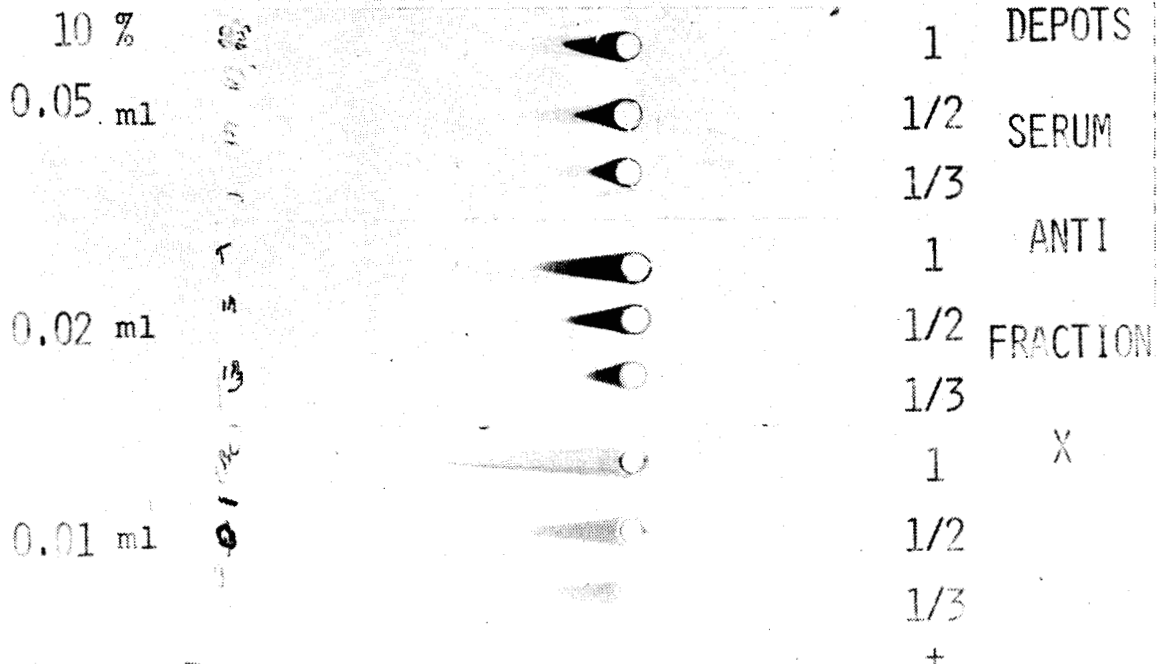


FIGURE 11

DOSAGES QUANTITATIFS DE LA FRACTION X
PAR METHODES IMMUNOLOGIQUES

- 11a - Immunodiffusion radiale
- 11b - Immunoélectrophorèse quantitative selon LAURELL
- 11c - Immunoélectrophorèse selon LOISA modifiée ENSIA



d'un outil qui pourrait permettre de doser des composés de la fraction X.

25.5 - CONCLUSION

La fraction X possède donc des constituants antigéniques Elle réagit contre des immunsérums anti-bière normale, anti-bière pur malt et anti-orge. Grâce à l'immunsérum anti-fraction X, des dosages pourraient être abordés soit en immunodiffusion, soit en immunoélectrophorèse quantitatives. L'importance des caractéristiques immunologiques de cette entité mousse positive sera discutée ultérieurement dans le paragraphe : filiation entre la fraction X de la bière et les protéines de l'orge

26 - CONCLUSION

Pour aborder le problème de la mousse de la bière, nous avons pensé concentrer les facteurs mousse positifs en réalisant de la bière de mousse. Le moussage est assuré en continu à l'aide d'une tour de mousse. Pour conserver cette bière de mousse et constituer un stock homogène, nous la lyophilisons.

La bière reconstituée concentrée 3 fois, est fractionnée chimiquement. Nous utilisons une méthode de relargage à l'éthanol. Une fraction dénommée fraction X est obtenue à raison de 75 mg par litre de bière initiale.

.../...

Cette entité se révèle au test de moussage E.N.S.I.A., comme une fraction mousse positive, très intéressante tant pour la formation que pour la stabilité de mousse.

- Du point de vue chimique, la fraction X contient à côté de molécules vraisemblablement adsorbées (isohumulones et polyphénols) 47 % de protéines et 51 % d'oses totaux dans le rapport glucose 18, Arabinose 1, xylose 1. La nature glycoprotidique des composés de cette fraction reste posée : Les oses habituellement présents dans les glycoprotides (acides uroniques, osamines, acides sialiques) n'existent pas.

Une hydrolyse pronasique menée dans des conditions peut-être trop drastiques, conduit à une fraction polysaccharidique pure. Cependant, en électrophorèse une coloration P.A.S. positive est possible.

- L'absence de méthode électrophorétique permettant de visualiser des fractions issues de bière, nous a conduit à nous intéresser, fin 1971, à la technique d'électrofocalisation sur gel de polyacrylamide en plaque. Pour pallier les difficultés de visualisation, nous avons mis au point sur ce support (gel de polyacrylamide 5 %, ampholines 1 %) des méthodes de colorations spécifiques. De même pour la conservation, nous avons trouvé une technique de vitrification des gels. La gel électrofocalisation révèle combien l'entité X est hétérogène. Dans toute la gamme de pH 10-3,25 bandes sont révélées. Bien que le problème de complexes ampholines fraction de la bière soit posé, il est certain que la reproductibilité de la technique de gel électrofocalisation permet d'affirmer que cette méthode constitue un excellent moyen analytique.

- L'immunoélectrophorèse nous apporte de précieux renseignements.

Grâce à l'EBC, nous disposons à côté de l'immunsérum anti-orge E.N.S.I.A., d'un sérum cheval anti-orge anti-malt. La fraction X réagit contre cet immunsérum en donnant, pour des solutions à 20 %, 5 arcs en diffusion radiale.

Nous avons risqué l'injection à des lapins, de bières normale et pur malt reconstituées après lyophilisation. Nous obtenons des immunsérums anti-bière normale et anti-bière pur malt comparables. De même, la fraction X, induit la formation d'anticorps, or la fraction X est issue de bière de mousse. Dans la bière résultant du drainage de la mousse, il subsiste donc des composés antigéniques.

- Enfin, à l'aide de l'immunsérum anti-fraction X, nous avons pu conduire des essais préliminaires d'immunoélectrophorèse quantitative, soit en faisant migrer l'échantillon dans une gélose imprégnée d'immunsérum, soit à l'inverse, en faisant migrer l'immunsérum dans une gélose contenant l'échantillon.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre : Etude d'une fraction mousse positive est rassemblé au tableau synthétique X page 89.

3° - FRACTIONNEMENT DE L'ENTITE
MOUSSE POSITIVE X

La fraction X obtenue par relargage à l'éthanol de bière de mousse rassemble les composés mousse positifs responsables de la formation et de la stabilité de la mousse.

Nous avons cherché à fractionner cette entité mousse positive de façon à mieux localiser les composés moussants.

Quatre types de techniques ont été utilisées :

- le tamisage moléculaire ;
- la chromatographie d'échanges d'ions ;
- l'électrophorèse préparative ;
- l'électrofocalisation.

A notre avis, les électrofocalisations en colonne et sur gel de polyacrylamide ont apporté les meilleurs résultats. Pourtant ces méthodes ne sont pas préparatives. Pour isoler à partir de la fraction X, mélange biologique complexe, un constituant purifié, il faudra coupler plusieurs techniques, en tenant compte des dernières conclusions apportées par l'électrofocalisation.

Bien que nous ne soyons pas parvenus à isoler un constituant remarquable vis-à-vis de la mousse par les trois premières techniques, nous les citerons car elles permettent de comparer nos travaux avec ceux d'ANDERSON (204), et elles constituent un travail de première approche indispensable à la poursuite de nos recherches.

31 - FRACTIONNEMENT DE L'ENTITE MOUSSE POSITIVE X PAR TAMISAGE MOLECULAIRE

31.1 - INTRODUCTION

Les industriels brasseurs imputent aux protéines adialysables et de haut poids moléculaire de la bière la responsabilité de la formation et de la stabilité de la mousse. Or en fait, peu de chercheurs ont déterminé le poids moléculaire de fractions issues de bière. SCALLET (voir p. 19) classe les poids moléculaires des protéines précipitées de bière par SO_4 $(\text{NH}_4)_2$ entre 34 000 et 73 000. ANDERSON (Voir p. 23) utilise le tamisage moléculaire sur gel de sephadex. Une fraction exclue de G 25 est étudiée par ultracentrifugation. D'après l'auteur, elle contient des substances " presque homogènes " de poids moléculaire d'environ 10 000. Le britannique poursuit l'étude de ce composé en utilisant des résines échangeuses d'ions avec ou sans traitement par adsorption.

Le travail d'ANDERSON constituant la seule référence a servi de point de départ à nos recherches. Nous avons voulu reproduire les résultats présentés en 1963 et 1966, puis nous avons élargi l'étude en gel filtration en utilisant plusieurs gels : G25, G50, G75, de façon à connaître la distribution dans l'échelle des poids moléculaires des composés de l'entité mousse positive X.

31.2 - MODE OPERATOIRE

400 mg de la fraction X sont dissous dans 10 ml d'eau distillée. Après centrifugation, ils sont déposés sur une colonne

.../...

chromatographique de 2 x 40 cm thermostatée à 4°C. La colonne est éluée par le haut à raison de 25 ml/heure. L'éluat passe par un absorptiomètre enregistreur à 280 nm et est collecté par fractions de 6 ml. Les oses sont dosés sur chaque fraction par le phénol sulfurique. Une courbe d'absorption entre 400 et 220 nm est réalisée sur les pics chromatographiques pour déceler d'éventuelles nucléoprotéines ou des composés renfermant de l'acide férulique.

Les fractions regroupées et lyophilisées sont alors soumises :

- au test E.N.S.I.A. de moussage ;
- aux dosages chimiques d'oses totaux et de protéines ;
- à l'électrophorèse sur acétate de cellulose ;
- à l'immunoélectrophorèse.

31.3 - RESULTATS

La figure 12 p. 93 présente un diagramme d'élution d'une colonne de Sephadex G25 super fine. Environ 75 % de la poudre déposée est récupérée après lyophilisation. Le pic A d'exclusion représente près des 3/4 de la poudre récupérée. Le composé B2 brun très sombre, très hygroscopique est difficilement récupérable.

Aucune fraction ne présente de pic d'absorption autre que le pic " protéique à 280 nm". L'assertion d'ANDERSON concernant la présence de nucléoprotéines et d'acide férulique, repérés par un spectre d'absorption à 254 nm et 320 nm, n'est pas vérifiée.

Le pouvoir moussant des diverses fractions est apprécié par le test E.N.S.I.A.

.../...

GEL FILTRATION

G 25 SUPER FINE

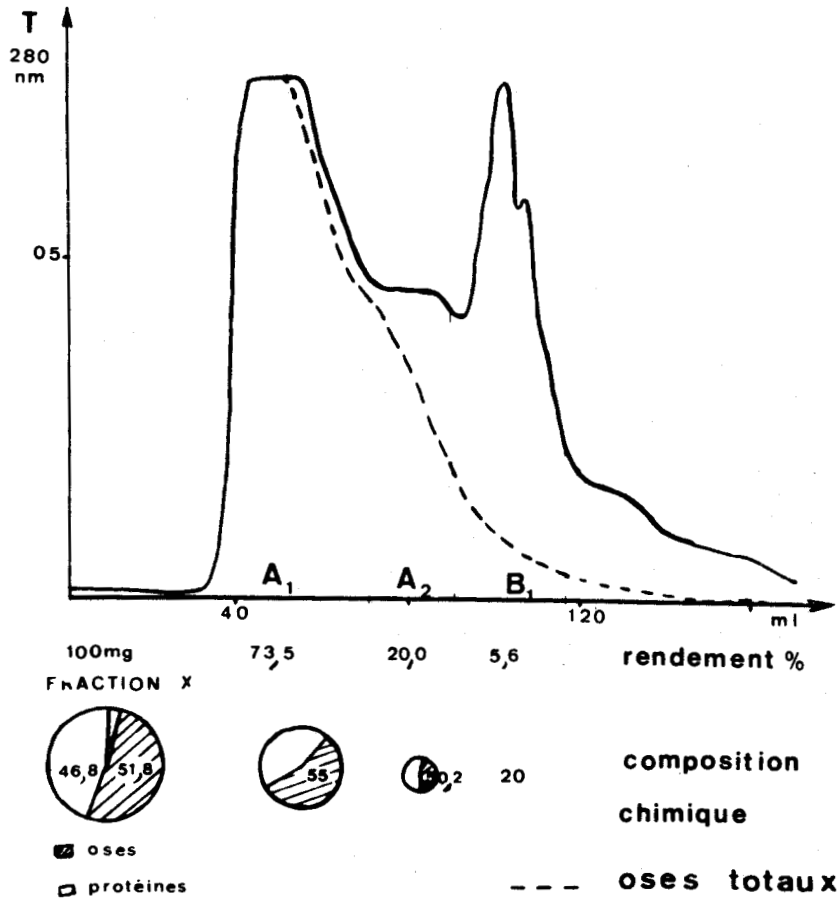


FIGURE 12

GEL FILTRATION

Elution d'une colonne de 2 x 40 cm
de G 25 Superfine

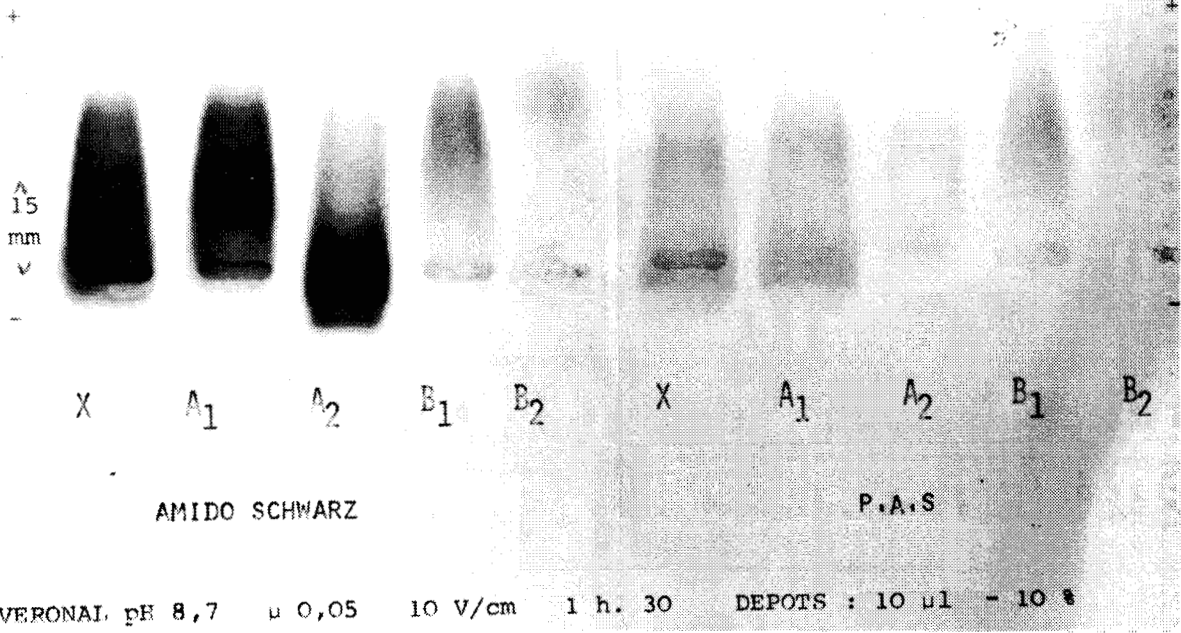


Les photos rassemblées figure 14 p. 96 montrent le comportement différent des diverses fractions quant à la formation et la stabilité de mousse. La fraction A est la plus moussante, mais ses caractéristiques sont voisines de celles de l'entité moussante X constituant le composé de départ. Les électrophorèses sur acétate de cellulose et les immunoélectrophorèses figurées p.95 (figure 13) ne différencient guère les diverses fractions. En immunoélectrophorèse, les quatre fractions réagissent en solution à 10 % contre l'immunsérum anti-fraction X en donnant un arc anodique. Par contre, les fractions B₁ et B₂ ne réagissent plus en solution à 5 %, alors que les constituants A₁ et A₂ donnent toujours un arc à cette concentration. En modifiant les conditions expérimentales du tamisage moléculaire sur G25, le fractionnement interprété à l'aide du diagramme d'éluion et de l'électrophorèse sur acétate de cellulose n'est pas amélioré. Par contre, l'emploi d'autres gels tels que G50, G75, G100, permet des fractionnements ultérieurs de la fraction A₁, mais le pouvoir moussant des sous-fractions obtenues est moindre que celui du composé A₁.

