

Filière Technologies du vivant

Orientation Chimie analytique

Diplôme 2007

Julien Donnet

*Extraction des composés volatils
de boissons aromatisées à base de malt
par la technique SAFE*

Professeur Urban Frey

Expert Ennio Cantergiani

SI	TV	EE	IG	EST
X	X	X	X	

Filière / Studiengang : Technologies du vivant

Confidentiel / Vertraulich

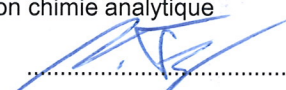

Etudiant / Student Julien Donnet	Année scolaire / Schuljahr 2006/07	No TD / Nr. DA TV/2007/73
Proposé par / vorgeschlagen von E. Cantergiani, Fayrouz		Lieu d'exécution / Ausführungsort Fayrouz, Bulle HES—SO Valais, DSI Expert / Experte Ennio Cantergiani

Titre / Titel:
Développement spécifique de composés d'arômes lors de la torréfaction de malt

Description / Beschreibung:
Le malt est torréfié plus ou moins fortement afin d'obtenir finalement une bière plus ou moins colorée. Pour donner des notes aromatiques plus particulières, il est proposé d'introduire — avant la torréfaction — des précurseurs d'arômes de réaction (acides aminés et év. sucres). Il s'agit de trouver des précurseurs qui puissent donner des notes noisettes, amandes, caramel, etc.
Les techniques utilisées sont GC-MS, GC-sniffing, et spectrophotométrie (pour la couleur). Des analyses par marquage isotopique peuvent être prises en considération. Dans un deuxième temps, des essais de fabrication d'une boisson avec le malt torréfié — voire même une fermentation avec ce type de malt — sont prévus avec un suivi analytique des arômes.

Objectifs / Ziele:

- Extraction des composés volatils de divers malt à l'aide de la technique S.A.F.E. et SPME
- Optimisation des paramètres d'extraction SAFE et SPME
- Analyse GC-MS et GC-sniffing à partir des extraits obtenus par SAFE et comparaison avec la SPME
- Analyse des composés non-volatils et de leur dégradation par HPLC – ELSD/UV-VIS et MS.
- Etude de la dégradation de l'acide linoléique présent dans le malt et quantification du (E)-2-nonenal, responsable d'une "off-note" indésirable dans les boissons à base de malt.

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum	Délais / Termine
Resp. de l'orientation chimie analytique 	Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags: 03.09.2007
Professeur/Dozent: Urban Frey	Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts: 23.11.2007 — 12h00
Etudiant/Student: 	Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten: 30.11.2007
	Défenses orales / Mündliche Verfechtungen Semaine 49

Extraction des composés volatils de boissons aromatisées à base de malt par la technique SAFE

Extraktion der flüchtigen Komponenten von Gewürzten Malzgetränken mit der SAFE Technik

Résumé :

Le but de ce travail est d'extraire puis d'identifier les composés volatils de divers malt et de boissons maltées (à l'arôme d'ananas) à l'aide de la technique SPME ainsi que de la technique SAFE (solvent assisted flavour evaporation), suivie d'analyses en GC-MS. Ces deux techniques pourront alors être optimisées et comparées. Des analyses en SPME dynamique seront aussi testées. Durant ce travail, une quantification sera également effectuée en GC-FID afin de déterminer les taux de recouvrement par la technique SAFE de certains composés de l'arôme ananas présents dans cette boisson à base de malt. Pour cette quantification, des extractions liquide/liquide ainsi que des extractions SPE seront testées et utilisées afin de concentrer les extraits SAFE (aqueux) dans un solvant organique.

L'optimisation des paramètres SPME a donné pour l'adsorption de la fibre un optimum de 30 minutes à 60°C avec une fibre divinylbenzène/carboxène/polydiméthylsiloxane. Les tests effectués en SPME dynamique n'ont pas été concluants. La SPME statique reste donc la meilleure alternative. Quant au SAFE, le débit optimal déterminé a été de 2 ml/min pour une température du ballon de distillation de 40°C. Les quatre composés principaux identifiés en SPME sur tous les types de malt sont l'hexanal, l'acide acétique, le benzaldéhyde et l'acide hexanoïque. Pour ce qui est de la boisson à base de malt aromatisée à l'ananas, les composés extraits par SPME et par SAFE sont principalement des esters, comme par exemple le butanoate d'éthyle, l'acétate de pentyle ou le caproate d'allyle. Ces volatils proviennent essentiellement de l'arôme ananas. La meilleure méthode d'extraction des composés volatils à partir de l'extrait aqueux du SAFE s'est avérée être la SPE, l'éther étant utilisé comme éluant. Enfin, les résultats des taux de recouvrement SAFE des composés volatils de l'arôme ananas se sont montrés satisfaisants. En effet, pour la grande majorité des composés, ceux-ci atteignent des valeurs supérieures à 70%. Cette technique permettrait alors de pouvoir reconstituer un arôme quelconque de composition inconnue à partir de différents produits alimentaires.

Mots-clés : Extraction, volatil, arôme, malt, ananas, boisson, SPME, SAFE, SPE, GC-MS/FID

Zusammenfassung :

Das Ziel dieser Arbeit ist das Herausschreiben sowie die flüchtige Komponenten Identifikation der diversen Maltzen und Malzgetränken (mit Ananas Aroma) mit der Hilfe der SPME sowie der SAFE Technik (solvent assisted flavour evaporation) folgend die GC-MS Analyse. Diese zwei Techniken können danach optimiert und verglichen werden. Dynamische SPME Analysen werden auch getestet. Während dieser Arbeit wird eine Quantifikation in GC-FID durchgeführt damit die Deckungsraten aufgrund der SAFE Technik einiger Ananas-Aromen Komponenten in diesem Malzgetränk herausgefunden werden können. Flüssiges Extraktion sowie SPE Technik werden für diese Quantifikation getestet und benutzt um die SAFE Extrakte in einem organischen Lösungsmittel zu konzentrieren.

Das Optimum von 30 Minuten zu 60° mit einer Faser divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxan wurde durch die Optimierung der SPME Parameter für die Absorbierung erreicht. Die in der SPME Dynamik durchgeführten Tests waren nicht überzeugend. Die statische SPME bleibt die beste Alternative. Wiederrum wurde für den SAFE ein optimale Leistung von 2ml/min für eine Temperatur des distillierten Ballons von 40° erreicht. Die vier in SPME identifizierten Hauptkomponenten aller Malztypen sind Hexanal, Acetic Acid, Benzaldehyd und Hexanoic Acid. Was die Malzgetränke mit Ananas Aroma anbelangt, sind die Komponenten Extrakte durch SPME und SAFE prinzipiell Esters, wie zum Beispiel Butylsäurethylester, Essigsäurepentylester oder hexylsäurepropenylester. Diese Volatile kommen hauptsächlich vom Ananasaroma. Die beste extraktions Methode der Volatil-Komponente vom wässrigen Extrakt des SAFE wurde als die SPE bestätigt, der äther wird als Lösungsmittel benutzt. Letztendlich wurden die Resultate der Deckungsrate SAFE des Ananasaroma Volatils als befriedigend herausgestellt. Die Mehrheit der Komponenten erreichen Werte über 70%.

Schlüsselwörter: Extraktion, flüchtige, Aroma, Malz, Ananas, Getränk, SPME, SAFE, SPE, GC-MS/FID

Remerciements

Ce travail de diplôme a été effectué au sein de l'entreprise Fayrouz Manufacturing & Technology Centre à Bulle, plus précisément au laboratoire de contrôle qualité.

Je souhaiterais, par ces quelques lignes, remercier toutes les personnes qui m'ont aidé, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail de diplôme :

- Messieurs Ennio Cantergiani, Chef du contrôle qualité, et Pascal Fuchsmann, Ingénieur en chimie, pour toutes les commandes de matériel, leur soutien ainsi que leurs précieux conseils qui m'ont permis de me guider au travers de ce travail.
- L'ensemble des collaborateurs de l'entreprise Fayrouz pour leur accueil et leur gentillesse tout au long de mon travail.
- Le personnel du laboratoire pour leur soutien et leur bonne humeur quotidienne.
- Monsieur Stéphane Brodard pour le partage de son bureau et son accueil chaleureux.
- Monsieur Urban Frey, professeur responsable, pour ses conseils durant le travail.

TABLE DES MATIERES

1	INTRODUCTION.....	6
1.1	LE MALT	6
1.1.1	<i>L'orge et le malt</i>	6
1.1.2	<i>Le malt dans la bière</i>	8
1.1.3	<i>Le maltage</i>	9
1.1.4	<i>La torrification</i>	10
1.1.5	<i>Les divers types de malt</i>	11
1.2	LES AROMES.....	11
1.3	LES TECHNIQUES ANALYTIQUES.....	12
1.3.1	<i>La technique SPME</i>	12
1.3.2	<i>La technique SAFE</i>	13
1.3.3	<i>La technique SPE</i>	14
2	PARTIE EXPERIMENTALE.....	15
2.1	MATERIEL	15
2.2	REACTIFS ET TOXICOLOGIE	16
2.3	METHODES.....	16
2.3.1	<i>Optimisation des paramètres SPME</i>	16
2.3.2	<i>Identification des composés volatils de divers malts</i>	17
2.3.3	<i>SPME dynamique</i>	17
2.3.4	<i>Appareillage du SAFE (solvent assisted flavour evaporation)</i>	19
2.3.5	<i>Déroulement d'un essai SAFE</i>	22
2.3.6	<i>Optimisation des paramètres SAFE</i>	22
2.3.7	<i>Identification des composés volatils dans l'extrait SAFE</i>	23
2.3.8	<i>Taux de recouvrement SAFE</i>	24
2.4	PROVENANCE DES ECHANTILLONS	25
2.5	PARAMETRES GC	25
2.5.1	<i>Paramètres GC-MS pour la SPME</i>	25
2.5.2	<i>Paramètres GC-MS pour les injections liquides</i>	26
2.5.3	<i>Paramètres du détecteur de masse</i>	26
2.5.4	<i>Paramètres GC-FID pour la quantification</i>	26
3	RESULTATS ET DISCUSSION.....	27
3.1	OPTIMISATION DES PARAMETRES SPME.....	27
3.2	IDENTIFICATION DES COMPOSES VOLATILS DE DIVERS MALTS.....	30
3.3	SPME DYNAMIQUE.....	34
3.4	OPTIMISATION DES PARAMETRES SAFE	35
3.5	IDENTIFICATION DES COMPOSES VOLATILS DANS L'EXTRAIT SAFE.....	36

3.6	TAUX DE RECOUVREMENT SAFE	40
3.6.1	<i>Taux de recouvrement SPE</i>	40
3.6.2	<i>Taux de recouvrement SAFE sans matrice</i>	41
3.6.3	<i>Taux de recouvrement SAFE avec matrice</i>	41
3.6.4	<i>Comparaison entre les extractions SAFE et SPME</i>	44
4	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	45
5	TABLEAUX ET FIGURES	46
6	BIBLIOGRAPHIE	47
7	ANNEXES	48

Abréviations

ADP : Adénosine diphosphate

ATP : Adénosine triphosphate

DVB : Divinylbenzène

GC-FID : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

m/z : Rapport masse sur charge

PDMS : Polydiméthylsiloxane

SAFE : Solvent Assisted Flavour Evaporation

SPE : Solid Phase Extraction

SPME : Solid Phase MicroExtraction

1 Introduction

1.1 le malt

1.1.1 L'orge et le malt

Le malt est une céréale germée, en général de l'orge. L'orge commune est une céréale à paille. C'est donc une plante herbacée annuelle de la famille des poacées. Elle est la plus ancienne céréale cultivée et est caractérisée par ses épis aux longues barbes.

Parmi les variétés cultivées, on distingue :

- les orges d'hiver, résistantes au froid, environ jusqu'à -15 degrés ; elles peuvent avoir des épis plats à 2 rangs de graines ou des épis cylindriques à 6 rangs de graines. Les variétés d'orge d'hiver à 6 rangs portent le nom d'escourgeon. Elles se sèment de fin septembre à début octobre et ont besoin d'être bien installées avant l'hiver.
- les orges de printemps, sensibles au gel, au cycle végétatif plus court, se sèment en février-mars.

L'orge, céréale secondaire, est une importante ressource énergétique en alimentation animale (orge de mouture) mais est pauvre en protéines et demande à être complétée. En alimentation humaine, son principal débouché est la brasserie. L'orge germée et grillée donne le malt, dont le produit de fermentation est la bière. Les malteurs sont exigeants en termes de calibrage et de teneur en protéines qui doit rester faible. Ce sont les variétés de printemps qui ont leur préférence [1][2].



Figure 1 : illustration d'orge [2]



Figure 2 : illustration de grains d'orge [2]

En 2004, la production mondiale d'orge s'est élevée à 155 millions de tonnes pour une surface emblavée de 57 millions d'hectares. Seize pays réalisent 80 % de cette production (voir tableau 1).

Tableau 1 : liste des principaux pays producteurs d'orge [2]

Principaux pays producteurs		
	Surface cultivée (Mha)	Production (Mt)
Russie	9,30	18,00
Canada	4,16	13,04
Allemagne	2,24	12,97
Ukraine	4,49	11,08
France	1,63	11,00
Espagne	3,18	10,58
Turquie	3,50	9,00
Australie	3,76	7,79
États-Unis	1,63	6,10
Royaume-Uni	1,01	5,86
Danemark	0,71	3,73
Pologne	1,09	3,48
Chine	0,85	3,20
Maroc	2,31	2,76
Iran	1,60	2,70
République Tchèque	0,47	2,29

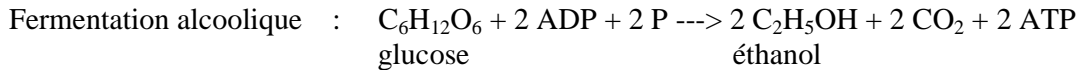
Le malt est principalement utilisé dans la fabrication de boissons alcoolisées tels que le whisky et surtout la bière. Il est aussi utilisé pour la fabrication de produits alimentaires comme le vinaigre de malt. Le maltage est une opération qui consiste à reproduire, de façon industrielle, le développement naturel d'une céréale, généralement de l'orge, bien que le froment s'y prête également, afin que cette dernière produise certains enzymes et des sucres [1], [2].



Figure 3 : malt germé à partir de l'orge [2]

1.1.2 Le malt dans la bière

Une bière est composée de 4 ingrédients principaux : **de l'eau** de source pure (jusqu'à 10 litres pour 1 litre de bière ; elle est analysée afin d'apporter des garanties au brasseur quant à sa pureté bactériologique ainsi que ses caractéristiques minérales), **du houblon** (entre 150 et 250g pour 100 litres de bière) pour l'amertume, les arômes, l'aseptisation et la digestibilité, **de l'orge** (130g environ pour un litre de bière) qui devient malt après germination et **de la levure** (6g environ pour un litre) permettant la fermentation alcoolique mais donnant aussi le goût et le parfum.



La longue transformation de ces éléments en bière s'étale sur une durée variant de 2 à 3 semaines (bières industrielles) à quelques mois (bières de garde, de haute fermentation, trappistes...). La fabrication de la bière comporte 3 phases principales :

- le maltage : c'est une germination limitée de l'orge qui a pour but de développer le potentiel enzymatique du grain.
- le brassage : pendant cette étape l'amidon du malt est hydrolysé en sucres fermentescibles par les enzymes du grain. Il comprend les opérations de concassage du malt, de brassage proprement dit, de filtration, de cuisson et d'aromatisation par du houblon.
- la fermentation : les sucres fermentescibles sont transformés en alcool par des levures de bière au cours d'une étape de fermentation principale et d'une étape de maturation en cave de garde. [3]

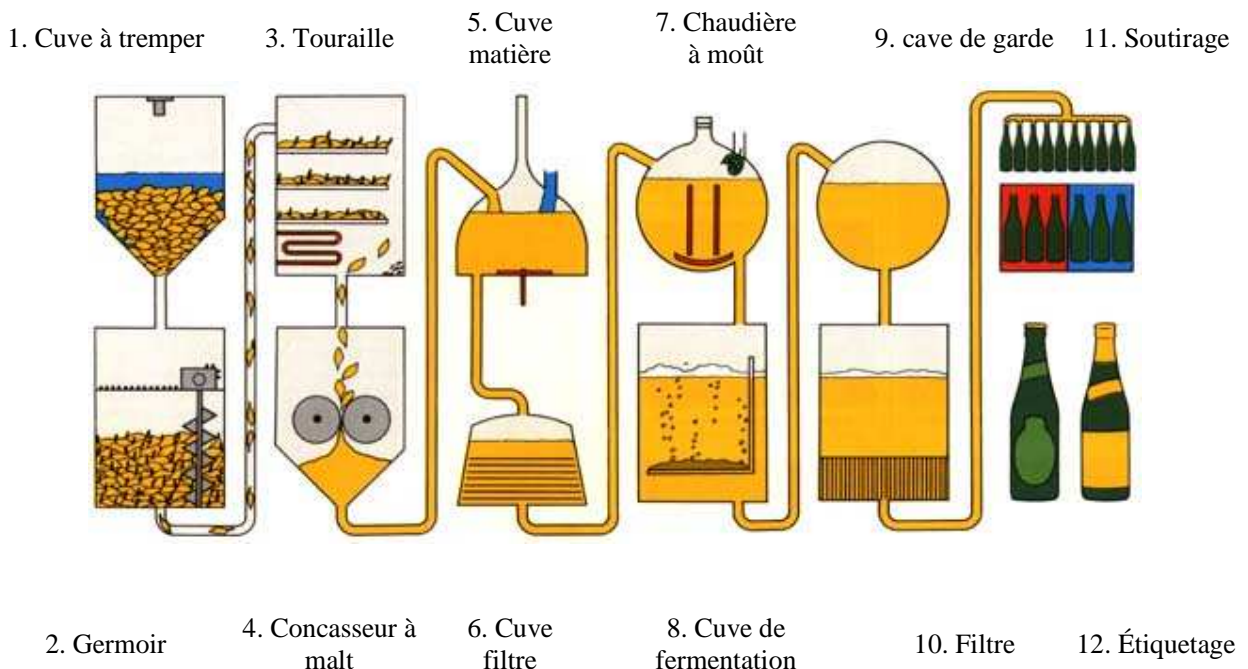


Figure 4 : illustration du procédé de fabrication de la bière [3]

Lors de la fabrication de simples boissons maltées, les étapes 8 (cuve de fermentation) et 9 (cave de garde) sont éliminées.

1.1.3 Le maltage

Le principe du maltage consiste à reproduire les conditions idéales de développement du grain d'orge (chaleur et humidité) afin qu'il produise certains enzymes (catalases, amylases, phosphatases, protéinases, peptidases) nécessaires à la saccharification de l'amidon, et donc à la fabrication de l'alcool lors de la fermentation. Une fois les conditions réunies, l'orge commencera à produire des enzymes qui lui permettront [2] [4]:

- de pénétrer à travers la barrière hémicellulosique et ainsi de pouvoir accéder à ses réserves d'amidon ;
- de transformer l'amidon notamment en glucose, glucide métabolisable par les levures (produisant ainsi de l'eau et du CO₂).

