

## Review

# Occurrence et voies de formation des arômes sulfurés dans la bière

## 1. Les sulfures et les polysulfures

Laurence Gijs, Catherine Vermeulen et Sonia Collin

Unité de Brasserie et des Industries Alimentaires,  
Faculté d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale,  
Université catholique de Louvain,  
Croix du Sud, 2 bte 7, 1348 Louvain-la-Neuve

### RÉSUMÉ

Cette revue bibliographique présente un résumé de l'ensemble des informations relatives aux composés sulfurés disponibles dans la littérature. Le premier volet est plus spécifiquement dédié à l'occurrence et aux voies de synthèse des sulfures et polysulfures dans la bière.

*Cerevisia*, 28(1), 2003

### INTRODUCTION

Les composés sulfurés sont des constituants naturels de la bière. Ils sont apportés par les matières premières (malt, houblon) ou synthétisés, chimiquement ou enzymatiquement, au cours des différentes étapes du processus de fabrication (brassage, ébullition, fermentation, vieillissement). Parmi ceux-ci, les sulfures et les polysulfures jouent un rôle non négligeable dans la qualité organoleptique de la bière. Individuellement, ils apportent souvent une saveur d'oignon, de végétal pourri, de chou... Afin d'orienter le brasseur dans le choix de ses matières premières ou du processus de fabrication, nous avons synthétisé, dans ce premier volet de notre review, les connaissances théoriques et pratiques relatives à ces deux familles de composés sulfurés.

### LES SULFURES

Le diméthylsulfure est probablement l'alkylsulfure le plus connu en brasserie. Il possède une odeur très caractéristique de maïs, d'oignon ou de cassis (1, 2). Formé par de nombreuses plantes et algues marines, mais aussi par certains microorganismes, il est présent dans presque tous les végétaux et contribue de manière bénéfique à la saveur de denrées telles que le thé, le cacao, le vin, le maïs... (2, 3). Il est présent naturellement dans la bière à des concentrations variant fortement selon le type de bière, entre 5 et 90 µg/l (3). Son seuil de perception se situant aux environs de 30 µg/l, il est reconnu comme étant un composé aromatique très important pour la saveur des bières lagers (2, 4).

A ce jour, deux principales voies de formation du diméthylsulfure dans des systèmes biologiques ont été élucidées (2, 4). La première voie est basée sur la dégradation des composés sulphonium tels que la diméthyl-β-propiothétine dans les algues et la S-méthyl-

méthionine (SMM) dans l'orge germé, le blé ou l'avoine. Ces composés sont dégradés en diméthylsulfure par traitement thermique ou hydrolysés par des systèmes enzymatiques qui ont été isolés dans des champignons, des bactéries et des algues (2). La seconde voie implique la réduction enzymatique du diméthylsulfoxyde (DMSO). Cette réduction a été observée dans divers systèmes biologiques tels que la vache, les cultures agricoles ou certains microorganismes eucaryotes ou procaryotes (2).

Ces deux voies de formation sont fortement dépendantes l'une de l'autre (figure 1). La figure 2 montre l'évolution du diméthylsulfure et de ses deux précurseurs au cours des principales étapes du processus de fabrication d'une bière.

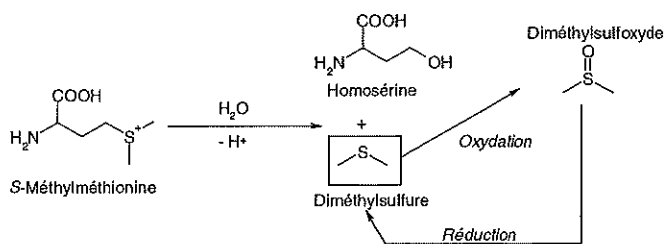


Figure 1: Interdépendance des voies de formation du diméthylsulfure dans la bière (d'après 2).

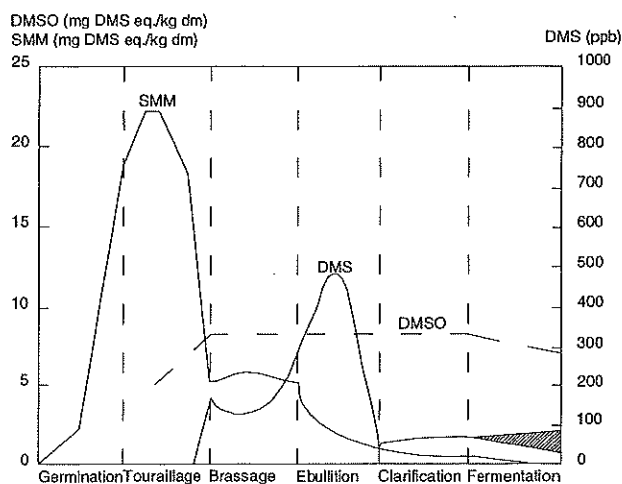


Figure 2: Evolution, au cours de la fabrication d'une bière, du diméthylsulfure (DMS), en ppb, et de ses précurseurs, le diméthylsulfoxyde (DMSO) et la S-méthylméthionine (SMM), en mg d'équivalent DMS par kg de malt en poids sec (d'après 6).

Une troisième voie de formation du diméthylsulfure, probablement moins importante que les deux premières, implique la dégradation de la méthionine par interaction avec des sucres réducteurs (5). Le produit principal de cette dégradation est le méthional ou des produits dérivés de cet aldéhyde tels que l'alcool correspondant, le méthionol. Deux autres produits importants de cette dégradation sont le diméthylsulfure et le diméthyl-disulfure.

#### Formation du diméthylsulfure à partir de *S*-méthyl-méthio nine

La *S*-méthylméthionine est absente de l'orge. Elle est seulement formée pendant la germination à partir de *S*-adénylméthionine et de méthionine par un système similaire à celui présent dans le germe de blé (2). La quantité de *S*-méthylméthionine rencontrée dans le malt vert est de l'ordre de 30 à 60 mg/kg (2, 4, 6, 7). La quantité de ce précurseur dans le malt dépend de la variété d'orge utilisée, mais surtout des conditions de maltage (2, 8). Ainsi, la quantité de *S*-méthylméthionine du malt est plus importante si le contenu en azote de l'orge de départ est plus important, si l'orge a été stockée plus longtemps avant le maltage ou si le maltage a été accéléré par différents facteurs tels que l'utilisation d'acide gibbérélique ou de hautes températures lors de la trempe et de la germination (2).

Au cours du touraillage du malt, lorsque la température dépasse 60 °C, la *S*-méthylméthionine est dégradée en homosérine et diméthylsulfure (2, 4, 6, 7, 8), dont une quantité non négligeable peut, heureusement, être perdue par entraînement gazeux. Dickenson et al. (4) ont étudié la demi-vie de la *S*-méthylméthionine en fonction de la température et de l'humidité du grain d'orge (tableau 1). Cette demi-vie indique la différence entre la dégradation et la synthèse continue. A température constante, une faible humidité du grain va favoriser la dégradation de la *S*-méthylméthionine tandis que, à humidité constante, elle est plus rapidement dégradée lorsque la température est élevée. Selon Anness et al. (2), la quantité de diméthylsulfure resterait stationnaire car, à haute température, le taux de perte par évaporation serait compensé par la dégradation de *S*-méthylméthionine.

