

REACTIONS CHIMIQUES ET ENZYMATIQUES PRODUCTRICES D'AROMES AU BRASSAGE

Sonia COLLIN, Sophie NOEL

Université Catholique de Louvain
Laboratoire de Brasserie et des Industries Alimentaires
Place Croix du Sud, 2 bte 7
B-1348 Louvain-la-Neuve

INTRODUCTION

Le rôle de l'oxygène au brassage est encore sujet à de nombreuses controverses. Faut-il à tout prix réduire la quantité d'oxygène apportée par la farine et l'eau à l'empâtage, voire même limiter les teneurs dans la cuve de brassage? Même si l'oxygène est un gaz relativement soluble (constante de Henry faible), le moût restera plus longtemps protégé en raison de l'inertie du système.

La plupart des objectifs visés à l'étape du brassage peuvent être atteints quelles que soit l'atmosphère gazeuse appliquée au système. C'est le cas de la protéolyse assurée par les protéinases et les carboxypeptidases, de la liquéfaction et de la saccharification réalisés par les α - et β -amylases, de la décomposition des β -glucanes par les β -glucanases ou de la création d'un pouvoir tampon par la phytase.

La présence d'oxygène va pourtant modifier fortement les caractéristiques du moût. La polyphénoloxydase va faire chuter le pouvoir réducteur du moût, modifier sa couleur et son astringence tout en augmentant la stabilité colloïdale de la bière produite. L'oxydation de protéines SH et de pentosanes va influencer la structure de l'oberteig à la filtration.

Diverses réactions oxydatives vont également être à l'origine d'un changement de saveur. Dans le cadre de cette communication, nous nous intéresserons tout particulièrement à l'arôme de papier-carton issu de l'oxydation des lipides et à celui de pain cuit/noisette associé à la présence de pyrazines.

1. L'AROME DE PAPIER-CARTON

Le trans-2-nonénel

En 1970, Jamieson et Van Gheluwe furent les premiers à

attribuer la saveur de papier carton présente dans une bière vieillie au trans-2-nonénel. En 1974, Wang et Siebert démontrent qu'aucune participation synergique d'autres composés n'est nécessaire pour percevoir cette note aromatique. A une concentration de 0,05 à 0,1 ppb dans la bière, ce sont les odeurs de papier, de carton et d'oxydé qui sont perçues (Palamand et Hardwick, 1969; Jamieson et Van Gheluwe, 1970; Wang et Siebert, 1974b; Meilgaard, 1975). A 0,2 ppb, les notes de papier, papier mouillé et carton plus prononcées deviennent désagréables (Palamand et Hardwick, 1969).

A des concentrations encore plus élevées, la saveur du trans-2-nonénel est décrite par les descripteurs de commerce (Drost et al, 1971) et de goût de savon (Jamieson et Van Gheluwe, 1970). Le nonénel pur est défini par une saveur plaisante de feuilles vertes, de fleurs et de fruits (Meilgaard et Moya, 1970).

Une caractéristique importante du trans-2-nonénel est son seuil de perception. Il est, comme pour la plupart des aldéhydes, de 2 à 3 ordres de grandeur inférieurs à celui de l'alcool correspondant (Meilgaard, 1975). Parmi les alcénals, le trans-2-nonénel a le seuil de perception le plus bas; il a été estimé récemment à 0,03 ppb dans la bière (Cfr Tableau I).

Tableau I. Seuils de perceptions du trans-2-nonénel.

Seuil de perception	Source
0,3 ppb	Palamand et Hardwick, 1969
0,3 - 0,5 ppb	Meilgaard et Moya, 1970
0,05 - 0,5 ppb	Jamieson et Van Gheluwe, 1970
0,1 ppb	Meilgaard, 1975
0,12 ppb	Meilgaard, 1982
0,035 ppb	Meilgaard, 1993

Concentrations du trans-2-nonénal dans la bière

Le trans-2-nonénal est présent dans la bière fraîche en très faible concentration (de l'ordre de 0,03 ppb selon Wang et Siebert, 1974 a; 0,04 ppb selon Meilgaard, 1993). Au cours du vieillissement de la bière, le trans-2-nonénal, comme tous les autres alcénals, augmente significativement. Dans des bières ayant subi un vieillissement accéléré (traitement à 38°C pendant 6 jours) où le goût de papier carton est présent, la concentration en nonénal atteint 0,2 ppb (Wang et Siebert, 1974 b; Drost & al, 1990) - 0,5 ppb (Vande Meersshe & al, 1983). Comme le décrit la Figure 1., les concentrations en trans-2-nonénal après un vieillissement naturel de 6 mois sont de l'ordre de 0,10 - 0,22 ppb (Drost & al, 1990).

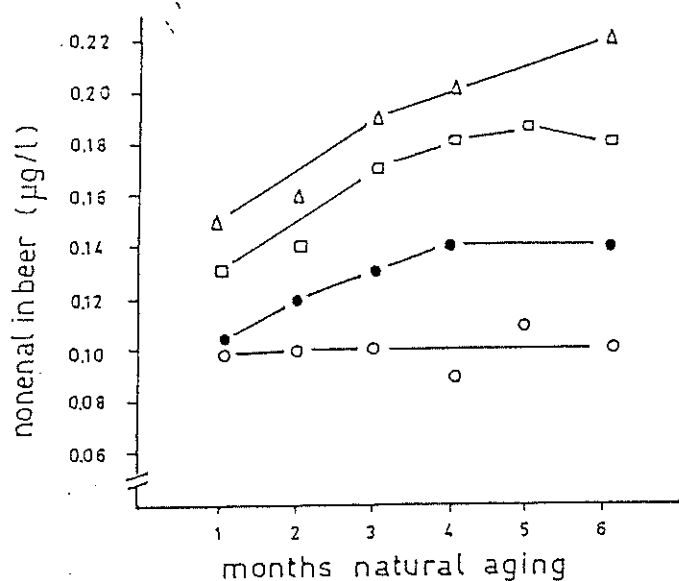


Figure 1. Evolution des teneurs en trans-2-nonénal au cours d'un vieillissement naturel dans différentes brasseries; d'après Drost & al (1990).

