



Encapsulation d'acétolactate décarboxylase : application à la bière

Claire Dulieu

► To cite this version:

Claire Dulieu. Encapsulation d'acétolactate décarboxylase : application à la bière. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1998. Français. NNT : 1998INPL019N . tel-01776064

HAL Id: tel-01776064

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01776064>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

Institut National Polytechnique de Lorraine
École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Thèse

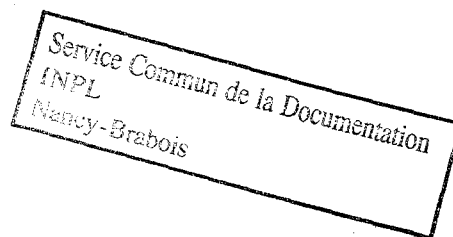
présentée par

[M] 1998 DULIEU - PÉROLS

Claire DULIEU, née PÉROLS

pour obtenir le titre de
Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine
Spécialité : Biotechnologies et Industries alimentaires

Encapsulation d'acétolactate décarboxylase. Application à la brasserie.



soutenue publiquement le 18 mars 1998 devant la commission d'examens

Jury

<i>Président</i>	Professeur	Pierre GERMAIN	ENSAIA, Vandoeuvre-lès-Nancy
<i>Rapporteurs</i>	Monsieur	Patrick BOIVIN	IFBM, Vandoeuvre-lès-Nancy
	Professeur	Jean-Paul SIMON	Institut Meurice, Bruxelles
<i>Examineurs</i>	Professeur	Denis PONCELET	ENSAIA, Vandoeuvre-lès-Nancy
	Docteur	Marc BÉVÉRINI	Tépral, Strasbourg
	Docteur	Rémy CACHON	ENSBANA, Dijon

Directeur de thèse : Professeur Denis PONCELET

Remerciements

Denis Poncelet m'a, sinon presque tout, beaucoup appris. Merci au coach et ami de m'avoir toujours considérée comme un équipier.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur Patrick Boivin de l'Institut Français de la Brasserie Malterie qui, avec Denis Poncelet, a conçu l'idée directrice de ce projet. Merci à lui d'avoir accepté de se pencher sur mon travail en qualité de rapporteur.

Je remercie vivement Jean-Paul Simon. Son enthousiasme en tant que chairman m'a touchée, et il a eu la gentillesse d'être rapporteur de cette thèse.

Je remercie également Messieurs Marc Bévérini du Tépral et Rémy Cachon de l'ENSBANA qui ont spontanément accepté de faire partie du jury en tant qu'examineurs.

I am grateful to Pr Horst Dautzenberg from Potsdam, Germany and to Dr Elena Markvicheva from Moscow, Russia, for their precious (international) collaboration. I wish both of them every success in their professional life.

Merci à la joyeuse équipe du FBI car leur soutien par le rire a été précieux : Marie-France, Catherine, Agnès, Marie-Noëlle, Delphine... J'ai aussi une pensée pour Magali Le Lan-Phelipeau et David Pasquier, qui eux aussi ont "sué" sur l'acétolactate décarboxylase.

Merci au fan clubs Pérols et Dulieu pour les délégations.

Enfin je remercie celui qui a toujours été là dans les petits et dans les grands moments, qui m'a toujours supportée et qui connaît mon manuscrit de thèse par coeur, Benoît.

Sommaire
Liste des figures
Liste des tableaux

Chapitre 1 : Introduction générale

Chapitre 2 : Synthèses bibliographiques & cahier des charges

1. Le diacétyle dans la bière.....	2-1
1.1. La maturation de la bière.....	2-1
1.2. L'apparition du diacétyle au cours de la fermentation.....	2-3
1.3. Les méthodes proposées actuellement pour éviter le diacétyle	2-6
1.4. Levures immobilisées en brasserie.....	2-10
2. L'immobilisation d'enzymes.....	2-20
2.1. Introduction.....	2-20
2.2. Les méthodes de fixation d'enzymes sur un support.....	2-21
2.3. Agrégation par réticulation.....	2-22
2.4. Les méthodes d'inclusion et de microencapsulation.....	2-23
2.5. Les techniques de formation de gouttelettes.....	2-28
3. L'α-acétolactate décarboxylase.....	2-34
3.1. Origines de l'enzyme.....	2-35
3.2. Formes commerciales disponibles.....	2-35
3.3. Caractéristiques enzymatiques.....	2-36
3.4. Séquence de l'enzyme et hypothèse de mécanisme réactionnel.....	2-38
3.5. Législation.....	2-40
4. Cahier des charges pour l'immobilisation d'acétolactate décarboxylase	2-42
4.1. Positionnement du projet.....	2-42
4.2. Débouchés.....	2-42
4.3. Objectifs à atteindre.....	2-43

Chapitre 3 : Matériels & méthodes

1. Acétolactate, acétoïne et diacétyle.....	3-2
1.1. Dosage de l'acétoïne par chromatographie en phase gazeuse.....	3-2
1.2. Dosage spectrophotométrique de l'acétoïne.....	3-4
1.3. Dosage de l'acétolactate.....	3-5
2. Synthèse de l'acétolactate.....	3-6
2.1. Procédure de synthèse de l'acétolactate Novo Nordisk.....	3-6
2.2. Suivi de saponification par titrimétrie.....	3-6
2.3. Suivi de saponification par dosage de l'acétolactate.....	3-7
2.4. Procédure adapté à notre étude	3-7
3. Mesure de l'activité acétolactate décarboxylasique.....	3-7
3.1. Procédure Novo Nordisk.....	3-8
3.2. Procédure améliorée pour notre étude.....	3-8
3.3. Mesure des paramètres cinétiques.....	3-9
3.4. Études de stabilité des enzymes encapsulées.....	3-10
4. Fabrication de billes d'alginate recouvertes de poly(éthylène imine).....	3-10
4.1. L'alginate.....	3-11
4.2. La poly(éthylène imine).....	3-11
4.3. Procédure.....	3-12
5. Fabrication de billes de poly(vinyl caprolactame)/alginate.....	3-13
5.1. Le poly(vinyl caprolactame).....	3-13
5.2. Procédure.....	3-14
6. Fabrication de capsules de complexes polyélectrolytes.....	3-15
6.1. Polymères utilisés pour les capsules de complexes polyélectrolytes..	3-15
6.2. Procédure.....	3-16

6.3. Mesure de la viscosité dynamique du sulfate de cellulose.....	3-17
7. Caractérisation des capsules de complexes polyélectrolytes.....	3-17
7.1. Observation microscopique.....	3-17
7.2. Mesures de masse.....	3-18
7.3. Dosage du taux de conversion du sulfate de cellulose.....	3-18
7.4. Mesure de distribution de tailles.....	3-19
7.5. Modélisation de la fermentation de la bière.....	3-21
8. Récapitulatif des produits utilisés.....	3-21

Chapitre 4 : Résultats & discussion

1. Mise au point de la mesure d'activité acétolactate décarboxylasique.....	4-2
1.1. Contexte de l'étude.....	4-2
1.2. Optimisation de la synthèse de l'acétolactate.....	4-4
1.3. Mesure de la stabilité de l'acétolactate.....	4-8
1.4. Choix des paramètres de conduite de la réaction enzymatique.....	4-11
1.5. Etude de la réaction colorée.....	4-12
2. Techniques d'encapsulation mises en oeuvre pour l'acétolactate décarboxylase.....	4-18
2.1. Inclusion en billes d'alginate recouvertes de polycation.....	4-18
2.2. Imprégnation de billes d'alginate.....	4-19
2.3. Inclusion en billes de poly(vinyl caprolactame)/alginate.....	4-20
2.4. Encapsulation par polymérisation interfaciale de gélatine.....	4-23
2.5. Encapsulation dans une membrane de complexes polyélectrolytes	4-24
2.6. Conclusion sur l'encapsulation.....	4-39
3. Modélisation de la fermentation de la bière.....	4-40
3.1. Principes du modèle.....	4-41
3.2. Calcul des constantes.....	4-44

3.3. Valeurs initiales des variables.....	4-48
3.4. Modélisation d'une fermentation discontinue "classique".....	4-49
3.5. Modélisation d'une fermentation accélérée.....	4-57
3.6. Conclusion de la modélisation.....	4-62
4. Conclusion générale.....	4-63

Chapitre 5 : Conclusions & perspectives

1. Bilan par rapport au cahier des charges.....	5-2
1.1. Utilisation de matériaux non toxiques.....	5-2
1.2. Fabrication de sphères "microbiologiquement propres".....	5-2
1.3. Disponibilité des matériaux d'encapsulation.....	5-3
1.4. Résistance mécanique.....	5-3
1.5. Rapport durée d'utilisation/prix.....	5-4
1.6. Procédé d'encapsulation simple.....	5-4
1.7. Sphères permettant des transferts de masse suffisants.....	5-5
1.8. Sphères individualisées.....	5-5
1.9. Enzyme immobilisée sous forme active.....	5-5
1.10. Rétention de l'enzyme dans les capsules.....	5-5
2. Discussion.....	5-6
2.1. Évaluation des capsules d'acétolactate décarboxylase pour une application industrielle.....	5-6
2.2. Positionnement par rapport à la législation.....	5-6
2.3. Organismes génétiquement modifiés contre acétolactate décarboxylase encapsulée.....	5-7
3. Perspectives.....	5-7
3.1. Stabilité de l'acétolactate décarboxylase native.....	5-7
3.2. Préparation des capsules.....	5-8

Liste des figures

1. Chapitre 1

1.1. Formation du diacétyle dans la bière.....	1-2
--	-----

2. Chapitre 2

2.1. Métabolisme de la levure et formation de diacétyle.....	2-4
2.2. Décarboxylation spontanée de l' α -acétolactate.....	2-5
2.3. Réaction catalysée par l' α -acétolactate décarboxylase.....	2-9
2.4. Réacteur à lit fluidisé par bullage, avec cheminée interne.....	2-12
2.5. Système multi-étagé Kirin pour la fermentation principale de la bière.....	2-13
2.6. Le système Meura-Delta pour la fermentation principale de la bière.....	2-15
2.7. Système de maturation en continu de la bière.....	2-17
2.8. Les méthodes d'immobilisation d'enzymes.....	2-20
2.9. Structures chimiques du sulfate de cellulose et du chlorure de poly(diallyl diméthyl ammonium).....	2-26
2.10. Techniques de formation de gouttelettes.....	2-29
2.11. Dispositifs de fabrication de billes par extrusion.....	2-29
2.12. Dispositifs de fabrication de billes par rupture de jet.....	2-32
2.13. L' α -acétolactate décarboxylase convertit l' α -acétolactate directement en acétoïne.....	2-34
2.14. Non-spécificité de substrat de l' α -acétolactate décarboxylase.....	2-36
2.15. Influence du pH et de la température sur l'activité de l' α -acétolactate décarboxylase.....	2-37
2.16. Comparaison des décarboxylations catalysées par l' α -acétolactate décarboxylase (ALDC) et par l'acétoacétate décarboxylase (AADC).....	2-39
2.17. Mécanisme réactionnel de décarboxylation enzymatique de l'acétoacétate.....	2-40

3. Chapitre 3

3.1. Représentation de l'acétoïne et du pinacol.....	3-2
3.2. Gamme étalon du dosage de l'acétoïne en CPG.....	3-3
3.3. Structure chimique des constituants de l'alginate.....	3-11
3.4. Structure chimique de la poly(éthylène imine)	3-11
3.5. Fabrication de billes d'alginate par émulsification.....	3-13
3.6. Structure chimique du poly(vinyle caprolactame) et du polyamide aromatique.....	3-14
3.7. Dispositif de fabrication des billes de poly(vinyle caprolactame).....	3-14
3.8. Structures chimiques du sulfate de cellulose et du poly(diallyl diméthyl ammonium).....	3-15
3.9. Dispositif de fabrication des capsules de complexes polyélectrolytes.....	3-16
3.10. Gamme étalon : dosage du sulfate de cellulose par le bleu de méthylène.....	3-19

4. Chapitre 4

4.1. Dosage de l'activité ALDC par la méthode Novo Nordisk.....	4-3
4.2. Préparation de l'acétolactate par saponification.....	4-5
4.3. Consommation de soude lors d'une saponification à pH contrôlé.....	4-6
4.4. Proposition pour la surconsommation de soude pendant la saponification.....	4-7
4.5. Formation d'acétolactate au cours de la saponification.....	4-7
4.6. Exemple de profil de titration de l'acétolactate en milieu alcalin par l'acide maléique et résultats expérimentaux.....	4-8
4.7. Effet de l'oxygène sur la décarboxylation spontanée de l'acétolactate.....	4-9
4.8. Effet de la température sur la décarboxylation spontanée de l'acétolactate.....	4-10
4.9. Caractéristiques des complexes colorés.....	4-12
4.10. Contributions du diacétyle et de l'acétoïne dans la coloration au cours du temps.....	4-13
4.11. Gammes étalon : diacétyle et/ou acétoïne.....	4-14

4.12. Procédure de dosage d'activité acétolactate décarboxylasique telle que nous l'avons modifiée.....	4-16
4.13. Distribution des poids moléculaires du sulfate de cellulose et du poly(diallyl diméthyl ammonium).....	4-25
4.14. Effet des concentrations des solutions sur la masse des capsules.....	4-26
4.15. Vitesses initiales de contraction des capsules en fonction de la différence de pression osmotique au départ.....	4-27
4.16. Effet du chlorure de sodium sur la masse des capsules.....	4-28
4.17. Répartition des vitesses initiales de contraction en fonction de la différence de pression osmotique au départ.....	4-28
4.18. Aspect des capsules de complexes polyélectrolytes.....	4-30
4.19. Exemple de distribution de tailles de capsules de complexes polyélectrolytes.....	4-31
4.20. Épaisseur de la membrane des capsules de complexes polyélectrolytes.....	4-32
4.21. Stabilité des capsules au stockage dans l'eau.....	4-35
4.22. Stabilité des capsules au stockage.....	4-36
4.23. Stabilité des capsules pendant l'utilisation.....	4-37
4.24. Test de réversibilité de l'inhibition de l'ALDC par le pH.....	4-38
4.27. Schéma de compréhension de la modélisation (en absence de capsules d'acétolactate décarboxylase).....	4-41
4.28. Schéma de compréhension de la modélisation (en présence de capsules d'acétolactate décarboxylase).....	4-42
4.29. Vitesses de décarboxylation enzymatique de l'acétolactate.....	4-45
4.30. Dégradation des sucres totaux fermentescibles pendant la fermentation.....	4-46
4.31. Modélisation d'une fermentation principale "classique" (sans ALDC).....	4-50
4.32. Modélisation d'une maturation (sans ALDC).....	4-51
4.33. Modélisation d'une maturation avec 2 mg/l d'ALDC libre.....	4-52
4.34. Modélisation d'une fermentation principale avec 2 mg/l d'ALDC libre.....	4-53

4.35. Modélisation d'une fermentation principale en présence de 2 mg/l d'ALDC encapsulé.....	4-55
4.36. Durée de la fabrication de la bière (calculée) en fonction de la charge en ALDC.....	4-56
4.37. Modélisation d'une fermentation principale accélérée (sans ALDC).....	4-58
4.38. Modélisation d'une fermentation principale accélérée en présence de 2 mg/l d'ALDC libre.....	4-59
4.39. Modélisation d'une fermentation principale accélérée en présence de 2 mg/l d'ALDC encapsulée.....	4-60
4.40. Durée de la fabrication de la bière sur levures immobilisées (calculée) en fonction de la charge en ALDC.....	4-61
4.41. Mise en place des capsules d'acétolactate décarboxylase.....	4-62

Liste des tableaux

1. Chapitre 1

2. Chapitre 2

2.1. Autres matériaux d'immobilisation de levures.....2-16

2.2. Coût de l' α -acétolactate décarboxylase.....2-35

3. Chapitre 3

3.1. Programme de température pour le dosage de l'acétoïne en CPG.....3-3

3.2. Paramètres utilisés pour la mesure de viscosité dynamique du sulfate de cellulose.....3-17

3.3. Caractéristiques des produits utilisés.....3-21 & 3-22

4. Chapitre 4

4.1. Décarboxylation de l'acétolactate en milieu acide et à chaud..... 4-6

4.2. Mesures d'absorbance et calcul des coefficients.....4-15

4.3. Test des coefficients calculés.....4-15

4.4. Données comparatives des deux procédures de dosage.....4-17

4.5. Inclusion d'ALDC en billes d'alginate recouvertes de polycation.....4-19

4.6. Inclusion en billes de poly(vinyl caprolactame)/alginate.....4-21

4.7. Hydrophobicité moyenne de l'acétolactate décarboxylase..... 4-22

4.8. Exemples de caractéristiques de distribution de tailles.....4-31

4.9. Rendements d'encapsulation.....4-33

4.10. Schémas de fermentations modélisés.....4-44

4.11. Constantes de vitesse utilisées pour la modélisation.....4-47

4.12. Autres constantes nécessaires pour la modélisation.....4-48

4.13. Valeurs initiales des variables utilisées pour la modélisation.....4-49

Chapitre 1

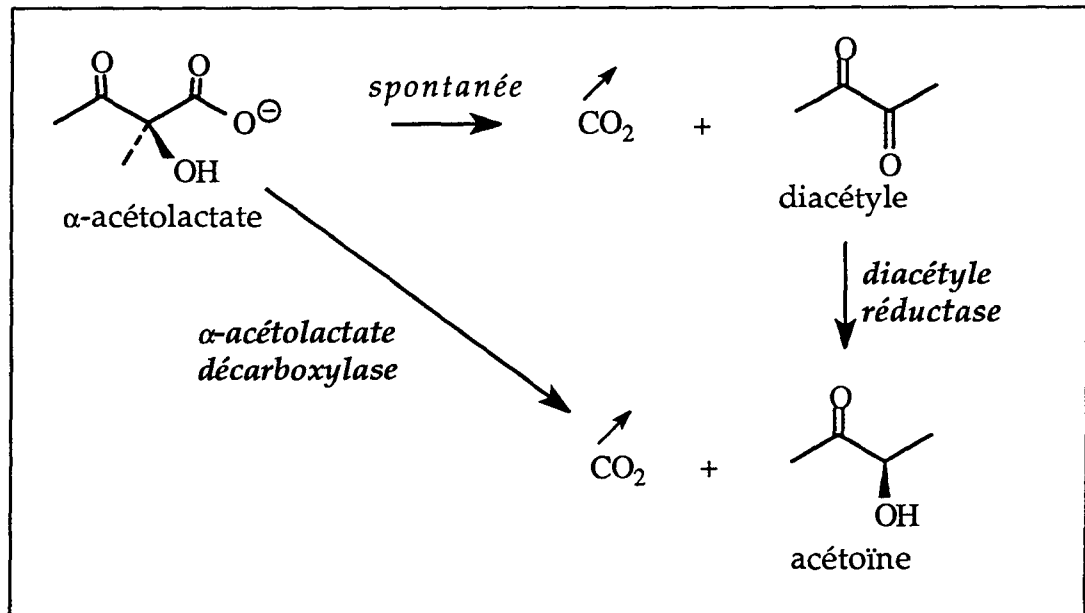
Introduction générale

Lors de la fabrication de la bière, deux fermentations se succèdent. La fermentation principale a pour but de former de l'éthanol et des précurseurs d'arômes. La fermentation secondaire, ou maturation, a pour rôle d'équilibrer les arômes et principalement d'éliminer le diacétyl, à l'origine d'un défaut de goût de beurre.

La maturation est une étape longue : traditionnellement de 2 à 12 semaines, elle est de ce fait coûteuse. Écourter cette étape reviendrait à réduire les coûts et à améliorer la souplesse de réponse aux attentes du marché.

Pour écourter la maturation de la bière, la meilleure solution proposée jusqu'à aujourd'hui est l'utilisation d'une enzyme, l'acétolactate décarboxylase. Son mode d'action est présenté dans la figure suivante.

Figure 1.1 Formation du diacétyl dans la bière



L'efficacité de l'acétolactate décarboxylase pour éviter l'apparition du diacétyl a été montrée sur des fermentations de bière réalisées à l'échelle pilote.

Toutefois, l'utilisation d' α -acétolactate décarboxylase sous forme soluble présente deux inconvénients majeurs :

- l'enzyme ajoutée au moût est perdue à la fin de la fermentation,
- l'enzyme reste présente dans la bière commercialisée.

Ceci va à l'encontre du désir des brasseurs de s'approcher de la Loi de Pureté allemande, qui n'autorise dans la bière que l'eau, le malt, la levure et le houblon.

La solution que nous proposons est d'encapsuler l'acétolactate décarboxylase, c'est-à-dire de l'emprisonner sous forme active dans des petites sphères. L'encapsulation permettra d'insolubiliser l'enzyme dans le but de la retirer de la bière avant embouteillage. L'objectif principal à atteindre est d'accélérer la maturation grâce à l'enzyme encapsulée.

Sommaire

Chapitre 2 : Synthèses bibliographiques & cahier des charges

1. Le diacétyle dans la bière.....	2-1
1.1. La maturation de la bière.....	2-1
<i>1.1.1. Rôle de la maturation.....</i>	<i>2-1</i>
<i>1.1.2. Intérêt d'accélérer la maturation.....</i>	<i>2-2</i>
1.2. L'apparition du diacétyle au cours de la fermentation.....	2-3
<i>1.2.1. Décarboxylation spontanée de l'α-acétolactate.....</i>	<i>2-5</i>
<i>1.2.2. Inconvénients de la présence du diacétyle dans la bière.....</i>	<i>2-5</i>
1.3. Les méthodes proposées actuellement pour éviter le diacétyle	2-6
<i>1.3.1. Contrôle du taux d'oxygène pendant la fermentation principale.....</i>	<i>2-6</i>
<i>1.3.2. Garde chaude.....</i>	<i>2-6</i>
<i>1.3.3. Fermentation sous pression.....</i>	<i>2-7</i>
<i>1.3.4. Levures modifiées génétiquement.....</i>	<i>2-7</i>
<i>1.3.5. Conversion de l'α-acétolactate par les zéolites.....</i>	<i>2-7</i>
1.4. Levures immobilisées en brasserie.....	2-10
<i>1.4.1. Fermentation principale sur levures immobilisées.....</i>	<i>2-11</i>
1.4.1.1. Levures incluses dans des billes de gel.....	2-11
1.4.1.2. Levures fixées sur billes de verre poreux (système Kirin).....	2-13
1.4.1.3. Levures immobilisées sur DEAE-cellulose.....	2-14
1.4.1.4. Immobilisation sur carbure de silicium	2-14
1.4.1.5. Autres matériaux d'immobilisation.....	2-15
1.4.1.6. Conclusion sur les procédés de fermentation principale sur levures immobilisées.....	2-16

1.4.2. Garde sur levures immobilisées.....	2-16
1.4.2.1. Levures adsorbées sur DEAE-cellulose.....	2-16
1.4.2.2. Levures adsorbées sur billes de verre poreux.....	2-18
1.4.2.3. Levures fixées sur carbure de silicium (Système Meura-Delta).....	2-19
1.4.2.4. Conclusion sur les procédés de garde sur levures immobilisées.....	2-19
2. L'immobilisation d'enzymes.....	2-20
2.1. Introduction.....	2-20
2.2. Les méthodes de fixation d'enzymes sur un support.....	2-21
2.2.1. Fixation par liaison covalente à un support	2-21
2.2.2. Adsorption à un support	2-21
2.2.3. Fixation par liaisons métalliques.....	2-22
2.3. Agrégation par réticulation.....	2-22
2.4. Les méthodes d'inclusion et de microencapsulation.....	2-23
2.4.1. Inclusion dans un gel.....	2-24
2.4.2. Microencapsulation par coacervation.....	2-21
2.4.2.1. Phénomène de coacervation.....	2-24
2.4.2.2. Coacervation simple.....	2-24
2.4.2.3. Coacervation complexe.....	2-24
2.4.3. Inclusion dans un gel avec recouvrement.....	2-26
2.4.4. Microencapsulation par polymérisation interfaciale.....	2-27
2.4.5. Microencapsulation par réticulation interfaciale.....	2-27
2.4.6. Microencapsulation en liposomes.....	2-27
2.4.7. Conclusion.....	2-28

2.5. Les techniques de formation de gouttelettes.....	2-28
2.5.1. <i>Production par extrusion.....</i>	2-29
2.5.1.1. Extrusion simple par gravité.....	2-30
2.5.1.2. Extrusion avec flux coaxial.....	2-30
2.5.1.3. Extrusion sous potentiel électrostatique.....	2-30
2.5.2. <i>Production par rupture de jet.....</i>	2-31
2.5.2.1. Rupture de jet par vibration.....	2-31
2.5.2.2. Rupture de jet par coupure.....	2-31
2.5.3. <i>Utilisation de la force centrifuge.....</i>	2-32
2.5.4. <i>Production par émulsification.....</i>	2-32
2.5.5. <i>Conclusion.....</i>	2-33
 3. L'α-acétolactate décarboxylase.....	 2-34
3.1. <i>Origines de l'enzyme.....</i>	2-35
3.2. <i>Formes commerciales disponibles.....</i>	2-35
3.3. <i>Caractéristiques enzymatiques.....</i>	2-36
3.3.1. <i>Spécificité de substrat.....</i>	2-36
3.3.2. <i>Stéréosélectivité.....</i>	2-36
3.3.3. <i>Effet du pH et de la température sur l'activité de l'ALDC.....</i>	2-37
3.3.4. <i>Activateurs et inhibiteurs.....</i>	2-37
3.3.5. <i>Paramètres cinétiques.....</i>	2-37
3.4. <i>Séquence de l'enzyme et hypothèse de mécanisme réactionnel.....</i>	2-38
3.5. <i>Législation.....</i>	2-40
3.5.1. <i>Remarques générales sur la législation française.....</i>	2-40
3.5.2. <i>Définition de l'auxiliaire technologique.....</i>	2-41
3.5.3. <i>Dispositions d'étiquetage.....</i>	2-41

4. Cahier des charges pour l'immobilisation d'acétolactate décarboxylase	2-42
4.1. Positionnement du projet.....	2-42
4.2. Débouchés.....	2-42
4.3. Objectifs à atteindre.....	2-43
4.3.1. Les contraintes liées à une application industrielle.....	2-43
4.3.2. Les contraintes imposées par l'échelle industrielle.....	2-43
4.3.3. Les contraintes liées à l'efficacité.....	2-44



Synthèses bibliographiques & cahier des charges

1. Le diacétyle dans la bière

1.1. La maturation de la bière

1.1.1. Rôle de la maturation

Un procédé traditionnel de fermentation se décompose en une fermentation principale du moût (ou fermentation primaire), suivie d'une fermentation secondaire, encore appelée garde ou maturation.

La première fermentation est une fermentation alcoolique : les glucides sont transformés en éthanol et en dioxyde de carbone et de nombreux précurseurs d'arômes sont formés. Cette fermentation peut être :

- une fermentation "haute", elle se déroulera alors à 15-25°C et durera 3 jours ;
- une fermentation "basse", elle se déroulera alors entre 7 et 12°C et durera 5 à 10 jours.

A la fin de cette fermentation principale, la majeure partie des levures est retirée et la bière subit la maturation.

La maturation a plusieurs objectifs :

- arrondir les saveurs afin de passer d'une "bière verte" à une bière équilibrée,
- consommer l'extrait résiduel (les sucres fermentescibles résiduels),
- faire précipiter les substances colloïdales (trouble au froid),
- laisser décanter les matières en suspension,
- saturer la bière en dioxyde de carbone.

Traditionnellement la maturation est menée à une température de 5 à 8°C avec un passage final à -1°C (précipitation du trouble au froid) [Brissart, R., 1994]. Elle dure de 2 à 12 semaines [Masschelein, C. A., 1986].

L'affinage de la saveur de la bière se traduit par des modifications biochimiques dont notamment :

- la réduction du taux de diméthylsulfure à 35-40 µg/l (responsable du faux-goût de légume cuit)
- la réduction du taux d'acétaldéhyde à 3-6 mg/l (responsable d'une saveur de pomme verte)
- la réduction du taux de diacétyl à 0,15 mg/l (responsable du faux-goût de beurre) [Moll, M., 1991].

1.1.2. Intérêt d'accélérer la maturation

La maturation est l'étape qui prend le plus de temps dans la fabrication de la bière ; nombreux sont les auteurs qui le mentionnent [Pajunen, E. *et al.*, 1987 ; Lommi, H. *et al.*, 1990 ; Yamauchi, Y. *et al.*, 1995a ; Borremans, E., 1997]. Toutefois peu d'auteurs donnent des chiffres concernant l'impact économique d'une réduction du temps de garde. Hough en 1985 estime le coût de la garde à 0,06 £/hl/jour [Hough, J. S., 1985] soit 0,84 F/hl/jour¹. A cela s'ajoute les coûts d'investissement. Lommi et ses collaborateurs font un bilan : en utilisant des réacteurs à levures immobilisées, ils peuvent réduire la garde à 2-3 heures. Pour une brasserie ayant une capacité de 1 000 000 hl/an, l'investissement pour les tanks de garde, l'espace et l'équipement lié passerait de 7,9 millions de dollars pour un système traditionnel à 1 million de dollars pour le système de garde accélérée [Lommi, H. *et al.*, 1990].

¹ Cours de la livre Sterling au 31/12/1985 : 10,65 F. Taux d'érosion 1,321.

Réduire la période de maturation de la bière est donc un enjeu économique important pour les brasseurs, ainsi qu'un gain en rapidité de réponse aux demandes du marché [Borremans, E., 1997 ; Mensour, N. *et al.*, 1995].

La maturation de la bière est longue car elle comporte une étape limitante : l'élimination du diacétyl.

1.2. L'apparition du diacétyl au cours de la fermentation

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

- être dirigé vers le cycle de Krebs,
- être dégradé en éthanol et en dioxyde de carbone
- être dégradé en α -acétohydroxyacides.

Les α -acétohydroxyacides (α -acétohydroxybutyrate et α -acétolactate) sont des intermédiaires de la biosynthèse intracellulaire des acides aminés isoleucine, leucine et valine (Figure 2.1). Ils sont aussi partiellement excrétés dans le milieu, où ils donnent naissance aux dicétones vicinales : la 2,3-pentanedione et le diacétyl, par transformation chimique [Moll, M., 1991 ; Hannemann, W., 1996]. Pendant la fermentation le diacétyl et la 2,3-pentanedione sont absorbés par la levure pour être convertis en acétoïne et en 2,3-pentanediol par les réductases levuriennes.

The diagram illustrates the leucine biosynthetic pathway in yeast (levure). The process begins with glucose entering the cell from the external environment (milieu extérieur). Glucose is converted to pyruvate via glycolyse. Pyruvate is then converted to α-acétolactate by the enzyme ILV2. α-acétolactate can be converted to α-acétohydroxybutyrate, which leads to 2,3-pentanedione and then 2,3-pentanediol. Alternatively, α-acétolactate is converted to α,β-dihydroxyisovalérate by the enzyme ILV5. α,β-dihydroxyisovalérate is then converted to valine and leucine by the enzymes ILV3 and ILV4, respectively. A branch from α-acétolactate leads to diacétyl, which is then converted to acétoïne by diacétyl réductase, and finally to 2,3-butanediol by acétoïne réductase. The diagram also shows the conversion of α-acétolactate to diacétyl via decarboxylation oxydative spontanée.

```

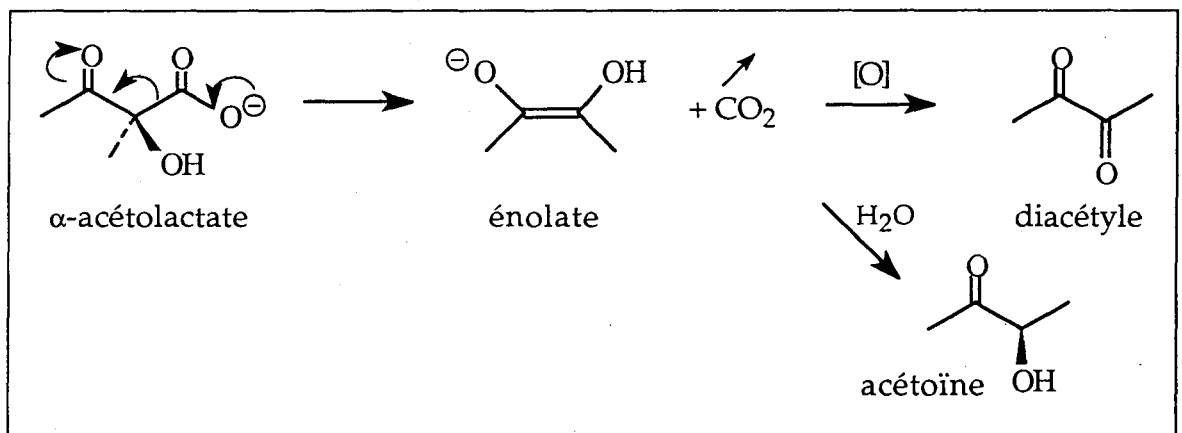
graph TD
    Glucose[glucose] -- glycolyse --> Pyruvate[pyruvate]
    Pyruvate -- ILV2 --> AAL[α-acétolactate]
    AAL --> AHB[α-acétohydroxybutyrate]
    AHB --> P23[2,3-pentanedione]
    P23 --> P23D[2,3-pentanediol]
    P23D --> Isoleucine[isoleucine]
    AAL -- ILV5 --> DIH[α,β-dihydroxyisovalérate]
    DIH -- ILV3 --> Valine[valine]
    DIH -- ILV4 --> Leucine[leucine]
    AAL -- "décarboxylation oxydative spontanée" --> Diacetyl[diacétyl]
    Diacetyl -- "diacétyl réductase" --> Acetoine[acétoïne]
    Acetoine -- "acétoïne réductase" --> B23[2,3-butanediol]
  
```

1.2.1. Décarboxylation spontanée de l' α -acétolactate

L' α -acétolactate possède un groupement carbonyle en position β (β -céto acide) ce qui le rend instable. L' α -acétolactate se décarboxyle spontanément pour donner du diacétyle et de l'acétoïne.

La structure des β -céto acides est telle que la fonction carboxylique agit comme attracteur d'électrons, conduisant à une énolisation de la molécule. Cet état d'énolisation est transitoire ; un état plus stable est obtenu par une cétonisation [Walsh, C., 1979]. Sayre et Jensen montrent que la formation du diacétyle peut provenir de l'oxydation de l'intermédiaire énolate (Figure 2.2) [Sayre, L. M. *et al.*, 1978].

Figure 2.2 Décarboxylation spontanée de l' α -acétolactate



L' α -acétolactate est particulièrement instable en milieu acide. D'autre part la valeur du potentiel rédox influence la nature des produits de dégradation :

- s'il est faible (-300 mV) il se forme de l'acétoïne et du diacétyle,
- s'il est important (50 mV) il ne se forme que de l'acétoïne [Monnet, C. *et al.*, 1994].

1.2.2. Inconvénients de la présence du diacétyle dans la bière

Pendant la fermentation de la bière, le diacétyle apparaît lentement. Or le diacétyle confère à la bière un défaut de goût : goût de beurre, de caramel au beurre ("butterscotch") ou encore arôme de miel ou de "toffee" [Russell *et al.*, 1995]. Son seuil de perception dépend du type de bière et du dégustateur, mais est généralement estimé à 0,15 ppm (mg/l). Le seuil de perception de l'acétoïne est par contre 300 fois plus élevé (50 ppm) [Meilgaard, M. C., 1975 ; Berry, D. R. *et al.*, 1987].

La concentration en diacétyle dans le moût est la résultante de trois facteurs :

- la synthèse et l'excrétion de l' α -acétolactate par la levure,
- la décarboxylation spontanée de l' α -acétolactate,
- la réduction du diacétyle en acétoïne par l'enzyme diacétyle réductase.

L'étape limitante dans l'apparition du diacétyle est la décarboxylation spontanée de l' α -acétolactate. En d'autres termes, tant que de l' α -acétolactate est présent dans le milieu, il y a risque de défaut de goût par apparition de diacétyle.

1.3. Les méthodes proposées actuellement pour éviter le diacétyle

L'étape limitante de la garde est la réduction de la teneur en diacétyle. Des solutions ont donc été cherchées par les brasseurs pour éviter ou minimiser la formation de diacétyle afin d'accélérer la garde.

Les facteurs qui influencent la formation de diacétyle sont :

- la composition du moût, en particulier la concentration en valine, isoleucine et leucine,
- la souche et la concentration de levure [Engan, S., 1981],
- les caractéristiques du moût : pH, rH (coefficient rédox), température [Moll, M., 1991 ; van Strien, J., 1987].

Les méthodes présentées dans cette partie ne concernent pas l'alternative des levures immobilisées, qui sont détaillées au point 1.4.

1.3.1. Contrôle du taux d'oxygène pendant la fermentation principale

Il semble qu'un contrôle du niveau d'oxygène pendant la fermentation principale puisse être un outil pour éviter l'apparition de diacétyle. Ceci est également mis en pratique dans le cas des levures immobilisées [Onaka, T. *et al.*, 1985].

1.3.2. Garde chaude

Une combinaison fermentation principale à froid/garde à chaud semble donner de bons résultats en termes de durée de production. La durée totale de fabrication dure 10 à 14 jours avec ce procédé, décomposé comme suit [Moll, M., 1991] :

• ensemencement	1 jour
• fermentation (7-12°C)	5 à 10 jours
• garde chaude (12-20°C)	3,5 jours
• refroidissement	2,5 jours
• garde froide (-1°C)	3 jours
• <i>Total :</i>	<i>15 à 20 jours</i>

La garde chaude permet une excrétion de “tout l’ α -acétolactate possible” avant qu’il ne soit converti par voie enzymatique (se reporter à la Figure 2.1) [Hough, J. S., 1985]. L’inconvénient de cette technique est que les levures ont tendance à se dégrader pendant la garde chaude, générant un “goût de levure” (excrétion d’acides caprique, caproïque et caprylique) [Devreux, A., 1997]. Pour pallier cet inconvénient, l’auteur conseille de maintenir le bas du tank cylindro-conique à 5°C en fin de fermentation et de purger la levure aussi souvent que possible pendant la garde.

1.3.3. Fermentation sous pression

Engan en 1981 mentionne qu’une fermentation sous pression permettrait de réduire la formation d’acétolactate et aboutirait à une réduction plus rapide du diacétyle (10 jours).

1.3.4. Levures modifiées génétiquement

De nombreuses études sont menées depuis une dizaine d’années sur la modification génétique de la levure. Plusieurs approches ont été envisagées et testées.

1.3.4.1. Les stratégies d’amplification de gènes

Des essais enzymatiques ont montré que l’étape limitante de la voie ILV est l’étape catalysée par l’enzyme réducto-isomérase codée par le gène ILV5 (se reporter à la Figure 2.1, page 2-2 de ce chapitre). Cette limitation entraîne une accumulation des α -acétohydroxy-acides, c’est-à-dire des précurseurs du diacétyle. Des chercheurs ont donc pensé au moyen de sur-exprimer l’activité de ce gène par amplification, dans le but d’éviter l’accumulation. Les résultats de cette étude montrent une réduction du taux des dicétones vicinales (dont le diacétyle) jusqu’à 80% [Dillemans, M. et al., 1987 ; Villanueva, K. D. et al., 1990].

Le gène ILV3 a aussi été amplifié. En effet, l'enzyme codée par ce gène est placée juste en aval de la réducto-isomérase dans la voie métabolique. En stimulant son activité, le flux métabolique doit être "tiré" et éviter l'accumulation des acétohydroxy-acides. La réduction du taux des dicétones vicinales obtenue alors est de 10% [Goosens, E. et al., 1987].

Dans les deux cas, le taux de diacétyl reste supérieur au seuil de perception. De plus les souches contenant le ou les plasmides sont instables. Le résultat n'est donc pas satisfaisant.

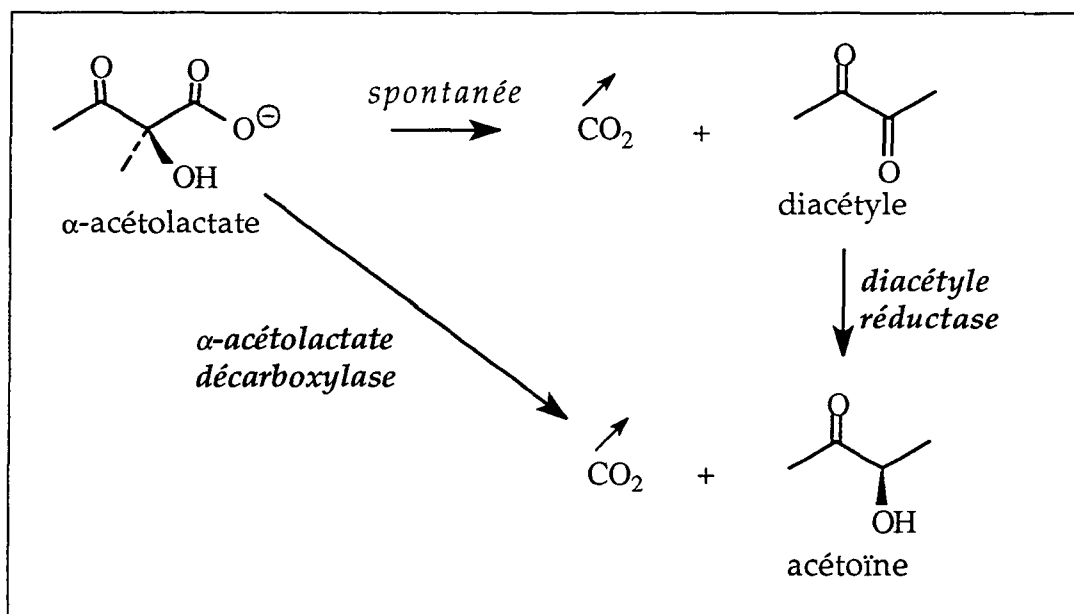
Les mêmes auteurs ont intégré le gène ILV5 dans le chromosome XIII de la levure [Goosens, E. *et al.*, 1991] ce qui évite le problème d'instabilité plasmidiale, puis l'ont placé sous le contrôle d'un promoteur fort [Goosens, E. *et al.*, 1993]. Les levures ainsi modifiées présentent une réduction du taux de diacétyl de plus de 70 %. Cependant ici encore le taux demeure supérieur au seuil de perception et la méthode n'est pas satisfaisante. Les travaux actuels semblent maintenant se diriger vers l'intégration de plusieurs copies du gène ILV5 dans le chromosome XIII, en supposant que la diminution de formation du diacétyl sera accentuée [Goosens, E. *et al.*, 1993].

1.3.4.2. Inhibition du gène ILV2

En inhibant le gène ILV2, la production d'acétolactate synthétase serait diminuée et peu d' α -acétolactate serait formé. Des chercheurs ont exploré cette voie, mais sans succès. En effet, la réduction de 90 % d'activité de l'enzyme acétolactate synthétase conduit certes à une baisse de synthèse de valine et d'isoleucine, mais aussi à une surproduction de dicétones vicinales [Debourg, A. *et al.*, 1990].

1.3.4.3. Intégration du gène codant pour l' α -acétolactate décarboxylase

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

Figure 2.3 Réaction catalysée par l' α -acétolactate décarboxylase

Plusieurs études ont montré que l'ajout d' α -acétolactate décarboxylase dans le moût en début de fermentation permettait d'éviter la formation de diacétyle [Jepsen, S., 1993 ; Kabaktschieva, G. *et al.*, 1994 ; Aschengreen, N. H. *et al.*, 1992]. Cependant, cette méthode reste coûteuse, elle est donc peu utilisée en brasserie. C'est ainsi que des chercheurs ont eu l'idée d'intégrer le gène de l' α -acétolactate décarboxylase dans la levure [Dellweg, H., 1985].

Cette manipulation génétique a été réalisée par les équipes du VTT (Finlande) et de Kirin (Japon). Les gènes codant pour l' α -acétolactate décarboxylase ont été clonés à partir d'espèces bactériennes telles que *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella terrigena* ou *Acetobacter aceti*. On peut noter que c'est une équipe de la brasserie Carlsberg qui a réalisé l'important travail de criblage de l'activité α -acétolactate décarboxylasique parmi diverses espèces bactériennes [Godtfredsen, S. E. *et al.*, 1983b et 1984]. Les gènes sont introduits par transformation dans la souche de levure. On observe alors une réduction de la formation de diacétyle pendant la fermentation. Ce résultat est observé jusqu'à l'échelle pilote [Suihko, M. L. *et al.*, 1989]. Aucune différence dans les propriétés brassicoles n'a été relevée entre les transformants et la souche mère (degré d'atténuation, floculation, composition en acides aminés et en composés volatiles) [Tada, S. *et al.*, 1995 ; Yamano, S. *et al.*, 1995]. La non-production de diacétyle est un caractère stable chez cette souche.

Parmi les espèces bactériennes dont est issu le gène de l' α -acétolactate décarboxylase, seule *Acetobacter aceti* (subsp. *xylinum*) est utilisée en industries alimentaires. Yamano et ses collaborateurs ont intégré ce gène de façon stable au chromosome XIII de la levure [Yamano, S. *et al.*, 1994].

La fermentation primaire avec levure transformée génétiquement dure 6 à 8 jours. La bière fabriquée n'a, en théorie, pas besoin de subir une maturation [Linko, M. *et al.*, 1991]. Toutefois les auteurs ne sont pas clairs dans la rédaction de leurs résultats à ce sujet [Tada, S. *et al.*, 1995 ; Yamano, S. *et al.*, 1995].

1.3.5. Conversion de l' α -acétolactate par des catalyseurs inorganiques : les zéolites

Pour accélérer la maturation de la bière, des catalyseurs de la conversion de l' α -acétolactate ont été proposés récemment : les zéolites [Andries, M. *et al.*, 1997b]. En effet, certains matériaux inorganiques très poreux peuvent catalyser la décarboxylation de l' α -acétolactate directement en acétoïne à température modérée. Les zéolites sont des aluminosilicates, qui possèdent la caractéristique d'une base selon la théorie de Brønsted (une base est capable de capter un proton). Une des qualités de zéolite sélectionnée par les auteurs permet d'obtenir 90 % de conversion de l' α -acétolactate à 20°C dans de la bière par passage à travers une colonne à garnissage. Peu d'informations sont publiées à l'heure actuelle.

1.4. Levures immobilisées en brasserie

Nous nous proposons d'étudier l'encapsulation de l'acétolactate décarboxylase pour accélérer la maturation de la bière. L'utilisation de levures immobilisées est un moyen qui a été étudié pour atteindre ce but. Nous allons maintenant décrire l'avancée des travaux dans ce domaine.

La technologie des levures immobilisées permet de réduire les coûts d'exploitation pour la production de bière et autres boissons issues du malt, entre autres parce que le procédé s'approche de la production en continu. Cette technologie peut être employée pour la fermentation principale et/ou pour la maturation. Par ailleurs, on peut considérer que la fabrication en continu favorise la protection de l'environnement, car le volume d'eaux usées est inférieur à un procédé traditionnel [Aivasidis, A., 1996]. Pour ces raisons, elle a fait l'objet de nombreuses études cette dernière décennie [Moll, M. et Duteurtre, B., 1996].

Les recherches menées jusqu'à présent montrent que l'adsorption ou la fixation des levures sur des supports pré-formés et recyclables sont les meilleures solutions pour l'utilisation à grande échelle de levures immobilisées [Ruhaut, L. *et al.*, 1993 ; Masschelein, C. A. *et al.*, 1995 ; Aivasidis, A., 1996]. Une meilleure connaissance de la physiologie levurienne est cependant nécessaire pour mieux contrôler les procédés. Le modèle de réacteur est déterminé par le type d'application, le support d'immobilisation et les paramètres de transfert de masse choisis.

On distingue les systèmes à levures immobilisées assurant la fermentation principale de ceux permettant de mener la maturation de la bière (garde). Quelques systèmes sont présentés ici, mais la liste n'est pas exhaustive.

1.4.1. Fermentation principale sur levures immobilisées

Par rapport au procédé traditionnel discontinu, la fermentation en continu permet une meilleure productivité volumique et une durée de fabrication diminuée. De nombreuses études ont été menées dans le but de réaliser la fermentation principale de la bière en continu sur levures immobilisées. Les premières d'entre elles montrent que l'inconvénient majeur de la technique est une surproduction d' α -acétolactate pendant la fermentation, conduisant à des niveaux de diacétyl supérieurs au seuil de perception [Engan, S., 1981 ; Ryder, D. *et al.*, 1985 ; Kronlöf, J. *et al.*, 1989 ; Nakanishi, K., 1990].

1.4.1.1. Levures incluses dans des billes de gel

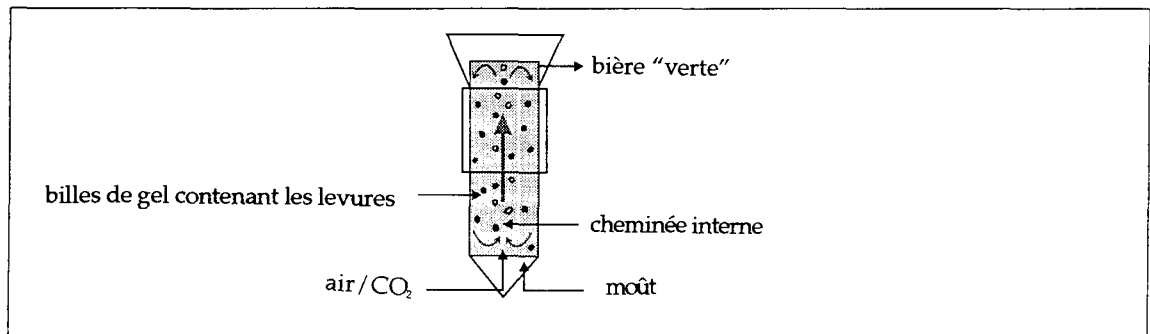
Alginate

La première proposition pour immobiliser des levures a été l'inclusion en billes d'alginate de calcium [White, F. H. *et al.*, 1978]. Plusieurs études concernant cette technique ont suivi au Japon [Nakanishi, K. *et al.*, 1985 ; Onaka, T. *et al.*, 1985 ; Nakanishi, K. *et al.*, 1986], en Tchécoslovaquie [Pardonova, B. *et al.*, 1982 ; Curin, J. *et al.*, 1987] et en Belgique [Cop, J. *et al.*, 1989].

Plus récemment, une équipe yougoslave (Institute of Food Technology, Belgrade) a mis au point un système de fermentation avec levures incluses en billes d'alginate [Nedovic, V. *et al.*, 1997]. Le système utilisé est un réacteur à lit fluidisé par bullage, avec une cheminée interne (gas lift draft tube bioreactor). Les billes de gel sont soulevées par bullage au centre du réacteur et redescendent à la périphérie.

La vitesse de fermentation est importante grâce à une bonne agitation dans le système : 16 heures pour une fermentation principale, au lieu de 6 à 7 jours avec un procédé traditionnel.

Figure 2.4 Réacteur à lit fluidisé par bullage avec cheminée interne



Alginate avec recouvrement

Une équipe japonaise de la brasserie Sapporo s'est intéressée à l'inclusion de levures dans des billes d'alginate, recouvertes d'une couche d'alginate ne contenant pas de levure. Le but de cette étude était de contrôler la formation d' α -acétolactate pendant la fermentation alcoolique. Les résultats sont satisfaisants puisqu'en fin de fermentation le taux d' α -acétolactate est de 0,16 mg/l. Ce phénomène serait dû aux conditions "plus anaérobiques" dans les billes d'alginate recouvertes comparées aux billes d'alginate classiques [Shindo, S. *et al.*, 1993]. Toutefois, leur étude est restée à l'échelle laboratoire (réacteur à lit fluidisé de 300 ml).