Le maltage se déroule en 4 étapes :

- le trempage, qui consiste à mettre l'orge à tremper pendant une dizaine d'heures.
- la germination, qui est la période durant laquelle l'orge va commencer à germer, et donc produire des enzymes telles que l'amylase. Cette étape dure environ une cinquantaine d'heures, variable en fonction de l'orge, et donne naissance à ce que l'on appelle le « malt vert ».
- le touraillage, qui consiste à sécher le « malt vert » (son humidité passe de 45% à 4%) dans un four à air à une température de 40°C durant une trentaine d'heures. Lors de cette étape, le malteur effectue un « coup de feu » où le « malt vert » est chauffé jusqu'à atteindre une température comprise entre 85°C et 105°C durant 1 à 4 heures : c'est la torréfaction. Torrifier est l'action de rôtir les grains de malt pour donner une saveur et une couleur particulière à la bière. Cette étape est cruciale car c'est la durée de la torréfaction qui va déterminer la teinte du malt ainsi que le goût de la bière. De même, le taux d'humidité va jouer sur l'arôme de caramel.
- le dégermage, qui consiste à débarrasser le malt de ses radicules.

À l'issue de cette étape le malt est un élément inerte qui peut être conservé près d'un an.

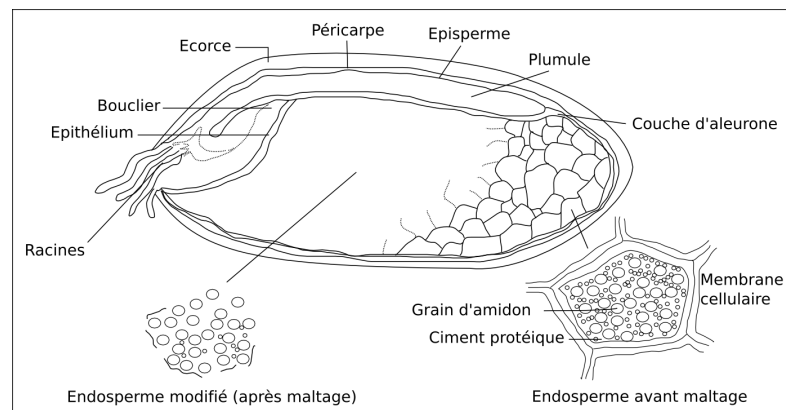


Figure 5 : section longitudinale d'un grain d'orge [2]

L'extrait de malt est une bouillie formée de farine maltée mélangée avec de l'eau et ayant subi un processus d'hydrolyse enzymatique. Les molécules contenues dans les graines de céréales maltées, généralement de l'orge maltée, sont transformées par les enzymes générés lors du maltage en des molécules plus petites et plus simples, utilisables par la plante pour sa croissance. Ce mélange de molécules facilement digestibles lors de leur consommation peut être concentré après filtration, ce qui donnera un sirop appelé extrait de malt. Le sirop contient essentiellement des dérivés de l'amidon (maltose principalement), des acides aminés issus de la transformation de protéines, des vitamines et des sels minéraux [1] [4].

1.1.4 La torréfaction

La torréfaction est le nom de l'étape où le malt est « grillé » à haute température : cette étape donne l'arôme et la saveur caractéristique au malt. Cette saveur est donc dépendante de la durée de la torréfaction. Lors de celle-ci se produisent des réactions appelées réactions de Maillard : ce sont des réactions de brunissement non enzymatiques qui surviennent lors des différents traitements subis par nos aliments : cuisson, torréfaction, conservation, grillage. A ces réactions, on peut également associer les réactions de dégradation thermique des sucres, des acides aminés et des vitamines [5].

Louis-Camille Maillard fit part de sa découverte surprenante à L'Académie des Sciences le 8 janvier 1912. Alors qu'il travaillait sur la synthèse de protéines par chauffage, il obtint par hasard des substances aromatiques et colorées qu'il identifia comme des mélanoidines (figure 6), polymères bruns responsables de la couleur et de la saveur de nombreux aliments : croûte du pain, café et chocolat torréfiés, bière... La réaction de Maillard est un ensemble de réactions physico-chimiques complexes qui, durant l'échauffement (la cuisson), produisent, entre autre, les arômes et les colorations brunes. Ainsi, alors que le malt vert ne laisse distinguer que 3 arômes, sa torréfaction va conduire à l'émergence de centaines de composés aromatiques. Cette réaction met en œuvre, dans des substrats biologiques ou agroalimentaires, des composés présentant des groupements réducteurs (aldéhydiques ou cétoniques), et des composés aminés qui réagissent entre eux pour produire des substances aromatiques et colorées [6] [7].

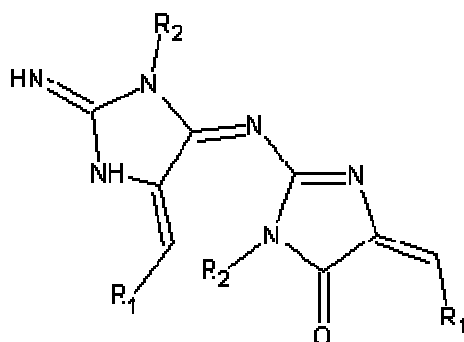


Figure 6 : la mélanoidine

1.1.5 Les divers types de malt

Le malt peut être pâle ou foncé, suivant sa torréfaction, mais, quelle que soit la recette utilisée, l'ingrédient de base de toute boisson est le malt pâle. Souvent employé seul, on lui ajoute parfois d'autres ingrédients, par exemple des céréales ou des malts spéciaux (plus foncés), mais il compte habituellement pour 75 % du poids des ingrédients. A part le malt pâle, il existe des dizaines d'autres malts plus ou moins torréfiés comme par exemple le malt foncé, le malt caramel, le malt chocolat (fortement torréfié) et le malt noir (très fortement torréfié) [8].

1.2 Les arômes

On a longtemps eu l'habitude de rapprocher l'arôme du parfum : c'est qu'il existe en effet de grandes analogies dans les conceptions, dans les matières premières utilisées, dans les techniques aussi, à tel point que se sont bien souvent les mêmes firmes qui exercent la double activité. Par contre, si depuis la plus haute Antiquité le parfum a su définir son individualité, l'arôme est resté, à juste titre d'ailleurs, totalement intégré à l'aliment.

Ainsi, tous nos aliments et toutes nos boissons possèdent des constituants odorants que nous percevons inconsciemment. Cette règle est valable qu'il s'agisse de produits frais ou de produits préparés, qu'il s'agisse d'aliments élaborés à la maison ou de produits industriels.

On peut alors définir l'arôme d'un aliment comme l'ensemble des substances qui y sont présentes au moment de sa consommation et capable d'intégrer le passage gazeux respiratoire pour créer des sensations olfactives. Cette définition exige les précisions suivantes :

- Le terme « arôme » est réservé à l'usage alimentaire
- L'arôme est souvent le résultat d'un mélange de nombreuses molécules
- Ces corps chimiques doivent avoir pour caractéristiques de changer d'état en passant d'un milieu le plus souvent aqueux à une phase gazeuse, de pouvoir atteindre l'organe olfactif au travers du mucus nasal (solubilité adéquate) ainsi que d'être des molécules réagissant avec les membranes réceptrices de l'organe sensoriel (chimiorécepteur).

L'expérience montre que les corps odorants présents dans un aliment le sont le plus souvent en quantités infimes. Toutefois, certains ingrédients bien connus pour leurs caractéristiques aromatiques (aromates,...) en sont notablement plus riches : par exemple, près de 40% d'oléorésine est présent dans la noix de muscade. Mais on descend à des quantités largement inférieures (environ 1 pour 10'000) dans bon nombre de fruits. Les aliments consommés se rapprochent plutôt de la deuxième proportion.

Chaque arôme extrait et analysé se révèle comme étant un mélange de centaines de molécules. On relève souvent dans différents arômes des molécules identiques dans des proportions différentes ou associées à d'autres molécules.

Dans la chimie des arômes, les esters font partis de la plus grande famille représentée avec près de 40% des molécules, suivis des cétones, des alcools ainsi que des aldéhydes. Il faut remarquer la place essentielle occupée par les esters qui permettent des combinaisons multiples du fait qu'il s'agit d'une réaction assez facile entre un alcool et un acide. Principaux constituants des huiles essentielles, les terpénoïdes (myrcène, limonène, pinène,...) ont pondéralement une place très importante dans les substances aromatiques.

Les scientifiques ont identifié des molécules intéressantes d'un point de vue aromatique (pour renforcer et améliorer le goût des arômes), mais qui n'existent pas dans la nature: ce sont les substances aromatisantes artificielles. Lorsqu'elles rentrent dans la composition d'un arôme, celui-ci est également qualifié d'artificiel.

Contrairement à ce que l'on croit fréquemment, les molécules odorantes n'ont pas un point d'ébullition particulièrement bas. Certes, des substances gazeuses à la température ambiante sont odorantes (acétaldéhyde) mais d'autres ont un point d'ébullition situé majoritairement entre 200 et 250 °C.

Dans la majorité des cas, la solubilité dans l'eau des corps odorants est plutôt faible. Le nombre de molécules qui passe en solution sera également fonction de la pression de vapeur qui règne au-dessus de ce liquide [9].

1.3 Les techniques analytiques

1.3.1 La technique SPME

La Micro-Extraction sur Phase Solide est une miniaturisation du procédé d'extraction sur phase solide. Cette technique d'extraction gaz-solide ou liquide-solide, commercialisée depuis 1993, est le plus souvent couplée à la chromatographie en phase gazeuse (CPG) en vue de l'analyse des composés extraits.

Cette méthode, qui n'utilise pas de solvants organiques et ne nécessite qu'un très faible volume d'échantillon se décompose en deux étapes. La première étape, d'extraction, consiste en un équilibre de partage entre une phase solide et une phase gazeuse ou liquide (adsorption ou absorption). Cette phase solide est un film polymère (longueur 1 cm, épaisseur 7 à 100 µm) enrobant une fibre en verre de silice (diamètre 100 µm), l'ensemble étant protégé dans une aiguille creuse amovible. L'aiguille amovible a pour rôle de percer le septum du flacon contenant l'échantillon à analyser ; la fibre est alors déployée hors de l'aiguille et plongée soit directement dans l'échantillon, à l'état liquide ou gazeux, soit au-dessus de l'échantillon (le headspace) à l'état liquide ou solide. Les solutés se concentrent alors dans la phase solide polymérique. La seconde étape consiste en la désorption thermique des solutés adsorbés. Pour ce faire, la fibre de silice, recouverte du film polymère et protégée dans l'aiguille creuse, est plongée dans un injecteur CPG chauffé. Une fois dans l'injecteur, la fibre est à nouveau déployée hors de l'aiguille creuse protectrice et les solutés sont alors rapidement désorbés et transférés vers la colonne de CPG pour analyse. Ce système permet une analyse exclusivement qualitative [10]. Différents types de fibres sont présentés dans la figure 7.

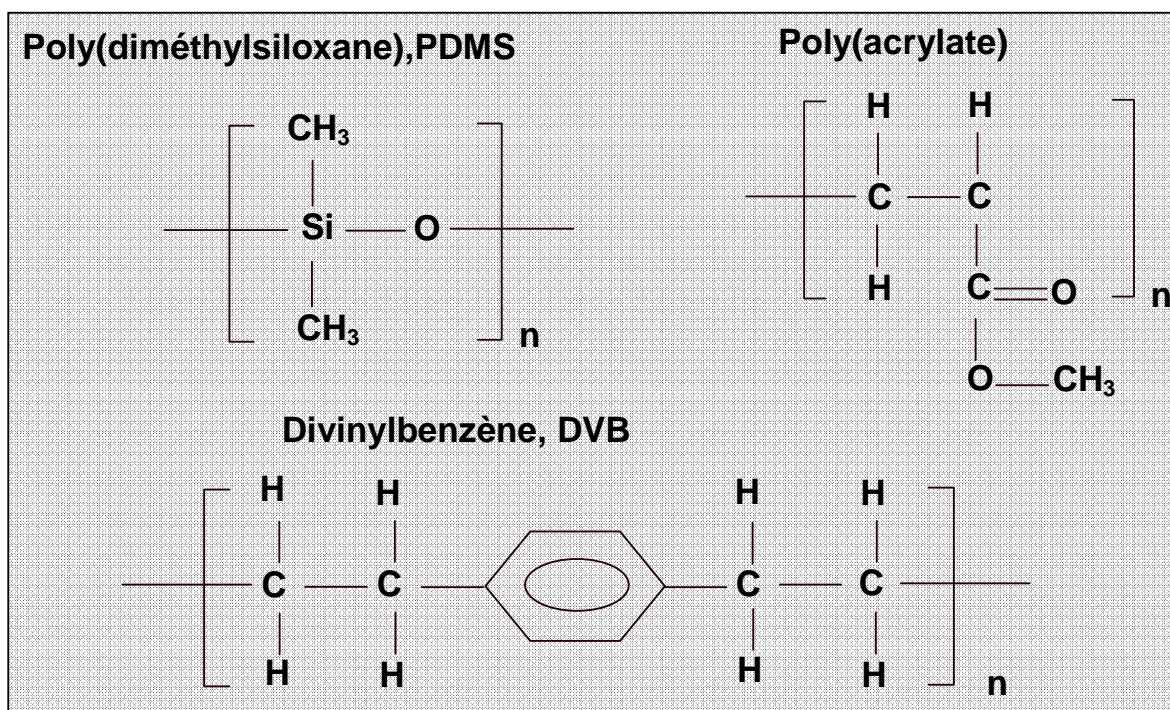


Figure 7 : différentes phases solides polymériques [11]

1.3.2 La technique SAFE

La mise au point de techniques sophistiquées afin de séparer les composés aromatiques volatils des non-volatils dans des matrices alimentaires par le biais de l'extraction et / ou de la distillation a été une tâche difficile depuis des centaines d'années. Aujourd'hui, l'enrichissement de l'odeur active des volatils à partir de matrices alimentaires complexes reste un défi, tout comme l'identification et la quantification des aliments odorisants.

En général, les techniques appliquées doivent répondre aux exigences suivantes:

- Les composés qui contribuent beaucoup à un certain goût ne devraient pas être l'objet de distinctions particulières
- Les conditions ne devraient pas modifier la structure des principaux composés aromatiques
- Les composés non volatils qui pourraient interférer avec la séparation par chromatographie en phase gazeuse devraient être complètement éliminés

La distillation par entraînement à la vapeur est parmi les plus anciennes techniques utilisées pour séparer les volatils à partir de matériaux non volatils. Toutefois, bien que les extraits aromatiques puissent être obtenus très rapidement et très simplement par cette méthode, les températures élevées appliquées au cours de la distillation peuvent conduire à la formation d'artefacts, en particulier lorsque des sucres et des acides aminés libres sont présents dans l'échantillon alimentaire [12]. En effet, lors d'une distillation classique à pression atmosphérique d'une boisson en solution aqueuse (dans le cadre de ce travail), la température d'ébullition de celle-ci avoisine les 100 °C, ce qui provoque la formation de composés indésirables par des réactions de Maillard (voir chapitre 1.1.4). Ces artefacts synthétisés ne permettent alors plus d'obtenir un profil aromatique qui représente la réelle composition de l'extrait comprenant les volatils recherchés. Grâce à la nouvelle technique

SAFE (solvent assisted flavour evaporation), il est possible de distiller cette même boisson à des températures beaucoup plus basses, ne provoquant pas la formation de ces artefacts. Ceci est possible grâce à un vide très poussé (pression atteignant 10^{-6} mbar) obtenu avec une pompe turbomoléculaire et un ballon de récupération des volatils plongé dans un bain d'azote liquide (-196°C). Ce système de différentiel de température extrême relié par l'appareillage pousse le passage des volatils entraînés par l'eau dans ce ballon de récupération (congélation), ce qui permet donc la séparation avec les composés non-volatils.

De plus, l'appareil est stable et facile à manipuler, ce qui permet une bonne sécurité lors de son utilisation sous haut vide. Une photo de l'appareillage SAFE avec la pompe turbomoléculaire est présentée en figure 8.