Température (°C)	Humidité (% , w/w)	DEMI-VIE (H)	
		42	7,5
55		98	50
65		30	20
75		9,3	4,8
85		2,4	1,9

**Tableau 1:** Demi-vie, en heures, de la *S*-méthylméthionine en fonction de la température et de l'humidité du grain d'orge (d'après 4).

Au cours du brassage, la *S*-méthylméthionine passe en solution et continue à être dégradée au cours de l'ébullition (2, 6). Le diméthylsulfure formé est entraîné dans les vapeurs d'ébullition. Mitani et al. (9) ont récemment montré que la vitesse de volatilisation du diméthylsulfure, dépendante du type de chaudière et de l'apport calorifique,

est plus importante que la vitesse de synthèse du sulfure à partir de *S*-méthylméthionine, uniquement dépendante de la température.

Après l'ébullition, lorsque le moût est encore chaud, la *S*-méthylméthionine est toujours dégradée, mais le diméthylsulfure produit n'est plus évaporé (2, 6).

Pendant la fermentation, la levure est capable de prélever la *S*-méthylméthionine, mais est incapable de la métaboliser en diméthylsulfure (4). Elle est probablement transformée en méthionine par l'action d'une méthyltransférase (2). Ce sont donc les étapes de touraillage du malt et de clarification du moût qui dicteront le taux de diméthylsulfure issu de la *S*-méthylméthionine.

#### Formation du diméthylsulfure à partir de diméthylsulfoxyde

L'orge et le malt vert contiennent très peu de diméthylsulfoxyde car celui-ci est principalement formé au cours du touraillage du malt, par oxydation d'une partie du diméthylsulfure produit au cours de cette même étape (4, 6, 7). L'oxydation du diméthylsulfure en diméthylsulfoxyde est d'autant plus importante que la température de touraillage est élevée (4, 7). Une oxydation plus poussée du diméthylsulfure aboutit à la formation de diméthylsulfone (DMSO<sub>2</sub>) qui, heureusement, n'est pas métabolisé par la levure (7).

La production de diméthylsulfoxyde n'est plus observée au cours des étapes telles que le brassage, l'ébullition et la clarification du moût. La majeure partie du diméthylsulfure est en effet perdue pendant le brassage et les premiers stades de l'ébullition (2). La quantité de diméthylsulfoxyde présente dans le moût au moment de l'ensemencement est donc identique à celle retrouvée dans le malt touraillé (4).

Au cours de la fermentation, les levures de brasserie ont le pouvoir de produire du diméthylsulfure par réduction du diméthylsulfoxyde par la diméthylsulfoxyde réductase (4, 6). Cette activité enzymatique, NADPH dépendante, serait en relation étroite avec les systèmes enzymatiques responsables de la réduction de la méthionine sulfoxyde et de la biotine sulfoxyde (7). Cette voie de formation du diméthylsulfure a été confirmée par l'utilisation de diméthylsulfoxyde marqué au carbone 14 (10) ou deutéré (11, 12). La production de diméthylsulfure est cependant masquée par une perte de ce même composé par entraînement au CO<sub>2</sub> (12). En réalité, Dickenson et al. (4) ont montré que la concentration en diméthylsulfoxyde reste assez constante au cours de la fermentation, au contraire de la concentration en diméthylsulfure qui, elle, diminue de façon exponentielle. Cette observation peut être expliquée par le fait que les concentrations en diméthylsulfoxyde sont beaucoup plus élevées que les quantités de diméthylsulfure observées. Le suivi de la concentration en DMSO au cours de la fermentation ne serait dès lors pas un bon indicateur de la production de DMS par les levures.

Le taux de réduction du diméthylsulfoxyde pendant la fermentation dépend de la souche de levure, de la température de fermentation, du pH, de la composition du moût et de la vaisselle utilisée (2). La production de diméthylsulfure est plus importante chez *Saccharomyces cerevisiae* que chez *Saccharomyces pastorianus*. Elle est également plus marquée si la fermentation se fait à basse température, si la densité du moût ou le pH sont plus

élevés (maximale à pH 5,75) et si la pression est élevée (2). La réduction du diméthylsulfoxyde par la levure est inhibée à 80 % en présence de méthionine sulfoxyde (2).

Leemans et *al.* (12) ont montré que 80 % du diméthylsulfure présent dans la bière fraîche seraient produits pendant la fermentation. Au cours du stockage, le diméthylsulfoxyde peut encore se réduire lentement en diméthylsulfure (8).

Si le diméthylsulfure est sans aucun doute le sulfure le plus important, d'autres alkylsulfures sont également présents dans la bière. Leur odeur est souvent désagréable et leur seuil de perception très faible (tableau 2).

Un sulfure asymétrique, l'éthylméthylsulfure peut être formé lors de la dégradation du méthional selon un mécanisme radicalaire (figure 3 ; 16). Il peut également être formé par substitution nucléophile d'un méthanthioliol sur un éthanol.

Le sulfure d'hydrogène est également un sulfure d'une importance capitale en brasserie. Un test triangulaire a été mené par Brenner et *al.* (17) sur deux bières afin de déterminer l'importance olfactive du sulfure d'hydrogène. Il s'est avéré que son odeur était détectée à partir d'une concentration de 5 ppb. Les termes utilisés pour décrire le composé étaient: odeur de fermentation, de levure, de soufre. La bière contenant l'ajout de sulfure d'hydrogène fut également perçue comme possédant moins les arômes de houblon. Selon Soltoft (8), le sulfure d'hydrogène, à une concentration de 5 ppb, diminue la perception des notes estérifiées. A une concentration supérieure à 10 ppb, il serait responsable d'une odeur très désagréable d'oeuf pourri. Dans la littérature, le seuil de perception du sulfure d'hydrogène dans la bière varie généralement de 5 à 10 ppb (tableau 3 ; 18). Hashimoto et *al.* (19) s'en éloignent un peu avec une valeur de  $6,3 \cdot 10^{-7}$  mol/l (23 ppb).

Le sulfure d'hydrogène peut être apporté par les matières premières de la bière (malt et houblon), être créé pendant l'ébullition par dégradation chimique ou thermique d'acides aminés (cystéine, cystine ; 22) ou être produit par le métabolisme de la levure ou d'une bactérie sporulante, *Zymomonas anaerobia* (18).

Le malt apporte une quantité appréciable de sulfure d'hydrogène. Le moût clarifié froid en contient entre 13 et 37  $\mu\text{g/l}$  (17).

Durant la fermentation, quatre pics de concentration élevée en  $\text{H}_2\text{S}$  sont observés (figure 4). Ils correspondent tous à une étape bien particulière de la croissance. Ce profil est observé quelle que soit la température de fermentation (23). Le premier pic se manifeste déjà avant la phase exponentielle de croissance de la levure, mais son intensité décroît rapidement. Le second pic est une sorte d'«épaulement» du premier et correspond à une concentration de cellules d'environ vingt millions par millilitre. Après le troisième pic, relatif à une quantité cellulaire d'environ quarante millions par millilitre, le contenu en  $\text{H}_2\text{S}$  diminue brusquement pour atteindre l'état de traces quelques heures plus tard. Enfin, au stade de croissance maximale correspond un quatrième pic au-delà duquel la quantité d' $\text{H}_2\text{S}$  décroît de façon graduelle (23). Malgré cette dernière déperdition de gaz, la concentration résiduelle en  $\text{H}_2\text{S}$  en fin de fermentation suffit encore à conférer aux bières dites «jeunes» une saveur putride (24). La concentration en sulfure d'hydrogène présente en fin de fermentation est similaire à celle observée dans le

moût clarifié froid de départ (17). Si la fermentation est trop lente, la concentration en sulfure d'hydrogène peut augmenter et dépasser le seuil de perception, entraînant des problèmes organoleptiques. Une garde plus longue ou un passage de la bière sur une électrode en cuivre permettent d'éliminer ce problème (21).