La fraction initiale X et la sous-fraction A₁ sont traitées alors par le stabifix selon ANDERSON. Le stabifix est un adsorbant synthétique, utilisé industriellement pour assurer une meilleure stabilité colloïdale à la bière. Si comme l'affirme l'auteur britannique, le stabifix fixe bien 30 % des protéines de l'entité X, il n'en résulte pas pour autant une amélioration des qualités de mousse, tant de la fraction brute X que de la sous-fraction A₁. Les photos de la figure 14 le prouvent.

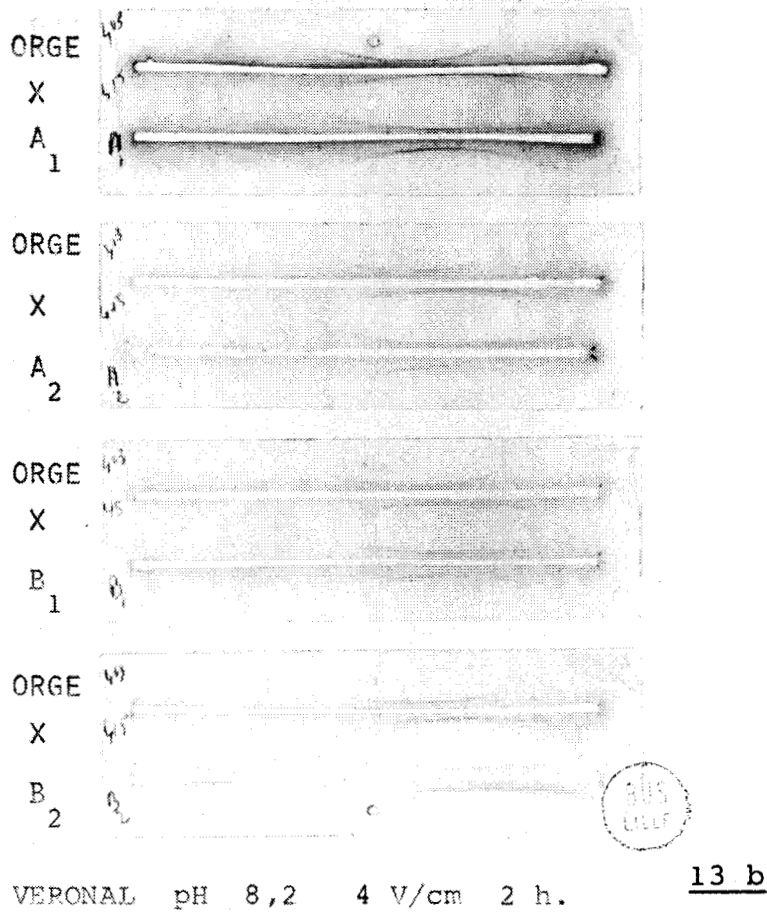
.../...

GEL FILTRATION G 25 SUPERFINE



13 a

ANTI FRACTION X



13 b

FIGURE 13

ETUDE DES FRACTIONS ISSUES DE GEL FILTRATION

13a - Electrophorèse sur Acétate de Cellulose pH 8,7 μ 0,05 10V/cm 1 h 30
13b - Immunoelectrophorèse pH 8,2 μ 0,05 4V/cm 2 h.

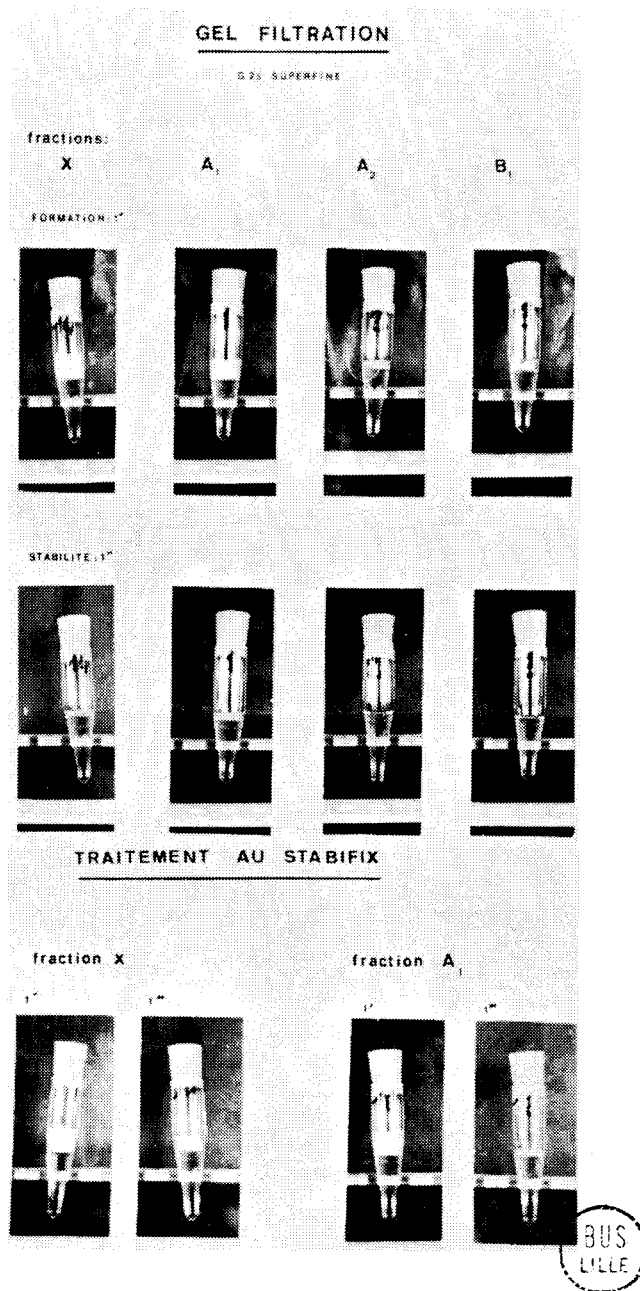


FIGURE 14
POUVOIR MOUSSANT DES
FRACTIONS ISSUES
DE GEL FILTRATION

31.4 - CONCLUSION

Si la technique de tamisage moléculaire n'apparaît pas comme une méthode préparative d'une sous-fraction exceptionnelle du point de vue mousse, elle permet de débarasser l'entité de départ X de substances peu moussantes. La fraction A₁ exclue sur Sephadex G25 rassemble les qualités mousse positives, elle nous apparaît beaucoup plus hétérogène que ne le pense ANDERSON/. Le traitement au stabifix, s'il fixe préférentiellement des protéines n'apporte pas, à notre avis, d'amélioration de la mousse.

Le tamisage moléculaire peut se révéler intéressant couplé à une autre méthode, le fractionnement par échanges d'ions par exemple.

32- FRACTIONNEMENT DE L'ENTITE MOUSSE POSITIVE X PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGES D'IONS

32.1 - INTRODUCTION

La fraction X, mousse positive, est préparée par relargage chimique à l'éthanol (voir page 50). Elle contient 47% de protéines (N x 6,25 par Kjeldahl) et 51% d'oses totaux.

Si une fraction purement polysaccharidique est co-précipitée avec les protides, une technique de chromatographie d'échanges d'ions devrait permettre d'éliminer une fraction neutre sans protides. En recherche en brasserie, les celluloses modifiées ont été utilisées pour le fractionnement des albumines de l'orge (ENARI et al (205), PREAUX (206) et l'étude des fractions basiques de l'orge (MAZERON (207)). Pour l'étude de composés de la bière, les seules référen-

ces sont apportées par NUMMI et coll. (208) pour l'étude des composés du trouble et par ANDERSON (voir page 27). Rappelons qu'ANDERSON a attribué à des composés 30% glucidique, 70% protidiques, baptisés hâtivement glycoprotéines, un pouvoir moussant important. Dans le cadre de nos travaux de première approche, nous avons repris des expérimentations similaires.

32.2 - MODE OPERATOIRE

- Deux types de celluloses modifiées ont été utilisés :

- la D.E.A.E. cellulose échangeur d'anions.
- la C.M. cellulose échangeur de cations.

Elles sont traitées selon les modes opératoires préconisés par la firme WHATMAN *.

- La DEAE cellulose est utilisée pour fractionner l'entité mousse positive X issue de bière de mousse, dans les conditions suivantes. La cellulose échangeur d'anions équilibrée dans le tampon :

Acétate de sodium 0,02 M pH 4,0.

est placée dans une colonne chromatographique thermostatée à 4°C. Après passage du tampon de départ pendant 12 heures minimum, le lit de DEAE est de 40 x 2 cm. 1 g. de la fraction X en solution dans le tampon de départ est appliqué au sommet de la colonne. L'élution de haut en bas est réalisée à l'aide d'une pompe péristaltique à raison de 80 ml/h. L'eluât passe par un absorptiomètre enregistreur à 280 nm et les fractions de 8 ml sont collectées toutes les 6 minutes. Le fractionnement chromatographique est réalisé à pH constant par déplacement du matériel fixé à l'aide d'un gradient discontinu de force ionique, en ajoutant dans le tampon de départ du NaCl,

* Fournisseur DANNATT, 198 rue St. Jacques PARIS Vè.

pour obtenir dans les 3 tampons postérieurs au tampon initial, les molarités en sel respectivement de 0,03 M, 0,1 M, 0,5 M. L'emploi de DEAE équilibrée en tampon Ac Na 0,005 M pH 4,0, et d'un gradient d'élution de force ionique linéaire et continu, n'apporte pas d'amélioration aux fractionnements.

- Dans des colonnes et à des débits d'élution analogues, des chromatographies sur CM cellulose ont été réalisées. Le tampon initial est une solution d'acétate d'ammonium 0,1 M, de pH variable : 3,5, 4,1 ou 5,5. Le déplacement chromatographique est effectué par l'emploi d'un gradient discontinu croissant de pH.

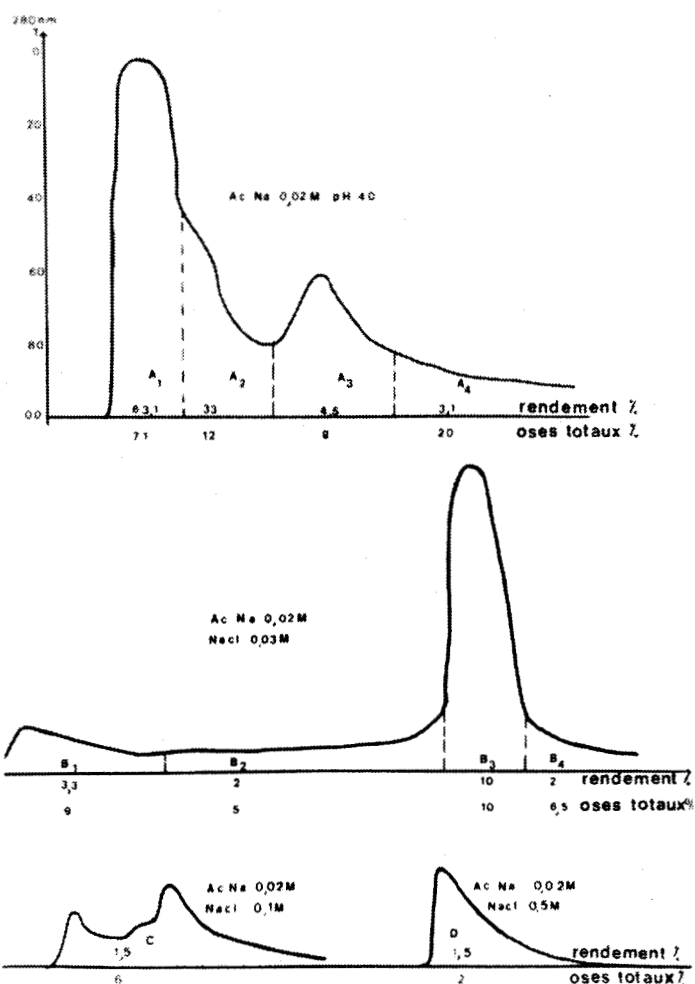
- Les fractions obtenues par chromatographie d'échanges d'ions sont alors dialysées contre eau distillée, lyophilisées. Elles sont alors dosées, soumises au test de moussage et analysées par électrophorèse et immunoélectrophorèse.

32.3 - RESULTATS

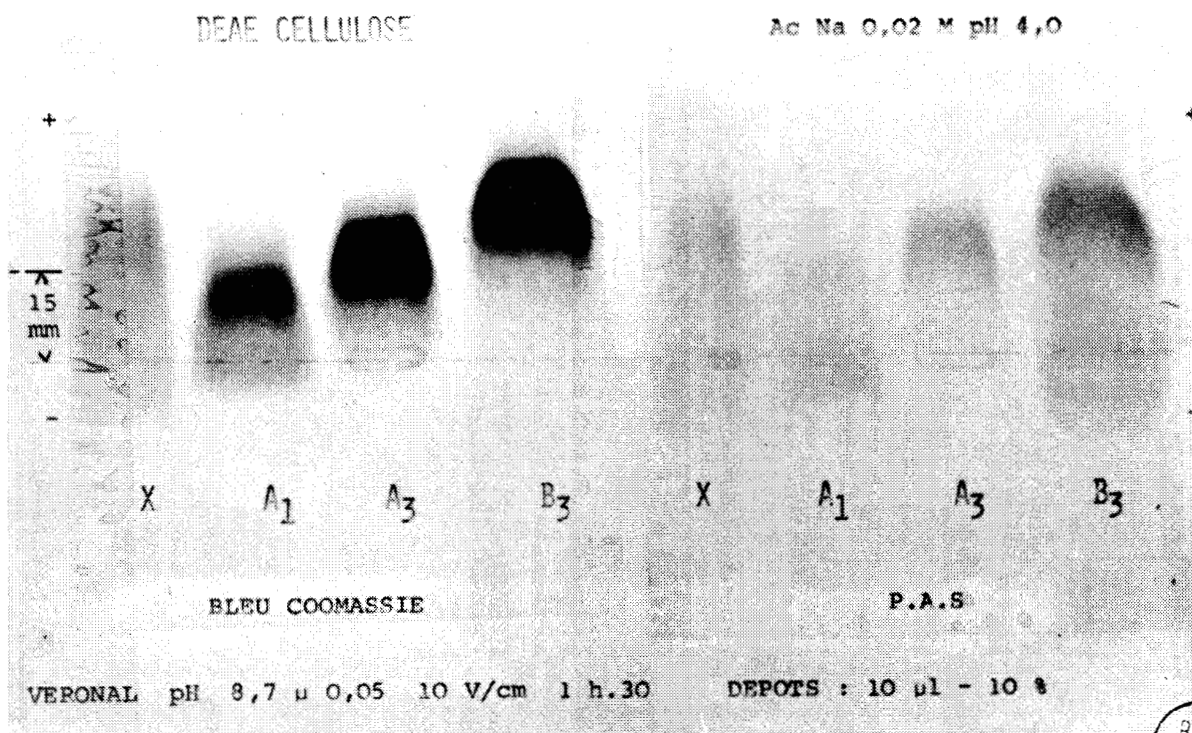
BUS
LILLE

La figure 15 p. 100, présente le diagramme d'élution d'une DEAE cellulose tamponnée en solution Ac Na 0,02 M pH 4,0. Nos résultats sont à comparer avec ceux d'ANDERSON décrits page 27. Contrairement à ses conclusions, il ne nous a pas été possible d'éluer une fraction purement polysaccharidique non retenue sur la colonne, aussi bien à partir d'une fraction X brute, que d'une sous-fraction A₁ exclue d'une colonne de Sephadex G 25, obtenue à partir de l'entité mousse positive X. Nous avons alors utilisé d'autres systèmes tampons dans le but d'éliminer un composé purement polysaccharidique constituant un ballast pour la fraction X. Nous nous contenterons de les citer car aucune chromatographie tant sur DEAE cellulose que sur CM cellulose n'a permis l'obtention d'une fraction purement polysaccharidique. Pour la DEAE nous avons opté pour l'élution des colonnes à l'ai-

DEAE CELLULOSE Ac Na 0,02M pH 4,0



15 a



15 b



FIGURE 15

CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS

15a - Diagramme d'élution 280 nm.