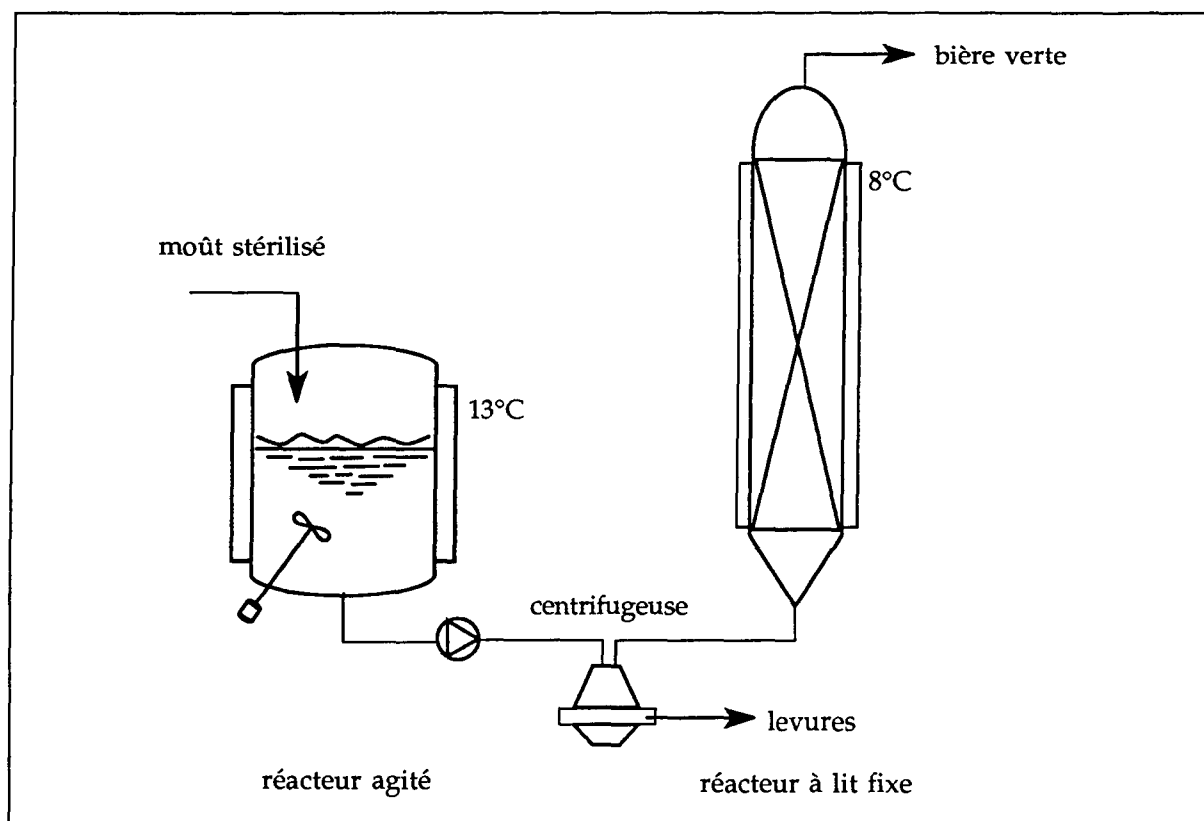
Carraghénane

La brasserie Labatt (Canada) a mis au point un procédé semi-industriel de fermentation en continu sur levures incluses en billes de κ -carraghénane. Les billes sont produites en continu grâce à des mélangeurs statiques et le type de réacteur choisi est le lit fluidisé par bullage avec cheminée interne (Figure 2.4) [Mensour, N. *et al.*, 1995 et 1996]. Le système Labatt permet de mener une fermentation principale en 20 heures. Associée avec une maturation accélérée, cette technique pourrait permettre de brasser une bière en 2 jours.

1.4.1.2. Levures fixées sur billes de verre poreux (système Kirin)

La brasserie japonaise Kirin a mis au point un système multi-étagé de fermentation en continu. Il est constitué d'un réacteur agité et d'un réacteur à lit fixe (levures immobilisées). Les levures sont immobilisées sur des billes de verre poreux de 3 mm de diamètre. Ce support, appelé Bioceramics®, est fabriqué par Kirin.

Figure 2.5 Système multi-étagé Kirin pour la fermentation principale de la bière, d'après [Yamauchi, Y. *et al.*, 1995d]



Dans le premier réacteur les levures sont en phase de croissance, ce qui stimule leur consommation en acides aminés. Les levures immobilisées du second réacteur sont placées en conditions défavorables à la croissance. Ceci stimule la formation d'alcools supérieurs et d'esters, ce qui équilibre les arômes de la bière. La mise au point du procédé a été minutieuse. Pour éviter une forte production d' α -acétolactate, un contrôle de la composition en acides aminés du moût entrant est nécessaire [Yamauchi, Y. *et al.*, 1995b]. La surproduction occasionnelle de sulfites par les levures immobilisées du deuxième réacteur nécessite de régénérer la

colonne tous les 6 à 7 mois environ (nettoyage du support et ré-ensemencement) [Yamauchi, Y. *et al.*, 1995c].

Grâce à ce système le moût peut être fermenté en 25 heures [Inoue, T., 1988]. Les auteurs suggèrent que la bière verte soit traitée par la chaleur (conversion de l' α -acétolactate) puis maturée sur colonne de levures immobilisées (se reporter au point 1.4.2) [Yamauchi, Y. *et al.*, 1995a]. L'installation a été mise au point pour des capacités de 2 à 10 000 l [Inoue, T., 1995]. L'auteur précise toutefois que la régénération des levures immobilisées tous les 6 à 7 mois constitue une limite au développement commercial de ce procédé.

1.4.1.3. Levures immobilisées sur DEAE-cellulose

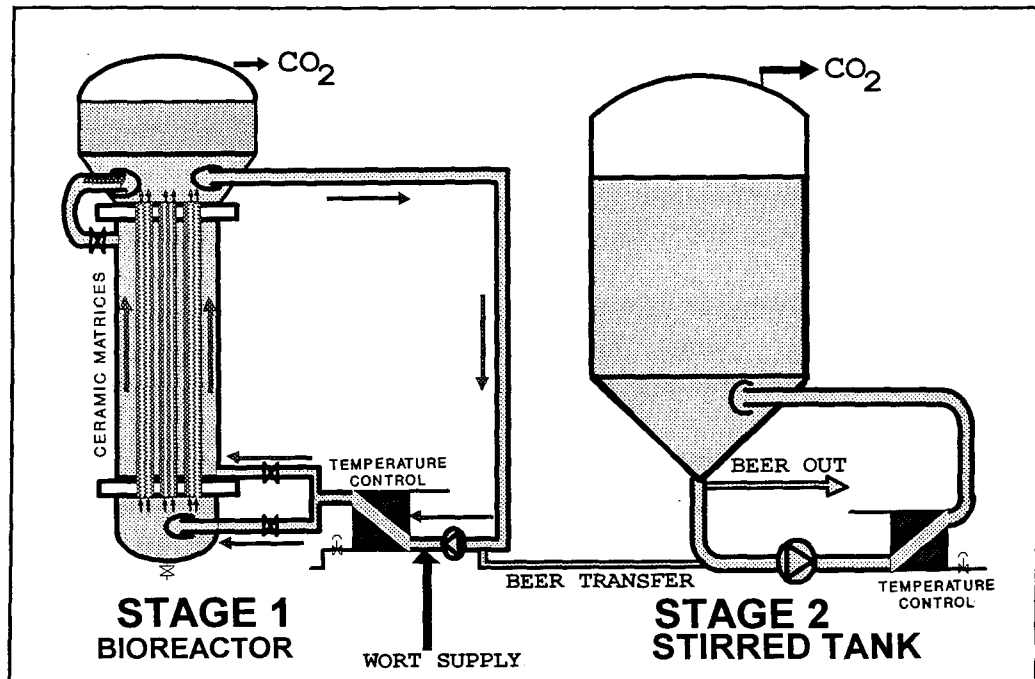
L'équipe Finlandaise du VTT (Centre de Recherche Technologique de Finlande) publie dès 1989 une étude portant sur la fermentation principale en continu grâce à des levures adsorbées sur DEAE-cellulose (diéthyl-diaminoéthyl-cellulose) [Kronlöf, J. *et al.*, 1989]. Un système bi-étagé est en place à l'échelle pilote (capacité de 165 L de moût). La fermentation dure 2 jours [Kronlöf, J. *et al.*, 1995].

La même équipe a combiné l'immobilisation de levures avec le génie génétique. Elle publie une étude en 1991, concernant des levures transformées produisant l'acétolactate décarboxylase et immobilisées sur DEAE-cellulose [Linko, M. *et al.*, 1991]. L'existence de cette étude nous montre que la production d'acétolactate est bien un inconvénient de la technique des levures immobilisées. Les résultats de cette étude montrent que la production de bière pourrait être achevée en 30 heures (fermentation principale et garde), sous réserve de contrôler l'apport d'oxygène et d'allonger la viabilité de la levure.

1.4.1.4. Immobilisation sur carbure de silicium (système Meura-Delta)

Meura-Delta est une société belge qui commercialise des systèmes de bioréacteurs à cellules immobilisées. Parmi eux un système permet de réaliser la fermentation principale de la bière en continu. Il s'agit d'un système bi-étagé comprenant un réacteur à levures immobilisées suivi d'un réacteur agité à cellules libres (Figure 2.6).

Figure 2.6 Le système Meura-Delta pour la fermentation principale de la bière



La matrice d'immobilisation est constituée de carbure de silicium poreux. Elle est cylindrique et perforée de canaux longitudinaux. Ce support offre plusieurs avantages : permettre de bons transferts de masse grâce à sa forme et une haute densité cellulaire grâce à sa porosité ; il est résistant, peut être nettoyé en place et être réutilisé.

Dans le système de fermentation en continu Meura-Delta, le deuxième réacteur est continuellementensemencé en levures issues du premier réacteur. Le temps de séjour est de deux à trois jours [Andries, M. *et al.*, 1995b ; Masschelein, C. *et al.*, 1996]. Deux brasseries belges utilisent les systèmes Meura-Delta : Martens et Aubel.

1.4.1.5. Autres matériaux d'immobilisation

D'autres matériaux ont été envisagés pour immobiliser des levures à des fins de fermentation brassicole ; ils sont listés dans le Tableau 2.1. Leur utilisation n'a pas dépassé le stade laboratoire.

Tableau 2.1 Autres matériaux d'immobilisation de levures

Matériaux d'immobilisation	Référence bibliographique
poly-galacturonate	[Centenera, J. I. et al., 1989]
alcool poly-vinyle et alginate	[Shindo, S. et al., 1990]
éponge	[Scott, J. A. et al., 1995]
cellulose délignifiée (issue de sciure de bois)	[Bardi, E. P. et al., 1996]
disques de silicone poreux	[Edwards, P. et al., 1996]

1.4.1.6. Conclusion sur les procédés de fermentation principale sur levures immobilisées

L'utilisation de levures immobilisées pour mener la fermentation principale a demandé plusieurs années de recherche avant la première application. La productivité de ces nouveaux procédés est améliorée ; par contre ils sont aussi beaucoup plus complexes. Le risque de contamination bactérienne est élevé et la physiologie levurienne étant modifiée de nouveaux "outils" ont dû être trouvés pour contrôler la fermentation (contrôle de l'azote aminé libre et de l'oxygène). De plus les bioréacteurs à levures immobilisées à un seul étage se heurtent à une forte production d' α -acétolactate, qui oblige à pratiquer trois opérations avant la garde :

- retrait des levures,
- traitement thermique à 90°C,
- refroidissement,

Une équipe a même imaginé d'immobiliser des levures transformées ayant le gène codant pour l' α -acétolactate décarboxylase, afin d'éviter de produire de l' α -acétolactate [Linko, M. *et al.*, 1991].

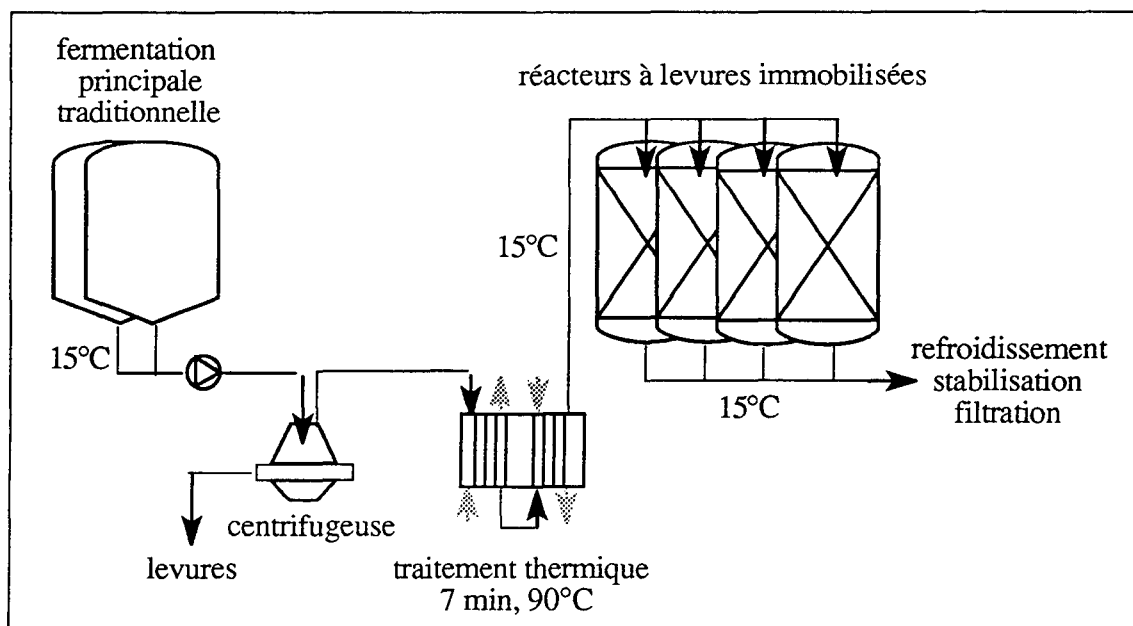
1.4.2. Garde sur levures immobilisées

L'encapsulation d' α -acétolactate décarboxylase a pour objectif d'accélérer la maturation de la bière. Parmi les procédés existant déjà on trouve l'utilisation des levures immobilisées.

1.4.2.1. Levures adsorbées sur DEAE-cellulose

Pajunen et ses collaborateurs du VTT (Centre de Recherche Technologique de Finlande) décrivent dès 1987 un système de maturation impliquant des levures immobilisées [Pajunen, E. *et al.*, 1987].

Figure 2.7 Système de maturation en continu de la bière [Pajunen, E., 1995]



Dans ce système, la bière verte est débarrassée de ses levures par centrifugation, puis chauffée et refroidie, avant de circuler à travers une colonne de levures immobilisées qui assurent la maturation. La bière subit ensuite les traitements classiques : stabilisation par refroidissement et filtration.

La durée de maturation est réduite à 2-3 heures sur levures immobilisées, au lieu de 10-14 jours pour un procédé traditionnel (comportant une garde chaude). Le taux de diacétyl en sortie de colonne est réduit à 0,05 mg/l.

Le chauffage du moût a pour buts :

- de décarboxyler l' α -acétolactate,
- de pasteuriser la bière verte avant le passage sur colonne de levures [Lommi, H. *et al.*, 1990],
- d'inactiver les enzymes protéolytiques libérées pendant la fermentation primaire [Pajunen, E., 1995].

Il dure 7 minutes à 90°C et doit être réalisé en conditions strictes d'anaérobiose. En effet en milieu bière et en anaérobiose la décarboxylation de l' α -acétolactate par chauffage conduit directement à de l'acétoïne, sans former de diacétyl [Inoue, T. *et al.*, 1991]. Si cette durée de chauffage est de 20 minutes, la flaveur

d'hydroxyméthylfurfural est augmentée [Pajunen, E. *et al.*, 1993]. De plus, la bière verte doit être chauffée en quasi-absence de levures, car sinon une "flaveur de levures" apparaît.

Les levures immobilisées sont retenues sur des granules de DEAE-cellulose (nom commercial Spezyme® GDC) par interaction ionique. Ce support d'immobilisation a été mis au point par la société finlandaise Cultor Finnsugar Bioproducts ; il est fabriqué par Genencor International (Finlande).

Une version industrielle de ce système est utilisée à la brasserie finlandaise Sinebrychoff Kerava (1 million hl/an) depuis 1990 [Pajunen, E. *et al.*, 1993]. Les levures sont immobilisées par ensemencement du support dans le réacteur [Pajunen, E., 1995]. Le support en place peut être nettoyé et ré-ensemencé [Lommi, H. *et al.*, 1990].

1.4.2.2. Levures adsorbées sur billes de verre poreux

Une autre équipe du VTT travaille sur un système de maturation accélérée ayant recours à des levures adsorbées sur des billes de verre poreux (nom commercial Siran®) [Hyttinen, I. *et al.*, 1995]. Ce système a été mis au point en partenariat avec Schott Engineering (producteur du support) et Alfa Laval (fournisseur des pompes et des échangeurs de chaleur). La mise en application du système sur différents sites industriels est déjà réalisée en Finlande, en Belgique et en Allemagne.

- Le principe de fonctionnement du système est identique à celui utilisant les levures adsorbées sur DEAE-cellulose, excepté que le traitement thermique est mené à 80°C pendant 10 minutes à 3 bars et que le passage sur colonnes de levures est fait du bas vers le haut. Les billes de verre font 2 à 3 mm de diamètre et la durée de maturation est de 2 heures [Dillenhöfer, W. *et al.*, 1996 ; Aivasidis, A., 1996].
- Comme précédemment, les tests organoleptiques montrent qu'il n'y a pas de différence entre la bière maturée sur levures immobilisées et la bière issue du procédé traditionnel [Hyttinen, I. *et al.*, 1995 ; Groneick, E. *et al.*, 1997].

1.4.2.3. Levures fixées sur carbure de silicium (Système Meura-Delta)

Les bioréacteurs à cellules immobilisées Meura-Delta ont plusieurs applications possibles, dont la maturation de la bière. Afin de montrer la faisabilité du procédé, l'équipe de M. Andries a fait circuler de la bière supplémentée en diacétyl dans le bioréacteur [Andries, M. *et al.*, 1995a]. Avec une certaine vitesse de recirculation, le taux de diacétyl en sortie de colonne est bien inférieur au seuil de perception. L'originalité de ce procédé est qu'il est exempt de traitement thermique. Toutefois, on peut s'interroger sur la méthode de démonstration de faisabilité. En effet, les auteurs s'attachent à faire disparaître le diacétyl déjà présent dans la bière. Or l'étape limitante de la maturation se situe en amont : c'est la décarboxylation de l' α -acétolactate.

1.4.2.4. Conclusion sur les procédés de garde sur levures immobilisées

Le point critique des procédés de maturation sur levures immobilisées est le traitement thermique de la bière verte. Certes, ce chauffage a plusieurs avantages comme celui de pasteuriser la bière ou d'inactiver des enzymes protéolytiques. Toutefois, le procédé est plus complexe car il nécessite de retirer les levures en conditions d'anaérobiose. De plus, une pasteurisation ultérieure est toujours nécessaire, puisque la bière est mélangée au reste de la production. Certains auteurs sous-entendent également que le chauffage altère certains composés présents dans la bière [Devreux, A., 1997] mais le sujet reste controversé. Ces inconvénients nous amènent à penser qu'un procédé de maturation accélérée de la bière ne nécessitant pas de chauffage de la bière verte serait plus adéquat.

2. L'immobilisation d'enzymes

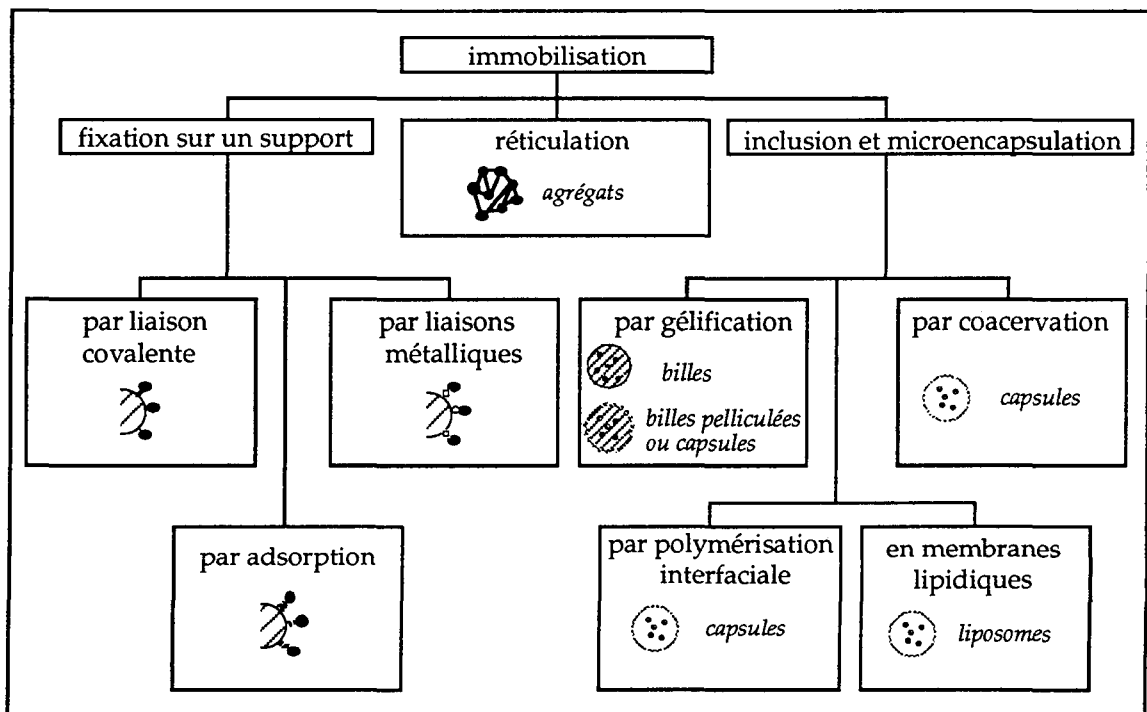
2.1. Introduction

Jusqu'aux années 1970, les enzymes étaient utilisées sous forme "libres", c'est-à-dire solubles. On cherche de plus en plus à utiliser les catalyseurs en continu, ou de façon répétée, c'est pourquoi de nombreuses études ont été faites sur l'immobilisation des enzymes.

Cette partie a pour but de faire un tour d'horizon, non exhaustif, des méthodes qui existent pour immobiliser des enzymes. Nous insisterons particulièrement sur l'inclusion en billes de gel et la microencapsulation par les complexes polyélectrolytes.

La Figure 2.8 donne un aperçu des techniques d'immobilisation d'enzymes.

Figure 2.8 Les méthodes d'immobilisation d'enzymes



2.2. Les méthodes de fixation d'enzymes sur un support

Les enzymes peuvent être fixées à la surface d'un support solide grâce à des liaisons chimiques.

Il peut s'agir de supports minéraux, comme la silice ou le verre poreux, mais nombre d'entre eux sont organiques, comme :

- les polymères naturels : l'agarose, la cellulose, l'alginate, le chitosane,
- les polymères synthétiques : les polyacrylates, polyamides, polystyrènes,
- les protéines comme le collagène.

La fixation est réalisée grâce à différents types de liaisons.

2.2.1. Fixation par liaison covalente à un support

Le support doit posséder des groupements réactifs capables de former une liaison covalente avec l'enzyme à immobiliser. Kennedy et Cabral en 1987 énumèrent 25 groupements réactifs. Le groupement impliqué sur l'enzyme est dans la plupart des cas une fonction amine primaire [Kennedy, J. F. and Cabral, J., 1987].

Les groupements de l'enzyme importants pour l'activité catalytique ne doivent pas être engagés dans les liaisons covalentes sans quoi on a une perte d'activité. Pour éviter ce phénomène, on peut réaliser la fixation de l'enzyme en présence de son substrat. Malgré tout, les enzymes perdent une partie de leur activité pendant la procédure d'immobilisation par liaison covalente.

2.2.2. Adsorption à un support

L'immobilisation par adsorption consiste à assurer la rétention d'une molécule d'enzyme à la surface d'un support solide, par l'établissement de liaisons faibles entre les groupes fonctionnels de l'enzyme et du support. Les forces intervenant dans le phénomène d'adsorption sont de type van der Waals, hydrophobe, hydrogène ou ionique. Avec ce type d'immobilisation, l'enzyme ne subit pas de modification de structure, ce qui assure un bon maintien de l'activité.

Différents types de supports peuvent être utilisés pour adsorber des enzymes. Les résines échangeuses d'ions utilisées en chromatographie sont souvent employées, comme l'amberlite ou le DEAE-cellulose (diéthyl-diaminoéthyl-cellulose), mais

aussi : les minéraux argileux, les alumino-silicates comme la bentonite, et les supports en verre ou en silice.

L'inconvénient majeur de la technique est que les enzymes se désorbent facilement.

2.2.3. Fixation par liaisons métalliques

Cette méthode est basée sur les propriétés chélatrices des ions métalliques transitoires qui peuvent être employées pour coupler des enzymes à un support comme de la cellulose ou de la silice. Grâce à cette méthode 30 à 80 % d'activité spécifique peut être retenue. Certains auteurs soupçonnent une inhibition des enzymes par le métal utilisé (titanium) [Kennedy, J. F. et Cabral, J., 1987]].

2.3. Agrégation par réticulation

Il est possible d'immobiliser des enzymes sans utiliser de support, par pontage covalent, au moyen de réactifs bifonctionnels. On obtient ainsi des agrégats insolubles d'enzyme réticulée. Les liaisons formées sont irréversibles.

Le glutaraldéhyde est le plus souvent utilisé pour réaliser ces pontages, mais de nombreux autres réactifs peuvent aussi être employés. Tout comme pour les liaisons covalentes à un support, cette technique présente un risque d'inactivation de l'enzyme.

L'inconvénient de la réticulation ou de la fixation à un support est que lors de l'application, les enzymes sont soumises :

- au cisaillement,
- à l'action des protéases.

Dans le cadre d'une fermentation de moût de bière, ces deux facteurs sont particulièrement présents :

- le dégagement de bulles de gaz comme le dioxyde de carbone est une source de cisaillement important,
- des protéases sont présentes dans le moût en fermentation, et peuvent dénaturer l'enzyme si celle-ci leur est accessible.

Par ailleurs, ces techniques sont connues pour provoquer une perte d'activité enzymatique inhérente à l'immobilisation. Pour ces raisons il nous est apparu essentiel de protéger l'enzyme en l'emprisonnant dans des sphères, c'est-à-dire de faire appel aux techniques d'inclusion et de microencapsulation.

2.4. Les méthodes d'inclusion et de microencapsulation

La microencapsulation consiste à emprisonner des composés dans des microsphères. Les avantages sont nombreux : protéger une molécule du milieu extérieur, contrôler la libération d'un principe actif, masquer un goût, une odeur désagréable ou rendre un catalyseur insoluble.

Les applications de la microencapsulation couvrent de nombreux domaines. Chaque domaine ayant son vocabulaire propre, nous allons définir certains termes comme ils seront employés dans la suite du document.

- Une **bille** est une sphère pleine constituée d'un matériau "homogène" comme un hydrogel. Elle peut contenir un principe actif.
- Une **capsule** est constituée d'un coeur liquide ou solide, limité par une membrane.
- Une **sphère** peut désigner une bille ou une microcapsule, sans distinction.
- Les **microsphères, microcapsules, microbilles** sont des sphères, capsules, billes dont la taille est comprise entre 2 et 500 micromètres.
- Les **sphères, capsules ou billes** ont une taille supérieure à 500 micromètres.
- L'**encapsulation** ou l'**inclusion** d'un composé se réfère à son immobilisation au sein d'une sphère, sans distinction concernant le type de sphère.

En ce qui concerne l'encapsulation d'enzymes, on peut rappeler qu'il s'agit d'isoler le catalyseur au sein de sphères, de sorte qu'il y soit toujours actif. Ceci implique que le ou les substrat(s) de la réaction soient capables de pénétrer dans la sphère pour y être transformés, et que le ou les produit(s) puissent en sortir.

2.4.1. Inclusion dans un gel

Les enzymes peuvent être immobilisées dans des billes de gel. La gélification de polymères est induite par un abaissement de la température (gélatine, κ -carraghénane) ou par chauffage (glucomannanes désacétylés de farine de konjac, poly(vinyle caprolactame)) [Nishinari, K. *et al.*, 1992 ; Markvicheva, E. A. *et al.*, 1991]. Une autre possibilité est la gélification ionotrope d'un polymère. Dans ce cas, un polyélectrolyte soluble est mis en présence d'un contre-ion, et la gélification se produit par formation d'un polysel. L'hydrogel le plus couramment utilisé pour l'encapsulation de composés fragile est l'alginate, qui gélifie en présence de cations divalent, comme les ions calcium.

La formation de billes est obtenue par gélification de gouttelettes. Les techniques de formation de gouttelettes sont détaillées au point 3.5 de ce chapitre.

2.4.2. Microencapsulation par coacervation

2.4.2.1. Phénomène de coacervation

La plupart des substances macromoléculaires donnent, en présence de solvant, des solutions colloïdales. Lorsque celles-ci sont soumises à des changements de composition, de pH ou de température, les forces d'attraction entre les molécules du colloïde deviennent plus fortes que celles qui les lient au solvant : il y a "désolvatation". Une nouvelle phase apparaît, constituée par des gouttelettes riches en substance macromoléculaire. Cette phase a les propriétés d'un liquide, elle est appelée coacervat [Michaels, A. S., 1965]. Ce principe peut être utilisé en chimie pour le fractionnement des substances macromoléculaires.

2.4.2.2. Coacervation simple

Si un seul colloïde est amené à se désolvater, on parle de coacervation simple. Elle est obtenue par exemple en traitant une solution de polymère hydrophile par des alcools ou des sels.

2.4.2.3. Coacervation complexe

Si deux colloïdes sont amenés à se désolvater, il s'agit alors de coacervation complexe. Le coacervat contient alors les deux polymères.

C'est Bungenberg de Jong, dans les années 1950, qui le premier s'est intéressé aux polymères hydrosolubles capables de former des coacervats complexes [Bungenberg

de Jong, H. G., 1949]. La coacervation complexe peut être appliquée à des polymères naturels :

- couple gélatine et gomme d'acacia,
- couple gélatine et alginate,

ou à des polymères synthétiques :

- couple acide poly(acrylique)/poly(éthylène imine).

Certains polymères contenant des groupements chargés (alors appelés "polyélectrolytes") sont capables d'interagir entre eux pour former des "complexes polyélectrolytes" par neutralisation des charges opposées [Michaels, A. S., 1965]. Dans certains cas, chacune des phases a les propriétés d'un liquide, et on parle de coacervation complexe.

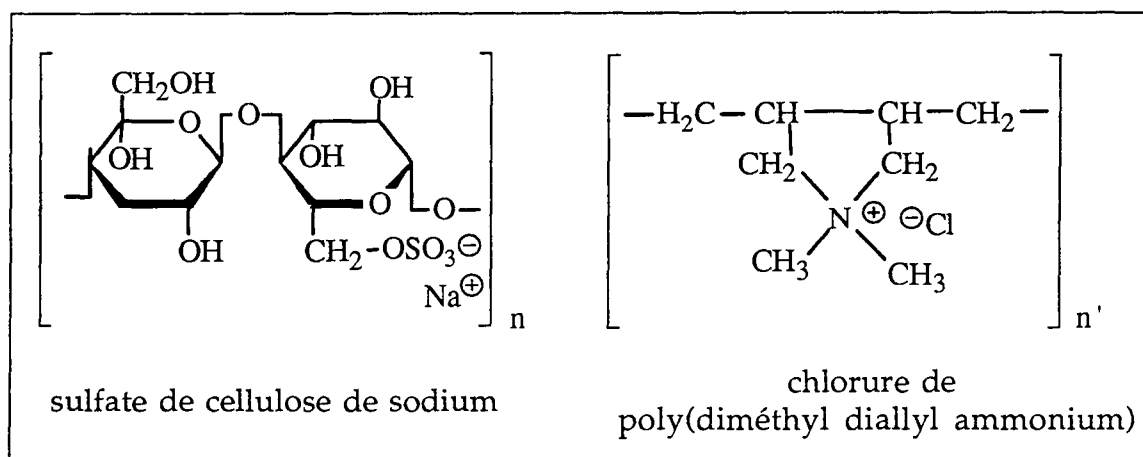
Considérons le couple sulfate de cellulose/poly(diallyl diméthyl ammonium). Ce couple de polymères est particulièrement intéressant pour l'encapsulation de composés biologiques. Il a été étudié et développé pour la microencapsulation par l'équipe du Professeur Dautzenberg (Université de Potsdam, Allemagne).

Lorsque le sulfate de cellulose est mis en contact avec le poly(diallyl diméthyl ammonium), un complexe polyélectrolyte insoluble se forme instantanément à l'interface. Par extrusion du sulfate de cellulose dans un bain de poly(diallyl diméthyl ammonium), on forme des capsules. Ces capsules sont constituées d'un coeur de solution de sulfate de cellulose, entouré d'une membrane de complexe sulfate de cellulose/poly(diallyl diméthyl ammonium).

Les avis sont partagés quant à savoir si la formation de ces capsules est une coacervation complexe. En effet, par certains aspects la membrane de complexe polyélectrolytes peut répondre à la définition du "coacervat complexe" : phase séparée riche en polymères, obtenue par désolvatation. Toutefois, son étude n'est pas assez approfondie pour déterminer si elle a les propriétés d'un liquide. De plus sa formation n'est pas le résultat d'un changement du milieu, puisqu'elle a lieu naturellement à l'instant de contact entre les polymères. Pour notre part nous parlerons de "capsules de complexes polyélectrolytes".

La structure de ces polymères est donnée Figure 2.9 [Dautzenberg, H. *et al.*, 1996a].

Figure 2.9 Structures chimiques du sulfate de cellulose et du poly(diallyl diméthyl ammonium)



Les caractéristiques chimiques des polymères ont un effet majeur sur les propriétés du complexe polyélectrolyte, c'est-à-dire de la membrane qui sera générée ; citons notamment :

- le degré de substitution,
- la répartition des charges sur la chaîne de polymère,
- la distribution de poids moléculaires au sein d'un polymère.

2.4.3. Inclusion dans un gel avec recouvrement

Dans certains cas le réseau tridimensionnel d'un hydrogel ne permet pas de maintenir convenablement un composé au sein de sphères. Si le gel porte des groupements chargés en surface, un recouvrement par complexation d'un polymère de charge opposée à la surface des billes peut être envisagé. On obtient alors des capsules à coeur solide. Certains auteurs procèdent ensuite à la reliquéfaction du gel formant le coeur ; ils obtiennent alors des capsules à coeur liquide.

Lim et Sun en 1980 ont étudié le recouvrement de billes d'alginate de calcium par de la poly(lysine) [Lim, F. *et al.*, 1980]. Depuis d'autres polymères polycationiques ont été testés comme le chitosane [McKnight, C. A. *et al.*, 1988 ; Goosen, M. F. A. *et al.*, 1989].

2.4.4. Microencapsulation par polymérisation interfaciale

Cette technique aussi appelée polycondensation interfaciale fut la première proposée pour l'encapsulation de composés biologiques [Chang, T. M. S., 1964]. Elle est basée sur une réaction de polymérisation de deux monomères à l'interface de gouttelettes en émulsion. Par exemple, une phase aqueuse, contenant une diamine et les entités à encapsuler, est dispersée dans une phase hydrophobe. Un dichlorure d'acide, agent réticulant liposoluble, est ajouté à la phase continue. La polymérisation a lieu à l'interface, qui donne naissance à un film de type nylon. On obtient des capsules à coeur liquide.

2.4.5. Microencapsulation par réticulation interfaciale

Cette technique est basée sur la réticulation d'un ou plusieurs polymères. Dans la pratique, on réalise une émulsion de polymère contenant le produit à encapsuler dans un liquide non miscible. L'ajout d'un agent réticulant permet ensuite de solidifier les gouttes de solution de polymère. On forme par cette technique des microcapsules ou des microbilles.

L'équipe du Professeur Lévy (Faculté de Pharmacie de Reims) a développé cette technique avec des biopolymères (protéine réticulée par de l'alginate de propylène glycol) [Lévy, M. C., 1997].

2.4.6. Microencapsulation en liposomes

Les liposomes sont de petites vésicules sphériques. Le coeur est un liquide aqueux, tandis que la paroi est constituée de phospholipides organisés en feuillet bimoléculaires. Les liposomes peuvent encapsuler des substances lipophiles ou hydrophiles. Les substances lipophiles sont enchâssées dans la paroi, alors que les substances hydrophiles sont dissoutes dans le coeur. Les liposomes pourraient être classés parmi les nanocapsules, car leur diamètre est en général voisin du micromètre.

N.B. La société Capsulis (Pessac, Gironde) développe et commercialise des microcapsules fabriquées à partir de tensioactifs. Comme les phospholipides dans le cas des liposomes, les tensioactifs s'organisent en bicouches. Ces membranes isolent un coeur aqueux du milieu extérieur.

2.4.7. Conclusion

Une enzyme peut être piégée dans des sphères. Grâce à la technique d'inclusion, l'enzyme est isolée sans être liée physiquement à un support. Elle conserve ainsi son intégrité moléculaire, ce qui est favorable au maintien de son activité.

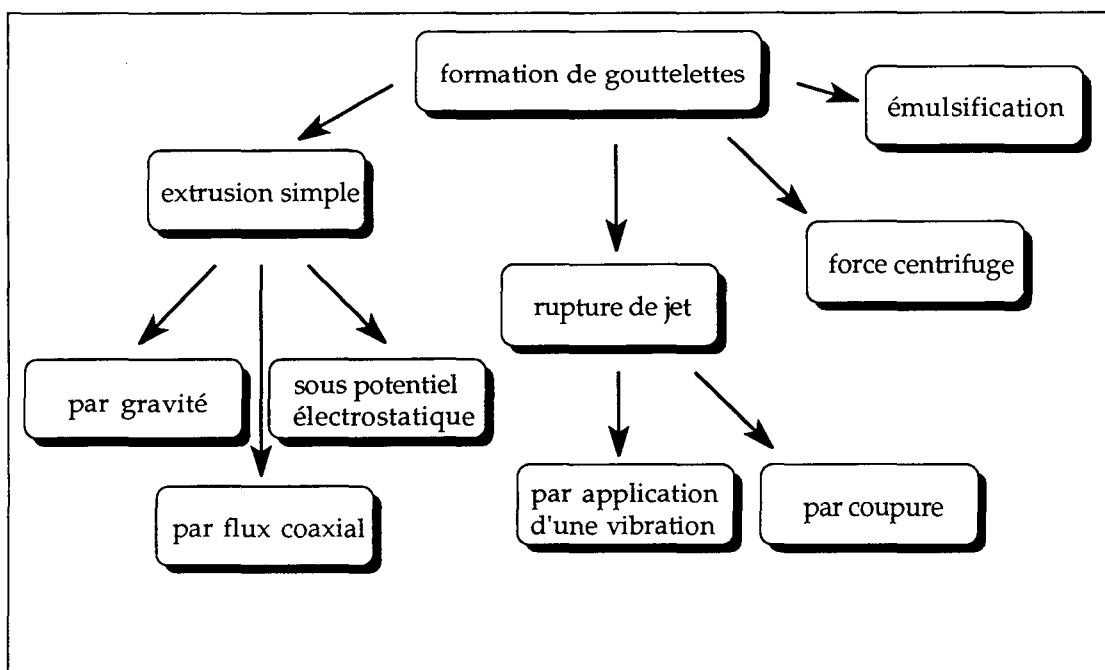
Le large éventail de techniques d'inclusion et de microencapsulation décrites permet d'orienter son choix en fonction des contraintes de l'application envisagée. On peut par ailleurs combiner plusieurs techniques, comme l'adsorption sur un support avant l'encapsulation de l'ensemble [Mansfeld, J. *et al.*, 1991].

Toutes ces techniques d'inclusion et de microencapsulation nécessitent en premier lieu la formation de gouttelettes de liquide. Ce domaine assez peu étudié revêt pourtant une importance capitale dans le domaine de la bioencapsulation. Nous allons décrire maintenant l'état d'avancée des connaissances sur les techniques de formation de gouttelettes applicables à la microencapsulation.

2.5. Les techniques de formation de gouttelettes

La formation de gouttelettes peut être obtenue par de nombreuses techniques différentes : par extrusion, par rupture de jet, par utilisation d'une force centrifuge ou par émulsification. Les techniques de formation de gouttelettes sont présentées en Figure 2.10.

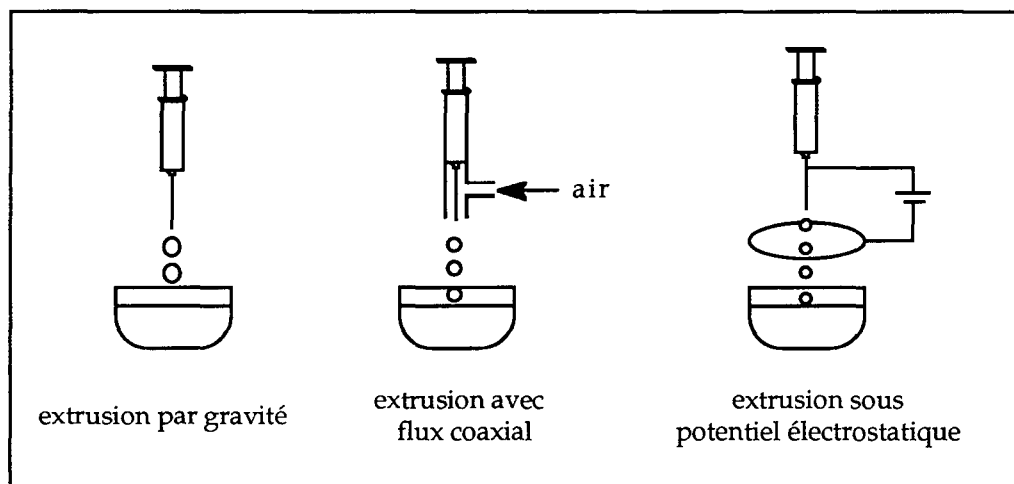
Figure 2.10 Techniques de formation de gouttelettes



2.5.1. Production par extrusion

La technique consiste à extruder une solution de polymère à travers un tube ou une aiguille, afin de former des gouttelettes. Les gouttes tombent dans une solution de solidification. Les dispositifs utilisés pour former des gouttelettes par extrusion sont illustrés en Figure 2.11.

Figure 2.11 Dispositifs de fabrication de billes par extrusion



2.5.1.1. Extrusion simple par gravité

La technique la plus simple consiste à laisser tomber les gouttes sous l'effet de la force de gravité. Le diamètre des gouttes obtenues est toujours supérieur au millimètre, même avec des aiguilles très fines [Poncelet, D. *et al.*, 1997a]. La taille des billes formées peut être différente de celles des gouttes car, lors de la gélification, il peut se produire un gonflement ou une rétraction des billes. Par exemple, le volume des gouttes d'alginate est divisé par deux lors de la gélification, ce qui revient à une réduction de 0,79 fois en diamètre.

2.5.1.2. Extrusion avec flux coaxial

Pour certaines applications, il est nécessaire d'obtenir des billes d'un diamètre inférieur. Plusieurs techniques ont été développées dans ce but. En 1947, Lane propose d'appliquer un jet d'air autour de l'aiguille pour favoriser le décrochage de la goutte en sortie de l'aiguille [Lane, W. R., 1947]. Cette technique est toujours largement utilisée aujourd'hui. Le diamètre des gouttes obtenues dépend de facteurs tels que la taille de l'aiguille, le rapport des vitesses de fluides, la viscosité de la solution. La taille des sphères peut descendre en-dessous de 500 μm de diamètre [Poncelet, D. *et al.*, 1997a].

En 1977, Charwat remplace l'air par un jet de liquide dans le but de mieux contrôler la tension de surface, la viscosité et la masse volumique de la phase entraînant la goutte [Charwat, A. F., 1977]. Cette technique n'a pas, par contre, suscité beaucoup d'intérêt, elle est très peu utilisée [Dupuy, B. *et al.*, 1988].

2.5.1.3. Extrusion sous potentiel électrostatique

On peut par ailleurs augmenter le débit et réduire la taille des microcapsules en plaçant un potentiel électrostatique entre l'aiguille et la solution gélifiante, ou entre l'aiguille et un anneau de métal placé en-dessous.

Les relations entre le potentiel électrique appliqué et la taille des gouttes, ainsi que le mécanisme impliqué ont été étudiés par notre équipe [Poncelet, D. *et al.*, 1997b]. Brièvement, la différence de potentiel appliquée polarise l'aiguille, et la goutte naissante. Au sein de la solution, cette polarisation se matérialise par le déplacement des molécules chargées vers l'interface liquide/air. La tension de surface de la goutte est ainsi diminuée et elle se décroche plus rapidement qu'en absence de potentiel électrique. Le phénomène est plus marqué si le signe appliqué

au niveau de l'aiguille est le même que celui des contre-ions du polymère en solution.

2.5.2. *Production par rupture contrôlée de jet*

Par extrusion on peut obtenir un jet de liquide. En rompant ce jet on forme des gouttelettes. Il est possible de contrôler le phénomène de rupture de jet pour obtenir des gouttes monodispersées, c'est-à-dire toutes de même taille.

2.5.2.1. Rupture de jet par vibration

Un jet de liquide se rompt en gouttelettes en réponse à des perturbations du milieu ambiant [Chicheportiche, J.-M., 1993]. Rayleigh en 1878 applique au jet une perturbation mécanique de fréquence donnée, et observe l'apparition d'une certaine régularité dans la rupture. Ces données théoriques sont exploitées en imposant au jet une vibration contrôlée (amplitude, fréquence, forme de l'onde).

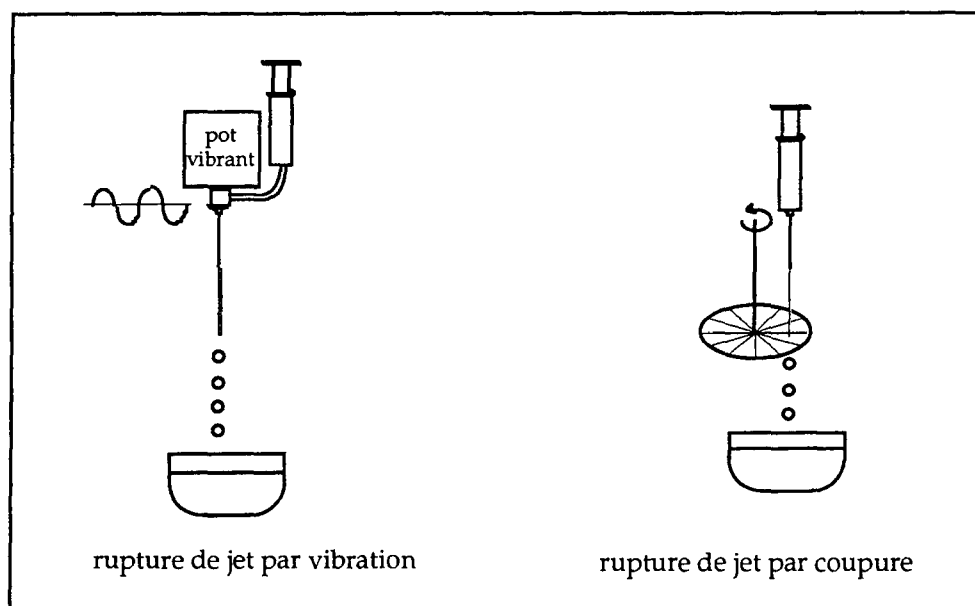
Le diamètre des gouttes est en général compris entre 1 et 3 mm, pour un écart-type de 5 %. Il semble difficile d'utiliser cette technologie pour former des gouttes inférieures à 800 μm de diamètre [Poncelet, D. *et al.*, 1997a]. Par contre la mise à l'échelle industrielle a déjà été réalisée.

2.5.2.2. Rupture de jet par coupure

L'équipe du Professeur Vorlop (Institute of Technology, Braunschweig, Allemagne) propose de couper le jet de liquide au moyen de fils rotatifs [Prusse, U. *et al.*, 1996]. Les fils sont montés en un dispositif en forme de roue de bicyclette, qui est placée perpendiculairement au jet. Les portions de jet individualisées prennent une forme sphérique avant de tomber dans le bain de solidification. Les fils utilisés doivent être les plus fins possibles, car ils conditionnent les pertes en polymère lors de l'impact fil/jet de liquide.

La figure suivante donne une idée des dispositifs utilisés pour produire des gouttes par rupture de jet de liquide.

Figure 2.12 Dispositifs de fabrication de billes par rupture de jet



2.5.3. Utilisation de la force centrifuge

Une force centrifuge peut être mise à profit pour la formation de gouttelettes. Deux systèmes d'extrusion rotatifs sont cités dans la littérature :

- un disque [Chicheportiche, J.-M., 1993],
- un cylindre perforé [Schlameus, W., 1995].

Les applications de ces dispositifs concernent la pharmacie ou des produits chimiques. Des inconvénients majeurs limitent son application à la bioencapsulation :

- le cisaillement généré est important,
- le récipient collecteur doit être très large (jusqu'à 10 mètres de diamètre) ce qui monopolise de l'espace et complique le maintien de la stérilité.

2.5.4. Production par émulsification

Des billes ou des capsules peuvent être fabriquées par émulsification et solidification des gouttelettes dispersées. Le principe de la technique est d'émulsionner un mélange de polymère et de principe actif dans une phase non miscible. On provoque ensuite la solidification des gouttelettes, qui sont séparées et nettoyées.

L'émulsification est obtenue en réacteur discontinu à l'échelle laboratoire. Dans l'optique d'un passage à l'échelle industrielle, l'émulsification peut aussi être menée de façon continue grâce à l'utilisation de mélangeurs statiques. Les mélangeurs statiques sont des éléments qui, placés dans un tube, font obstacle à l'écoulement des fluides. Après passage à travers ces éléments, les fluides sont parfaitement mélangés.