Pendant la fermentation primaire, l'évolution de la concentration en sulfure d'hydrogène est étroitement liée à l'indice de bourgeonnement de la levure (23). L'indice de bourgeonnement de la levure, ou budding, est le taux de cellules filles exprimé en pourcentage de cellules mères. Au cours de la fermentation, cet indice augmente de façon périodique. La concentration en sulfure d'hydrogène évolue de façon similaire, mais décalée dans le temps, le maximum de sulfure d'hydrogène étant observé lorsque l'indice de bourgeonnement est minimal (figure 4). Le sulfure d'hydrogène est en fait produit pendant la période de maturation de la cellule de levure (25).

Au cours du stockage de la bière, la concentration en sulfure d'hydrogène diminue, parfois jusqu'à disparition complète (tableau 4). Cependant, aucune corrélation n'est possible entre le temps de stockage et les teneurs présentes dans la bière (17).

Les levures, et en particulier *Saccharomyces cerevisiae*, sont capables d'assimiler le soufre organique et inorganique présent dans le milieu pour l'utiliser dans le métabolisme des acides aminés (26, 27). Les précurseurs métabolisés par la levure sont les sulfates, les sulfites, les acides aminés et les polypeptides soufrés (méthionine, cystéine, cystine, thiamine et glutathion ; 28, 29). A ce stade, plusieurs auteurs s'opposent quant à l'importance relative de chaque précurseur.

Selon Lawrence et *al.* (30), le sulfure d'hydrogène est majoritairement produit à partir de cystéine et minoritairement à partir de sulfate. Anderson et *al.* (18) ont, quant à eux, montré que 75 à 90 % du sulfure d'hydrogène produit lors de la fermentation dérivent du sulfate. Selon Hysert et *al.* (31), la réalité est un compromis entre ces deux extrêmes. La formation du sulfure d'hydrogène à partir du sulfate est beaucoup plus importante en début de fermentation, lorsque la levure est en phase exponentielle de croissance. C'est en effet à ce moment que la levure nécessite le plus de soufre et que l'énergie disponible pour l'assimilation du sulfate est la plus grande. La formation du sulfure d'hydrogène par dégradation primaire de la cystéine se déroulerait, quant à elle, de façon constante tout au long de la fermentation, mais à un taux plus faible. C'est pourquoi le sulfure d'hydrogène serait majoritairement produit à partir de sulfate en début de fermentation et à partir de cystéine en fin de fermentation.

En 1974, Anderson et *al.* (18) ont montré que 2 % du sulfure d'hydrogène dérivent de la méthionine. Selon ces auteurs, à l'exception des sulfates, les autres précurseurs joueraient un rôle tout à fait négligeable dans la synthèse du sulfure d'hydrogène. En effet, la thiamine et la cystine sont très peu assimilées par les levures lorsqu'elles constituent la seule source de soufre tandis que les sulfites et la cystéine ne sont assimilés qu'après une phase de latence prolongée. Néanmoins, les sulfites exogènes pourraient diffuser au travers de la membrane des levures et s'accumuler dans la cellule en échappant à la régulation de la voie de réduction du sulfate (32).

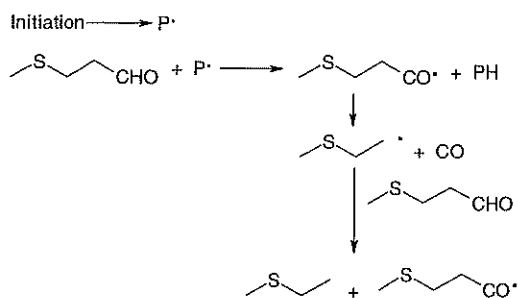


Figure 3: Formation d'éthylméthylsulfure par dégradation radicalaire du méthional (d'après 16).

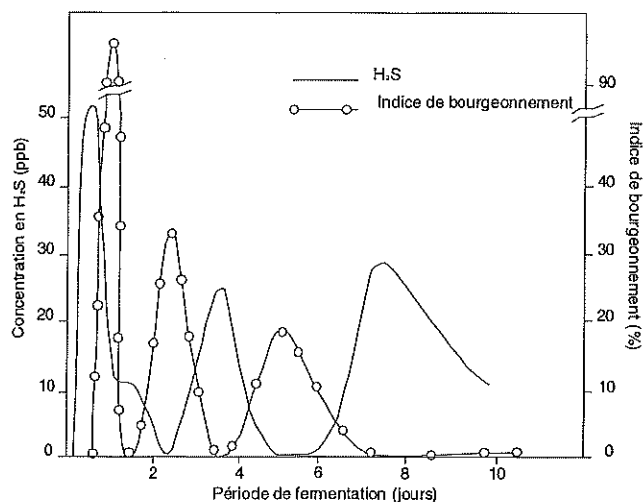


Figure 4: Relation entre l'indice de bourgeonnement de la levure (%) et la concentration en sulfure d'hydrogène (ppb) au cours de la fermentation du moût (d'après 23).

Étape de fabrication		Concentration en H <sub>2</sub> S μg/kg d'orge ou de malt μg/l de moût ou de bière
Matières premières	Orge	72
	Malt	190
Brassage et ébullition	Moût clarifié froid	13 - 37
Fermentation	0,5 h	70
	8 h	250
	16 h	90
	24 h	60
	48 h	20
	120 h	22
	216 h	20
Bière	Bière filtrée	11 - 25
Stockage	10 j	7
	30 j	3 - 16
	40 j	0 - 8

Tableau 4: Concentration en sulfure d'hydrogène rencontrée au cours du processus de fabrication d'une bière (d'après 17).

Composé	Odeur	Seuil de perception en ppb (milieu)
Diméthylsulfure <chem>CS</chem>	Oeuf pourri, chou <sup>1</sup>	50 <sup>1</sup>
Diéthylsulfure <chem>CCSCC</chem>	Oignon, ail <sup>1</sup>	1,2 <sup>1</sup> 3 (bière) <sup>13</sup> 0,92 (vin) <sup>14</sup>
Diisopropylsulfure <chem>CC(C)SC(C)C</chem>	Oignon, ail, éther <sup>1</sup>	20 <sup>1</sup>
Di-n-butylsulfure <chem>CCCCSCCCC</chem>	Caoutchouc, soufré, oignon pourri <sup>1</sup>	0,002 <sup>1</sup>
1,1-Bis (méthylthio)-2-méthylpropane <chem>CC(C)(CS)CS</chem>	Rôti, café, oignon, métallique <sup>15</sup>	-

Tableau 2: Odeur et seuil de perception en ppb (dans différents milieux) d'alkylsulfures.