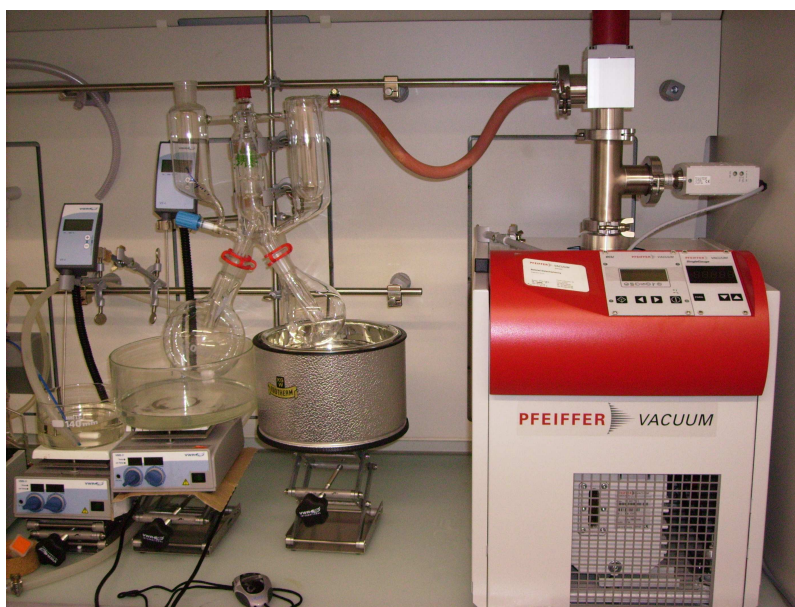


Figure 8 : illustration de l'appareillage SAFE lié à la pompe turbomoléculaire

1.3.3 La technique SPE

L'extraction sur phase solide est une étape de concentration des composés organiques présents dans les matrices aqueuses avant analyse (p. ex. chromatographique). Cette méthode consiste à percoler l'échantillon aqueux sur un support solide pour piéger les analytes recherchés, puis de les récupérer avec un volume minimum de solvant organique. Le principe de l'extraction sur phase solide est illustré ci-dessous en figure 9 [10]:

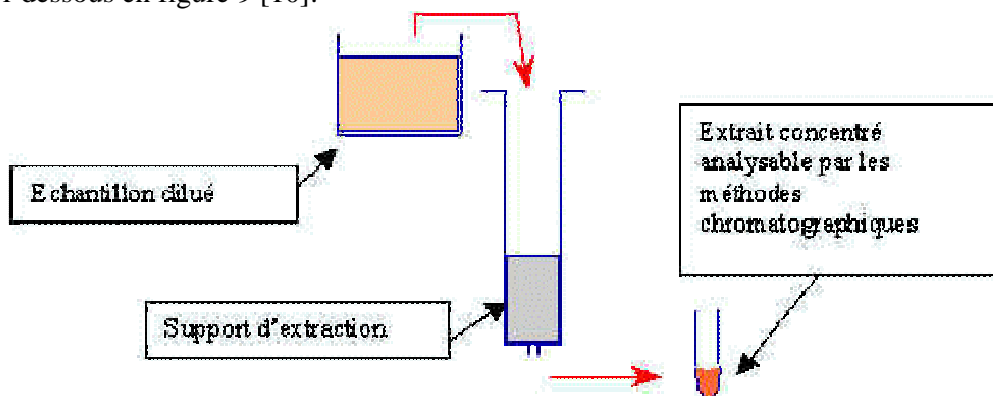


Figure 9 : schéma d'une extraction sur phase solide [10]






2 Partie expérimentale

2.1 Matériel

- Fibres pour SPME :
 - 50/30 µm Divinylbenzène / Carboxène / Polydiméthylsiloxane , Supelco 57328-U (grise)
 - 85 µm Polyacrylate coating , Supelco 57304 (blanche)
 - 100 µm Polydiméthylsiloxane coating, Supelco 57300-U (rouge)
- GC-MS Hewlett Packard 5890 Series II :
 - Détecteur HP 5972 Series, Mass Selective Detector
 - Colonne à haute résolution pour chromatographie en phase gazeuse, Agilent Technologies, J&W Scientific, 19091F-433, HP-FFAP
 - Injecteur automatique Hewlett Packard 7673 GC/SFC Injector
 - Echantillonneur automatique Hewlett Packard
- GC-FID Agilent Technologies 6890N Network GC System
 - Colonne capillaire Teknokroma® TR-150141 / TRB-FFAP
 - Injecteur automatique Hewlett Packard 7683 Series Injector
 - Echantillonneur automatique Agilent 7633 Series Autosampler
- Centrifugeuse Universal 32 R, Hettich
- Broyeuse SOMMER, Velo MUL 40
- Débitmètre Aalborg P16B2 – BA0A
- Bain ultrasons VWR ultrasonic cleaner USC300TH
- Appareillage SAFE, Glasbläserei Bahr – Allemagne (voir chapitre 2.3.4)
- Pompe turbomoléculaire Pfeiffer Vacuum DUO 5
- Graisse spéciale pour vide poussé Dow Corning
- Plaque chauffante VWR VMS-D S40
- Sonde de température VWR VT-4 26666 40
- Pompe NOUVAG SP 40/6
- Cartouche SPE, Interchim XC-1G/6
- Balance METTLER TOLEDO PG5002-S DeltaRange®
- Micropipette SOCOREX 100-1000µl
- Micropipette SOCOREX 10-100µl

2.2 Réactifs et toxicologie

Tableau 2 : provenance et toxicologie des produits utilisés

Produit	Formule	Provenance	Danger	Remarques
Chlorure de sodium	NaCl	Fluka 71380	---	---
Hexane	C ₆ H ₁₄	Panreac 133242.1611		95 %
Ether diéthylique	C ₄ H ₁₀ O	Panreac 132770.0311		Très inflammable
Azote liquide	N ₂	Pangas L-2025	---	Eviter tout contact avec la peau (risque de brûlures)
Dichlorométhane	CH ₂ Cl ₂	Fisher Scientific 0583361		---
Méthanol	CH ₃ OH	Riedel-de Haën 34860		---
Arôme ananas	---	Fayrouz / Pineapple 1302	---	---
Butanoate de pentyle	C ₉ H ₁₈ O ₂	SynacoSY7728	---	---
Acide citrique anhydre	C ₆ H ₈ O ₇	Reactolab 1088949		---
Saccharose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sucre cristallisé vendu dans le commerce	---	---

2.3 Méthodes

2.3.1 Optimisation des paramètres SPME

Afin d'obtenir les meilleurs chromatogrammes possibles pour l'identification des composés de divers malts, plusieurs paramètres de l'analyse SPME ont été optimisés. Trois différentes fibres ont été testées : une fibre polydiméthylsiloxane (PDMS), une fibre polyacrylate ainsi qu'une fibre divinylbenzène (DVB) / carboxène / polydiméthylsiloxane (PDMS). Divers temps (15, 30 et 60 minutes) et températures (40, 50, 60 et 70°C) d'adsorption ont également été expérimentés. Lors de cette optimisation et tout au long du travail, la méthode GC-MS utilisée est la méthode classique des analyses des arômes de l'entreprise Fayrouz. Les paramètres GC de cette méthode sont détaillés au chapitre 2.5.1. Pour cette optimisation, le malt utilisé est le malt foncé (voir chapitre 2.4).

2.3.2 Identification des composés volatils de divers malts

Les analyses SPME ont été effectuées sur 3 malts de torrifications différentes : il s'agit du malt pale, du malt crystal et du malt foncé. Pour chaque essai, le malt a été broyé finement à l'aide d'une broyeuse et introduit jusqu'à environ un tiers d'un vial de 15 ml. Ensuite, un léger volume d'eau (2-3ml pour bien humidifier le malt) saturé en NaCl a également été introduit dans celui-ci afin de favoriser le passage des volatils dans le headspace. La fibre, le temps et la température d'adsorption optimisés précédemment ont logiquement été utilisés pour ces différentes analyses qualitatives. La fibre a ensuite été désorbée et les composés identifiés grâce à un GC-MS dont les paramètres sont détaillés dans le chapitre 2.5.1. La bibliothèque utilisée comme aide à l'identification des composés par leurs spectres de masse est une librairie MS spécifique aux composés aromatiques appartenant à l'entreprise Fayrouz.

2.3.3 SPME dynamique

Une technique de SPME dynamique a également été testée : un débit d'air à optimiser à l'aide d'un débitmètre (de 10 à 50 ml/min) a été introduit durant 10 minutes par un bouchon en verre prévu à cet effet dans un dispositif au fond duquel 5ml d'échantillon (Fayrouz ananas dégazée dans un bain à ultrasons) saturé en NaCl y avaient été introduits. Le conduit en verre, qui se trouve au dessus de l'échantillon et par lequel s'évacue l'air, mène à la fibre SPME qui a été fixée à sa sortie (fibre choisie après l'optimisation des paramètres SPME). Afin de tester cette technique à d'autres températures qu'ambiante, un bain d'eau ainsi qu'une plaque chauffante ont également été placés au fond de l'appareillage. Un schéma du dispositif est détaillé dans la figure 10. La fibre a ensuite été désorbée sur un GC-MS dont les paramètres sont détaillés dans le chapitre 2.5.1. Il sera alors possible de comparer ces résultats avec une SPME statique dont l'adsorption a également été effectuée durant 10 minutes à 60°C sur 5 ml de Fayrouz ananas dégazée.

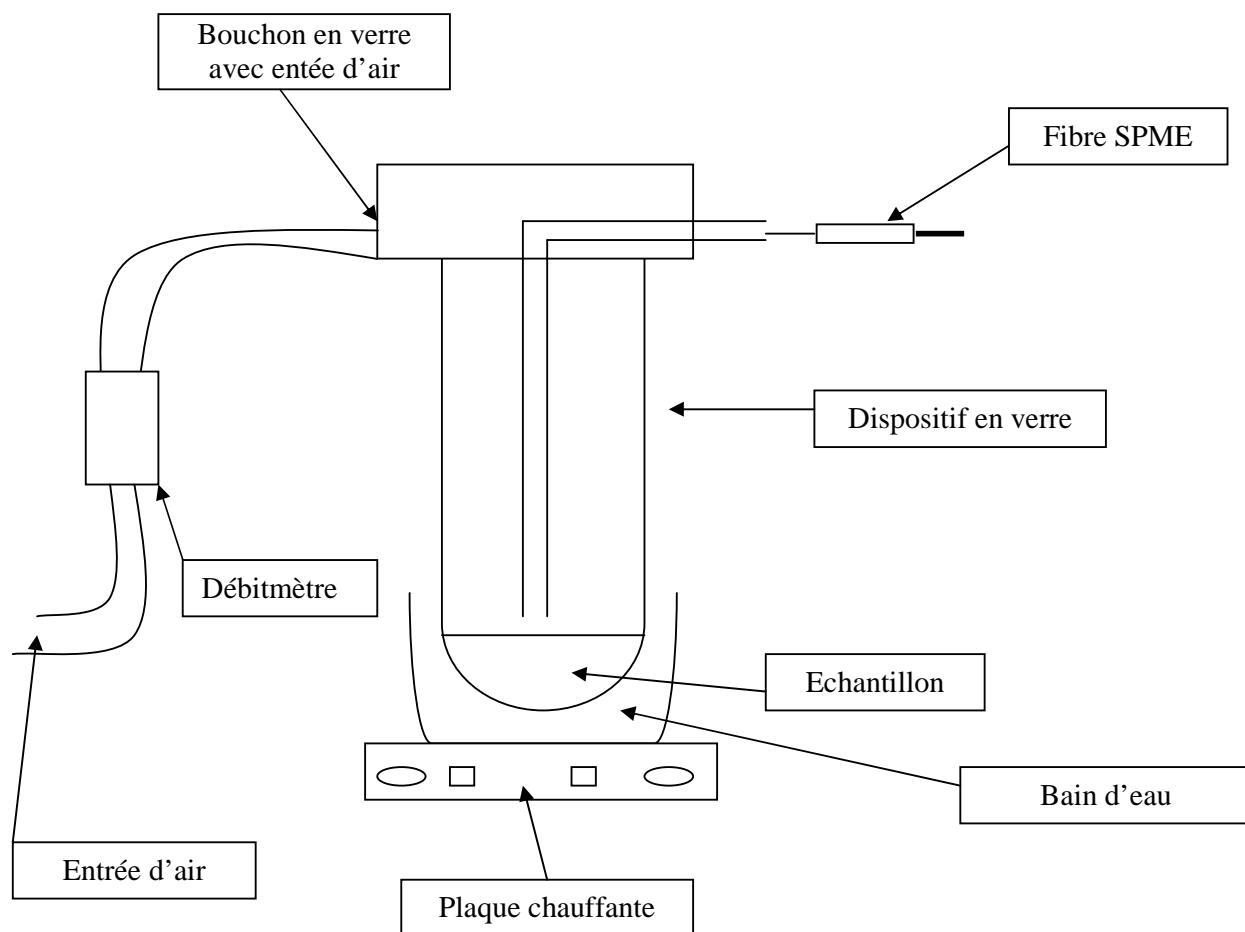


Figure 10 : schéma du dispositif de la SPME dynamique



Figure 11 : illustration du dispositif de la SPME dynamique

2.3.4 Appareillage du SAFE (solvent assisted flavour evaporation)

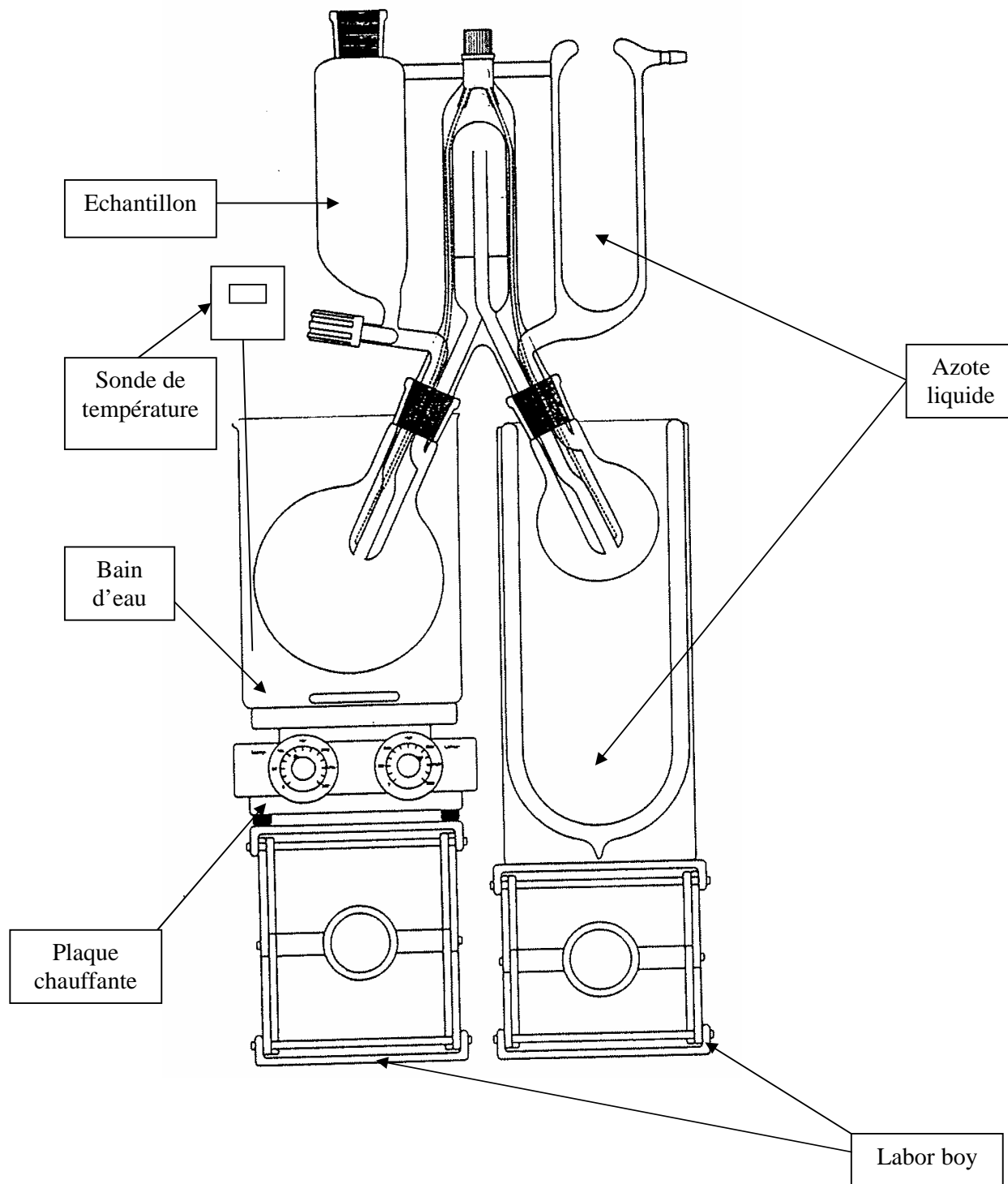


Figure 12 : schéma grossier du matériel utilisé pour les extractions SAFE [12]

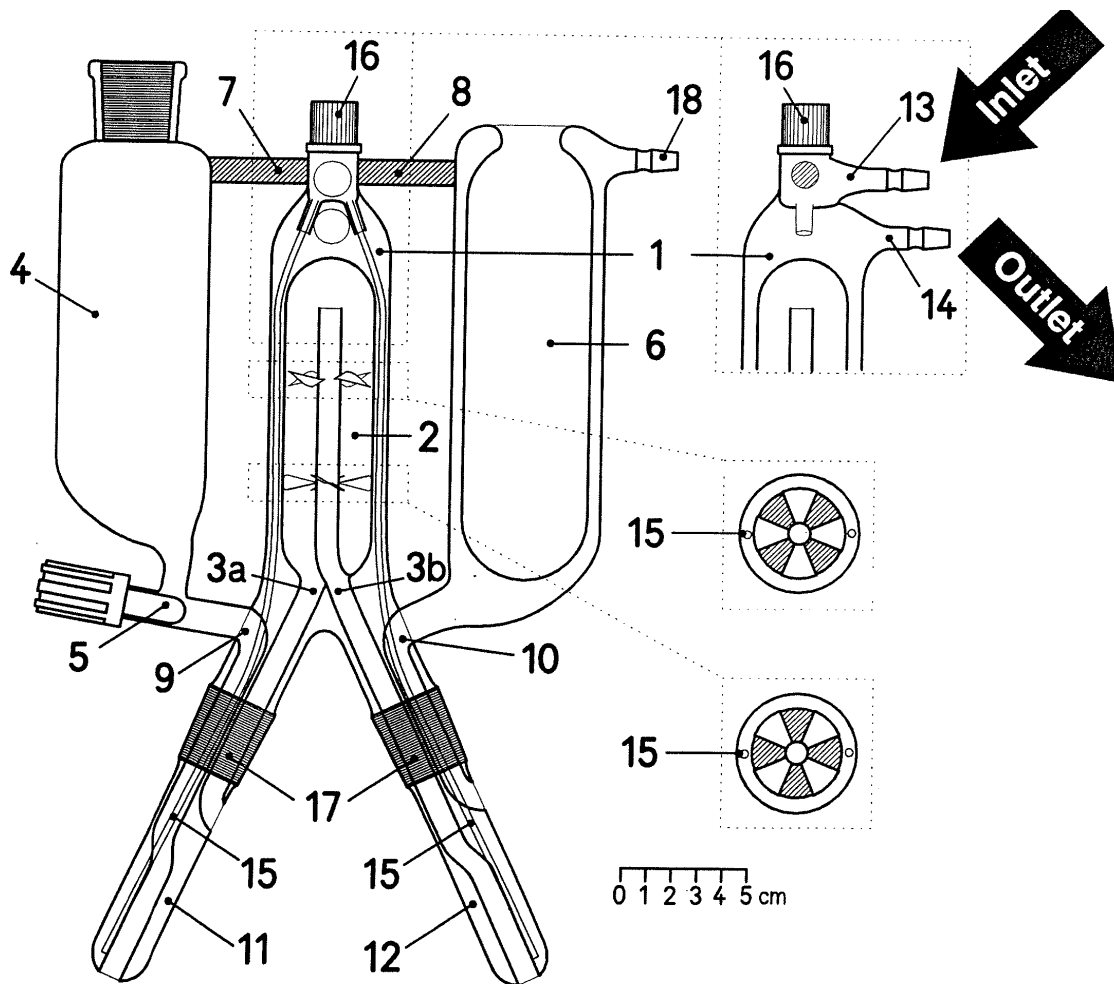


Figure 13 : schéma détaillé de l'appareillage SAFE [12]

1. Compartiment permettant la régulation de la température de la tête centrale (circuit d'eau)
2. Tête centrale (présence des volatils)
- 3a. Entrée des vapeurs (volatils) dans la tête centrale
- 3b. Entrée des vapeurs (volatils) dans le ballon de récupération (plongé dans l'azote liquide)
4. Ampoule à introduire
5. Robinet spéciale pour vide poussé
6. Trappe de refroidissement (en l'occurrence à l'azote liquide) empêchant certains volatils de s'échapper par la pompe
7. et 8. Tubes en verres remplis assurant la stabilité du système.
9. Passage du liquide à distiller de l'ampoule à introduire au ballon de distillation (plongé dans un bain d'eau thermostatisé)

10. Passage permettant d'effectuer le vide dans toute l'installation
11. «Jambe» gauche
12. «Jambe» droite
13. Entrée de l'eau (température connue) dans la tête centrale
14. Sortie de l'eau de la tête centrale
15. Arrivée du circuit d'eau jusqu'aux extrémités des «jambes» par des tubes flexibles en polyéthylène
16. Bouchon en plastique
17. Rodages NS 29
18. Connexion à la pompe turbomoléculaire