15b --Electrophorèse sur Acétate de cellulose
Véronal pH 8,7 μ 0,05 10V/cm 1 h 30

de d'un gradient de force ionique, le pH restant constant. Les tampons d'équilibrage des colonnes ont été les suivants :

- tampon phosphate de Na 0,005 M, pH 8,0, pH 6,7, pH 3,75.
- tampon citrate de Na 0,01 M pH 3,0.

Pour la CM cellulose, nous avons utilisé les systèmes tampons décrits ci-dessus :

. Le diagramme de la figure 15 p. 100 précise les rendements de la chromatographie et les pourcentages d'oses des différentes fractions.

. Il faut noter que l'on obtient, dans les mêmes conditions d'expériences, des diagrammes d'élution quasi superposables pour des dépôts de 1 g. aussi bien de la fraction brute X que de sa fraction dérivée A₁ exclue sur Séphadex G 25.

. Le rendement global de la chromatographie, après dialyse et lyophilisation des fractions est de 65 p.100. Les 3/4 de la fraction X sont élués par le tampon de départ. La sous-fraction B₃, élue par le second tampon sous forme d'un pic symétrique, représente 10% du matériel récupéré, le pic B₃ contient 10,4 p.100 d'oses totaux dont 1,9 p.100 de pentoses et 8,5 p.100 de glucose, déterminés selon les techniques rapportées p. 56. Par rapport à la technique de tamisage moléculaire, le fractionnement par échanges d'ions conduit à des sous-fractions très notablement différentes du point de vue composition chimique. Le taux d'oses déterminé par le phénol sulfurique varie de 71 p.100 pour la sous-fraction A₁ à 2 p.100 pour la fraction mineure D. Aucune fraction n'est ni purement polysaccharidique ni purement protidique.

. Quant aux spectres d'absorption, les diverses fractions en solution à 2% ne montrent pas de pic à 320 nm révélateur, d'après ANDERSON, d'acide férulique.

. L'analyse électrophorétique figurée schéma 15 P. 100 ne présente pas de bandes individualisées même pour la fraction B₃ pauvre en oses totaux, mais des zones diffuses.

. L'analyse immunoélectrophorétique est réalisée à l'aide de trois immunosérums anti bière normale, anti fraction X et anti orge ENSIA. Les photos présentées figure 16 p.103 appellent les commentaires suivants . Les diverses fractions sont étudiées en solution à 10%. Toutes les fractions réagissent, même la fraction A₁, contenant 71 p. 100 d'oses totaux. Contre l'immunosérum anti-orge ENSIA, l'entité mousse positive X étudiée donne deux arcs de précipitation, alors que les sous-fractions A₂ et A₃ montrent trois arcs. Ces composés respectivement à 12 et 9 p. 100 d'oses totaux, rassemblent l'ensemble des protéines antigéniques de la fraction X. Un composé mineur de l'entité mousse positive, soit masqué par d'autres constituants, soit en concentration insuffisante dans la fraction brute X est donc révélé à la suite d'une purification sur échangeur d'ions. Il convient de rester circonspect sur l'interprétation des plaques d'immunoélectrophorèse ; en effet, il faudrait en toute rigueur faire des essais systématiques de concentrations.

- Les caractéristiques moussantes des fractions obtenues par échange d'ions sont visualisées figure 17 p. 104. La mousse n'est pas fonction de la richesse en protéines. Ainsi la fraction mineure (moins de 1,5 p. 100 de la poudre récupérée) D, très pauvre en oses totaux (2%) a une mauvaise mousse. La fraction B₃, représentant 10 p. 100 du matériel récupéré, comprenant 10 p.100 d'oses totaux, se révèle intéressante pour la formation et la stabilité de la mousse. Sa mousse toutefois est légèrement supérieure à celle de la fraction A₁ polysaccharidique à 70 p. 100.

32.3 - CONCLUSIONS.

- Bien que l'analyse immunoélectrophorétique montre un fractionnement médiocre, la chromatographie d'échange d'ions sur DEAE cellulose fournit des composés de composition chi-

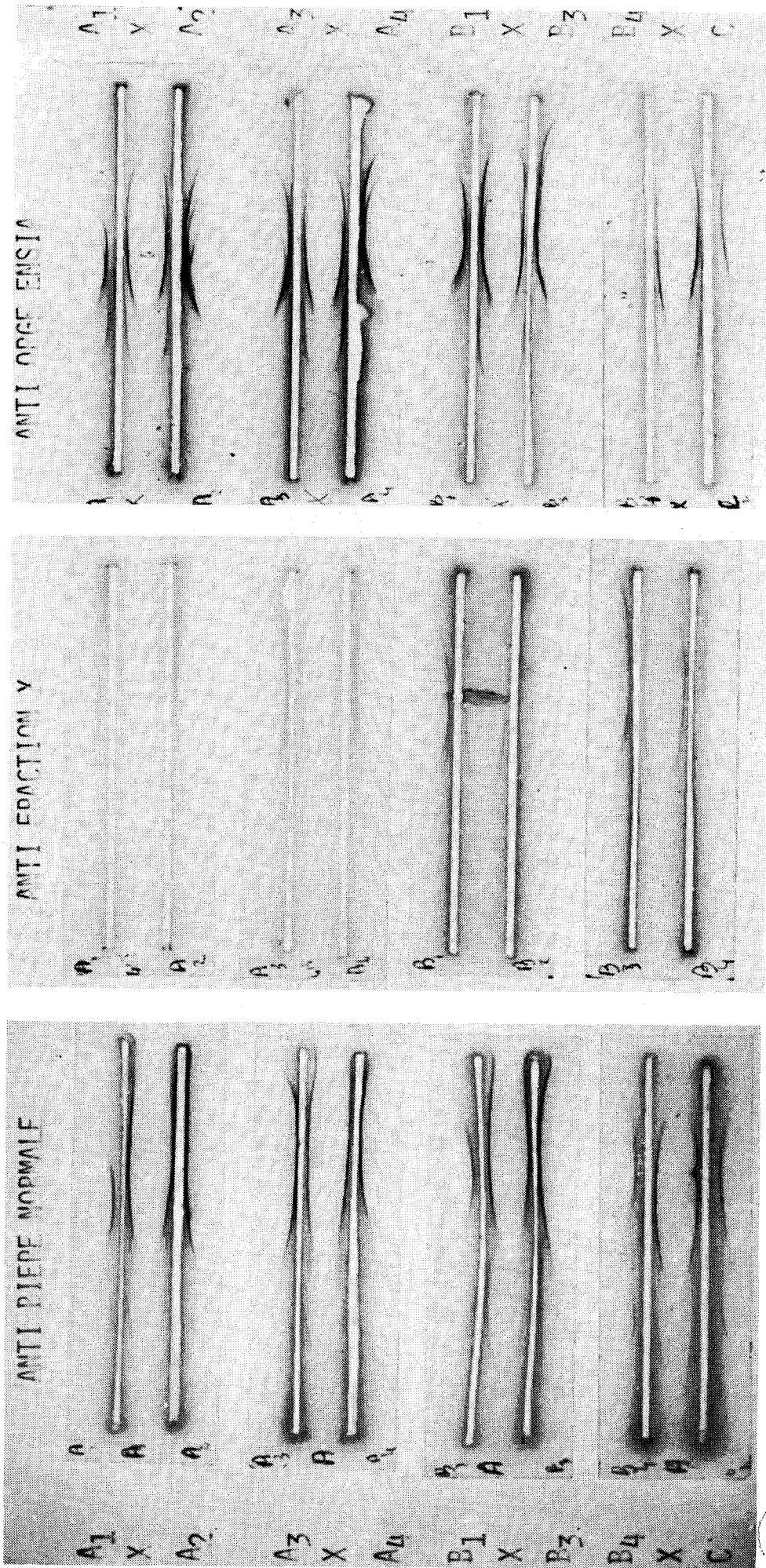


FIGURE 16

ANALYSES IMMUNOELECTROPHORETIQUES DE FRACTIONS ISSUES DE DEAE CELLULOSE

Véronal pH 8,2 μ 0,05 4 V/cm 2 heures Dépôts solution à 10%

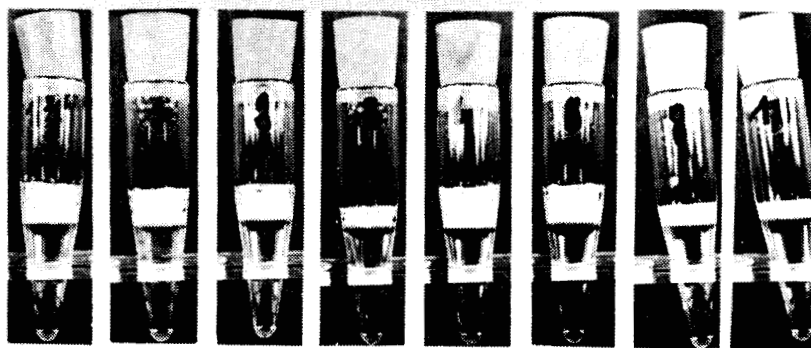


ECHANGE D'IONS : DEAE cellulose

fractions:

X A₁ A₂ A₃ A₄ B₃ C D

FORMATION: 1"



STABILITE: 1"

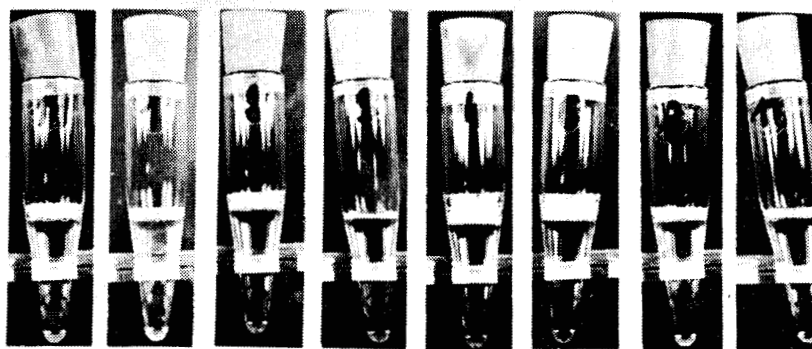


FIGURE 17
POUVOIR MOUSSANT
DES FRACTIONS ISSUES
DE DEAE CELLULOSE

mique très différente et de propriétés moussantes très variables.

- Le pouvoir moussant des fractions n'est pas lié à leur richesse en protéines. La fraction A₁, non retenue sur la DEAE cellulose équilibrée en tampon Ac Na 0,02 M pH 4,0, très riche en polysaccharide (71 p. 100) a un pouvoir moussant très légèrement inférieur à celui de la fraction B₃, pauvre en oses totaux (10 p. 100). Cette fraction B₃, intéressante pour la mousse, est éluée de la cellulose par l'emploi du tampon de départ additionné de Na Cl (0,03 M). Obtenue à raison de 10 p. 100 du matériel déposé, en tenant compte des 65 p. 100 de rendement de la chromatographie, elle représente environ 4 mg. par litre de bière initiale.

- Contrairement aux assertions d'ANDERSON, la chromatographie d'échange d'ions tant sur DEAE cellulose que sur CM cellulose ne nous a pas permis d'obtenir à partir de la fraction brute X, un composé purement polysaccharidique ou purement protidique. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers une nouvelle technique : l'électrophorèse préparative.

33 - FRACTIONNEMENT DE L'ENTITE MOUSSE POSITIVE X PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE -

33.1 - PRINCIPE

- L'électrophorèse préparative sépare les colloïdes selon leurs charges électriques. La fraction X, mousse positive, isolée de bière par relargage chimique à l'éthanol, contient plus de 50% d'oses totaux. Par ce mode de fractionnement, un composé purement polysaccharidique est-il co-précipité avec les protides ? L'électrophorèse préparative devrait apporter une solution à ce problème.

- Nous disposons d'une électrophorèse préparative sur rideau de papier BECKMAN CP. Le support d'électrophorèse vertical est alimenté en tampon en continu, de même, l'échantillon est déposé en continu. Le champ électrique horizontal de 20 à 50 V/cm assure le fractionnement des molécules chargées électriquement. A la base du rideau de papier de 39 x 35 cm, un découpage en 32 dents permet la récupération des fractions à l'aide d'un collecteur.

- Les paramètres à fixer de façon à obtenir un fractionnement étalé sur toute la largeur du rideau de papier sont :

- la composition du tampon d'électrophorèse ;
- la vitesse d'écoulement du tampon créant la force verticale d'entraînement des colloïdes ;
- le champ électrique créant la force horizontale permettant la discrimination des particules chargées ;
- enfin, l'emplacement et le débit d'injection du dépôt.

33.2 - MODE OPERATOIRE

Après une étude préliminaire des divers paramètres, les meilleurs résultats sont obtenus pour les conditions suivantes :

Le tampon d'électrophorèse d'ARONSSON et GRONWALL (209) recommandé par la firme BECKMAN (210) et utilisé par JAKUBCZAK (211) a pour composition :

- TRIS	60,5 g)	
)	
- EDTA	6,0 g)	
)	pH 8,9
- Acide borique	4,6 g)	
)	
- Eau q.s.p.	3.000 ml)	

Le tampon refroidi à 4°C par le groupe frigorifique de l'appareil coule en flux continu, à raison d'environ 20 ml/heure (débit général graduation 8).

Le dépôt est constitué, d'une fraction X, issue de bière normale reconstituée et concentrée 3 fois après lyophilisation. Il est injecté en solution à 10%, à la verticale de la dent n° 10 sur la 2ème languette gauche du rideau de papier, au débit de 0,55 ml/heure (Sample feed 4).

- La migration électrophorétique sous 900 volts dure 72 heures. Après ce temps, il se produit à la verticale du dépôt, un colmatage du papier par des substances brunes.

Les fractions sont récupérées et rassemblées pour être mises en dialyse et lyophilisées. Les critères du groupement des fractions sont basées :

- sur l'observation du chromatogramme sous la lampe de Wood.
- sur la révélation du chromatogramme en amidoschwarz.
- sur les dosages systématiques d'oses totaux par la méthode au phénol sulfurique en prélevant 0,2 ml de chaque tube collecté.