2.5.5. Conclusion

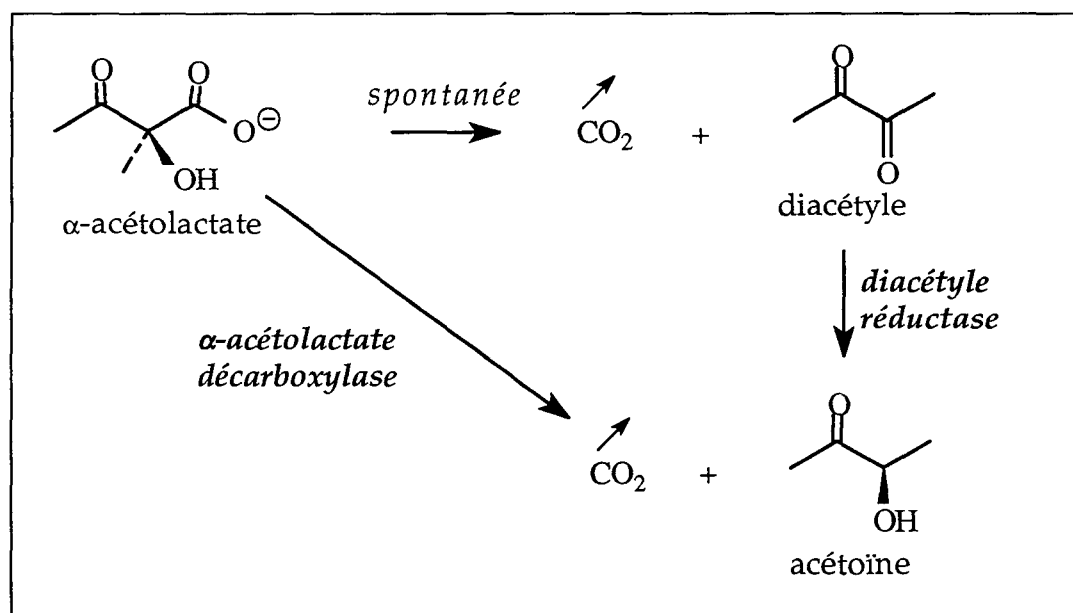
La technique de formation de gouttelettes à choisir dépend du type de technique d'encapsulation, de la taille souhaitée, de la dispersion de tailles possible et de l'échelle de la production.

3. L' α -acétolactate décarboxylase

Nous nous proposons d'encapsuler l' α -acétolactate décarboxylase dans des sphères. Commençons par dresser une fiche signalétique de cette enzyme.

En 1983, Godtfredsen et Ottesen proposent d'utiliser une enzyme pour éviter la formation de diacétyle dans la bière. En effet, l' α -acétolactate décarboxylase convertit l' α -acétolactate directement en acétoïne, ce qui évite la formation de diacétyle (Figure 2.13).

Figure 2.13 L' α -acétolactate décarboxylase convertit l' α -acétolactate directement en acétoïne



Plusieurs études ont montré son efficacité pour accélérer la maturation de la bière [Aschengreen, N. H. et Jepsen, S., 1992 ; Jepsen, S., 1993 ; Kabaktschieva, G. *et al.*, 1994]. De plus, son utilisation en brasserie est autorisée [Lamy Dehove, 1995 et 1996].

L' α -acétolactate décarboxylase (E.C. 4.1.1.5) répond aussi au nom de (S)-hydroxy-2 méthyl-2 3-oxobutanoate carboxy-lyase [Enzyme Handbook, 1990]. Son poids moléculaire a été déterminé, mais les données de la littérature sont incohérentes. Svendsen et ses collaborateurs ont mesuré un poids moléculaire de 29 000 Da, tandis que l'équipe de Rostgaard Jensen en 1987 trouve pour la même enzyme une valeur de 70 000 Da (deux monomères de 35 000 Da) [Svendsen, I. *et al.*, 1989 ; Rostgaard Jensen, B. *et al.*, 1987]. On peut supposer que l'équipe de Svendsen a fait

ses mesures sur le monomère et non sur le dimère.

3.1. Origines de l'enzyme

L' α -acétolactate décarboxylase est produite par plusieurs espèces bactériennes. Elle est synthétisée dans le cytoplasme. L' α -acétolactate décarboxylase a été purifiée à partir de souches de :

- *Lactobacillus casei* [Rasmussen, A. M. et al., 1985],
- *Enterobacter aerogenes* (anciennement *Aerobacter aerogenes*) [Loken, J. P. et al., 1970 ; Godtfredsen, S. E. et al., 1982 ; Sone, H. et al., 1987],
- *Brevibacterium acetylicum* [Ohshiro, T. et al., 1989].

3.2. Formes commerciales disponibles

L' α -acétolactate décarboxylase est disponible dans le commerce. Tout d'abord, la société danoise Novo Nordisk produit une préparation liquide à activité acétolactate décarboxylasique : Maturex® L. D'autre part, Fluka (société suisse) commercialise de l' α -acétolactate décarboxylase purifiée sous forme de lyophilisat. Les deux sociétés utilisent le même type de procédé de fabrication : l'utilisation d'une souche transformée de *Bacillus subtilis*. Cette souche hôte a reçu le gène codant pour l' α -acétolactate décarboxylase d'une souche de *Bacillus brevis* (donneur) [Fiche technique Novo Nordisk, 1996].

Deux exemples de prix sont présentés dans le Tableau 2.2.

Tableau 2.2 Coût de l' α -acétolactate décarboxylase

Nom	Société	Quantité : prix TTC	Activité (U*/g)	Coût/activité (FF/U*)
Maturex® L	Novo Nordisk	4 500 FF/Kg	1 500	0,003
Acétolactate décarboxylase	Fluka	1 046 FF/50 mg	60 000	0,35

* U = "quantité d'enzyme qui, sous les conditions standard, produit par décarboxylation de l' α -acétolactate, 1 μ mol d'acétoïne par minute" [Fiche technique Novo Nordisk, 1993].

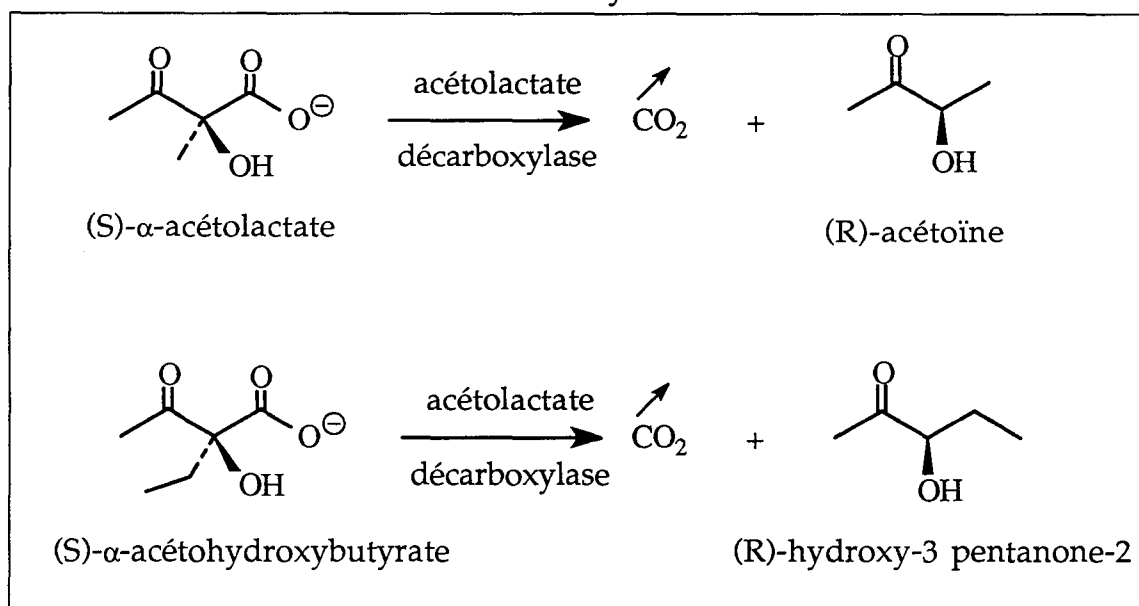
Le dosage recommandé par Novo Nordisk est de 10 à 20 g de Maturex® L par hectolitre de moût, à ajouter au moût froid en début de fermentation [Fiche technique Novo Nordisk, 1993]. Ce dosage s'appuie sur les travaux de Rostgaard Jensen et de son équipe [Rostgaard Jensen, B. *et al.*, 1987]. Fluka ne donne pas de recommandations de dosage, mais par le calcul on obtient 250 à 500 mg d'enzyme Fluka par hectolitre de moût.

3.3. Caractéristiques enzymatiques

3.3.1. Spécificité de substrat

L' α -acétolactate décarboxylase transforme l' α -acétolactate en acétoïne sans former de diacétyle, mais aussi l' α -acétohydroxybutyrate en hydroxy-3 pentanone-2 sans former la dicétone correspondante [Crout, D. H. *et al.*, 1991 ; Hannemann, W., 1996] (voir Figure 2.14).

Figure 2.14 Non-spécificité de substrat de l' α -acétolactate décarboxylase



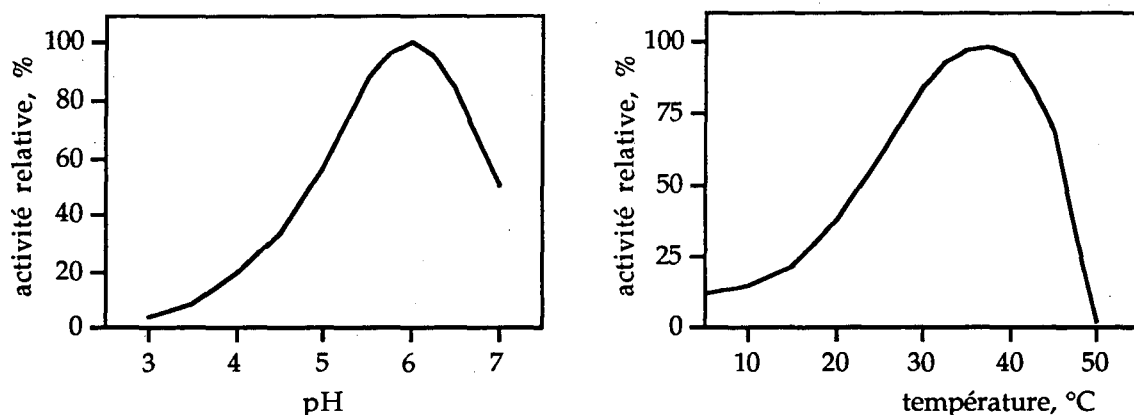
3.3.2. Stéréosélectivité

L' α -acétolactate décarboxylase agit préférentiellement sur le (S)- α -acétolactate. Toutefois, le (R)- α -acétolactate peut aussi être décarboxylé, mais à une vitesse beaucoup plus faible et après une période d'induction [Crout, D. H. G. *et al.*, 1986]. Cette préférence pour l'énantiomère S se retrouve aussi pour le cas de l' α -acétohydroxybutyrate [Crout, D. H. *et al.*, 1991].

3.3.3. Effet du pH et de la température sur l'activité de l' α -acétolactate décarboxylase

Les variations d'activité de l' α -acétolactate décarboxylase en fonction du pH et de la température sont présentées graphiquement sur la Figure 2.15. Le pH optimal est de 6 tandis que la température optimale est de 37°C.

Figure 2.15 Influence du pH et de la température sur
l'activité de l' α -acétolactate décarboxylase



3.3.4. Activateurs et inhibiteurs

L' α -acétolactate décarboxylase est activée par le Triton X-100 (détergent non-ionique) et par le chlorure de sodium. Ces deux activateurs ont un effet synergique [Rostgaard Jensen, B. *et al.*, 1987].

Aucun inhibiteur de l' α -acétolactate décarboxylase de *Bacillus brevis* n'est cité dans la littérature, pas plus que de co-facteur, de co-enzyme ou de groupement prosthétique.

3.3.5. Paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques de l' α -acétolactate décarboxylase issue de *Bacillus brevis* sont : $V_m = 900$ unités/mg et $K_m = 60$ $\mu\text{mol/l}$ [Rostgaard Jensen, B. *et al.*, 1987]. Une unité est "la quantité d'enzyme qui produit 1 μmol d'acétoïne par minute" dans les conditions fixées par l'auteur : pH 6, 30°C, tampon contenant des activateurs. Bien entendu ces conditions de mesure sont très différentes des conditions réelles d'utilisation. Pendant la fermentation le pH évolue entre 5 et 4 et la température est de 7 à 12°C (fermentation basse). Ces paramètres font que l' α -acétolactate décarboxylase est moins active dans le cas d'une fermentation réelle.

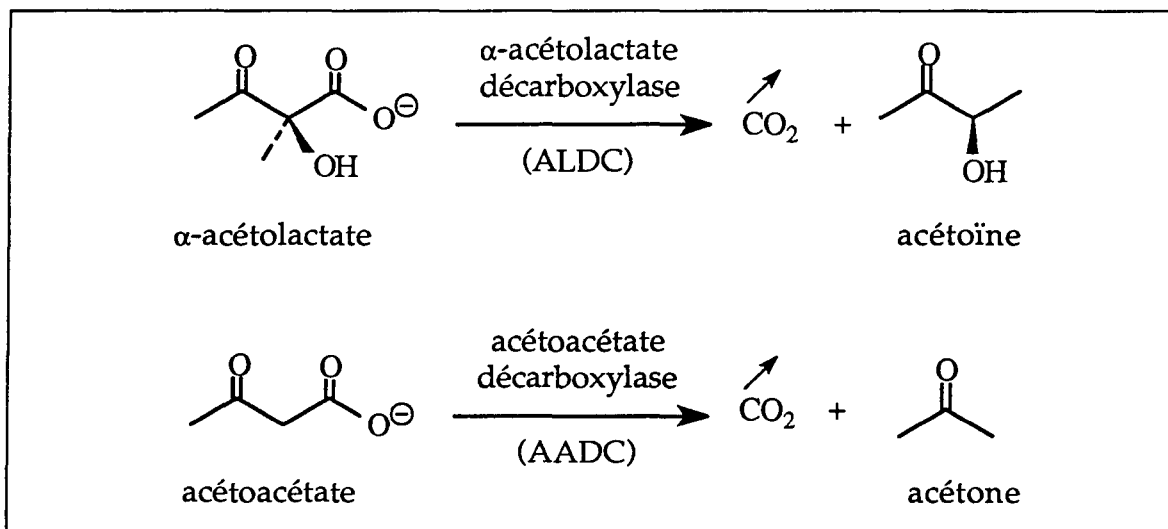
3.4. Séquence de l'enzyme et hypothèse de mécanisme réactionnel

Afin de comprendre le mode d'action d'une enzyme (son "mécanisme réactionnel") il est nécessaire de connaître sa structure dans l'espace et les groupements impliqués dans son site actif. C'est dans ce but que l'équipe du Laboratoire de la brasserie Carlsberg a réalisé le séquençage (c'est-à-dire la liste des acides aminés qui la composent, dans l'ordre) de l' α -acétolactate décarboxylase produite par *Bacillus brevis* [Svendsen, I. *et al.*, 1989].

D'après l'équipe de Svendsen, l'enzyme se compose de 260 acides aminés, organisés en une seule chaîne peptidique et sans pont disulfure. Les prédictions d'organisation tridimensionnelle donnent une structure très ordonnée, composée d'hélice α pour 54 % et de feuillet β pour 34 %. Ici encore les données de la littérature divergent puisque d'après Rostgaard Jensen et ses collaborateurs, l'enzyme est formée de deux monomères de 315 acides aminés chacun [Rostgaard Jensen, B. *et al.*, 1987]. Les compositions relatives en acides aminés citées par ces deux équipes sont assez proches.

A l'heure actuelle on ne sait pas quel(s) groupement(s) sont impliqués dans le site actif de l' α -acétolactate décarboxylase (ALDC) produite par *Bacillus brevis*. On peut seulement faire une analogie. En effet, une autre β -céto-acide décarboxylase a été très bien étudiée, il s'agit de l'acétoacétate décarboxylase (AADC) issue de *Clostridium acetobutylicum*. Cette enzyme catalyse la décarboxylation de l'acétoacétate en acétone, comme présenté dans la Figure 2.16.

Figure 2.16 Comparaison des décarboxylations catalysées par l' α -acétolactate décarboxylase (ALDC) et par l'acétoacétate décarboxylase (AADC)

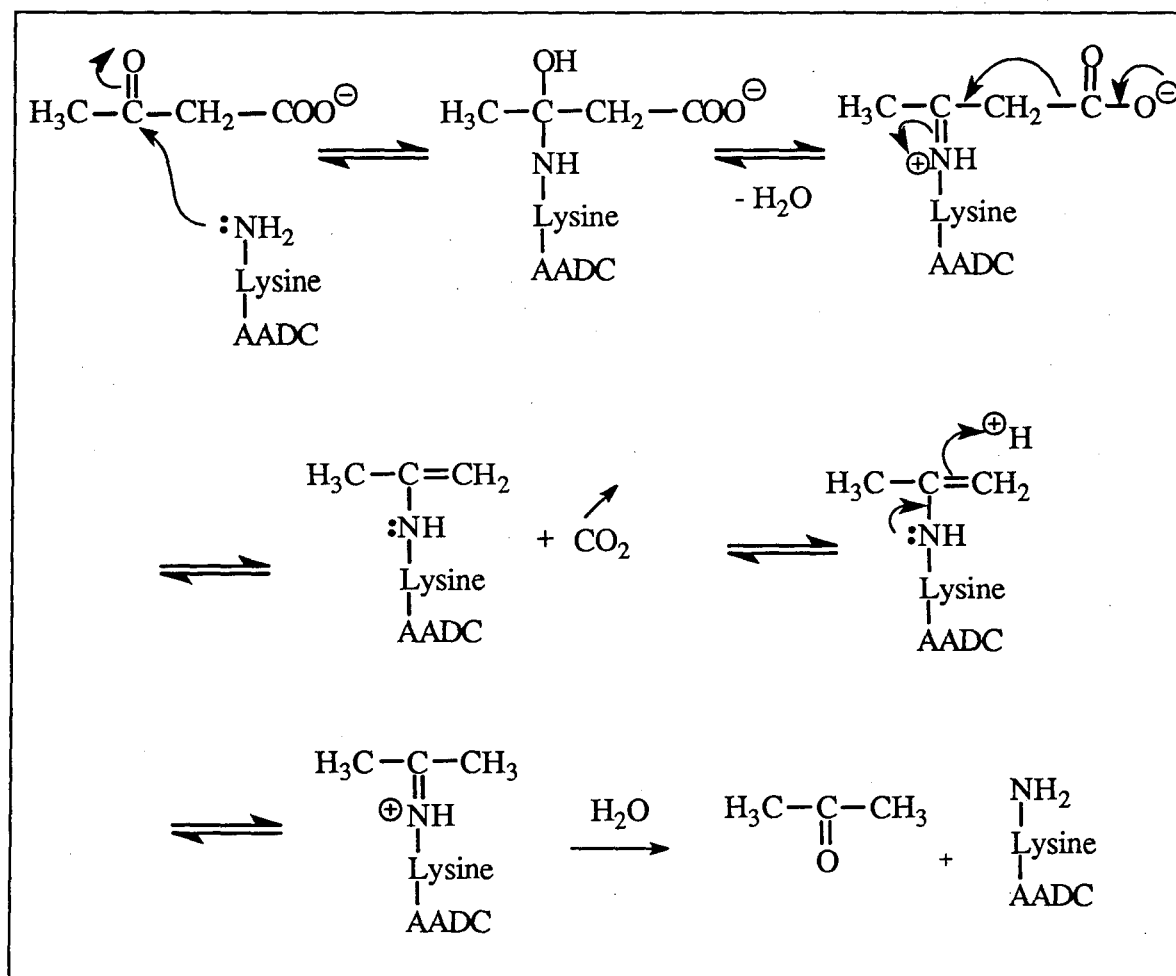


Le mécanisme réactionnel de l'acétoacétate décarboxylase (AADC) est schématisé Figure 2.17 [Walsh, C., 1979]. Le groupement amine d'un résidu lysine dans le site actif de l'enzyme est responsable d'une attaque nucléophile sur le carbone β de l'acétoacétate. Peut-on imaginer que le mécanisme réactionnel de l' α -acétolactate décarboxylase (ALDC) suive ce modèle ? Deux études s'opposent :

- Svendsen et ses collaborateurs ont trouvé un groupement lysine occupant la même position dans les séquences de deux α -acétolactate décarboxylases (ALDC) [Svendsen, I. *et al.*, 1989]. Cet argument porte à croire que le mécanisme pourrait être identique.
- Toutefois, Walsh fait apparaître qu'un second groupement lysine, situé proche du premier, interviendrait dans le mécanisme pour l'acétoacétate décarboxylase (AADC). Or, ce deuxième groupement n'est pas retrouvé parmi les deux α -acétolactate décarboxylases (ALDC) de séquence connue. Cet argument met donc en doute l'hypothèse d'un mécanisme identique pour les deux enzymes.

Il y a donc un argument en faveur de l'analogie et un en sa défaveur.

Figure 2.17 Mécanisme réactionnel de décarboxylation enzymatique de l'acétoacétate



3.5. Législation

On peut s'interroger sur la législation en vigueur concernant les enzymes immobilisées en industries alimentaires.

3.5.1. Remarques générales sur la législation française

La législation française fonctionne sur le principe des listes positives, c'est-à-dire que seuls les composés mentionnés dans ces listes sont autorisés¹. Pour qu'un nouveau composé apparaisse sur ces listes, le demandeur doit déposer un dossier auprès de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes. Cette demande engagera un examen analytique et toxicologique avant l'autorisation éventuelle du composé [Lamy Dehove, 1996].

¹ Directive du 15/04/1912, article 2 modifié par directive n°73-138, 12/02/1973.

Rappelons que l' α -acétolactate décarboxylase est autorisée en brasserie [Lamy Dehove, 1995 et 1996].

3.5.2. Définition de l'auxiliaire technologique

"... on entend par auxiliaire technologique toute substance non consommée comme ingrédient alimentaire en soi et volontairement utilisée dans la transformation des matières premières, des denrées alimentaires ou de leurs ingrédients, pour répondre à un certain objectif technologique pendant le traitement ou la transformation et pouvant avoir pour résultat la présence non intentionnelle de résidus technologiquement inévitables de cette substance ou de ses dérivés dans le produit fini et à condition que ces résidus ne présentent pas de risques sanitaires et n'aient pas d'effet technologiques sur le produit fini"².

D'après cette définition, on peut donc considérer les capsules d' α -acétolactate décarboxylase comme un auxiliaire technologique.

3.5.3. Dispositions d'étiquetage

La présence d'un additif dans une denrée alimentaire pré-emballée doit être indiquée sur l'emballage³.

Les auxiliaires technologiques ne subsistent, par définition, qu'à l'état de traces, et de ce fait sont dispensés d'indication dans l'étiquetage des denrées [Souverain, R., 1992].

L'utilisation d' α -acétolactate décarboxylase encapsulée au cours de la fermentation de la bière n'aura pas besoin d'être mentionné sur le produit fini.

² Addendum de la directive de la Communauté Économique Européenne du 21/12/1988 relative aux additifs [Souverain, R., 1992].

³ Décret du 7/12/1984 décrivant la directive de la Communauté Économique Européenne du 18/12/1978, relative à l'étiquetage et à la présentation des denrées alimentaires.

4. Cahier des charges pour l'immobilisation d'acétolactate décarboxylase

Pour clôturer ce chapitre de synthèses bibliographiques nous allons faire le point sur les objectifs à atteindre pour l'application envisagée.

4.1. Positionnement du projet

La maturation de la bière peut être accélérée au moyen de levures immobilisées, ou en utilisant les levures génétiquement modifiées. L'inconvénient des levures immobilisées est le chauffage du moût, nécessaire pour convertir l'acétolactate, mais qui altère les qualités de la bière. Quant aux organismes génétiquement modifiés, même si la législation avance dans ce domaine, brasseurs et consommateurs ne semblent pas encore prêts à franchir le pas. Par conséquent, une proposition de technique de maturation accélérée qui n'implique ni chauffage du moût, ni organismes génétiquement modifiés en utilisation directe se justifie auprès des brasseurs.

4.2. Débouchés

Le projet d'encapsulation de l' α -acétolactate décarboxylase a plusieurs applications possibles :

- ➔ les procédés conventionnels de fabrication de la bière en réacteurs discontinus. En effet, l' α -acétolactate décarboxylase ajoutée en début de fermentation principale permet de raccourcir ou même d'éviter l'étape ultérieure de maturation.
- ➔ les procédés en continu de fermentation principale sur levures immobilisées. Ces procédés présentent un risque de surproduction d' α -acétolactate. Or, on peut envisager un procédé de fabrication "mixte" faisant intervenir à la fois des levures et des enzymes immobilisées.
- ➔ la production de bière sans alcool, ou à faible teneur en alcool. Certes, la qualité des bières sans alcool s'est sensiblement améliorée depuis les années 1980, mais on peut garder en mémoire que la grande difficulté de brassage est d'éviter certains faux-goûts, comme celui de diacétyl [Moll, M., 1991].

4.3. Objectifs à atteindre

Dans le cadre de cette étude, les contraintes qui nous sont imposées sont de différentes natures :

- les contraintes liées à une application alimentaire,
- les contraintes imposées par l'échelle industrielle,
- les contraintes liées à l'efficacité du système.

4.3.1. *Les contraintes liées à une application alimentaire*

Une enzyme encapsulée peut être comparée à une enzyme "emballée". Par conséquent, au même titre que les emballages classiques, les matériaux d'encapsulation (matrice de gel, membrane) doivent être compatibles avec un contact alimentaire :

➔ **matériaux non toxiques**, chimiquement stables, et exempts de traces de produits non autorisés

D'autre part, matériaux et techniques d'encapsulation doivent permettre de fabriquer

➔ un produit "**microbiologiquement propre**".

4.3.2. *Les contraintes imposées par l'échelle industrielle*

L'industrie de la brasserie produit de grandes quantités :

- 20 millions d'hectolitres en France en 1995,
- 1,3 milliards d'hectolitres dans le monde.

Dans cette optique, une étude d'encapsulation doit utiliser des technologies extrapolables à l'échelle industrielle, ainsi que des

➔ **matériaux disponibles** (produits en quantité et en qualité adéquates).

L'utilisation d' α -acétolactate décarboxylase encapsulée dans des fermenteurs de brasserie nécessite

➔ **une bonne résistance mécanique**

En effet, la hauteur de liquide génère une forte pression, et les dégagements de dioxyde de carbone peuvent être à l'origine de phénomènes d'abrasion. De petites sphères ont une meilleure résistance mécanique que des grosses, d'où l'intérêt de

→ fabriquer des **petites sphères**.

4.3.3. *Les contraintes liées à l'efficacité*

Si on compare l'industrie alimentaire aux secteurs pharmaceutique et cosmétique, on peut dire qu'il s'agit d'une industrie à faible marge bénéficiaire. De ce fait, un nouveau procédé doit, pour s'imposer, permettre de réduire les coûts d'exploitation de manière non négligeable, et avec des frais d'investissement réduits. La principale limitation à l'utilisation de Maturex L est son coût. L' α -acétolactate décarboxylase encapsulée devra donc afficher

→ un **rapport durée d'utilisation/prix** plus compétitif que Maturex L

Pour atteindre ce but il faut choisir

→ un **procédé d'encapsulation simple**

afin de réduire le coût de fabrication des capsules au plus bas [Poncelet, D. *et al.*, 1997a]. Il faut par ailleurs que

→ l'enzyme soit **encapsulée sous forme active**, et que

→ les **capsules retiennent l'enzyme**.

Certes la définition d'un auxiliaire technologique autorise la présence de traces "technologiquement inévitables" dans le produit fini, notamment d'enzyme. Mais, une fuite d'enzyme signifierait aussi une diminution de l'efficacité des capsules, ce qui est défavorable à un bon rapport durée d'utilisation/prix.

Le reproche le plus couramment formulé à l'égard des enzymes incluses ou encapsulées est la limitation des transferts de masse. Pour s'affranchir de telles limitations, il est essentiel de fabriquer des **petites sphères**, comme nous l'avons déjà signalé. En effet, l'accessibilité des enzymes dépend notamment du gradient de concentration qui s'établit entre la surface et le coeur de la sphère. A barrière membranaire égale, les petites sphères ont une meilleure efficacité de catalyse que

les grosses. Par analogie avec les levures immobilisées, on peut considérer que 0,8 mm de diamètre est la taille de sphères maximale pour éviter les limitations de transfert de matière [Pajunen, E., 1995].

Dans le même ordre d'idée, des sphères agglomérées se comporteront vis-à-vis des transferts de matières comme une seule sphère de la taille de l'agglomérat. Il est donc important d'obtenir

➔ **des sphères bien individualisées.**

La distribution de tailles est aussi un paramètre important à contrôler. Qu'il s'agisse de la résistance mécanique ou du transfert de matière, les plus grosses sphères seront limitantes pour l'ensemble de la population. D'un point de vue cinétique, il est préférable d'avoir des sphères monodispersées [Poncelet, D. *et al.*, 1988]. On cherche donc à fabriquer des sphères petites et

➔ **de tailles homogènes.**

Références bibliographiques

(1989) Fiche technique Novo Nordisk Manual Method for Determination of alpha-acetolactate decarboxylase (ALDC), September, 5 pp.

(1990) Acetolactate decarboxylase, in *Enzyme handbook*, 1, Springer-Verlag, Berlin.

(1993) Fiche technique Novo Nordisk Maturex L, March, 2 p.

(1994) Fiche technique Novo Nordisk Influence of beer pH on Maturex, August, 2 p.

(1996) Fiche technique Novo Nordisk Maturex L, March, 3 p.

A. Aivasidis (1996)

Another look at immobilized yeast systems, *Cerevisia*, 1, 27-32.

M. Andries, P. C. van Beveren, O. Goffin and C. A. Masschelein (1995a)

Design of a multi-purpose immobilized yeast bioreactor system for application in the brewing process, Proceedings : *Symposium immobilized yeast applications in the brewing industry*, Espoo, Finland, Getränke-Fachverlag, Carl, XXIV, 134-144.

M. Andries, P. C. van Beveren, O. Goffin and C. A. Masschelein (1995b)

Design and applications of an immobilized loop bioreactor for continuous beer fermentation, Proceedings *Immobilized cells: Basics and applications*, Noordwijkerhout, The Netherlands, 264.

M. Andries, P. C. van Beveren, O. Goffin, P. Rajotte and C. A. Masschelein (1997a)

First results on semi-industrial continuous fermentation with the Meura-Delta immobilized yeast fermentor, *Brewers' Guardian*, 126, 2, 26-28.

M. Andries, G. Derdelinckx, K. G. Ione, F. Delvaux, P. C. van Beveren and C. A. Masschelein (1997b)

Zeolites as catalysts for the cold and direct conversion of acetolactate to acetoin, Proceedings *Eur Brew Conv*, Maastricht, The Netherlands, Oxford: IRL Press, in press.

N. H. Aschengreen and S. Jepsen (1992)

Use of acetolactate decarboxylase in brewing fermentations, Proceedings *Proc Conv Inst Brew Australian and New Zealand section*, 22, 80-83.

R. Bahukelar, N. R. Ayyangar and S. Ponrathnam (1991)

Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts, *Enzyme Microb Technol*, 13, November, 858-868.

E. P. Bardi, A. A. Koutinas, M. J. Soupioni and M. E. Kanellaki (1996)

Immobilization of yeast on delignified cellulosic material for low temperature brewing, *J Agric Food Chem*, 44, 463-467.

D. R. Berry and D. C. Watson (1987)

Production of organoleptic compounds, in *Yeast Biotechnology*, 345-368, D. C. Berry, I. Russell and G. G. Stewart, Academic Press, London.

E. Borremans (1997)

Secondary fermentation of beer with immobilized yeast, *Cerevisia*, 33-38.

R. Brissart (1994)

Technologie de la brasserie, Document pédagogique Institut Français de la Brasserie Malterie.

H. G. Bungenberg de Jong (1949)

XI. Morphology of coacervates, in *Colloid Science*, I, 433-481, H. R. Krug, Elsevier, Amsterdam.

J. I. Centenera, F. Ortega, A. Galvez and J. A. Candela (1989)

Beer production with immobilized yeast into pretreated polygalacturonic acid, *ProceedingsEur Brew Conv*, Zurich, Oxford: IRL Press, 307-314.

T. M. S. Chang (1964)

Semipermeable Microcapsules, *Science*, 1, 524-525.

A. F. Charwat (1977)

Generator of Droplet Tracers for Holographic Flow Visualization in Water Tunnels, *Rev Sci Instrum*, 48, 8, 1034-1036.

J.-M. Chicheportiche (1993)

Etude de la fragmentation commandée de jets liquides issus d'un disque en rotation et réalisation d'un générateur de gouttelettes monodispersées, Thèse Paris VI Spécialité Mécanique.

J. Cop, D. Dyon, D. Iserentant and C. Masschelein (1989)

Reactor design optimization with a view to the improvement of amino acid utilization and flavour development in calcium alginate entrapped brewing yeast fermentation, *ProceedingsEur Brew Conv*, Zurich, Oxford: IRL Press, 315-322.

D. H. G. Crout, J. Littlechild and S. M. Morrey (1986)

Acetoin metabolism : stereochemistry of the acetoin produced by the pyruvate decarboxylase of wheat germ and by the alpha-acetolactate decarboxylase of *Klebsiella aerogenes*, *Chem Soc Perkin Trans 1*, 1, 105-108.

D. H. Crout, D. H. Lee and D. P. J. Pearson (1991)

Stereoelectronic control of the base-catalysed rearrangement of 2-hydroxy-3-oxocarboxylates, *J Chem Soc Perkin Trans 2*, 381-385.

J. Curin, B. Pardonova, M. Polednikova, H. Sedova and M. Kahler (1987)

Beer production with immobilized yeast, *Proceedings Eur Brew Conv*, Madrid, Oxford: IRL Press, 433-440.

H. Dautzenberg, J. Stange, S. Mitzner and B. Lukanoff (1996a)

Encapsulation by polyelectrolyte complex formation - a way to make hepatocyte cultures safe, efficient and on-line available, *Proceedings Immobilized cells: basics and applications*, Noordwijkerhout, the Netherlands, Elsevier Science B.V., 11, 181-188.

A. Debourg, C. A. Masschelein and A. Pierard (1990)

Effects of ILV genes doses on the flux through the isoleucine-valine pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proceedings 6th Int Symp Genet Ind Microorganisms*, Abst. C21, 148.

H. Dellweg (1985)

Diacetyl und Bierreifung, *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 38, 6, 262-266.

A. Devreux (1997)

La Chaire J De Clerck VII, Commentaires et enseignements, *Cerevisia*, 1, 23-26.

M. Dillemans, E. Goosens, O. Goffin and C. A. Masschelein (1987)

The amplification effect of the ILV5 gene on the production of vicinal diketones in *Saccharomyces cerevisiae*, *ASBC Journal*, 45, 3, 81-84.

W. Dillenhöfer and D. Rönn (1996)

Alfa Laval/Schott system of secondary fermentation with immobilized yeast, *Brew Distill Int*, 27, 11, 35-37.

B. Dupuy, H. Gin, C. Baquey and D. Ducassou (1988)

In Situ Polymerization of a Microencapsulating Medium Round Living Cells, *J Biomed Mater Res*, 22, 1061-1070.

P. Edwards and A. J. Knights (1996)

Brewing with immobilized cells: influence of biomass hold-up on batch performance and the potential for unstable continuous culture, *Inst Chem Eng Res Event*, 2, 869-872.

S. Engan (1981)

3. Beer composition: volatile substances, in *Brewing Science*, 2, 120-133, J. R. A. Pollock, Food and Science Technology, G. F. Stewart, C. O. Chichester, J. Hawthorn, A. I. Morgan, E. M. Mrak, J. K. Scott and E. Von Sydow, Academic Press, London.

S. E. Godtfredsen and M. Ottesen (1982)

Maturation of beer with alpha-acetolactate decarboxylase, *Carslberg Res Commun*, 47, 93-102.

S. E. Godtfredsen, H. Lorck and P. Sigaard (1983b)

On the occurrence of alpha-acetolactate decarboxylases among microorganisms, *Carslberg Res Commun*, 48, 239-247.

S. E. Godtfredsen, A. M. Rasmussen, M. Ottesen, P. Rafn and N. Peitersen (1984)

Occurrence of α -acetolactate decarboxylases among lactic acid bacteria and their utilization for maturation of beer, *Appl Microb Biotechnol*, 20, 23-28.

M. F. A. Goosen, G. A. King, C. A. McKnight and N. Marcotte (1989)

Animal Cell Culture Engineering Using Alginate Polycation Microcapsules of Controlled Membrane Molecular-Weight Cut-off, *J Membrane Sci*, 41, 323-343.

E. Goosens, M. Dillemans, A. Debourg and C. A. Masschelein (1987)

Control of diacetyl formation by the intensification of the anabolic flux of acetohydroxyacid intermediates, *Proc Eur Brew Conv*, Madrid, 553-560.

E. Goosens, A. Debourg, K. D. Villanueva and C. A. Masschelein (1991)

Decreased diacetyl production by site directed integration of the ILV5 gene into chromosome XIII of *Saccharomyces cerevisiae*, *Proceedings Eur Brew Conv*, Lisbon, Oxford: IRL Press, 289-296.

E. Goosens, A. Debourg, K. D. Villanueva and C. A. Masschelein (1991)

Decreased diacetyl production by site directed integration of the ILV5 gene into chromosome XIII of *Saccharomyces cerevisiae*, *Proceedings Eur Brew Conv*, Lisbon, Oxford: IRL Press, 289-296.

E. Goosens, A. Debourg, K. D. Villanueva and C. A. Masschelein (1993)

Decreased diacetyl production in lager brewing yeast by integration of the ILV5 gene, *Proceedings Eur Brew Conv*, Oslo, Oxford: IRL Press, 251-258.

E. Groneick, H. Groppe, W. Dillenhöfer and D. Rönn (1997)

Secondary fermentation of beer with immobilized yeast, *Brauwelt Int*, 3, 264-266.

W. Hannemann (1996)

Alpha-acetolactate decarboxylase for diacetyl control, *Proceedings J. De Clerck Chair: Post-fermentation: The final touch*, Leuven, Belgium, 15-19 September.

J. S. Hough (1985)

Post-fermentation treatments, in *The biotechnology of brewing and malting*, 135-144, Cambridge University Press, Cambridge.

M. L. Huguet (1994)

Etude de billes d'alginate de calcium recouvertes de polymère polycationique, Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques Spécialité Génie des procédés et chimie-physique.

I. Hyttinen, J. Kronlöf and P. Hartwall (1995)

Use of porous glass at Hartwall brewery in the maturation of beer with immobilized yeast, Proceedings *Immobilized yeast applications in the brewing industry*, Espoo, Finland, Getränke-Fachverlag, Carl, 24, 55-65.

T. Inoue (1988)

Immobilized cell biotechnology - A new possibility for brewing?, *ASBC Journal*, 46, 3, 64-66.

T. Inoue, H. Murayama, K. Kajino, T. Kamiya, S. Mitsui and M. Mawatari (1991)

Direct spontaneous conversion of acetolactate into non-diacetyl substance in fermenting wort, Proceedings *Eur Brew Conv*, Lisbon, Oxford: IRL Press, 96-103.

T. Inoue (1995)

Development of a two-stage immobilized yeast fermentation system for continuous beer brewing, Proceedings *Eur Brew Conv*, Brussels, Oxford: IRL Press, 25-37.

S. Jepsen (1993)

Using ALDC to speed up fermentation, *Brewers' Guardian*, September, 55-56.

G. Kabaktschieva, T. Ginova-Stojanova and T. Dimitrova (1994)

The use of an enzyme solution with alpha-acetolactate decarboxylase activity, *Brew Bever Ind Int*, 2, 22-24.

J. F. Kennedy and J. Cabral (1987)

7-Enzyme immobilization, in *Enzyme technology*, 7a, 347, J. F. Kennedy, Biotechnology, H.-J. Rehm and J. F. Reed, 1st Ed., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

J. Kronlöf, T. Härkönen, P. Hartwall, S. Home and M. Linko (1989)

Main fermentation with immobilized yeast, Proceedings *Eur Brew Conv*, Zurich, Oxford: IRL Press, 355-362.

J. Kronlöf, M. Linko and E. Pajunen (1995)

Primary fermentation with two-stage packed bed system - pilot scale experiences, Proceedings *EBC Symposium Immobilized yeast applications in the brewing industry*, Espoo, Finland, Getränke-Fachverlag, Carl, 24, 118-125.

Lamy Dehove (1995)

Dispositions particulières - §3. Additifs alimentaires - 5H Mise à jour Février 1995., in *Réglementation des produits, Qualité, Répression des fraudes*, Tome 1, 5-270, L. S.A., Lamy.

Lamy Dehove (1996)

Denrées alimentaires - Généralités - Additifs et auxiliaires technologiques, arômes, in *Réglementation des produits, qualité, répression des fraudes*, Tome 1, 250 100/250 111/260 120, L. S.A., Lamy, Paris.

W. R. Lane (1947)

A Microburette for Producing Small Liquid Drops of Known Size, *Rev Sci Instrum*, 24, 98-101.

M. C. Lévy (1997)

Micro-capsules de biopolymères réticulés, Formation "Enrobage et Microencapsulation" Archimex Paris 8-9 Octobre 1997.

F. Lim and A. M. Sun (1980)

Microencapsulated Islets as Bioartificial Endocrine Pancreas, *Science*, 210, 908-910.

M. Linko and J. Kronlöf (1991)

Main fermentation with immobilized yeast, *Proceedings Eur Brew Conv*, Lisbon, Oxford: IRL Press, 353-360.

H. Lommi, A. Grönqvist and E. Pajunen (1990)

Immobilized yeast reactor speeds beer production - Continuously operated bioreactor cuts time of secondary fermentation-maturation (lagering) from 10-14 days to 2-3 hours, *Food Technol*, 44, 5, 128-133.

J. Mansfeld, M. Forster, A. Schellenberg and H. Dautzenberg (1991)

Immobilization of Invertase by Encapsulation in Polyelectrolyte Complexes, *Enzyme Microb Technol*, 13, March, 240-244.

E. A. Markvicheva, I. F. Kuz'kina, I. I. Pashkin, T. N. Plechko, Y. E. Kirsh and V. P. Zubov (1991)

A novel technique for entrapment of hybridoma cell in synthetic thermally reversible polymers, *Biotechnol Technique*, 5, 3, 223-226.

C. A. Masschelein (1986)

The Biochemistry of beer maturation, *J Inst Brew*, 92, 213-219.

C. Masschelein, D. Ryder and J.-P. Simon (1994)

Immobilized cell technology in beer production, *Critical Rev Biotechnol*, 14, 2, 155-177.

C. A. Masschelein and M. Andries (1995)

Future scenario of immobilized systems: promises and limitations, *Proceedings EBC Symposium Immobilized yeast applications in the brewing industry*, Espoo, Finland, Getränke-Fachverlag, Carl, 24, 223-241.

C. Masschelein and M. Andries (1996)

The Meura-Delta immobilized yeast fermentor for the continuous production of beer, *Brew Distill Int*, 27, 7, 16-18.

L. McLain (1994)

Genetically-engineering yeast "breakthrough" for brewers, *Brew Distill Ind*, 25, 5, 16-17.

M. C. Meilgaard (1975)

Flavor chemistry of beer: Part 2: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles, *MBAA Technical Quarterly*, 12, 3, 151-168.

N. Mensour, A. Margaritis, C. L. Briens, H. Pilkington and I. Russell (1995)

"Gas lift" systems for immobilized cells fermentations, *Proceedings EBC Symposium Immobilized yeast applications in the brewing industry*, Espoo, Finland, Getränke-Fachverlag, Carl, 24, 125-133.

N. Mensour, A. Margaritis, C. L. Briens, H. Pilkington and I. Russell (1996)

Application of immobilised cells in the brewing industry, *Progress in Biotechnology - Immobilized cells: basics and applications*, 11, 661-671.

A. S. Michaels (1965)

Polyelectrolyte Complexes, *Ind Eng Chem*, 57, 10, 32-40.

M. Moll (1991)

Bières & coolers, *Collection Sciences et Techniques agro-alimentaires*, 516.

M. Moll and B. Duteurtre (1996)

Fermentation and maturation of beer with immobilized microorganisms, *Brauwelt Int*, 3, 14, 248-252.

C. Monnet, P. Schmitt and C. Diviès (1994)

Diacetyl production in milk by an α -acetolactic acid accumulating strain of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Journal of Dairy Science*, 77, 10, 2916-2924.

K. Nakanishi, T. Onaka, T. Inoue and S. Kubo (1985)

A new immobilized yeast system for rapid production of beer, *Proceedings Eur Brew Conv*, Helsinki, Oxford: IRL Press, 331-338.

K. Nakanishi, T. Onaka and T. Inoue (1986)

A new immobilized yeast system for rapid production of beer, *Rep Res Lab Kirin Brew*, 29, 13-16.

K. Nakanishi (1990)

Beer production with immobilized yeast cells, in *Yeast biotechnology and biocatalysis*, 85-102, H. Verachtert and R. De Mot, Marcel Dekker Inc., New York.

V. Nedovic, I. Leskosek-Cukalovic, G. Milosevic and G. Vunjak-Novakic (1997)

Flavour formation during beer fermentations with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in gas-lift bioreactor, *Proceedings International Workshop Bioencapsulation*, Barcelona, 5.3.

K. Nishinari, P. A. Williams and G. O. Phillips (1992)

Review of the physico-chemical characteristics and properties of konjac mannans, *Food Hydrocolloids*, 6, 2, 199-222.

S. Norton and T. D'Amore (1994)

Physiological effects of yeasts cell immobilization: Applications for brewing, *Enzyme Microb Technol*, 16, 365-376.

T. Onaka, K. Nakanishi, T. Inoue and S. Kubo (1985)

Beer brewing with immobilized yeast, *Bio/Technology*, 3, May, 467-470.

E. Pajunen, V. Mäkinenn and R. Gisler (1987)

Secondary fermentation with immobilized yeast, *Proceedings Eur Brew Conv*, Madrid, Oxford: IRL Press, 441-448.

E. Pajunen and A. Jääskelainen (1993)

Synebrychoff Kerava-a brewery for the 90's, *Proceedings Eur Brew Conv*, Oslo, Oxford: IRL Press, 559-567.

E. Pajunen (1995)

Immobilized yeast lager beer maturation: DEAE-cellulose at Synebrychoff, *Proceedings Immobilized yeast applications in the brewing industry*, Espoo, Finland, Getränke-Fachverlag, Carl, 24,

B. Pardonova, M. Polednikova, H. Sedova, M. Kahler and J. Ludvik (1982)

Biokatalysator für die Bierherstellung, *Brauwissenschaft*, 10, 254-258.

D. Poncelet, B. Poncelet De Smet and R. J. Neufeld (1988)

Mass Transfer in Nylon Membrane Bound Microcapsules, *Proceedings 38th Can Chem Eng Conf*, Oct. 2-5, Edmonton, Canada.

D. Poncelet, C. Dulieu and R. Neufeld (1997a)

Encapsulation and immobilisation techniques, in *Handbook of cell encapsulation and therapeutics*, in press, R. Kühtreibern W and Lanza, Birkhäuser ans Springer-Verlag.

D. Poncelet, C. Dulieu and R. Neufeld (1997b)

Fundamentals of the dispersion into bioencapsulation technologies, Proceedings 11th *International Symposium on Microencapsulation*, Bangkok, Thailand, in press.

D. Poncelet, V. Babak, C. Dulieu and A. Picot (1997c)

Production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation, Proceedings 2nd *World Congress on Emulsion*, Bordeaux, France, in press.

U. Prusse, F. Bruske, J. Bredford and K. D. Vorlop (1996)

A new encapsulation method, Proceedings *International Workshop Bioencapsulation V*, Potsdam, Germany, T7.

B. Rostgaard Jensen, I. Svenden and M. Ottesen (1987)

Isolation and characterization of an alpha-acetolactate decarboxylase useful for accelerated beer maturation, Proceedings *Eur Brew Conv*, Madrid, Oxford: IRL Press, 393-400.

L. Ruhaut, J.-Y. Barbeau, M. Shingleton and I. Marc (1993)

Comparaison de divers supports d'immobilisation cellulaire, Proceedings *Eur Brew Conv*, Oslo, Oxford: IRL Press, 315-322.

D. Ryder and C. A. Masschelein (1985)

The growth process of brewing yeast and technological challenge, *J Am Soc Brew Chem*, 43, 66-75.

F. Savart (1833)

Annales de Chimie, 53, 337.

L. M. Sayre and F. R. Jensen (1978)

Novel decarboxylative oxidation of α -hydroxy- β -keto (or β -imino) acid salts of mercury (II), *J Org Chem*, 43, 25, 4700-4705.

W. Schlameus (1995)

Centrifugal extrusion encapsulation, in *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, 590, 96-103, S. J. Risch and G. A. Reineccius, ACS Symposium Series, Amer Chemical Soc, 1155 Sixteenth St NW, Washington, DC 20036.

J. A. Scott and A. M. O'Reilly (1995)

Use of a flexible sponge matrix to immobilize yeast for beer fermentation, *ASBC Journal*, 53, 67-71.

S. Shindo and M. Kamimura (1990)

Immobilization of yeast with hollow PVA gel beads, *J Ferment Bioeng*, 70, 232-234.

S. Shindo, H. Sahara, S. Koshino and H. Tanaka (1993)

Control of diacetyl precursor [α -actolactate] formation during alcohol fermentation with yeast cell immobilized in alginate fibers with double gel layers, *J Ferment Bioeng*, 76, 3, 199-202.

J. C. Slaughter (1994)

New prospects for use of enzymes in brewing, *Ferment*, 7, 3, 185-188.

H. Sone, T. Fuji, K. Kondo and J.-I. Tanaka (1987)

Molecular cloning of the gene encoding alpha-acetolactate decarboxylase from *Enterobacter aerogenes*, *J Biotechnol*, 5, 87-91.

R. Souverain (1992)

Chap. 1 - Définitions et classement (des additifs et auxiliaires technologiques), in *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agro-alimentaires*, 3-31, J. L. Multon, Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

M. L. Suihko, M. Penttilä, H. Sone, S. Home, K. Blomqvist, J. Tanaka, T. Inoue, et al. (1989)

Pilot-brewing with alpha-acetolactate decarboxylase active yeasts, *Proceedings Eur Brew Conv*, Zurich, Oxford: IRL Press, 483-490.

I. Svendsen, B. R. Jensen and M. Ottesen (1989)

Complete amino acid sequence of alpha-acetolactate decarboxylase from *Bacillus subtilis*, *Carlsberg Res Commun*, 54, 157-163.

S. Tada, T. Takeuchi, H. Sone, S. Yamano, M. Schofield, J. Hammond and T. Inoue (1995)

Pilot-scale brewing with industrial yeasts which produce the alpha-acetolactate decarboxylase of *Acetobacter aceti* ssp. *xylinum*, *Proceedings Eur Brew Conv*, Brussels, Oxford: IRL Press, 369-377.

L. Van De Winkel and L. De Vuyst (1997)

Immobilized yeast cell systems in today's breweries and tomorrow's, *Cerevisia*, 1, 27-31.

J. van Strien (1987)

Direct measurement of the oxidation-reduction condition of wort and beer, *ASBC Journal*, 45, 2, 77-79.

K. D. Villanueva, E. Goossens and C. A. Masschelein (1990)

Subthreshold vicinal diketone levels in lager brewing yeast fermentations by means of ILV5 gene amplification, *ASBC Journal*, 48, 3, 111-114.

C. Walsh (1979)

Chap. 21 Enzyme-catalysed decarboxylations, in *Enzyme reaction mechanisms*, 669-702, W. H. Freeman, San Francisco, CA.

F. H. White and A. D. Portno (1978)

Continuous fermentation by immobilized brewers yeast, *J Inst Brew*, 84, 228-230.