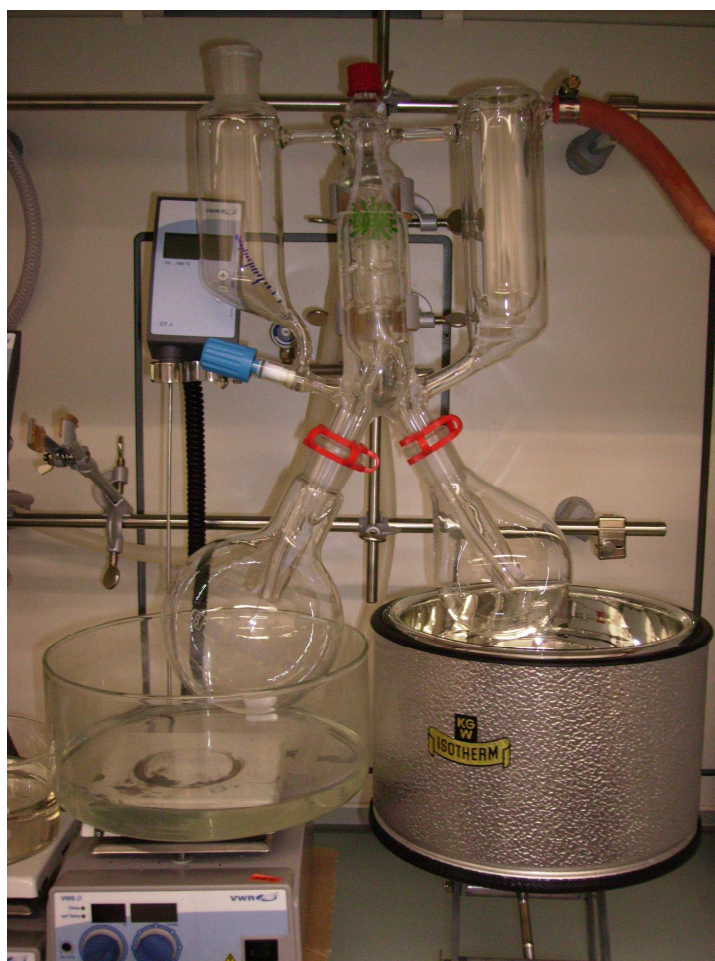


Figure 14 : illustration de l'appareillage SAFE

2.3.5 Déroulement d'un essai SAFE

Après avoir graissé correctement les rodages avec de la graisse spécifique pour vide poussé, fixé les deux ballons et fermé le robinet de l'ampoule à introduire, la pompe turbomoléculaire a été enclenchée. Le circuit d'eau, à une température bien définie de 20°C, a été mis en marche. Ce circuit passe dans la tête centrale ainsi que dans «les 2 jambes» de l'installation afin d'assurer une température constante durant la distillation et d'empêcher que le lieu de passage des volatils (n° 3b) ne se bouche à cause de la congélation de l'extrait dans celui-ci due à la basse température de l'azote liquide (-196°C). Afin de pouvoir maîtriser ce paramètre de température à 20 °C, le circuit d'eau n'a pas été branché sur le réseau (robinet), mais une petite pompe a assurée le passage de l'eau depuis un récipient thermostaté grâce à une plaque chauffante et une sonde de température, la sortie d'eau retournant dans ce même récipient. Le ballon de distillation, placé sous l'ampoule à introduire, a été thermostaté à une température bien définie (à optimiser) grâce à un bain d'eau et à une plaque chauffante munie d'une sonde de température. A l'intérieur de ce ballon de distillation, un bâtonnet magnétique a été introduit afin d'assurer une bonne agitation et ainsi d'éviter tout retard d'ébullition. Le ballon de récupération des volatils a été plongé dans un bain d'azote liquide (- 196°C) à l'aide d'un vase Dewar. De l'azote liquide a également été introduit dans la trappe de refroidissement à la jonction d'entrée de la pompe turbomoléculaire afin d'éviter au maximum le passage de volatils dans la pompe. L'introduction à un certain débit (à optimiser) de 100ml d'échantillon a pu débiter lorsque la pression à l'intérieur de l'installation a atteint une valeur stable (entre 2.0 et 4.0 * 10⁻⁵ mbar). Tout au long de l'essai, de l'azote liquide a été rajouté dans la trappe de refroidissement ainsi que dans le vase Dewar du bain de refroidissement du ballon de récupération afin de compenser l'évaporation rapide de cette azote liquide.

A la fin de l'essai, lorsque les 100ml ont été introduits, le robinet a été fermé précisément lors du passage de la dernière goutte d'échantillon afin d'éviter de casser le vide immédiatement. Le résidu a été agité encore quelques minutes afin de permettre aux derniers volatils de bien passer dans le ballon de récupération. La pompe a ensuite été éteinte et le vide cassé à l'intérieur de l'installation en ouvrant lentement le robinet. Puis, les 2 fractions (résidu et extrait) ont été récupérées. La fraction des volatils s'est bien évidemment trouvée sous forme solide (température proche de -200°C, attention de ne pas se brûler). Cette fraction a été laissée à température ambiante jusqu'à ce que cette phase aqueuse contenant les volatils soit sous forme liquide. Diverses analyses ont alors pu être effectuées.

2.3.6 Optimisation des paramètres SAFE

Les optimisations de la température du ballon de distillation et du débit d'introduction de l'échantillon depuis l'ampoule à introduire ont été effectuées avec 100ml d'une boisson Fayrouz à l'arôme ananas préalablement dégazé aux ultrasons. Celle-ci est composée d'extrait de malt (dilué à 2 plateaux), de 0.37% d'acide citrique, de 10% de saccharose et de 0.05% d'arôme ananas, le tout ayant subi une carbonatation puis une pasteurisation.

Les températures du bain d'eau du ballon de distillation testées ont été 20, 30 et 40°C. Des températures supérieures à 40°C ne sont bien entendu pas à expérimenter vu que le but premier de cette technique est de ne pas chauffer l'échantillon à des températures auxquelles pourraient se former des artefacts. Quant aux débits d'introduction de l'échantillon, les valeurs testées ont été de 2 ml/min (difficile de descendre plus bas avec un débit régulier), 10 ml/min, puis un essai par portions de 5ml a été réalisé comme décrit dans une publication sur le SAFE [12]. Afin de pouvoir respecter un débit régulier, l'utilisation d'un chronomètre a été nécessaire.

Les résultats obtenus sont d'une part le volume d'extrait récupéré (rendement) et d'autre part des analyses SPME en GC-MS effectuées sur ces extraits saturé en NaCl en utilisant toujours la même méthode GC (chapitre 2.5.1). Etant donné la présence de composés très volatils (provenant surtout de l'arôme ananas), l'adsorption SPME de la fibre a été effectuée durant 10 minutes et à température ambiante. Lors de ces optimisations, un essai a également été effectué en introduisant 30g de NaCl (saturation) dans le ballon de distillation avant le début de l'essai afin de constater si le passage des volatils dans l'extrait était favorisé.

2.3.7 Identification des composés volatils dans l'extrait SAFE

Toujours à partir de 100 ml d'une Fayrouz ananas, un essai SAFE (paramètres optimisés) a été effectué afin d'identifier les composés volatils présents dans l'extrait grâce à des analyses SPME/GC-MS utilisant les mêmes paramètres que ceux mentionnés dans le chapitre précédent. La bibliothèque utilisée comme aide à l'identification des composés par leurs spectres de masse est une librairie MS spécifique aux composés aromatiques appartenant à l'entreprise Fayrouz.

Ensuite, comme pour la Fayrouz ananas, 100ml d'arôme 0.05% dans l'eau ainsi que 100ml d'extrait de malt ont été passés tour à tour au SAFE puis analysés en GC-MS afin d'identifier quels composés provenaient du malt et quels sont ceux qui provenaient de l'arôme ananas. Tous ces extraits récupérés ont également subis une extraction liquide/liquide afin de pouvoir effectuer des injections liquides sur le GC-MS (méthode GC au chapitre 2.5.2). Deux solvants ont été testés : le dichlorométhane ainsi que l'éther (15ml extrait saturé en NaCl : 3ml solvant – agitation 10 minutes – centrifugation 4000 tours/min, 30 min, 10°C).

Ensuite, avec d'autres essais SAFE identiques, des extractions SPE ont été testées sur les extraits afin de comparer les résultats avec l'extraction l/l et ainsi pouvoir sélectionner la meilleure méthode pour la future quantification.

Pour cette SPE, la phase polymérique des cartouches utilisées est un mélange de silice et de polystyrène divinylbenzène. Le déroulement de cette extraction sur phase solide a été le suivant : tout d'abord, pour faciliter le passage du liquide dans la cartouche SPE (solide phase extraction), celle-ci a été placée sur un dispositif muni d'une entrée sur laquelle y a été installé le vide grâce à une trompe à eau (voir figure 15). Ensuite, la cartouche SPE a été lavée avec quelques portions d'eau déminéralisée et conditionnée avec du méthanol. L'extrait récupéré du SAFE a alors été passé à travers la cartouche qui a récupéré les composés organiques présents dans cette phase aqueuse. 4ml d'éluant (l'éther) ont alors été introduits dans la cartouche afin de récupérer ces composés dans une phase organique. Le passage de l'éther peut être facilité par une légère pression obtenue grâce à un flux d'air placé au-dessus de la cartouche. La phase organique a alors pu être analysée.

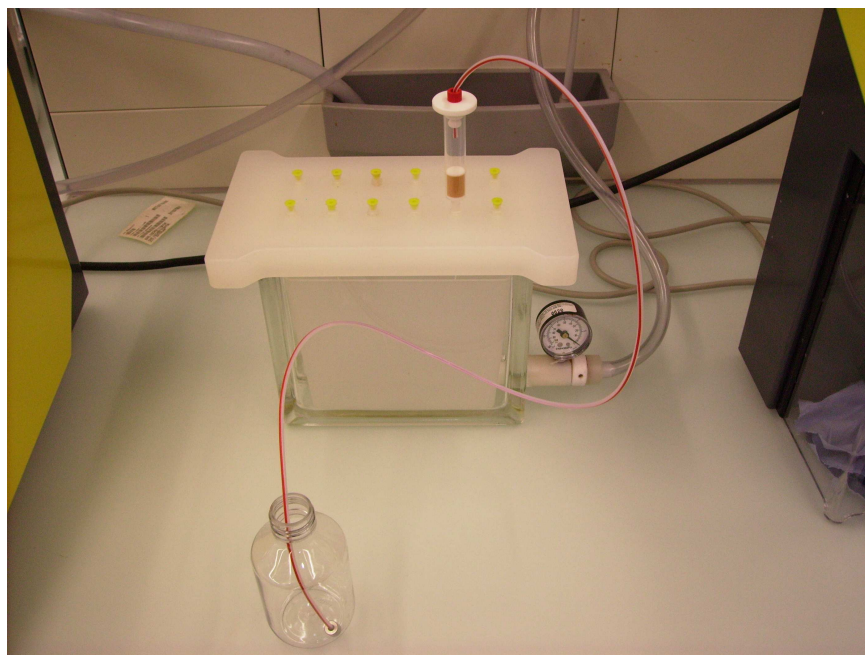


Figure 15 : illustration du dispositif SPE

2.3.8 Taux de recouvrement SAFE

Etant donné leurs grandes volatilités ainsi que leur grand nombre, les principaux composés provenant de l'arôme ananas ont été utilisés afin d'en déterminer leurs taux de recouvrement suite à leurs passage dans le SAFE. En effet, pour savoir si cette technique est intéressante, il est indispensable de connaître le rendement qu'elle fournit sur des composés volatils. Ainsi, ces composés sont ceux identifiés à l'étape précédente sur le SAFE réalisé sur l'arôme ananas 0.05% dans l'eau.

Pour ce faire, la technique d'extraction SPE a été utilisée (description du mode opératoire dans le chapitre 2.3.7) à partir des extraits produits par le SAFE, suivi de l'ajout d'un standard interne (50µl), en l'occurrence le butanoate de pentyle 1% dans l'éther (caractéristique de l'arôme abricot), puis d'une injection sur GC-FID dont les paramètres de la méthode sont décrits dans le chapitre 2.5.4. Les différents facteurs pour tous ces composés (formule pour le calcul de la concentration à partir d'un standard interne) ont été déterminés à partir de trois solutions standard d'arôme ananas dans l'éther : 1%, 2% et 5% (concentrations estimées par rapport à l'arôme 0.05% à la sortie du SAFE concentré environ 25 fois dans l'éther en SPE).

Les taux de recouvrement des composés ont été calculés sur un échantillon d'arôme ananas 0.05% dans l'eau (sans matrice), sur des échantillons de Fayrouz ananas produites en Egypte, en Grèce, au Maroc ainsi qu'au Nigéria (avec matrice) afin de pouvoir constater s'il y a une influence de la matrice lors du SAFE. Une préparation a également été effectuée au laboratoire (matrice reconstituée) avec un extrait de malt provenant d'Egypte dilué à 2 plateaux, 0.37% d'acide citrique, 10% de saccharose ainsi que 0.05% d'arôme ananas suivi d'une pasteurisation. Chacun de ces essais SAFE + SPE ont été effectués trois fois.

Afin de pouvoir calculer les taux de recouvrement des différents composés uniquement sur le SAFE (et non sur le SAFE + l'extraction SPE), le calcul des taux de recouvrement de l'extraction SPE uniquement a été effectué à partir de 100ml d'une solution d'arôme ananas 0.05 % dans l'eau passée directement dans la cartouche SPE. Puis, comme énoncé auparavant, 4ml d'éther ont permis de récolter les composés suivis de l'ajout de 50µl du standard interne 1% et de l'injection en GC-FID. Cette étape a été réalisée 3 fois.

2.4 Provenance des échantillons

Les malts utilisés lors des analyses SPME proviennent de l'entreprise SIOS HOMEBREWING à Wald en Suisse alémanique : il s'agit de malt pale, de malt crystal et de malt foncé.

Pour l'optimisation des paramètres SAFE et l'identification des composés volatils extraits, les boissons utilisées étaient des cannettes de 330ml de Fayrouz ananas produites en Egypte en décembre 2006, de l'extrait de malt produit par la compagnie Al Ahram en Egypte (Badr) en juin 2007 ainsi que des solutions aqueuses d'arôme ananas 0.05% (même concentration que dans les boissons Fayrouz) réalisées à partir d'un concentré d'arôme ananas (Pineapple 1302) produit ici à Bulle en septembre 2007.

Pour le calcul du taux de recouvrement SAFE (quantification) sans matrice, les extractions ont été effectuées sur des solutions aqueuses d'arôme ananas 0.05% réalisées à partir d'un concentré d'arôme ananas (Pineapple 1302) produit ici à Bulle en septembre 2007.

Pour le calcul du taux de recouvrement SAFE avec matrice, les boissons utilisées étaient des cannettes de 330ml de Fayrouz ananas produites en Egypte en décembre 2006, des cannettes de 330ml de Fayrouz ananas produites en Grèce en septembre 2007, des cannettes de 330ml de Fayrouz ananas produites au Maroc en septembre 2007 et des bouteilles de 330ml de Fayrouz ananas produites au Nigéria en août 2007. Une matrice a également été effectuée en laboratoire à l'aide d'acide citrique, de saccharose, de concentré d'arôme ananas produit ici à Bulle en septembre 2007 (Pineapple 1302) ainsi que d'extrait de malt produit par la compagnie Al Ahram en Egypte (Badr) en juin 2007.

2.5 Paramètres GC

2.5.1 Paramètres GC-MS pour la SPME

Tableau 3 : paramètres du GC-MS pour la SPME

Température de l'injecteur	250°C
Injection	Splitless
Température initiale	45 °C
Rampe de température	10°C/minute jusqu'à 240°C
Temps et température finale	5 minutes à 240°C
Gaz vecteur	Hélium
Débit de gaz	1ml/min

2.5.2 Paramètres GC-MS pour les injections liquides

Tableau 4 : paramètres du GC-MS pour les injections liquides

Température de l'injecteur	250°C
Injection	Split 10 :1
Volume injection	1.0 µl
Température initiale	45 °C
Rampe de température	10°C/minute jusqu'à 240°C
Temps et température finale	5 minutes à 240°C
Gaz vecteur	Hélium
Débit de gaz	1ml/min

2.5.3 Paramètres du détecteur de masse

Le détecteur de masse avec lequel le travail a été effectué utilise une ionisation à impact d'électrons. La limite des masses détectées se situe entre un m/z de 30 à 300. Le nombre de scans par seconde est de 2.77.

2.5.4 Paramètres GC-FID pour la quantification

Afin d'avoir un temps d'analyse chromatographique plus court, une méthode « fast-GC » a été éditée à l'aide d'un programme spécifique. Afin d'avoir parfaitement le même profil chromatographique que les analyses en GC-MS, les paramètres utilisés en GC-MS ont été introduits dans ce programme qui a lui-même calculé les nouveaux paramètres produisant le même profil en un temps plus court en GC-FID, en l'occurrence 3.40 minutes. Les paramètres de cette nouvelle méthode sont décrits dans le tableau 5.

Tableau 5 : paramètres du GC-FID pour la quantification

Température de l'injecteur	250°C
Injection	Split 50 :1
Volume injection	0.2 µl
Température initiale	45 °C
Rampe de température	70°C/minute jusqu'à 120°C 90°C/minute jusqu'à 240°C
Temps et température finale	1 minute à 240°C
Gaz vecteur	Hydrogène
Débit de gaz	5 ml/min

3 Résultats et discussion

3.1 Optimisation des paramètres SPME

Les résultats des analyses SPME effectuées sur le malt foncé à l'aide de 3 fibres différentes (30 minutes, 60°C) montrent une bien meilleure extraction des volatils avec la fibre DVB/carboxène/PDMS. En effet, comme le montre la figure 16, l'intensité de la plupart des pics est nettement supérieure avec cette fibre qu'avec la PDMS ou la polyacrylate. Les chromatogrammes entiers de ces analyses SPME pour chacune des fibres se trouvent en annexe 1.