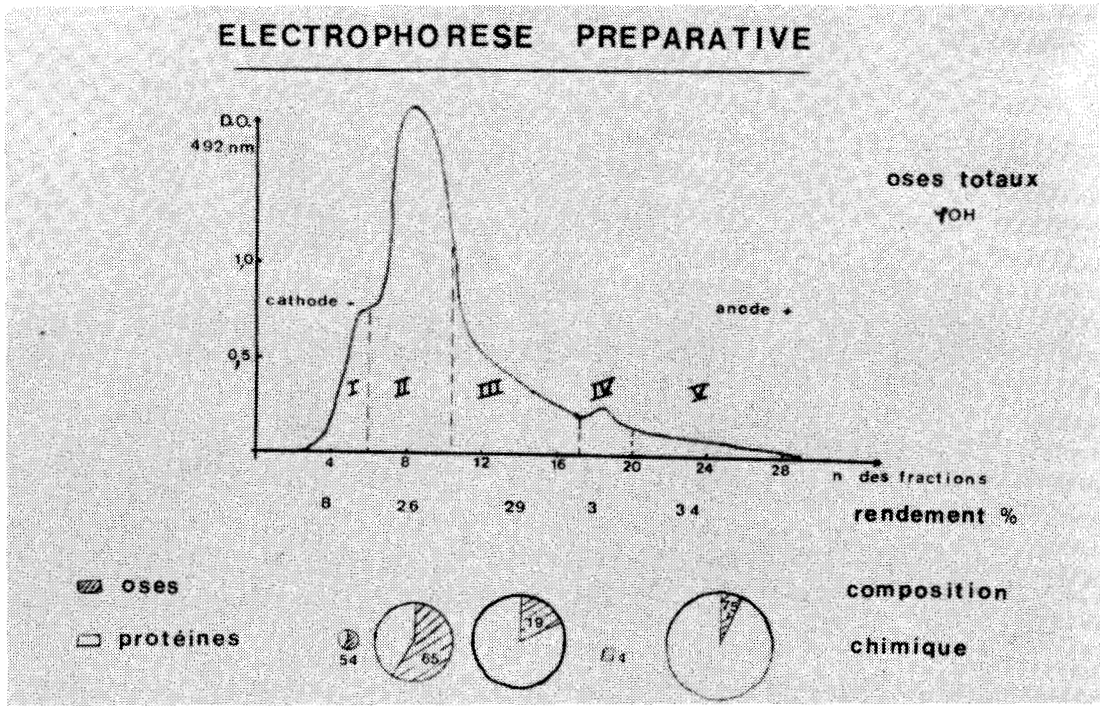
33.3 - RESULTATS

L'observation des chromatogrammes en lumière ultra-violet montre un composé très absorbant à la verticale du dépôt, latéralement la fluorescence est plus diffuse, le reste du chromatogramme reste non coloré.

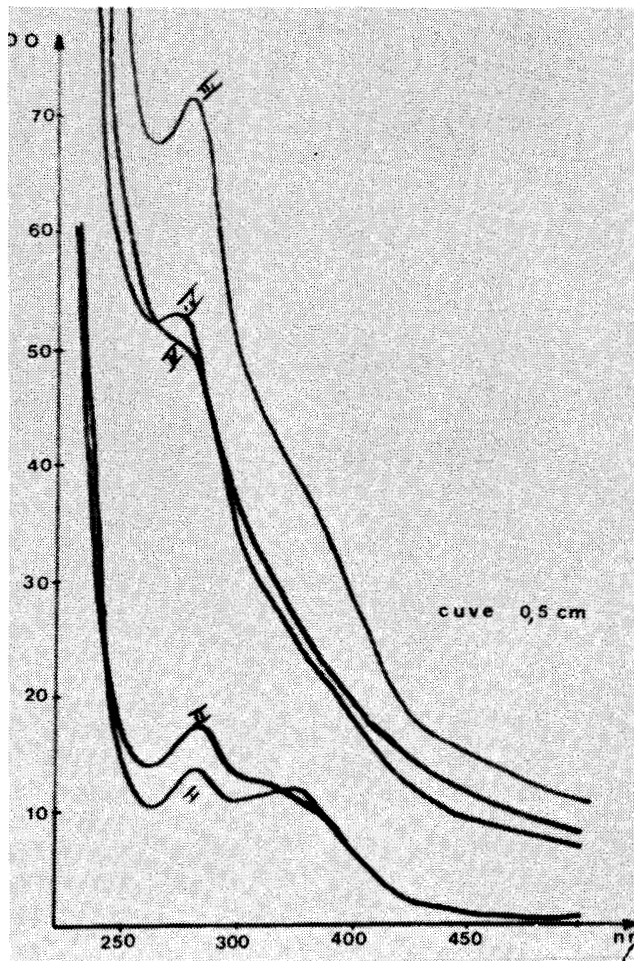
La coloration à l'amidoschwarz ne révèle pas de bandes majeures, elle reste diffuse sur tout le chromatogramme. Ce mode de révélation reste toutefois utile, car il permet d'apprécier l'étalement du fractionnement.

Le dosage d'oses totaux au phénol montre, comme le témoigne la figure 18 p. 108, la présence d'oses dans l'ensemble de l'électrophorègramme.

ELECTROPHORESE PREPARATIVE



18 a



18 b

ELECTROPHORESE PREPARATIVE :
SPECTRE D'ABSORPTION DES FRACTIONS



FIGURE 18

ELECTROPHORESE PREPARATIVE

- 18 a - Dosage d'oses totaux. Caractéristiques des fractions
- 18 b - Spectres d'absorption des fractions.

Les 32 tubes de l'éluat sont réunis en 5 fractions. Après dialyse pour éliminer le tampon d'électrophorèse, les fractions sont lyophilisées et dosées.

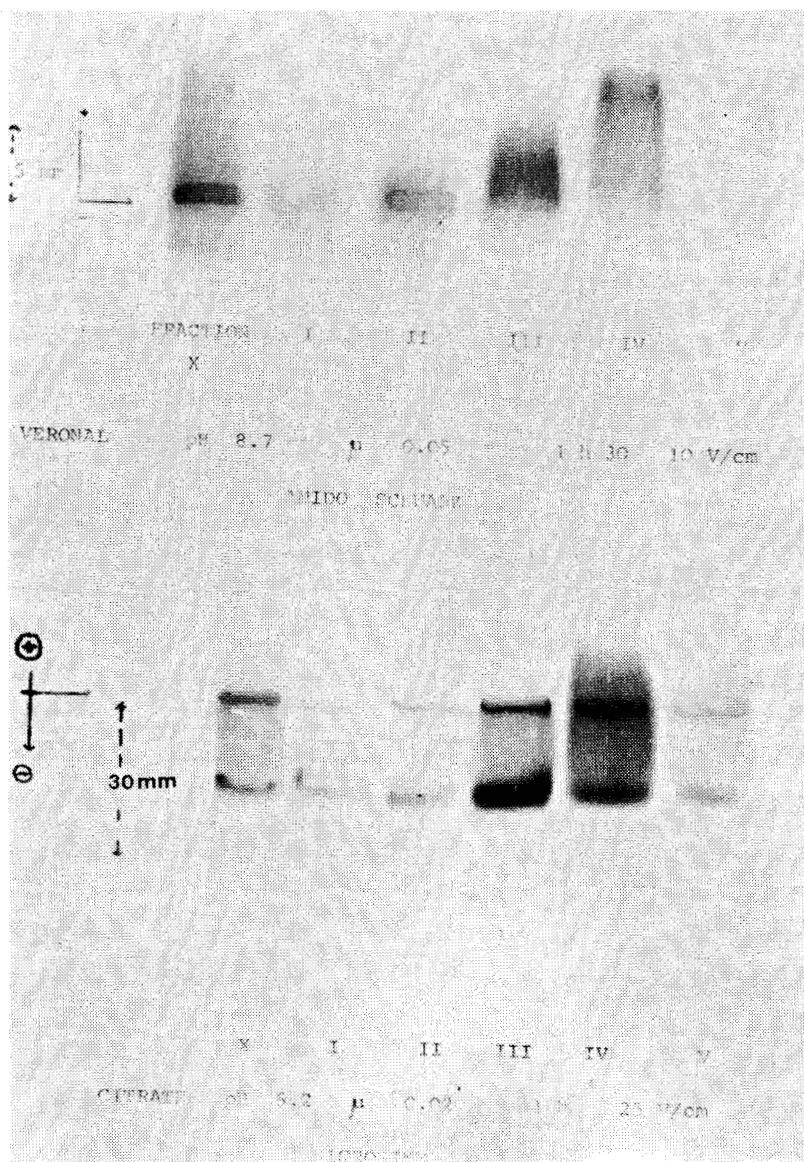
Les résultats enregistrés figure 18 p. 108 appellent les remarques suivantes :

- Le rendement de l'électrophorèse préparative est très faible : 45% de la poudre déposée est récupérée, le papier retient des colloïdes, les nombreuses manipulations et la dialyse créent des pertes.

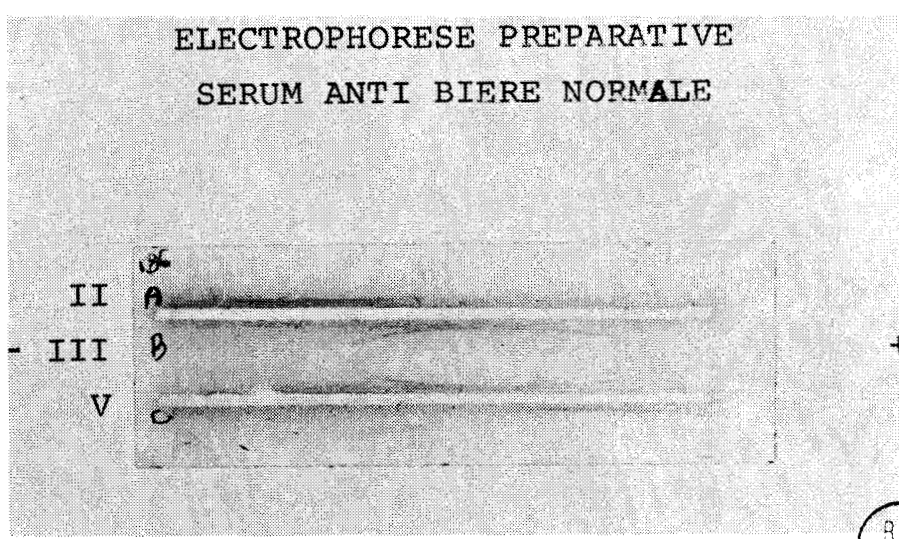
Les fractions obtenues sont très différentes du point de vue composition chimique. Les composés I et II fluorescents à l'ultra violet contiennent des polyphénols, comme l'indique leur absorption à 320 nm et leur coloration brun foncé. La figure 18 p. 108 présente les spectres d'absorption en cuve de 1/2 cm entre 450 et 250 nm des 5 sous-fractions issues d'électrophorèse préparative. Nous n'avons pas pu doser ces polyphénols, car les quantités de poudre récupérées sont faibles. Le constituant II à la verticale du dépôt est très riche en oses, mais contient tout de même 30% de protéines. Le constituant V le plus anodique à 80% de protéines possède encore des oses en quantité appréciable.

- Le fractionnement de l'entité mousse positive X par électrophorèse préparative, est visualisé par électrophorèse sur acétate de cellulose et immunoelectrophorèse, comme le présentent les figures 19 p. 110.

Les acétates de cellulose, en tampon classique Véronal pH 8,7 et en tampon citrate pH 5,2 montrent un fractionnement, mais il faut remarquer qu'un constituant cathodique en pH 5,2 subsiste dans toutes les fractions.



19 a



19 b

FIGURE 19



ETUDE DES FRACTIONS ISSUES
DE L'ELECTROPHORESE PREPARATIVE

19a - Electrophorèses sur acétate de cellulose pH 8,7 et pH 5,2
19b - Immunoélectrophorèse pH 8,2 μ 0,05 4V/cm 2 h.

Les fractions II, III, IV, en concentration à 10%, réagissent en donnant respectivement 1, 2 et 1 arcs en immunoelectrophorèse contre un immunosérum anti-bière normale. L'arc majeur correspond-t'il au composé visible sur l'électrophorèse en acétate de cellulose ? Un composé possédant un fort pouvoir antigénique peut-il être présent dans les diverses fractions d'électrophorèse préparative ? Une réponse pourrait être apportée, en faisant sur chaque tube une étude systématique d'essais de concentration.

Les pouvoirs moussants des fractions I à V sont testés selon la méthode E.N.S.I.A. et illustrés par la figure 20 p. 112. Les résultats sont très symptomatiques et surprenants. Les pouvoirs moussants sont tous comparables. Des fractions ayant des taux d'oses aussi différents que les fractions II et V, respectivement 65% et 7,5%, donnent des mousses analogues. Le pouvoir moussant d'un composé issu de bière n'est donc pas lié directement à sa teneur en protéines.

33.4 - CONCLUSION

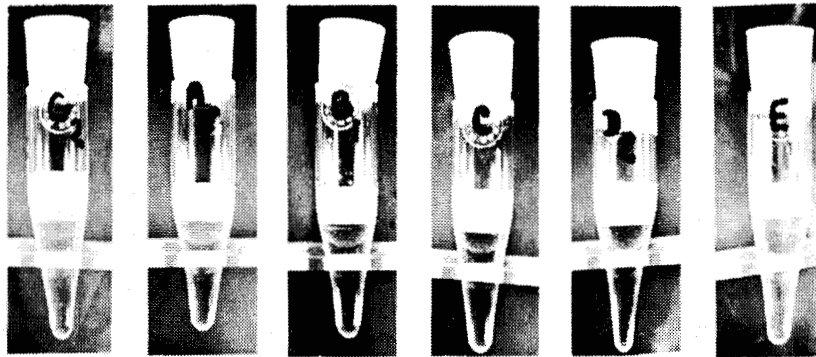
L'électrophorèse préparative sur rideau de papier BECKMAN CP. a confirmé l'hétérogénéité de l'entité mousse positive X. Des composés polyphénoliques sont repérés par leur spectre d'absorption. Le fractionnement conduit à des constituants de composition chimique très différente.

Le pouvoir moussant n'est pourtant pas localisé dans une fraction. L'électrophorèse préparative confirme la complexité du problème de la mousse de la bière. Pour repérer un constituant mousse positif exceptionnel, il faudra procéder par un fractionnement punctiforme. L'électrofocalisation nous a donc semblé une technique pouvant réaliser ce but.

ELECTROPHORESE PREPARATIVE

fractions:
fraction x I II III IV V

FORMATION 1'



STABILITE 1'

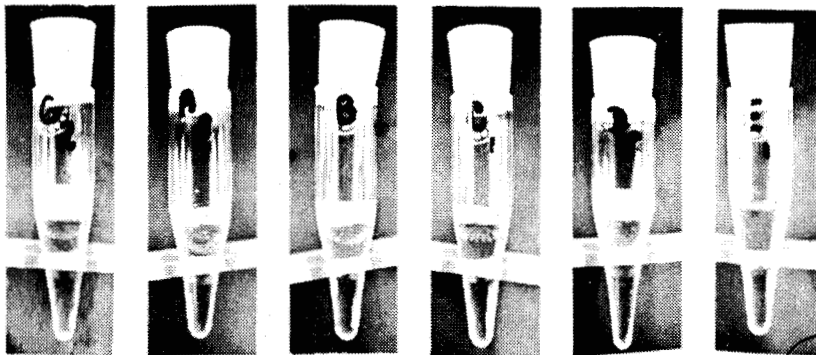


FIGURE 20
POUVOIR MOUSSANT
DES FRACTIONS ISSUES
DE L'ELECTROPHORESE PREPARATIVE

vons cherché à fractionner cette entité mousse positive de façon à mieux localiser les composés moussants.

La gel filtration et la chromatographie d'échanges d'ions permettent de comparer nos résultats à ceux d'ANDERSON (voir p.27). La gel filtration sur Séphadex G 25 superfine permet d'éliminer des composés peu moussants qui sont retenus par le gel de dextran. La fraction A₁ exclue rassemble donc les éléments moussants, mais ses qualités de mousse restent toutefois comparables à celles de la fraction brute X. Le traitement par absorption à l'aide de Stabifix n'améliore pas, d'après nos expériences, la mousse.

La chromatographie d'échange d'ions, tant sur DEAE cellulose que sur CM cellulose, ne conduit pas, contrairement aux assertions de l'auteur britannique, à l'obtention d'une fraction purement polysaccharidique. De même une fraction 100 p.100 protidique n'est pas obtenue. La chromatographie d'échange d'ions fournit des fractions très différentes du point de vue chimique. Le pouvoir moussant n'est pas fonction de la teneur en protéines des fractions, puisqu'une fraction à 70 p.100 d'oses totaux représentant 60 p.100 de la fraction X a une mousse comparable à celle de la fraction B₃, constituant 10 p.100 du composé brut, et dont la teneur en oses n'est que de 10 p.100.