Le gros risque de comparer des données de la littérature provient du fait que les teneurs mesurées dépendent beaucoup de la méthode utilisée. En effet, une fraction non négligeable du trans-2-nonénal est sous une forme liée (complexes sulfiteux...). Des méthodes d'extraction plus draconiennes, avec modifications éventuelle du pH, mèneront à des teneurs plus élevées. Les techniques d'analyses les plus couramment utilisées font appel à la chromatographie liquide haute pression (dérivatisation avec la 2,4 dinitrophénylhydrazine (Greenhoof & Wheeler, 1981; Wang & Siebert, 1974 a) ou la dansylhydrazine (Verhaegen & al, 1987)), à la chromatographie gazeuse (dérivatisation en oximes (Barker & al, 1989)) ou à la chromatographie bidimensionnelle (Strating & al, 1979). L'extraction préalable peut s'opérer par distillation sous vide (Currie & al, 1990) ou entraînement au gaz et piégeage (Bonte & al, 1994).

Voies de formation du trans-2-nonénal dans la bière

Les mécanismes d'apparition du trans-2-nonénal au cours du vieillissement de la bière sont encore largement contestés à l'heure actuelle. De nombreuses informations contradictoires circulent dans la littérature quant à l'im-

portance de l'oxygène sur cette production.

Owades (1966) a montré qu'après un vieillissement naturel de 8 mois en présence d'oxygène 18 qu'il avait introduit dans le col de la bouteille, 65% des tannins, 5% des isohumulones et 30% des composés carbonyles (analysés sous forme de dérivés 2,4 DNP hydrazones) étaient marqués. Ces résultats, pris comme référence dans le domaine de la brasserie, indiquent que les composés carbonyles sont impliqués dans les phénomènes d'oxydation de la bière au niveau de leur chaîne latérale.

D'après Nordlöv & Winnell (1983), la mauvaise stabilité du goût d'une bière type pils provient principalement de sa faible teneur en bisulfites. L'addition de SO₂ à une bière vieillie diminue en effet la concentration en aldéhydes libres (Pessa, 1971; Hashimoto, 1972). L'apparition du goût de carton pendant le vieillissement est considérablement retardée quand ces bières sont traitées avec du bisulfite (Nordlöv & Winnell, 1983). La complexation du SO₂ avec les composés carbonyles est réversible (Burroughs & Sparks, 1973; Barker, 1983). Le nonénal peut être relibéré par oxydation des sulfites (Gracey & al, 1984; Nordlöv & Winnell, 1983; Drost & al, 1990), par fixation du bisulfite à de l'acétaldéhyde (Barker & al, 1983; Nordlöv & Winnell, 1983; Gracey & al, 1984), ou encore par une élévation de la température ou une augmentation du pH (Nordlöv & Winnell, 1983).

Vande Meersshe & al (1983) indiquent que la teneur en trans-2-nonénal dans la bière est la résultante de deux réactions, l'une de synthèse, l'autre de dégradation. La réaction de production est fonction de la température (Dupire, 1990). En effet, le traitement thermique à 100°C pendant 4 heures d'une bière acidifiée à pH 2 mène à de grandes quantités de trans-2-nonénal (Meilgaard & Moya, 1970; Wohleb & al, 1972). Le goût de papier se développera d'autant plus rapidement que la bière aura été conservée plus chaude immédiatement après son soutirage. Les bières insuffisamment refroidies après pasteurisation en bouteille auront aussi une tendance à vieillir prématurément. La lumière est également déterminante pour la vitesse et l'amplitude des réactions qui interviennent dans la formation du trans-2-nonénal. Ces informations mettent en évidence l'importance des conditions de conservation de la bière (Vande Meersshe & al, 1983). En ce qui concerne la dégradation, Lillard & Day (1964) ont montré que le trans-2-nonénal est légèrement instable en solution aqueuse et, surtout, facilement oxydé pour donner des aldéhydes saturés de courtes chaînes et de l'acide nonénoïque. Meilgaard & Moya (1970) et Idota et al (1993) suggèrent que le trans-2-nonénal présent dans la bière vieillie est continuellement formé à partir d'un précurseur et simultanément dégradé durant le stockage. La disparition du trans-2-nonénal permet un effacement progressif du goût de papier après un vieillissement prolongé. Cette phase correspond à la dégradation du trans-2-nonénal mais aussi d'autres aldéhydes lourds (>C9), en aldéhydes de plus courtes chaînes (Vande Meersshe & al, 1983). Les études réalisées dans notre laboratoire confirment que le trans-2-nonénal de la bière fraîche ne peut survivre au vieillissement en l'absence de sulfites. Un composé de dégradation majeur a été identifié.

Jusque dans les années 80, seules des synthèses de novo d'aldéhydes dans la bière avaient été proposées. Parmi elles, retenons les dégradations de Strecker des acides aminés (Wheeler & al, 1971; Blockmans & al, 1975; Hashimoto and Kuroiwa, 1975), la dégradation oxydative des isohumulones (Hashimoto, 1976), l'oxydation des alcools supérieurs par les mélanoidines (Hashimoto 1972) les condensations aldoliques (Drost & al, 1971; Hashi-

moto and Kuroiwa, 1975; Stenroos & al, 1976) et l'autooxydation des acides gras (Gracey & al, 1984). La contribution de chacune d'elles dans l'apparition de saveurs de "vieux" sous des conditions normales de stockage de la bière restaient indéterminées (Hashimoto & Eshima, 1977).