Matrice	Odeur	Seuil de perception (ppb)	Concentration	Auteur
Bière	Oeuf pourri, algue pourrie, soufré	5 - 10	0,5 - 5 ppb	8
Bière	-	60	-	20
Bière	Sulfureux, oeuf pourri	5 - 8 (libre) > 5 (total)	1 - 20 ppb	21
Bière	-	23	-	19
Air	Sulfureux, oeuf pourri	30	Traces	13
Eau	Sulfureux, oeuf pourri	50	-	13
Vin	-	50 - 80	-	14

Tableau 3: Occurrence, odeur, seuil de perception (ppb) et concentration du sulfure d'hydrogène.

### Métabolisme du sulfate

Au cours de la première étape-clé dans l'élaboration d'H<sub>2</sub>S (figure 5), à savoir l'assimilation du sulfate, *Saccharomyces cerevisiae* utilise deux types de perméases (33, 34). Seule l'une d'entre elles, *SUL 1*, est caractérisée

par une haute affinité pour le sulfate. Il est probable que le transporteur de haute affinité ne soit autre qu'un simple symport  $\text{SO}_4^{2-}/\text{H}^+$  (35). Notons qu'il n'est toutefois pas exclu que les levures puissent également recourir à une simple diffusion de sulfate au travers de leur membrane (36). Une fois dans la cellule de levure, le sulfate est réduit en sulfite par voie enzymatique et le sulfite est à son tour

réduit en sulfure d'hydrogène par la sulfite réductase. Une petite partie de ce sulfure d'hydrogène est utilisé pour la biosynthèse de la cystéine et de l'homocystéine, le reste étant excrété dans le milieu. La production de sulfure d'hydrogène par les levures dépend de la composition du milieu nutritionnel, des conditions de fermentation et de la souche de levure (26, 37).

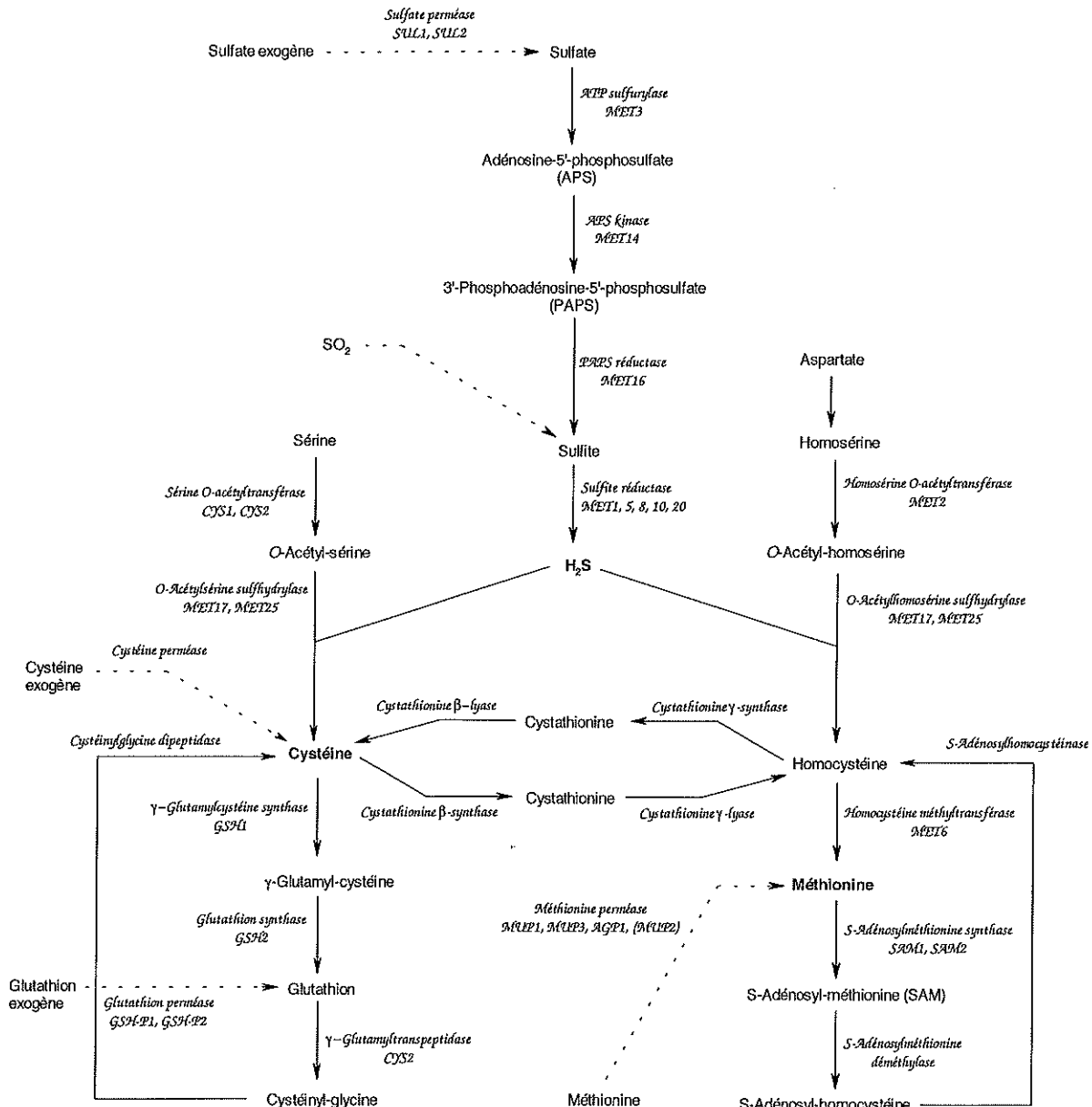


Figure 5: Illustration du métabolisme levurien des composés soufrés (d'après 24, 32, 34, 36, 38, 39, 40, 41).

### Influence des acides aminés et de l'azote sur la production de sulfure d'hydrogène

L'ajout d'acides aminés dans un moût altère considérablement la quantité de sulfure d'hydrogène qui est produite au cours de la fermentation (31). Un ajout de cystéine ou de thréonine va stimuler significativement la production de sulfure d'hydrogène, tandis qu'un ajout de méthionine va l'inhiber. En fait, la méthionine exerce son inhibition sur la réduction du sulfate, probablement par inhibition de l'ATP-sulfurylase et par répression de la sulfite réductase et de la cystéine désulfhydrase. La thréonine, quant à elle, stimule non seulement la réduction

du sulfate, mais aussi les autres voies de formation du sulfure d'hydrogène, issues du métabolisme de la méthionine, probablement par simple inhibition de la biosynthèse de la méthionine.