L'électrophorèse préparative sur rideau de papier BECKMAN CP, confirme que le pouvoir moussant n'est pas fonction de la teneur en protéines des fractions. Elle permet de repérer les constituants absorbant à 320 nm. Toutes les fractions contiennent des oses, dans cette série d'expérimentations, il nous a aussi été impossible d'obtenir un composé purement protidique ou purement polysaccharidique.

L'électrofocalisation en colonne, si elle ne permet

pas la préparation de composés, autorise un repérage très fin. Si le moût dialysé possède des constituants à pH 4,5 et 7,5 remarquables du point de vue mousse, la fraction X isolée de bière de mousse se distingue particulièrement par son composé de pH 4,5.

L'entité mousse positive X se révèle à nos yeux, beaucoup plus hétérogène que ne le pense ANDERSON. A la lumière des expériences d'électrofocalisation, plusieurs techniques devront être couplées pour isoler le composé le plus remarquable du point de vue mousse de pH isoélectrique 4,5.

.../...

4° - FILIATION ENTRE DES CONSTITUANTS
DE L'ENTITE MOUSSE POSITIVE X
ET DES CONSTITUANTS DE L'ORGE

Le problème de l'origine des facteurs mousse positifs de la bière est posé. L'entité mousse positive X rassemblant les constituants moussants de la bière, il nous a semblé intéressant d'étudier l'éventuelle filiation de composés de la fraction X et des composés de l'orge.

Trois méthodes sont utilisées :

- la gel électrofocalisation.
- l'analyse des acides aminés des fractions.
- les méthodes immunologiques.

41 - MATERIEL ET METHODES

41.1 - MATERIEL

- *Entité mousse positive*

Elle est constituée par la fraction X obtenue à partir de bière de mousse selon la méthode décrite page 50.

- *Extrait d'orge*

Afin de préparer des extraits d'orge, nous avons suivi les directives de l'EBC (227). L'orge est un grain vêtu dont les balles restent adhérentes. Or, ces enveloppes apportent lors des extractions aqueuses ou salines, des composés nuisibles, du type tanins, qui peuvent donner des précipités ultérieurs pro-

téotanniques. Nous nous sommes employés à éliminer ces enveloppes.

Pour décortiquer l'orge, nous avons modifié la méthode préconisée par LONTIE (228), en réalisant un lavage continu pendant 15 h. à 0° C sous vide ; le vide permettant d'arracher les bulles bloquées sous les enveloppes. Après égouttage et lyophilisation, les grains secs sont introduits deux fois pendant 45 s dans mixer sous-volté, et les téguments, ainsi que le germe, se détachent facilement de l'endosperme.

L'extraction des protéines est réalisée en trois étapes, mouture du grain, délipidation, extraction.

- la mouture est réalisée dans un mixer WARING en trois périodes d'une minute, la température est maintenue inférieure à 15°C, par l'emploi de neige carbonique.

- la délipidation, discutée par FEILLET (229), est réalisée en deux étapes par 500 ml d'acétone à -15°C, sous agitation pendant 30 minutes. Après filtration et aspiration sur buchner pendant 20 minutes on laisse séjourner 18 heures à 20°C dans une étuve ventilée pour éliminer les vapeurs d'acétone.

- l'extraction de 100 g de farine a lieu dans 500 ml de tampon :

- Na Cl 0,4 M

- Phosphate dipotassique 0,1 M (amené à pH 6,6 par du phosphate monopotassique 0,1 M) pendant 2 heures à 4°C.

Après centrifugation et dialyse contre le tampon, l'extrait filtré est lyophilisé.

41.2 - METHODES

- La gel électrofocalisation avec raccordement d'arcs.

- L'électrofocalisation en gel de polyacrylamide a fait l'objet d'une description page 67. Bien que des ré-

servent puissent être émises quant aux possibilités d'interaction ampholines et composés électrofocalisés, nous considérons cette technique comme la seule acceptable pour l'analyse simple de composés issus de bière. Rappelons que les fractions analysées par cette technique sont déposées dans un puits découpé dans le gel de 15 x 1 mm. En plaçant deux puits côte à côte à 3 mm l'un de l'autre, les bandes après migration diffusent légèrement latéralement. Certaines bandes se raccordent alors, prouvant qu'elles ont mêmes pH isoélectriques. Ce mode de jonction, s'il ne constitue pas comme le raccordement d'arcs en immunoélectrophorèse, une preuve formelle de l'identité de deux fractions, peut être considéré comme une preuve nécessaire, mais non suffisante.

- *L'analyse d'acides aminés des fractions.*

- Les protéines de l'orge sont classées en albumine, globulines, prolamines et gluténines. Ces diverses fractions ont un spectre d'acides aminés caractéristique (COOK(230)). Les teneurs en proline et acide glutamique permettent d'identifier les fractions.

- HOUSTON (231), en 1971, rapporte une nouvelle technique. Des fractions protéiques, séparées en électrophorèse sur gel de polyacrylamide, colorées à l'amidoschwarz, sont soumises à l'hydrolyse telles quelles, insérées dans le gel. Les acides aminés de l'hydrolysate des fractions contenues dans le gel sont analysés à l'aide d'un auto-analyseur. Nous avons transposé cette technique en soumettant à l'hydrolyse en milieu chlorhydrique, 4 N à 110°C pendant 24 heures : - la portion de gel électrofocalisation renfermant les bandes correspondantes à la fraction moussante de pH 4,5, obtenue par électrofocalisation sur colonne.

- une portion de gel comparable, dépourvu d'échantillon, de façon à constituer un témoin blanc.

- Les teneurs en acides aminés sont déterminées à l'aide d'un auto-analyseur JEOL.*

- *Méthodes immunologiques.*

Nous avons utilisé les techniques d'immunodiffusion, d'immunodiffusion quantitative, d'immunoélectrophorèse, et d'immunoélectrophorèse quantitative décrites précédemment page 79.

42 - RESULTATS

42.1 - GEL ELECTROFOCALISATION AVEC RACCORDEMENTS D'ARCS.

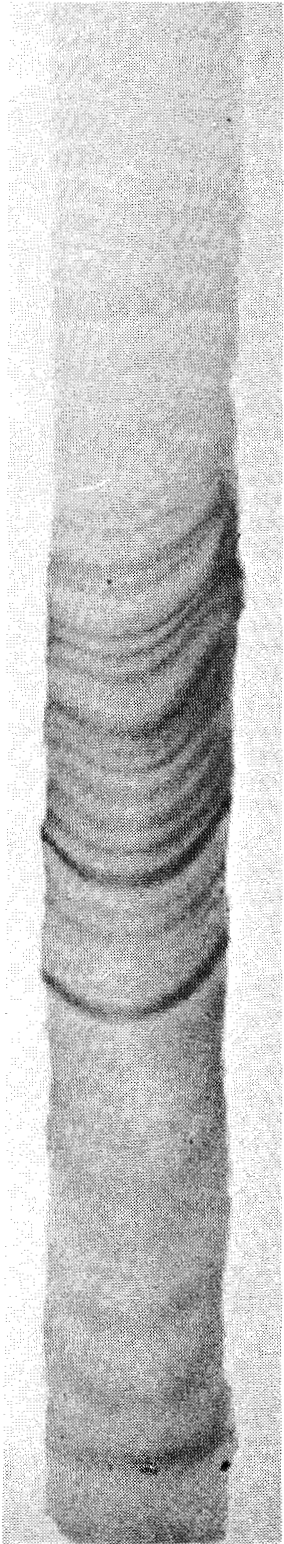
- La figure 27 p. 135, présente plusieurs analyses d'extrait d'orge, comparées à celles de la fraction moussante X.

- La photo 27 a, montre une possibilité nouvelle de la gel électrofocalisation. La substance à analyser est répartie dans la masse du gel, car c'est une solution aqueuse de l'échantillon qui sert à créer le gel de polyacrylamide. L'aspect courbe des bandes est inévitable. En effet, pour éviter une trop grande consommation d'ampholines, la largeur du gel est réduite à 3 cm, ce qui occasionne des effets de bords.

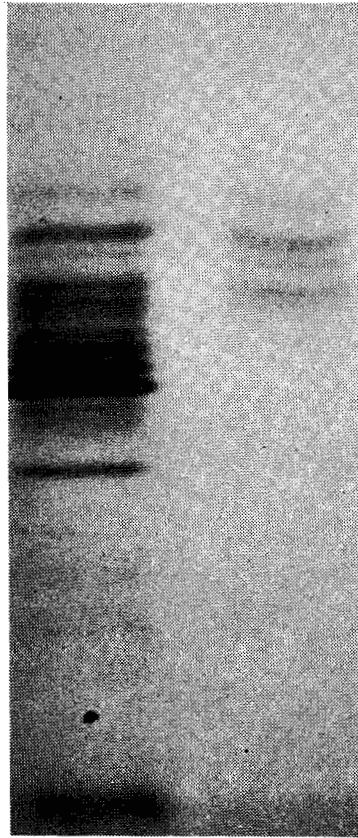
- La figure 27 b illustre la technique de coloration rapide des protides au bleu coomassie décrite tableau IX p. 78. 5 fractions d'orge et de la fraction X se correspondent.

- Enfin, les clichés 27 c témoignent du raccordement de 12 arcs. Les gels sont colorés à l'aide de la double coloration

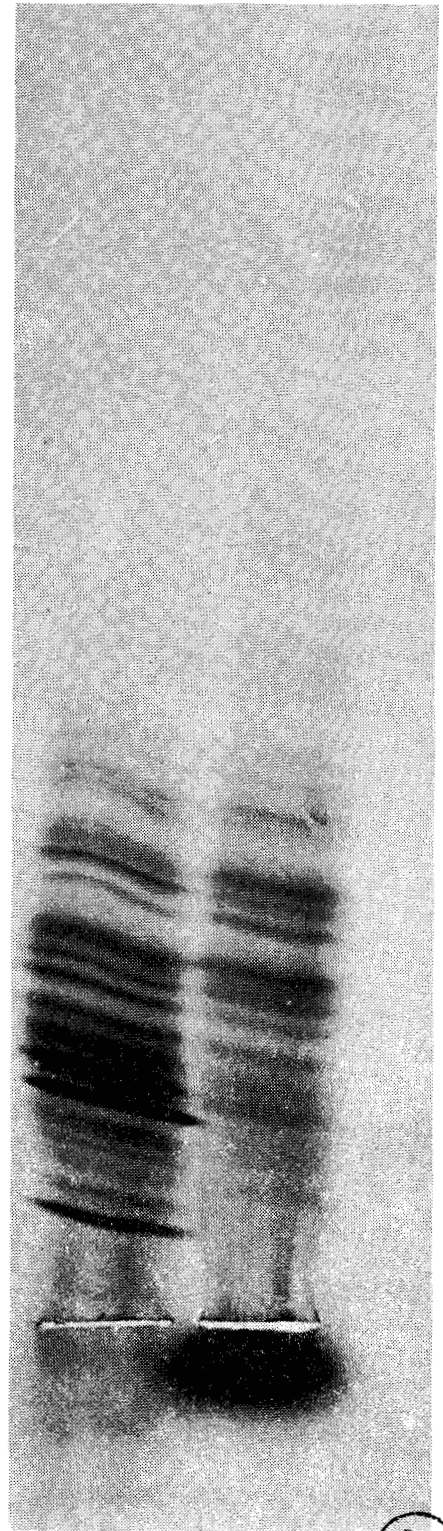
* JEOL- Agent en France
JEOL Co Europe - REUIL MALMAISON



27 a



27 b



27 c

BUS
LILLE

FIGURE 27

GEL ELECTROFOCALISATION D'EXTRAIT D'ORGE

27a - Orge 10 mg coulé dans la masse du gel

27b - Orge (10%) Fraction X 35 μ l - Bleu Coomassie Lent

27c - Orge (10%) Fraction X 35 μ l - Raccordement d'arcs

P.A.S., Bleu Coomassie, méthode lente décrite page 79.

La technique du gel électrofocalisation nous apporte donc des informations importantes. L'entité mousse positive X contient 12 constituants, ayant mêmes pH isoélectriques que des composés de l'orge. Le raccordement de leurs arcs en gel électrofocalisation laisse à penser que ces fractions se correspondent.

42.2 - ANALYSES DES ACIDES AMINES DES FRACTIONS.

Elles ont été réalisées sur :

- la fraction brute, entité mousse positive X.
- le composé de pH isoélectrique isolé par électrofocalisation, débarassé des ampholines et du saccharose par passage sur Sephadex G 25 fine.

- 2 portions de gel électrofocalisation; l'une sans échantillon qui constituait le blanc, l'autre contenant la fraction moussante de pH 4,5 obtenue par électrofocalisation, concentrée 5 fois mais non purifiée.

Les teneurs en acides aminés ne permettent pas de conclure. La fraction X, très complexe, ne peut pas être rattachée à une fraction protéique de l'orge. Quant à la fraction moussante obtenue par électrofocalisation, elle ne peut pas être classée dans une catégorie.

La méthode proposée par HOUSTON (232) permettant l'hydrolyse d'un gel de polyacrylamide contenant l'échantillon, n'est pas transposable directement aux gels électrofocalisation. Les ampholines présentes dans le gel apportent des pics non identifiés, et le gel de polyacrylamide lui-même libère un ballast très important de NH_3 .

42.3 - ANALYSES IMMUNOLOGIQUES

- Pour étudier la filiation des constituants de la fraction X et des composés de l'orge, nous disposons de deux immunsérums :

- un immunsérum lapin anti orge, préparé à l'ENSIA et conservé congelé à - 18°C.
- l'immunsérum anti-orge, anti-malt EBC préparé par immunisation d'un cheval, présenté sous forme lyophilisée.

- En immunodiffusion, la fraction X réagit contre l'immunsérum EBC dès une concentration de 1,2 p. 100; à partir de 2,5 p. 100, deux arcs de précipitation sont visibles. Comme en témoigne la photo 11 page 85, en immunodiffusion quantitative, la fraction X en solution à 20% laisse apparaître 3 arcs dans une gélose imprégnée de 10 p. 100 d'immunsérum EBC. Il faut souligner que, si l'on tient compte du dédoublement de 2 arcs, c'est alors 5 arcs qui sont mis en évidence.

- En immunoélectrophorèse, contre l'immunsérum anti-orge ENSIA, la fraction X en solution à 10% donne deux arcs de précipitation anodiques en tampon véronal pH 8,2 μ 0,05. La photo 16 p. 103 révèle qu'il existe un troisième constituant mineur. Ce troisième constituant mineur n'apparaît pas dans le cas de l'étude de la fraction brute X, mais il est mis en évidence par immunoélectrophorèse des fractions A₂ et A₃ en solution à 10%. Ces fractions sont issues de la chromatographie sur DEAE cellulose de l'entité mousse positive X. Rappelons que si la fraction X contient 51 p. 100 d'oses totaux, les sous-fractions A₂ et A₃ n'en contiennent plus que 9 et 12 p. 100, mais ces composés A₂ et A₃ ne donnent pas une mousse intéressante.

- En ce qui concerne les fractions moussan-

tes obtenues par électrofocalisation, une étude en immunodiffusion contre le sérum anti-orge anti-malt EBC montre un arc de précipitation pour les sous-fractions concentrées 3 fois, de pH isoélectriques compris entre pH 4,40 et 5,6. L'immunoélectrophorèse présentée figure 18 a p. 108 prouve que les fractions moussantes de pH isoélectriques 4,51 et 5,05 ont au moins un composé dérivant de l'orge. Les immunoélectrophorèses quantitatives (fig. 28b p. 139) selon LAURELL (233) apportent des informations complémentaires. A l'aide des immunosérum anti-bière normale et anti-fraction X, les composés 4,51 et 5,05 issus d'électrofocalisation, révèlent non pas un, mais deux constituants antigéniques. Les sous-fractions moussantes isolées par électrofocalisation ne sont pas pures ; elles contiennent deux composés antigéniques dont un provient directement de l'orge.

43 - CONCLUSIONS

La question de la filiation de composés responsables de la mousse de la bière et constituants de l'orge est abordée de trois façons.

Les spectres des acides aminés de l'entité mousse positive X et de la fraction moussante repérée par électrofocalisation ne sont pas suffisamment caractéristiques, pour permettre le rapprochement de composés intéressants vis-à-vis de la mousse et les fractions albumines, globulines, hordéïnes ou glutélines de l'orge.