Depuis lors, Laws et Peppard (1982) ont montré que les composés produits par dégradation de Strecker ou par dégradation oxydative des isohumulones sont des aldéhydes de C4 à C7; ces réactions ne contribuent donc pas directement à la formation de trans-2-nonéanal au cours du vieillissement.

D'autre part, l'oxydation des alcools est lente dans une bière maintenue à l'obscurité. En présence de lumière et de riboflavine, la réaction peut devenir très rapide à condition que l'on soit en absence de polyphénols (Blockmans & al, 1975). De plus, l'oxydation des alcools supérieurs à haut poids moléculaire est plus lente et des concentrations importantes en éthanol inhibent la réaction (Barker & al, 1983). Tous ces éléments indiquent que dans la bière, il est improbable que l'oxydation de nonanol soit à l'origine de la formation de carbonylés tel que le trans-2-nonéanal (Devreux & al, 1981).

Selon Hashimoto and Kuroiwa (1975), les composés carbonylés de faible poids moléculaire peuvent être soumis à une condensation aldolique dans un milieu comme la bière. Par exemple, l'heptanal peut donner du trans-2-nonéanal en présence de proline et d'acétaldéhyde; la proline y joue le rôle de catalyseur basique. Depuis, les faibles rendements observés dans des réactions modèles de ce type ont remis en question cette voie de formation du nonéanal dans la bière (Hashimoto and Kuroiwa, 1975; Barker & al, 1983).

La dégradation oxydative des lipides présents dans la bière, 0,03% des lipides des matières premières (Drost & al, 1990), est inhibée par des antioxydants tels que les polyphénols de sorte qu'il s'agit aussi d'une voie de synthèse du nonéanal sujette à controverses (Kaneda & al, 1990). Aucune augmentation de trans-2-nonéanal n'est par ailleurs observée après addition d'acide linoléique dans la bière (Wheeler, 1984).

Les études visant à comprendre les mécanismes d'apparition du trans-2-nonéanal au cours du vieillissement de la bière sont orientées aujourd'hui dans la recherche de précurseurs produits au cours du processus de fabrication.

Production de précurseurs du trans-2-nonéanal au maltage et au brassage

Selon Meilgaard & al (1971) et Tressl & al (1979), la majeure partie des composés carbonylés proviendrait des matières premières. Ils seraient issus de l'oxydation des lipides durant le maltage. La lipoxygénase étant la principale enzyme impliquée dans l'oxydation des lipides et des acides gras (Gardner, 1988), les propriétés enzymatiques et l'activité lipoxygénasique de plusieurs malts ont été analysées et mises en relation avec le vieillissement de la bière. Une corrélation a été établie entre l'activité lipoxygénasique du malt et le nonéanal dans la bière vieillie (Wakaura & al, 1994). La mesure du "nonéanal potential" (défini comme la capacité d'un malt à former du nonéanal à pH 4 pendant 2 heures à 100°C) est proposée par Drost & al (1990) comme un bon indicateur du vieillissement de la bière produite. Celui-ci serait corrélé à l'activité lipoxygénasique du malt. Idota & al (1993) montrent, par contre, qu'il n'y a pas de relation entre le "nonéanal poten-

tial" (protocole différent utilisant l'eau oxygénée) d'un malt et son activité lipoxygénasique.

L'oxydation des acides gras insaturés du malt est également considéré comme le mécanisme principal contribuant à la formation de trans-2-nonéanal durant les premiers stades du brassage (Drost & al, 1990; Kobayashi & al, 1993 a). La réaction d'oxydation peut être enzymatique ou chimique (autooxydation) (Gardner, 1988; Kobayashi & al, 1993 c) (Cfr Figure 2).

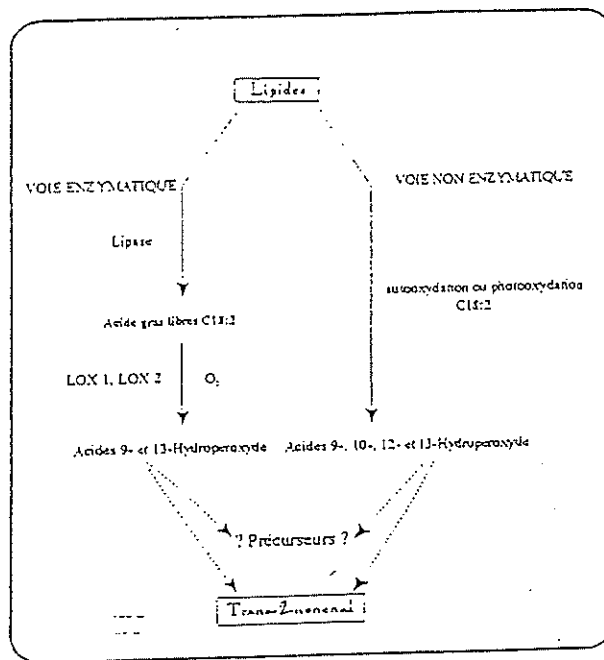


Figure 2. Schéma de l'oxydation des acides gras appliqué à l'acide linoléique.

La réaction d'oxydation par voie enzymatique fait intervenir les lipoxygénases du malt (Letters, 1992). Deux isoenzymes, la LOX 1 (lipoxygénase A) et la LOX 2 (lipoxygénase B), y ont été identifiées et caractérisées (Yabuuchi, 1976; Schwarz et Pyler, 1984; Abbas & al, 1989; Martel & al, 1991). La LOX 1, déjà présente dans le grain non malté (Lulai & Baker, 1975), a un pH optimum déterminé par plusieurs auteurs entre 5,9 et 7,8 (Gardner, 1988). Yabuuchi (1976) a évalué le point isoélectrique à 4,75-4,90. L'enzyme a une température optimale d'action de 45°C et reste relativement stable jusqu'à 50°C (Lulai & Baker, 1975). Par ailleurs, la LOX 2 est synthétisée au cours du maltage (Yabuuchi, 1976). Son pH optimum est évalué à 7-7,5 et son point isoélectrique est de 6,6 (Yabuuchi, 1976). La LOX 2 est thermiquement moins stable que la LOX 1 (Yabuuchi, 1976). La LOX 1 est l'origine de l'acide 9-hydroperoxyde (90%) tandis que la LOX 2 donne préférentiellement l'acide 13-hydroperoxyde (90%) (Schwarz et Pyler, 1984; Yabuuchi, 1976). Le mécanisme incriminé est présenté à la Figure 3.