Lorsque, dans le milieu, une carence en azote est imposée aux levures, la production de sulfure d'hydrogène croît. Ainsi, lorsque la levure est transférée d'un milieu riche en azote vers un milieu pauvre en cet élément, une libération accrue d' $\text{H}_2\text{S}$  se manifeste. Si une source d'azote est ensuite ajoutée au milieu, la quantité d' $\text{H}_2\text{S}$  libérée rechute (32), résultant, selon Vos et al. (42), de la dégradation des protéines intracellulaires contenant des résidus soufrés. Selon Giudici et al. (43), la formation

accrue de sulfure d'hydrogène par certaines espèces en manque d'azote pourrait encore être due à une réduction incontrôlée des sulfates en l'absence de précurseurs pour la cystéine ou la méthionine. Ce qui est sûr, c'est que dans le cas où l'azote se fait rare, un net ralentissement de la biosynthèse des acides aminés soufrés et de la SAM est observé. Or, il est reconnu aujourd'hui que ces molécules soufrées jouent un rôle important dans la répression des gènes codant pour les  $\text{SO}_4^{2-}$  perméases. Par conséquent, l'absence de ces substances régulatrices mène logiquement à une dérégulation, provoquant ainsi une surproduction d' $\text{H}_2\text{S}$ .

Notons qu'une carence en azote a également un effet sur le glutathion intracellulaire. Une migration vers la vacuole, observée dans ces conditions, induit une dérégulation de *GSH1*, provoquant ainsi une synthèse accrue de glutathion. Néanmoins, après quelques heures, la consommation du glutathion vacuolaire par la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase est évidente et permet de répondre aux besoins en acides aminés soufrés de la cellule (39).

### Influence des métaux lourds sur la production de sulfure d'hydrogène

L'ajout de certains métaux lourds va influencer la production de sulfure d'hydrogène de façons diverses en fonction du métal (31). L'ajout de fer induit une diminution de production par inhibition de la réduction du sulfate. L'ajout de cuivre n'a quasiment pas d'effet. En théorie, l'ajout de zinc, en faible concentration, induit une forte augmentation de la production par stimulation de la réduction du sulfate et des autres voies de formation du sulfure d'hydrogène. Pourtant, en pratique, on sait que le zinc augmente la vitesse de fermentation et empêche ainsi la formation de sulfure d'hydrogène.

### Influence du pH et de la température sur la production de sulfure d'hydrogène

La température, ayant des répercussions directes sur la croissance levurienne, peut donner lieu à des décalages temporels au niveau de la production de sulfure d'hydrogène, ainsi qu'à des variations de sa concentration (figure 6). Une haute température et un pH bas sont, par exemple, deux conditions favorables à la formation d' $\text{H}_2\text{S}$  (44).

### Influence des vitamines sur la production de sulfure d'hydrogène

La biotine encourage l'apparition de l' $\text{H}_2\text{S}$  simplement en favorisant le phénomène de fermentation (45). La riboflavine (vitamine  $\text{B}_2$ ) stimule la sulfite réductase. La pyridoxine (vitamine  $\text{B}_6$ ) et la thiamine (vitamine  $\text{B}_1$ ) ne semblent avoir aucun effet sur la production de  $\text{H}_2\text{S}$  (46). Le rôle du pantothénate demeure quelque peu controversé. Certains constatent qu'il n'influence pas la production d' $\text{H}_2\text{S}$  (46), d'autres affirment qu'une carence en cette vitamine, dans un milieu de culture, favorise la réduction du sulfate et du sulfite (27).

### Influence diverses sur la production de sulfure d'hydrogène

Pour conclure, signalons encore l'effet d'une série de molécules.

La présence de flavine mononucléotide (FMN) ou de groupements thiol peut stimuler la sulfite réductase contrairement au monoxyde de carbone et à certains agents chélatants qui jouent plutôt un rôle d'inhibiteur (47).

L'acide ascorbique n'influence pas la production d' $\text{H}_2\text{S}$  (47).

L'addition de cycloheximide aux cultures de levures défavorise l'apparition de sulfure d'hydrogène (46).

La thiorédoxine est impliquée dans le transport et la réduction du PAPS (33).

Et finalement, l'hydroxylamine, réducteur assez puissant, favorise la réduction du bisulfite (44).

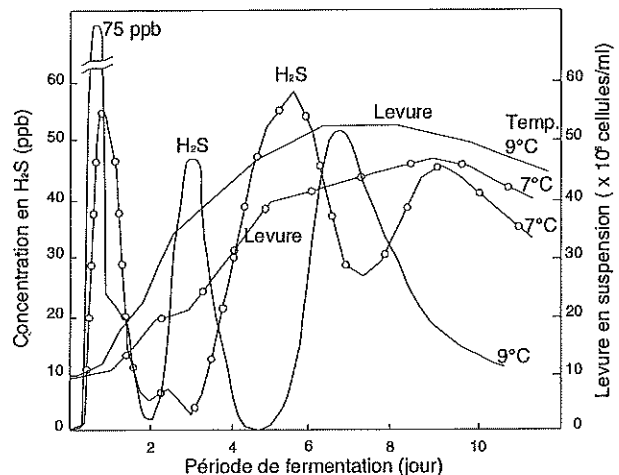


Figure 6: Evolution du sulfure d'hydrogène en fonction de la température (d'après 23).

## LES POLYSULFURES


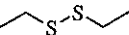
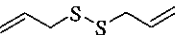
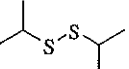
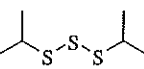
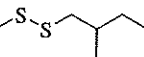

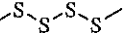
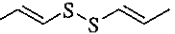
Au vu de leurs notes olfactives et de leur seuil de perception (tableau 6), les polysulfures pourraient également jouer un rôle non négligeable dans la qualité organoleptique de la bière.

Le polysulfure possédant le seuil de perception le plus faible ( $0,1 \mu\text{g/l}$ ) semble être le diméthyltrisulfure (8, 48). Son odeur, en milieu synthétique, est semblable à celle de l'oignon et sa présence a été détectée dans le cognac, le whisky, le vin et la bière (29, 49, 50). Les diméthyldisulfure et -trisulfure sont présents dans la bière fraîche en concentration inférieure ou proche de leur seuil de perception (concentrations respectivement de  $0,3 - 7,5$  ppb et  $0,1 - 1,8$  ppb ; 49).

Des quantités importantes de diméthyltrisulfure et de diméthyltrisulfure sont déjà présentes dans le moût en fin d'ébullition, avant le houblonnage (49).

Selon Williams et al. (50), la concentration en polysulfures chute fortement au cours de la fermentation.

Au cours du vieillissement de la bière, on observe une production importante de diméthyltrisulfure, et même de diméthyltétradisulfure, tandis que la concentration en diméthyltrisulfure ne varie pas de façon significative (tableau 7 ; 49, 50). Des analyses olfactives en sortie de colonne chromatographique ont récemment confirmé à quel point le diméthyltrisulfure participait à l'arôme de la bière vieillie, à l'instar du *trans*-2-nonéanal, de la  $\beta$ -damascénone et du méthional (52, 53). La présence d'une quantité d'air importante dans le col de la bouteille a tendance à réduire le taux de production de diméthyltrisulfure (49, 50).