La gel électrofocalisation et la méthode dérivée de raccordement d'arcs, indiquent des analogies entre composés de l'orge et composés de l'entité X, puisque 12 bandes se raccordent.

La preuve de la filiation est apportée par des méthodes immunologiques. La fraction X induit la formation d'anticorps

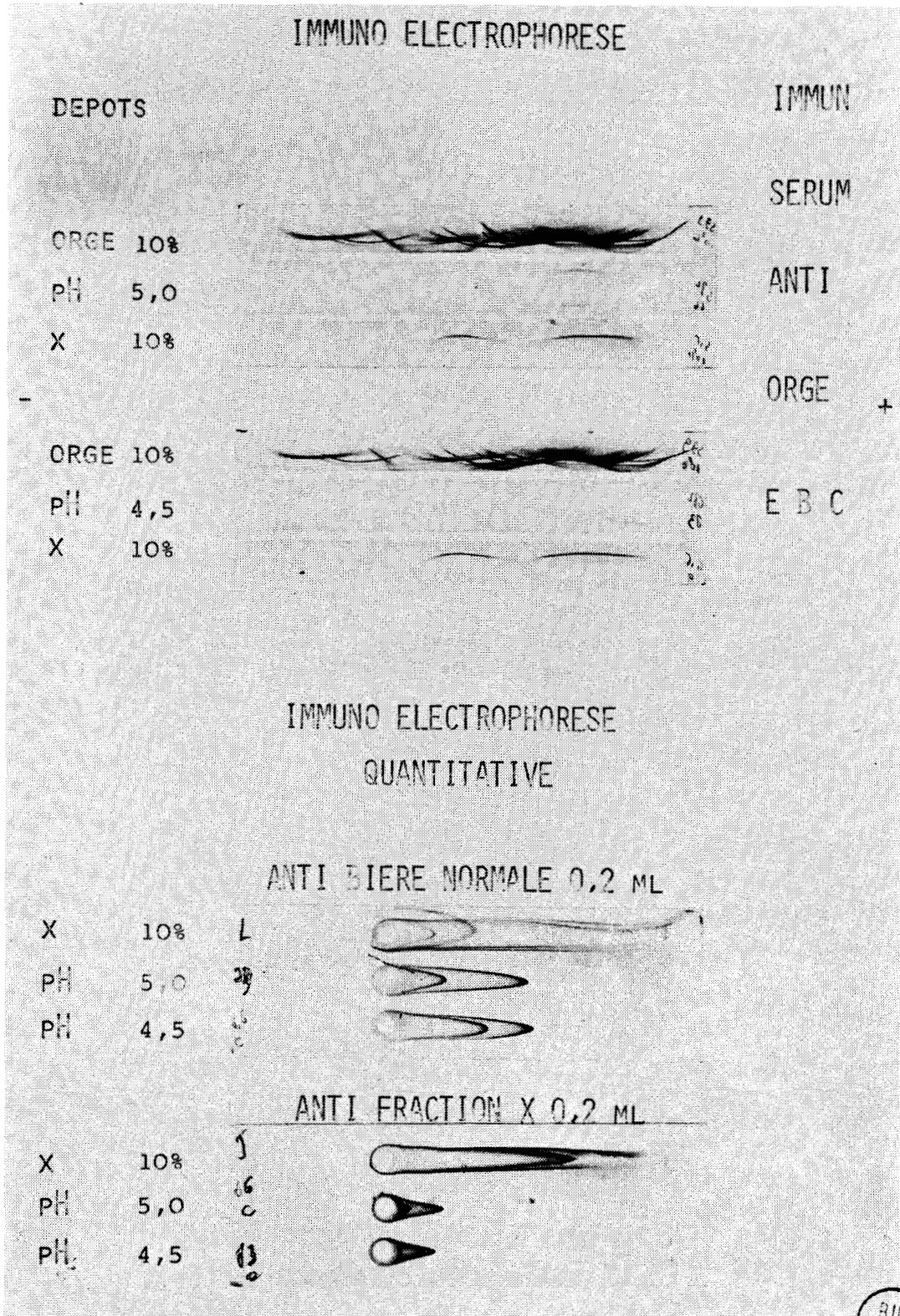


FIGURE 28

IMMUNOELECTROPHORESES
DES FRACTIONS MOUSSANTES
ISSUES D'ELECTROFOCALISATION

et réagit contre un immunosérum anti-orge. En immuno-diffusion quantitative, 5 arcs sont dénombrés, si l'on tient compte du dédoublement de 2 arcs majeurs. Par immunoélectrophorèse, si la fraction brute X à 10 p. 100 ne donne que 2 arcs, un troisième arc mineur apparaît à l'analyse des sous-fractions A_2 et A_3 obtenues par fractionnement sur résines échangeuses d'ions de la fraction brute X. Enfin, les fractions moussantes décelées par électrofocalisation réagissent en immunodiffusion contre un sérum anti-orge ; les fractions moussantes de pH 4,51 et 5,05 donnent un arc anodique en immunoélectrophorèse contre le sérum anti-orge anti-malt EBC, et révèlent 2 composés antigéniques en immunoélectrophorèse quantitative contre les sérums anti-bière normale et antifraction X.

Un problème reste néanmoins posé : les composés mousse positifs interviennent-ils dans le trouble de la bière ? GRABAR et DAUSSANT (234) répondent par l'affirmative. Pour eux, 2 composés et peut-être 3 sont à la fois dans la mousse et le trouble de la bière. Ne disposant pas encore de fraction trouble, et à fortiori d'immunosérum antitrouble, nous ne pouvons pas répondre. Toutefois, l'arc anodique repéré dans la fraction moussante isolée par électrofocalisation, semble correspondre à un arc anodique, dans les mêmes conditions d'immunoélectrophorèse, du trouble tel que le présentent les auteurs cités précédemment.

- Pour assurer une meilleure stabilité à la bière, les industriels brasseurs utilisent un traitement par enzymes protéolytiques suivi d'une pasteurisation. Nous avons fait subir à l'entité mousse positive des traitements analogues, de façon à étudier l'influence de ces procédés technologiques sur les qualités moussantes de la fraction X.

5° - INCIDENCES DE LA PASTEURISATION
EN PRESENCE D'ENZYMES PROTEOLYTIQUES
SUR L'ENTITE MOUSSE POSITIVE X.

51 - INTRODUCTION

- Le brasseur pour s'assurer d'une bonne conservation de la bière se préoccupe de garantir une bonne stabilité biologique et colloïdale.

- La stabilité biologique est obtenue par pasteurisation. Deux techniques sont rencontrées, la flash pasteurisation et la pasteurisation tunnel.

. La flash pasteurisation ou traitement de la bière en vrac est réalisée dans un échangeur de chaleur à plaques; la bière, en absence d'air, est portée quelques secondes à une température de l'ordre de 70°C.

. La pasteurisation en tunnel traite à la fois le contenu et le contenant. L'ensemble subit un séjour d'un quart d'heure à une température d'environ 60°C pour obtenir un traitement de 15 à 20 unités de pasteurisation.

- La stabilité colloïdale est préservée généralement par l'emploi d'enzymes protéolytiques, ajoutées, soit en cave de garde, soit après filtration de la bière finie. Pour combattre les effets néfastes de l'oxygène, on a parfois recours à l'acide ascorbique en action combinée ou non avec du métabisulfite de Na, ces substances jouent en outre un rôle d'effecteurs vis-à-vis des enzymes protéolytiques.

- Toujours préoccupé par l'équilibre bonne stabi-

lité colloïdale et bonne stabilité de mousse, l'industriel brasseur craint toujours de nuire aux qualités de mousse en voulant assurer une bonne conservation à la bière. C'est pourquoi nous avons étudié la pasteurisation en présence d'enzymes protéolytiques et d'effecteurs de l'entité mousse positive X.

- Nous conduirons deux modes d'expérimentation :

- . pasteurisation de type industriel.
- . surpasteurisation de laboratoire.

52 - PASTEURISATION DE TYPE INDUSTRIEL

52.1 - MATERIEL ET METHODES

- Matériel

- Le substrat d'étude est la fraction moussante brute X, en solution finale à 0,2 %.

- L'enzyme étudiée est une papaine industrielle, la papaine CFA (Centrifugée, filtrée, atomisée) commercialisée par la firme LANDOUZY *. Son titre de 960 unités tyrosine, par mg/minute à 40°C est déterminé par la méthode A.P.A. (235).

- Les effecteurs de l'action enzymatique, acide ascorbique et métabisulfite de Na sont utilisés en synergie ou non, à raison de 10 ppm.

- Méthodes

- Dans un tube cylindroconique, 4 ml d'une solution filtrée de la fraction brute X sont ajoutés à 1 ml de la solution enzymatique à 4 mg/l contenant ou non des effecteurs.

- Pour nous placer à un pH voisin de la bière, toutes les solutions sont effectuées dans un tampon de pH 4,0 :

* LANDOUZY, 27 Rue de Wazemmes - LILLE.

Na ₂ H PO ₄	0,2 M	19,3 ml
Ac. citrique	0,1 M	30,7 ml
Eau	q.s.p.f.	100 ml

- Le tube soigneusement bouché est soumis à la pasteurisation à des températures de 65°C, 60°C, 50°C. Après 1 heure ou 20 mn, l'action enzymatique est bloquée à 0°C. Après retour à la température ambiante, les pouvoirs moussant sont comparés à des témoins.

52.2 - RESULTATS

- Les résultats sont traduits par les pouvoirs moussant, présentés sous forme d'histogramme figure 30 page 144.

La pasteurisation dans des limites convenables, tant en présence de papaïne seule qu'en présence d'enzyme et d'effec-teurs d'enzyme, (acide ascorbique et métabisulfite de sodium) n'altère pas les qualités de mousse. Seule une surpasteurisation à 65°C pen-dans 1 heure a une incidence sur la stabilité de la mousse. La forma-tion de mousse quant à elle n'est pas affectée.

- Notre but était de localiser l'effet du traite-ment protéolytique sur des fractions de l'entité moussante X, visua-lisées par gel électrofocalisation en coloration double : bleu coo-massie et P.A.S. C'est pourquoi puisqu'un un traitement industriel même trop drastique ne se traduit pas par des incidences tranchées, nous avons délibérément pasteurisé la fraction X dans des conditions de suractivité enzymatique et de surpasteurisation.

53 - PASTEURISATION EXPERIMENTALE DANS DES CONDITIONS DE SURACTIVITE ENZYMATIQUE

53.1 - MODE EXPERIMENTAL

Nous reconduisons l'expérimentation décrite paragra-

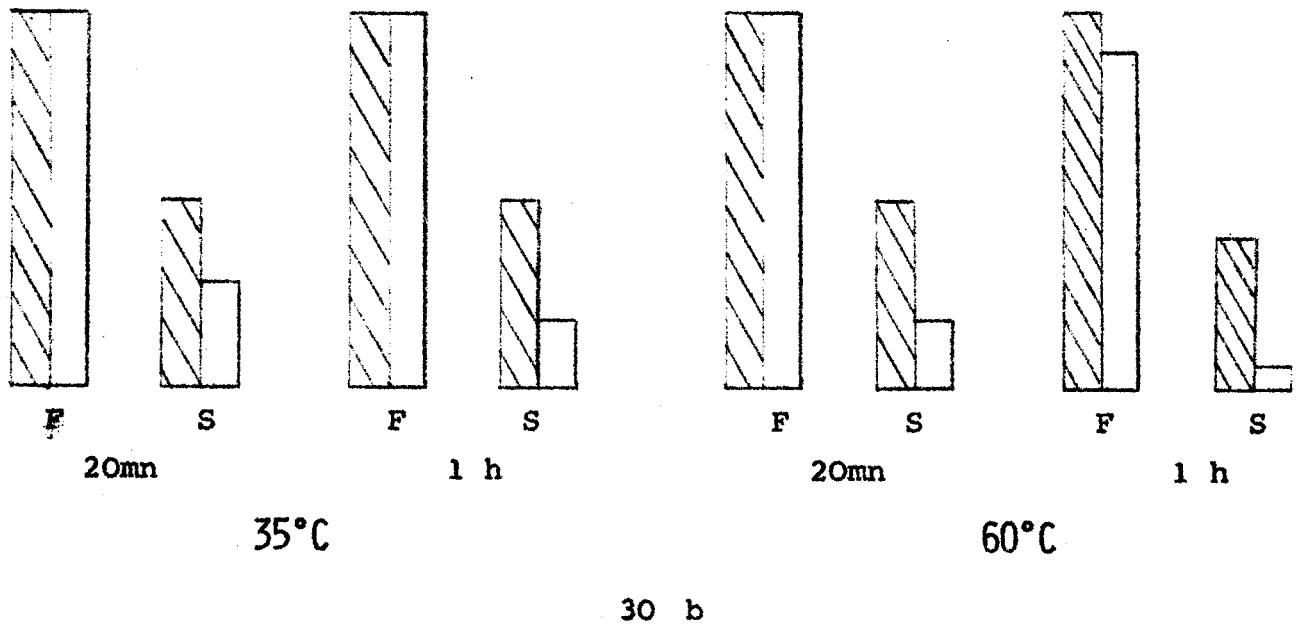
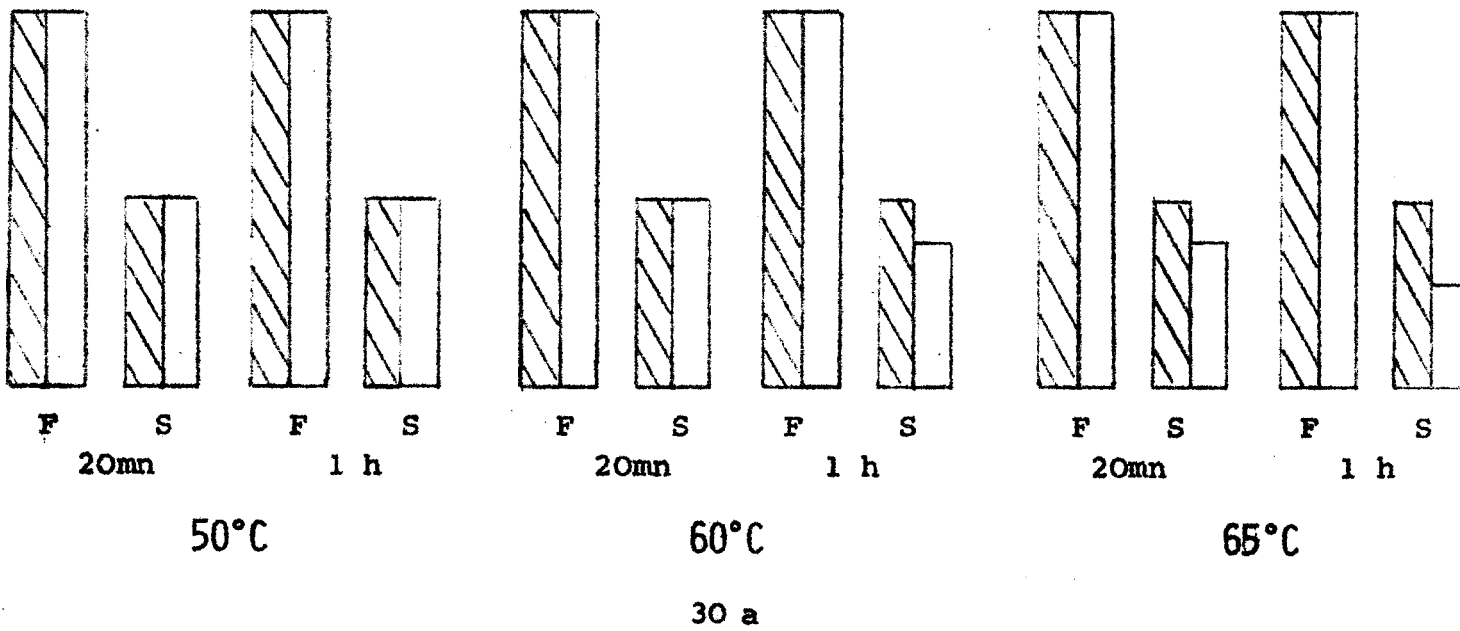


FIGURE 30
INCIDENCES DE LA PASTEURISATION
EN PRESENCE D'ENZYMES PROTEOLYTIQUES
SUR L'ENTITE MOUSSE POSITIVE X



30 a - Pasteurisation de type industriel
 30 b - Suractivité enzymatique expérimentale de laboratoire

□ Échantillon ▨ Témoin
 F - Formation de mousse S - Stabilité de mousse

phe 52.1.