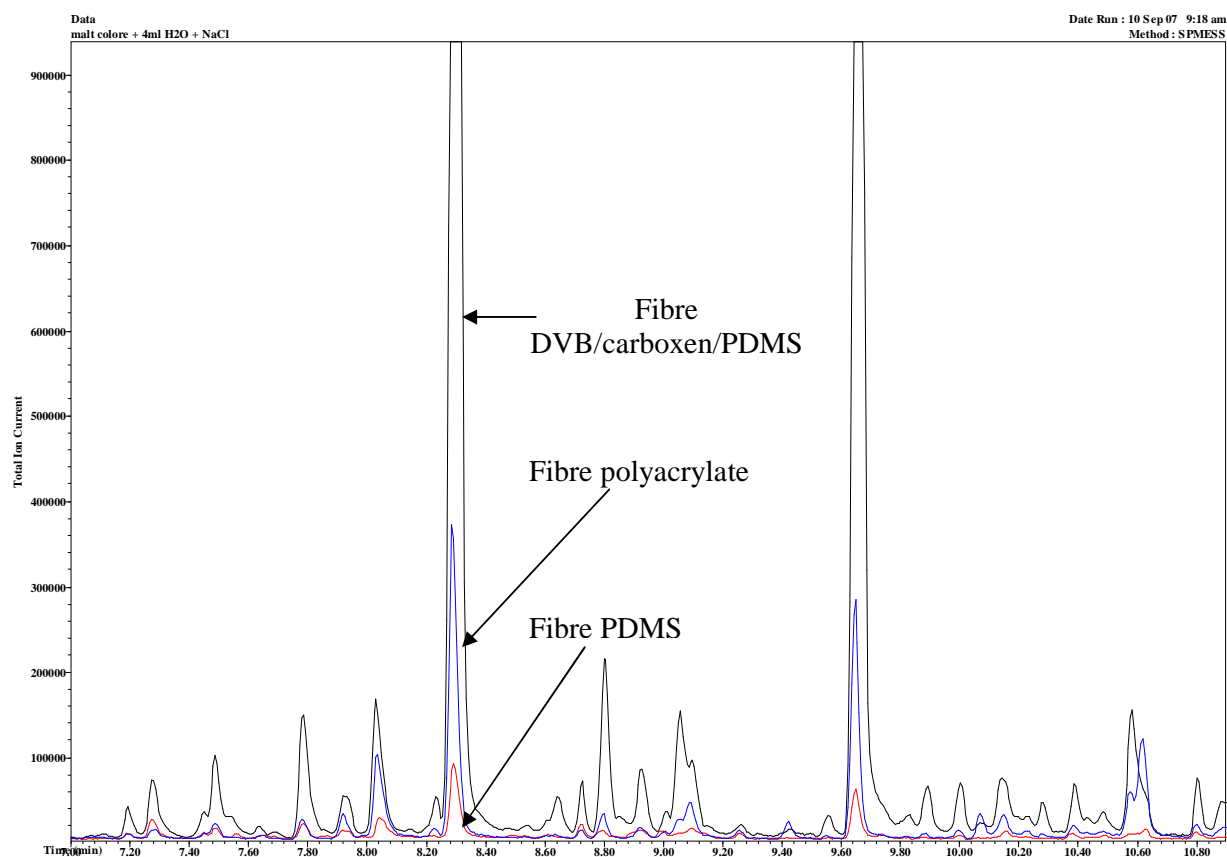
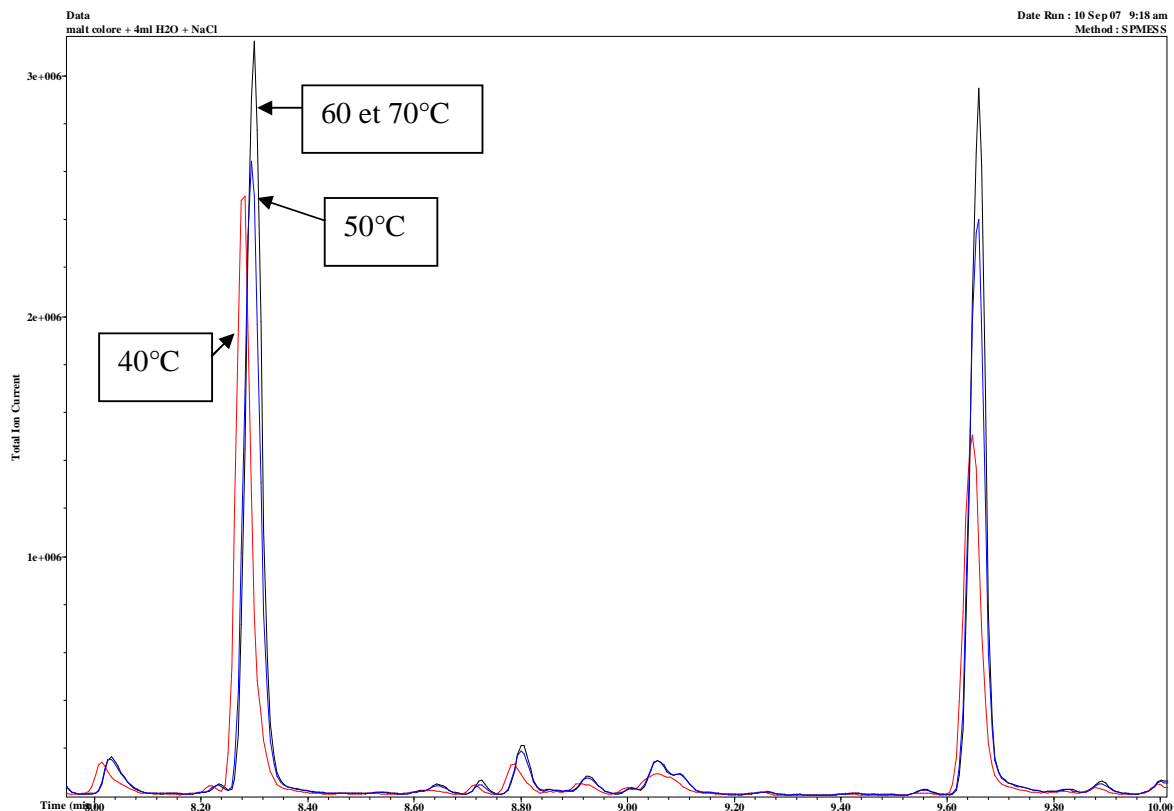


Figure 16 : superposition des 3 chromatogrammes pour les SPME effectuées avec 3 fibres différentes (minute 7 à 11)

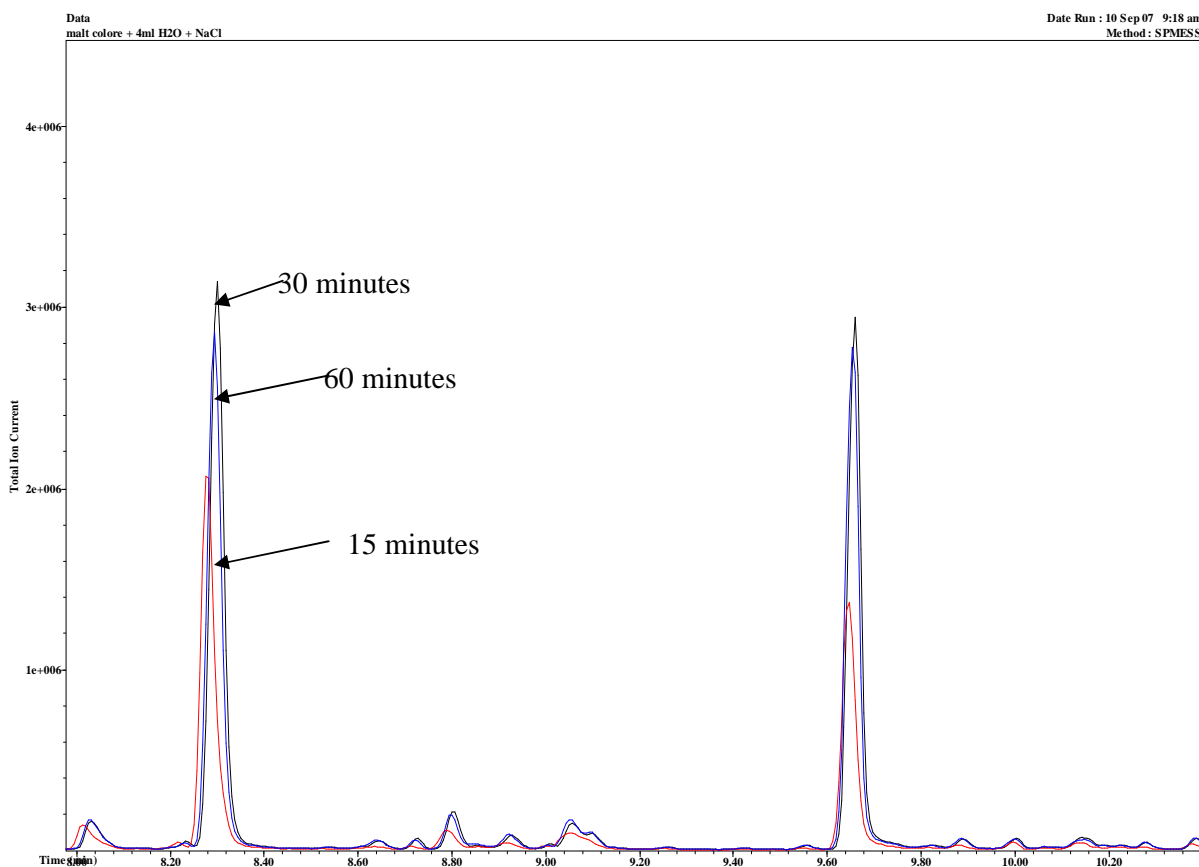
Les résultats des analyses SPME effectuées sur le malt foncé avec la fibre DVB/carboxène/PDMS et avec 4 températures d'adsorption différentes (durant 30 minutes) montrent que la plupart des pics des différents composés sont plus intenses avec une température d'adsorption plus élevée, comme le montre la figure 17. Cependant, aucune différence n'est remarquée entre l'essai à 60 et celui à 70°C. Il est donc inutile de chauffer le malt à une température supérieure à 60°C. Il s'agit donc de la température optimale. Les chromatogrammes entiers de ces analyses SPME pour chacune des températures d'adsorption se trouvent en annexe 2.



Les chromatogrammes démontrent également qu'il n'y a pas d'artefacts qui se forment en chauffant le malt à 70°C. En effet, les composés extraits à 40 ou à 70°C sont identiques (parfaite similitude du profil chromatographique).

Il faut cependant se méfier du fait que l'analyse ait été effectuée sur du malt foncé. En effet, s'il y a formation d'artefacts à 60°C, le profil chromatographique sur le malt foncé ne changera pas car celui-ci a déjà subi une torréfaction : les composés se formant par traitement thermique sont donc déjà présents. Cependant, pour les essais servant à l'identification des composés volatils sur les 3 différents malts avec cette température optimisée à 60°C (voir chapitre 3.2), aucun artefact ne s'est formé durant la SPME du malt pale (non torréfié).

Les résultats des analyses SPME effectuées sur le malt foncé à 60°C avec la fibre DVB/carboxène/PDMS et avec 3 temps d'adsorption différents montrent que les airs des pics de la majorité des composés sont plus faibles avec un temps d'adsorption de 15 minutes mais, par contre, sont quasiment identiques que le temps soit de 30 ou de 60 minutes, comme le montre la figure 18. Il est donc inutile de laisser adsorber la fibre durant une heure alors que celle-ci est déjà saturée aux alentours de 30 minutes. L'optimum du temps d'adsorption est illustré dans la figure 19. Les chromatogrammes entiers de ces analyses SPME pour chacun des temps d'adsorption se trouvent en annexe 3.



La figure 19 montre un graphique de l'optimum du temps d'adsorption effectué sur la base des aires de 4 pics de composés volatils principaux du malt foncé (temps de rétention à 8.3, 9.7, 12.6 14.0 minutes – voir annexe 3). Il est clairement démontré que l'optimum se situe entre 40 et 45 minutes. Pour la suite du travail, un temps d'adsorption de 30 minutes a été gardé, la différence d'airs de pics entre 30 et 40 minutes étant infime.

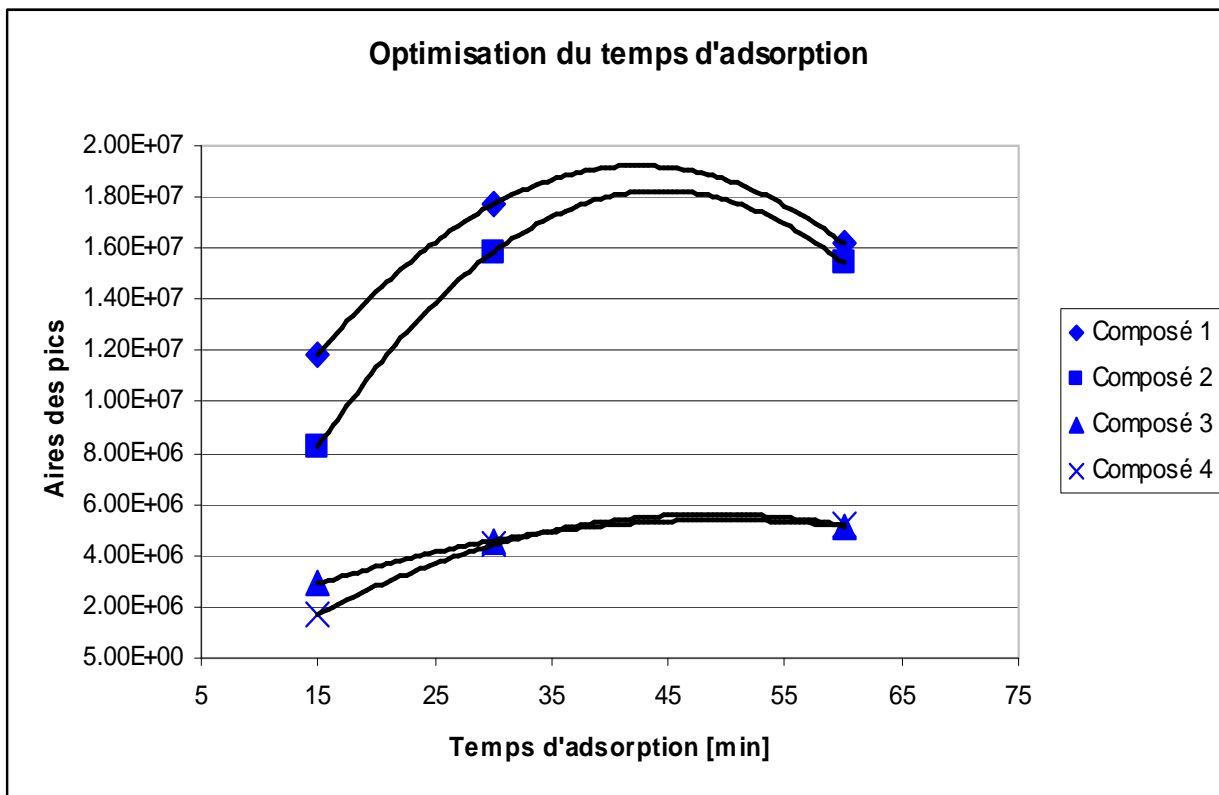


Figure 19 : graphique de l'optimum du temps d'adsorption SPME effectuée sur 4 composés volatils principaux du malt foncé

3.2 Identification des composés volatils de divers malts

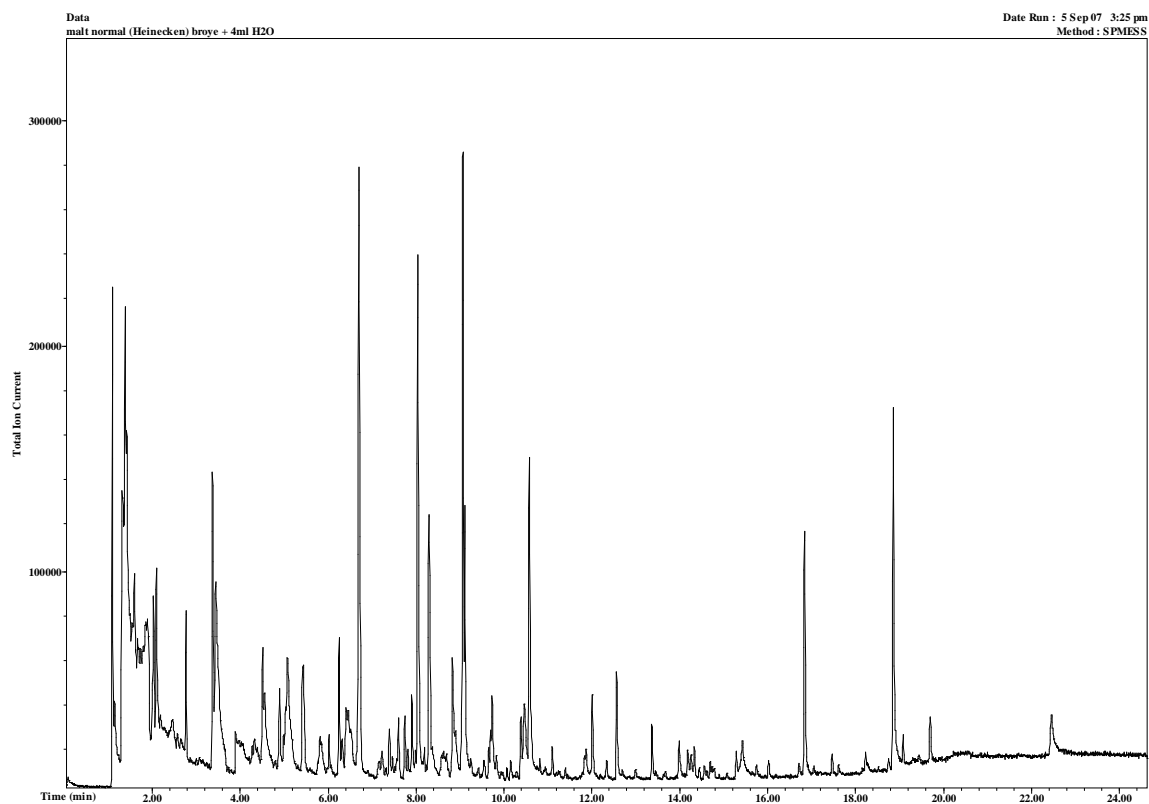
Le tableau 6 présente la liste des composés identifiés en GC-MS dans le malt pale, le malt crystal et le malt foncé. Les paramètres SPME utilisés sont ceux optimisés à l'étape précédente (fibre DVB/carboxène/PDMS, adsorption 30 minutes à 60°C)

Tableau 6 : liste des principaux composés volatils identifiés dans 3 malts différents

Temps de rétention [min]	malt pale	malt crystal	malt foncé	Composés identifiés
2.04		X		2-méthylbutanal
2.07	X	X		3-méthylbutanal
2.13	X			éthanol
2.48	X			pentanal
2.79	X			alpha-pinène
3.42	X	X	X	hexanal
3.65	X			beta-pinène
3.82		X		acétate de 3-méthylbutyle
4.03	X			butanol
4.09	X			o-xylène
4.70	X			dodécane
4.74	X			limonène
5.15	X		X	2-pentylfuran
5.34	X			pentanol
5.69			X	méthylpyrazine
6.68	X			hexanol
6.84		X		2-isopropyl-5-méthyl-2-hexanal
7.27	X		X	nonanal
7.49	X		X	3-octèn-2-one
7.79		X	X	2-(E)-octénal
8.03	X	X	X	acide acétique
8.30		X	X	furfural
8.80		X	X	2-acétylfurane
8.93	X		X	3,5-(E,E)octandièn-2-one
9.06	X	X	X	benzaldéhyde
9.66		X	X	méthylfurfural
9.73	X			diméthylsulfoxyde
10.47		X		phénylacétaldéhyde
10.59		X	X	alcool furfurylique
10.61	X	X		acide 3-méthylbutanoïque
11.98			X	2-furyl-1,2-propandione
12.35		X		acétate de phényléthyle
12.57	X	X	X	acide hexanoïque
13.36		X		phényléthanol
13.98		X	X	3-hydroxy-2-méthylpyran-4-one
14.01		X		acétylpyrrole
14.30			X	2-furylpyrazine
14.58			X	2-pyrrole carbaldéhyde
18.87			X	5-hydroxyméthyl-2-furfural
19.09	X			phtalate de dibutyle

Les composés se trouvant dans les 3 types de malt sont l'hexanal, l'acide acétique, le benzaldéhyde ainsi que l'acide hexanoïque. Des composés tels que le furfural, le méthylfurfural ou encore l'alcool furfurylique sont des molécules typiques que l'on retrouve lorsqu'un traitement thermique a eu lieu (torréfaction). Les résultats obtenus le confirment parfaitement (voir tableau 6), vu que ces composés se trouvent uniquement dans les malts ayant subi une torréfaction, et non sur le malt pale. Ci-dessous sont présentés 3 exemples de chromatogrammes (GC-MS) obtenu par analyses SPME sur les 3

sortes de malts. Attention, l'échelle du chromatogramme du malt pale (figure 20) est dix fois plus petite que pour le malt crystal et foncé (figure 21 et 22). Ces chromatogrammes des SPME effectués sur ces trois malts ainsi que quelques exemples de spectres de masse se trouvent en annexe 4.