Composé	Odeur	Seuil de perception (ppb)	Concentration dans la bière (ppb)
Diméthyldisulfure 	Chou cuit, oignon, caoutchouc <sup>51</sup>	3 - 50 29 (vin blanc) <sup>14</sup>	0,3 - 1,5 <sup>49</sup> 7,5 <sup>51</sup>
Diéthylsulfure 	Caoutchouc brûlé, soufré, doux <sup>15</sup>	0,4 - 30	-
Diallyldisulfure 	Ail	Non déterminé	-
Diisopropyldisulfure 	Oignon frit, fruit tropical <sup>15</sup>	-	-
Diisopropyltrisulfure 	Oignon, poireau, métallique <sup>15</sup>	-	-
Méthyl-2-méthylbutylsulfure 	Soufré, caoutchouc, oignon <sup>15</sup>	-	-
Diméthyltrisulfure 	Oignon frais, soufré, légumes cuits <sup>51</sup>	0,1	0,2 - 1,8 <sup>49</sup> 0,1 <sup>51</sup>
Diméthyltétrasulfure 	Oignon, soufré, légumes cuits <sup>51</sup>	0,2	0,2 <sup>51</sup>
1-Propényldisulfure 	Oignon cuit <sup>51</sup>	-	-

**Tableau 6:** Note olfactive, seuil de perception (ppb) et concentration dans la bière (ppb) de quelques polysulfures (8).

Plusieurs voies de formation des alkylpolysulfures ont été proposées. Elles impliquent des précurseurs tels que les thiols (en présence ou non de sulfure d'hydrogène), la *S*-alkylcystéine sulfoxyde, le méthional, les thiosulfates et la méthionine sulfoxyde.

L'agitation d'une solution contenant du méthanthiol suffit à produire les di-, tri et tétrasulfures correspondants (Spinner E., communication personnelle; 5). La synthèse d'alkylpolysulfures est facilitée par la présence de riboflavine (figure 7).

Nedjma et al. (29) ont proposé une voie de formation des dialkyltrisulfures symétriques ou asymétriques à partir de thiols et de sulfure d'hydrogène (figure 8). Ce mécanisme se base sur la réactivité du sulfure d'hydrogène avec les thiols en présence de cuivre II. Après 24 heures à température ambiante, la réaction entre H<sub>2</sub>S et le méthanthiol aboutit, en présence de cuivre II, à la formation de diméthylsulfure (DMDS) et de diméthyltrisulfure (DMTS). La réaction avec de l'éthanthiol, dans les mêmes conditions, aboutit à la

formation de diéthylsulfure (DEDS) et de diéthyltrisulfure (DETS). Lorsque méthanthiol et éthanthiol sont présents dans un même milieu, on observe la production de deux disulfures et deux trisulfures symétriques (DMDS, DEDS, DMTS et DETS) ainsi que d'un disulfure et d'un trisulfure asymétriques (EMDS et EMTS). Ce mécanisme semble possible dans la bière étant donné la présence de 0,01 à 1,60 mg/l de métaux de transition.

En 1970, Maruyama a proposé un mécanisme de formation du diméthyltrisulfure durant la cuisson de quelques brassicacées (29, 48). Ce mécanisme implique une  $\beta$ -élimination à partir de *S*-méthylcystéine sulfoxyde aboutissant à la formation d'acide méthanesulfénique (figure 9). Cet intermédiaire instable réagit rapidement avec du sulfure d'hydrogène pour donner le trisulfure. Il est probable que ce soit également la voie majoritaire de formation du diméthyltrisulfure de la bière fraîche (48).

La formation de diméthyltrisulfure à partir de *S*-méthylcystéine sulfoxyde est inhibée par la présence d'un

antioxydant tel que le dioxyde de soufre (48). Ce phénomène a été mis en évidence lorsqu'un traitement au dioxyde de soufre est utilisé pendant le séchage des houblons. Toutefois, cette inhibition est réversible, puisqu'un stockage du houblon en présence d'air permet de reformer le précurseur (figure 10). Il y a donc un équilibre d'oxydoréduction entre la *S*-méthylcystéine sulfoxyde et son homologue réduit, la *S*-méthylcystéine qui, elle, ne peut subir la  $\beta$ -élimination pour former le diméthyltrisulfure.

Une *S*-alkylcystéine sulfoxyde a été mise en évidence dans les espèces du genre *Allium* comme précurseur des allylpolysulfures. Cette fois, la *S*-allylcystéine sulfoxyde (alliline) se dégrade chimiquement ou enzymatiquement en allicine (diallylthiosulfinate) qui peut ensuite mener au disulfure par dismutation (figure 11 ; 54).

Gijs et collaborateurs (55) ont montré que la voie majeure de formation du diméthyltrisulfure trouvé dans la bière vieillie est la dégradation du méthional et du méthionol de la bière fraîche. Le méthional étant principalement issu de la dégradation de Strecker de la méthionine, l'utilisation de malts caramélisé induit des teneurs beaucoup plus importantes en diméthyltrisulfure.

Une modification du pouvoir réducteur, par l'ajout d'acide ascorbique par exemple, est sans effet sur les teneurs en diméthyltrisulfure après vieillissement. Par contre, le cuivre en concentration importante réduit à néant les teneurs en diméthyltrisulfure, en piégeant son précurseur direct, le méthane-thiol (56). Les sulfites quant à eux, en protégeant le méthional de l'oxydation en acide 3-méthylthiopropionique, accentuent de façon désastreuse le taux de diméthyltrisulfure produit au cours du vieillissement (56). Les complexes méthional-sulfites étant moins stables lorsque le pH est élevé, une augmentation du pH de la bière induit une diminution de la production de diméthyltrisulfure, alors que la concentration en méthional est, elle, fortement accrue (52).

Une autre voie de synthèse des polysulfures implique la dégradation de Strecker de la méthionine sulfoxyde, en présence de sucres réducteurs, en méthional, puis en diméthylsulfure et diméthyldisulfure. La méthionine sulfoxyde est formée par oxydation de la méthionine en présence de lipides oxydés ou d'agents oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène (5).

Contrairement à ce qui avait été postulé par Peppard en 1978 (48), la méthionine sulfoxyde peut aussi se dégrader par  $\beta$ -élimination, à l'instar de la *S*-méthylcystéine sulfoxyde, en acide méthanesulfénique (figure 12). Par réaction avec du sulfure d'hydrogène, l'acide méthanesulfénique produit du diméthyldisulfure et du diméthyltrisulfure (5).

Le diméthyltrisulfure peut également être formé à partir de diméthyldisulfure par insertion de soufre élémentaire (48). Ce soufre peut être présent dans le milieu (par exemple, le houblon) ou dériver du sulfure d'hydrogène lors d'un traitement thermique.

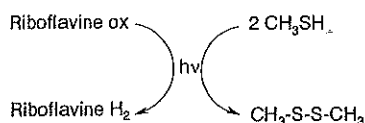


Figure 7: Rôle de la riboflavine dans la synthèse du diméthyldisulfure à partir de méthane-thiol.

Composés	Stockage à 45°C d'une lager (en jours)				
	Concentration (ppb)				
	0	1	2	3	4
Diméthyldisulfure	0,7	1,1	0,8	0,5	0,5
Diméthyltrisulfure	0,5	1,9	1,9	2,3	2,5
Diméthyltétrasulfure	traces	0,5	0,8	1,1	1,5

Tableau 7: Evolution des polysulfures au cours du stockage de la bière (49).