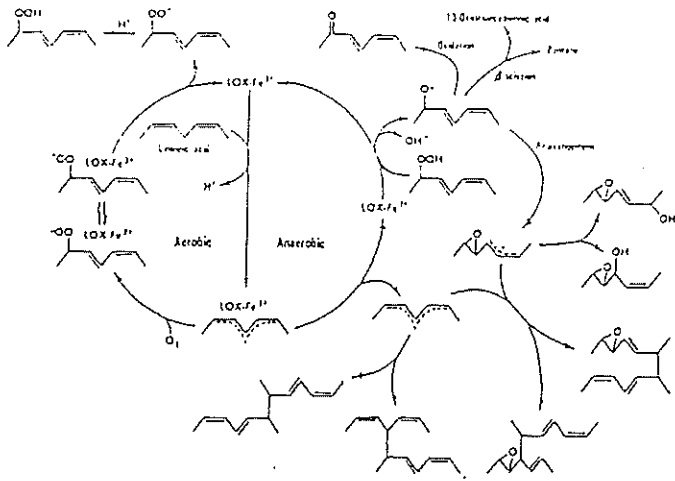


Figure 3. Formation des hydroperoxydes par voie enzymatique (Gardner, 1988).

Une fois les hydroperoxydes formés, ceux-ci peuvent se dégrader par voie radicalaire, par réarrangement hydroperoxyde (Kamimura et Kaneda, 1992; Kobayashi & al, 1993 a) ou sous l'action d'enzymes tel que l'hydroperoxyde lyase (peu présente dans le malt) pour former divers aldéhydes ou autres structures (Drost & al, 1990). Le 9-hydroperoxyde de l'acide linoléique mènera ainsi au trans-2-nonéanal.

Martel & al (1991) soulignent néanmoins que les acides gras polyinsaturés ne sont pas disponibles aux températures où la lipooxygénase a une activité optimale. Selon Kobayashi & al (1993 b), la lipooxygénase et la lipase du malt jouent pourtant un rôle important dans la production des hydroperoxydes durant le brassage.

L'auto-oxydation des acides gras mène aux mêmes composés d'oxydation que la voie enzymatique (Drost & al, 1971). Ce mécanisme ne nécessite cependant pas un acide gras à méthylène central. La réaction radicalaire inclut une étape d'initiation (favorisée par la présence de métaux, de lumière, de température...), une étape de propagation (étape limitante, favorisée lorsque l'acide gras contient des insaturations) et une étape de terminaison. Les hydroperoxydes formés, très instables, vont à nouveau rapidement se décomposer, notamment en aldéhydes (Drost & al, 1990; Kamimura et Kaneda, 1992; Kobayashi & al, 1993 a).

La majorité du trans-2-nonéanal formé ainsi au cours du brassin va disparaître. Selon Currie & al (1990), des 16 ppb mesurés en début de brassage il ne reste que 0,9 ppb avant la filtration. Une diminution des teneurs en trans-2-nonéanal a également été observée lors d'un brassin effectué sous azote; la concentration finale était néanmoins légèrement plus élevée. L'oxygène joue donc un rôle important dans l'évolution des concentrations des composés carbonyles insaturés. Son effet sur la stabilité résultante de la bière semble cependant très complexe (Ohtsu & al, 1986).

Présents en faible quantité dans le grain non malté (Drost & al, 1990), les hydroperoxydes sont produits comme nous venons de le voir par autooxydation et par oxyda-

tion enzymatique des acides gras insaturés (Gardner, 1988) dans les premiers stades du maltage et au brassage. La quantité d'hydroperoxydes formés peut être corrélée avec l'activité lipooxygénasique du malt (Wakaura & al, 1994). Ces composés, vu leur instabilité, peuvent difficilement jouer le rôle de précurseurs du trans-2-nonéanal dans la bière finie. Selon Drost (1990), ils se transforment au stade de l'ébullition et de la fermentation. Wakaura & al (1994) ont récemment montré que leur concentration diminue déjà au cours du brassage pour atteindre des valeurs nulles en fin de saccharification.

La transformation du 9-hydroperoxyde de l'acide linoléique en trans-2-nonéanal nécessite le passage par une structure non conjuguée: le cis-3-nonéanal (Visser & Lindsay, 1971; Wheeler, 1984; Drost & al, 1990). Sakuma & Kowaka (1994) ont montré que cette structure n'était déjà plus présente dans la bière fraîche, et qu'elle ne pouvait, dès lors, être le précurseur du goût de papier des bières vieilles.