S. Yamano, K. Kondo, J. Tanaka and T. Inoue (1994)

Construction of a brewer's yeast having α -acetolactate decarboxylase gene from *Acetobacter aceti* ssp. *xylinum* integrated in genome, *J Biotechnol*, 32, 173-178.

S. Yamano, K. Tomizuka, H. Sone, M. Imura, T. Takeuchi, J. Tanaka and T. Inoue (1995)

Brewing performance of a brewer's yeast having α -acetolactate decarboxylase from *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*, *J Biotechnol*, 39, 21-26.

Y. Yamauchi, T. Okamoto, H. Murayama, A. Nagara, T. Kashiwara, M. Yoshida and K. Nakanishi (1995a)

Rapid fermentation of beer using an immobilized yeast multistage bioreactor system

1- Balance control of extract and amino acid uptake, *Appl Biochem Biotechnol*, 53, 245-259.

Y. Yamauchi, T. Okamoto, H. Murayama, A. Nagara, T. Kashiwara, M. Yoshida and K. Nakanishi (1995b)

Rapid fermentation of beer using an immobilized yeast multistage bioreactor system

2- Control of minor products of carbohydrate metabolism, *Appl Biochem Biotechnol*, 53, 261-276.

Y. Yamauchi, T. Okamoto, H. Murayama, A. Nagara, T. Kashiwara, M. Yoshida and K. Nakanishi (1995c)

Rapid fermentation of beer using an immobilized yeast multistage bioreactor system

3- Control of sulfite formation, *Appl Biochem Biotechnol*, 53, 277-283.

Y. Yamauchi and T. Kashiwara (1995d)

Kirin immobilized system, *Proceedings Immobilized yeast applications in the brewing industry*, Espoo, Finland, Getränke-Fachverlag, Carl, 24, 99-117.

Sommaire

Chapitre 3 : Matériels & méthodes

1. Acétolactate, acétoïne et diacétyle.....	3-2
1.1. Dosage de l'acétoïne par chromatographie en phase gazeuse.....	3-2
1.2. Dosage spectrophotométrique de l'acétoïne.....	3-4
1.2.1. Procédure Novo Nordisk.....	3-4
1.2.2. Procédure adaptée à notre étude.....	3-4
1.3. Dosage de l'acétolactate.....	3-5
1.3.1. Procédure.....	3-5
1.3.2. Produits de décarboxylation de l'acétolactate.....	3-5
2. Synthèse de l'acétolactate.....	3-6
2.1. Procédure de synthèse de l'acétolactate Novo Nordisk.....	3-6
2.2. Suivi de saponification par titrimétrie.....	3-6
2.3. Suivi de saponification par dosage de l'acétolactate.....	3-7
2.4. Procédure adapté à notre étude	3-7
3. Mesure de l'activité acétolactate décarboxylasique.....	3-7
3.1. Procédure Novo Nordisk.....	3-8
3.2. Procédure améliorée pour notre étude.....	3-8
3.3. Mesure des paramètres cinétiques.....	3-9

3.4. Études de stabilité des enzymes encapsulées.....	3-10
4. Fabrication de billes d'alginate recouvertes de poly(éthylène imine).....	3-10
4.1. L'alginate.....	3-11
4.2. La poly(éthylène imine).....	3-11
4.3. Procédure.....	3-12
4.3.1. Fabrication des billes.....	3-12
4.3.2. Imprégnation des billes.....	3-12
5. Fabrication de billes de poly(vinyl caprolactame)/alginate.....	3-13
5.1. Le poly(vinyl caprolactame).....	3-13
5.2. Procédure.....	3-14
6. Fabrication de capsules de complexes polyélectrolytes.....	3-15
6.1. Polymères utilisés pour les capsules de complexes polyélectrolytes.....	3-15
6.2. Procédure.....	3-16
6.3. Mesure de la viscosité dynamique du sulfate de cellulose.....	3-17
7. Caractérisation des capsules de complexes polyélectrolytes.....	3-17
7.1. Observation microscopique.....	3-17
7.2. Mesures de masse.....	3-18
7.2.1. Masse moyenne.....	3-18
7.2.2. Estimation du pourcentage de rétraction.....	3-18
7.3. Dosage du taux de conversion du sulfate de cellulose.....	3-18

7.4. Mesure de distribution de tailles.....	3-19
<i>7.4.1. Principe du granulomètre.....</i>	<i>3-19</i>
<i>7.4.2. Conformation de l'appareil.....</i>	<i>3-20</i>
<i>7.4.3. Paramètres calculés par le logiciel.....</i>	<i>3-20</i>
7.5. Modélisation de la fermentation de la bière.....	3-21
8. Récapitulatif des produits utilisés.....	3-21



Matériels & méthodes

Ce chapitre a pour objet de décrire les matériels, les produits et les méthodes utilisés au cours de ce travail de doctorat. Certaines procédures ont été améliorées ; les travaux justifiant les changements sont présentés au Chapitre 4 "Résultats et discussion".

Pour réaliser les mesures d'activité de l'acétolactate décarboxylase, il est nécessaire de doser l'acétolactate, l'acétoïne, et la somme acétoïne + diacétyle. Nous allons décrire ces méthodes de dosage. D'autre part, l'acétolactate doit être synthétisé pour pouvoir servir de substrat à l'acétolactate décarboxylase (mesures d'activité).

L'encapsulation de l'acétolactate décarboxylase a été envisagée par plusieurs approches : l'inclusion en billes de gel d'alginate ou de poly(vinyl caprolactame), et l'emprisonnement dans des capsules de complexes polyélectrolytes.

Enfin l'utilisation des capsules d'acétolactate décarboxylase dans la bière pour accélérer la maturation a été modélisée.

1. Acétolactate, acétoïne et diacétyl

1.1. Dosage de l'acétoïne par chromatographie en phase gazeuse

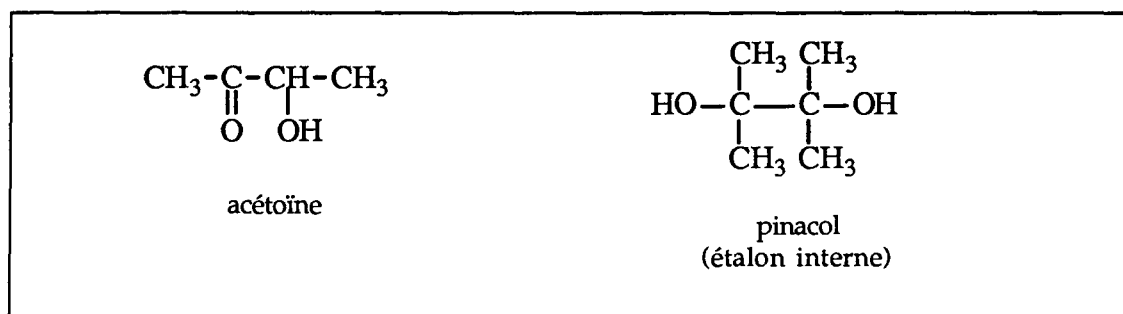
L'acétoïne peut être dosée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) dès lors qu'il n'y a pas d'acétolactate dans le milieu. Si de l'acétolactate est présent, il est dégradé en acétoïne en passant dans l'injecteur, d'où une surestimation.

Le chromatographe utilisé est un CP2001 de chez Chrompack, relié à un ordinateur PC équipé du logiciel d'analyse de chromatogrammes Maestro. La colonne utilisée est une colonne capillaire dont le groupement actif est un polyéthylène glycol de poids moléculaire 20 000 (Carbowax 20 M Ohio Valley, 30 m x 0,25 mm, épaisseur 0,5 µm).

Un microlitre de solution aqueuse contenant l'acétoïne et l'étalon interne en concentration connue est injecté manuellement. L'analyse est faite avec de l'azote comme gaz vecteur et avec un courant de fuite (25 ml/min).

La gamme étalon est réalisée avec des solutions aqueuses d'acétoïne commerciale (Fluka), de 0 à 5 µM. L'étalon interne choisi est le pinacol (Aldrich) à 1,7 g/l dans les solutions injectées.

Figure 3.1 Représentation de l'acétoïne et du pinacol



La colonne doit être conditionnée régulièrement ; en routine elle est conditionnée chaque nuit. L'analyse et le conditionnement sont faits selon les programmes de températures donnés dans le tableau suivant.

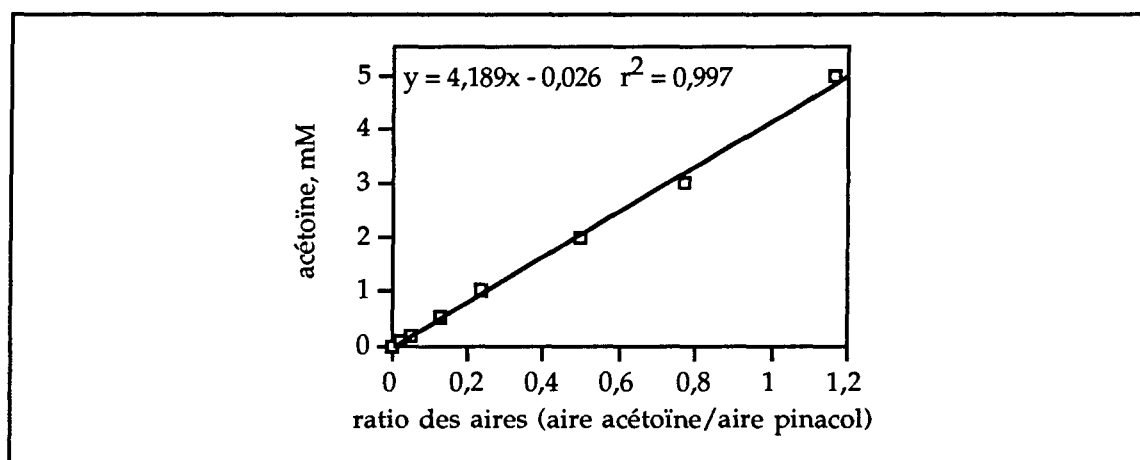
Tableau 3.1 Programme de température pour le dosage de l'acétoïne en CPG

	pour le dosage de l'acétoïne	pour le conditionnement	unités
température limite	240	240	°C
température du détecteur	220	220	°C
température de l'injecteur	190	190	°C
température de départ	80	80	°C
température finale	180	230	°C
vitesse de chauffe	13	1	°C/minute
durée du palier de départ	1.5	1	minutes
durée du palier final	1	1	minutes
durée de stabilisation	1	1	minutes
nombre de cycles	1	10	-

Avec cette procédure d'analyse, le temps de rétention de l'acétoïne est de 5,36 minutes, et celui du pinacol de 7,32 minutes.

Le logiciel d'analyse des chromatogrammes nous donne le rapport des quantités acétoïne (mM)/pinacol (g/l). La gamme étalon suivante nous permet de calculer la quantité d'acétoïne dans l'échantillon.

Figure 3.2 Gamme étalon du dosage de l'acétoïne en CPG



1.2. Dosage spectrophotométrique de l'acétoïne

Le principe du dosage spectrophotométrique de l'acétoïne a été publié par Westerfeld en 1945 [Westerfeld, W. W., 1945]. La réaction a été découverte par Voges et Proskauer en 1898, mais les réactions impliquées ne sont à l'heure actuelle toujours pas élucidées. Le diacétyl et l'acétoïne réagissent avec un groupement guanidine en présence d'une base, pour donner un complexe coloré rose. Par une lecture d'absorbance à 525 nm après 40 minutes de coloration, on obtient la quantité d'acétoïne dans l'échantillon.

1.2.1. Procédure Novo Nordisk

A 400 μ l d'échantillon sont ajoutés 4,6 ml d' α -naphtol 1% et de créatine 0,1% en solution NaOH 1 M. Ce réactif doit être protégé de la lumière, et utilisé dans les 4 heures suivant sa préparation. L'absorbance des tubes à 525 nm est lue après 40 minutes de développement de la coloration.

La gamme étalon est réalisée avec de l'acétoïne commerciale en solution aqueuse, jusqu'à 800 μ M.

1.2.2. Procédure adaptée pour notre étude

Deux virgule cinq millilitres de réactif coloré (α -naphtol 1%, créatine 0,1% en milieu soude 1 M) fraîchement préparé sont distribués dans des cuves pour spectrophotomètre (contenance 3,3 ml, une cinquantaine de cuves par série de mesures). Ces cuves sont maintenues à l'abri de la lumière, et le réactif coloré ne doit plus être utilisé au-delà de 4 heures après sa préparation.

A intervalles de 30 secondes, 200 μ l des solutions contenant l'acétoïne à doser sont ajoutés au réactif coloré. Les cuves sont recouvertes avec du film plastique puis agitées par retournement. L'absorbance à 525 nm est lue après exactement 40 minutes de développement de la coloration.

La gamme étalon est réalisée avec de l'acétoïne commerciale en solution aqueuse, jusqu'à 800 μ M. Ces solutions peuvent être utilisées jusqu'à un mois après leur fabrication si elles sont stockées à +5°C.

Afin de minimiser l'effet du vieillissement du réactif coloré, les séries de dosage comportent toujours deux mesures de la gamme étalon, une en début et une en fin de série. C'est la moyenne qui est ensuite prise en compte.

Toutes les mesures sont corrigées de la décarboxylation spontanée de l'acétolactate.

1.3. Dosage de l'acétolactate

L'acétolactate est dosé pour suivre l'évolution de sa synthèse (voir le point 2.3) ou en routine pour vérification de la procédure de préparation.

Il s'agit de doser l'acétoïne et le diacétyl formés par décarboxylation de l'acétolactate à chaud en milieu acide.

1.3.1. Procédure

A un volume d'acide sulfurique 2% est ajouté un volume d'échantillon contenant l'acétolactate à doser. Les tubes hermétiquement clos sont chauffés dans un bain à 60°C pendant 15 minutes puis refroidis sous l'eau courante. Ces milieux sont dilués 21 fois avec de l'eau distillée. La concentration en acétoïne + diacétyl est déterminée selon la méthode de Westerfeld (décrite au point 1.2.2).

1.3.2. Produits de décarboxylation de l'acétolactate

L'acétolactate est déterminé par dosage de l'acétoïne et du diacétyl formés après décarboxylation en milieu acide et à chaud. La répartition entre le diacétyl et l'acétoïne n'est jamais mentionnée dans la littérature. Nous avons mesuré cette répartition.

Des prélèvements de milieux de saponification sont soumis au dosage de l'acétolactate comme décrit ci-avant. Sur les mêmes échantillons l'acétoïne est déterminé par chromatographie en phase gazeuse. Ces valeurs sont corrigées de l'acétoïne et du diacétyl présents initialement dans le milieu de saponification.

2. Synthèse de l'acétolactate

La base de notre travail est la procédure décrite dans la fiche technique Novo Nordisk [Fiche technique Novo Nordisk, 1989]. Cette procédure a été optimisée (voir Chapitre 4 "Résultats & discussion"), grâce au suivi de la saponification :

- par titrimétrie,
- par dosage de l'acétolactate.

2.1. Procédure de synthèse de l'acétolactate Novo Nordisk

L' α -acétolactate est préparé par saponification d'un diester, l'éthyl 2-acétoxy 2-méthylacétoacétate. Six millilitres de NaOH 0,5 M sont ajoutés à 100 μ l de diester. Après 20 minutes de saponification sous agitation, 40 ml de tampon MES (acide morpholino-éthane sulfonique) à pH 6 sont introduits. Le pH est ajusté à 6,00 $\pm$ 0,05 avec de l'HCl 0,5 M sous agitation. Le volume est ensuite ajusté à 50 ml avec du tampon.

Ce substrat doit être préparé juste avant utilisation et ne peut être conservé.

2.2. Suivi de saponification par titrimétrie

Pour optimiser la préparation de l'acétolactate, la saponification a été suivie par titrimétrie. En effet, pendant la saponification le milieu tend à s'acidifier par libération d'acide acétique. Le pH du milieu réactionnel est maintenu constant par ajout de soude grâce à un titrateur automatique (Titroline Alpha Schott).

Dans un réacteur adapté au titrateur automatique, 100 μ l d'éthyl 2-acétoxy 2-méthylacétoacétate (diester) sont ajoutés à 10 ml de soude préalablement titrée à 10, 100 ou 180 mM. Le titrateur est programmé pour maintenir le pH à sa valeur initiale grâce à une solution de soude titrée.

La quantité de NaOH titrant nous donne le rendement de transformation du diester en acétolactate.

$$\text{Rendement théorique (\%)} = \frac{\text{NaOH ajouté}}{2 \times \text{diester au départ}}$$

2.3. Suivi de saponification par dosage de l'acétolactate

La cinétique de formation de l'acétolactate a été vérifiée par dosage extemporané sur des prélèvements du milieu réactionnel. Les valeurs sont corrigées de l'acétoïne et du diacétyle présents au départ. Elles sont exprimées en rendement de conversion :

$$\text{Rendement de conversion (\%)} = \frac{\text{acétolactate formé}}{\text{diester au départ}}$$

2.4. Procédé adapté à notre étude

La synthèse d' α -acétolactate est menée à 10°C. Cent microlitres d'éthyl 2-acétoxy 2-méthylacétoacétate sont ajoutés à 10 ml de soude 180 mM dans un récipient pouvant être fermé. Après 20 minutes sous agitation magnétique, la réaction de saponification est arrêtée par ajout de 20 ml de tampon maléate 100 mM pH 6,0. Enfin 3,5 ml d'acide maléique 100 mM sont ajoutés. Cette solution d'acétolactate 15,4 mM à pH 6,0 doit être préparée de façon extemporanée.

3. Mesure de l'activité acétolactate décarboxylasique

L'évaluation de la quantité d'acétolactate décarboxylase est toujours réalisée par mesure d'activité. La linéarité entre la mesure d'activité et la quantité d'enzyme présente a été vérifiée sur des solutions d'enzyme libre.

Un dosage classique des protéines ne permet pas d'évaluer la quantité d'acétolactate décarboxylase, en raison des quantités très faibles utilisées, et de l'interférence du tampon dans ces types de dosages (mesure d'absorbance en ultraviolet à 280 et 205 nm, dosage de Folin-Lowry, dosage de Bradford, et dosage à l'acide bicinchoninique).

3.1. Procédure Novo Nordisk

Substrat

La synthèse de l' α -acétolactate selon la procédure Novo Nordisk est décrite au point 2.1..

Réaction enzymatique

La réaction enzymatique est menée en milieu non agité, à 30°C, pH 6, pendant 20 minutes. Le substrat est dilué dans un tampon MES (acide morpholino-éthane sulfonique) 50 mM pH 6, tandis que l'enzyme est dans un tampon MES 50 mM, Brij 35 0,05%, NaCl 600 mM pH 6,0. La réaction enzymatique est arrêtée par ajout d'un réactif alcalin, et correspond aussi au démarrage de la réaction colorée.

Réaction colorée

La réaction colorée selon la procédure Novo Nordisk est décrite au point 1.2.1..

3.2. Procédure améliorée pour notre étude

Substrat

La synthèse de l' α -acétolactate a fait l'objet d'une étude décrite au Chapitre 4 "Résultats et discussion". En routine, 100 μ l d'éthyl 2-acétoxy 2-méthylacétoacétate (540 μ mol) sont ajoutés à 10 ml de NaOH 180 mM. La saponification a lieu sous agitation à 10°C. Au bout de 20 minutes, 20 ml de tampon maléate 100 mM pH 6,0 sont ajoutés, puis 3,5 ml d'acide maléique 100 mM. Cette solution tamponnée à 15,4 mM d'acétolactate constitue le substrat de la réaction enzymatique.

Réaction enzymatique

La réaction enzymatique est menée en tubes fermés, agités sur une plaque d'agitation (IKA KS 125, agitation en va-et-vient), à 10°C (chambre thermostatée), pH 6, pendant 20 minutes. Les conditions correspondent à un excès de substrat : 20% au maximum est transformé par l'enzyme au cours des 20 minutes de réaction.

Les échantillons dont l'activité doit être mesurée sont distribués dans les réacteurs à hauteur de 300 μ l (ou 0,3 g le cas échéant) :

- solution d'acétolactate décarboxylase (200 μ g/ml pour l'enzyme Fluka, dissoute dans du tampon maléate 100 mM pH 6,0),
- tampon pour les blancs-substrat (correction de la décarboxylation spontanée de l'acétolactate),
- capsules (environ exactement 0,3 g),
- suspension de capsules désagrégées (environ exactement 0,3 g),
- autres solutions : surnageant de stockage des capsules, solutions de sulfate de cellulose contenant l'enzyme ayant servi à la préparation des capsules.

La réaction enzymatique est arrêtée par ajout de 3 ml de soude 2,5 M, suivi d'une agitation vigoureuse. Cette opération dissout les capsules. Dans le cas des mesures de stabilité sur une longue période les mesures ont été faites sans dénaturer les capsules. Pour cela, 500 μ l de milieu réactionnel est prélevé après 20 minutes de réaction enzymatique. Le prélèvement est délicat car il ne doit pas comporter de capsules. Il est immédiatement transvasé dans un microtube contenant déjà 500 μ l de soude 2,5 M et est agité.

Ces milieux réactionnels dont l'activité enzymatique a été stoppée par alcalinisation peuvent être conservés jusqu'à une heure avant le dosage de l'acétoïne.

Réaction colorée

La réaction colorée est réalisée comme décrit au point 1.2.2..

3.3. Mesure des paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques de l'acétolactate décarboxylase ont été déterminés pour les besoins de l'étude de modélisation.

Sept réacteurs correspondant à 7 concentrations en acétolactate entre 0 et 20 mM ont été menés de front (acétolactate décarboxylase 1 μ g/ml dans chaque réacteur, pH 4,6, température 10°C). Les mesures de l'acétoïne formé sont faites au cours du temps sur 40 minutes. Les droites obtenues permettent de calculer les vitesses de

décarboxylation enzymatique en μ moles d'acétoïne formées par minute et par mg d'enzyme dans les conditions de l'expérience.

3.4. Études de stabilité des enzymes encapsulées

La stabilité de l'activité des enzymes encapsulées a été menée dans différentes conditions de pH et de température. Pour cela, les échantillonnages sont réalisés immédiatement après la fabrication. Trois cent milligrammes de capsules sont placés dans des tubes pouvant être bouchés hermétiquement, auxquels on ajoute 300 μ l de surnageant (bière dégazée ou tampon). Le mélange de sulfate de cellulose et d'enzyme ayant servi à fabriquer les capsules, ainsi que la suspension obtenue en désagrégeant des capsules dans un mortier avec 3 fois leur volume de tampon sont aussi échantillonnés par 300 mg. Une solution d'enzyme libre à 200 μ g/ml dans du milieu de stockage est placée dans les mêmes conditions pour comparaison. Le stockage est réalisé en chambre thermostatée à 5°C ou 15°C.

Le jour du dosage, les mesures d'activité sont réalisées sur 3 échantillons pour chaque catégorie. Le surnageant des capsules est soigneusement retiré à la micropipette avant la mesure, et subit lui-même une mesure d'activité.

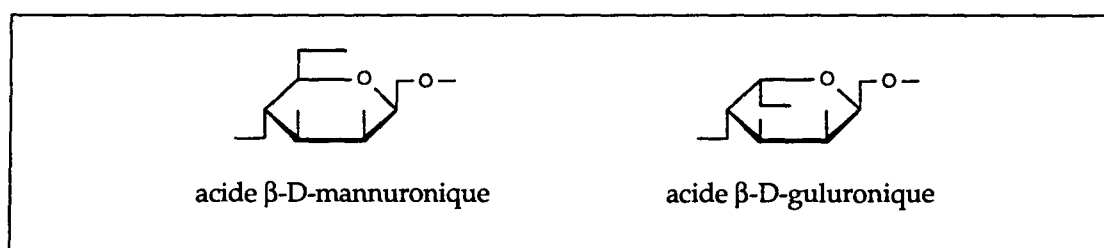
Dans le cas de mesures non destructives, les capsules sont débarrassées du milieu réactionnel résiduel à la micropipette. Elles sont ensuite rincées 3 fois avec 10 fois leur volume de milieu de stockage, avant d'être replacées dans les conditions du test.

4. Fabrication de billes d'alginate recouvertes de poly(éthylène imine)

4.1. L'alginate

L'alginate est un polysaccharide extrait d'algues. Il est constitué d'acide guluronique (G) et mannuronique (M) liés en β (1-4) et organisés en chaînes. Ces chaînes contiennent des blocs homogènes (M-M-M-M ou G-G-G-G) ou des motifs alternés (M-G-M-G). L'alginate gélifie en présence d'ions divalents comme le calcium.

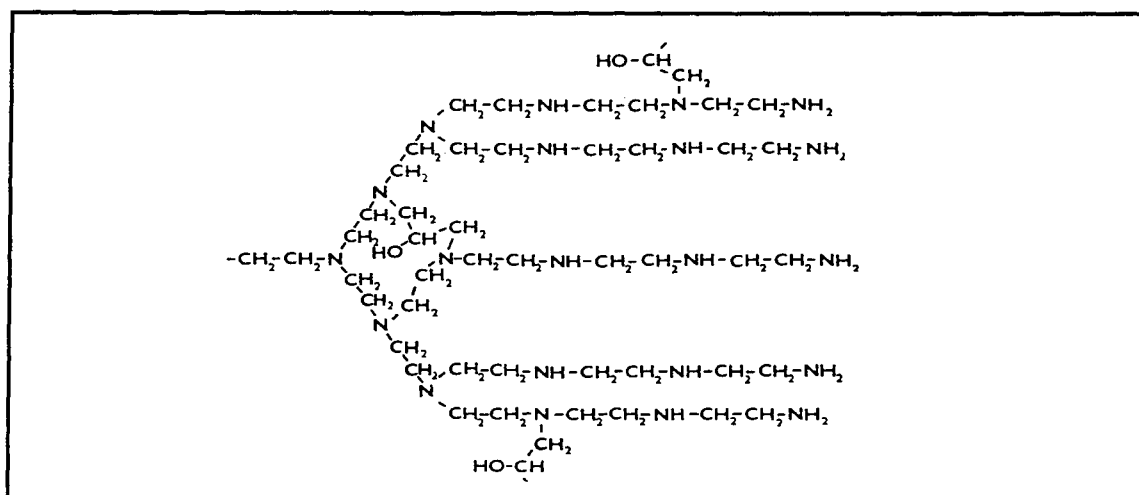
Figure 3.3 Structure chimique des constituants de l'alginate



4.2. La poly(éthylène imine)

La poly(éthylène imine) possède une structure très ramifiée. Du fait de ses nombreux groupements amines primaires, elle est facilement chargée positivement.

Figure 3.4 Structure chimique de la poly(éthylène imine) [Zemek, J. *et al.*, 1982]



4.3. Procédure

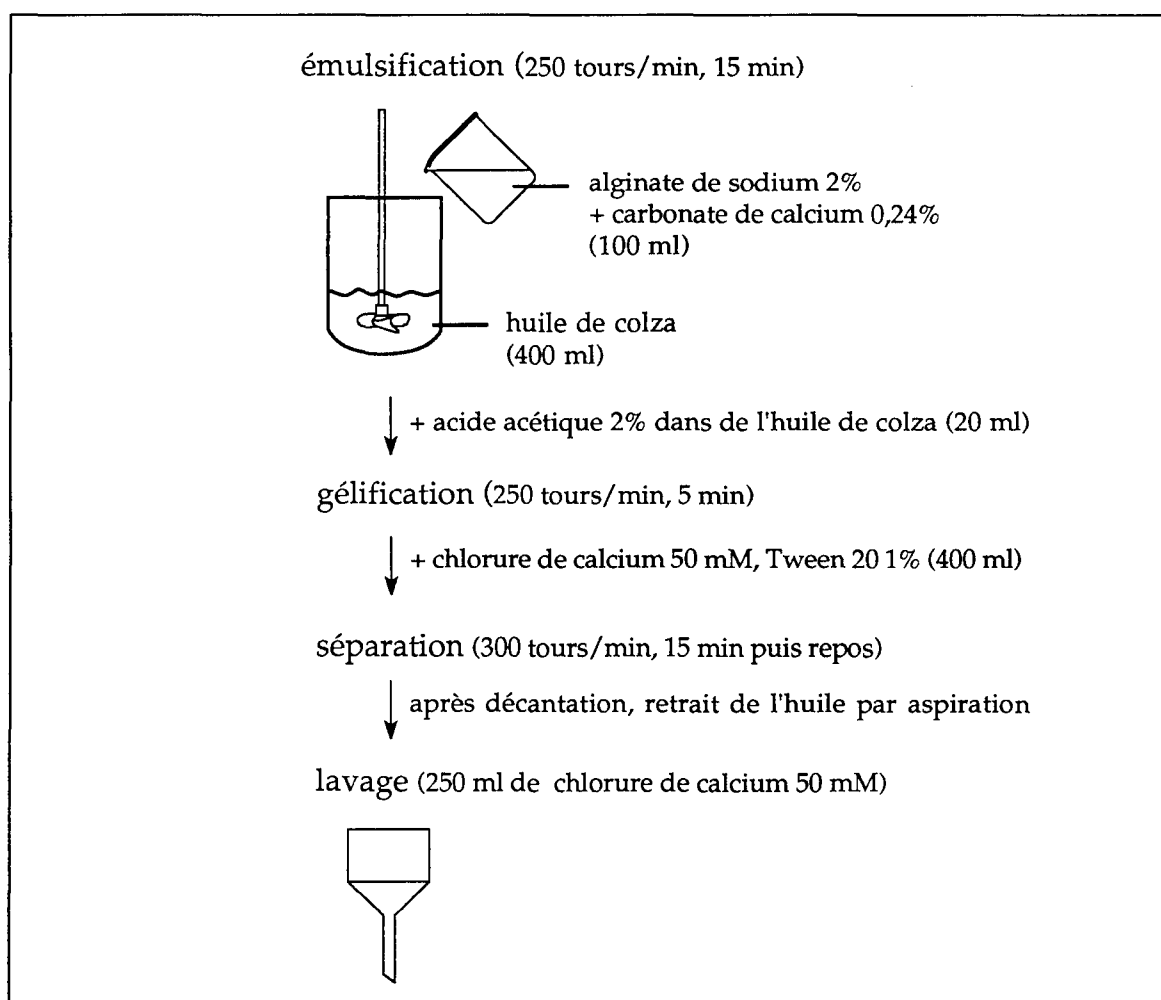
4.3.1. Fabrication des billes

Le principe de fabrication des billes d'alginate par émulsification est présenté dans la figure suivante [Poncelet, D. *et al.*, 1992]. Il consiste à émulsionner une solution d'alginate de sodium (Satialgine SG 300, SKW Biosystems) contenant du carbonate de calcium (Omya Setacarb 6 à granulométrie contrôlée) dans une huile végétale (huile de colza alimentaire). Habituellement cette solution d'alginate contient aussi l'entité à encapsuler, mais pas dans le cas de notre étude puisque les billes seront imprégnées dans un deuxième temps. La gélification de l'alginate est obtenue par addition d'acide acétique (acide acétique glacial Fluka) dissout dans de l'huile. En effet, l'acide libère les ions calcium du carbonate, et induit la gélification de l'alginate. Il s'agit d'une gélification interne car les ions calcium sont libérés *in situ*. Les gouttelettes gélifiées sont extraites de la phase hydrophobe par ajout d'une solution aqueuse de chlorure de calcium 50 mM, Tween 20 1% (CaCl₂ Sigma, Tween 20 Aldrich) [Poncelet, D. *et al.*, 1997]. Ces billes d'alginate sont ensuite imprégnées par une solution d'enzyme.

4.3.2. Imprégnation des billes

Dix grammes de billes d'alginate sont placés dans une solution tamponnée d'enzyme (20 ml contenant 300 µl de Maturex L) sous agitation et à 5°C. Après 12 heures d'imprégnation, les billes sont égouttées, et immédiatement transférées dans 100 ml de poly(éthylène imine) 0,25% (Fluka). Après 30 minutes sous agitation, les billes sont égouttées et rincées au chlorure de calcium 50 mM.

Figure 3.5 Fabrication de billes d'alginate par émulsification

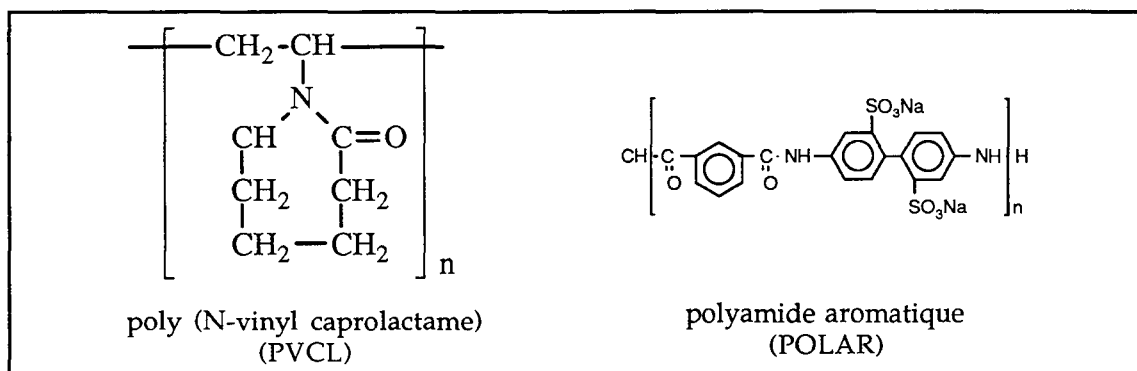


5. Fabrication de billes de poly(vinyl caprolactame)/alginate

5.1. Le poly(vinyl caprolactame)

Le poly(vinyl caprolactame) (PVCL) est un polymère qui gélifie par chauffage. Il est utilisé pour l'encapsulation de cellules fragiles comme les cellules hybridomes, ou d'enzymes. L'encapsulation de la trypsine et de la carboxypeptidase B par ce polymère a donné des résultats prometteurs [Markvicheva, E. A. *et al.*, 1994]. Nous avons donc mené l'étude d'immobilisation d'acétolactate décarboxylase avec ce polymère. Il nécessite l'ajout d'un polyamide aromatique (POLAR) qui stabilise le gel à température ambiante.

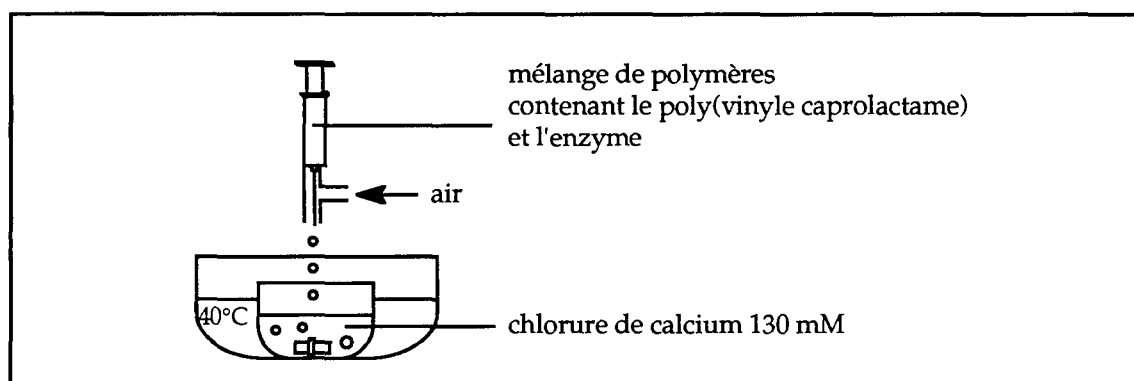
Figure 3.6 Structure chimique du poly(vinyl caprolactame) et du polyamide aromatique



5.2. Procédure

Les billes de poly(vinyl caprolactame) sont fabriquées par extrusion avec un jet d'air coaxial. Les gouttes de mélange de polymères sont extrudées dans un bain de chlorure de calcium chauffé à 40°C. L'extrusion est accompagnée d'un jet d'air coaxial dans le but de diminuer la taille des gouttes.

Figure 3.7 Dispositif de fabrication des billes de poly(vinyl caprolactame)



Les solutions utilisées sont les suivantes :

- acétolactate décarboxylase 0,6 mg/ml de tampon acétate pH 6,0,
- poly(vinyl caprolactame) (PVCL) 10%,
- polyamide aromatique (POLAR) 1%,
- ovalbumine 7 mg/ml,
- alginate 2%,
- chlorure de calcium 130 mM.

Le mélange de polymères doit être fait selon cette chronologie : solution de PVCL (1 ml), d'ovalbumine (0,4 ml), de POLAR (0,1 ml), et d'enzyme (0,1 ml). On y ajoute en dernier lieu la solution d'alginate (2,5 ml) et on extrude ce mélange 10 cm au-dessus du bain de CaCl_2 (50 ml) à 40°C.

Après extrusion, les billes séjournent 45 minutes dans le bain de durcissement sous agitation et à 40°C avant d'être rincées avec 100 ml de tampon acétate pH 6,0.

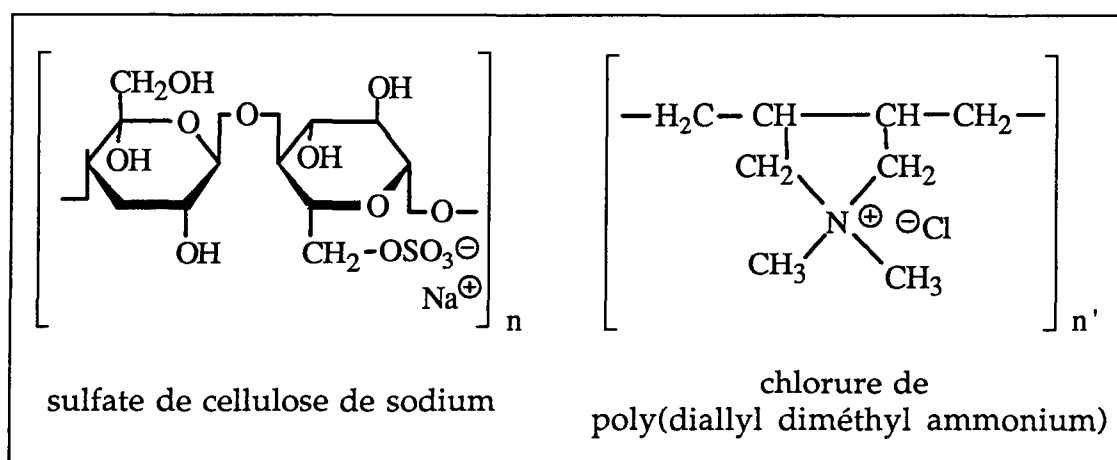
Les billes obtenues sont sphériques, et font entre 0,8 et 1 mm de diamètre. Elles sont blanches à 50°C mais deviennent totalement transparentes après refroidissement.

6. Fabrication de capsules de complexes polyélectrolytes

6.1. Polymères utilisés pour les capsules de complexes polyélectrolytes

Les polymères utilisés pour fabriquer les capsules de complexes polyélectrolytes sont le sulfate de cellulose (polymère anionique) et le poly(diallyl diméthyl ammonium) (polymère cationique). Ces polymères ont été décrits pour l'encapsulation de composés biologiques dès 1985 [Dautzenberg, H. *et al.*, 1985].

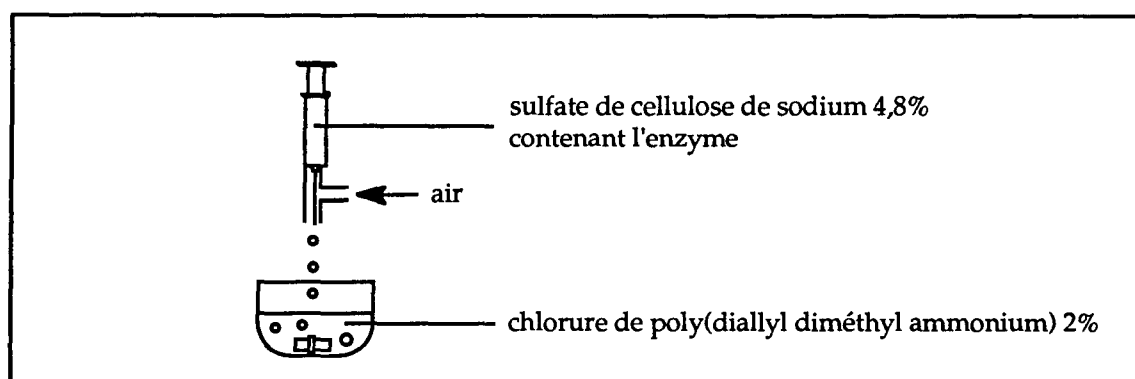
Figure 3.8 Structures chimiques du sulfate de cellulose et du poly(diallyl diméthyl ammonium)



6.2. Procédure

Les capsules sont fabriquées par extrusion de la solution de polymère anionique (sulfate de cellulose de sodium 4,8%) contenant l'enzyme (200 µg/ml) dans un bain de polymère cationique (chlorure de poly(diallyl diméthyl ammonium) 2%). Une membrane de complexe insoluble se forme instantanément à la surface des gouttes. La réaction de complexation, c'est-à-dire l'épaississement de la membrane, se poursuit aussi longtemps que le polymère cationique peut migrer vers l'intérieur des capsules.

Figure 3.9 Dispositif de fabrication des capsules de complexes polyélectrolytes



Les capsules en formation doivent séjourner 10 minutes dans le bain de polymère cationique (bain de complexation). Lors de la fabrication de lots importants, l'extrusion doit être poursuivie pendant 20 à 30 minutes, c'est pourquoi plusieurs bains sont préparés.

Après 10 minutes de complexation, les capsules sont extraites du bain par filtration sur un tamis (pores 600 et 800 µm) et immédiatement rincées à l'eau distillée sous un jet de pissette.

6.3. Mesure de la viscosité dynamique du sulfate de cellulose

La viscosité dynamique de solutions de sulfate de cellulose a été mesurée grâce un appareil Carri-Med à dispositif cône-plan, en écoulement. Les caractéristiques sont données dans le tableau suivant.

Tableau 3.2 Paramètres utilisés pour la mesure de viscosité dynamique du sulfate de cellulose

température initiale et finale	20°C
temps de montée, d'attente et de descente	30 s
temps de palier	0 s
couple maximal	400 $\mu\text{N/s}$
contrainte maximale	238 N.m^{-2}
variation de contrainte	linéaire

7. Caractérisation des capsules de complexes polyélectrolytes

7.1. Observation microscopique

Les capsules sont observées en microscopie optique (microscope DMRB, Leica, Allemagne). Les images présentées au Chapitre 4 "Résultats et discussion" ont été prises par une caméra (CCD monochrome COHU, San Diego, USA) à temps d'intégration programmable. Elle est reliée à un PC Compaq 386 par l'intermédiaire d'une carte Cyclope (Digital Vision Technologies, Toulouse). Le logiciel permettant de piloter la caméra et d'extraire des images en format .TIF a été développé au Laboratoire de Microbiologie Industrielle (aujourd'hui Laboratoire des Fermentations Bioconversions Industrielles) de l'ENSAIA [Drouin, J.-F. *et al.*, 1997]. L'étalon est obtenu grâce à une lame micro-graduée, dont l'image est prise dans les mêmes conditions.

Pour visualiser l'épaisseur des membranes, des capsules ont été sectionnées à la lame de rasoir.

7.2. Mesures de masse

7.2.1. Masse moyenne

La masse moyenne des capsules est mesurée pour chaque lot fabriqué. Pour cela, une cinquantaine de capsules égouttées sont placées sur un morceau de papier aluminium préalablement taré. Les capsules sont ensuite rapidement pesées (balance de précision) et comptées. L'opération est renouvelée 4 fois (5 pesées au total) et la masse moyenne est calculée.

Le diamètre des capsules est estimé à partir des masses moyennes en assimilant les capsules à des sphères et avec l'hypothèse d'une densité unitaire. Cette estimation a pour seul intérêt de comparer les lots entre eux avant les mesures précises au granulomètre laser.

$$d \text{ (mm)} = \sqrt[3]{\frac{6 \times m \text{ (mg)}}{\pi}}$$

7.2.2. Estimation du pourcentage de rétraction

L'estimation du pourcentage de rétraction est réalisée par pesée.

La masse des gouttes en sortie de seringue est mesurée par pesée comme décrit précédemment. Elle est assimilée à une masse initiale des capsules. Le rapport entre les masses finales et initiales nous donne la rétraction des capsules.

7.3. Dosage du taux de conversion du sulfate de cellulose

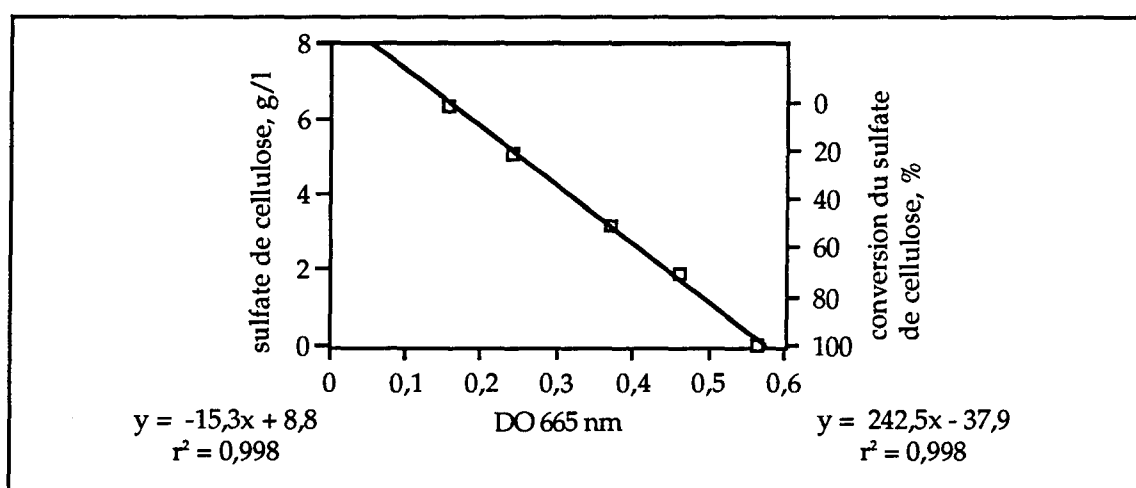
Le "taux de conversion" du sulfate de cellulose correspond à la fraction qui est impliquée dans le complexe polyélectrolyte formant la membrane des capsules. Ce taux de conversion peut être estimé par dosage au bleu de méthylène du polymère anionique résiduel dans les capsules [Dautzenberg, H. *et al.*, 1993].

Le bleu de méthylène est un composé chargé positivement qui absorbe à 665 nm. Si du sulfate de cellulose résiduel est présent dans le milieu, il se forme un complexe bleu de méthylène-sulfate de cellulose (complexe polyélectrolyte). L'absorbance mesurée sera d'autant plus diminuée qu'il y aura eu de complexe formé, c'est-à-dire de sulfate de cellulose résiduel.

Un échantillon des capsules est placé dans 6,5 fois son volume d'eau distillée. Les capsules sont désagrégées par passage aux ultra-sons (puissance moyenne, 3 cycles de 30 secondes au minimum, récipient dans un bain de glace). A un volume de cette suspension est ajouté un volume de bleu de méthylène 15 mM en solution aqueuse. La précipitation est immédiate, et visible. Après une dilution au 1/10ème, les tubes sont centrifugés à 12 000 g, pendant 20 minutes à 20°C (centrifugeuse Beckman J2-21). Les surnageants sont dilués dix fois avant de lire l'absorbance à 665 nm.

La gamme étalon est faite avec une solution de sulfate de cellulose, jusqu'à 6,4 g/l. Le rapport sulfate de cellulose résiduel/sulfate de cellulose mis au départ nous donne le pourcentage de conversion.

Figure 3.10 Gamme étalon : dosage du sulfate de cellulose par le bleu de méthylène



7.4. Mesure de distribution de tailles

La distribution de tailles des capsules est mesurée grâce à un granulomètre laser Malvern, modèle Mastersizer S permettant de mesurer des particules de 0,05 à 3500 µm.

7.4.1. Principe du granulomètre

La source de lumière est un laser Hélium-Néon à faible puissance sous forme d'un faisceau collimaté et monochromatique. Ce faisceau, appelé rayon analyseur, est diffracté par toutes les particules qu'il rencontre selon un angle qui diminue avec la taille des particules. Le profil de diffraction ne dépend ni de la position d'une

particule, ni de la vitesse qui l'anime, ni des propriétés optiques du matériel et du milieu de suspension.

7.4.2. Conformation de l'appareil

L'unité de mesure optique comprend un transmetteur et un récepteur. Le transmetteur abrite le laser, tandis que le récepteur abrite la gamme de lentilles, le détecteur et les interfaces avec l'ordinateur. Tous ces éléments sont reliés au banc optique qui permet de garder l'alignement. Chaque lentille réceptrice a une échelle d'utilisation déterminée par la taille de l'ouverture laissant passer les rayons non diffractés.

7.4.3. Paramètres calculés par le logiciel

L'acquisition et le traitement des données sont faites par ordinateur. On obtient la distribution volumique de l'échantillon, et les paramètres suivants :

$D(v, 0,5)$ = diamètre en-dessous duquel se trouvent 50% en volume de la population,

$D(v, 0,9)$ = diamètre en-dessous duquel se trouvent 90% en volume de la population,

$D(v, 0,1)$ = diamètre en-dessous duquel se trouvent 10% en volume de la population.

$$\text{span} = \frac{D(v, 0,9) - D(v, 0,1)}{D(v, 0,5)}$$

Le span reflète la largeur de la bande centrale contenant 80% en volume des particules. Plus le span est petit, plus étroite est la dispersion.

$$D[4,3] = \frac{\sum d_i^4}{\sum d_i^3} \quad \text{avec } d_i \text{ le diamètre médian de la classe } i.$$

Ce paramètre correspond au diamètre moyen des sphères ayant le même volume que les particules. C'est la valeur de ce paramètre qui sera considérée comme la taille moyenne des capsules d'un lot.

D'après les caractéristiques de la loi de distribution log-normale, on peut établir la

relation qui existe entre le span et l'écart-type :

$$\text{span} = 2,58 \times \text{écart-type}$$

8. Modélisation de la fermentation de la bière

Le principe, les hypothèses et les valeurs de constantes utilisés pour réaliser l'étude de modélisation sont décrits au Chapitre 4 "Résultats et discussion".

La modélisation a été réalisée grâce au logiciel de calcul Mathcad Plus 6, sur Macintosh. L'intégration est faite par la méthode de Runge-Kutta, avec un pas d'intégration variable (fonction Rkadapt du logiciel).

9. Récapitulatif des produits utilisés

Tableau 3.3 Récapitulatif des produits et des polymères utilisés

composé	nom commercial ou autre nom	fournisseur	N° référence	caractéristiques
1-naphtol		Aldrich	N 199-2	99 % (copeaux)
acétoïne	acétylméthylcarbinol	Fluka	540	> 97 %-PM 88
acétolactate décarboxylase	Maturex L	Novo Nordisk		(liquide)
acétolactate décarboxylase		Fluka	00550	(lyophilisat)
acide maléique		Prolabo	21409.298	>99%-PM98,06
ac. morpholino-éthane sulfonique	MES	Sigma	8250	99.5%
bleu de méthylène		Merck	1283	PM 373,9
créatine		Aldrich	85,524-3	99%
diacétyl	2,3-butanedione	Sigma	D-3634	PM 86
ester laurique polyoxyéthylène	Brij 35	Merck	801962	
éthyl 2-acétoxy		Aldrich	22,039-6	d=1.079 - 97 %
2-méthylacétoacétate				
ovalbumine		Sigma	A-7642	
pinacol		Aldrich	22.117-1	PM 118.2-98 %

Tableau 3.3 - suite

polymère	abréviation	caractéristiques	source
poly(vinyle caprolactame)	PVCL	PM 900 000	(1)
polyamide aromatique	POLAR	PM = 25 000	(1)
alginate		de faible viscosité	Bellco (USA)
chlorure de poly(diallyl diméthyl ammonium)	PDADMAC	1 000<PM<10 000	(2)
sulfate de cellulose de sodium	NaCS	PM env. 100 000	(2)

(1) : Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic chemistry, Moscou, Russie.