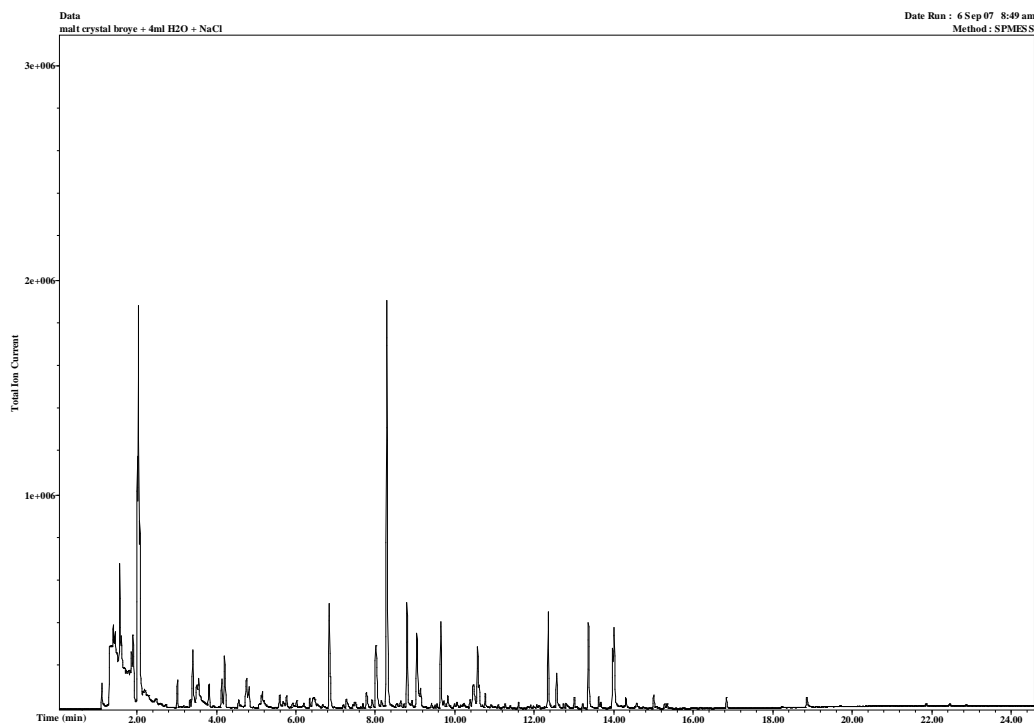


Figure 21 : exemple de chromatogramme d'une analyse SPME effectuée sur le malt crystal

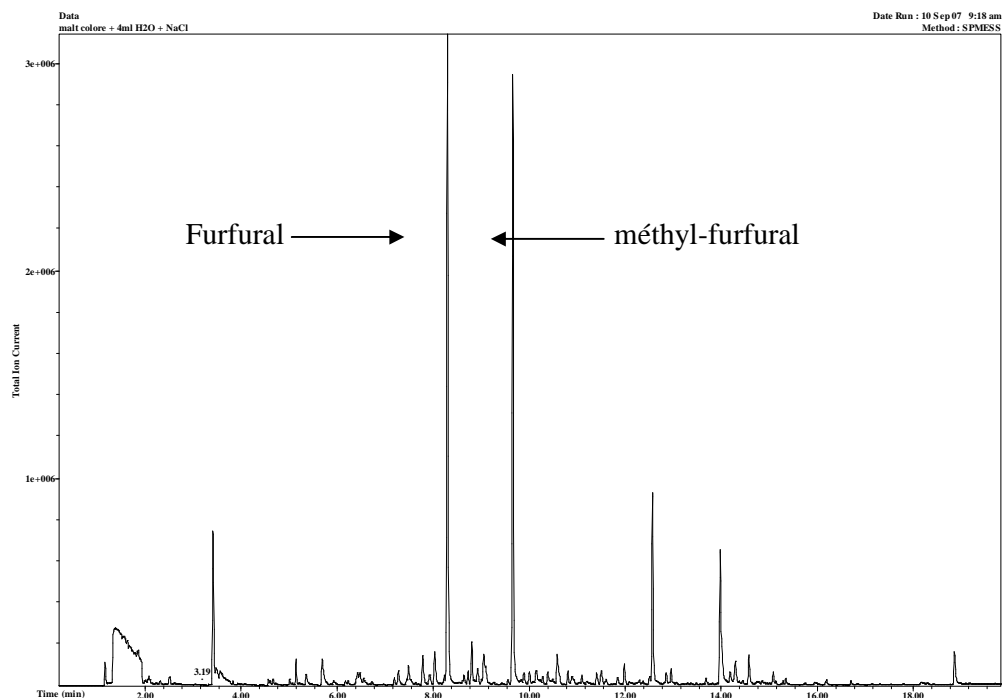


Figure 22 : exemple de chromatogramme d'une analyse SPME effectuée sur le malt foncé

Sur le chromatogramme de la SPME effectuée sur le malt foncé, illustré en figure 22, on remarque la présence de deux composés typiques qui se forment lors d'un traitement thermique sur le malt : le furfural (spectre de masse en figure 23) et le méthylfurfural.

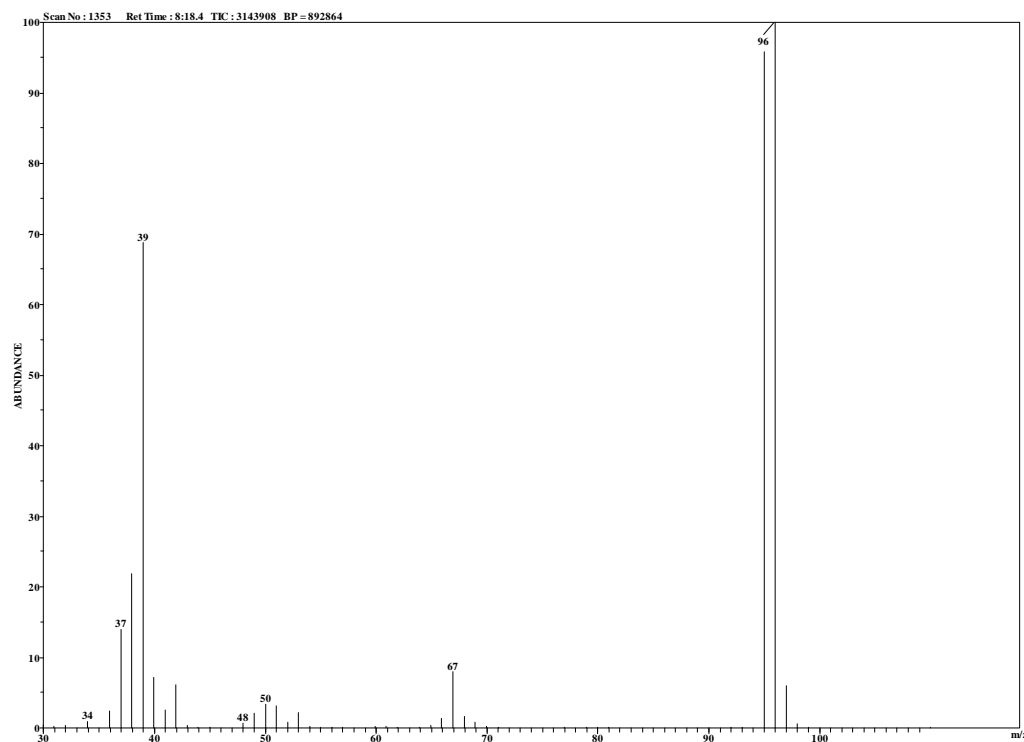


Figure 23 : spectre de masse du fufural

3.3 SPME dynamique

L'optimisation du débit d'air introduit dans le dispositif utilisé pour tester la SPME dynamique (adsorption 10 minutes à 60°C - fibre DVB/carboxène/PDMS) a donné un résultat de l'optimum entre 30 et 35 ml/min. En effet, les aires des pics de deux des composés caractéristiques de l'arôme ananas (le 2-méthylbutanoate de méthyle et le caproate d'allyle – voir le chapitre de l'identification des composés volatils des extraits SAFE)) pris en considération indiquent le même résultat en figure 24.

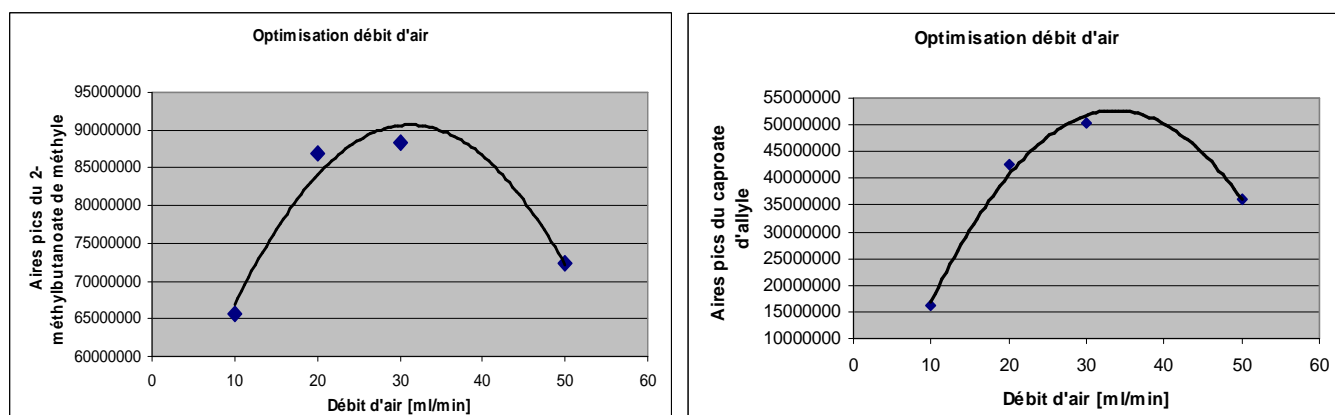


Figure 24 : graphiques démontrant le débit d'air optimal pour la SPME dynamique

Cependant, les résultats de ces essais effectués en SPME dynamique sur de la boisson Fayrouz dégazée à l'arôme ananas ont été peu concluants. En effet, l'extraction des composés volatils sur la fibre DVB/carboxène/PDMS est bien meilleure en SPME statique. La figure 25 montre la comparaison entre un chromatogramme d'une analyse SPME effectuée en statique (à gauche) puis en dynamique (à droite) dans les mêmes conditions. La différence est surtout remarquée sur les composés moins volatils, en l'occurrence entre 10 et 20 minutes de l'analyse GC-MS, comme illustré dans la figure ci-dessous.

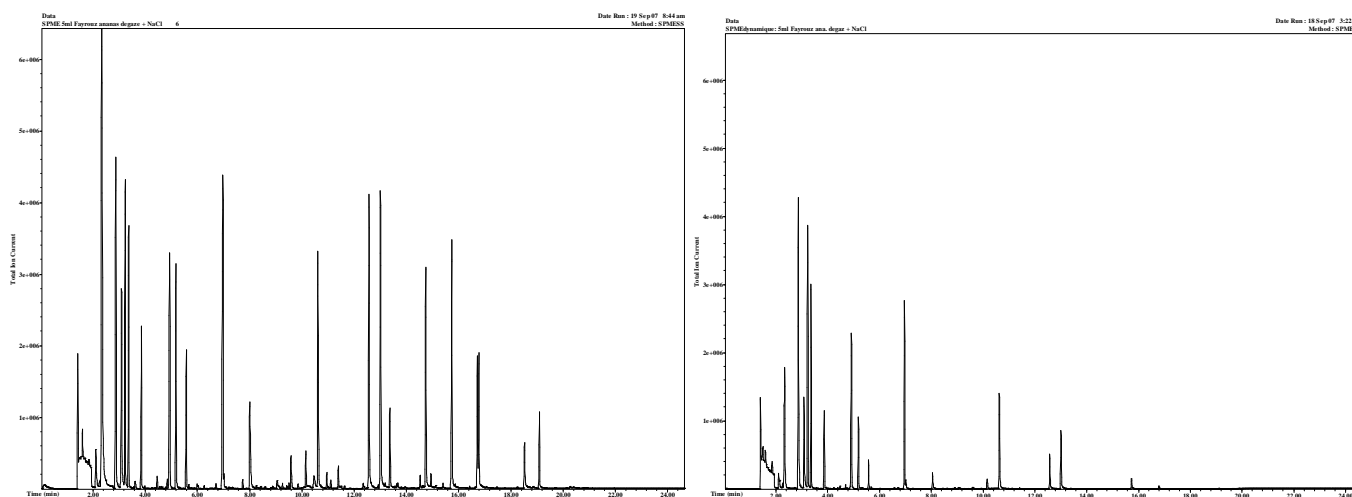


Figure 25 : comparaison entre un chromatogramme effectué en SPME statique puis dynamique en conditions similaire sur 5 ml d'une Fayrouz ananas dégazée saturée en NaCl

Cette technique a donc été abandonnée pour la suite du travail.

Les graphiques et chromatogrammes obtenus lors de ces essais de SPME dynamique se trouvent en annexe 5.

3.4 Optimisation des paramètres SAFE

L'essai effectué à 20 °C avec un débit d'entrée de l'échantillon à 2 ml/min (45ml d'extrait récupérés) a été meilleur que ceux réalisés avec un débit de 10 ml/min (15ml récupérés) et par portions de 5 ml (32ml récupérés), ce qui correspond à la logique. En effet, plus le débit est lent, plus les composés volatils ont le temps de distiller par l'entraînement de l'eau. Toutefois, il est difficile de descendre à un débit inférieur à 2 ml/min tout en le gardant régulier. C'est pourquoi ce débit de 2 ml/min a été conservé pour la suite du travail.

Pour ce qui est de la température du ballon de distillation, comme attendu, plus elle est élevée, plus le volume d'extrait récupéré en 50 minutes (2ml/min) est grand. En effet, à 20°C, 45 ml d'extrait sont récupérés, à 30°C, 74ml et à 40°C, 86ml. 40°C est donc la température utilisée pour le ballon de distillation durant tout le reste du travail. Il a été jugé contre l'objectif de cette technique de chauffer le ballon davantage, vu que le but est de ne pas monter trop haut en température afin d'éviter la formation d'artefacts. De toute manière, il est totalement inutile de chauffer plus, vu que, suite au passage des 100ml d'échantillon (50 minutes), il est possible d'évaporer à sec le résidu en peu de temps à 40°C.

L'essai effectué avec 30g de NaCl dans le ballon de distillation, au débit et à la température optimisée a donné des résultats parfaitement identiques que sans celui-ci, comme le montre les chromatogrammes des analyses SPME réalisées sur les extraits de ces 2 SAFE, illustrés en figure 26.

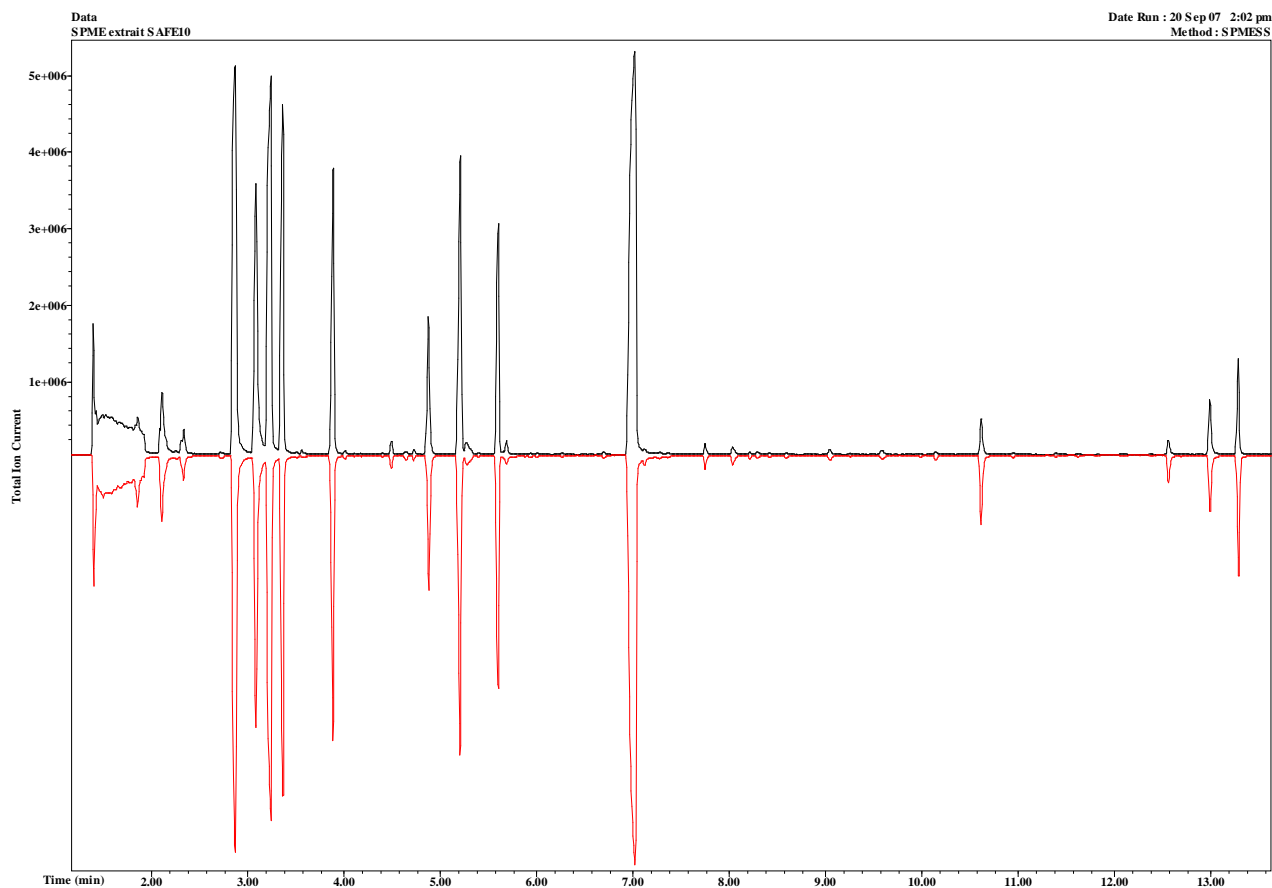


Figure 26 : comparaison entre deux chromatogrammes d'analyses SPME sur les extraits SAFE d'échantillons initiales de boissons Fayrouz ananas dégazées avec et sans NaCl

3.5 Identification des composés volatils dans l'extrait SAFE

Le tableau 7 présente tous les composés identifiés par analyses SPME en GC-MS (chromatogramme en figure 27) sur les extraits des extractions SAFE réalisées sur des boissons Fayrouz à l'arôme ananas. Les résultats des analyses chromatographiques des extractions SAFE effectuées sur l'extrait de malt pur ainsi que sur l'arôme ananas 0.05% dans l'eau sont exprimés dans les 2 colonnes de droite du tableau 7.