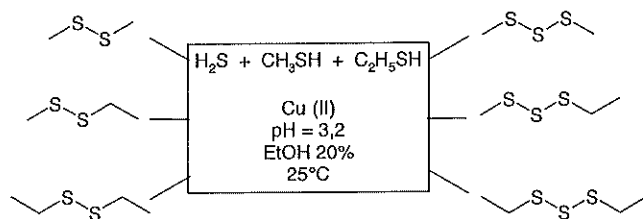


Figure 8: Formation d'alkyldi- et -trisulfures, par réaction de thiols et de sulfure d'hydrogène, en présence de cuivre II.

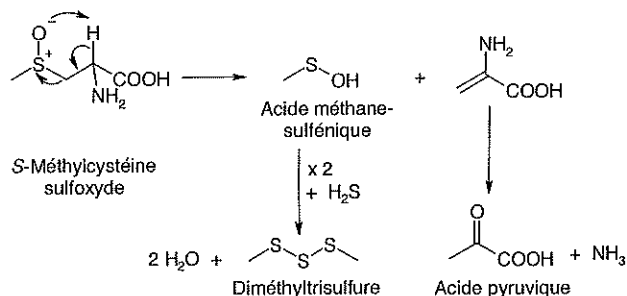


Figure 9: Formation de diméthyltrisulfure à partir de *S*-méthylcystéine sulfoxyde.

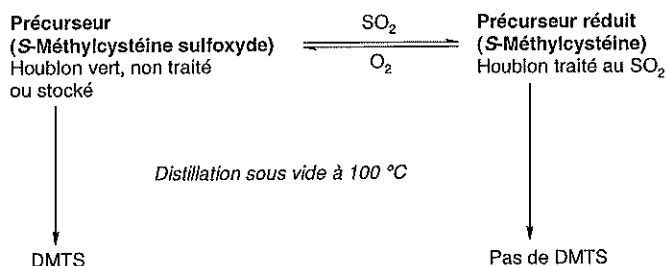


Figure 10: Equilibre d'oxydoréduction entre la *S*-méthylcystéine sulfoxyde, précurseur du diméthyltrisulfure (DMTS), et sa forme réduite, la *S*-méthylcystéine.

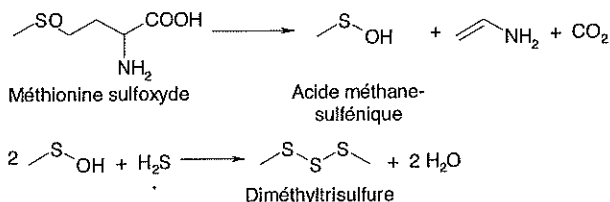
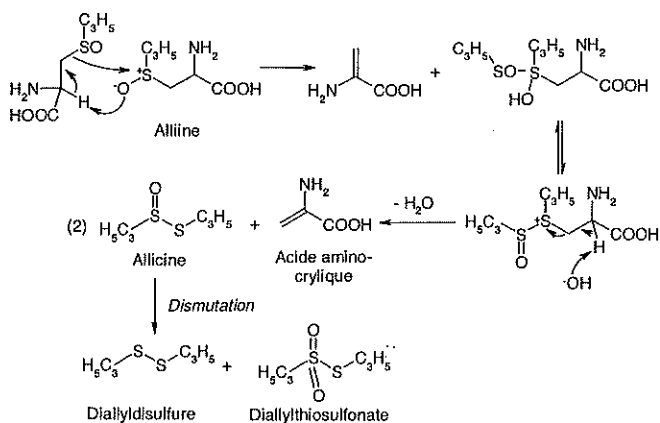


Figure 12: Formation de diméthyldisulfure à partir de méthionine sulfoxyde.





**Figure 11:** Formation d'allyldisulfure à partir de S-allylcystéine sulfoxyde.

## BIBLIOGRAPHIE

- MEILGAARD M.C., 1975. *Flavor Chemistry of Beer: Part II: Flavor and Threshold of 239 Aroma Volatiles*. MBAA Technical Quarterly, 12 (3), 151-168.
- ANNES B.J., BAMFORTH C.W., 1982. *Dimethyl sulphide - A review*. Journal of the Institute of Brewing, 88, 244-252.
- WHITE F.H., PARSONS R., 1975. *The development of dimethyl sulphide in malting, brewing and fermentation*. European Brewery Convention, Proceedings of the 15th Congress, Nice, 721-734.
- DICKENSON C.J., ANDERSON R.G., 1981. *The relative importance of S-methylmethionine and dimethyl sulfoxide as precursors of dimethyl sulphide in beer*. European Brewing Convention, Proceedings of the 18th Congress, Copenhagen, 413-420.
- YU T.H., HO C.T., 1995. *Volatile compounds generated from thermal reaction of methionine and methionine sulfoxide with or without glucose*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 1641-1646.
- VAN DEN EYNDE E., 1991. *The DMS story from malt to beer*. Cerevisia Biotechnology, 16, 45-49.
- ANNES B.J., BAMFORTH C.W., WAINWRIGHT T., 1979. *The measurement of dimethyl sulphoxide in barley and malt and its reduction to dimethyl sulphide by yeast*. Journal of the Institute of Brewing, 85, 346-349.
- SOLTOFT M., 1988. *Flavour active sulphur compounds in beer*. Brygmesteren, 2, 18-24.
- MITANI Y., ISHIDA F., AKIYAMA H., TAMAKI T., 1997. *Rate analysis of dimethyl sulphide volatilization during wort boiling*. European Brewery Convention, Proceedings of the 26th Congress, 315-322.
- GIBSON R.M., LARGE P.J., BAMFORTH C.W., 1985. *The use of radioactive labeling to demonstrate the production of dimethyl sulfide from dimethyl sulfoxide during fermentation of wort*. Journal of the Institute of Brewing, 91, 397-400.
- YANG B., COLLIN S., DUFOUR J.P., 1992. *The influence of the yeast characteristics and fermenting conditions on the in vivo reduction of dimethylsulfoxide to dimethylsulfide*. ASBC Newsletter, 52.
- LEEMANS C., DUPIRE S., MACRON J.Y., 1993. *Relation between wort DMSO and DMS concentration in beer*. European Brewery Convention, Proceedings of the 24th Congress, Oslo, 709-716.
- FAZZALARI F.A., 1978. *Compilation of odor and taste threshold values data*. American Society for Testing and Materials.
- RAUHUT D., 1993. *Chap. 6. Yeasts-production of sulfur compounds*. Wine Microbiol. Biotechnol. Ed. Fleet, Graham H., Harwood C., 183-223.
- WERKHOFF P., GUNTERT M., KRAMMER G., SOMMER H., KAULEN J., 1998. *Vacuum headspace method in aroma research: flavor chemistry of Yellow Passion Fruits*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 1076-1093.
- PRYOR W.A., TANG R.H., 1978. *Ethylene formation from methional*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 81 (2), 498-503.
- BRENNER M.W., OWADES J.L., GOLYZNIAK R., 1953. *Determination of volatile sulfur compounds. - I. Hydrogen sulfide*. Proceedings of the American Society of Brewing Chemists, 83-97.
- ANDERSON R.J., HOWARD G. A., 1974. *The production of hydrogen sulphide by yeast and by zymomonas anaerobia*. Journal of the Institute of Brewing, 80, 245-251.
- HASHIMOTO N., ARAMAKI K., KUROIWA Y., 1968. *Fate of sulfur compounds during brewing*. Report of the Research Laboratories of Kirin Brewery CO., LTD., 11, 43-55.
- THORNE R.S.W., 1966. *The contribution of yeast to beer flavor*. MBAA Technical Quarterly, 3(2), 160-168.
- MOLL M., 1991. *Bieres & Coolers: définition, fabrication, composition*. Collection sciences et techniques agro-alimentaires, Tec & Doc - Lavoisier et Apria.
- ZHENG Y., BROWN S., LEDIG W.O., MUSSINAN C., HO C.T., 1997. *Formation of sulfur-containing flavor compounds from reactions of furaneol and cysteine, glutathione, hydrogen sulfide, and alanine/hydrogen sulfide*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 894-897.
- NAGAMI K., TAKAHASHI T., NAKATANI K., KUMADA J., 1980. *Hydrogen Sulfide in Brewing*. MBAA Technical Quarterly, 17(2), 64-68.
- OMURA F., SHIBANO Y., FUKUI N., NAKATANI K., 1994. *Reduction of hydrogen sulfide production in brewing yeast by constitutive expression of MET25 gene*. ASBC Journal, poster n°7, 1-3.
- TAKAHASHI T., NAGAMI K., NAKATANI K., KUMADA J., 1980. *Hydrogen Sulfide in Brewing -II*. MBAA Technical Quarterly, 17(4), 210-214.
- ROMANO P., SUZZI G., 1992. *Production of H<sub>2</sub>S by Different Yeast Strains During Fermentation*. Proceedings of the Institute of Brewing, Twenty-second convention, 96-98.
- STEWART G.G., RUSSEL I., 1981. *The influence of yeast on volatile sulphur compounds in beer*. European Brewery Convention Monography VII, 173-187.
- MAGA J.A., 1976. *The role of sulfur compounds in food flavor. Part III: Thiols*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, January, 147-192.