(2) : Universität Potsdam, Fo. Gr. Polyelektrolytkomplexe, Teltow, Allemagne.

Références bibliographiques

(1989)

Manual Method for Determination of alpha-acetolactate decarboxylase (ALDC), Fiche technique Novo Nordisk AF 278/1-GB.

B. M. Buladi, C. C. Chang, J. M. Belovich and J. E. Gatica (1997)

Transport phenomena and kinetics in an extravascular bioartificial pancreas, *AIChE J*, 42, 3, 2886-2682.

H. Dautzenberg, G. Holzapfel and B. Lukanoff (1993)

Methods for comprehensive characterization of microcapsules based on polyelectrolyte complexes, *Biomat Art Cells & Immob Biotech*, 21, 3, 399-405.

J.-F. Drouin, L. Louvel, B. Vanhoutte, H. Vivier, M.-N. Pons and P. Germain (1997)

Quantitative characterization of cellular differentiation of *Streptomyces ambofaciens* in submerged culture by image analysis, *Biotechnol Techniques*, 11, 11, 819-824.

J. M. Engasser, I. Marc, M. Moll and B. Duteurtre (1981)

Kinetic modelling of beer fermentation, Proceedings: *Eur Brew Conv*, Copenhagen, Oxford: IRL Press, 579-587.

M. F. A. Goosen, G. A. King, C. A. Mcknight and N. Marcotte (1989)

Animal Cell Culture Engineering Using Alginate Polycation Microcapsules of Controlled Membrane Molecular-Weight Cut-off, *J Membrane Sci*, 41, 323-343.

E. A. Markvicheva, A. S. Bronin, N. E. Kudryavtseva, L. D. Rumsh, Y. E. Kirsh and V. P. Zubov (1994)

Immobilization of proteases in composite hydrogel based on poly(N-vinyl caprolactam), *Biotechnol Technique*, 8, 3, 143-148.

F. J. A. Merchant, A. Margaritis, J. B. Wallace and A. Vardanis (1987)

A Novel Technique for Measuring Solute Diffusivities in Entrapment Matrices Used in Immobilization, *Biotechnol Bioeng*, 30, 936-945.

D. Poncelet, B. Poncelet De Smet and R. J. Neufeld (1988)

Mass Transfer in Nylon Membrane Bound Microcapsules, Proceedings: *38th Can Chem Eng Conf*, Oct. 2-5, Edmonton, Canada,

D. Poncelet, R. Lencki, C. Beaulieu, J. P. Hallé, R. J. Neufeld and A. Fournier (1992)

Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation: I Methodology, *Appl Microbiol Biotechnol*, 38, 39-45.

D. Poncelet, V. Babak, C. Dulieu and A. Picot (1997)

Production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation, Proceedings: *2nd World Congress on Emulsion*, Bordeaux, France, in press.

R. van den Berg, P. A. Harteveld and F. B. MArtens (1983)

Diacetyl reducing activity in brewers' yeast, Proceedings: *Eur Brew Conv*, London, 497-504.

W. W. Westerfeld (1945)

A colorimetric determination of blood acetoin, *J. Biol. Chem.*, 161, 495-502.

J. Zemek, L. Kuniak, P. Geimener, J. Zámocký and S. Kucár (1982)

Crosslinked polyethyleneimine: an enzyme carrier with spacers of various lengths introduced in crosslinking reaction, *Enzyme Microb Technol*, 4, July, 233-238.

Sommaire

Chapitre 4 : Résultats & discussion

1. Mise au point de la mesure d'activité acétolactate décarboxylasique.....	4-2
1.1. Contexte de l'étude.....	4-2
1.2. Optimisation de la synthèse de l'acétolactate.....	4-4
1.2.1. Mécanisme réactionnel de la saponification.....	4-4
1.2.2. Dosage de l'acétolactate.....	4-5
1.2.3. Suivi de la saponification.....	4-6
1.2.4. Etablissement d'une procédure rapide.....	4-7
1.3. Mesure de la stabilité de l'acétolactate.....	4-8
1.3.1. Effet de l'oxygène sur la stabilité de l'acétolactate.....	4-9
1.3.2. Effet de la température sur la décarboxylation de l'acétolactate.....	4-10
1.4. Choix des paramètres de conduite de la réaction enzymatique.....	4-11
1.4.1. Température de mesure d'activité.....	4-11
1.4.2. Tampon.....	4-11
1.4.3. Procédure d'arrêt de la réaction enzymatique.....	4-12
1.5. Etude de la réaction colorée.....	4-12
1.5.1. Stabilité des complexes colorés dans le temps.....	4-12
1.5.2. Dosage simultané de l'acétoïne et du diacétyle par spectrophotométrie.....	4-13

2. Techniques d'encapsulation mises en oeuvre pour l'acétolactate décarboxylase.....	4-18
2.1. Inclusion en billes d'alginate recouvertes de polycation.....	4-18
2.2. Imprégnation de billes d'alginate.....	4-19
2.3. Inclusion en billes de poly(vinyl caprolactame)/alginate.....	4-20
2.3.1. <i>Activité enzymatique au sein du gel.....</i>	<i>4-21</i>
2.3.2. <i>Transferts de masse.....</i>	<i>4-22</i>
2.4. Encapsulation par polymérisation interfaciale de gélatine.....	4-23
2.5. Encapsulation dans une membrane de complexes polyélectrolytes.....	4-24
2.5.1. <i>Choix des paramètres de fabrication des capsules.....</i>	<i>4-24</i>
2.5.1.1. <i>Effet des concentrations des solutions de polymères.....</i>	<i>4-26</i>
2.5.1.2. <i>Effet de la présence de chlorure de sodium dans les solutions.....</i>	<i>4-27</i>
2.5.1.3. <i>Taux de conversion du sulfate de cellulose.....</i>	<i>4-30</i>
2.5.2. <i>Résultats de l'encapsulation dans une membrane de complexes polyélectrolytes.....</i>	<i>4-30</i>
2.5.2.1. <i>Aspect, taille et épaisseur de membrane des capsules.....</i>	<i>4-30</i>
2.5.2.2. <i>Activité de l'enzyme encapsulée.....</i>	<i>4-33</i>
2.5.2.3. <i>Etudes de stabilité des enzymes encapsulées.....</i>	<i>4-34</i>
2.5.2.4. <i>Conservation au stockage.....</i>	<i>4-35</i>
2.5.2.5. <i>Stabilité dans la bière.....</i>	<i>4-37</i>
2.6. Conclusion sur l'encapsulation.....	4-39

3. Modélisation de la fermentation de la bière.....	4-40
3.1. Principes du modèle.....	4-41
3.2. Calcul des constantes.....	4-44
3.2.1. Décarboxylation de l'acétolactate.....	4-44
3.2.2. Paramètres cinétiques de l'acétolactate décarboxylase.....	4-45
3.2.3. Vitesse de dégradation des sucres totaux fermentescibles.....	4-46
3.2.4. Tableau récapitulatif des constantes de vitesse.....	4-47
3.2.5. Tableau récapitulatif . autres constantes.....	4-48
3.3. Valeurs initiales des variables.....	4-48
3.4. Modélisation d'une fermentation discontinue 'classique'.....	4-49
3.5. Modélisation d'une fermentation accélérée.....	4-57
3.6. Conclusion de la modélisation.....	4-62
4. Conclusion générale.....	4-63

Résultats & discussion

L'objectif de notre étude est d'encapsuler l'acétolactate décarboxylase active dans des petites sphères. Pour mesurer l'efficacité des sphères, leur activité enzymatique sera déterminée et comparée à celle de l'enzyme libre. Ce chapitre a pour objet de donner les résultats expérimentaux de notre étude.

La méthode analytique proposée dans la littérature pour doser l'activité de l'acétolactate décarboxylase est délicate. En effet, l'acétolactate est instable et son produit de dégradation interfère dans la mesure. Cette interférence rend les résultats peu précis. Pour notre étude nous avons donc dû étudier la méthode analytique, pour l'optimiser. Grâce à ces travaux, une méthode de mesure d'activité fiable et précise a été mise au point.

L'encapsulation d'acétolactate décarboxylase a été envisagée par plusieurs approches. Par analogie aux cellules immobilisées, la méthode la plus "classique" pour une application alimentaire a d'abord été retenue : l'inclusion en billes de gel, avec un recouvrement. Toutefois, l'acétolactate décarboxylase est de petite taille et hydrophile. Ces deux points rendent l'emprisonnement de l'enzyme particulièrement difficile. En dernier ressort, l'encapsulation d'une gouttelette de solution d'enzyme dans une membrane de complexes polyélectrolytes s'est montrée la méthode la plus efficace.

Enfin, l'évaluation de l'utilisation des capsules d'acétolactate décarboxylase pendant la fermentation de la bière a été réalisée grâce à une modélisation mathématique.

1. Mise au point de la mesure d'activité acétolactate décarboxylasique

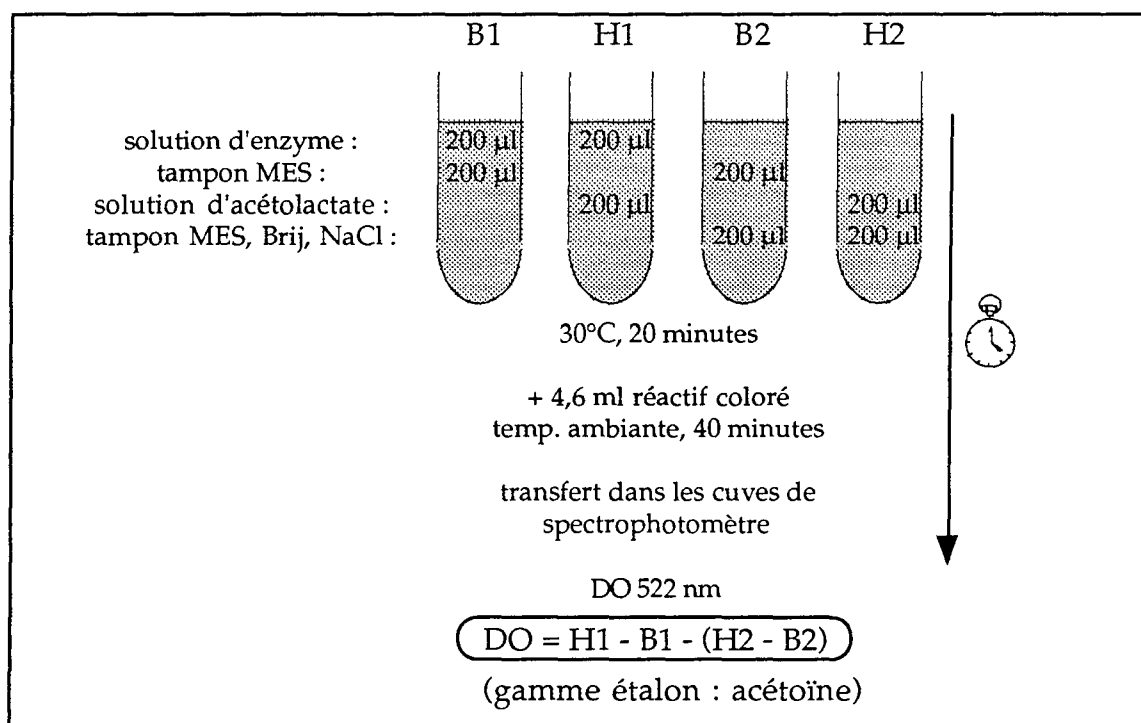
1.1. Contexte de l'étude

L'activité de l'acétolactate décarboxylase est mesurée par dosage spectrophotométrique de l'acétoïne formé par décarboxylation enzymatique d'acétolactate.

De nombreuses méthodes existent pour doser l'acétoïne. Pour comparer les activités de l'enzyme libre et encapsulée, la méthode doit permettre de doser des échantillons en série (50 mesures à la fois). Pour cette raison notre choix s'est tourné vers la spectrophotométrie plutôt que vers la chromatographie liquide haute performance ou la fluorimétrie. D'autre part il n'est pas possible de doser l'acétoïne par chromatographie en phase gazeuse lorsque l'acétolactate est aussi présent dans le milieu.

Une procédure est proposée par Novo Nordisk pour mesurer l'activité de l'acétolactate décarboxylase [Fiche Technique Novo Nordisk, 1989]. La solution d'acétolactate (substrat) est préparée par saponification d'un diester (éthyl 2-acétoxy 2-méthylacétoacétate) dans de la soude 0,5 M pendant 20 minutes. Il faut ensuite ajouter du tampon (40 ml de tampon acide morpholino-éthane sulfonique (MES) 50 mM pH 6,0), ajuster le pH puis le volume (pH 6,0 et volume 50 ml). L'enzyme acétolactate décarboxylase est dissoute dans un tampon MES contenant aussi du Brij 35 (surfactant non ionique, à hauteur de 0,05%) et du chlorure de sodium (600 mM). L'activité enzymatique est mesurée grâce à 4 réacteurs comme schématisé en Figure 4.1. La réaction enzymatique est menée à 30°C. Elle est stoppée après 20 minutes de façon simultanée au déclenchement de la réaction colorée. Cette réaction colorée est elle aussi chronométrée, car l'absorbance (525 nm) des solutions doit être mesurée au bout de 40 minutes.

Figure 4.1 Dosage de l'activité ALDC par la méthode Novo Nordisk



Cette méthode de dosage est longue et lourde : 4 tubes pour faire une mesure, 5 heures pour une série de 40 tubes. De plus elle conduit à des résultats peu précis, sur une gamme de mesure étroite (10 à 50% de précision, gamme de mesure entre 500 et 800 µM d'acétoïne).

- La méthode est longue car les solutions doivent être préparées de façon extemporanée (solution de substrat et d'enzyme, réactif coloré) et qu'elles nécessitent toutes des ajustements de pH ou de volume qui prennent du temps. Nous nous sommes donc attachés à établir des "procédures rapides" ne nécessitant pas ou peu d'ajustements.
- La méthode est peu précise à cause de l'instabilité de l'acétolactate. En effet, l'acétolactate se décarboxyle spontanément pour donner un mélange d'acétoïne et de diacétyl. Ces produits de dégradation sont mesurés au même titre que l'acétoïne issu de la décarboxylation enzymatique. Il faut donc mesurer des "blancs-substrat" qui permettent de corriger les valeurs. Lors les premières séries de mesures, les valeurs des blancs-substrat présentaient une absorbance de 0,4 à 0,5. Ceci est inacceptable pour deux raisons : d'une part la gamme de mesure est très étroite (les absorbances ne sont pas prises en compte au-delà de 1,2) et

d'autre part la décarboxylation enzymatique est du même ordre de grandeur que la décarboxylation parasite, ce qui nuit à la précision des mesures. Nous avons donc cherché à déterminer les causes majeures de l'instabilité de l'acétolactate afin de minimiser sa dégradation pendant les dosages.

L'acétolactate qui est mis en cause est préparé par nos soins, selon la procédure décrite par Novo Nordisk. Étant donné les difficultés que nous avons rencontré, nous avons choisi de vérifier par nous-mêmes la fiabilité de la procédure de préparation de l'acétolactate.

1.2. Optimisation de la synthèse de l'acétolactate

L' α -acétolactate est la substrat de la réaction enzymatique. Il doit être synthétisé avant chaque utilisation, car il ne se conserve pas. Il est obtenu par saponification d'un diester, l'éthyl 2-acétoxy 2-méthylacétoacétate.

Dans le but d'établir les conditions opératoires les plus efficaces pour synthétiser l'acétolactate, nous avons cherché à :

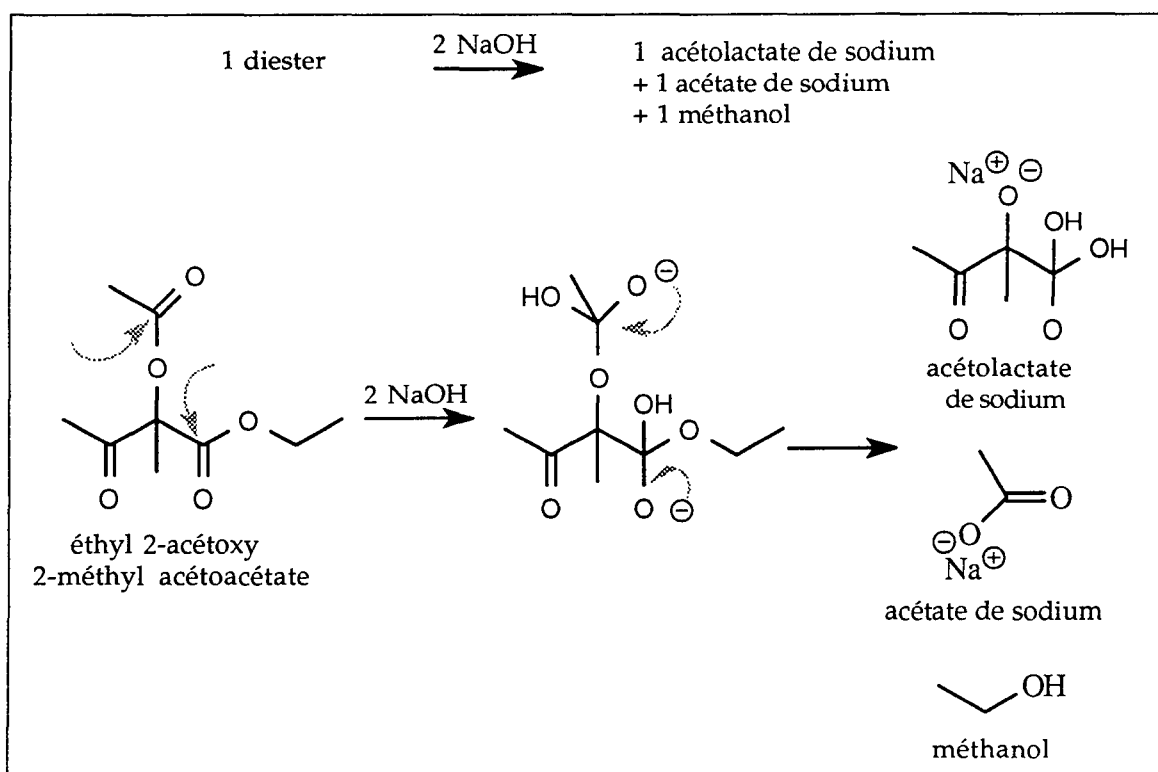
- déterminer quelle concentration d'hydroxyde de sodium utiliser : les données de la littérature divergent [Fiche Technique Novo Nordisk, 1989 ; Monnet, C. *et al.*, 1994 ; Krampitz, L. O., 1948],
- déterminer la durée nécessaire pour que la saponification soit complète.

Avant de présenter ces études, voyons le mécanisme réactionnel de la saponification du diester en acétolactate, ainsi que le dosage de l'acétolactate.

1.2.1. Mécanisme réactionnel de la saponification

Le mécanisme réactionnel de la saponification de l'éthyl 2-acétoxy 2-méthylacétoacétate (diester) en acétolactate est schématisé dans la figure suivante. Il s'agit d'une attaque nucléophile en deux points de la molécule. La molécule intermédiaire subit des réarrangements électroniques qui donne lieu à la libération d'acétolactate, d'acétate et de méthanol.

Figure 4.2 Préparation de l'acétolactate par saponification



1.2.2. Dosage de l'acétolactate

L'acétolactate est dosé par la mesure de l'acétoïne et du diacétyl formés après décarboxylation (milieu acide sulfurique 1%, chauffage à 60°C pendant 15 minutes). Or ce dosage est assez peu précis. La littérature ne donne pas d'information quant à la répartition acétoïne/diacétyl formés après décarboxylation dans les conditions citées. Comme notre procédure implique d'ouvrir les tubes ayant subi la décarboxylation pour prélever des aliquotes, et que le diacétyl est très volatil, nous avons mesuré cette répartition.

La somme acétoïne + diacétyl (A+D) est mesurée sur les échantillons d'acétolactate décarboxylé par spectrophotométrie, tandis que l'acétoïne (A) est mesuré par chromatographie en phase gazeuse.

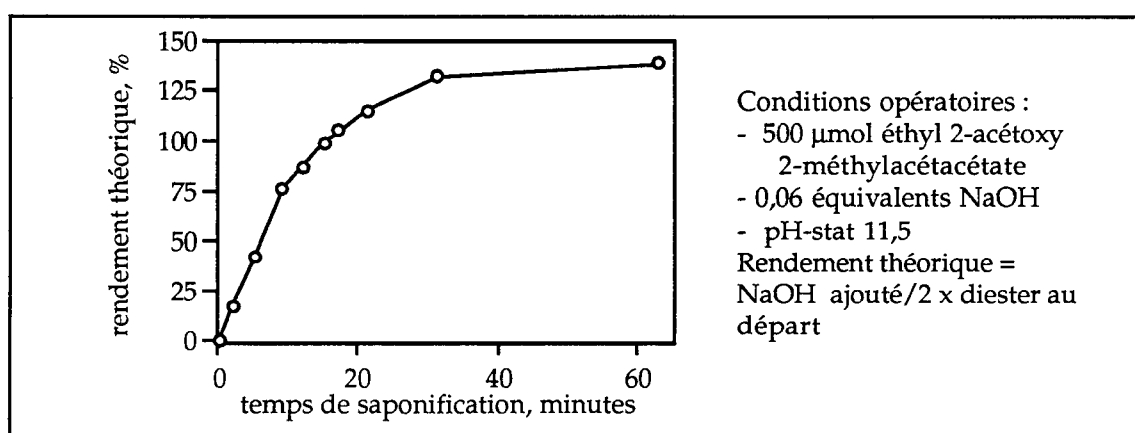
Tableau 4.1 Décarboxylation de l'acétolactate en milieu acide et à chaud

	A + D	A	(A + D)/A
échantillon 1	3562	1946	1.83
échantillon 2	4071	2260	1.80
échantillon 3	4500	2080	2.16
échantillon 4	22767	10480	2.17
échantillon 5	25288	11000	2.30
échantillon 6	24823	10840	2.29
		Moyenne :	2.09

Il apparaît donc que les conditions de décarboxylation utilisées convertissent l'acétolactate pour moitié en diacétyl et pour moitié en acétoïne. Comme le diacétyl est volatil (point d'ébullition 88°C), il est nécessaire de s'assurer du complet refroidissement des tubes avant de les ouvrir. Ce point de détail permet d'améliorer la précision du dosage.

1.2.3. Suivi de la saponification

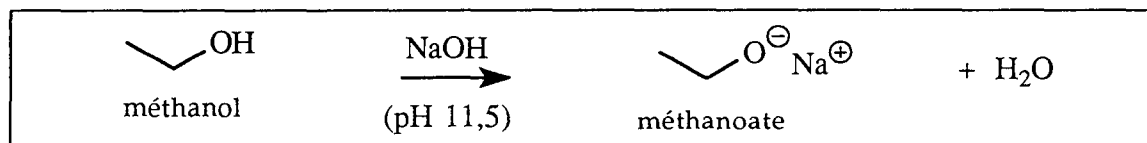
La première étude de saponification a été menée en pH contrôlé à 11,5 [Monnet, C. *et al.*, 1994]. Nous avons reproduit cette expérience afin de disposer du profil d'ajout de soude titrante. Il est exprimé en rendement théorique (NaOH ajouté/(2 x diester au départ)) dans la figure suivante.

Figure 4.3 Consommation de soude lors d'une saponification à pH contrôlé

Ces résultats montrent que lorsque le plateau est atteint, le rendement est de 140% (confirmé sur 5 expériences). Il y aurait une surconsommation de soude pendant la réaction, qui n'est pas mentionnée par l'équipe de Monnet. L'hypothèse que nous émettons pour expliquer ce phénomène est une consommation de soude par

un des produits de la réaction, le méthanol.

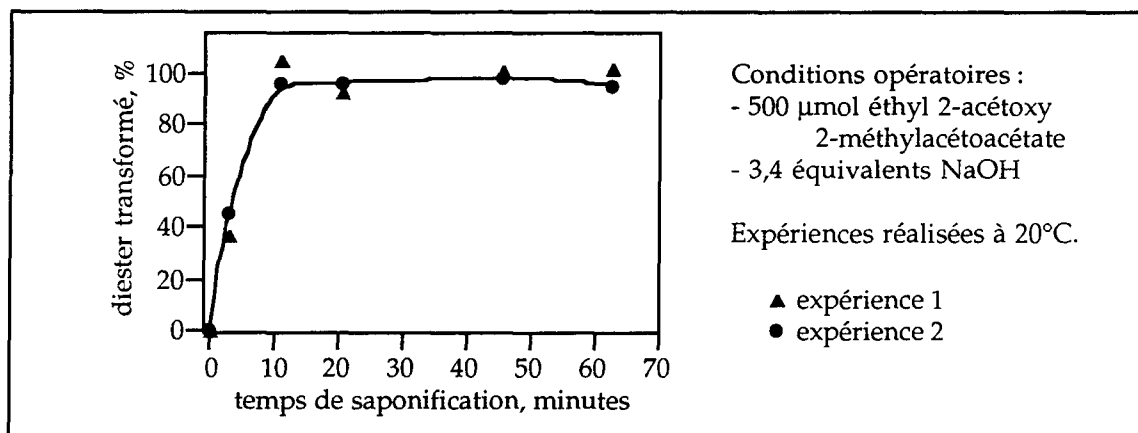
Figure 4.4 Proposition pour la surconsommation de soude pendant la saponification



A pH basique la base conjuguée de l'alcool se forme (alcoolate) avec consommation de soude. Le suivi de la saponification par titrimétrie n'est pas réalisable directement. Nous avons donc poursuivi l'étude par dosage de l'acétolactate.

La cinétique de formation de l'acétolactate pendant la saponification a été menée et donne les résultats suivants :

Figure 4.5 Formation d'acétolactate au cours de la saponification



Le rendement de conversion de l'éthyl 2-acétoxy 2-méthylacétoacétate en acétolactate est de 100%. Ces conditions opératoires ont donc été retenues pour la suite du travail :

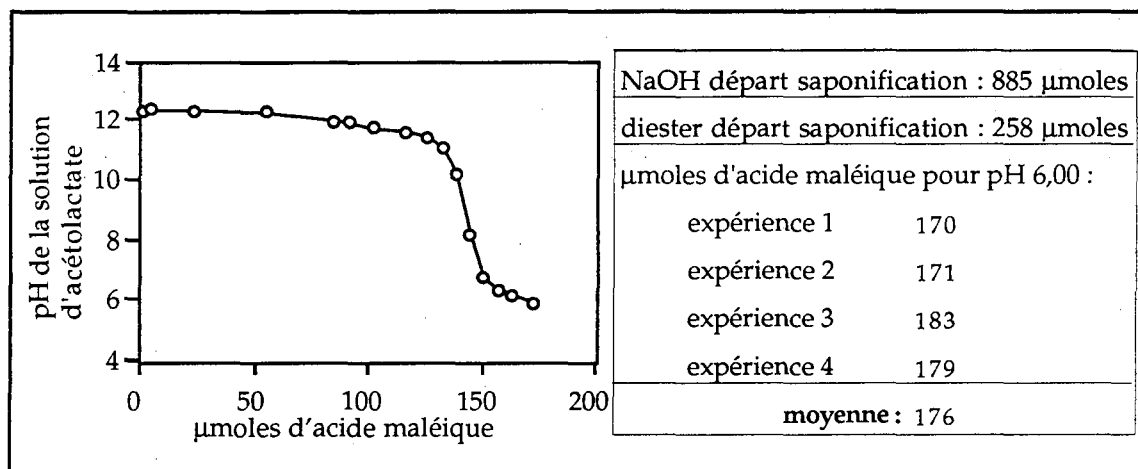
- 10 ml de soude 180 mM pour 100 μl d'éthyl 2-acétoxy 2-méthylacétoacétate,
- saponification pendant 20 minutes en milieu agité.

1.2.4. Établissement d'une procédure rapide

L'acétolactate étant un composé instable, une procédure rapide de préparation est

indispensable. Cette préparation comporte la saponification (milieu soude 180 mM) et la dilution de l'acétolactate fraîchement synthétisé dans un tampon à pH ajusté à 6,00. Le tampon choisi est le tampon maléate (pKa de l'acide maléique : 6,24). Les titrations à point final du milieu par l'acide maléique 100 mM donnent les résultats suivants :

Figure 4.6 Exemple de profil de titration de l'acétolactate en milieu alcalin par l'acide maléique et résultats expérimentaux



En conclusion, la procédure adoptée en routine est la suivante :

- 540 μmol de diester sont saponifiés par
- 1800 μmol de NaOH,
- pendant 10 minutes à 20°C ou 20 minutes à 10°C, puis
- 3,5 ml d'acide maléique 100 mM sont ajoutés,
- et 20 ml de tampon maléate 100 mM pH 6,00.

Le pH final de la solution tamponnée à 15,4 mM d'acétolactate est vérifié à chaque expérience. La fourchette de 6,00 +/- 0,05 n'a jamais été dépassée.

1.3. Mesure de la stabilité de l'acétolactate

L'acétolactate se décarboxyle spontanément en acétoïne et diacétyle. Acétoïne et diacétyle donnent la même réponse lors du dosage spectrophotométrique. Par conséquent, pour doser la transformation enzymatique de l'acétolactate en acétoïne il faut corriger les résultats de la décarboxylation spontanée ("blancs-substrat").

Les valeurs des blancs-substrat étaient inacceptables lors des premières séries de mesures (Absorbance de 0,4 à 0,5). Nous avons mesuré l'effet de certains facteurs sur la décarboxylation de l'acétolactate : la présence d'oxygène et la température, afin de minimiser cette interférence.

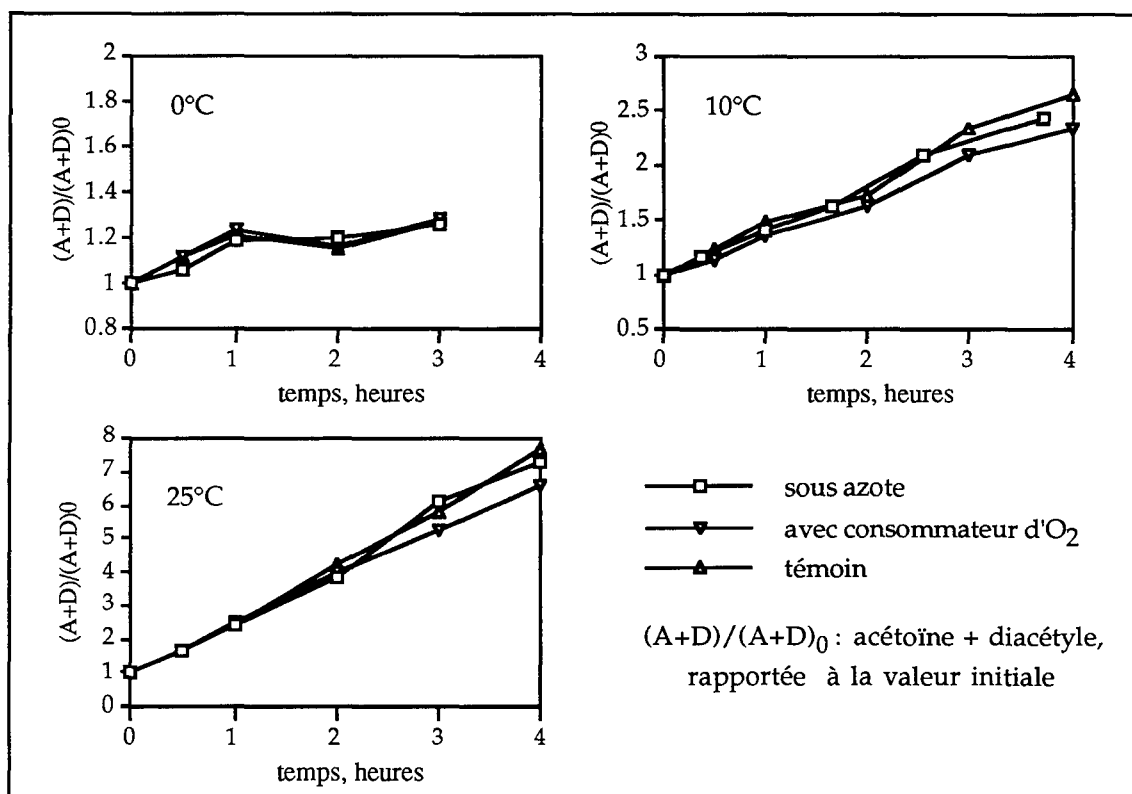
1.3.1. Effet de l'oxygène sur la stabilité de l'acétolactate

La présence d'air dans le milieu stimulerait la décarboxylation de l'acétolactate [De Man, J. C., 1959 ; Gollop, N. *et al.*, 1987]. Nous avons testé l'effet de la présence d'oxygène dissous dans la solution d'acétolactate.

Une solution d'acétolactate est préparée sous azote, en présence d'un système consommateur d'oxygène et sans précaution particulière (témoin). Le système consommateur d'oxygène est le couple sulfite de sodium/sulfate de cobalt, chacun à hauteur de 1 mM [Poncelet, D. *et al.*, 1993] (respectivement Prolabo 28126, et Riedel).

La dégradation est donnée en concentration normalisée, c'est-à-dire concentration rapportée à la concentration initiale.

Figure 4.7 Effet de l'oxygène sur la décarboxylation spontanée de l'acétolactate

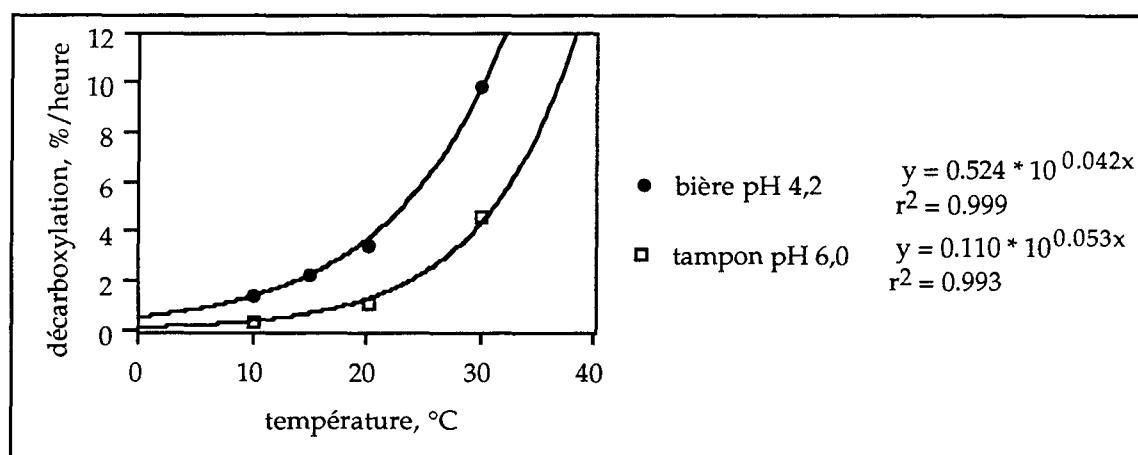


Ces graphes nous montrent que l'oxygène ne semble pas avoir un effet significatif sur la décarboxylation de l'acétolactate. Aussi nous n'avons pas jugé nécessaire de travailler sous azote.

1.3.2. Effet de la température sur la décarboxylation de l'acétolactate

Comme la plupart des réactions chimiques, la décarboxylation de l'acétolactate est accélérée par la chaleur (Figure 4.8). Les vitesses de décarboxylation de l'acétolactate ont été mesurées en fonction de la température, dans les conditions de mesure d'activité (tampon pH 6,00) et d'utilisation de l'enzyme acétolactate décarboxylase (bière pH 4,2). Ces vitesses correspondent à la pente des droites : somme de l'acétoïne et du diacétyle, exprimée en pourcentage de l'acétolactate au départ, en fonction du temps.

Figure 4.8 Effet de la température sur la décarboxylation spontanée de l'acétolactate



La température est un paramètre important vis-à-vis de la décarboxylation de l'acétolactate : par exemple, la vitesse est multipliée par 5 entre 20 et 30°C en milieu tampon. Dans la bière à pH 4,2 le phénomène est encore plus marqué car les pH acides favorisent la décarboxylation de l'acétolactate [Veringa, H. A. *et al.*, 1984 ; Rondags, E., 1997] en stimulant la délocalisation des électrons sur la molécule (point 1.2.1 du Chapitre 2). Dans tous les cas, la décarboxylation non enzymatique de l'acétolactate doit être quantifiée afin de corriger les mesures d'activité enzymatique.

Les conditions de mesure de l'activité proposées dans la littérature correspondent aux conditions optimales pour l'enzyme (pH 6,0, 30°C). Ces conditions sont éloignées des conditions d'utilisation réelle (pH entre 5,5 et 4,2, 10°C environ pour une fermentation basse). Nous venons de voir que l'acétolactate est d'autant plus

stable que la température est basse. Aussi, nous avons revu les conditions de mesure d'activité.

1.4. Choix des paramètres de conduite de la réaction enzymatique

1.4.1. Température de mesure d'activité

La température favorise la décarboxylation de l'acétolactate. Un compromis est donc à faire pour le choix de la température de mesure d'activité, entre :

- une enzyme fortement active et un substrat fort instable (30°C),
- et une enzyme faiblement active et un substrat stable (10°C).

Au regard des résultats de décarboxylation spontanée de l'acétolactate (point 1.3.2) et de la température de fermentation de la bière, nous avons choisi de travailler à 10°C.

1.4.2. Tampon

La procédure Novo Nordisk préconise un tampon MES (acide morpholino éthane sulfonique) contenant aussi du Brij 35 (éther laurique de polyoxyéthylène, un détergent non ionique) et du chlorure de sodium (35 g/l). Le détergent et le chlorure de sodium sont des activateurs pour l'enzyme acétolactate décarboxylase.

Dans le but de limiter les sources d'interférences nous avons simplifié le milieu de mesure d'activité en éliminant les activateurs. D'autre part le MES est un composé onéreux : 3700 F/kg ; le litre de tampon MES/Brij/chlorure de sodium revient à 48 F/l en réactifs. Un tampon maléate 100 mM (acide maléique 395 F/kg et soude 125 F/kg) permet de tamponner dans la même gamme de pH pour un coût de 5,30 F/l.

Enfin, le fait d'utiliser le même tampon pour les solutions d'enzyme et d'acétolactate permet de réduire le nombre de mesures. En effet dans la procédure Novo Nordisk les interférences entre les différent tampons obligeaient à réaliser 4 tubes pour une mesure. Ici deux tubes suffiront : l'essai et un blanc-substrat.

1.4.3. Procédure d'arrêt de la réaction enzymatique

Dans la procédure Novo Nordisk, l'arrêt de réaction enzymatique et le démarrage de la réaction colorée sont simultanés. Le chronométrage est donc délicat et doit être précis (se reporter au point suivant). Il en résulte une procédure très peu flexible. Afin d'adapter la procédure de dosage aux enzymes encapsulées, nous avons dissocié les deux réactions. L'arrêt de réaction enzymatique est réalisé par ajout de soude ($\text{pH} > 9$). La réaction colorée sur les échantillons ainsi traités peut être différée de quelques heures sans affecter la qualité du dosage.

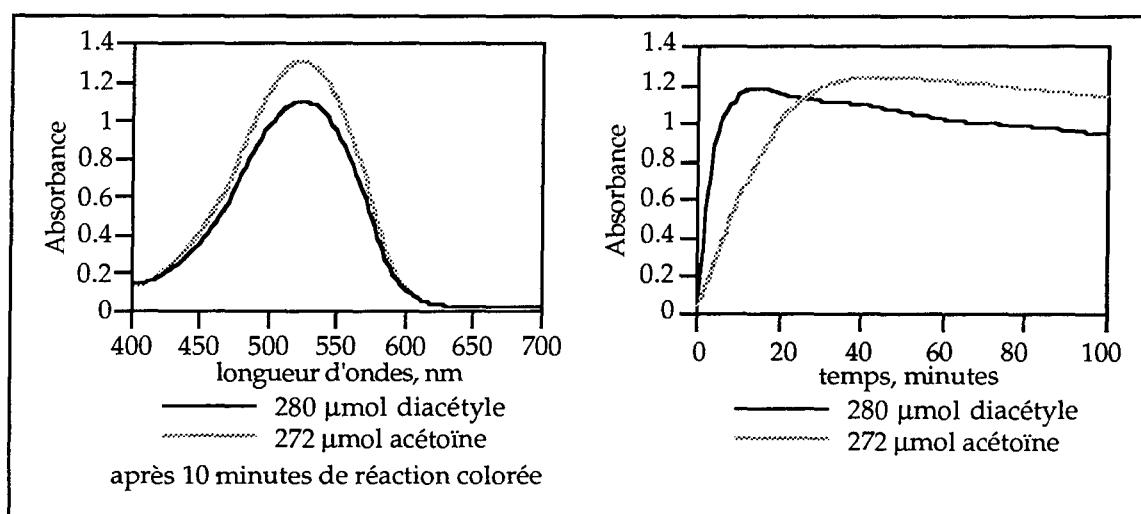
1.5. Étude de la réaction colorée

Le dosage de l'acétoïne est réalisé par spectrophotométrie. Les mécanismes de formation des complexes colorés sont mal connus. Or, ces complexes sont instables dans le temps. Nous avons mené une étude succincte de ces complexes : mesure du pic d'absorbance, évolution dans le temps.

1.5.1. Stabilité des complexes colorés dans le temps

Le dosage de l'acétoïne (et du diacétyle) selon la méthode de Westerfeld implique la formation d'un complexe coloré avec le naphtol et la créatine en milieu alcalin [Westerfeld, W. W., 1945]. Les spectres d'absorbance des complexes formés avec le diacétyle et l'acétoïne donnent un maximum pour la même longueur d'onde. Par ailleurs, ces complexes sont instables ; leur absorbance évolue avec le temps.

Figure 4.9 Caractéristiques des complexes colorés



La mesure d'absorbance à 525 nm donnera la réponse globale du diacétyle et de l'acétoïne. L'instabilité des complexes avec le temps oblige cependant à respecter le chronométrage du dosage.

L'acétoïne et le diacétyle sont présents simultanément dans les milieux que nous dosons, ainsi que dans la bière. Il serait intéressant de quantifier ces deux composés, et les courbes ci-dessus nous laissent penser que ces déterminations pourraient être menées par spectrophotométrie. Nous avons étudié la possibilité de quantifier ces deux composés *simultanément*, c'est-à-dire sur le même tube.

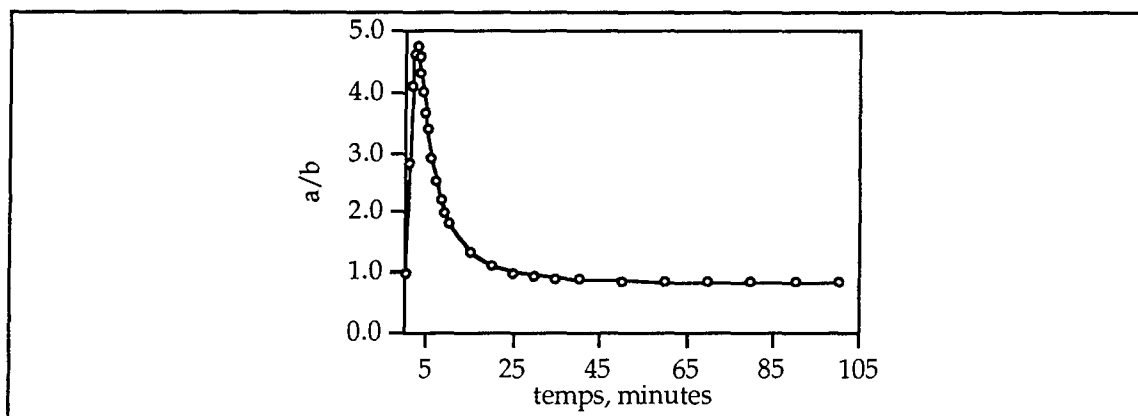
1.5.2. Dosage simultané de l'acétoïne et du diacétyle par spectrophotométrie

Le dosage spectrophotométrique de l'acétoïne au naphtol et à la créatine donne un signal avec l'acétoïne mais aussi avec le diacétyle. L'absorbance mesurée est la résultante du diacétyle et de l'acétoïne présents. La différence de vitesse de réponse des complexes colorés au cours du temps peut être exploitée pour différencier les deux composés. Posons :

$$\text{Abs } 525 \text{ nm} = a \cdot (\text{Abs due au diacétyle}) + b \cdot (\text{Abs due à l'acétoïne})$$

La représentation graphique de a/b (Figure 4.10) calculé à partir du spectre de la Figure 4.9 en fonction du temps nous indique l'évolution de la part respective de deux composés dans la coloration.

Figure 4.10 Contributions du diacétyle et de l'acétoïne dans la coloration au cours du temps

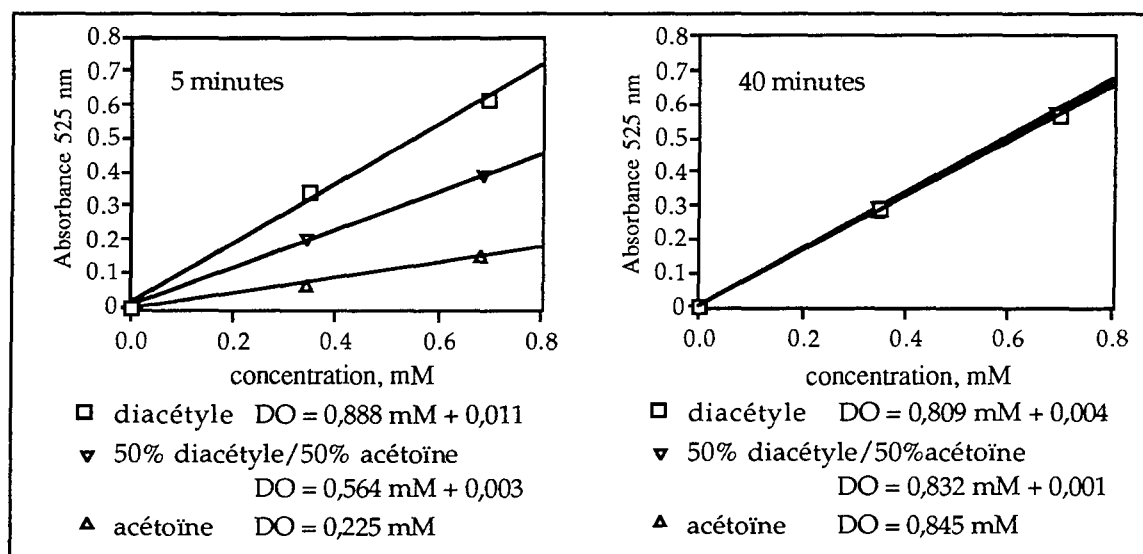


L'intervention du diacétyle est dominante au bout de 5 minutes de réaction colorée. Après 40 minutes, acétoïne et diacétyle présentent une réactivité au naphtol et à la créatine voisine puisque a/b est proche de 1 (0,9).

Ainsi il devrait être possible de différencier l'acétoïne et le diacétyl contenus dans une solution par le même dosage, en mesurant l'absorbance du complexe formé à des temps différents.

La réaction colorée obtenue avec des solutions mixtes de diacétyl et d'acétoïne mesurée au bout de 5 et de 40 minutes illustrent ce phénomène, comme on peut le voir sur les graphes suivants.

Figure 4.11 Gammes étalon : diacétyl et/ou acétoïne



Au bout de 40 minutes de coloration, acétoïne et diacétyl donnent la même réponse. Le diacétyl pourrait ainsi être mesuré grâce à une droite étalon en acétoïne et inversement, tant que l'absorbance est mesurée après 40 minutes de coloration.

En prenant maintenant comme hypothèse de travail :

$$\text{Abs 525 nm à 5 minutes} = \alpha * [\text{Acétoïne, } \mu\text{M}] + \beta * [\text{Diacétyl, } \mu\text{M}]$$

$$\text{Abs 525 nm à 40 minutes} = \gamma * [\text{Acétoïne, } \mu\text{M}] + \delta * [\text{Diacétyl, } \mu\text{M}]$$

et en réalisant des essais sur des solutions à concentrations connues, on peut déterminer les constantes inconnues α , β , γ et δ .

Tableau 4.2 Mesures d'absorbance et calcul des coefficients

Pour calculer les coefficients :							
acétoïne μM	diacétyle μM	Abs 5 min nette	Abs 40 min nette	α	β	γ	δ
0	348	0.343	0.293		7.9e-4		7.8e-4
0	697	0.619	0.564				
340	0	0.071	0.288	2.4e-4		8.4e-4	
681	0	0.153	0.576				

Les coefficients montrent la participation relative de chaque composé à la coloration obtenue. On confirme ici que le diacétyle est le principal responsable de la couleur développée au bout de 5 minutes avec un coefficient β de $7,9 \cdot 10^{-4}$ pour un α de $2,4 \cdot 10^{-4}$ pour l'acétoïne. Après 40 minutes de coloration l'intervention des deux molécules est dans le même ordre de grandeur : $\delta = 7,8 \cdot 10^{-4}$ et $\gamma = 8,4 \cdot 10^{-4}$. Le ratio γ/δ est égal à 0,9 ce qui est en accord avec la valeur du rapport a/b à 40 minutes présentée en Figure 4.10.

D'après Del Campo, la différence de temps de réaction colorée peut s'expliquer par une interaction "directe" du diacétyle avec le réactif, alors que l'acétoïne doit d'abord être oxydé en diacétyle dans la solution alcaline pour développer une coloration [Del Campo, G. *et al.*, 1992].

Un test est réalisé sur des solutions "mixtes" dans la même série de mesures, pour valider les coefficients calculés.