Parmi les composés de dégradation des hydroperoxydes d'acides gras, il est également intéressant de mentionner les acides trihydroxy. Le malt contient de faibles quantités de ces acides. Ils sont principalement synthétisés durant le brassage sous l'action des lipooxygénases et de la "flour isomérase" (Drost & al, 1974; Vande Meersshe & al, 1983; Letters, 1992). L'acide 9-hydroperoxyde, produit principalement sous l'action de la LOX 1, constitue la source majeure d'acide 9, 12, 13-trihydroxy. L'acide 13-hydroperoxyde, en plus faible quantité dans le moût et produit principalement par la LOX 2, mènera à l'acide 9, 10, 13-trihydroxy (Yabuuchi, 1976; Vande Meersshe & al, 1983). Le mécanisme de transformation est proposé à la Figure 4. Les composés trihydroxy ne semblent pas être

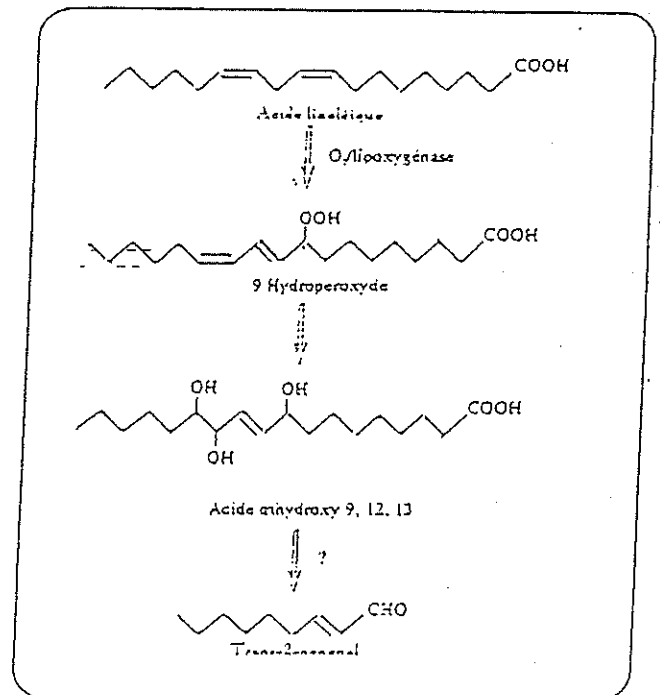
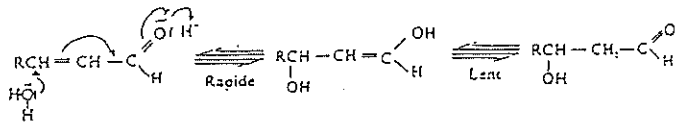


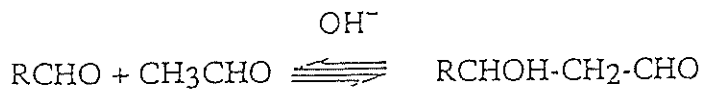
Figure 4. Transformation des hydroperoxydes (Gardner, 1988).

dégradés significativement lors de l'ébullition du moût (Letters, 1992), ni réduits en fermentation (Smillie, 1992). Drost & al (1971) suggèrent que les acides trihydroxylés de la bière fraîche, pourraient être précurseurs du trans-2-nonéanal, suite à une dégradation oxydative s'opérant dans la bouteille (Devreux & al, 1981). Ce rôle de précurseur est contesté par d'autres auteurs. Même si après une ébullition à pH 2, les acides trihydroxy produisent de grandes quantités de nonéanal, l'ébullition à pH 4 (pH de la bière) ne permet pas, quant à elle, d'en relibérer (Stenroos & al, 1976). Par ailleurs, comment expliquer que plusieurs ppm d'acides trihydroxy ne mèneraient qu'à des dixièmes de ppb de trans-2-nonéanal? (Drost & al, 1974).

Les 2-alcénals coexistent dans le malt, le moût et la bière avec les 3-hydroxyalcanals (Gracey & al, 1984). Meilgaard isolait en 1971 le 3-hydroxybutanal et deux autres hydroxyalcanals dans une bière acidifiée et traitée à la chaleur (2 heures à 100°C). Barker & al (1983) ont identifié le 3-hydroxynonanal dans un moût et dans un distillat de bière. Gracey & al (1984) relèvent également la formation d'aldols durant la production du moût à haute température. Dupire (1993) n'observe, par contre, aucune différence dans le comportement des alcanals et alcénals, indiquant qu'il n'y a ni hydratation des alcénals et alcadiénals, ni rétroaldolisation, durant la montée en température du moût avant l'ébullition. L'hydratation des 2-alcénals est favorisée en solution légèrement acide. Une étape rapide d'addition 1-4 de l'eau est suivie d'un réarrangement catalytique acide plus lent pour donner les 3-hydroxyalcanals (Gracey & al, 1984). La proportion des composés hydratés augmente avec la longueur de la chaîne de l'alcénal. Après 10 jours en solution aqueuse, à 20°C et à pH 4, 95% du trans-2-nonéanal serait transformé en hydroxynonanal (Gracey & al, 1984; Dupire, 1990).



Les 3-hydroxyalcanals sont également connus comme dérivés de la condensation aldolique de l'acétaldéhyde et d'un alcanal. Il s'agit d'un processus réversible. Cette voie de formation d'aldol à partir d'aldéhydes à courtes chaînes serait plus lente que celle à partir de l'alcénal (Gracey & al, 1984).



Les hydroxyalcanals se lient aux sulfites avant les 2-alcénals (Barker & al, 1983). C'est de cette manière que l'hydroxynonéanal pourrait passer la fermentation et être précurseur du trans-2-nonéanal dans la bière. La complexation est envisageable si l'on admet que la forme hydratée est plus résistante à l'activité levurienne (Gracey & al, 1984). L'oxydation du SO₂ lors du vieillissement de la bière libérerait le 3-hydroxynonanal, précurseur du trans-2-nonéanal dans la bière par crotonisation (Barker & al, 1983). Lillard & Day (1964) et Wohleb & al (1972) indiquent que le trans-2-nonéanal est oxydé en milieu modèle en acide

nonénoïque. Ces acides, s'ils sont formés au cours du brassage par oxydation du moût, seraient susceptibles d'être réduits en trans-2-nonéanal lors de la fermentation ou par des antioxydants présents dans la bière tels que les polyphénols.