- 29 NEDJMA M., HOFFMANN N., 1996. *Hydrogen sulfide reactivity with thiols in the presence of copper (II) in hydroalcoholic solutions cognac brandies: Formation of symmetrical and unsymmetrical dialkyltrisulfides*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44 (12), 3935-3938.
- 30 LAWRENCE E.C., COLE E.R., 1972. Institute of Brewing. Proceedings of the 12<sup>th</sup> Convention.
- 31 HYSERT D.W., MORRISON N.M., 1976. *Sulfate metabolism during fermentation*. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 34(1), 25-31.
- 32 JIRANEK V., LANGRIDGE P., HENSCHKE P.A., 1995. *Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing Saccharomyces cerevisiae strains by assimilable nitrogen*. Applied and Environmental Microbiology, 61, 461-467.
- 33 THOMAS D., BARDEY R., SURDIN-KERJAN Y., 1990. *Gene-enzyme relationship in the sulfate assimilation pathway of Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 138, 2021-2028.
- 34 THOMAS D., BARDEY R., HENRY D., SURDIN-KERJAN Y., 1992. *Physiological analysis of mutants of Saccharomyces cerevisiae impaired in sulfate assimilation*. Journal of General Microbiology, 138, 2021-2028.
- 35 SMITH F.W., HAWKESFORD M.J., PROSSER I.M., CLARKSON D.T., 1995. *Isolation of cDNA from Saccharomyces cerevisiae that encodes a high affinity sulfate transporter at the plasma membrane*. Molecular and General Genetics, 247, 709-715.
- 36 BRETON A., SURDIN-KERJAN Y., 1977. *Sulfate uptake in Saccharomyces cerevisiae: biochemical and genetic study*. Journal of Bacteriology, 132, 224-232.
- 37 HANSEN J., KIELLAND-BRANDT M.C., 1996. *Mini review. Modification of biochemical pathways in industrial yeasts*. Journal of Biotechnology, 49, 1-12.
- 38 COOPER A.J.L., 1983. *Biochemistry of sulfur-containing amino acids*. Annual Review of Biochemistry, 52, 187-222.
- 39 MEHDI K., 2000. *Contribution à l'étude du rôle physiologique et métabolique du glutathion et de la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase en réponse au stress de la carence azotée chez la levure, Saccharomyces cerevisiae*. Thèse ULB.
- 40 ONO B.-I., KIJIMA K., ISHII N., KAWATO T., MATSUDA A., PASZEWSKI A., SHINODA S., 1996. *Regulation of sulfate assimilation in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 12, 1153-1162.
- 41 SODA K., 1987. *Microbial sulfur amino acids: an overview*. Methods in Enzymology, 143, 453-459.
- 42 VOS P.J.A., GRAY R.S., 1978. *The origin and control of hydrogen sulfide during fermentation of grape must*. Am. J. Enol. Vitic., 30, 187-197.
- 43 GIUDICI P., KUNKEE R.E., 1994. *The effect of nitrogen deficiency and sulfur-containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts*. Am. J. Enol. Vitic., 45, 107-112.
- 44 RANKINE B.C., 1963. *Nature, origin, and prevention of hydrogen sulphide aroma in wines*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 14, 79-91.
- 45 WAINWRIGHT T., 1971. *Origin and control of undesirable sulphur compounds in beer*. European Brewing Convention, Proceedings of the 13th Congress, Estoril.
- 46 STRATFORD M., ROSE A.H., 1985. *Hydrogen sulfide production from sulfite by Saccharomyces cerevisiae*. Journal of General Microbiology, 131, 1417-1424.
- 47 PRABHAKARARAO K., NICHOLAS D.J.D., 1969. *Sulfite reductase from bakers' yeast: a haemoflavoprotein*. Biochimica and Biophysica Acta, 180, 253-263.
- 48 PEPPARD T.I., 1978. *Dimethyltrisulphide, its mechanism of formation in hop oil and effect on beer flavour*. Journal of the Institute of Brewing, 84, 337-340.
- 49 WILLIAMS R.S., GRACEY D.E.F., 1982a. *Beyond Dimethyl Sulfide: The Significance to Flavor of Thioesters and Polysulfides in Canadian Beers*. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 40(2), 68-71.
- 50 WILLIAMS R.S., GRACEY D.E.F., 1982b. *Factors Influencing the Levels of Polysulfides in Beer*. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 40(2), 71-74.
- 51 PEPPARD T.I., LAWS D.R.J., 1979. *Hop derived sulphur compounds and their effect on beer flavour*. European Brewing Convention, Proceedings of the 17th Congress, Berlin, 91-104.
- 52 GIJS L., CHEVANCE F., JERKOVIC V., COLLIN S., 2002. *How low pH can intensify  $\beta$ -damascenone and dimethyl trisulfide through aging*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 5612-5616.
- 53 CHEVANCE F., GUYOT-DECLERCK C., DUPONT J., COLLIN S., 2002. *Investigation of the  $\beta$ -damascenone level in fresh and aged commercial beers*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 3818-3821.
- 54 BLOCK E., 1985. *The chemistry of garlic and onions*. Scientific American, 3, 94-103.
- 55 GIJS L., PERPETE P., TIMMERMANS A., COLLIN S., 2000. *3-Methylthiopropionaldehyde as precursor of dimethyl trisulfide in aged beers*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 6196-6199.
- 56 GIJS L., COLLIN S., 2002. *Effect of the reducing power of a beer on dimethyltrisulfide production during aging*. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 60(2), 68-70.