Tableau 4.3 Test des coefficients calculés

Solutions de test :							
Abs 5 min nette	Abs 40 min nette	acétoïne μM calculée	diacétyle μM calculée	acétoïne μM introduite	diacétyle μM introduite	acétoïne écart %	diacétyle écart %
0.204	0.289	146	214	170	174	-14%	23%
0.387	0.571	314	394	340	348	-8%	13%
moyenne						-11%	18%

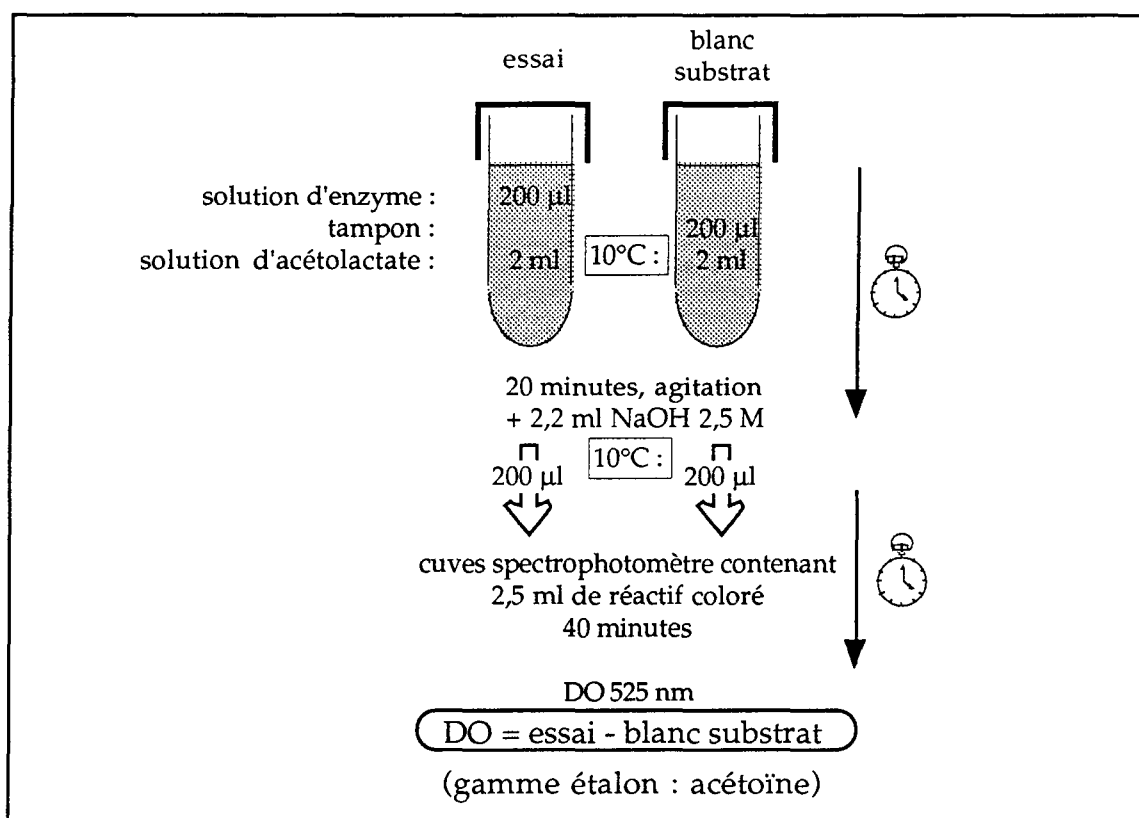
L'écart entre les concentrations calculées et réelles est d'environ 20%.

On peut donc tirer deux informations d'un même milieu réactionnel, en prenant les absorbances à deux temps différents. La méthode n'est encore pas très précise puisque les résultats sont à 20% près. Enfin, la méthode de dosage

spectrophotométrique étant déjà lourde d'un point de vue chronométrages, nous ne mettrons pas à profit cette possibilité de double détermination à partir du même milieu réactionnel. En outre, nous nous attacherons à travailler dans des conditions opératoires telles que la décarboxylation spontanée de l'acétolactate soit minime.

Ces études nous permettent de proposer une procédure de dosage d'activité acétolactate décarboxylasique plus aisée et plus précise. Cette procédure est schématisée dans la figure suivante.

Figure 4.12 Procédure de dosage d'activité acétolactate décarboxylasique telle que nous l'avons modifiée



L'acétolactate est préparé en 25 minutes grâce à une procédure rapide qui ne nécessite pas d'ajustements de pH ou de volume (540 µmol de diester sont saponifiés par 1800 µmol de NaOH pendant 20 minutes à 10°C puis 3,5 ml d'acide maléique 100 mM sont ajoutés et 20 ml de tampon maléate 100 mM pH 6,00). Le dosage de l'activité est réalisé à 10°C dans une pièce thermostatée. La réaction enzymatique est déclenchée par ajout de la solution d'acétolactate, et stoppée 20 minutes plus tard par ajout de soude 2,5 M. Le dosage de l'acétoïne est réalisé sur des prélèvements de 200 µl de milieux réactionnels, qui sont ajoutés à 2,5 ml

de réactif coloré placés dans des cuves de spectrophotomètre. Après agitation, la réaction colorée se déroule pendant 40 minutes.

Quelques chiffres comparatifs des deux procédures sont donnés dans le Tableau 4.4. Toutes les mesures d'activité en routine ont été réalisées selon cette procédure. Le blanc-substrat sert à éliminer l'interférence inévitable de la décarboxylation spontanée de l'acétolactate. Grâce à cette procédure les blancs-substrats ne dépassent pas des absorbances de 0,250.

Tableau 4.4 Données comparatives des deux procédures de dosage

	Procédure Novo Nordisk	Procédure modifiée
Précision de la mesure	10 à 50%	10 à 15%
Limite inférieure de mesure	400 à 500 μM	200 μM
Temps nécessaire pour faire 40 mesures	5 heures	3 heures
Nombre de tubes pour une mesure	4 tubes	2 tubes
Coût du tampon utilisé	48 F/l	5,30 F/l

Grâce à ces études nous disposons d'un outil analytique fiable et plus précis que ceux proposés jusqu'à maintenant dans la littérature. Cet outil est indispensable pour pouvoir évaluer l'immobilisation de l'enzyme. En effet les dosages de protéines classiques ne permettent pas de doser l'acétolactate décarboxylase, en raison des faibles quantités mises en jeu et des nombreuses interférences dans ces différents dosages (tampon, matériaux d'encapsulation).

Nous en venons à l'objectif premier de ce travail : immobiliser l'acétolactate décarboxylase dans des petites sphères.

2. Techniques d'encapsulation mises en oeuvre pour l'acétolactate décarboxylase

L'immobilisation de l'acétolactate décarboxylase a pour buts d'insolubiliser l'enzyme afin de pouvoir la retirer du moût pour la réutiliser. Par analogie aux levures immobilisées en brasserie, notre choix s'est d'abord tourné vers l'inclusion en billes de gel. Deux types de billes de gel ont été mises en oeuvre pour immobiliser l'acétolactate décarboxylase : les billes d'alginate de calcium et les billes de poly(vinyle caprolactame). Outre les billes de gel, les capsules à coeur solide (billes de gel recouvertes) ou liquide sont envisageables. Plusieurs types de membranes ont été testés, qui diffèrent par le matériau mis en oeuvre et les réactions chimiques qui leur donne naissance : les billes d'alginate recouvertes de poly(éthylène imine), les capsules de gélatine réticulée, ou les capsules de complexes polyélectrolytes.

Quelle que soit la méthode d'immobilisation, deux objectifs sont fixés :

- préserver l'activité de l'enzyme lors de l'encapsulation, en choisissant une technique d'immobilisation "douce",
- limiter tout décrochement ou relargage de l'enzyme dans le moût.

Le composé le plus couramment utilisé pour l'immobilisation de cellules est un gélifiant alimentaire : l'alginate de calcium. Il est utilisé pour immobiliser des levures en brasserie, nous avons en premier lieu choisi d'utiliser ce matériau pour l'immobilisation de l'acétolactate décarboxylase.

2.1. Inclusion en billes d'alginate recouvertes de polycation

Le Lan en 1994 a conduit les essais d'immobilisation de Maturex L en billes d'alginate produites par émulsification/gélification interne, avec un recouvrement de poly(éthylène imine) (PEI) ou de chitosane [Le Lan, M., 1994].

Le réseau du gel d'alginate est un réseau lâche. En effet, les concentrations utilisées sont de quelques pourcents en alginate, donc l'eau est majoritaire dans le réseau du gel. Par conséquent, on a souvent recours à un recouvrement des billes d'alginate par un autre réseau plus serré, pour améliorer la rétention de la substance immobilisée.

Les résultats de cette étude montrent des rendements d'encapsulation faibles et une inactivation très rapide des enzymes encapsulées.

Tableau 4.5 Inclusion d'ALDC en billes d'alginate recouvertes de polycation (en % de l'activité introduite)

	Alginate 2% PEI 0,4%	Alginate 2% Chitosane 4 g/l
Rendement d'encapsulation	14%	43%
Activité après 24 heures	6%	3%

L'étude n'a pas permis d'expliquer l'inactivation rapide de l'enzyme immobilisée.

La difficulté majeure de la technique utilisée était de réaliser simultanément le transfert des billes de l'huile à la phase aqueuse et le recouvrement. En effet éliminer les microgouttelettes d'huile de la surface des billes demande de grands volumes de phase aqueuse, et favorise la perte de l'enzyme par diffusion. C'est pour éviter cette perte qu'on introduit dans les solutions de lavage le polymère cationique responsable du recouvrement. Le fait de coupler ces deux opérations ne permet pas de comprendre comment la technique peut être améliorée.

Afin de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu, nous avons séparé les étapes : l'immobilisation a été réalisée après le lavage des billes, par imprégnation.

2.2. Imprégnation de billes d'alginate

L'imprégnation consiste à fabriquer des billes d'alginate sans enzyme par émulsification/gélification interne. Ces billes sont nettoyées et plongées dans une solution d'enzyme afin de s'en imprégner. La diffusion a lieu sous agitation, pendant une nuit, à 4°C. Les billes imprégnées sont ensuite recouvertes de polycation par trempage dans une solution de poly(éthylène imine).

Un profil de diffusion de l'enzyme dans les billes est effectivement observé sur le surnageant (résultat non présenté). Cependant, le rendement d'encapsulation après recouvrement est faible : 3%.

Les deux études d'immobilisation en billes d'alginate pelliculées présentent un rendement d'encapsulation faible. Nous pensons qu'il résulte de deux phénomènes :

- Une partie de l'enzyme est perdue lors du recouvrement, qui s'effectue par trempage. La mesure de l'activité résiduelle dans la solution de trempage est impossible car la poly(éthylène imine) interfère dans le dosage de l'acétoïne. On ne peut donc pas vérifier cette hypothèse.
- L'enzyme est partiellement inactivée lors du contact avec la solution de recouvrement. Cette inactivation serait essentiellement due au pH des solutions utilisées : 11 à 11,5 pour la solution de poly(éthylène imine), 4 à 5 pour celle de chitosane. Le contact avec les solutions de recouvrement dure de 30 minutes à plusieurs heures. Or, une autre étude menée au laboratoire a montré qu'une solution de Maturex L ayant séjourné 35 minutes à pH 9,8 perdait 65% de son activité. D'autre part, le profil d'activité de Maturex L en fonction du pH (chapitre 2, point 3.3.3) montre une perte de 60 à 80% d'activité à pH 4 à 5 comparé à pH 6.

A ce stade de l'étude il nous est apparu que l'inclusion en billes d'alginate de calcium pelliculées n'était pas adéquate pour l'acétolactate décarboxylase.

Une autre solution était envisageable pour immobiliser l'acétolactate décarboxylase en billes de gel par une technique en une seule étape : l'utilisation de poly(vinyl caprolactame).

2.3. Inclusion en billes de poly(vinyl caprolactame)/alginate

L'inclusion en billes de poly(vinyl caprolactame)/alginate donne de bons résultats d'encapsulation avec certaines enzymes (trypsine, carboxypeptidase B [Markvicheva, E. A. *et al.*, 1994]).

Le poly(vinyl caprolactame) est un polymère à gélification thermique : il gélifie par chauffage. La gélification de ce "polymère composite" est donc thermique (poly(vinyl caprolactame)) et ionotropique (alginate). De l'ovalbumine et un polyamide aromatique (POLAR) sont ajoutés au mélange. Le polyamide permet de

stabiliser le gel à température ambiante, tandis que l'ovalbumine a un rôle anti-adhésion des billes entre elles [Markvicheva, E. A. *et al.*, 1991].

Une collaboration avec l'équipe russe spécialiste de ce polymère a été établie pour ce travail (Dr Markvicheva, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscou).

Les mesures d'activité enzymatique réalisées sur les billes et les solutions nécessaires à la fabrication donnent le bilan suivant :

Tableau 4.6 Inclusion en billes de poly(vinyl caprolactame)/alginate

	activité enzymatique, en % de l'activité introduite	précision
billes	5%	2%
bain de gélification	19%	6%
solutions de lavage	24%	7%
solution de stockage (après 24 heures)	0%	1%
<i>bilan en activité :</i>	<i>48%</i>	
billes dissoutes	27%	8%
<i>bilan en activité, avec billes dissoutes :</i>	<i>69%</i>	

Les billes de poly(vinyl caprolactame)/alginate présentent une bonne rétention de l'enzyme puisqu'après 24 heures aucune activité n'est mesurable dans le milieu de stockage. Ces résultats sont meilleurs que l'étude concernant les billes d'alginate pelliculées. Toutefois, l'activité retenue dans les billes est faible, tandis que la perte lors de la fabrication est importante. Enfin l'activité des billes dissoutes est supérieure à celle des billes d'origine (27% contre 5%). Ceci témoigne d'une action inhibitrice du gel sur l'enzyme, ou d'une limitation dans les transferts de masse.

2.3.1. *Activité enzymatique au sein du gel*

Le micro-environnement est un paramètre connu pour influencer l'activité enzymatique. Les billes de poly(vinyl caprolactame)/alginate seraient formées d'une matrice de gel d'alginate de calcium, au sein de laquelle le poly(vinyl caprolactame) serait réparti en gouttelettes. L'enzyme est dissoute dans ce mélange de polymères. Le poly(vinyl caprolactame) est un gel hydrophobe [Markvicheva, E. A. *et al.*, 1991]. Nous avons calculé l'hydrophobicité de l'acétolactate décarboxylase à partir des énergies libres des acides aminés qui la composent.

Tableau 4.7 Hydrophobicité moyenne de l'acétolactate décarboxylase

Acide Aminé	Quantité (n) [Svendsen, I. et al., 1989]	ΔG° (J/mol)	n. ΔG°
Asx	27.1	1105	29946
Thr	28.2	1850	52170
Ser	11.3	170	1918
Glx	35.0	950	33250
Pro	20.9	1850	38591
Gly	15.0	0	0
Ala	16.5	3005	49643
1/2 Cys	0.0	4200	0
Val	19.1	7050	135008
Met	5.3	5450	28721
Ile	8.3	12400	102424
Leu	25.3	10100	255126
Tyr	6.7	12000	80880
Phe	15.8	11100	174936
His	9.7	2100	20349
Arg	3.2	3100	10044
Lys	23.4	6250	146125
Trp	0.0	12550	0
<i>total</i> :	270.7		
hydrophobicité moyenne de l'acétolactate décarboxylase (J/mol) :			4282
-> hydrophobicité moyenne (J/mol) = $(\sum n.\Delta G^\circ)/\sum n$ [Cheftel, J. et al., 1985]			
-> ΔG° énergie libre de transfert d'une mole d'acide aminé d'une solution aqueuse à une solution éthanolique			

La myosine et l'actine, qui sont des protéines hydrophiles, ont des hydrophobicités moyennes de 4 250 et 4 400 J/mol respectivement [Cheftel, J. et al., 1985]. L'acétolactate décarboxylase, avec 4 282 J/mol est donc hydrophile.

L'environnement hydrophobe du gel de poly(vinyl caprolactame) nuit à son activité. Lorsque les billes sont liquéfiées, l'enzyme se retrouve en solution aqueuse favorable à son activité, le poly(vinyl caprolactame) étant déstructuré et dilué.

L'hydrophilicité de l'enzyme peut aussi expliquer sa fuite vers les solutions aqueuses de fabrication ou de lavage, dans lesquelles elle séjourne pendant plus d'une heure lors de la fabrication.

2.3.2. Transferts de masse

Pour expliquer la différence d'activité entre billes entières et liquéfiées, on peut aussi avancer l'argument de la limitation de transfert du substrat dans les billes. Les billes de poly(vinyl caprolactame)/alginate fabriquées sont des sphères de 800 μm de diamètre environ. Il semble, d'après la littérature, que cette taille

permette d'éviter les limitations de transfert. Par contre l'hydrophobicité du gel est une entrave au transfert de l'acétolactate qui est hydrophile. Là encore, la liquéfaction des billes facilite le transfert du substrat (milieu monophasique et plus hydrophile).

Si on considère le bilan global en activité avec les billes dissoutes, on constate une perte d'activité de 31%. La seule explication serait la température et la durée de solidification des billes : 40°C environ, pendant 45 minutes. Ce barème pourrait suffire à dénaturer partiellement l'enzyme. La lenteur de solidification est aussi un facteur néfaste pour un bon rendement d'encapsulation [Poncelet, D. *et al.*, 1995].

Les billes de poly(vinyl caprolactame)/alginate permettent une bonne rétention de l'enzyme immobilisée, comme mentionné dans la littérature, mais ne favorisent pas son activité.

2.4. Encapsulation par polymérisation interfaciale de gélatine

L'encapsulation de l'acétolactate décarboxylase par polymérisation interfaciale de gélatine a été menée au Laboratoire de Fermentations Bioconversions Industrielles [Pasquier, D., 1995].

Les capsules sont obtenues par émulsification d'une solution de gélatine contenant l'enzyme dans du cyclohexane et réticulation par du dichlorure de téréphtaloyle. Les capsules sont ensuite lavées avec du cyclohexane, une solution éthanolique de Tween 20, de l'éthanol et enfin du tampon.

Le rendement d'encapsulation de Maturex L est très faible : 0,5%. La mesure d'activité n'ayant pas été faite sur les différentes solutions servant à la fabrication, on ne peut pas présumer d'un relargage éventuel. Le séjour de l'enzyme dans la solution de gélatine à pH 9,8 est dénaturant : en 35 minutes Maturex L perd 65% de son activité. Les essais à pH plus favorable à l'enzyme (8 et 7) n'ont pas permis d'obtenir des capsules. Par ailleurs le contact avec le cyclohexane et le dichlorure de téréphtaloyle peut être dénaturant pour l'enzyme ; le remplacement du cyclohexane par une huile végétale n'a pas non plus donné de résultats satisfaisants.

La réticulation de la gélatine pour encapsuler l'acétolactate décarboxylase n'a donc pas donné de résultats exploitables. Cette voie a alors été mise de côté.

Pour encapsuler l'acétolactate décarboxylase, il semble donc primordial d'utiliser une technique "sans pH extrême", permettant une bonne rétention. L'emprisonnement dans des capsules de complexes polyélectrolytes a ainsi été envisagé.

2.5. Encapsulation dans une membrane de complexes polyélectrolytes

La formation de capsules par complexation entre le sulfate de cellulose (NaCS) et le poly(diallyl diméthyl ammonium) (PDADMAC) est développée par l'équipe du Professeur Dautzenberg (Université de Potsdam, Teltow, Allemagne). Cette technique est particulièrement intéressante car la réaction formant la membrane est instantanée et a lieu à pH proche de la neutralité.

Une solution de sulfate de cellulose (polymère anionique) contenant l'entité à encapsuler est extrudée dans une solution de chlorure de poly(diallyl diméthyl ammonium) (polymère cationique). Une membrane de complexe insoluble se forme instantanément à la surface des gouttes. La réaction de complexation, c'est-à-dire l'épaississement de la membrane, se poursuit aussi longtemps que le polymère cationique peut migrer vers l'intérieur des capsules. La stoechiométrie du complexe est de 1:1 [Philipp, B. *et al.*, 1979].

2.5.1. Choix des paramètres de fabrication des capsules

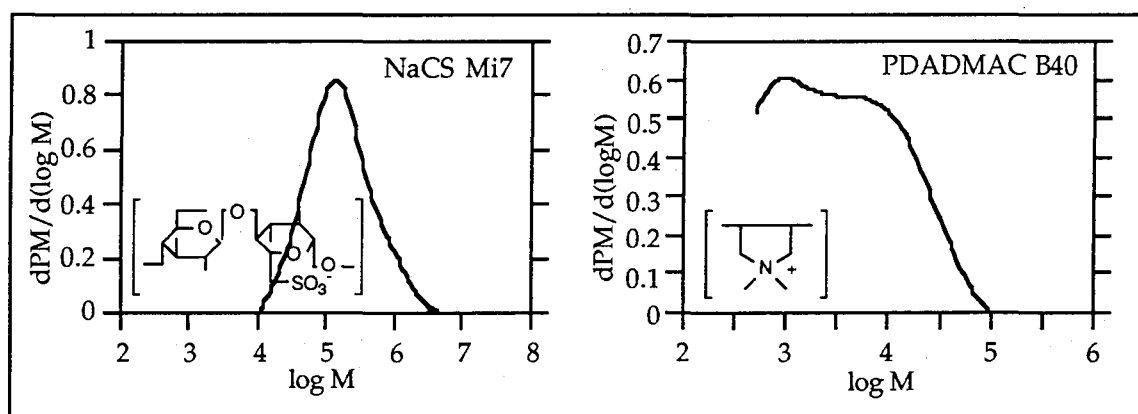
Les lots de polymères à notre disposition donnent naissance à des capsules qui se rétractent visiblement au cours de leur formation. Nous avons cherché à définir des conditions de préparation des capsules permettant de minimiser cette rétraction. En effet, des capsules rétractées sont fragiles vis-à-vis du cisaillement. A contrario, des sphères (capsules gonflées) ont une bonne résistance mécanique.

Parmi les paramètres qui influencent la formation des capsules, certains sont imposés, tandis que d'autres peuvent être modifiés.

□ Les paramètres imposés sont :

- La distribution des poids moléculaires des polymères. Nous disposons des lots appelés Mi7 pour le sulfate de cellulose et du lot B40 pour le poly(diallyl diméthyl ammonium), dont la distribution des poids moléculaires est donnée en Figure 4.13 (d'après [Dautzenberg, H. *et al.*, 1996b]).
- La densité de charge des polymères [Koetz, J. *et al.*, 1986]. Le degré de substitution du lot de sulfate de cellulose Mi7 est de 0,54. Ceci signifie qu'environ la moitié des motifs du polymère portent un groupement sulfate. Le poly(diallyl diméthyl ammonium) porte une charge par motif.
- La taille des gouttes qui formeront des capsules. Nous avons comme objectif d'éviter des limitations de transfert de masse, c'est pourquoi nous fixons la taille des gouttes au minimum permis par le dispositif d'extrusion avec jet d'air coaxial à notre disposition : 800 à 1000 μm .

Figure 4.13 Distribution des poids moléculaires du sulfate de cellulose et du poly(diallyl diméthyl ammonium)



□ Les paramètres qui peuvent être modifiés sont :

- la concentration des solutions de polymère,
- le temps de réaction entre les deux polymères, appelé temps de complexation.

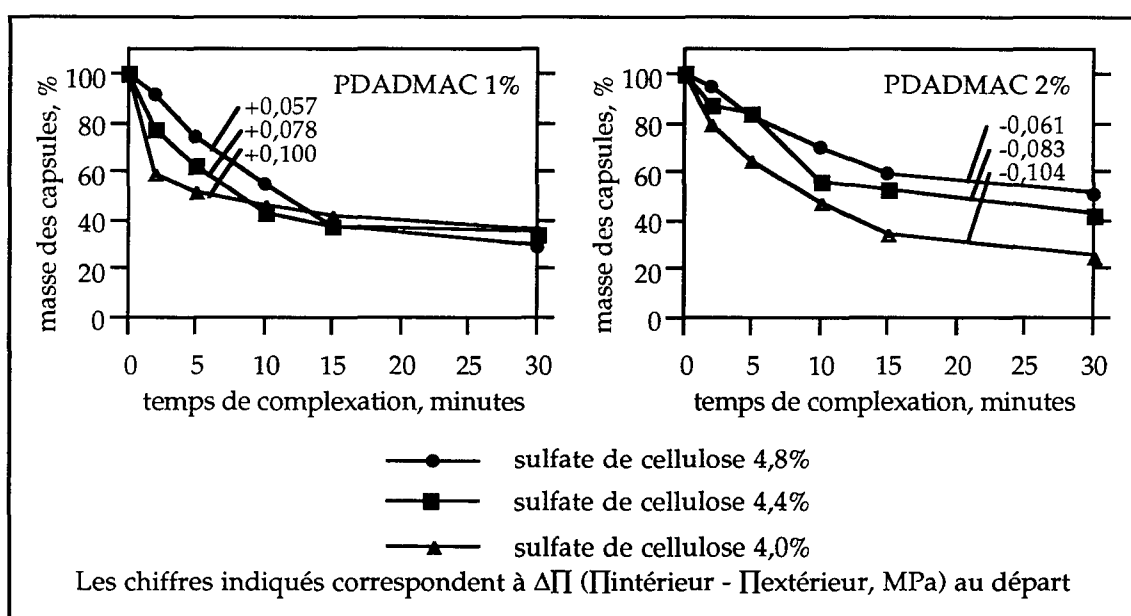
La présence de chlorure de sodium dans les solutions de polymère a également été testée.

2.5.1.1. Effet des concentrations des solutions de polymères

Deux concentrations en poly(diallyl diméthyl ammonium) et trois en sulfate de cellulose ont été testées. Le sulfate de cellulose ne peut pas être extrudé au-delà de 4,8%.

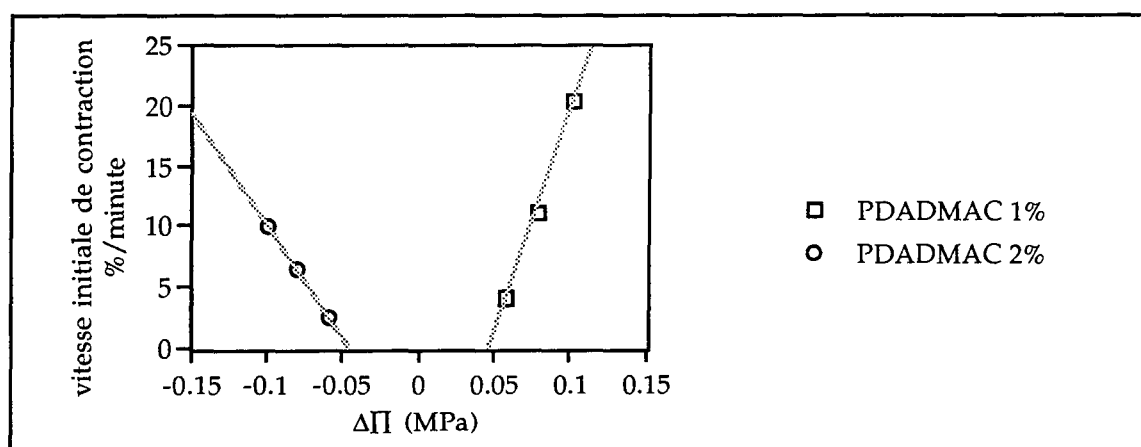
Dans tous les cas, les capsules se rétractent pendant leur formation. Dans le cas où le PDADMAC est à 1%, la vitesse initiale de contraction est affectée par les différentes concentrations, mais pas la masse des capsules à l'équilibre. Par contre à 2% la concentration maximale en sulfate de cellulose donne la plus faible rétraction des capsules.

Figure 4.14 Effet des concentrations des solutions sur la masse des capsules



Dans le cas le plus favorable de ces expériences la rétraction des capsules est d'environ 50% en volume en 30 minutes de complexation. La contraction des capsules en fonction de la différence de pression osmotique, $\Delta\Pi$, ne semble pas répondre à un mécanisme simple. Les vitesses initiales de contraction montrent la répartition suivante :

Figure 4.15 Vitesses initiales de contraction des capsules en fonction de la différence de pression osmotique au départ



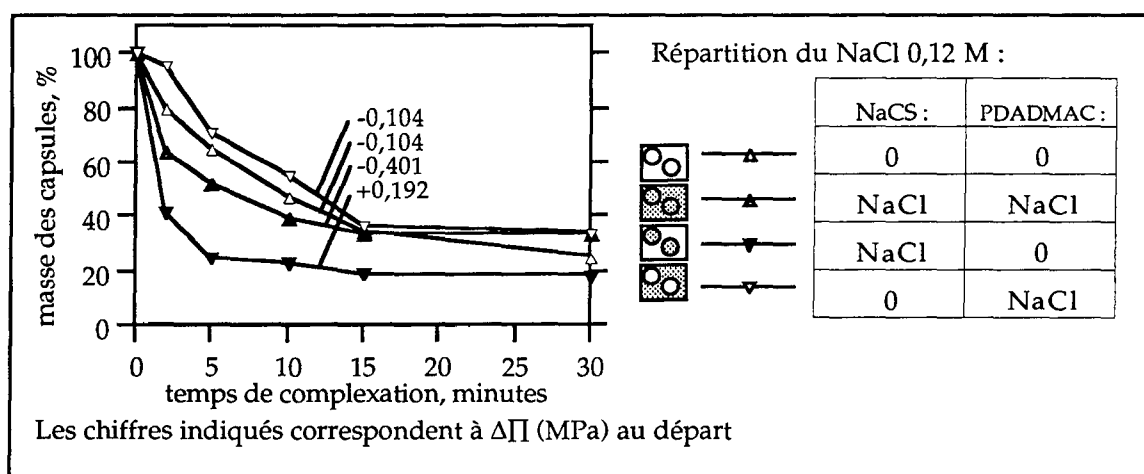
Plus on s'écarte de l'équilibre entre les pressions osmotiques, plus la vitesse initiale de contraction est importante. Pour minimiser la rétraction des capsules, il semble donc opportun de s'approcher de l'égalité des pressions osmotiques au départ.

Les phénomènes osmotiques ont donc un rôle non négligeable au cours de la formation des capsules. Par contre les droites passant à travers les points ne coupent pas l'axe de abscisses en zéro. En d'autres termes, une différence de pressions osmotiques nulle au départ ne semble pas suffire pour éviter la rétraction des capsules.

2.5.1.2. Effet de la présence de chlorure de sodium dans les solutions

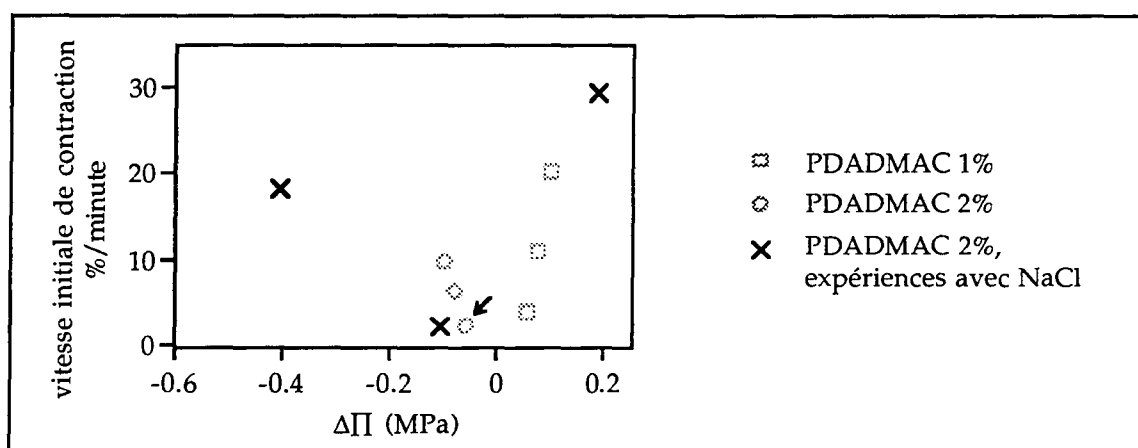
La présence de composés de faible poids moléculaire comme le chlorure de sodium influence la réaction de complexation. En effet, les ions se répartissent le long des chaînes de polymère et jouent un rôle protecteur. La réaction de complexation en est ralentie et la diffusion du polymère cationique vers l'intérieur des capsules est facilitée. L'effet de la présence de chlorure de sodium 0,12 M dans l'une et/ou l'autre solution de polymère donne les profils de masse suivants :

Figure 4.16 Effet du chlorure de sodium sur la masse des capsules



A partir de ces courbes, les vitesses initiales de rétraction des capsules ont été calculées.

Figure 4.17 Répartition des vitesses initiales de contraction en fonction de la différence de pression osmotique au départ



Ces résultats confirment notre première observation concernant la balance des pressions osmotiques : plus on s'écarte de l'équilibre, plus les vitesses initiales de contraction sont importantes. La rétraction des capsules est d'environ 50% pour toutes les expériences réalisées. Nous avons pris le parti de choisir les conditions expérimentales donnant la vitesse de contraction minimale, dans un souci de solidité des capsules. En effet, on peut penser qu'entre deux membranes d'épaisseur égale, celle ayant subi les déformations les moins brutales sera la plus solide. Ainsi les conditions opératoires retenues sont notées d'une flèche sur le graphe.

Les mécanismes gouvernant la rétraction des capsules sont plus complexes qu'une simple loi osmotique. En se formant, la membrane des capsules isole deux compartiments contenant des composés osmotiques diffusibles. Il s'établit des transferts selon les lois de Donnan, ayant pour conséquence une polarisation entre les deux compartiments. En effet, dans le compartiment intérieur la complexation du sulfate de cellulose fait chuter le nombre de charges négatives, tandis qu'à l'extérieur la variation du nombre de charges positives est négligeable devant le grand volume. Si on considère que la rétraction des capsules est une conséquence d'une fuite d'eau de l'intérieur vers l'extérieur et que ce transfert suit les lois osmotiques, le compartiment intérieur est donc hypotonique ($\Pi_{\text{intérieur}} < \Pi_{\text{extérieur}}$). La tonicité de ce compartiment étant due aux ions sodium on peut imaginer que ces ions aient d'abord fui vers le compartiment extérieur.

Par ailleurs il est aussi possible que la perte de masse des capsules soit due au mécanisme d'établissement de la membrane elle-même. La formation de certains complexes s'accompagne d'une synérèse, c'est-à-dire une contraction du réseau tridimensionnel avec expulsion d'eau. Aucune étude ne permet actuellement de statuer sur cette hypothèse.

La rétraction des capsules au cours de leur formation semble difficilement évitable ; quelques cas sont relatés dans la littérature, mais avec d'autres lots de polymères. Dans notre cas nous avons donc opté pour les conditions opératoires suivantes :

- sulfate de cellulose 4,8%,
- chlorure de poly(diallyl diméthyl ammonium) 2%, ce qui correspond à une différence de pression osmotique de -0,104 MPa au départ et à une vitesse initiale de contraction de 3%/minute en volume ;
- temps de complexation 10 minutes.

Ces conditions permettent de fabriquer des capsules suffisamment solides pour être manipulées à la spatule.

25.1.3. Taux de conversion du sulfate de cellulose

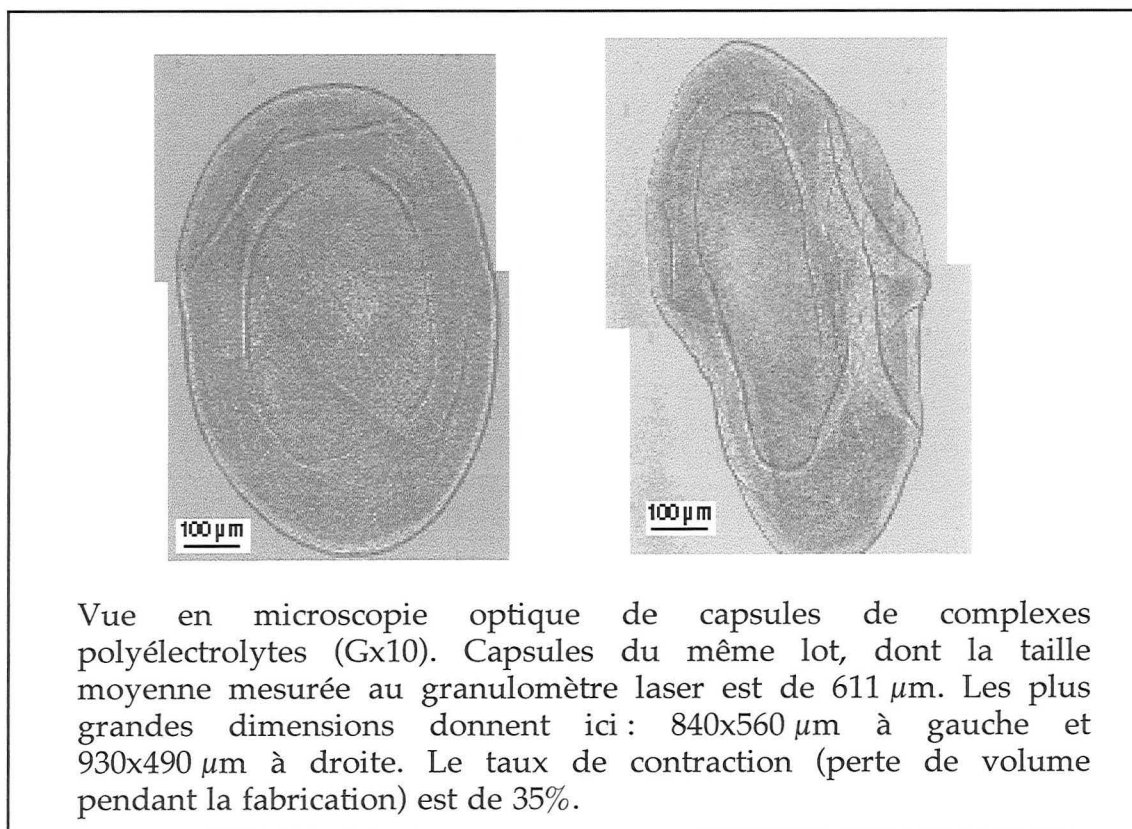
Le pourcentage de sulfate de cellulose impliqué dans le complexe polyélectrolyte formant la membrane a été mesuré, il est de 90%. Un taux aussi élevé est donné pour des capsules ayant séjourné 1 à 2 heures dans le bain de poly(diallyl diméthyl ammonium). Dans notre cas le temps de complexation est de seulement 10 minutes. Ce fort taux de conversion s'explique par la petite taille de nos capsules : la surface d'échange est plus grande (0,5 mg en moyenne/capsules dans notre cas contre 15 mg environ dans le cas cité) [Dautzenberg, H. *et al.*, 1996b].

2.5.2. Résultats de l'encapsulation dans une membrane de complexes polyélectrolytes

25.2.1. Aspect, taille et épaisseur de membrane des capsules

Les capsules de complexes polyélectrolytes apparaissent comme des sphères blanches, opaques, légèrement rétractées. Elles ont une solidité suffisante pour être manipulées à la spatule, être filtrées et rincées sous un jet de liquide. L'observation des capsules au microscope met l'accent sur leur aspect contracté, comme le montre la figure suivante.

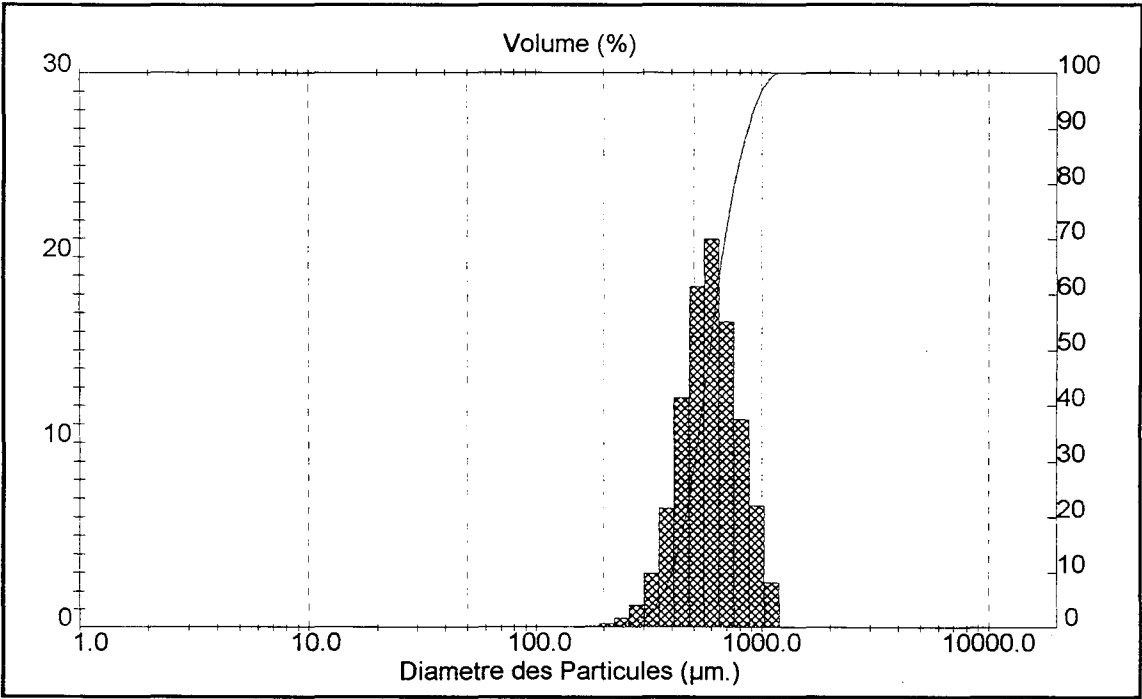
Figure 4.18 Aspect des capsules de complexes polyélectrolytes



La taille moyenne des capsules présentées en Figure 4.18 est de 611 μm de diamètre (diamètre de la sphère ayant le même volume). Pour comparaison, une levure fait 5 à 10 μm de long et 4 à 8 μm de large, soit 100 fois moins en dimensions, et 10^6 fois moins en volume.

La distribution de tailles des capsules présente un profil gaussien et unimodal : les capsules sont donc monodispersées.

Figure 4.19 Exemple de distribution de tailles de capsules de complexes polyélectrolytes



La taille moyenne des capsules se situe selon les essais entre 600 et 850 μm en assimilant les capsules à des sphères.

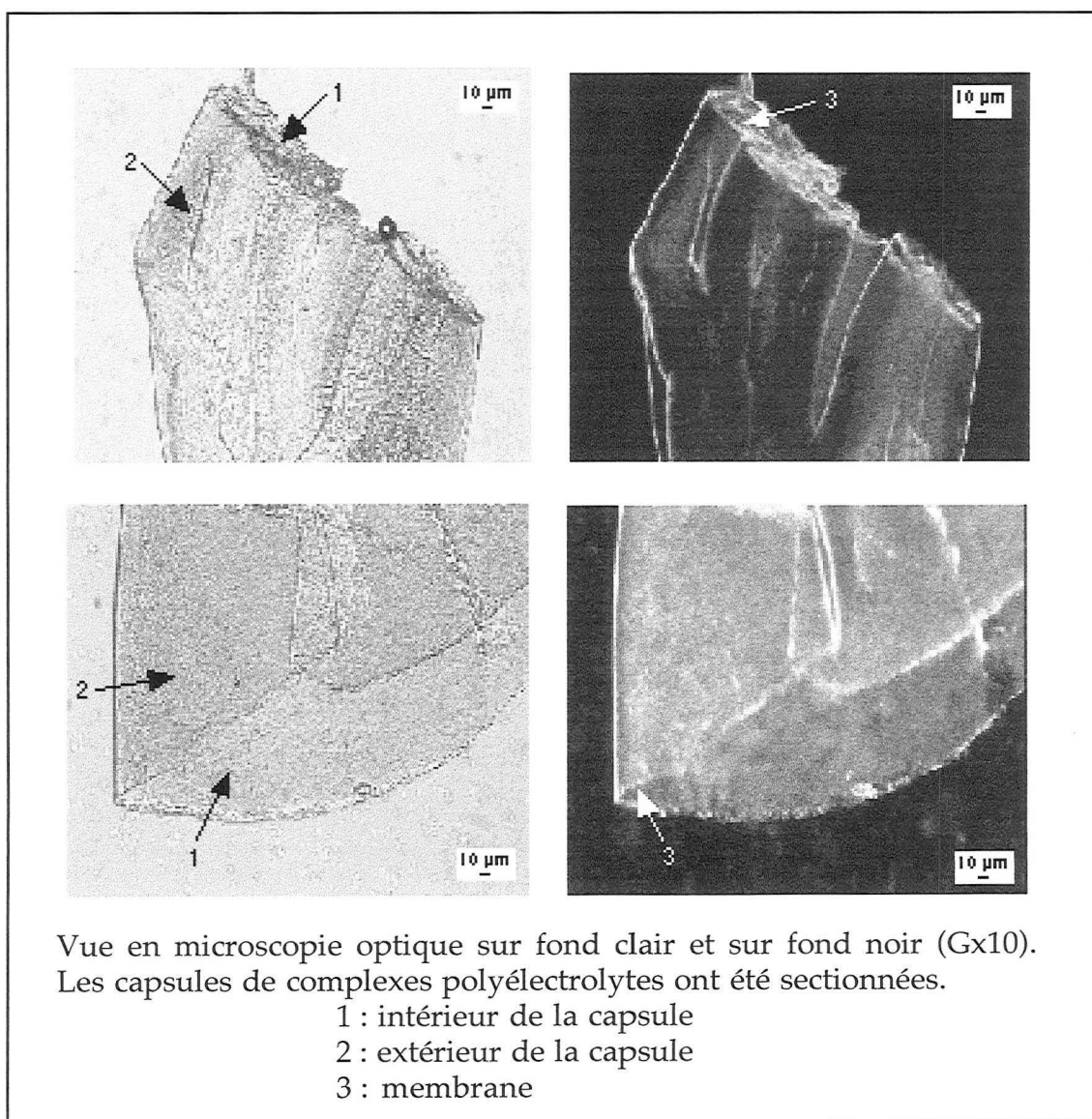
Tableau 4.8 Exemples de caractéristiques de distribution de tailles

diamètre moyen	span	écart type
611 μm	0,792	30.7%
736 μm	0,649	25.2%
844 μm	0,832	32.2%
• Le span donne la largeur de la bande centrale contenant 80% des particules • Écart-type = $\text{span}/2,58$ • 80% des particules se trouvent dans l'intervalle [moyenne +/- écart-type/2]		

La taille des capsules est en accord avec les recommandations de la littérature pour éviter les limitations de transferts de masse [Norton, S. *et al.*, 1994]. L'écart-type est de 30% environ. Les meilleurs résultats de la littérature est de 10% (même type de dispositif de fabrication) mais pour des billes d'alginate de calcium [Poncelet, D. *et al.*, 1992b].

L'observation de la membrane est possible sur des capsules sectionnées. La figure suivante représente des demi-capsules. L'épaisseur de la membrane est estimée à une dizaine de microns.

Figure 4.20 Épaisseur de la membrane des capsules de complexes polyélectrolytes



Le ratio de volume occupé par la membrane dans la capsule peut être estimé. Pour des sphères de 800 μm de diamètre et une membrane d'épaisseur 10 μm , ce ratio est de 7% en volume.

2.5.2.2. Activité de l'enzyme encapsulée

Les résultats en termes de rendements d'encapsulation sont présentés sous forme de tableau (Tableau 4.9). L'activité est mesurée :

- sur les capsules,
- sur une solution d'enzyme de même concentration en milieu tampon ("enzyme libre"),
- sur des capsules désagrégées, afin de se rendre compte d'éventuelles limitations de transfert de masse,
- sur la solution d'enzyme et de sulfate de cellulose ayant servi à fabriquer les capsules ("enzyme dans NaCS") afin de vérifier l'effet du microenvironnement sur l'activité enzymatique.

Tableau 4.9 Rendements d'encapsulation

	capsules/ enzyme libre	capsules désagrégées/ enzyme libre	capsules/ enzyme dans NaCS	enzyme dans NaCS/ enzyme libre	volume des capsules/ volume initial
	60%				55%
	75%			43%	55%
	54%		65%	82%	60%
	65%		93%	71%	49%
	79%	91%	87%	91%	46%
	83%	106%	113%	42%	66%
moyenne :	69%		90%	66%	55%

Les capsules présentent une activité comprise entre 50 et 80% par rapport à l'enzyme libre selon les expériences. Ce rendement est satisfaisant comparé aux autres techniques d'encapsulation d'enzymes.

L'activité de l'enzyme dispersée dans une solution de sulfate de cellulose varie fortement d'une expérience à l'autre, d'où les valeurs fluctuantes pour les ratios faisant intervenir cette grandeur. Ce phénomène peut être attribué à la difficulté d'incorporation de la solution d'enzyme à la solution de sulfate de cellulose qui est fortement visqueuse :

- 96 N.m⁻².s⁻¹ pour une solution à 6%,
- 47 N.m⁻².s⁻¹ pour une solution à 4,8%.

Cette opération est délicate à mener sur les petites quantités manipulées (5 à 10 ml). Les aliquotes prélevés sont donc hétérogènes et conduisent à ces valeurs disparates. Pour améliorer cette mesure on ne peut pas envisager de réduire la viscosité de la solution de sulfate de cellulose, car c'est un paramètre nécessaire à la fabrication des capsules [Prokop, A. *et al.*, 1998]. Pour améliorer l'homogénéité de ce mélange, il faudrait donc pouvoir travailler sur des quantités plus importantes, au détriment du coût de chaque expérience. L'éventuelle hétérogénéité du mélange ne se répercute pas sur les capsules, car leur activité est mesurée sur des lots (300 mg, soit environ 600 capsules).

L'activité de capsules désagrégées (broyées) comparée à l'enzyme libre montre que la membrane des capsules permet les transferts de masse nécessaires aux conditions de mesure d'activité.

Enfin, le taux de contraction des capsules est cohérent avec les expériences préliminaires.

Ces mesures (aspect, taille, activité) sont des mesures initiales. Nous avons ensuite mesuré la stabilité physique et catalytique des capsules.

2.5.3. *Études de stabilité des enzymes encapsulées*

L'étude de stabilité de l'acétolactate décarboxylase encapsulée a comporté deux volets :

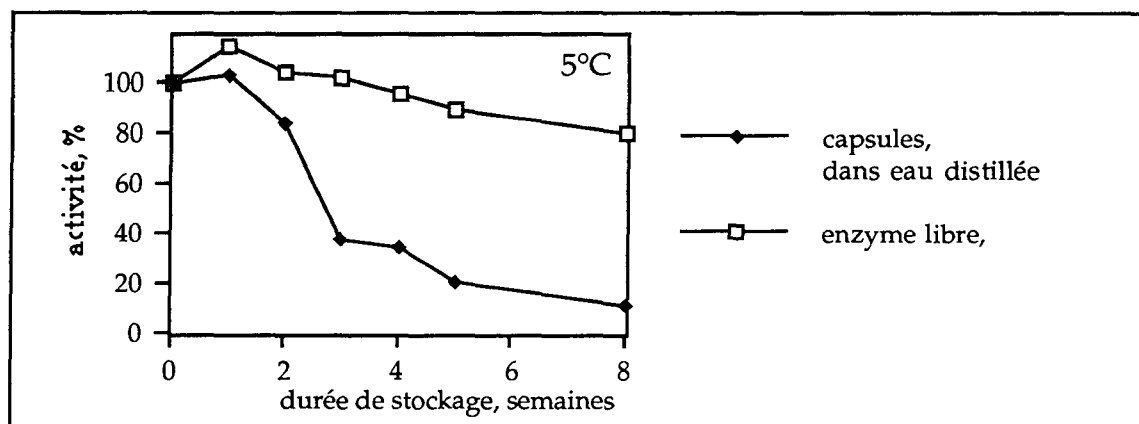
- une étude de conservation au stockage, menée à 5°C dans un milieu tampon,
- une étude de stabilité "à l'utilisation", menée à 15°C, dans un milieu bière.