On peut ainsi en conclure quels composés proviennent du malt et quels sont ceux qui viennent de l'arôme ananas.

Tableau 7 : liste des principaux composés volatils identifiés dans les extraits des extractions SAFE effectuées sur des boissons Fayrouz ananas dégazées

Temps de rétention [min]	Composés identifiés	Arôme ananas	Extrait de malt
2.14	acétate d'éthyle	X	X
2.37	éthanol		X
2.42	2,4-diméthyl-1,3-dioxalane	X	
2.52	propanoate d'éthyle		X
2.88	2-méthylbutanoate de méthyle	X	
3.09	butanoate d'éthyle	X	X
3.23	2-méthylbutanoate d'éthyle	X	
3.38	3-méthylbutanoate d'éthyle	X	
3.65	isobutanol		X
3.94	acétate de 3-méthylbutyle	X	
4.52	acétate de pentyle	X	
4.82	limonène	X	
5.00	alcool amylique		X
5.18	hexanoate d'éthyle		X
5.24	caproate d'éthyle	X	
5.63	butanoate de 3-méthylbutyle	X	
5.70	acétate d'hexyle		X
6.75	hexanol		X
6.97	hexanoate de 2-propène		X
7.01	caproate d'allyle	X	
7.78	octanoate d'éthyle	X	
8.06	acide acétique		X
10.62	alcool furfurylique		X
10.66	acide 3-méthylbutanoïque		X
12.60	acide hexanoïque		X
13.01	alcool benzylique	X	
13.41	phényléthanol		X
14.58	furanéol	X	
14.77	acide octanoïque		X
15.70	décalactone	X	
15.74	7-méthyl-4-octanolide	X	
15.78	acide nonanoïque		X
16.79	5-heptyldihydro-2(3H)-furanone	X	
18.24	acide benzoïque		
19.12	phtalate de dibutyle		X

L'acétate d'éthyle et le butanoate d'éthyle sont les seuls composés qui sont présents à la fois dans l'extrait de malt et dans l'arôme. La grande majorité des composés volatils de l'arôme ananas sont des esters (11 sur 17). Quand à l'extrait de malt, on retrouve également des esters (6 sur 18), mais aussi des alcools (6 sur 18) et des acides (5/18). La majorité des composés identifiés dans l'extrait de malt pur se retrouve également dans le tableau 6 présentant les composés identifiés dans plusieurs malts. Cependant, certains autres n'y sont pas car ils se forment lors de la production de l'extrait de malt.

L'acide benzoïque ne provient ni du malt, ni de l'arôme, car c'est un composé utile à la conservation de la boisson. Il est introduit lors de la production de celle-ci sous forme de benzoate de sodium. Les chromatogrammes des SPME effectuées sur ces extraits SAFE ainsi que quelques exemples de spectres de masse se trouvent en annexe 6.

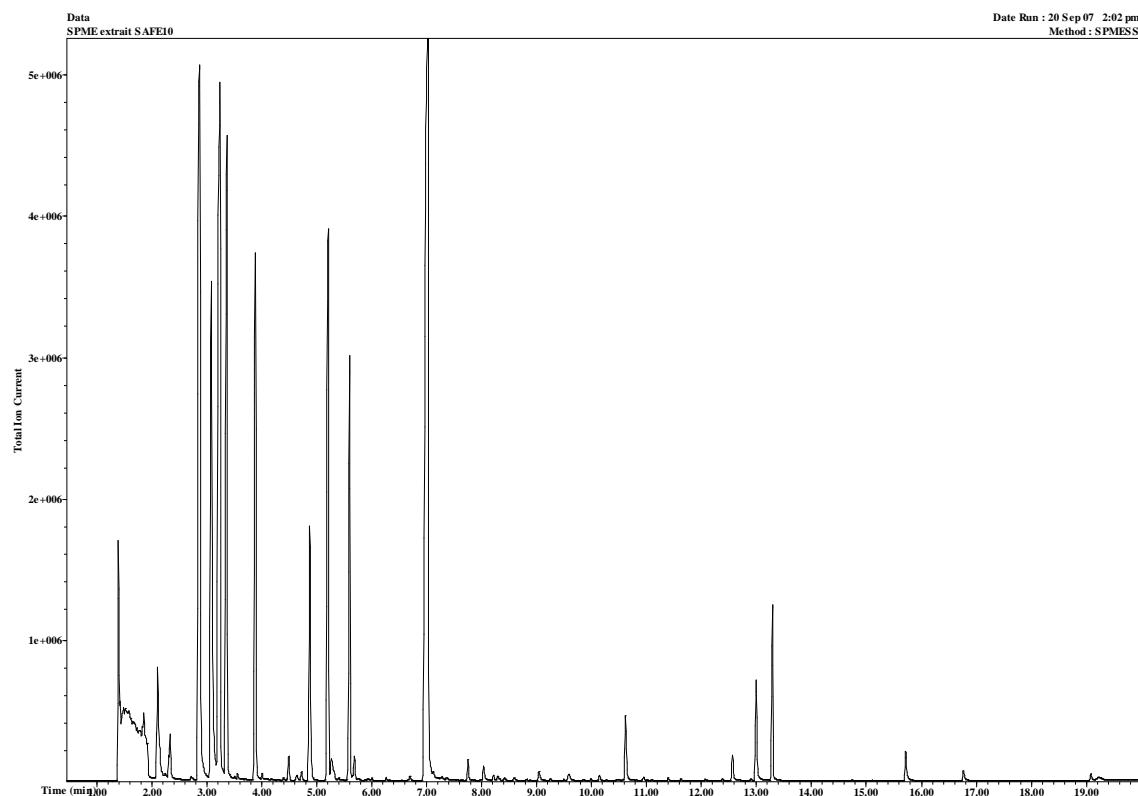


Figure 27 : chromatogramme de l'analyse SPME (GC-MS) effectuée sur l'extrait SAFE d'une boisson Fayrouz ananas

Les tests d'essais d'extractions liquide/liquide et d'extractions SPE ont démontré une bien meilleure efficacité de l'extraction SPE. En effet, comme le montrent les figures 28 et 29, les chromatogrammes en GC-MS après extractions liquide/liquide à l'éther et au dichlorométhane ne révèlent que peu de composés extraits par rapport à l'analyse SPME exprimée en figure 27. De plus, les aires des pics des quelques composés extraits sont très faibles. Dans la figure ci-dessous, l'échelle du chromatogramme a volontairement été adaptée à celle du chromatogramme de la figure 29 afin de pouvoir comparer l'intensité des pics.

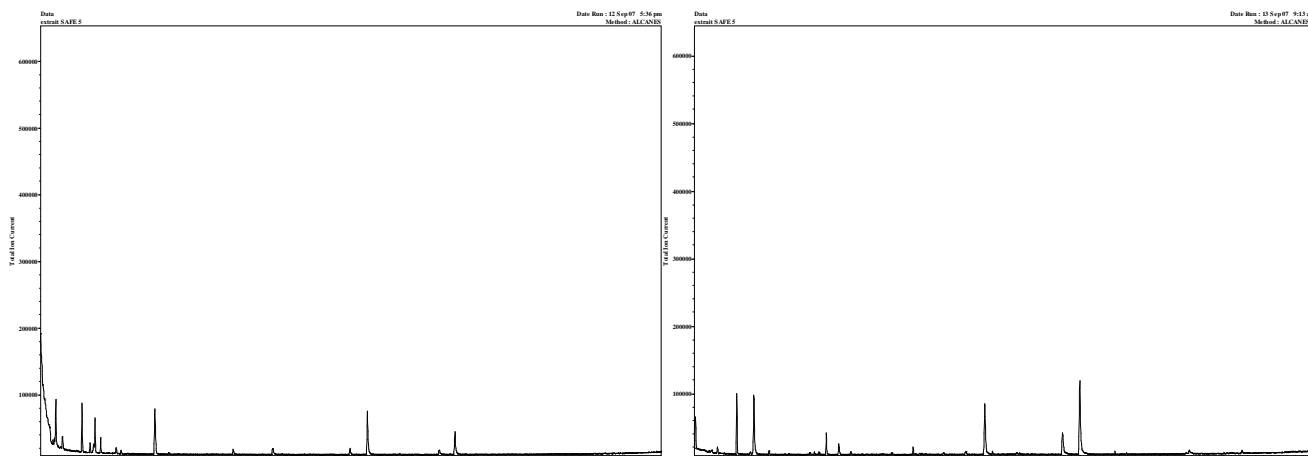


Figure 28 : chromatogrammes des analyses GC-MS après extractions liquide/liquide à l'éther (gauche) et au dichlorométhane (droite) effectuées sur les extraits SAFE d'une boisson Fayrouz ananas

Par contre, les résultats obtenus en SPE sont nettement de meilleure qualité (figure 29). En effet, tous les composés sont retenus par la cartouche polymérique et resolubilisés dans l'éther. C'est donc cette méthode qui sera utilisée pour le calcul des taux de recouvrement SAFE des composés volatils provenant de l'arôme ananas. Cependant, les injections ne se feront pas en GC-MS mais en GC-FID.

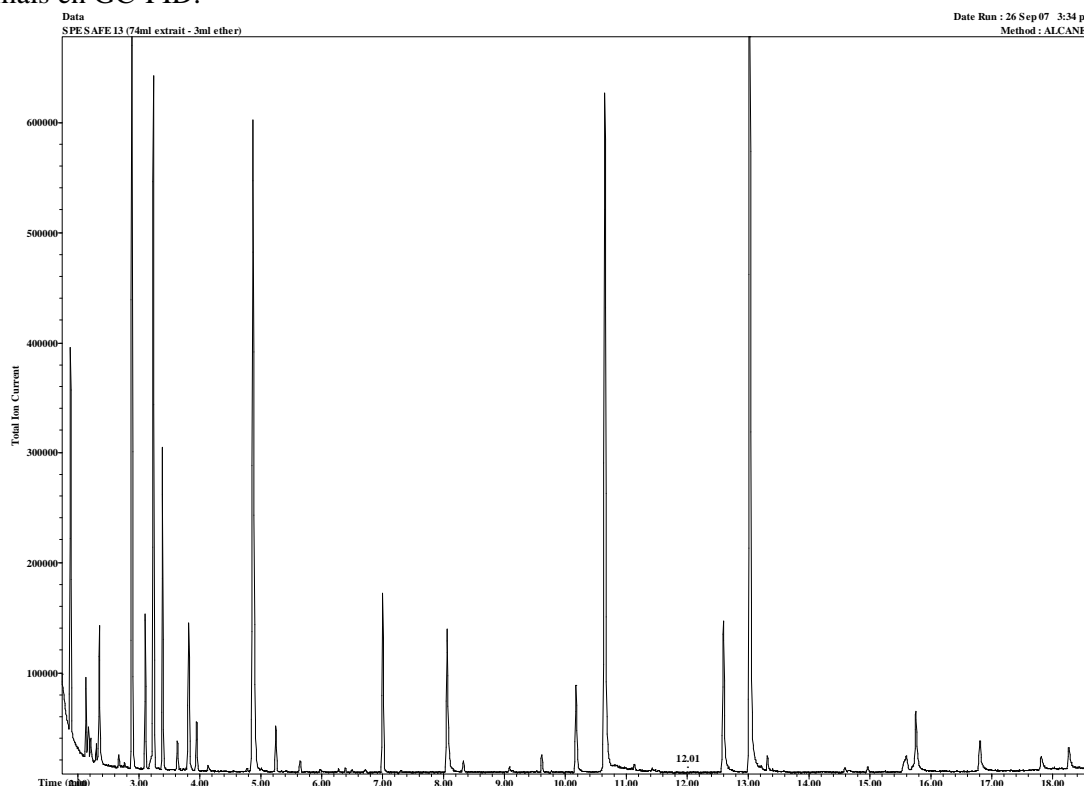


Figure 29 : chromatogramme d'une analyse GC-MS après une extraction SPE effectuée sur un extrait SAFE d'une boisson Fayrouz ananas

Les chromatogrammes des analyses GC-MS obtenus lors des injections des solvants après les extractions l/l et SPE des extraits SAFE se trouvent en annexe 7.

3.6 Taux de recouvrement SAFE

Toutes les feuilles de calculs Excel des taux de recouvrement se trouvent en annexe 8, tout comme 2 exemples de chromatogrammes en GC-FID.

3.6.1 Taux de recouvrement SPE

Les résultats des calculs des taux de recouvrement de chaque composé de l'arôme ananas (retenus pour cette partie du travail) lors de leurs passages dans une cartouche SPE (sans passage par le SAFE) sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : taux de recouvrement SPE des principaux composés volatils identifiés dans l'arôme ananas (extraction SPE effectuées à partir d'arôme 0.05%)

Taux de recouvrement SPE (%)						
Composés de l'arôme ananas	Temps de rétention [min]	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Taux moyen [%]	Ecart type [%]
acétate d'éthyle	0.392	86.9	87.2	95.2	89.8	4.74
2-méthylbutanoate de méthyle	0.511	86.9	86.7	86.8	86.8	0.13
butanoate d'éthyle	0.544	89.5	89.2	89.4	89.4	0.14
2-méthylbutanoate d'éthyle	0.570	85.1	83.4	83.8	84.1	0.91
3-méthylbutanoate d'éthyle	0.593	86.3	84.3	83.5	84.7	1.44
acétate de 3-méthylbutyle	0.676	85.7	84.2	84.1	84.7	0.92
acétate de pentyle	0.761	85.5	84.2	82.2	84.0	1.70
caproate d'éthyle	0.874	83.8	82.4	84.0	83.4	0.88
butanoate de 3-méthylbutyle	0.941	74.1	73.4	78.5	75.3	2.74
caproate d'allyle	1.146	78.2	76.9	79.9	78.3	1.53
octanoate d'éthyle	1.263	60.3	64.0	64.8	63.0	2.39
alcool benzylique	2.002	74.6	72.7	71.3	72.9	1.67

La grande majorité des composés volatils de l'arôme ananas sont récupérés à plus de 80% par la technique SPE, surtout les plus volatils. L'octanoate d'éthyle est plus proches des 60%.

Pour la suite du travail, il sera possible de déterminer les taux de recouvrement total (SAFE + SPE) de ces mêmes composés et, par déduction, grâce aux résultats ci-dessus, de calculer les taux de recouvrement du SAFE uniquement.

3.6.2 Taux de recouvrement SAFE sans matrice

Après le passage de 100ml d'arôme ananas 0.05% par le SAFE, les taux de recouvrements des principaux composés volatils de l'arôme sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : taux de recouvrement SAFE des principaux composés volatils de l'arôme ananas (SAFE effectués à partir d'arôme 0.05%)

Taux de recouvrement SAFE (%) sans matrice						
Composés de l'arôme ananas	Temps de rétention [min]	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Taux moyen (SAFE+SPE) [%]	Taux moyen (SAFE) [%]
acétate d'éthyle	0.392	77.1	87.2	70.2	78.2	87.1
2-méthylbutanoate de méthyle	0.511	60.0	63.2	59.4	60.8	70.1
butanoate d'éthyle	0.544	65.3	68.5	64.6	66.1	74.0
2-méthylbutanoate d'éthyle	0.570	56.3	60.8	55.8	57.6	68.5
3-méthylbutanoate d'éthyle	0.593	59.0	63.1	57.8	60.0	70.8
acétate de 3-méthylbutyle	0.676	61.0	65.8	59.6	62.1	73.4
acétate de pentyle	0.761	63.1	69.5	61.2	64.6	77.0
caproate d'éthyle	0.874	59.8	64.4	57.5	60.6	72.6
butanoate de 3-méthylbutyle	0.941	52.9	56.4	49.9	53.1	70.5
caproate d'allyle	1.146	60.0	63.8	57.5	60.4	77.2
octanoate d'éthyle	1.263	62.1	56.7	54.0	57.6	91.4
alcool benzylique	2.002	71.1	68.2	68.5	69.3	95.1

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus sont, pour la plupart des composés, de bonne qualité. En effet, 11 composés sur les 12 analysés ont un taux de recouvrement sur le SAFE supérieur à 70%. Le 2-méthylbutanoate d'éthyle y est tout proche (68.5%).

3.6.3 Taux de recouvrement SAFE avec matrice

Après le passage de 100ml de boisson Fayrouz à l'arôme ananas par le SAFE, les taux de recouvrements des principaux composés volatils de l'arôme sont présentés dans le tableau 10. Les différentes colonnes du tableau dévoilent les résultats obtenus sur des échantillons de boisson Fayrouz produites en Egypte, en Grèce, au Nigéria, au Maroc ainsi qu'une matrice reproduite à l'identique en laboratoire.

**Tableau 10 : taux de recouvrement SAFE des principaux composés volatils de l'arôme ananas
(SAFE effectués à partir de boisson de provenances différentes)**

Composés de l'arôme ananas	Taux moyen Matrice labo [%]	Taux moyen Matrice Egypte [%]	Taux moyen Matrice Grèce [%]	Taux moyen Matrice Nigéria [%]	Taux moyen Matrice Maroc [%]
acétate d'éthyle	-	14.2	51.8	40.6	32.5
2-méthylbutanoate de méthyle	75.9	25.3	59.0	52.2	45.4
butanoate d'éthyle	83.7	7.5	50.4	35.6	31.1
2-méthylbutanoate d'éthyle	71.4	18.0	55.0	43.1	45.1
3-méthylbutanoate d'éthyle	72.5	31.2	57.5	45.2	46.2
acétate de 3-méthylbutyle	75.9	2.8	47.2	28.9	24.9
acétate de pentyle	76.8	< 3.0	< 3.0	< 3.0	< 3.0
caproate d'éthyle	68.0	2.8	41.5	24.2	25.9
butanoate de 3-méthylbutyle	49.6	< 2.0	32.1	15.1	21.6
caproate d'allyle	59.0	2.1	43.0	20.7	28.8
octanoate d'éthyle	49.7	< 5.0	18.7	< 5.0	< 5.0
alcool benzylique	70.2	94.5	62.0	63.8	56.9

Les résultats ci-dessus ne présentent aucune vraie cohérence entre les boissons produites dans les différents pays, pourtant identiques.