II. L'AROME DE PAIN CUIT/NOISETTE

Les pyrazines

Les réactions de Maillard sont habituellement définies comme étant des réactions non enzymatiques et non oxydatives. Une première étape menant à la synthèse du composé d'Amadori (cétose amine) utilise l'acide aminé comme catalyseur. Une énoisation 1,2 ou 2,3 du composé d'Amadori permet alors la formation de divers α-dicarbonylés susceptibles de se déshydrater (synthèse de 5-hydroxyméthylfurfural, de furanone, d'isomaltol...) ou de se fragmenter (synthèse de diacétyl...). Toutes les dicétones conjuguées issues des réactions de Maillard ou provenant d'une activité microbienne peuvent participer à la dégradation de Strecker bien connue dans le moût puisqu'à l'origine des nombreux aldéhydes branchés. Cette dégradation va également mener à la formation d'aminocétones, précurseurs des pyrazines (Figure 5). Dans le cas particulier de la formation des pyrazines, la condensation de deux aminocétones est suivie d'une étape oxydative.

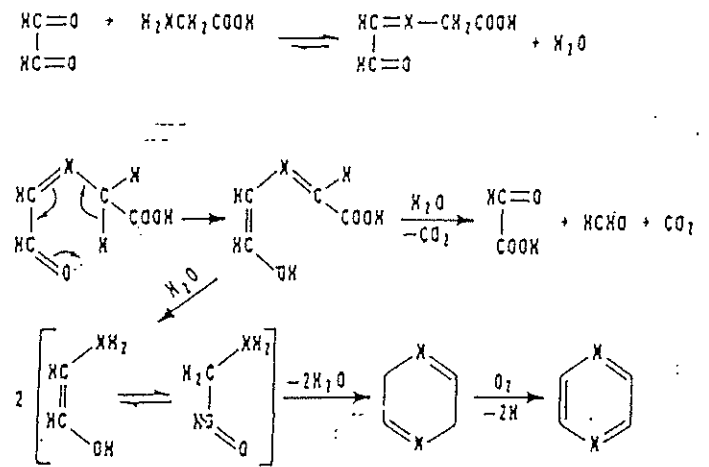


Figure 5. Synthèse des pyrazines par voie thermique.

La structure des pyrazines influence leurs propriétés olfactives. La taille, la lipophilie et la polarité de la molécule, la nature et la longueur des groupements fonctionnels modifient considérablement l'odeur de ces composés. Principalement deux notes olfactives sont associées aux pyrazines: la note "verte" et l'arôme de "noisette/pain cuit". Une étude fondamentale menée dans notre laboratoire nous a montré que seuls les hétérocycles suffisamment lipophiles pouvaient se lier à des protéines olfactives solubles (OBP) et exhiler un arôme de verdure (Hérent & al, 1994).

Les pyrazines sont des molécules très intéressantes en raison de leur seuil de perception extrêmement bas (jusqu'au ppt) (Shibamoto, 1986; Takken & al, 1975).

Les pyrazines en brasserie

Divers composés hétérocycliques azotés, oxygénés et soufrés sont produits par réaction de Maillard dans le malt. Les teneurs sont plus élevées dans des malts de type "caramel" ou torréfiés (Fors & Eriksson, 1985; Narziss & al. 1986; Narziss, 1990; Seaton, 1987; Walker & Westwood, 1993). Bien que la biosynthèse des alkoxy-pyrazines soit bien connue dans de nombreuses plantes (Gallois, 1984; Maga & Sizer, 1973; Murray & Whitfield, 1975), aucune information de ce type n'est disponible sur l'orge ou le malt.

Au brassage, la condensation des aminopyrazines devrait se poursuivre si la température atteint 70°C. Peu de données sont cependant disponibles quant au rôle de l'oxygène. Les pyrazines vont encore être synthétisées à l'ébullition, surtout si l'on travaille sous pression (Eyben, 1992). Heureusement, il s'agit de composés relativement volatils de sorte que la majorité des pyrazines vont se retrouver dans le condensat (Narziss & al, 1986). L'étape de clarification sera par conséquent cruciale.

A l'inverse des composés carbonylés, la levure ne peut pas réduire les teneurs en pyrazines, si ce n'est par adsorption. Au contraire, *S. cerevisiae* synthétise des hétérocycles azotés tels que la tétraméthylpyrazine (Gallois, 1984; Rizzi, 1988).

A l'instar de ce qui s'est passé il y a quelques années dans le domaine des aldéhydes, ils'avère aujourd'hui indispensable de disposer de méthodes d'analyse des hétérocycles azotés plus performantes pour évaluer l'impact des alkyl- et alkoxy-pyrazines sur la flaveur des bières fraîches (Viro, 1984) et des bières vieilles (Quershi, 1979), et ce en relation avec la présence d'oxygène dans les différentes étapes de la production.

CONCLUSION

Avec l'évolution des connaissances du processus brassicole, le brasseur est aujourd'hui en mesure de maîtriser la majorité des caractéristiques de son produit. La recherche fondamentale reste pourtant prometteuse dans le domaine des arômes où les améliorations apportées aux méthodes d'analyse laissent entrevoir la possibilité de suivre de nouvelles familles de molécules odorantes au travers des différentes étapes de production de la bière. Une évaluation sérieuse de l'impact de paramètres tels que la teneur en oxygène au brassage sur les propriétés organoleptiques de la bière requiert de nombreuses études complémentaires qui présagent un avenir passionnant pour le chercheur.