2.5.3.1. Conservation au stockage

Plaçons-nous dans le rôle d'un fabricant d'enzymes, qui souhaiterait proposer une formulation "encapsulée" à ses clients. Les délais entre la fabrication et l'utilisation sont tels que la préparation doit être stable pendant plusieurs mois. Une préparation enzymatique est souvent stockée en chambre froide ; par ailleurs pour limiter le nombre de paramètres nous avons choisi de laisser les capsules en milieu liquide.

Le graphe suivant montre le comportement des capsules au stockage.

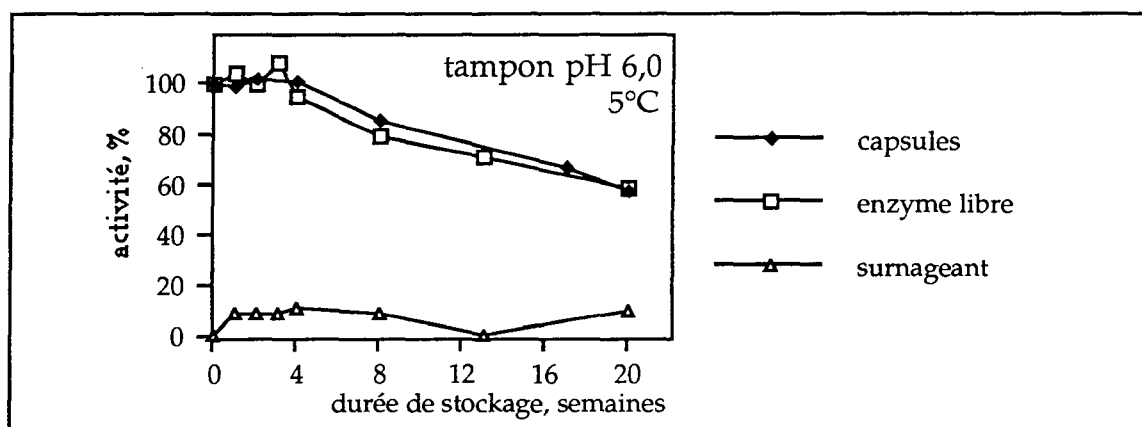
Figure 4.21 Stabilité des capsules au stockage dans l'eau



Les capsules ont été stockées dans de l'eau distillée, alors que l'enzyme libre est dissoute dans un tampon maléate à pH 6,0. L'activité des capsules stockées dans de l'eau chute fortement : perte de 50% en deux semaines. Ce résultat nous incite à penser que l'enzyme nécessite une certaine pression osmotique dans le milieu pour favoriser leur stabilité. L'enzyme libre stockée dans un tampon à pH 6,0 semble par ailleurs relativement stable : 80% de l'activité initiale est retrouvée après deux mois de stockage.

Le stockage des capsules en milieu tampon donne les résultats suivants (moyenne de deux expériences) :

Figure 4.22 Stabilité des capsules au stockage



Ce graphe nous montre que l'encapsulation de l'acétolactate décarboxylase n'altère en rien sa stabilité : enzyme libre et encapsulée présentent le même profil.

Après 20 semaines, soit 5 mois de stockage, l'activité des enzymes est de 57%. Si on considère qu'un stockage en milieu aqueux n'est pas favorable au maintien de l'activité enzymatique, ce résultat est tout-à-fait satisfaisant.

On constate un léger relargage d'enzyme : environ 10%, qui n'évolue pas avec le temps. Ce phénomène est un inconvénient pour notre application. La constance de cette mesure peut s'expliquer de deux manières différentes :

- soit la membrane des capsules laisse diffuser l'enzyme

Alors, l'établissement d'un équilibre de Donnan se matérialise par la sortie d'une fraction de l'enzyme. A pH 6,0 l'enzyme peut en effet être faiblement chargée positivement (son point isoélectrique est de 7,2) et se comporter comme un électrolyte diffusible si la membrane la laisse passer. Toutefois cette hypothèse nous semble peu probable car à l'intérieur de la capsule le sulfate de cellulose résiduel est chargé négativement. En conséquence les interactions électrostatiques sont en faveur de la rétention de l'enzyme.

- soit le complexe polyélectrolyte est instable

Les amines interfèrent dans le dosage de l'acétoïne. Le poly(diallyl diméthyl ammonium) pourrait être libéré dans le milieu par dissociation du complexe polyélectrolyte. La valeur mesurée serait alors un artefact. Une dissociation du complexe est néanmoins dommageable pour notre application.

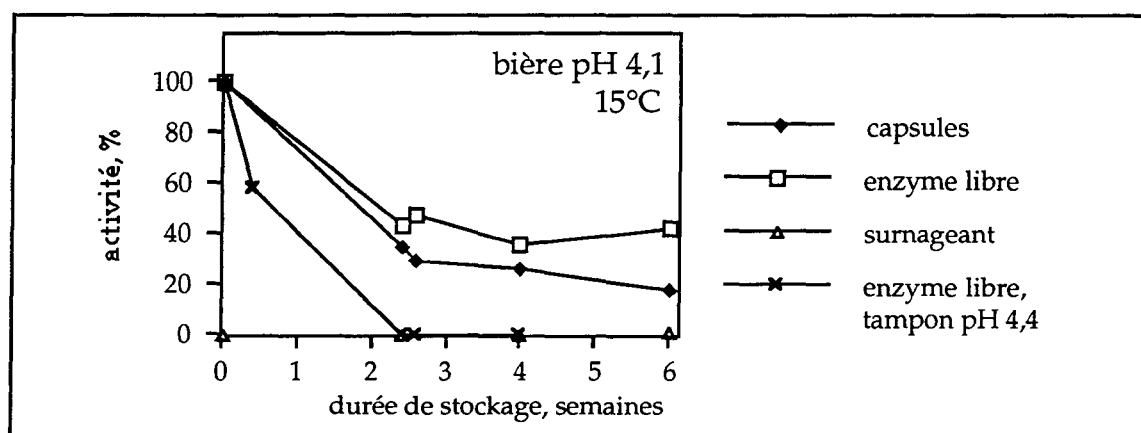
L'étude suivante consiste à placer les capsules dans des conditions d'utilisation.

2.5.3.2. Stabilité dans la bière

Pour mener l'étude de stabilité à l'utilisation, nous nous sommes placés à 15°C, dans un milieu bière. Une stabilité de 80% sur 4 à 5 cycles de fermentation, c'est-à-dire 4 à 5 semaines serait acceptable.

L'activité de capsules placées dans de la bière dégazée à 15°C a été mesurée sur 6 semaines. Les témoins consistaient en une solution d'enzyme libre dissoute dans le même lot de bière dégazée et en une solution d'enzyme libre dans un tampon acétate à pH 4,1.

Figure 4.23 Stabilité des capsules pendant l'utilisation



Libre ou encapsulée, l'enzyme perd 60 à 70% de son activité en 15 jours ce qui correspond à la durée de 2 cycles de fermentation. Au-delà de ces 15 premiers jours, l'activité se stabilise.

Pour l'application des capsules à la fermentation de la bière il faut donc prendre en considération la deuxième partie de la courbe. L'enzyme encapsulée devrait donc être introduite en excès au début de la fermentation pour assurer l'activité suffisante sur les cycles suivants. Ou bien, on peut envisager d'ajouter des capsules d'enzyme à chaque début de cycle afin de pallier la perte d'activité.

L'enzyme dissoute dans un tampon perd 100% de son activité après quinze jours de stockage, alors qu'en milieu bière il reste 40% de l'activité, malgré le facteur pH défavorable au milieu bière : 4,1 contre 4,4 (symboles carrés contre croix sur le graphique). Comme évoqué pour la première expérience de stabilité au stockage dans l'eau distillée (Figure 4.21), on peut penser qu'une certaine pression osmotique est nécessaire au maintien de l'activité de l'enzyme (pression osmotique de la

bière>au tampon). Il pourrait aussi s'agir de l'effet protecteur exercé par un des composant de la bière.

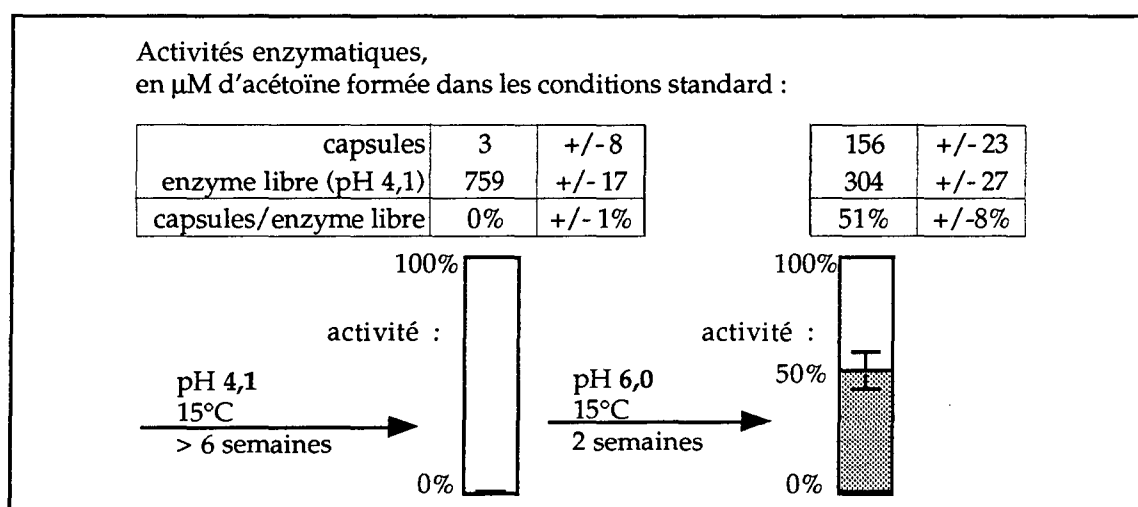
Le relargage de l'enzyme n'est pas observé dans le milieu bière (symboles triangulaires sur le graphe). L'hypothèse d'instabilité du complexe polyélectrolyte avancée dans l'étude de stabilité en milieu tampon (Figure 4.22) n'est donc pas vérifiée. Ce point est positif pour l'application à la fermentation de la bière.

L'expérience présentée ici n'a pas pu être menée au-delà de 6 semaines en raison de contaminations microbiennes. A 15°C dans un milieu bière, des levures se développent et l'activité mesurée n'est plus représentative. Malheureusement aucun agent anti-microbien ne pouvait être envisagé en raison des interférences qu'il produisent lors du dosage de l'acétoïne.

L'activité de l'acétolactate décarboxylase est fortement dépendante du pH : elle chute de 70% entre pH 6,0 et 4,0. Il pourrait s'agir d'un changement de conformation tridimensionnelle dû à l'acidité du milieu. On peut se demander si un pH de 4 agit de la même façon sur la *stabilité* de l'enzyme. Pour vérifier ce point, nous avons testé la réversibilité de l'inhibition par le pH.

Des capsules stockées à pH 4,1 dans de la bière et ayant perdue la totalité de leur activité enzymatique sont placées à pH 6,0 dans un milieu tampon. Après 15 jours à 15°C, une reprise d'activité partielle est observée : 51% de l'activité initiale est retrouvée.

Figure 4.24 Test de réversibilité de l'inhibition de l'ALDC par le pH



Cette expérience montre que l'inhibition de l'activité acétolactate décarboxylasique est partiellement réversible. Ce résultat serait donc plutôt en faveur d'une stabilisation de l'activité des capsules au-delà de 6 semaines de stockage dans la bière. Toutefois, comme le pH de la bière ne peut pas être modifié jusqu'à une valeur de 6,0 comme ici, cette caractéristique de l'enzyme ne peut pas être mise à profit pour l'application.

2.6. Conclusion sur l'encapsulation

L'encapsulation de l'acétolactate décarboxylase a été envisagée par plusieurs approches. L'inclusion en billes de gel a montré ses limites car la diffusion de l'enzyme pendant la fabrication a donné des rendements trop faibles. La petite taille de l'enzyme a donc été une entrave pour l'application de ces méthodes.

L'emprisonnement d'acétolactate décarboxylase dans des membranes de gélatine réticulée aurait par ailleurs pu être une méthode satisfaisante. Toutefois, les pH extrêmes nécessaires pendant la fabrication des capsules ont été néfastes à l'activité de l'enzyme. Dans ce cas c'est donc la sensibilité de l'acétolactate décarboxylase vis-à-vis des pH extrêmes qui a fait échouer la technique.

Enfin l'encapsulation dans des membranes de complexes polyélectrolytes est une méthode efficace pour immobiliser l'acétolactate décarboxylase. Ses principaux atouts sont de pouvoir opérer à pH proche de la neutralité, et de permettre un contrôle de la porosité de la membrane. Cette technique d'encapsulation permet d'avoir 80% d'activité par rapport à l'enzyme libre. La fuite de l'enzyme n'est pas observée dans la bière. D'autre part l'encapsulation ne modifie pas le comportement de l'enzyme en termes de stabilité d'activité au cours du temps.

L'enzyme native est peu active au pH acide de la bière. Or, l'enzyme encapsulée présente le même comportement. Cette inactivation est néfaste à un bon rapport durée d'utilisation/prix des capsules d'acétolactate décarboxylase. Pour améliorer ce paramètre il faudrait donc mener une étude de stabilisation de l'enzyme.

3. Modélisation de la fermentation de la bière

Nous sommes en possession d'une méthode efficace pour encapsuler l'acétolactate décarboxylase dans des petites sphères. Grâce au bon taux de rétention et aux conditions d'encapsulation particulièrement douces, l'activité des capsules est satisfaisante. Même si la stabilité de l'activité pourrait être améliorée, il nous est apparu intéressant de tester les capsules au cours d'une fermentation de bière.

Les essais sur fermentations réelles prennent du temps et sont coûteux. Pour nous permettre d'avancer plus vite sur ce travail, nous avons choisi de procéder par modélisation mathématique.

La modélisation nous permet de simuler une fermentation de bière. La présence d'acétolactate décarboxylase sous forme libre et encapsulée est facilement introduite dans le modèle. Ainsi, on pourra envisager la façon optimale d'utiliser les capsules.

Une question-clé vis-à-vis de ce modèle est de savoir si les transferts à travers la membrane des capsules sont suffisants pour consommer l'acétolactate et accélérer la fermentation. Il est par ailleurs intéressant de déterminer la durée d'une fermentation avec l'acétolactate décarboxylase encapsulée.

Dans un premier temps, nous allons décrire les hypothèses posées pour faire cette modélisation. Ensuite nous calculerons des constantes à partir de courbes expérimentales. Enfin nous appliquerons le modèle aux différents cas de figure : fermentation principale ou maturation, avec ou sans enzyme.

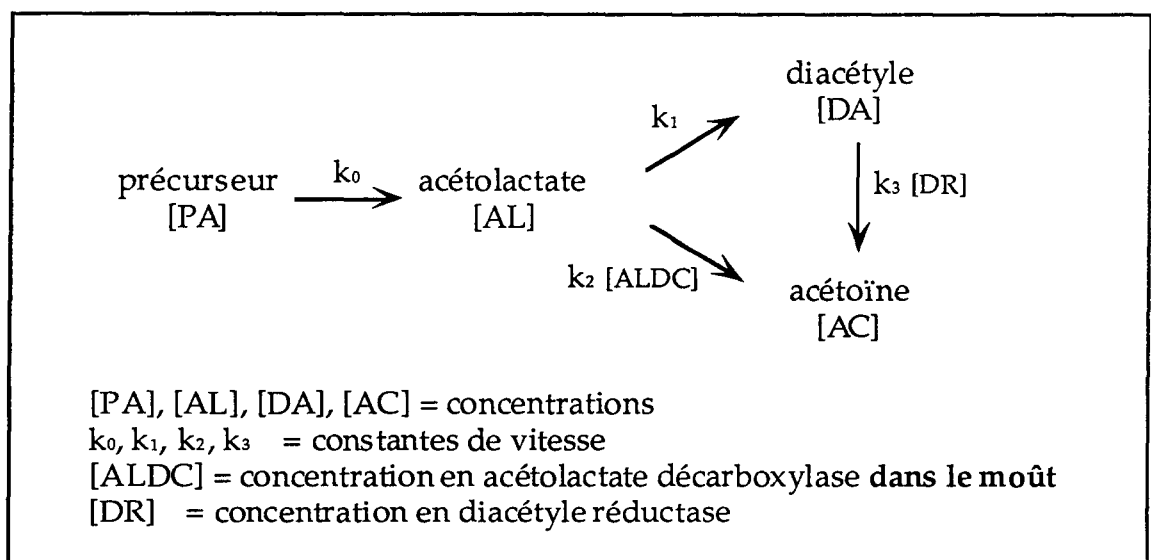
3.1. Principes du modèle

Le travail a été réalisé selon les hypothèses suivantes :

- L'acétolactate apparaît dans le moût par transformation d'un précurseur. D'après Engasser [Engasser, J. M. *et al.*, 1981] on peut considérer que le précurseur de l'acétolactate est une fraction des sucres totaux fermentescibles. Nous avons considéré l'apparition d'acétolactate comme étant d'ordre un, avec un coefficient constant sur toute la durée de la fermentation.
- L'acétolactate est ensuite transformé en diacétyle par décarboxylation oxydative spontanée. Nous avons mesuré cette réaction, il s'agit d'un ordre un.
- Le diacétyle est converti en acétoïne par les levures *via* la diacétyle réductase.
- En présence d'acétolactate décarboxylase, l'acétolactate est aussi transformé en acétoïne.

Nous avons ainsi le schéma d'inter-relations suivant :

**Figure 4.27 Schéma de compréhension de la modélisation
(en absence de capsules d'acétolactate décarboxylase)**

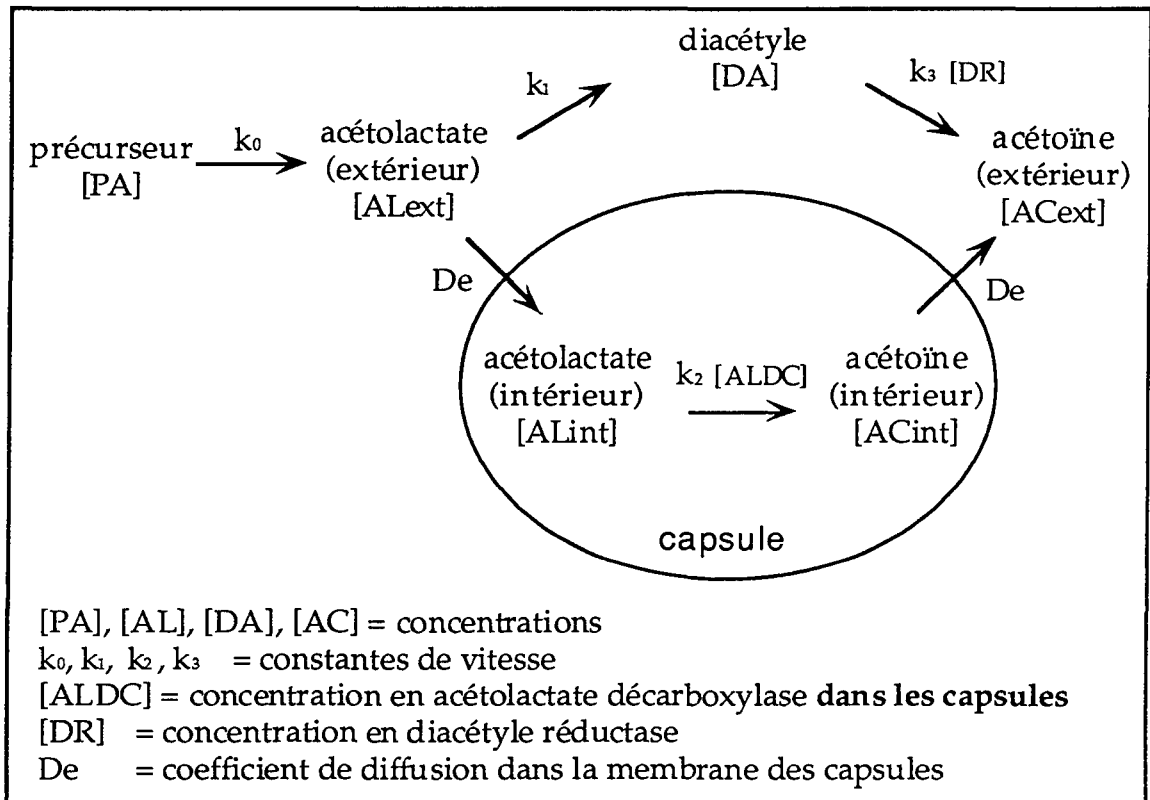


L'évolution des différentes concentrations est rendue possible par la résolution d'un système d'équations :

$$\begin{aligned} d[PA]/dt &= -k_0 [PA] \\ d[AL]/dt &= k_0 [PA] - k_1 [AL] - k_2 [ALDC][AL] \\ d[DA]/dt &= k_1 [AL] - k_3 [DR][DA] \\ d[AC]/dt &= k_2 [ALDC][AL] + k_3 [DR][DA] \end{aligned}$$

Dans le cas où des capsules d'acétolactate décarboxylase sont introduites dans la bière en fermentation, il faut prendre en compte le transfert de l'acétolactate et de l'acétoïne à travers la membrane des capsules. Nous avons considéré ces transferts comme étant dus à une diffusion. Ils répondent à la Loi de Fick, c'est-à-dire que le moteur de leur déplacement est le gradient de concentration de part et d'autre de la membrane.

**Figure 4.28 Schéma de compréhension de la modélisation
(en présence de capsules d'acétolactate décarboxylase)**



Le système d'équations à résoudre est alors :

$$\begin{aligned}
 d[PA]/dt &= -k_0 [PA] \\
 d[ALext]/dt &= k_0 [PA] - k_1 [ALext] - (De A)/\delta ([ALext] - [ALint]) \\
 d[ALint]/dt &= (De A)/(\delta \alpha) ([ALext] - [ALint]) - k_2 [ALDC][ALint] \\
 d[DA]/dt &= k_1 [ALext] - k_3 [DR][DA] \\
 d[ACint]/dt &= k_2 [ALDC][ALint] - (De A)/\delta ([ACint] - [ACext]) \\
 d[ACext]/dt &= (De A \alpha)/\delta ([ACint] - [ACext]) + k_3 [DR][DA]
 \end{aligned}$$

Avec : De : coefficient de diffusion de l'acétolactate et de l'acétoïne dans la membrane des capsules ($m^2.s^{-1}$),
 A : aire interfaciale (m^{-1}),
 δ : épaisseur de la membrane (m),
 α : concentration volumique des capsules (%).

Pour cette étude nous distinguerons :

- la fermentation principale de la maturation,
- une fermentation discontinue "classique" d'une fermentation accélérée sur levures immobilisées.

Pour une fermentation discontinue "classique" nous avons considéré que la fermentation principale se déroulait à 10-15°C, pendant 5 jours, suivi le cas échéant d'une maturation à 0°C. La maturation dure jusqu'à ce que le taux de diacétyle devienne inférieur à son seuil de perception dans la bière : 0,15 mg/l soit 1,7 $\mu\text{mol/l}$.

Dans le cas des levures immobilisées, la fermentation de la bière est accélérée par l'augmentation de la densité cellulaire et par des changements dans le métabolisme de la levure du fait de l'immobilisation. Dans le modèle ces phénomènes seront matérialisés par l'augmentation des constantes de vitesse k_0 (transformation des précurseurs en acétolactate) et k_3 (transformation du diacétyle en acétoïne par les diacétyle réductases).

L'acétolactate décarboxylase peut être utilisée sous forme libre ou encapsulée. Nous avons fixé le taux de capsules à introduire dans les tanks à 1% (α). D'autre part, l'acétolactate décarboxylase peut être utilisée pendant la maturation, ou pendant la fermentation principale. Les cas qui sont présentés ici sont regroupés dans le tableau suivant.

Tableau 4.10 Schémas de fermentations modélisés

Cas d'une fermentation "classique"		
fermentation principale (5 jours)	maturation	figures
sans ALDC	sans ALDC	4.31 + 4.32
sans ALDC	2 mg/l d'ALDC libre	4.31 + 4.33
avec 2 mg/l d'ALDC libre	(sans maturation)	4.34
avec 2 mg/l d'ALDC encapsulée	(sans maturation)	4.35
Cas d'une fermentation accélérée		
fermentation principale (2 jours)	maturation	figures
sans ALDC	(sans maturation)	4.37
avec 2 mg/l d'ALDC libre	(sans maturation)	4.38
avec 2 mg/l d'ALDC encapsulée	(sans maturation)	4.39

La modélisation a été réalisée avec le logiciel de calcul Mathcad, qui fait appel à une certaine syntaxe. Les fichiers de construction du modèle sont donnés sous forme de figures.

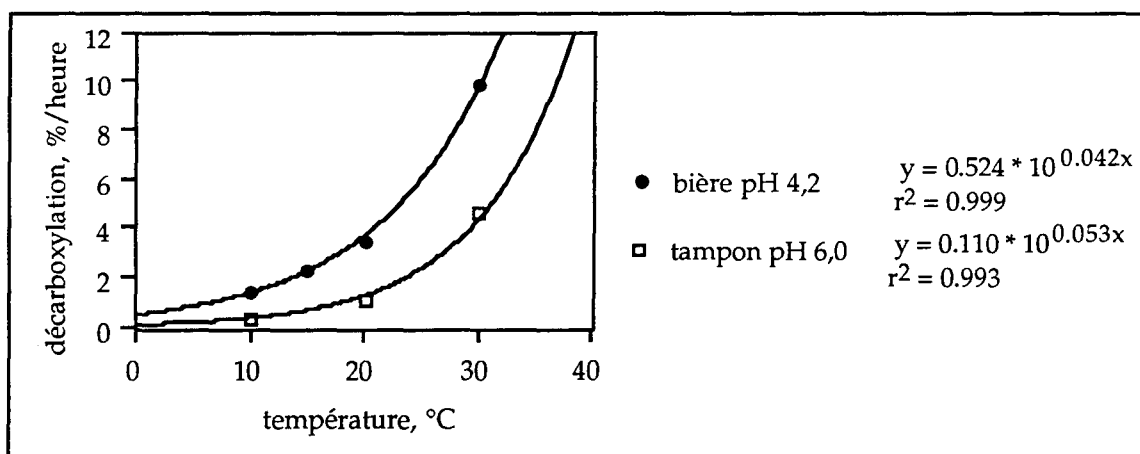
Avant de présenter les résultats voyons d'abord comment certaines constantes ont été calculées, et quelles valeurs initiales ont été attribuées aux variables.

3.2. Calcul des constantes

3.2.1. Décarboxylation de l'acétolactate

La décarboxylation spontanée de l'acétolactate a été mesurée en milieu bière, à pH 4,2 (point 1.3.2, page 4-10). En appliquant l'équation de régression exponentielle, on obtient une vitesse de décarboxylation spontanée à 15°C de 2,23 %/h soit une constante d'ordre un de $0,54 \text{ j}^{-1}$ (k_1) pour la fermentation principale. Pour la maturation (0°C) cette constante vaut $0,12 \text{ j}^{-1}$.

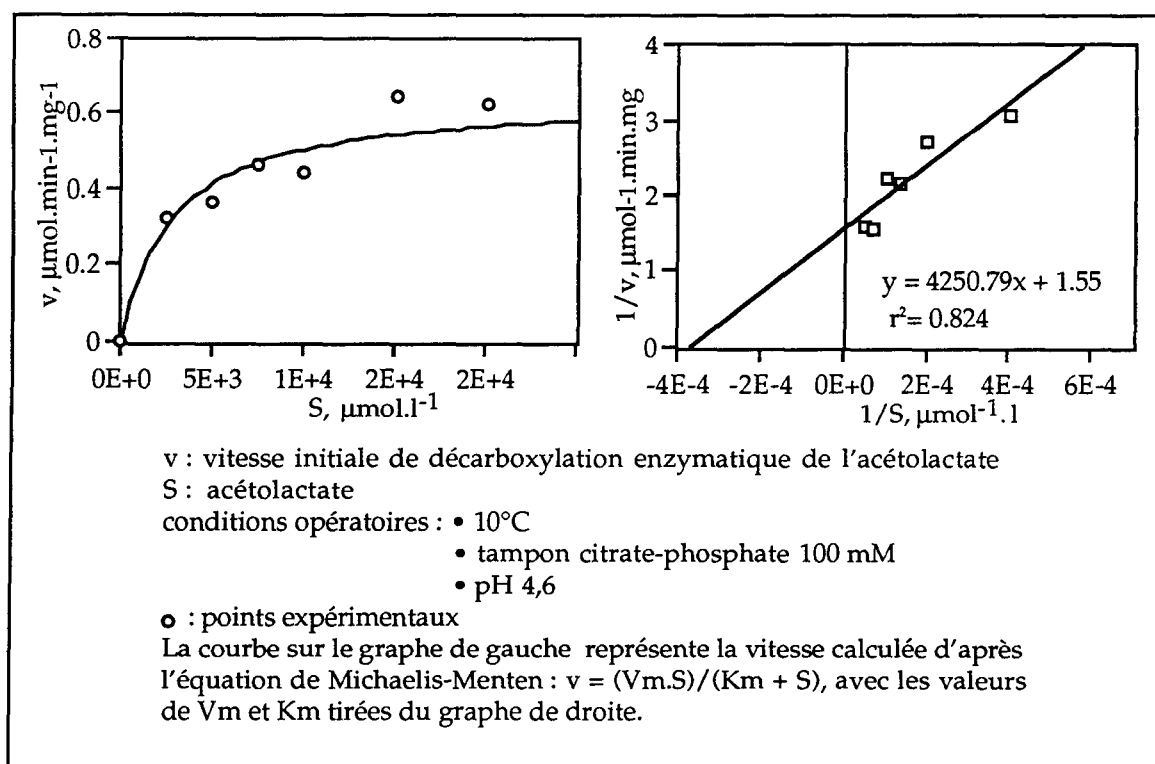
Figure 4.9 Effet de la température sur la décarboxylation spontanée de l'acétolactate (pour rappel)



3.2.2. Paramètres cinétiques de l'acétolactate décarboxylase

Les paramètres cinétiques de l'acétolactate décarboxylase ont été mesurés à 10°C. Les vitesses initiales correspondent aux pentes des droites acétoïne formé au cours du temps (mesurées sur 40 minutes) en fonction des différentes concentrations en acétolactate.

Figure 4.29 Vitesses de décarboxylation enzymatique de l'acétolactate



Les paramètres obtenus sont :

- $V_m = 0,647 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$,
- $K_m = 2750 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

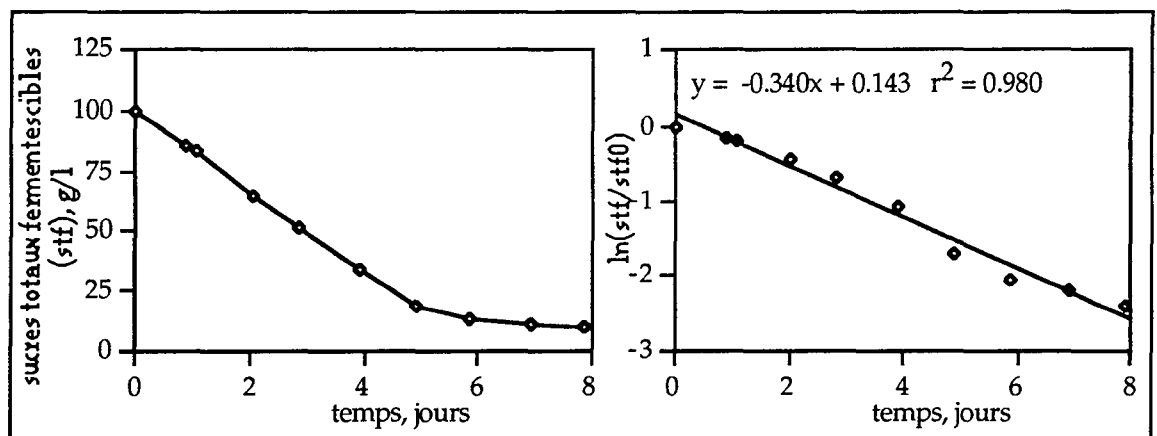
Pour la modélisation la constante k_2 correspondant à l'acétolactate décarboxylase a été estimée par le ratio V_m/K_m : $2,35 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{l}$ soit $0,34 \text{ j}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{l}$ (k_2).

Pour calculer la valeur de k_2 pendant la fermentation, nous nous sommes référés à la courbe d'activité de l'enzyme en fonction de la température présentée au Chapitre 2 "Synthèses bibliographiques et cahier des charges" (Figure 2.15). Si on considère une activité de 100% à 15°C, à 0°C l'activité passe à 57%. De ce fait k_2 prend pour valeur $0,19 \text{ j}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{l}$ pour la maturation.

3.2.3. Vitesse de dégradation des sucres totaux fermentescibles

Dans le moût l'acétolactate est formé à partir de précurseurs qui sont les sucres totaux fermentescibles. La vitesse de dégradation de ces sucres a été calculée à partir de données de la littérature [Engasser, J. M. *et al.*, 1981]. Comme le montrent les graphes suivants, nous avons pris comme hypothèse que la dégradation suivait une cinétique d'ordre un.

Figure 4.30 Dégradation des sucres totaux fermentescibles pendant la fermentation



La constante de vitesse d'ordre un considérée sera donc de $0,34 \text{ jour}^{-1}$ (k_0).

3.2.4. Tableau récapitulatif des constantes de vitesse

Tableau 4.12 Constantes de vitesse utilisées pour la modélisation

réaction catalysée	constante du modèle	valeur	unité	source
Fermentation principale				
PA -> AL	k0	0,34	jour-1	calculée au point 3.2.3 (page 4-46)
AL -> DA	k1	0,54	jour-1	calculée au point 3.2.1 (page 4-44)
AL -> AC	k2	0,34	j-1.mg-1.l	calculée au point 3.2.2 (page 4-45)
DA -> AC	"k3"	0,40	jour-1	estimée : (1)
Maturation				
PA -> AL	k0	0,10	jour-1	estimée : (3)
AL -> DA	k1	0,12	jour-1	calculée au point 3.2.1 (page 4-44)
AL -> AC	k2	0,19	j-1.mg-1.l	calculée au point 3.2.2 (page 4-45)
DA -> AC	"k3"	0,28	jour-1	calculée : (2)

(1) : En l'absence de données suffisantes dans la littérature, nous avons estimé cette constante à $0,4 \text{ jour}^{-1}$. L'estimation a été faite sur la base des profils de diacétyle trouvés dans la littérature, par tâtonnement [Haukeli, A. D. *et al.*, 1971]. Cette valeur correspond en fait au produit $k_3^*[\text{DR}]$, avec [DR] concentration en diacétyle réductase, c'est pourquoi elle porte l'unité d'une constante d'ordre un.

(2) : Van den Berg et ses collaborateurs ont étudié l'activité diacétyle réductase chez la levure de brasserie [van den Berg, R. *et al.*, 1983]. Ils mentionnent que l'activité de la diacétyle réductase est de 30% pendant la maturation comparée à celle de la fermentation principale. Par conséquent nous avons pris comme constante de vitesse 30% de la valeur de k_1 pendant la fermentation principale, soit $0,28 \text{ jour}^{-1}$.

(3) : La conversion du précurseur en acétolactate correspond à des réactions enzymatiques. Par analogie à la diacétyle réductase, nous avons considéré que cette réaction avait une constante de vitesse de 30% de celle de la fermentation principale, soit $0,10 \text{ jour}^{-1}$.

3.2.5. Tableau récapitulatif : autres constantes

Dans le cas des capsules d'acétolactate décarboxylase, les constantes relatives au transfert sont les suivantes :

Tableau 4.12 Autres constantes nécessaires pour la modélisation

constante	symbole	valeur	unité
coefficient de diffusion de l'acétolactate et de l'acétoïne dans la membrane de capsules	De	10e-10	m ² /s
épaisseur de la membrane	δ	10e-5	m
concentration volumique des capsules dans le moût	α	1	%
diamètre des capsules	d	10e-3	m

Le coefficient de diffusion effectif De a été estimé par comparaison avec celui du glucose dans des gels [Merchant, F. J. A. *et al.*, 1987 ; Buladi, B. M. *et al.*, 1997]. Le coefficient de perméabilité P qui est calculé avec cette valeur est en accord avec les données de la littérature concernant des membranes de capsules (membranes de nylon ou complexes polyélectrolytes recouvrant des billes [Poncelet, D. *et al.*, 1988 ; Goosen, M. F. A. *et al.*, 1989]).

L'épaisseur de la membrane des capsules a été estimée par observation de capsules sectionnées en microscopie optique (se reporter à la Figure 4.20 du Chapitre 4 "Résultats et Discussion").

La concentration volumique en capsules est une proposition de notre part, et enfin le diamètre des capsules a été posé à 1 mm, ce qui est supérieur au cas réel.

3.3. Valeurs initiales des variables

Les variables du modèle sont les concentrations en précurseur de l'acétolactate, en acétolactate, en diacétyle et en acétoïne. Au début de la fermentation principale ces variables sont nulles, sauf le précurseur de l'acétolactate.

D'après Engasser, la valeur initiale des sucres totaux fermentescibles est de 100 g/l [Engasser, J. M. *et al.*, 1981]. Toutefois, seule une petite fraction des sucres totaux

fermentescibles est destinée à l'acétolactate. Nous avons estimé cette fraction par tâtonnement. Grâce à la modélisation et en comparant les taux d'acétolactate au moment du pic trouvés dans la littérature, nous avons pu attribuer une valeur initiale au(x) précurseur(s) de l'acétolactate : 50 $\mu\text{mol/l}$.

Tableau 4.13 Valeurs initiales des variables utilisées pour la modélisation

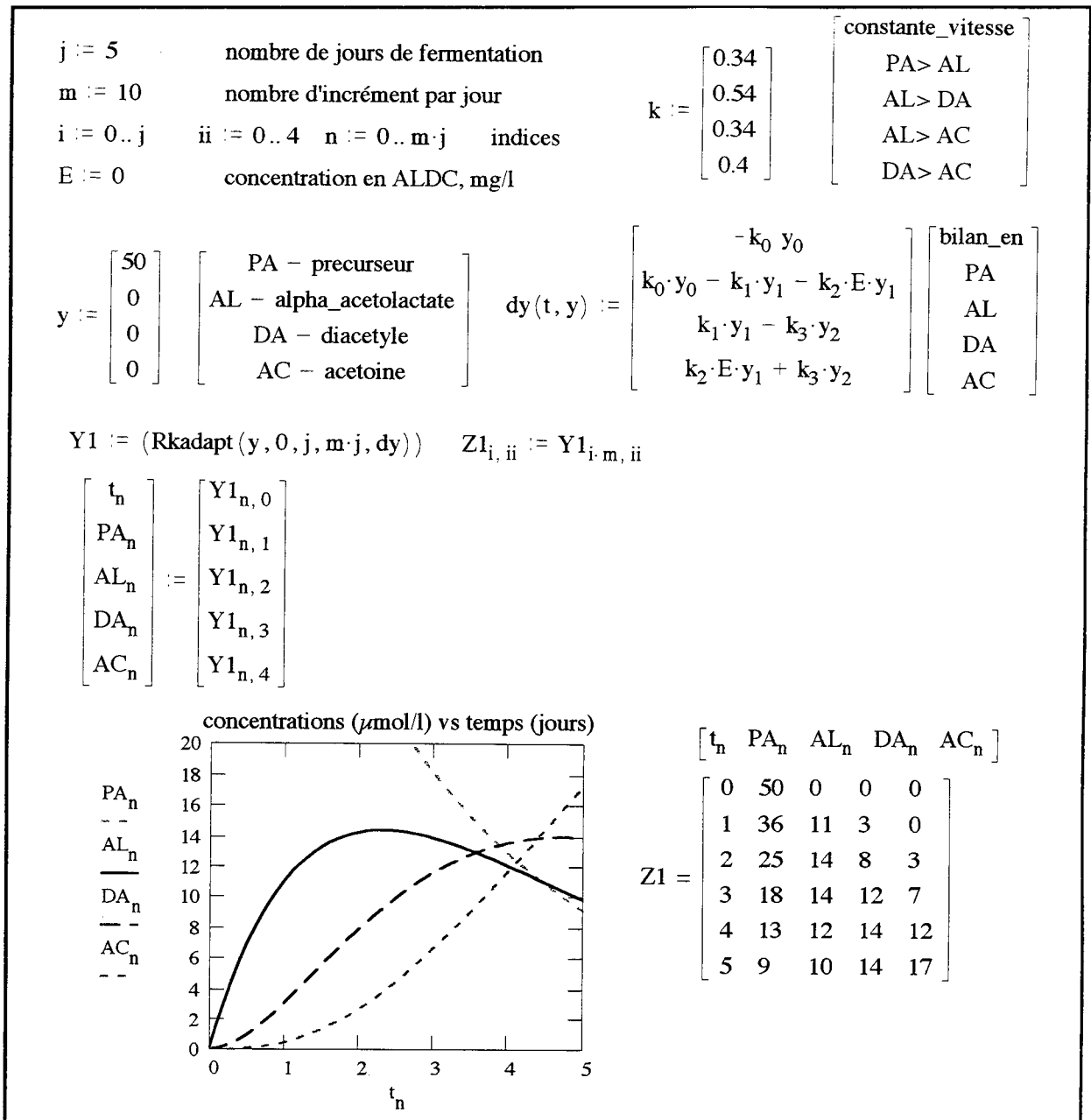
composé	abréviation	variable du modèle	valeur initiale	unité
Cas d'une fermentation sans capsules				
précurseur de l'acétolactate	PA	y0	50	$\mu\text{mol/l}$
acétolactate	AL	y1	0	$\mu\text{mol/l}$
diacétyl	DA	y2	0	$\mu\text{mol/l}$
acétoïne	AC	y3	0	$\mu\text{mol/l}$
Cas d'une fermentation avec capsules				
précurseur de l'acétolactate	PA	y0	50	$\mu\text{mol/l}$
acétolactate à l'extérieur des capsules	ALext	y1	0	$\mu\text{mol/l}$
acétolactate à l'intérieur des capsules	ALint	y2	0	$\mu\text{mol/l}$
diacétyl	DA	y3	0	$\mu\text{mol/l}$
acétoïne à l'intérieur des capsules	ACint	y4	0	$\mu\text{mol/l}$
acétoïne à l'extérieur des capsules	ACext	y5	0	$\mu\text{mol/l}$

Grâce à ces valeurs, nous avons pu mener les calculs de simulation de la fermentation.

3.4. Modélisation d'une fermentation discontinue "classique"

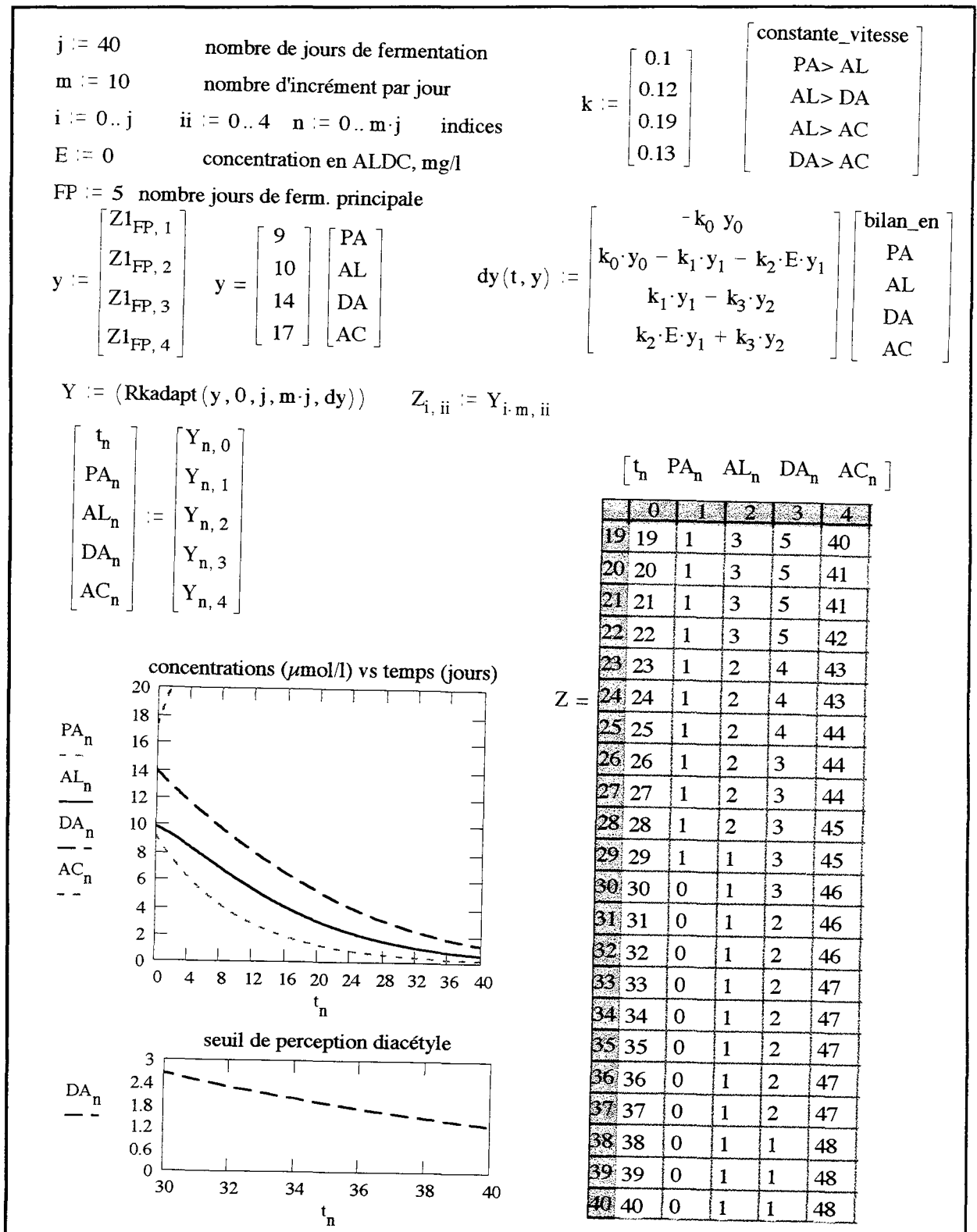
La Figure 4.31 représente notre modèle pour une fermentation "classique", c'est-à-dire constituée d'une fermentation principale et d'une maturation, en absence d'acétolactate décarboxylase (le lecteur se reportera aux graphes, et éventuellement aux tableaux ou matrices de valeurs placés à droite des graphes).

Figure 4.31 Modélisation d'une fermentation principale "classique" (sans ALDC)



Le pic d'acétolactate se situe vers 2 jours, avec un maximum à $14 \mu\text{mol/l}$ ($1,8 \text{ mg/l}$). Il est suivi du pic de diacétyle à 4-5 jours pour un taux de $1,2 \text{ mg/l}$. Ces valeurs sont en accord avec les grandeurs données dans la littérature [Engasser, J. M. *et al.*, 1981 ; Haukeli, A. D. *et al.*, 1971]. Cette fermentation est suivie par une maturation, modélisée figure suivante.

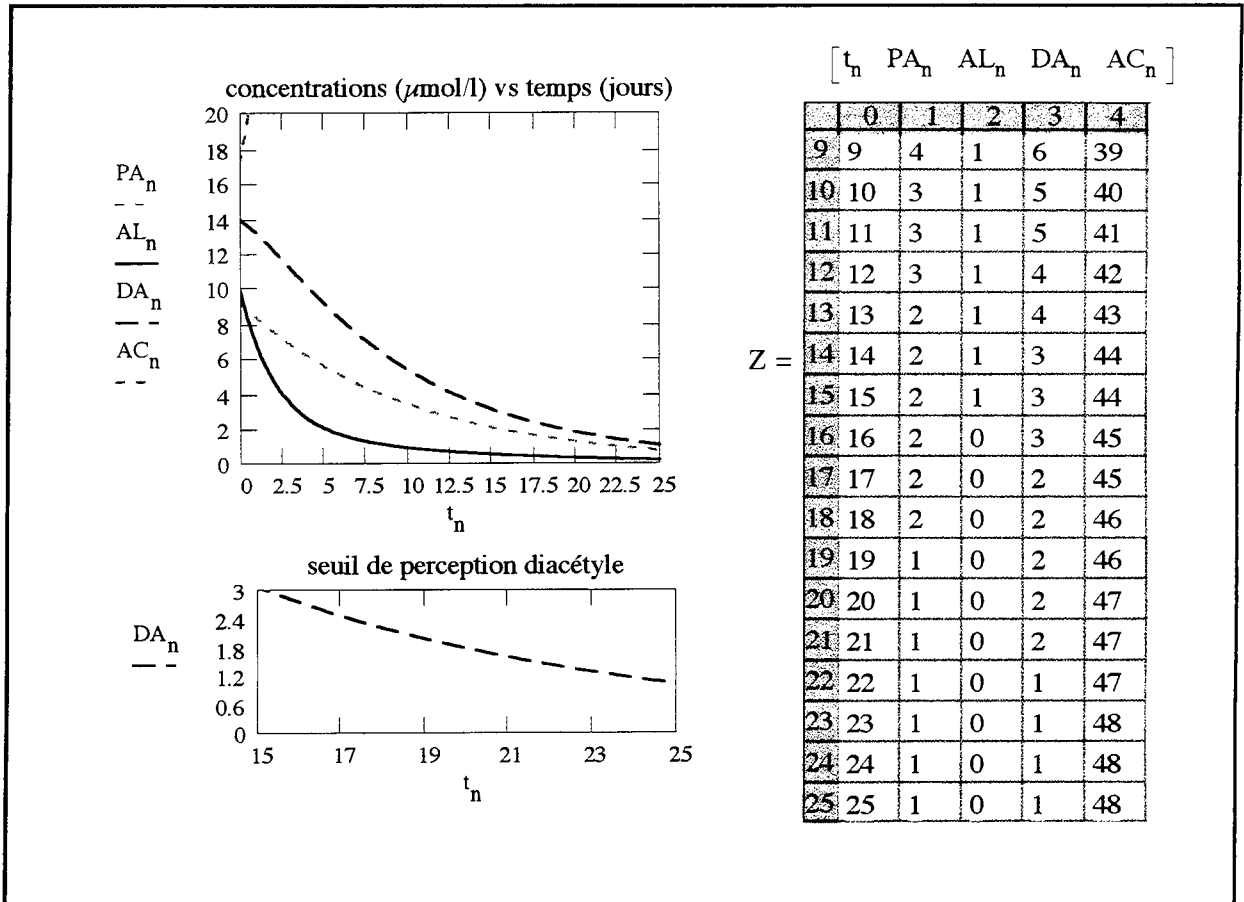
Figure 4.32 Modélisation d'une maturation (sans ALDC)



Une maturation simple à 0°C demande 37 jours pour que le diacétyle passe en-dessous de son seuil de perception dans la bière. Ce mode de maturation est peu utilisé (on lui préfère les techniques accélérées comme la garde chaude)

néanmoins il était nécessaire de valider les hypothèses de notre modèle en effectuant ces calculs. Considérons maintenant l'utilisation de l'acétolactate décarboxylase (libre) pendant la maturation.