Pour nous placer dans des conditions d'activité maximale de la papaïne, le tampon utilisé est alors celui préconisé par l'APA (235) de pH 6,0 de composition :

EDTA di Na	14,0 g.
Chlorhydrate de cystéine	6,1 g.
Na ₂ H PO ₄	7,1 g.
pH ajusté à 6,0 par Na OH N	
eau q.s.p.f.	1.000 ml.

Les températures choisies sont 35°C et 60°C pour des durées d'action de 20 minutes et 1 heure.

53.2 - RESULTATS

L'histogramme figure 30 page 144 témoigne des pouvoirs moussant. Si la formation de mousse est sensiblement altérée, la stabilité de la mousse est très nettement diminuée par l'activité enzymatique.

Une suractivité protéolytique a donc perturbé la formation et la stabilité de la mousse.

Les fractions pasteurisées sont alors analysées par gel électrofocalisation, soit après concentration, soit après dialyse et lyophilisation.

Les électrophorégrammes ne montrent pratiquement pas de différence entre les témoins mousse positifs et les fractions mousse altérées. Aucune bande ne disparaît. Aussi pour envisager une visualisation nette de l'effet de pasteurisation, une nouvelle étape reste à franchir. La gel électrofocalisation et ses méthodes de coloration doivent devenir quantitatives par l'emploi d'un densitomètre enregistreur.

53.3 - CONCLUSION

Le traitement par la papaïne dans des conditions normales n'altère pas les qualités de la mousse.

Pour obtenir des résultats tranchés et diminuer la formation et la stabilité de la mousse, il faut effectuer un surtraitement enzymatique. Pour visualiser le traitement protéolytique sur des fractions de l'entité moussante X, il est indispensable de rendre quantitative la gel électrofocalisation.

CONCLUSIONS
GENERALES

Le problème de la mousse de la bière préoccupe depuis longtemps les brasseurs. Pour tenter de le résoudre, les chercheurs de l'European Brewery Convention (E.B.C.) se sont regroupés au sein du comité "Trouble et Mousse de la Bière". La naissance, en 1968, de cette commission à l'échelon international, montre l'acuité et la difficulté du problème. Malgré une réunion annuelle, les recherches demeurent actuellement préliminaires. Une méthode de référence, de mesure de la mousse, parfaitement reproductible, fait cruellement défaut, tant au niveau contrôle industriel qu'au laboratoire de recherche. Elle est à l'étude au Comité des Analyses de l'E.B.C.

La mousse résulte d'un équilibre dynamique entre facteurs mousse positifs et mousse négatifs. Pour étudier les composés responsables de la mousse de la bière, nous avons mis en oeuvre des techniques physicochimiques, chimiques et chromatographiques.

Nous nous sommes attachés dans ce présent mémoire, à préparer une entité mousse positive et à l'analyser pour localiser les fractions responsables de la formation et de la stabilité de la mousse.

A l'aide d'une tour de mousse, par moussage de la bière en continu, sous atmosphère d'azote, nous avons concentré dans la bière de mousse, les facteurs mousse positifs. Pour conserver un stock homogène, inaltérable, nous les avons lyophilisés moyennant certaines précautions. A partir de cette bière de mousse lyophilisée, nous avons obtenu, par relargage chimique, à l'éthanol, une fraction X. Cette entité se distingue par ses qualités de formation et de

stabilité de mousse ; elle contient 47 p. 100 de protéïdes pour 51 p. 100 de glucides.

Nous nous sommes préoccupés d'étudier cette entité moussante X.

Les procédés de fractionnement utilisés : - gel filtration, échanges d'ions, électrophorèse préparative, électrofocalisation, nous permettent d'avancer les conclusions suivantes :

1°) Le pouvoir moussant des fractions n'est pas proportionnel à leur teneur en protides.

2°) L'entité mousse positive brute est très hétérogène. Une technique unique ne permet pas d'isoler un composé mousse positif prédominant.

3°) La fraction moussante brute est douée de propriétés antigéniques. Il est important de noter que trois constituants dérivent de l'orge. Les opérations technologiques de maltage, de brassage, de fermentation et le moussage n'ont pas altéré la structure antigénique de certains composés. Une filiation composés responsables de la mousse et composés originels de l'orge est démontrée.

4°) L'électrofocalisation et l'électrofocalisation de recyclage montrent qu'une fraction mousse positive de pH isoélectrique 7,5 existe dans le moût et a disparu dans la bière. Par contre, une fraction de la bière de pH isoélectrique 4,5 se distingue par sa stabilité exceptionnelle. Cette fraction dérive de l'orge car elle donne un arc en immunoélectrophorèse.

5°) L'absence de technique simple de visualisation de fractions isolées de bière nous a conduit à développer la technique d'électrofocalisation en gel de polyacrylamide. Nous avons mis au point des méthodes de colorations spécifiques, au bleu coomassie, au P.A.S. et à la double coloration bleu coomassie-P.A.S., ainsi que la vitrification du gel.

6°) L'emploi d'enzymes protéolytiques au stade industriel dans les conditions opératoires traditionnelles et durant une pasteurisation normale en intensité, n'engendre pas d'ennuis de stabilité de mousse. Par contre, une suractivation de la papaine en laboratoire conduit à une diminution de la formation de la mousse et surtout de sa stabilité.

Nous pensons que le problème de la mousse de la bière pour être mieux connu grâce aux travaux concertés au sein du "Groupe Trouble et Mousse" de l'EBC. Nous disposons maintenant à l'ENSIA, grâce à l'électrofocalisation en gel et à l'immunsérum anti-fraction mousse positive, de moyens nouveaux permettant d'aborder le problème sous de meilleurs auspices.

BIBLIOGRAPHIE

- ABRIBAT M.
Techniques de Laboratoire, 1947, (Loiseleur, Ed. MASSON) (152)
- AMINOFF D.
Biochem J., 1961, 81, 384 (173)
- ANDERSON F.B. HARRIS G.
J. Inst. Brew. 1963, 69, 4, 383, 388 (98)
- ANDERSON F.B.
J. Inst. Brew., 1966, 72, 4, 384-389, 33, (101) (137) (140) (141)
(148) (158)
- ANDERSON J.H.
Amer. Brewer, 1959, 4 31-35
6 39-44
7 39-41 (51)
- A.P.A. LAZO-WASEM E.A.
American Pharmacial Association
J. Pharm. Sc. 1966, 55, 7,723.
- ARONSSON T. GRONWALD A.
Scand. J. Clin. Invest., 1957, 9, 338 (209)
- AWDEH Z.L. WILLIAMSON A.R. ASKONAS B.A.
Nature G.B., 1968, 219, 66 (185)
- AWDEH Z.L.
Science Tools, 1969, 16, 42 (191)
- AYARAPAA T.
E.B.C.Proc.Copenhagen 1957, 113-123 (76)
- AYRAPAA T. HOLMBERG J. SELLMANN-PERSSON G.
Proc. EBC, Vienne 1961, 286-298 (76)
- BADER R. SCHUTZ F. STACEY M.
Nature 1944, 8, 3901, 183 (154)
- BANASIK CS. GILLES KA.
Cereal Sci. Today 1966, 2 , 98-118 (73)
- BATESON J.B. LEACH A.A.
EBC Proc. 1969 Interlaken, 161-171 (106) (220) (227)
- BECKMAN
Instruction Manual Model CP Continous flow paper electrophoresis
(210)
- B.I.R.F.
Advisory Leaflet 1971, 37 in J. Inst. Brew. 1971, 77, 3, (41)
- BLOM J.PRIP P.
Woch Brau 1936, 53, 11, (14)
- BÖRSESON J. BORWENG R. GARDELL S. NORDEN A. THUNELL S.
Biochem Biophys. Acta 1964, 82, 158, 161, (121)
- BOUNDY J.A. WALL J.S. TURNER S.E. WOYCHIK J.H. DIMLER R.S.
Biochem 242, 10, 2410, 2415, (136)
- BOURGEOIS A.
Diplome Faculté des Sciences Lille 1966 (157)
- BRENNER (M.W.) EARL D. STEWART R.
Am. Brewer 1967, 4, (50)

BIBLIOGRAPHIE

- ABRIBAT M.
Techniques de Laboratoire, 1947, (Loiseleur, Ed. MASSON) (152)
- AMINOFF D.
Biochem J., 1961, 81, 384 (173)
- ANDERSON F.B. HARRIS G.
J. Inst. Brew. 1963, 69, 4, 383, 388 (98)
- ANDERSON F.B.
J. Inst. Brew., 1966, 72, 4, 384-389, 33, (101) (137) (140) (141)
(148) (158)
- ANDERSON J.H.
Amer. Brewer, 1959, 4 31-35
6 39-44
7 39-41 (51)
- A.P.A. LAZO-WASEM E.A.
American Pharmacial Association
J. Pharm. Sc. 1966, 55, 7,723.
- ARONSSON T. GRONWALD A.
Scand. J. Clin. Invest., 1957, 9, 338 (209)
- AWDEH Z.L. WILLIAMSON A.R. ASKONAS B.A.
Nature G.B., 1968, 219, 66 (185)
- AWDEH Z.L.
Science Tools, 1969, 16, 42 (191)
- AYARAPAA T.
E.B.C.Proc.Copenhagen 1957, 113-123 (76)
- AYRAPAA T. HOLMBERG J. SELLMANN-PERSSON G.
Proc. EBC, Vienne 1961, 286-298 (76)
- BADER R. SCHUTZ F. STACEY M.
Nature 1944, 8, 3901, 183 (154)
- BANASIK OS. GILLES KA.
Cereal Sci. Today 1966, 2 , 98-118 (73)
- BATESON J.B. LEACH A.A.
EBC Proc. 1969 Interlaken, 161-171 (106) (220) (227)
- BECKMAN
Instruction Manual Model CP Continous flow paper electrophoresis
(210)
- B.I.R.F.
Advisory Leaflet 1971, 37 in J. Inst. Brew. 1971, 77, 3, (41)
- BLOM J.PRIP P.
Woch Brau 1936, 53, 11, (14)
- BÖRSESON J. BORWENG R. GARDELL S. NORDEN A. THUNELL S.
Biochem Biophys. Acta 1964, 82, 158, 161, (121)
- BOUNDY J.A. WALL J.S. TURNER S.E. WOYCHIK J.H. DIMLER R.S.
Biochem 242, 10, 2410, 2415, (136)
- BOURGEAIS A.
Diplome Faculté des Sciences Lille 1966 (157)
- BRENNER (M.W.) EARL D. STEWART R.
Am. Brewer 1967, 4, (50)

BREWNZYNE

Nouvelles de Naarden 1971, 10, 7-9 (23)

BRITWISTLE JE. HUDSON JR. Mac WILLIAM IC.

J. Inst. Brew. 1962, 68, 6, 467-470 (31) (133)

BROWN W.D. GREEN S.

Anal. Biochem 1970, 34, 2, 593-595 (225)

CAMPAGNE Y.

Ind. Alim. Agricoles 1967, 79, 529, 536, (65) (72)

CARLSBERG (9)

CHAPON L. CHAPON S. CHEMARDIN M. KRETSCHMER K.F.

Proc. E.B.C. Interlaken 1969, 173-192 (131)

COATES JH. SIMMONDS DH.

Cereal Chem. 1961, 38, 256 (104)

COHN E.S. STRONG W.L. HUGUES Jr. D.J. MULFORD J.N. ASHWORTH M.M. TAYLOR H.L.J.

Amer. Chem. Soc. 1946, 68, 459 (88) (94) (159)

COOK A.H.

Proc. E.B.C. Lisbonne 1971, 469-479, (2) (5)

COOK A.H.

Communication personnelle

News Letters n°2 1971 E.B.C. Haze and Foam Group (108)

COOK A.H.

Barley and Malt - Academic Press 514 (230)

CRAMER F.

Chem. Ber 1951, 84, 851

1953, 86, 1576 (176)

CRAMER F. KAMPE W.J.

J. Amer. Chem. Soc. 1965, 87, 1115 (176)

CURTIS N.S.

J. Inst. Brew. 1966, 72, n°3, 240-250 (4) (107)

CURTIS N.S. MARTINDALE L.

J. Inst. Brew. 1961, 67, 4, 417-420 (38)

DAENECKINDT J. DE WACHTER R.

Echo Bie 1965 21, 62-63 (62) (64)

DALE G. LATNER A.L.

Lancet(G.B.) 1968, 1, 847, (182)

DAVIES H.

Protides of the biol. fluids - Pergamon Press, 1969, 17, 386-396 (216)

DAVIES J.W. HARRIS G. PARSONS R.

J. Inst. Brew. 1956, 62, 31-38

38-50

50-56 (89) (90) (93) (99) (100)

DE CLERCK J.

Echo Brasserie 1959, 1147 (10)

DE CLERCK J, DEJICKER G.

Bull. Ass. Ec. Br. Louvain 1957, 53, 77, (13)

DELIZEE P. DEVREUX A. CASTIAU M.

Bull. Ind. Ferm. 1967, 34, 5, (74)

DISCHE Z.

J. Biol. Chem. 1947, 167, 189, (170)

DONHAUSER S.