REFERENCES

- ABBAS J., ROUET-MAYER M. and LAURIERE C.: Lipoxygenase isoenzymes of french bean pericarp: separation, characterization and chlorophyll-bleaching activity. *Phytochemistry*, 1989, 28 (4), 1019-1024.
- BARKER R.L., GRACEY D.E.F., IRWIN A.J., PIPASTS P. and LEISKA E.: Liberation of staling aldehydes during storage of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 1983, 89, 411-415.
- BARKER R.L., PIPASTS P. and GRACEY D.E.F.: Examination of beer carbonyls as their oximes by gas chromatography - mass spectrometry. *J. Amer. Soc. Brew. Chem.*, 1989, 47 (1), 9-14.
- BLOCKMANS C., DEVREUX A. et MASSCHELEIN C.A.: Formation de composés carbonylés et altération du goût de la bière. *European Brewery Convention, Proceedings of the 15th Congress*, 1975, 699-713.
- BONTE S., DUPIRE S. and DEGELIN L.: Rapid and sensitive method for the analysis of free trans-2-nonenal in beer. Poster presented during the 60th Amer. Soc. Brew. Chem. annual meeting, 1994.
- BURROUGHS L.F. and SPARKS A.H.: Sulfite - binding power of wines and ciders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1973, 24, 187-198.
- CURRIE B.R., KULANDAI J., FITZROY M.D., HAWTHORNE D.B. and KAVANAGH T.E.: Processing influences on the stability of packaged beer. *Proceedings 21st Conv. Inst. Brew.*, 1990, 117-125.
- DEVREUX A., BLOCKMANS C. and VANDE MEERSHE: Carbonyl compounds formation during aging of beer. *European Brewery Convention, Monograph. VII*, 1981, 191-201.
- DROST B.W., VAN EERDE P., HOEKSTRA S.F. and STRATING J.: Fatty acids and staling of beer. *European Brewery Convention, Proceedings of the 13th Congress*, 1971, 451-458.
- DROST B.W., DUIDAM J., HOEKSTRA S.F. and STRATING J.: Role of individual compounds in beer staling. *MBAA Technical Quarterly*, 1974, 11 (2), 127-134.
- DROST B.W., VAN DEN BERG R., FREIJEE F.J.M., VAN DER VELDE E.G. and HOLLEMANS M.: Flavor stability. *J. Amer. Soc. Brew. Chem.*, 1990, 48 (4), 124-131.
- DUPIRE S.: Evolution des composés identifiables au cours du vieillissement de la bière: les esters et les produits carbonylés. *Louvain Brewing Letters*, 1/2, 1990, 41-50.
- DUPIRE S.: Application des techniques d'analyse à la gestion de la flaveur de la bière. *Cerevisia & Biotechnology*, 1993, 18 (3), 53-63.
- EYBEN D.: Comparaison des systèmes d'ébullition: Aspects qualitatifs. *Chaire J.-De Clerck V*, 1992.
- FORS M. and ERIKSON E.: Pyrazine composition in extruded and conventionally processed malt, in *Amino-carbonyl reactions in food and biological systems*, Ed. Elsevier, Japan, 1985.
- GALLOIS A.: Les pyrazines présentes dans les aliments. *Sciences des aliments*, 1984, 4, 145-166.
- GARDNER H.W.: Lipoxygenase pathway in cereals. *Advances in Cereal Science and Technology*, 1988, X, 161-165.
- GRACEY D., BARKER R., IRWIN A., PIPASTS P. and LEISKA E.: Chemical equilibria of beer flavour stability. *Proceedings of the 18th convention of the Institute of Brewing*, 1984, 50-58.
- GREENHOFF K. and WHEELER R.E.: Analysis of beer carbonyls at the part per billion level by combined liquid