Figure 4.33 Modélisation d'une maturation avec 2 mg/l d'ALDC libre

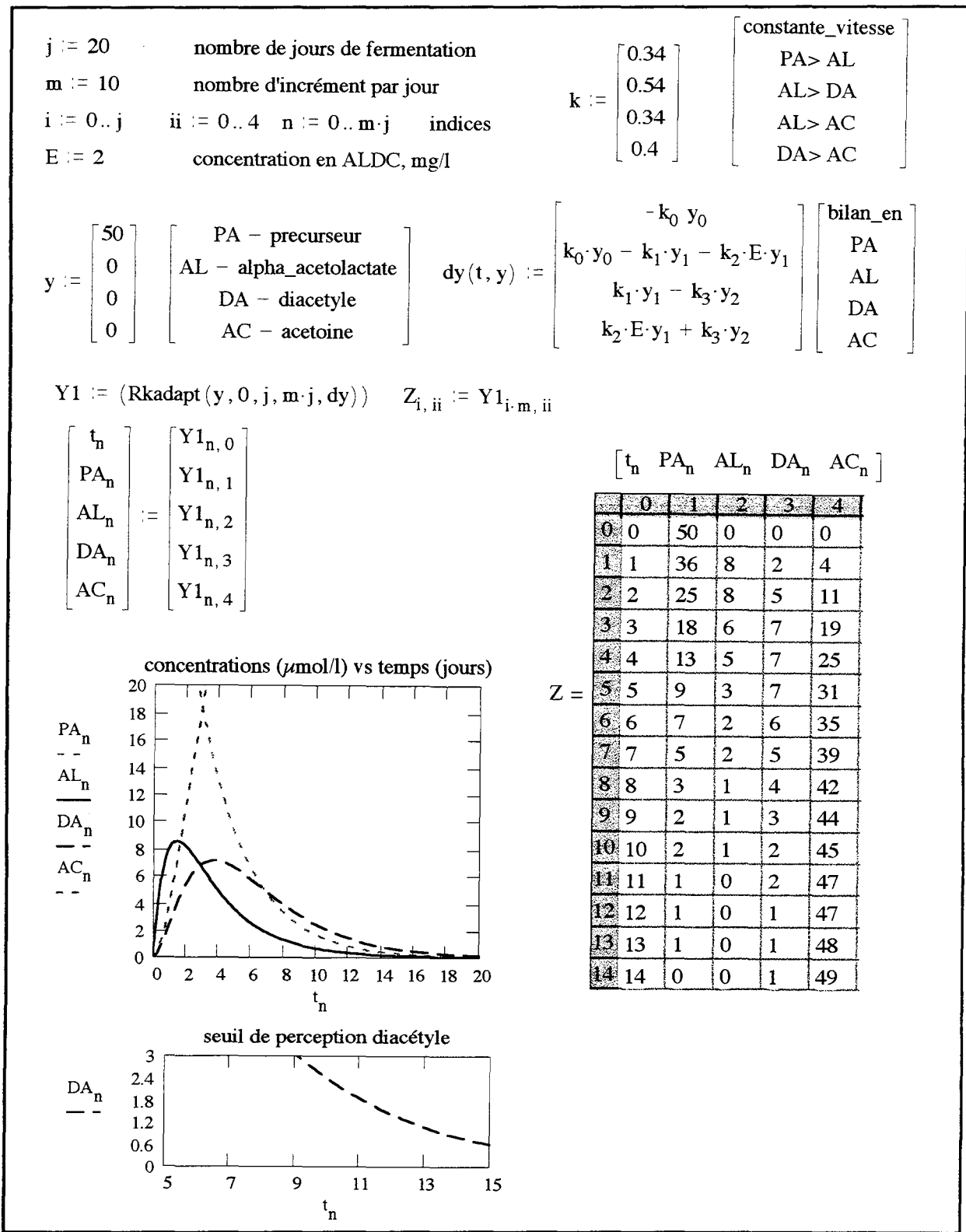


Comme on pouvait s'y attendre, la présence d'acétolactate décarboxylase accélère la maturation : de 37 jours elle passe à 21, soit une amélioration de 43%.

L'acétolactate est décarboxylé à la fois par voie chimique donnant du diacétyle et par voie enzymatique donnant de l'acétoïne. Il y a donc moins de diacétyle formé.

Au bout de 5 jours de fermentation principale, il y a 14 $\mu\text{mol/l}$ de diacétyle dans la bière. L'acétolactate décarboxylase (ALDC) aurait plus d'impact si elle était présente avant le pic d'acétolactate, c'est-à-dire dès la fermentation principale. La modélisation d'une fermentation principale en présence d'acétolactate décarboxylase donne les résultats suivants :

Figure 4.34 Modélisation d'une fermentation principale avec 2 mg/l d'ALDC libre

 $Y1 := (Rkadapt(y, 0, j, m \cdot j, dy))$ $Z_{i, ii} := Y1_{i \cdot m, ii}$

$\begin{bmatrix} t_n \\ PA_n \\ AL_n \\ DA_n \\ AC_n \end{bmatrix} := \begin{bmatrix} Y1_{n, 0} \\ Y1_{n, 1} \\ Y1_{n, 2} \\ Y1_{n, 3} \\ Y1_{n, 4} \end{bmatrix}$

$Z = \begin{bmatrix} t_n & PA_n & AL_n & DA_n & AC_n \end{bmatrix}$

	0	1	2	3	4
0	0	50	0	0	0
1	1	36	8	2	4
2	2	25	8	5	11
3	3	18	6	7	19
4	4	13	5	7	25
5	5	9	3	7	31
6	6	7	2	6	35
7	7	5	2	5	39
8	8	3	1	4	42
9	9	2	1	3	44
10	10	2	1	2	45
11	11	1	0	2	47
12	12	1	0	1	47
13	13	1	0	1	48
14	14	0	0	1	49

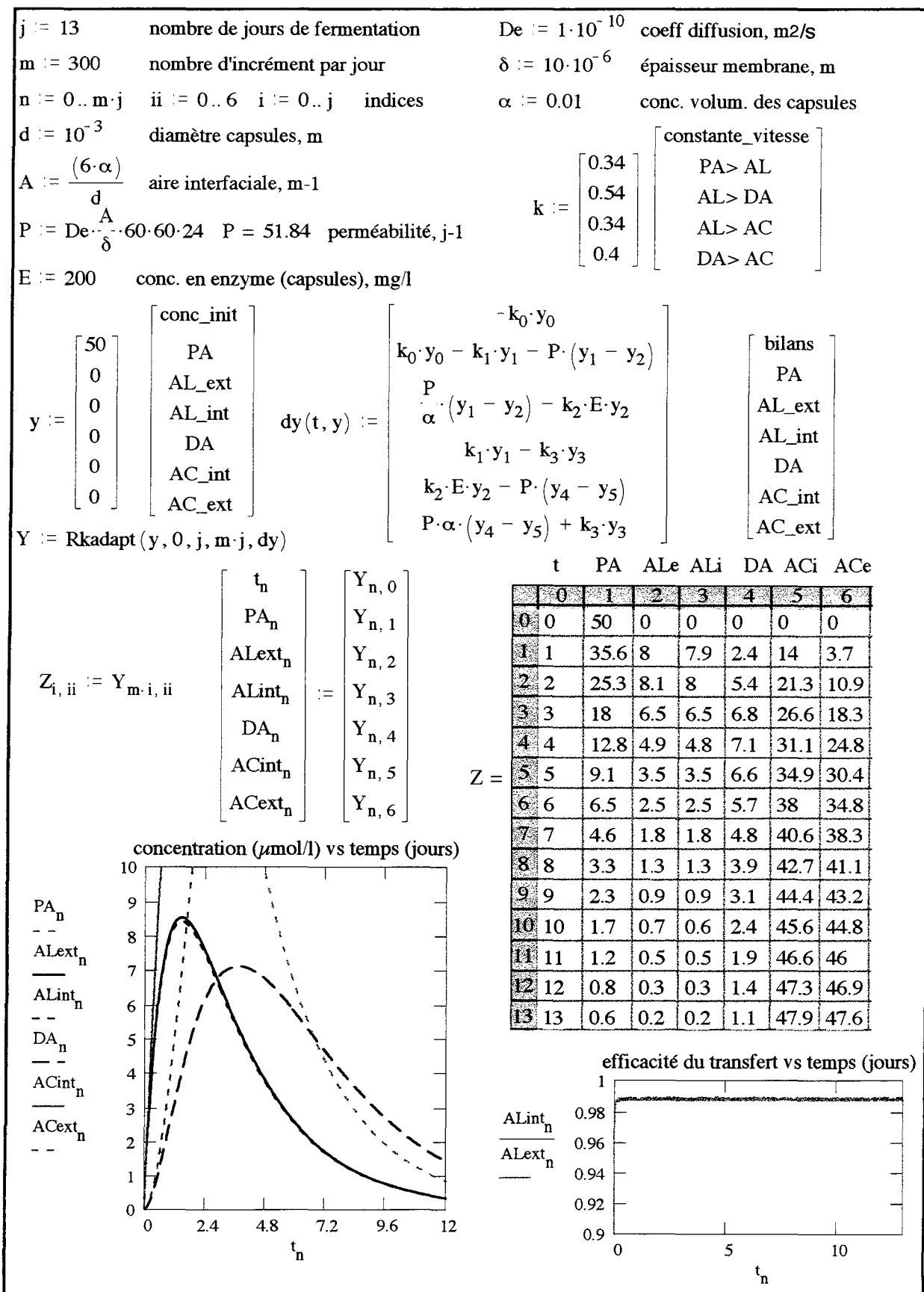
concentrations ($\mu\text{mol/l}$) vs temps (jours)

seuil de perception diacétyle

La présence d'ALDC dès le début de la fermentation principale est plus efficace pour atteindre rapidement le taux auquel on ne perçoit plus le diacétyle (12 jours de fermentation principale, contre 17 jours sans enzyme si la fermentation principale était menée jusque là, résultat non présenté). Ceci s'explique aisément : dès qu'il est formé, l'acétolactate prend les deux voies de décarboxylation possibles : chimique et enzymatique. Le pic d'acétolactate atteint donc des valeurs inférieures en présence d'enzyme. En conséquence, la maturation sera moins longue.

L'acétolactate décarboxylase est donc utile pour accélérer le procédé de fabrication de la bière. Voyons maintenant comment se situe notre proposition d'acétolactate décarboxylase encapsulée.

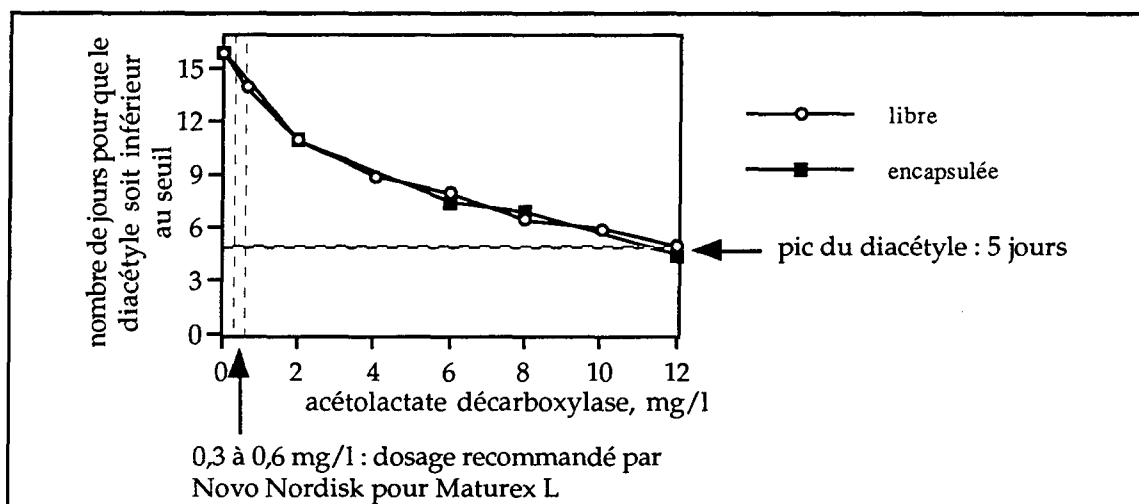
Figure 4.35 Modélisation d'une fermentation principale en présence de 2 mg/l d'ALDC encapsulée



D'après le modèle, les transferts de composés sont suffisants pour permettre à l'acétolactate décarboxylase encapsulée d'être aussi efficace que l'enzyme libre : il faut 12 jours pour que le diacétyl atteigne la valeur de $1,7 \mu\text{mol/l}$ en fermentation principale. Ceci est confirmé par le rapport acétolactate à l'intérieur / acétolactate à l'extérieur des capsules (graphe "efficacité du transfert"). Ce ratio est de 99% pendant toute la fermentation dans le cas présenté ci-dessus. Ce rapport diminue lorsque la concentration en enzyme dans les capsules augmente. Il atteint 93% pour une concentration de 1200 mg/l dans les capsules soit 12 mg/l dans le moût (résultat non présenté). La diffusion des substrat et produit dans la membrane des capsules n'est donc pas limitante.

Nous avons introduit dans notre modèle différentes concentrations d'ALDC. Les résultats en termes de durée de fermentation principale pour atteindre le seuil de perception du diacétyl sont les suivants :

Figure 4.36 Durée de la fabrication de la bière (calculée) en fonction de la charge en ALDC



Ces résultats confirment notre première observation : l'emprisonnement de l'enzyme dans des capsules ne nuit pas à son action, car les courbes de l'enzyme libre et encapsulée se superposent (écarts de l'ordre d'une demi-journée). Plus on met d'enzyme dans le moût, plus le diacétyl atteint son seuil rapidement.

Par ailleurs, les courbes présentées en Figure 4.36 concernent la fermentation principale. Cette fermentation dure au maximum 10 jours, et en général 5 à 6 jours. En apportant de l'acétolactate décarboxylase à hauteur de 10 mg/l on finit la fermentation principale sans avoir de diacétyl, donc la bière n'aurait pas besoin

de maturation. Cette possibilité a déjà été évoquée par l'équipe de Linko qui étudiait alors les levures génétiquement modifiées contenant le gène de l'acétolactate décarboxylase [Linko, M. *et al.*, 1991].

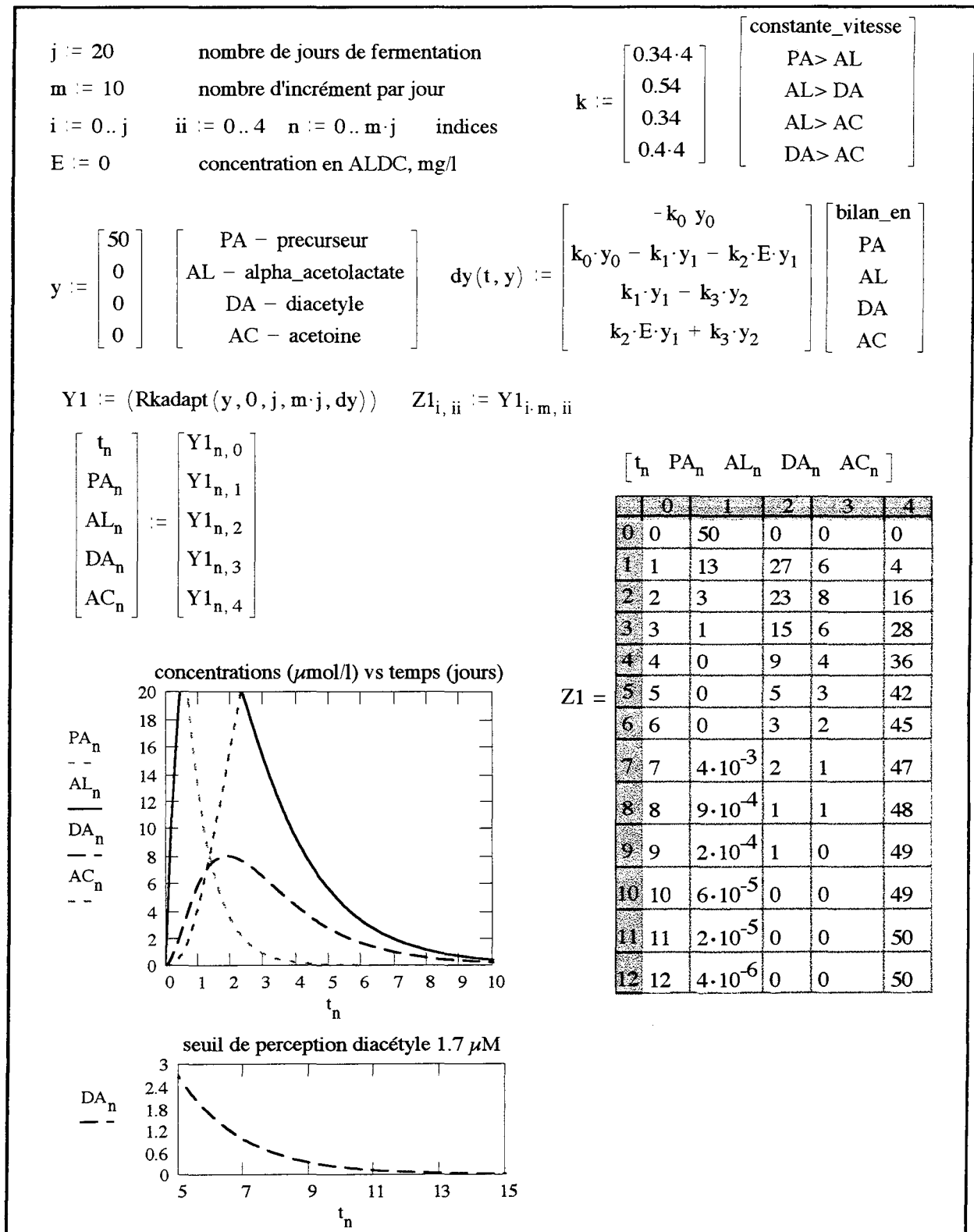
Les recommandations de Novo Nordisk sont de 0,3 à 0,6 mg/l de moût, à ajouter en début de fermentation principale. D'après notre modèle, avec ce dosage le diacétyl passe en-dessous de son seuil de perception après 14 jours de fermentation principale, contre 17 jours en absence d'enzyme. Le gain de temps paraît bien faible par rapport aux possibilités qu'offre l'enzyme. Peut-être doit-on voir ici un compromis gain de temps/coût.

Comme nous l'avons signalé dans les principes du modèle, l'acétolactate décarboxylase encapsulée peut aussi être appliquée aux fermentations accélérées sur levures immobilisées.

3.5. Modélisation d'une fermentation accélérée

La technologie des levures immobilisées permet une fermentation de la bière accélérée. Le taux d'acétolactate reste toutefois le problème-clé de ces technologies, puisque la plupart sont obligées d'avoir recours à un chauffage du moût à 80°C, ce qui est néfaste à la qualité de la bière.

Figure 4.37 Modélisation d'une fermentation principale accélérée (sans ALDC)



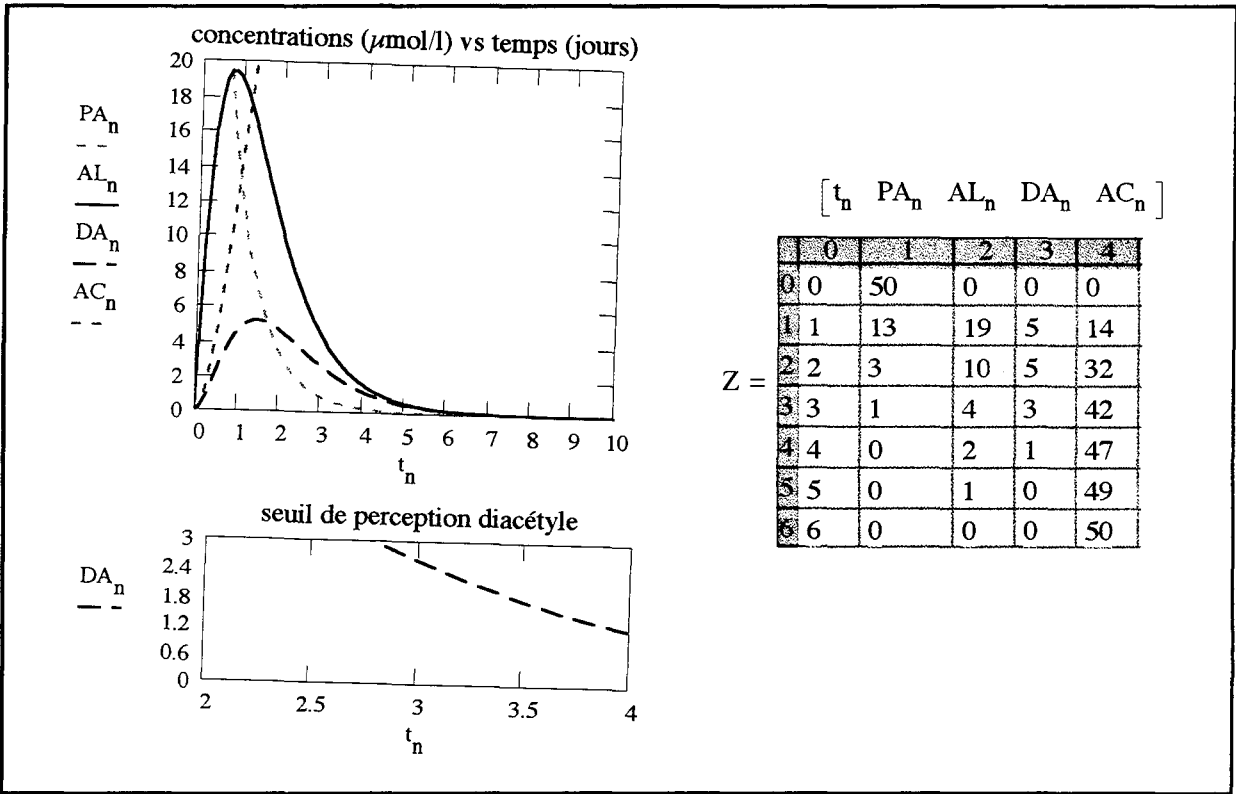
Le pic de diacétyle arrive à 2 jours avec une fermentation accélérée tandis que le seuil est atteint en 6 jours de fermentation principale.

Dans certains cas, on considère que la fermentation principale peut être arrêtée au bout de 2 jours. Elle est suivie :

- d’une maturation traditionnelle : 10 à 30 jours, ce qui élimine les avantages d’une fermentation principale accélérée, ou
- d’une maturation accélérée qui nécessite un chauffage du moût à 80°C.

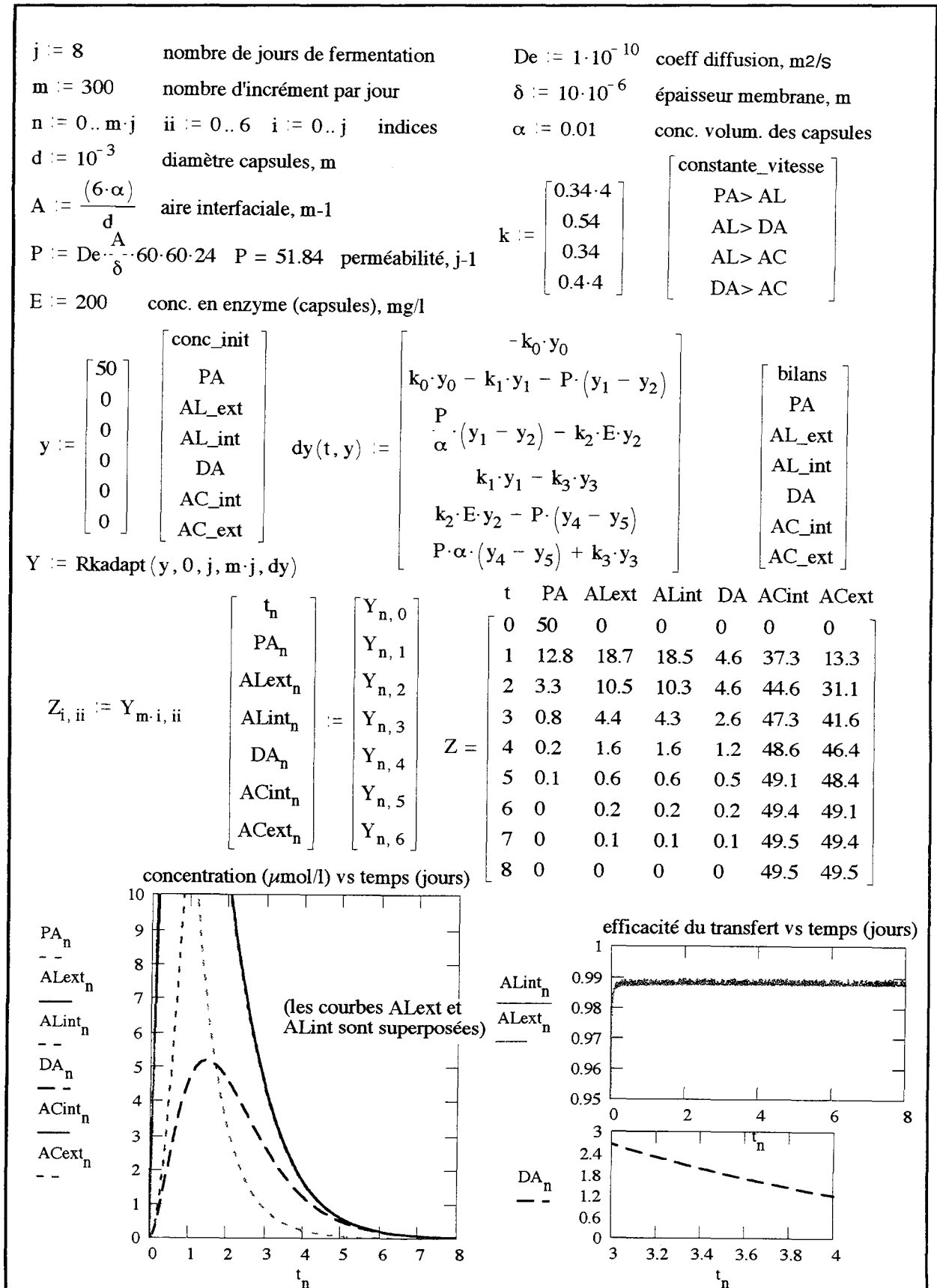
Mener la fermentation principale accélérée en présence d’acétolactate décarboxylase apparaît comme une alternative à ce chauffage, c’est pourquoi nous avons réalisé la modélisation suivante :

Figure 4.38 Modélisation d’une fermentation principale accélérée en présence de 2 mg/l d’ALDC libre



En présence de 2 mg/l d’ALDC libre, on atteint le seuil de diacétyle en un peu plus de 3 jours, soit un gain de temps de 43%. Ce gain est important étant donné la courte durée de fermentation. Avec le même taux d’enzyme sous forme encapsulée, on obtient :

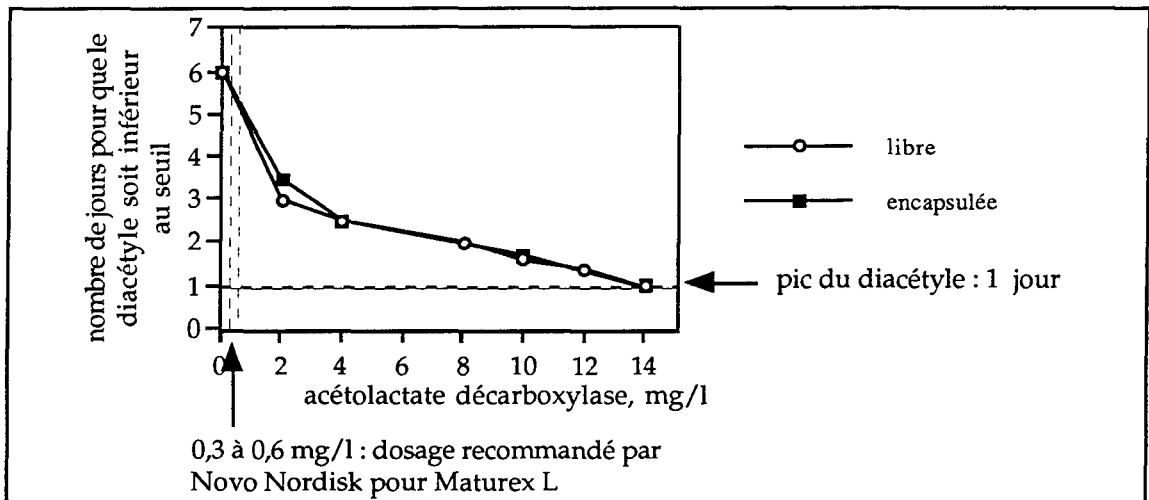
Figure 4.39 Modélisation d'une fermentation principale accélérée en présence de 2 mg/l d'ALDC encapsulée



Avec 2 mg/l d'ALDC encapsulée on atteint le seuil de diacétyl en un peu plus de 3 jours, ce qui confirme que l'encapsulation ne nuit pas aux transferts de masse.

L'utilisation d'ALDC encapsulée en association avec un procédé de fermentation sur levures immobilisées semble donc particulièrement intéressant. La quantité d'enzyme à mettre en oeuvre répond au graphe suivant :

Figure 4.40 Durée de la fabrication de la bière sur levures immobilisées (calculée) en fonction de la charge en ALDC



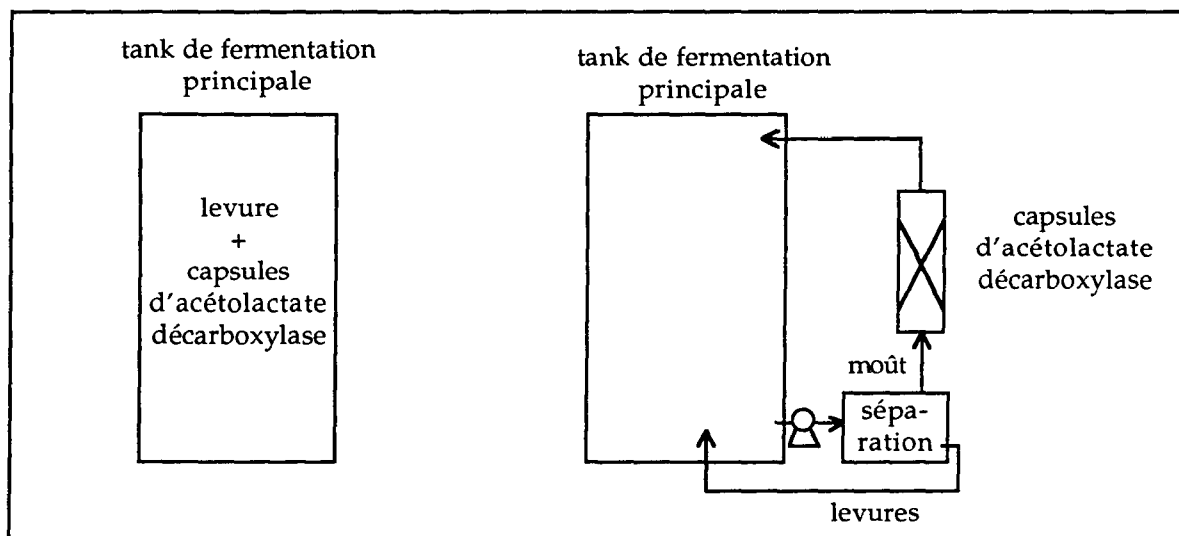
3.6. Conclusion de la modélisation

Cette étude de modélisation nous a permis de vérifier que l'encapsulation était une technique applicable au procédé de fermentation : les transferts sont suffisants pour permettre de reproduire les performances de l'enzyme libre. L'acétolactate décarboxylase accélère le procédé de fabrication de la bière en permettant au diacétyl de repasser en-dessous de son taux de perception plus rapidement qu'à la normale.

D'un point de vue mise en place, il serait souhaitable de pouvoir introduire l'acétolactate décarboxylase encapsulée sans changements majeurs de cuverie. En effet, l'industrie brassicole a beaucoup de capitaux bloqués en matériel et des investissements lourds. Par ailleurs nous avons vu par la modélisation que l'acétolactate décarboxylase encapsulée devait être présente dès le début de la fermentation principale pour être efficace. Aussi, nous avons imaginé le procédé de fabrication de bière avec acétolactate décarboxylase encapsulée de deux façons :

- capsules ajoutées dans le tank de fermentation principale,
- capsules maintenues dans une colonne à garnissage à travers laquelle circule le moût en fermentation.

Figure 4.41 Mise en place des capsules d'acétolactate décarboxylase



Sur les tanks de fermentation discontinue classique, une dérivation pourrait être faite pour que le moût soit amené à circuler à travers une colonne de capsules d'acétolactate décarboxylase. En sortie de cette colonne, le moût serait réintroduit dans le tank. L'intensité de la décarboxylation enzymatique de l'acétolactate pourrait ainsi être modulée grâce à la vitesse de circulation du moût à travers la colonne.

Les deux systèmes nécessitent une étape de séparation :

- séparation levures/capsules pour pouvoir récupérer les capsules d'acétolactate décarboxylase en fin de fermentation dans le cas du fermenteur classique,
- retrait des levures du moût avant circulation dans la colonne pour éviter le colmatage dans l'autre cas.

La séparation des levures est une étape coûteuse en matériel dans les deux cas.

C'est le compromis temps gagné/coût qui permettrait de conclure sur l'application possible de l'acétolactate décarboxylase encapsulée. Or, le "coût" est délicat à estimer. En effet, outre le coût de l'enzyme encapsulée et du matériel

supplémentaire nécessaire à sa mise en place, il faudrait aussi considérer un "amortissement de l'enzyme" si on la réutilise, un gain en matériel qui ne serait plus immobilisé (bâtiments, tanks de garde), une réduction de stock de bière...

4. Conclusion générale

Après avoir mis au point la technique de détermination d'activité, nous avons envisagé l'immobilisation de l'acétolactate décarboxylase par plusieurs approches.

L'inclusion en billes de gel a montré ses limites en termes de rétention d'activité lors de la fabrication des billes. L'encapsulation dans des sphères de complexes polyélectrolytes est en revanche une méthode efficace.

L'enzyme emprisonnée dans des capsules est presque aussi active que l'enzyme libre dans le même micro-environnement. Les capsules présentent une activité catalytique aussi stable que l'enzyme en solution à pH 6,0 et à 5°C sur 5 mois. A pH 4,1 et 15°C, capsules et enzyme en solution présentent une activité dans le même ordre de grandeur sur 6 semaines. L'acétolactate décarboxylase libre perd rapidement une partie de son activité dans les conditions de fermentation de la bière et son encapsulation n'empêche pas cette inactivation partielle.

Nous avons établi un modèle de simulation de la fermentation de la bière. D'après les hypothèses que nous avançons, l'utilisation de capsules d'acétolactate décarboxylase est efficace pour accélérer la fermentation de la bière si les capsules sont placées dans le moût en début de fermentation principale.

Références bibliographiques

(1989)

Manual Method for Determination of alpha-acetolactate decarboxylase (ALDC), Fiche technique Novo Nordisk AF 278/1-GB.

J. Cheftel, J. Cuq and D. Lorient (1985)

Protéines alimentaires - Biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle, *Tech&Doc*, 309, Lavoisier, Paris.

H. Dautzenberg, B. Lukanoff, U. Eckert, B. Tiersch and U. Schuldt (1996b)

Immobilisation of biological matter by polyelectrolyte complex formation, *Ber Bunsenges Phys Chem*, 100, 6, 1045-1053.

J. C. De Man (1959)

The formation of diacetyl and acetoin from alpha-acetolactic acid, *Rec Trav Chim*, 78, 480-486.

G. Del Campo and C. Lajo (1992)

Spectrophotometric determination of biacetyl in distillates of wine by flow injection, *Analyst*, 117, 1343-1346.

J. M. Engasser, I. Marc, M. Moll and B. Duteurtre (1981)

Kinetic modelling of beer fermentation, *Proceedings: Eur Brew Conv*, Copenhagen, Oxford: IRL Press, 579-587.

N. Gollop, Z. e. Barak and D. Chipman (1987)

A method for simultaneous determination of the two possible products of acetohydroxy acid synthase, *Anal Biochem*, 160, 323-331.

A. D. Haukeli and S. Lie (1971)

The influence of 2-acetohydroxy acids on the determination of vicinal diketones in beer and during fermentation, *J Inst Brew*, 77, 538-543.

J. Koetz, K.-J. Linow, B. Philipp, L. Ping Hu and O. Vogl (1986)

Effects of charge density and structure of side-chain branching on the composition of polyanion-polycation complexes, *Polymer*, 27, 1574-1580.

L. O. Krampitz (1948)

Synthesis of alpha-acetolactic acid, *Arch. Biochem.*, 17, 81-85.

M. Le Lan (1994)

Encapsulation d'alpha-acétolactate décarboxylase, enzyme utilisée en brasserie, Rapport de D.E.A. Institut National polytechnique de Lorraine

M. Linko and J. Kronlôf (1991)

Main fermentation with immobilized yeast, *Proceedings: Eur Brew Conv*, Lisbon, Oxford: IRL Press, 353-360.

E. A. Markvicheva, I. F. Kuz'kina, I. I. Pashkin, T. N. Plechko, Y. E. Kirsh and V. P. Zubov (1991)

A novel technique for entrapment of hybridoma cell in synthetic thermally reversible polymers, *Biotechnol Technique*, 5, 3, 223-226.

E. A. Markvicheva, A. S. Bronin, N. E. Kudryavtseva, L. D. Rumsh, Y. E. Kirsh and V. P. Zubov (1994)

Immobilization of proteases in composite hydrogel based on poly(N-vinyl caprolactam), *Biotechnol Technique*, 8, 3, 143-148.

C. Monnet, P. Schmitt and C. Diviès (1994)

Diacetyl production in milk by an α -acetolactic acid accumulating strain of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Journal of Dairy Science*, 77, 10, 2916-2924.

S. Norton and T. D'Amore (1994)

Physiological effects of yeasts cell immobilization: Applications for brewing, *Enzyme Microb Technol*, 16, 365-376.

D. Pasquier (1995)

Contribution à l'encapsulation de l'alpha-acétolactate décarboxylase par réticulation interfaciale de la gélatine, Rapport de D.E.A. Institut National polytechnique de Lorraine

B. Philipp, L. T. Hong, W. Davydoff and K. J. Linow (1979)

Acta Polym, 30, 563-568.

D. Poncelet, R. Lencki, C. Beaulieu, J. P. Hallé, R. J. Neufeld and A. Fournier (1992a)

Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation: I Methodology, *Appl Microbiol Biotechnol*, 38, 39-45.

D. Poncelet, B. Poncelet De Smet, C. Beaulieu and R. J. Neufeld (1992b)

Scale-up of Gel Bead and Microcapsule Production in Cell Immobilization, in *Fundamentals of Animal Cell Encapsulation and Immobilization*, M. F. A. Goosen, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

D. Poncelet, R. Leung, L. Centomo and R. J. Neufeld (1993)

Microencapsulation of Silicones Oils within Polyamide-Polyethylene Membranes as Oxygen Carriers for Bioreactor oxygenation, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 57, 253-263.

D. Poncelet, B. Poncelet De Smet, C. Beaulieu, M. L. Huguet, A. Fournier and R. J. Neufeld (1995)

Production of alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation II: physicochemistry, *Appl Microbiol Biotechnol*, 42, 644-650.

A. Prokop, D. Hunkeler, S. DiMari, M. Haralson and T. Wang (1998)

Water soluble polymers for immunoisolation I: complex coacervation and cytotoxicity, *Adv Polym Science*, accepted.

A. Prokop, D. Hunkeler, S. DiMari, M. Haralson and T. Wang (?)

Water soluble polymers for immunoisolation I: complex coacervation and cytotoxicity, ??,

E. Rondags (1997)

Production d'arômes laitiers par des lactocoques : recherche d'une voie de synthèse du diacétyl et mise en oeuvre en réacteur continu à haute densité cellulaire, *Biotechnologies et industries alimentaires*,

I. Svendsen, B. R. Jensen and M. Ottesen (1989)

Complete amino acid sequence of α -acetolactate decarboxylase from *Bacillus subtilis*, *Carlsberg Res Commun*, 54, 157-163.

H. A. Veringa, E. H. Verburg and J. Stadhouders (1984)

Determination of diacetyl in dairy products containing α -acetolactic acid, *Neth. Milk Dairy J.*, 38, 251-263.

W. W. Westerfeld (1945)

A colorimetric determination of blood acetoin, *J. Biol. Chem.*, 161, 495-502.

Sommaire

Chapitre 5 : Conclusions & perspectives

1. Bilan par rapport au cahier des charges.....	5-2
1.1. Utilisation de matériaux non toxiques.....	5-2
1.2. Fabrication de sphères “microbiologiquement propres”.....	5-2
1.3. Disponibilité des matériaux d’encapsulation.....	5-3
1.4. Résistance mécanique.....	5-3
1.5. Rapport durée d’utilisation/prix.....	5-4
1.6. Procédé d’encapsulation simple.....	5-4
1.7. Sphères permettant des transferts de masse suffisants.....	5-5
1.7.1. <i>Sphères de petite taille</i>	5-2
1.7.2. <i>Sphères de tailles homogènes</i>	5-2
1.8. Sphères individualisées.....	5-5
1.9. Enzyme immobilisée sous forme active.....	5-5

1.10. Rétention de l'enzyme dans les capsules.....	5-5
2. Discussion.....	5-6
2.1. Évaluation des capsules d'acétolactate décarboxylase pour une application industrielle.....	5-6
2.1.1. Présentation	
2.1.2. Séparation	
2.2. Positionnement par rapport à la législation.....	5-6
2.3. Organismes génétiquement modifiés contre acétolactate décarboxylase encapsulée.....	5-7
3. Perspectives.....	5-7
3.1. Stabilité de l'acétolactate décarboxylase native.....	5-7
3.2. Préparation des capsules.....	5-8

L'encapsulation par réticulation interfaciale de gélatine n'a pas non plus permis de bons résultats. Les pH extrêmes nécessaires à la formation de la membrane sont incompatibles avec un bon maintien d'activité.

Enfin c'est la méthode des complexes polyélectrolytes qui a permis d'encapsuler l'acétolactate décarboxylase avec succès. La méthode est simple et sans pH extrême. Les capsules ont la porosité adéquate pour garder l'enzyme à l'intérieur tout en laissant entrer et sortir les substrat et produit de la réaction enzymatique.

Nous allons maintenant faire le bilan par rapport au cahier des charges établi en début d'étude.

1. Bilan par rapport au cahier des charges

1.1. Utilisation de matériaux non toxiques

Les amines quaternaires sont toxiques pour les micro-organismes, or le poly(diallyl diméthyl ammonium) est une amine quaternaire. Toutefois, sous forme complexée comme c'est le cas dans la membrane qui entoure les capsules, ces composés perdent leur toxicité. On peut d'ailleurs tenir pour preuve le développement de levures qui a été observé lors du stockage de capsules dans de la bière à 15°C (étude de stabilité des enzymes encapsulées dans la bière).

1.2. Fabrication de sphères "microbiologiquement propres"

La fabrication des sphères dans le cadre de notre étude a été réalisée sans précautions particulières d'un point de vue sanitaire. Par conséquent, ce point reste à étudier.

1.7. Sphères permettant des transferts de masse suffisants

1.7.1. Sphères de petite taille

Sur ce plan nous avons atteint notre objectif : les capsules font environ 800 μm de diamètre, or cette taille permet d'éviter des limitations de transferts [Norton, S. *et al.*, 1994]. De plus, notre étude de modélisation a été réalisée en considérant des sphères de 1 mm de diamètre, et il s'avère que les transferts ne sont pas limitants.

1.7.2. Sphères de tailles homogènes

L'écart-type de la taille moyenne des capsules d'acétolactate décarboxylase est de 30%. Cette valeur pourrait être améliorée.

1.8. Sphères individualisées

Les capsules de complexes polyélectrolytes ne se collent pas entre elles. C'est un point positif pour l'application.

1.9. Enzyme immobilisée sous forme active

Nous obtenons 80% de rendement d'encapsulation, c'est-à-dire que les capsules ont une activité de 80% par rapport à une solution d'enzyme libre à la même concentration. Ce rendement est satisfaisant.

1.10. Rétention de l'enzyme dans les capsules

L'efficacité des capsules tient aussi à leur capacité de garder l'enzyme à l'intérieur. Nous avons mesuré un relargage nul pour les capsules placées dans la bière à 15°C (étude de stabilité des enzymes encapsulées). L'objectif est donc atteint.

La plupart des points du cahier des charges sont donc satisfaits. Nous avons modélisé la fermentation de bière. Cette étude nous a permis de montrer que l'encapsulation de l'acétolactate décarboxylase est efficace pour l'application. En effet, capsules et enzyme libre donnent les mêmes performances en termes de durée de fabrication de la bière. Aussi, nous allons discuter maintenant de l'utilisation de capsules d'acétolactate décarboxylase pendant la fermentation de la bière.

2. Discussion

2.1. Évaluation des capsules d'acétolactate décarboxylase pour une application industrielle

2.1.1. Présentation

Les capsules d'acétolactate décarboxylase se manipulent aisément. Leur présentation sous forme sèche pourrait être étudiée, ce qui faciliterait encore leur manipulation.

2.1.2. Séparation

A la fin de la fermentation principale les levures sont retirées du moût par passage dans un whirlpool (bac tourbillonnaire). Dans le cas où des capsules seraient présentes, il faut les séparer des levures afin de pouvoir les réutiliser. Cette séparation pourrait être faite au moyen d'une centrifugation différentielle car capsules et levures ont des dimensions très différentes.

2.2. Positionnement par rapport à la législation

Pour que les capsules d'acétolactate décarboxylase soient autorisées en industrie, il faut qu'une demande soit faite auprès de la Direction Générale de la Consommation, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes afin que des études toxicologiques soient engagées.

Pour l'instant, les composants polymériques des capsules ne font pas partie des listes positives.

2.3. Organismes génétiquement modifiés contre acétolactate décarboxylase encapsulée

Dans la mesure où des demandes d'accréditation pour des souches de levure génétiquement modifiées sont déposées, on peut se demander vers quelle solution les brasseurs se tourneront : les levures génétiquement modifiées, ou l' α -acétolactate décarboxylase exogène ?

Les brasseurs feront leur choix en fonction de nombreux critères comme :

- le coût (de l'enzyme ou des souches de levures transformées),
- la flexibilité d'utilisation,
- la qualité de la bière fabriquée [Hannemann, W., 1996],
- la stratégie marketing de la brasserie,
- les attentes des consommateurs...

Toutefois, on peut prédire que l'introduction d'organismes génétiquement modifiés de façon directe en industrie alimentaire prendra du temps.

Cette étude mériterait d'être poursuivie. Voici sur quels aspects.

3. Perspectives

3.1. Stabilité de l'acétolactate décarboxylase native

La limitation majeure de l'utilisation des capsules d'acétolactate décarboxylase est la sensibilité de l'enzyme native vis-à-vis du pH acide de la bière. Pour améliorer les performances des capsules, il faudrait donc étudier la stabilisation de l'enzyme.

Les techniques faisant intervenir des liaisons covalentes pourraient être envisagées. En effet une inactivation par effet pH est souvent due à des modifications d'interactions ioniques au sein de l'enzyme. Ainsi une fixation par liaison covalente serait une solution pour empêcher des changements de conformation. Toutefois, cette éventuelle amélioration en *stabilité* se ferait au détriment de l'*activité* de l'enzyme au départ.

3.2. Préparation des capsules

Dans une optique de passage à l'échelle industrielle, certains points relatifs à la préparation des capsules devront être étudiés. La technique de formation des gouttelettes devra permettre des débits importants. La formation de gouttelettes par rupture contrôlée de jet serait plus adéquate et permettrait de réduire la dispersion de tailles. D'autre part, la qualité sanitaire de préparation des capsules est à étudier.

Références bibliographiques

H. Dautzenberg, J. Stange, S. Mitzner and B. Lukanoff (1996a)

Encapsulation by polyelectrolyte complex formation - a way to make hepatocyte cultures safe, efficient and on-line available, *Proceedings: Immobilized cells: basics and applications*, Noordwijkerhout, the Netherlands, Elsevier Science B.V., *Progress in Biotechnology* 11, 181-188.

H. Dautzenberg (1996d)

About industrial production of poly(diallyl dimethyl ammonium), Personal communication

S. Norton and T. D'Amore (1994)

Physiological effects of yeasts cell immobilization: Applications for brewing, *Enzyme Microb Technol*, 16, 365-376.

Abstract

During beer fermentation, some diacetyl is produced. This component gives a strong off-flavour to the beer, and has to be removed by yeasts. But, this step is time-consuming. Acetolactate decarboxylase is an enzyme which avoids diacetyl formation in beer. Thus, it speeds up beer fermentation.

Encapsulation of acetolactate decarboxylase has been investigated in order to remove the enzyme from beer, and to re-use it. This permits to reduce the costs, and to provide a beer free of residue.

Acetolactate decarboxylase activity measurement method has been improved, for results to be more accurate.

Entrapment of acetolactate decarboxylase in gel beads failed because of the small size of enzyme: it leaked out. Encapsulation in polyelectrolyte complexes membranes gave good results: capsules are 800 μm in diameter, and encapsulation yield is 80% (capsules activity/free enzyme activity). Free and immobilized enzyme show the same behaviour upon time.

Beer fermentation has been modelised. The use of acetolactate decarboxylase shortens the fermentation time up to 43%. Encapsulated acetolactate decarboxylase gives the same results. This means mass transfers are enough with our encapsulation method.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur BOIVIN Patrick, Ingénieur, IFBM Qualtech Vandoeuvre,

**Monsieur SIMON Jean-Paul, Professeur, Institut Meurice/CERIA Bruxelles
(Belgique).**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame PEROLS - DULIEU Claire

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Encapsulation de l'acétolactate décarboxylase. Application à la
bière."**

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

Spécialité : **"BIOTECHNOLOGIES & INDUSTRIES ALIMENTAIRES"**

Fait à Vandoeuvre le, **3 Mars 1998**

Le Président de l'I.N.P.L.,


J. HARDY



Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

Résumé

Pendant la fermentation de la bière, du diacétyle apparaît. Le diacétyle est responsable d'un défaut de goût ; il doit être éliminé par les levures, ce qui prend du temps.

L'acétolactate décarboxylase est une enzyme qui permet d'éviter la formation de diacétyle pendant la fermentation de la bière. L'utilisation d'acétolactate décarboxylase pendant la fermentation de la bière permet d'accélérer le procédé.

L'encapsulation de l'acétolactate décarboxylase a été envisagée dans le but de la retirer du moût et de la réutiliser. Ainsi les coûts seront réduits et la bière finale sera exempte de résidu.

La méthode analytique de mesure d'activité acétolactate décarboxylasique a été optimisée car les procédures citées dans la littérature donnaient des résultats peu précis.

L'immobilisation de l'enzyme par inclusion en billes de gel s'est révélée inadéquate car l'enzyme est de petite taille et fuit dans le milieu extérieur. L'emprisonnement dans des capsules de complexes polyélectrolytes montre de bons rendements d'encapsulation. Les capsules fabriquées font $800\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre et le rendement d'encapsulation est de 80% (activité des capsules rapportée à l'activité de l'enzyme libre). Les enzymes libres et encapsulées présentent des profils d'activité semblables au cours du temps.

La fermentation de la bière a été modélisée. L'utilisation d'acétolactate décarboxylase a été introduite dans le modèle. Elle permet de réduire la durée de fabrication de 43%. L'utilisation d'acétolactate décarboxylase encapsulée permet d'obtenir les mêmes performances. Ceci prouve que les transferts sont suffisants et que notre méthode d'encapsulation est efficace.