- These : Fakultät für Brauwesen Weihenstephan der Technischen Hochschule München
Brauwiss. 1967, 20, 4, 135-144
5, 209-214
6, 234-247
- Communication personnelle (199 bis)

DRAWERT F. RADOLA B.J. MÜLLER W. GÖRG A.
Proc. E.B.C. Interlaken 1971, 479-488 (180)

DWORSCHACK A.G.
Brew Digest 1963, 38, 110, 63-66, (70)

E.B.C.
Haze Group - Biotechnique 1967, 3, 28-31, (86) (227)

E.B.C.
Analytica Edition n°1 - Elsevier Publ. Comp. (150)

E.B.C.
Analytica Edition n°2 - Elsevier Publ. Comp. - A paraître - (151)

E.B.C.
Secrétariat POB 455 Rotterdam - Holland - (194)

E.B.C.
Dosage à la ninhydrine (215) (218)

ELSON L.A. MORGAN W.T.J.
Biochem. J. 1933, 27, 1824 (171)

ENARI T.M.
Wallerstein Lab. Comm. 1967, 30, n° 101, 5-19, (32)

ENARI TM. MIKOLA J.
Proc. EBC Vienne 1962, 62-69 (103)

ENARI TM.
Communication personnelle (196)

ENARI TM.
Brauwiss 1962, 15, 4, 100-108
1963, 16, 6, 189-192 (205)

ENARI TM. MIKOLA J.
Wstein Lab. Comm. 1967, 30, 101, 5-16 (135)

FEILLET P.
Ann. Technol. Agric. 1967, 16, 2, 135-183 (229)

FEINSTEIN G. WHITAKER J.R.
Biochem 1964, 2, 1050 (115)

GJERSTEN P.
Proc. ASBC 1966, 113-120 (85)

GJERSTEN P.
Communication personnelle (156)

GJERSTEN P. TROLLE B. ANDERSEN K.
Proc. EBC Bruxelles 1963, 320-341 (36) (37) (40)

GLICKSMAN M.
1969 Gum Technology in the food industry 4 Academic Press (81)

GRABAR P. DAUSSANT J.
- Communication personnelle. Comité trouble et mousse EBC Londres
1970
- J. Inst. Brew. 1971, 77, 6, 544-546 (110) (234)

GRABAR P. LONTIE R. DJURTOFT R.
Biotechnique Mars 1967, 28-31 (195)

- GRABAR P. WILLIAMS C.A.
Biochem and Biophys. Acta 1955, 17, 67 (198)
- GRABAR P. DAUSSANT J.
J. Inst. Brew. 1971, 77, n°6, 544-546 (202)
- GRAY JJ. STONE I.
Wallerstein Lab. Comm. 1939, 6, 46
1940, 10, 159 (16)
- GRAY P.P. STONE I.
Proc. ASBC Conv. 1940, 11 (155)
- GUGGENBERGER J. KLEBER W.
Proc. EBC Bruxelles 1963, 299-320 (53)
- HAGLUND H.
LKB Isoelectric focusing in pH gradients 1972 (212)
- HARRIS G. Mac WILLIAM I.C.
J. Inst. Brew. 1961, 67, 2, 154 (132)
- HARRISON J.G. ROWSELL J.E.
Process. Biochem. 1970, 5, 4, 37-39 (22)
- HARTONG B.D.
Rev. Int. Brass. Malt 1947, 3, 5, 8 (11)
- HARTONG B.D. KRETSCHNER K.F.
Die Brauerei - Wiss. Beilage 1953, 6, 109 (30)
- HAUTKE P. PERRICEK D.
Mschr. Brauerei 1970, 23, 12, 341-345 (35)
- HEBERT J.P.
Mémoire DEA Faculté des Sciences Lille (169)
- HELM E.
J. Inst. Brew. 1936, 42, 379 (8)
- HENNRICH N. CRAMER F.
J. Amer. Chem. Soc. 1965, 87, 1121 (177)
- HOCHSTRASSER K.
Z. Physio. Chem. 324, 250- 1961 -
328, 61 , 1962 -
333, 99 , 1963 - (143) (167)
- HODGE E.J.
Agr. Food. Chem. 1953, 928-943 (68)
- HOLSTROM C.D. POLLOCK G.E. ELBRICHT E.S. Mc CLARY J.E.
Collant- Proc. ASBC 1958, 127-129 (19)
- HOLTERMAND E.
Brew. Digest 1966, 58-66 (67)
- HÖPPLER F.
Colloid Science Elsevier Publishing Company 1969 p.169 (160)
- HOUSTON L.L.
Anal. Biochem, 1971, 44, 81-88 (231) (232)
- HUDSON J.R.
Brew. Digest 1971 July 86-91 (3)
- ISSING E.
These Technologische Universität Weihenstephan 1971 (12)
- ISSING E. KÖHN K.
Brauwiss 1971, 24, 2, 37-42, (12)
- JAKUBCZAK E.
Communication personnelle (211) (222)

JENKISS

J. Inst. Brew. 1970, 76, 5, 481-485 (26)

KAISER A.

Brauer und Malzer 1966, 10, 18-21
11, 14-17
12, 13-16 (69)

KAMIMURA M.

Bull. Brewing Sci. Tokyo 1965, 2, 33-39 (78)

KAMM G.

Kurth Malting and Co. U.S. Patent AP 3099563 1963, Brauwiss 1968,
7, 528 (49)

Brauwelt 1966, 106, 31, 32, 549-555 (34) (56)

Brauwelt 1970, 110, 59, 1105-1108, (58) (166)

KIEKENS E.

Mémoire du CERIA Bruxelles 1969 (52)

KLEBER J.

Brauwelt 1967, 39/40, (42)

KLEBER W. GEYER H.

Brauwelt 1971, 111, 73, 1643-1646

1972, 25, 4, 116-120 (64 bis)

KLOPPER WS.

Wallerstein Lab. Comm. 1955, 18, 123.

Brauwelt 1970, 110, 1807-1811

Communication personnelle (7)

KOLBACH P.

EBC Analytica Elsevier Publ. Comp. 98 (29)

Berichte Arbeiten VLB 1963, 42, (75)

KORN E.D. NORTHCOTE D.H.

Biochem J. 1960, 75, 12-17 (125)

KRAUSS G.

Brew. Digest 1970, 6, 66-71 (27)

KRAUSS W.

Communication personnelle

EBC Trouble et Mousse Londres 1970 (161) (125)

KREMKOV C.

M Schr. Brauerei 1969, 3, 53-56 (6)

KUNDIG W.

These Jons Verlag Zurich 1962 (139) (146)

KUNDIG W. NEUKOM H. DEUEL H.

Helv. Chim. Acta 1961, 44, 94, 823-829 (83) (138)

LAMPORT D.T.A.

Fed. Proc. 1962, 21, 398

Nature 1967, 216, 1322-1325 (122)

LAMY J. LAMY J. COMPIN S. WEILL J.

Ann. Biol. Clin. 1971, 29, 125-143 (181)

LAURELL C.B.

Analytical Biochemistry 1966, 15, 45 (200) (203) (204) (233)

LAUWERS A.

Fermentatio 1963, 4, 145-162 (18) (28) (60)

Communication personnelle

EBC Groupe Trouble et Mousse Londres 1970 (162)

- LEACH A.A.
J. Inst. Brew. 1968, 74, 2, 183-192 (134)
- LETTERS R.
J. Inst. Brew. 1969, 75, 1, 54-60 (84) (175)
- LEVEAU J.Y.
Communication personnelle (223)
- LIS H. SHARON N. KATCHALSKI E.
J. Biol. Chem. 1966, 241, 3, 684.
Biochim. Biophys. Acta 1964, 83, 376 (118)
- LKB
Documentation Technique Acta Ampholinæ n°3 (221)
- LOISA M. NUMMI M. DAUSSANT J.
Brauwiss. 1971, 24, 10, 366-368 (111) (201) (205)
- LONTIE R. VOEST TH.
Proc. EBC 1959, 25-36 (228)
- LOWRY O. ROSEBROUGH N. FARR L. RANDALL J.
J. Biol. Chem. 1951, 193, 265-275
- LUERS H. MONINGER W.
Wochenschrift für Brauerei 1935, 385 (59)
- LUNDIN H. SCHRODERHEIM J.
J. Woch. Brau. 1931, 48, 347-357 (91)
- LUYKX JMM. VAN VELDHINZEN H.
Int. Tijds. Brouw. Mout. 1960/61, 20, 56
" " " " 1958/59, 18, 19 (43)
- LYONS TP. HOUGH J.S.
J. Inst. Brew. 1971, 77, 3, 300-305 (127)
- MAC WILLIAM I.C.
J. Inst. Brew. 1970, 76, 6, 525-535 (124)
- MAC WILLIAM I.C. CLAPPERTON J.F.
Proc. EBC Interlaken 1969, 270-279 (128)
- MALZEW PM. WELIKAJA EI. SCHWETZ WH.
Brauwiss 1965, 18, 10 (71)
- MARKUZE Z.
Aca. Chim. Acad. Sc. Hung 1960, 23, 247-254 (66)
- MAURER H.R.
Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel
electrophoresis W. de Gruyter
- p. 34 (187)
- p. 72 (193)
- MAZERON P. KRISCHER J. HORN R.
Proc. EBC Stockholm 1965, 70-80
Bull. Soc. Chim. Biol. 1966, 48, n°2, 239
Bull. Soc. Chim. Biol. 1967, 49, n°7, 791 (207)
- MONTREUIL J. SPIK G.
Monographie n°1 du laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté
des Sciences de Lille 1963 (163)
Monographie n°2 Laboratoire Chimie Biologique de la Faculté des
Sciences de Lille 1968 (163)
- MONTREUIL J. SPIK G. KONARSKA A.
Monographie n°3 Laboratoire Chimie Biologique de la Faculté des
Sciences de Lille 1967 (163)
- MONTREUIL J. SCHEPPLER N.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1959, 41, 13, (168)

- MUNEKATA, KOSHINO, YADA
Bull. Brew. Sci. Tokyo 1960, 6, 1, 61 (39)
- MURACHI T. YASUI M. YASUDU Y
Biochem 1964, 3, 48 (113)
- MYRBACK K. MYRBACK S.
Woch Brau 1931, 48, 43, (92)
- NEUMANN N.P. LAMPEN J.O.
Biochemistry 1969, 8, 9, 3552-3556 (129)
- NIELSEN E.B.
Proc. EBC. Lisbonne 1971, 149-170 (25)
- NUMMI M. LOISA M. ENARI T.M.
Proc. EBC Interlaken 1969, 349-356 (208)
- OSBORNE T.B.
J. Amer. Chem. Soc. 17, 539, 1895 (85)
- OTA S. MOORE S. STEIN W.H.
Biochemistry 1964, 3, 180, (114)
- OUCHTERLONY O.
Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 1949, 26, 507 (197)
- PEETERS H.
Protides of the biological fluids 1969, 1970 Pergamon Press (213)
- PETIT L.
Brasserie 1968, 252, 3-12 (71 Bis)
- PHAFF H.J.
Ann. Rev. Microbiol. 1963, 17, 15 (123)
- PIERCE J.S. PURSELL A.J.R.
Proc. EBC, Rome 1959, 246-265 (17) (97)
- PREAUX TH.
Proc. EBC Bruxelles 1963, 59-68 (206)
- PUSZTAI A.
Biochem J. 1965, 94, 611
Biochem J. 1966, 101, 379 (119)
- PUSZTAI A WATT W.B.
European J. Biochem. 1969, 10, 523-532, (120)
- RAIBLE K.
Mschr. Brauerei 1961, 14, 80 (45)
- RILEY R.F. COLEMAN M.K.
J. Lab. Clin. Med. 1968, 72, 714 (190)
- ROCHE M.
Communication personnelle (217)
- ROSS S. CLARK G.L.
Wallerstein Lab. Comm. 1939, 2, n°6 52 (15)
- RUCH JE, TAYLOR EJ, JARBOROUGH SA, SEGEL E.
Brauwiss 1966, 19, 497 (46)
- RUDIN AD.
J. Inst. Brew. 1958, 64, 238-239 (37)
J. Inst. Brew. 1957, 53, 506 (96)
- RUDIN AD. HUDSON JR.
J. Inst. Brew. 1968, 64, 317-318 (44)
- RUYSSEN R.
Echo Bie 19, 541-550 1963 et Brauwiss 1964, 17, n°4, 155 (55)

- SAVAGE D.J. THOMPSON C.C.
J. Inst. Brew. 1971, 77, n°4, 371-375, (109) (179) (186) (192)
- SCALLET BL. STANSBREY J.J. SMALL FW Jr. GIBBS P.F.
Anheuser Bush Inc St Louis Missouri Wallerstein Lab. Comm. 1953,
16, n°53, 133-147 (87) (112) (178)
- SCHEIDEGGER J.J.
Inter. Arch. Allergy. Appl. Immunol. 1955, 7, 103 (199)
- SCHMID K.
J. Amer. Chem.Soc. 1953, 75, 60 (95)
- SCHUSTER K.
Brauwelt 102, n° 21, 380-383 (1962) - (57) (61)
- SCHUSTER K. NARZISS L. KUMADA J.
Brauwiss 1967, 20, 125-135
185-206
280-289 (82)
- SCHUTZ F.
Nature 1937, 4, 629 (153)
- SCOCCA J. LEE Y.C.
J. Biol. Chem. 1969, 244, n°18, 4852-4863 (116)
- SCRIBAN R.
Brasserie, 1966, 12, 240, 476-491 (1) (26 bis)
- SCRIBAN R. CARUYER O. NOEL J.P.
Brasserie 1969, 270, 421-427 (164)
- SENTANDREU R. NORTHCOTE DH.
Biochem. J. 1968, 109, 419-432 (126)
- SILBEREISEN K. ANTHON H.F.
Mschr. Brauerei 1967, 8, 297 (79)
- SIMMONDS D.H.
J. Inst. Brew. 1966, 72, 6, 573-579 (102) (105)
- STEWART-TULL D.E.S. ARBUTHNOTT J.P.
Sc. Tools 1971, 18, 2-3, 18, 21 (224)
- STRUMEYER D.M. MALIN M.S.
Biochem J. 1970, 118, 899-900 (130)
- SUNTRUP F.
Brauwelt 1966, 106, 36, 655-663 (47) (63)
- THOMPSON C.C.
Communication personnelle (188)
- TRACEY M.V.
Biochemistry 1950, 47, 433-437 (165)
- TROLLE B. PEDERSEN H.
J. Inst. Brew. 1971, 77, 4, 338-348 (37)
- VESTERBERG O.
Biochim. Biophys. Acta 1972, 257, 11-19 (189)
- VESTERBERG
Science Tools 1969, 16, 2, 24-27 (226)
- WAKAIZUMI H.
Bull. Brewing Sci. Tokyo 1958, 4, 1 (77) (80)
- WALDSCHMIDT LEITZ E.
Z. Physio-Chem. 1961, 324, 243.
Proc. EBC. Vienne 1961, 56
Proc. EBC Bruxelles 1963, 78-84 (142) (144) (145) (147) (149)

- WERNER I. ODIN L.
Acta Soc. Med. Upsaliensis 1952, 57, 230 (172)
- WIEG A.J.
Process Biochem 1970, 5, 4, 46-48 (24)
- WINTER W.G.S.
Int. Brew. & Distill. 1971, 1, 7, 49-52 (48)
- WOLF W.J. RACKIS J.J. SMITH A.K.
Proc. First Int. Congr. Food Sci. and Techn. 1970, 1, 131 (117)
- WRIGLEY C.W.
J. Chromatogr. 1968, 36, 362.
Science Tools 1968, 15, 2, 17-23 (183)
- YAMASHINA, MAKINO
Biochem J. 1962, 51, 359 (174)
- ZANGRANDO T. GIRINI G. COLLAVO F. BARP R.
Proc. E.B.C. Lisbonne 1971, 355-379 (54)
- ZÜRCHER Ch.
These 1970, Forschungs Institut für Technologie der Brauerei und
Mälzerei im Institut für Gärungsgewerbe und biotechnologie Berlin
(76 bis).

LISTE DES REVUES DE TECHNOLOGIE BRASSICOLE

American Brewer		Amer. Brewer
Biotechnique (jusqu'en 1969 aujourd'hui BIOS)		Biotechnique
Brasserie et Malterie de Belgique jusqu'en 1970		Brass. Malt. Belg.
Brasserie et Malterie Europe	depuis 1971	Brass. Malt. Eur.
Brauwelt		Brauwelt
Brauwissenschaft		Brauwiss.
Brewers' Digest		Brew. Digest
Brewers' Guardian		Brew. Guardian
Brewers' Guild Journal		Brew. Guild J.
Brewers' Journal		Brew. J.
Brewing Trade Review		Brew. Tr. Rev.
Bulletin de l'Association des Anciens Etudiants) de l'Ecole Supérieure de Brasserie de) l'Université de LOUVAIN)		Bull. Ass. Ec. Br.Louvain
Bulletin des Anciens Elèves de l'Ecole de) Brasserie de NANCY jusqu'en 1966, aujourd'hui) BIOS)		Bull. Ecole Brass. Nancy
Bulletin of Brewing Science Tokyo		Bull. Brewing Sci. Tokyo
Communications of the Master Brewers' Association) of America)		Comm.Master Brew.Ass.Amer.
Industries Agricoles et Alimentaires		Industr. agric. aliment.
International Brewer and Distiller		Int. Brew. & Distill.
International Tijdschrift voor Brouwerij en) Mouterij)		Int. Tijds. Brouw. Mout.
Journal of the Institute of Brewing		J. INst. Brew.
Mitteilungen der Versuchsstation für das) Gärungsgewerbe)		Mitt. Versuchs Gärungsgew
Modern Brewery age		Mod. Brew. Age
Monatschrift für Brauerei		Msch. Brauerei
Petit journal du Brasseur		Pet. J. Brasseur
Proceedings of the Annual Meeting of the) American Society of Brewing Chemists)		Proc. ASBC Conv.
Proceedings of the European Brewing Convention) Congress)		Proc. EBC

Report of the Research Laboratories of Kirin
Schweizer Brauerei Rundschau
Tageszeitung für Brauerei
Technical Quaterly
Wallerstein Laboratories Communication

Rep. Res. Lab. Kirin Brew
Schweiz. Brauerei. Rdsch.
Tagesztg. Brauerei
Tech. Quater.
Wallerstein Lab. Comm.