Tout d'abord, la matrice préparée en laboratoire ne donne pas de résultats fiables en ce qui concerne le premier composé. En effet, étant donné la longue période durant laquelle l'extrait de malt était resté au réfrigérateur, de l'éthanol s'est formé à l'intérieur de la bouteille. Malheureusement, avec cette méthode de GC-FID d'un temps d'analyse très court, un grand pic qui provenait donc de l'éthanol « masquait » ou sortait dans le même temps que ce composé. A part cela, les résultats des analyses effectuées sur cette matrice sont ceux qui se rapprochent le plus de ceux des analyses réalisées sans matrice. En effet, pour une grande partie des composés, les taux de recouvrement SAFE sont très proches. Quelques exceptions sont pourtant à signaler, comme pour le butanoate de 3-méthylbutyle, le caproate d'allyle, l'octanoate d'éthyle et l'alcool benzylique dont leurs résultats diffèrent quelque peu. Il est cependant possible d'affirmer que l'effet de matrice est nul.

Ensuite, des constatations étranges sont à faire sur les boissons produites à l'étranger. L'acétate de pentyle n'est retrouvé ni dans les Fayrouz ananas d'Egypte, ni celle de Grèce, ni celle du Nigéria et ni celle du Maroc. Dans la Fayrouz d'Egypte, deux autres composés ne sont pas détectés : le butanoate de 3-méthylbutyle et l'octanoate d'éthyle, celui-ci étant également absent dans les Fayrouz du Nigeria et du Maroc.

Les différences entre les résultats de chaque pays pour chaque composé laissent à penser qu'un facteur influence ces résultats. En effet, toutes les extractions ont été effectuées exactement à l'identique dans des temps très rapprochés. De plus, la répétabilité de cette méthode d'extraction est bonne vu que, pour chaque boisson, trois essais ont été effectués, ceux-ci donnant des résultats similaires (voir annexe 8). Enfin, la concentration en arôme dans les boissons est sensée être de 0.05% pour chaque cannette. La matrice, totalement identique dans chaque boisson, n'a apparemment aucune influence vu que l'extraction effectuée avec une matrice préparée en laboratoire donne des résultats très proches de ceux des extractions effectuée sans matrice.

Même si les résultats de la matrice reconstituée ne sont pas les mêmes que ceux des boissons produites dans les divers pays, les résultats des boissons de l'Égypte, de la Grèce, du Nigéria et du Maroc devraient au moins être identiques entre eux car leur fabrication est identique. Ce n'est bizarrement pas le cas.

Vu que les résultats des analyses des boissons Fayrouz étaient généralement plus bas que ceux de la matrice préparée au labo, une hypothèse fut que les composés volatils de l'arôme ananas étaient entraînés lors du dégazage de la boisson aux ultrasons et ainsi l'échantillon qui passait au SAFE était nettement diminué de son arôme. Cette hypothèse a pu être écartée car un essai à été effectué en dopant l'échantillon avec de l'arôme ananas une fois avant et une fois après le dégazage : les résultats ne différaient pas.

Une explication peut être la suivante : la seule différence notable entre ces diverses boissons produites à l'étranger, mise à part leurs lieux de fabrication, est leurs dates de production. Une hypothèse pourrait être que certains composés de l'arôme ne soient pas aussi stables que d'autres, ce qui expliquerait leurs dégradations dans le temps. En regardant les valeurs du tableau 10, on remarque effectivement une tendance claire entre les résultats des Fayrouz d'Égypte (décembre 2006), du Nigéria (août 2007), de Grèce (septembre 2007) et du Maroc (septembre 2007). En effet, les taux de recouvrement augmentent de la même manière que les dates de productions. Toutefois, les Fayrouz de Grèce et du Maroc, produites à la même date, présentent des résultats quelque peu différents. Ces constatations de l'influence du facteur « temps de conservation » pourraient laisser croire que les échantillons de départ n'étaient alors pas forcément à 0.05% d'arôme ananas, rendant les résultats des calculs des taux de recouvrement SAFE déterminés sur les boissons produites à l'étranger difficilement utilisables, étant donné le manque de certitude quant à la concentration initiale en arôme. Par contre, les taux de recouvrement SAFE des composés volatils de l'arôme ananas calculés à partir de l'échantillon sans matrice et avec la matrice préparée au laboratoire peuvent être pris en considération.

3.6.4 Comparaison entre les extractions SAFE et SPME

D'après les résultats obtenus lors de ce travail, il est évident que les deux techniques d'extractions des volatils fonctionnent très bien. Les avantages de la SPME sont son plus faible coût, sa plus courte durée d'analyse, sa facilité d'utilisation. Cependant, ces analyses sont purement qualitatives et aucune matière n'est matériellement récupérée. Au contraire, avec le SAFE, il est possible d'obtenir concrètement un extrait dans lequel se trouvent les volatils. A partir de là il est donc possible d'effectuer toutes les analyses désirées sur la matière récupérée, comme ici une quantification de certains composés. De plus, cette quantification est nettement favorisée après le passage de l'échantillon dans le SAFE car celui-ci est alors dépourvu de matrice. Malheureusement, l'obligation de se procurer l'appareillage ainsi que la pompe turbomoléculaire rend cette technique très coûteuse. Comme réalisé lors de ce travail, il est possible de combiner ces deux types d'extraction. En effet, il est possible d'effectuer une simple analyse qualitative en SPME sur les extraits récupérés lors d'une extraction SAFE.

La figure 30 montre la différence entre un chromatogramme d'une SPME réalisée sur 5 ml d'une Fayrouz ananas dégazée (à gauche) et un chromatogramme d'une SPME effectuée dans les mêmes conditions (10 minutes à température ambiante) sur 5ml d'un extrait SAFE obtenu à partir d'une Fayrouz ananas dégazée (à droite).

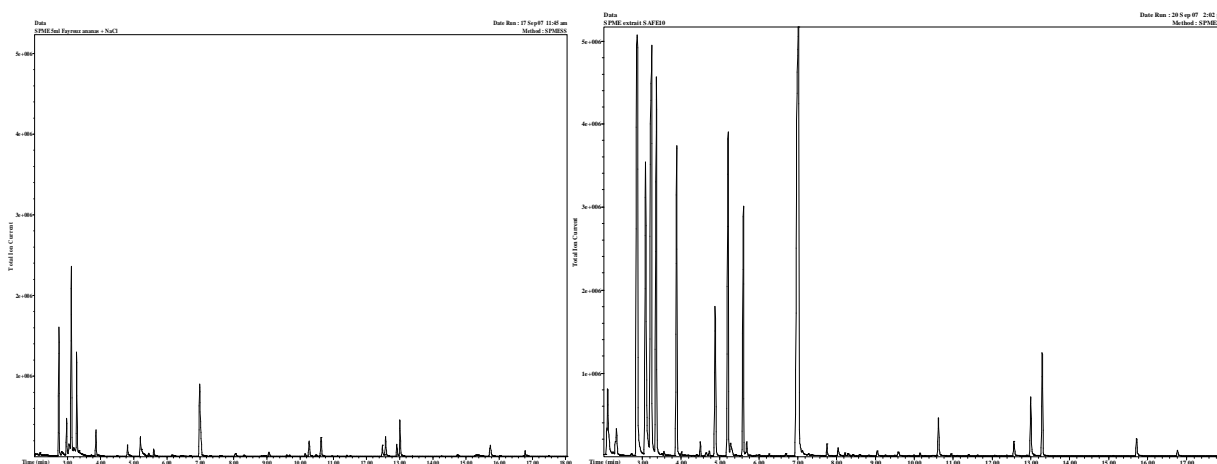


Figure 30 : comparaison entre un chromatogramme d'une SPME sur 5 ml d'une Fayrouz ananas dégazée et d'une SPME sur 5ml d'un extrait SAFE obtenu à partir d'une Fayrouz ananas dégazée (minute 2 à 18)

Comme présenté dans les chromatogrammes ci-dessus, les volatils ont bien plus de facilité à être extrait en SPME après le passage de la boisson par le SAFE. Voici un avantage supplémentaire d'utiliser cette extraction SAFE.

4 Conclusion et perspectives

Avec la SPME, une grande quantité de composés volatils ont pu être extraits des différents malts. Les tests de SPME dynamique n'ont pas été concluants. Les artefacts provenant de la torréfaction du malt ont bien été identifiés sur le malt crystal et le malt foncé. Ces mêmes artefacts n'ont pas été détectés après le passage des boissons à base de malt sur le SAFE, ce qui était le but de cette technique. Les extractions SAFE ont en effet été très concluantes : les composés volatils du malt et surtout de l'arôme ananas des échantillons utilisés se sont tous retrouvés dans les extraits récupérés, sans la présence de composés indésirables. Le profil aromatique des extraits correspond donc parfaitement à celui attendu.

Afin de concentrer les volatils des extraits aqueux dans un solvant organique, la technique SPE s'est avérée être une bien meilleure méthode que l'extraction liquide/liquide.

Les calculs des taux de recouvrement des composés volatils de l'arôme ananas démontrent des résultats plutôt satisfaisants, avec des valeurs avoisinant les 70%, l'effet de matrice étant quasiment nul.

La détermination de ces mêmes taux de recouvrement a été bien plus laborieuse sur les boissons de mêmes matrices, mais produites dans les usines de différents pays. Les différences notées pourraient provenir des dates différentes de fabrication entre les boissons de l'Égypte, du Nigéria, de la Grèce et du Maroc ou d'un autre facteur. Afin de confirmer ou d'écarter cette hypothèse, il serait intéressant de préparer plusieurs échantillons en laboratoire à la même date et d'en réaliser les essais SAFE à de grands intervalles de temps et ainsi pouvoir comparer les résultats. Il serait également possible d'utiliser un appareil de simulation de vieillissement (temps accéléré) utilisant un rayonnement électromagnétique (W/m^2).

La combinaison des extractions SAFE et SPME sur les extraits est une très bonne méthode d'analyses qualitatives des composés volatils. De la même manière, la combinaison des extractions SAFE et SPE sur les extraits est une méthode de quantification fiable pour ces composés volatils.

Au final, on peut en déduire que cette technique pourrait parfaitement permettre de reconstituer un arôme quelconque de composition inconnue à partir de différents produits alimentaires. En effet, il suffirait de réaliser une extraction SAFE sur un échantillon liquide puis d'analyser ces extraits en SPME et en SPE suivi d'analyses en chromatographie afin de connaître les composés volatils participant à l'arôme de ce produit alimentaire. Il est clair qu'une simple SPME sur l'échantillon peut donner des résultats similaires. Cependant, la qualité des chromatogrammes obtenus est bien meilleure après le passage de l'échantillon au SAFE et il est possible de quantifier un composé voulu à partir des extraits, ce qui n'est pas possible en SPME. Une quantification est également possible directement sur l'échantillon, toutefois, les extraits aqueux obtenus par le SAFE éliminent l'effet de matrice.

5 Tableaux et figures

Figure 1 : illustration d'orge [2].....	6
Figure 2 : illustration de grains d'orge [2].....	6
Figure 3 : malt germé à partir de l'orge [2].....	7
Figure 4 : illustration du procédé de fabrication de la bière [3].....	8
Figure 5 : section longitudinale d'un grain d'orge [2].....	9
Figure 6 : la mélanoidine.....	10
Figure 7 : différentes phases solides polymériques [11].....	13
Figure 8 : illustration de l'appareillage SAFE lié à la pompe turbomoléculaire.....	14
Figure 9 : schéma d'une extraction sur phase solide [10].....	14
Figure 10 : schéma du dispositif de la SPME dynamique.....	18
Figure 11 : illustration du dispositif de la SPME dynamique.....	18
Figure 12 : schéma grossier du matériel utilisé pour les extractions SAFE [12].....	19
Figure 13 : schéma détaillé de l'appareillage SAFE [12].....	20
Figure 14 : illustration de l'appareillage SAFE.....	21
Figure 15 : illustration du dispositif SPE.....	24
Figure 16 : superposition des 3 chromatogrammes pour les SPME effectuées avec 3 fibres différentes (minute 7 à 11).....	27
Figure 17 : superposition des 4 chromatogrammes pour les SPME effectuées avec 4 températures d'adsorption différentes (minute 8 à 10).....	28
Figure 18 : superposition des 3 chromatogrammes pour les SPME effectuées avec 3 temps d'adsorption différents (minute 8 à 10).....	29
Figure 19 : graphique de l'optimum du temps d'adsorption SPME effectuée sur 4 composés volatils principaux du malt foncé.....	30
Figure 20 : exemple de chromatogramme d'une analyse SPME effectuée sur le malt pale.....	32
Figure 21 : exemple de chromatogramme d'une analyse SPME effectuée sur le malt crystal.....	33
Figure 22 : exemple de chromatogramme d'une analyse SPME effectuée sur le malt foncé.....	33
Figure 23 : spectre de masse du fufural.....	34
Figure 24 : graphiques démontrant le débit d'air optimal pour la SPME dynamique.....	34
Figure 25 : comparaison entre un chromatogramme effectué en SPME statique puis dynamique en conditions similaire sur 5 ml d'une Fayrouz ananas dégazée saturée en NaCl.....	35
Figure 26 : comparaison entre deux chromatogrammes d'analyses SPME sur les extraits SAFE d'échantillons initiales de boissons Fayrouz ananas dégazées avec et sans NaCl.....	36
Figure 27 : chromatogramme de l'analyse SPME (GC-MS) effectuée sur l'extrait SAFE d'une boisson Fayrouz ananas.....	38
Figure 28 : chromatogrammes des analyses GC-MS après extractions liquide/liquide à l'éther (gauche) et au dichlorométhane (droite) effectuées sur les extraits SAFE d'une boisson Fayrouz ananas.....	39
Figure 29 : chromatogramme d'une analyse GC-MS après une extraction SPE effectuée sur un extrait SAFE d'une boisson Fayrouz ananas.....	39
Figure 30 : comparaison entre un chromatogramme d'une SPME sur 5 ml d'une Fayrouz ananas dégazée et d'une SPME sur 5ml d'un extrait SAFE obtenu à partir d'une Fayrouz ananas dégazée (minute 2 à 18).....	44

Tableau 1 : liste des principaux pays producteurs d'orge [2].....	7
Tableau 2 : provenance et toxicologie des produits utilisés.....	16
Tableau 3 : paramètres du GC-MS pour la SPME	25
Tableau 4 : paramètres du GC-MS pour les injections liquides.....	26
Tableau 5 : paramètres du GC-FID pour la quantification.....	26
Tableau 6 : liste des principaux composés volatils identifiés dans 3 malts différents.....	31
Tableau 7 : liste des principaux composés volatils identifiés dans les extraits des extractions SAFE effectuées sur des boissons Fayrouz ananas dégazées.....	37
Tableau 8 : taux de recouvrement SPE des principaux composés volatils identifiés dans l'arôme ananas (extraction SPE effectuées à partir d'arôme 0.05%).....	40
Tableau 9 : taux de recouvrement SAFE des principaux composés volatils de l'arôme ananas (SAFE effectués à partir d'arôme 0.05%)	41
Tableau 10 : taux de recouvrement SAFE des principaux composés volatils de l'arôme ananas (SAFE effectués à partir de boisson de provenances différentes).....	42

6 Bibliographie

- [1] Dennis E. Briggs, Malts and Malting, Department of Biochemistry University of Birmingham, Birmingham UK, 1998
- [2] Wikipédia – L'encyclopédie libre, <http://fr.wikipedia.org/wiki/Malt>, octobre 2007
- [3] Tout savoir sur l'actualité scientifique, <http://bioingenierie-kett.over-blog.com/article-4510476.html>, octobre 2007
- [4] D.E. Briggs, C.A. Boulton, P.A. Brookes and R. Stevens, Brewing – Science and practice, CRC Press, Boca Raton (USA), 2004
- [5] Xavier Fernandez, Sébastien Kerverdo, Elisabet Duñach, Louisette Lizzani-Cuvelier, Les hétérocycles dans la chimie des arômes, Nice, 2002
- [6] Elsa Messines, Julie Montès, La Réaction de Maillard, Ecole Normale Supérieure De Lyon - Département des Sciences de la Matière, Lyon, 1998
- [7] CBB – Centre de Biotechnologies en Bretagne, Obtention De Matières Premières Pour La Préparation D'arômes Salés Et/Ou Grillés Et/Ou Torrifiés, Rennes, 2003
- [8] J.-F. Simard, Comment faire de la bonne bière chez soi, Editions du Trécarré, 3^{ème} édition, 1992, Canada
- [9] J.-N. Jaubert, Les arômes alimentaires, Presses Universitaires de France, 1983, Paris
- [10] Laboratoire Environnement et Chimie Analytique, associé au CNRS, <http://www.espci.fr/recherche/labs/leca>, octobre 2007
- [11] Janusz Pawliszyn, Optimization and Quantification with Solid Phase Microextraction, Department of Chemistry, University of Waterloo, Waterloo, 2000
- [12] W. Engel, W. Bahr, P. Schieberle, Solvent assisted flavour evaporation - a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices, Allemagne, 1999

7 Annexes

- Annexe 1 : exemples de chromatogrammes de l'optimisation des paramètres SPME sur le malt foncé : 3 fibres différentes
- Annexe 2 : exemples de chromatogrammes de l'optimisation des paramètres SPME sur le malt foncé : 4 températures d'adsorption différentes
- Annexe 3 : exemples de chromatogrammes de l'optimisation des paramètres SPME sur le malt foncé : 3 temps d'adsorption différents
- Annexe 4 : exemples de chromatogrammes et de spectres de masse obtenus lors de l'identification des composés volatils sur les 3 différents malts
- Annexe 5 : Graphiques et exemples de chromatogrammes obtenus lors des essais en SPME dynamique
- Annexe 6 : exemples de chromatogrammes et de spectres de masse obtenus sur les extraits SAFE d'une Fayrouz ananas dégazée, de l'arôme ananas 0.05% et de l'extrait de malt
- Annexe 7 : exemples de chromatogrammes des analyses GC-MS effectuées après les extractions liquide/liquide et les extractions SPE réalisées sur les extraits SAFE
- Annexe 8 : Feuilles de calculs Excel des taux de recouvrement SAFE des principaux composés de l'arôme ananas à partir de différents échantillons et exemples de chromatogrammes en GC-FID

Rédigé par Julien Donnet

.....