- chromatography and HPLC. *Journal of the Institute of Brewing*, 1981, 86, 35-41.
- HASHIMOTO N.: Oxidation of higher alcohols by melanoidins. *Journal of the Institute of Brewing*, 1972, 78, 43-51.
- HASHIMOTO N.: Stale flavor derived from higher alcohols and isohumulones in beer. Report of the Research Laboratories of Kirin Brewery CO., LTD., 1976, 19, 1-8.
- HASHIMOTO N. and ESHIMA T.: Composition and pathway of formation of stale aldehydes in bottled beer. *J. Amer. Soc. Brew. Chem.*, 1977, 35 (3), 145-150.
- HASHIMOTO N. and KUROIWA Y., Proposed pathways for the formation of volatile aldehydes during storage of bottled beer. *J. Amer. Soc. Brew. Chem.*, 1975, 33 (3), 104-111.
- HERENT M-F., COLLIN S. and PELOSI P.: Affinities of nutty and green-smelling pyrazines and thiazoles to odorant-binding proteins, in relation with their lipophilicity. Submitted to *Chemical Senses*, 1994.
- IDOTA Y., NOHARA K. and KAMIYA T.: Difference in trans-2-nonenal - Forming potential in brewing malts. MBAA International convention, 1993.
- JAMIESON A.M. and VAN GHELUWE J.E.A.: Identification of a compound responsible for cardboard flavour in beer. *Amer. Soc. Brew. Chem. Proceedings*, 1970, 192-197.
- KAMIMURA M. and KANEDA H.: Off-flavours in beer, in OFF- Flavors in foods and beverages, Ed G. Charalambous, 1992, 433-471.
- KANEDA H., KANO Y., KAMIMURA M., OSAWA T. and KAWASKISHI S.: Analysis of long chain fatty acids in beer by HPLC-Fluorescence detection method. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38, 1363-1367.
- KOBAYASHI N., KANEDA H., KANO Y. and KOSHINO S.: Determination of fatty acid hydroperoxides produced during the production of wort. *Journal of the Institute of Brewing*, 1993 a, 99, 143-146.
- KOBAYASHI N., KANEDA H., KANO Y. and KOSHINO S.: The production of linoleic and linolenic acid hydroperoxides during mashing. *Journal of the fermentation and bioengineering*, 1993 b, 76 (5), 371-375.
- KOBAYASHI N., KANEDA H., KANO Y. and KOSHINO S.: Lipid oxidation during wort production. *European Brewery Convention, Proceedings of the 24th Congress*, 1993 c, 44, 405-412.
- LAWS D.R.J. and PEPPARD T.: The stability of flavour constituents in alcoholic beverages. *Food chemistry*, 1982, 9, 131-146.
- LETTERS R.: Lipids in brewing, friend or foe? *Ferment*, 1992, 5(4), 268-274.
- LILLARD D.A. and DAY E.A.: Degradation of monocarbonyls from autoxydizing lipids. *J. Am. Oil Chemists Soc.*, 1964, 41, 549-552.
- LULAI E.C. and BAKER C.W.: Physicochemical characterization of barley lipoxigenase. *Cereal Chemistry*, 1975, 53 (5), 777-786.
- MAGA J.A. and SIZER C.E.: Pyrazines in foods. A review. *J. Agric. Food Chem.*, 1973, 21 (1), 22-30.
- MARTEL C., KOHL S. and BOIVIN P.: Lipoxigenase: origine, évolution et conséquence dans la filière malterie-brasserie. *European Brewery Convention, Proceedings of the 23th Congress*, 1991, 425-432.
- MEILGAARD M.C.: Flavor chemistry of beer: Part II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. *MBAA Technical Quarterly*, 1975, 12 (3), 151-168.
- MEILGAARD M.C.: Prediction of flavor differences between beers from their chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1982, 30, 1009-1017.
- MEILGAARD M.C.: Individual differences in sensory threshold for aroma chemicals added to beer. *Food Quality and Preference*, 1993, 4, 153-167.
- MEILGAARD M.C., AYMA M. and RUANO J.I.: A study of carbonyl compounds in beer. IV. Carbonyl compounds identified in heat-treated wort and beer. *Amer. Soc. Brew. Chem. Proceedings*, 1971, 29, 219-229.
- MEILGAARD M. and MOYA E.: A study of carbonyl compounds in beer - Background and literature review. *MBAA Technical Quarterly*, 1970, 7 (3), 135-149.
- MURRAY K.E. and WHITFIELD F.B.: The occurrence of 3-Alkyl-2-methoxypyrazines in raw vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1975, 26, 973-986.
- NARZISS L.: Spezialmalze als Sortimentsbereicherung. *Brauwelt*, 1990, 6, 178-184.
- NARZISS L., MIEDANER H., SCHWILL-MIEDANER A. and SCHMIDT R.: Nitrogen-heterocyclic compounds in malt, during wort production and in different beers. *Cerevisiae*, 1986, 3, 121-134.
- NORDLOV H. and WINELL B.: Beer flavor stabilization by interaction between bisulfite and trans-2-nonenal. *European Brewery Convention, Proceedings of the 19th Congress*, 1983, 271-278.
- OHSTU K., HASHIMOTO N., INNOUE K. and MIYAKI S.: Flavor stability of packaged beer in relation to the oxidation of wort. *Brewers digest*, 1986, 13-21.
- OWADES J.L. and JAKOVAC J.: Study of beer oxidation with O¹⁸. *Amer. Soc. Brew. Chem. Proceedings*, 1966, 180-183.
- PALAMAND S.R. and HARDWICK W.A.: Studies on the relative flavor importance of some beer constituents. *MBAA Technical Quarterly*, 1969, 6 (2), 117-128.
- PESSA E.: Variations in the acetaldehyde content of beer. *European Brewery Convention, Proceedings of the 13th Congress*, 1971, 333-342.

- QUERSHI A.A., BURGER W.C. and PRENTICE N.: Polyphenols and pyrazines in beer during aging. *J. Amer. Soc. Brew. Chem.*, 1979, 37 (4), 161-163.
- RIZZI G.P.: The biogenesis of food-related pyrazines. *Food Reviews International*, 1988, 4 (3), 375-400.
- SAKUMA S. and KOWAKA M.: Flavor characteristics of cis-3-nonenal in beer. *J. Amer. Soc. Brew. Chem.*, 1994, 52 (2), 37-41.
- SCHWARZ P.B. and PYLER R.E.: Lipxygenase and hydroperoxide isomerase activity of malting barley. *J. Amer. Soc. Brew. Chem.*, 1984, 42 (2), 47-53.
- SEATON J.C.: Malt types and beers. Communication at the European Brewery Convention, Proceedings of the 21th Congress, 1987.
- SHIBAMOTO T.: Odor threshold of some pyrazines. *Journal of Food Science*, 1986, 51 (4), 1098-1099.
- SMILLIE R.H., JONES R.D., HAWTHORNE D.B. and KAVANAGH T.E.: The availability of fatty acids in wort. Proceedings 22nd Conv. Inst. Brew., 1992, 48-51.
- STENROOS L., WANG P., SIEBERT K. and MEILGAARD M.: Origin and formation of 2-nonenal in heated beer. *MBAA Technical Quarterly*, 1976, 13 (4), 227-232.
- STRATING J., WESTRA W.M., VERHAGEN L.C. and SLOTEMA F. Ph.: Trace analysis of trans-2-nonenal in beer by two dimensional high resolution gas chromatography. *MBAA Technical Quarterly*, 1979, 16 (4), 176-181.
- TAKKEN H.J., VAN DER LINDE L.M., BOELENS M. and VAN DORT J.M.: Olfactive properties of a number of polysubstituted pyrazines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1975, 23 (4), 638-642.
- TRESSL R., BAHRI D. and SILWAR R.: Bildung von aldehyden durch lipidoxidation und deren bedeutung als "off-flavour" komponenten in bier. European Brewery Convention, Proceedings of the 17th Congress, 1979, 27-43.
- VANDE MEERSSE J., BLOCKMANS C., DEVREUX A. and MASSCHELEIN C.A.: Formation de trans-2-nonénal par photo-oxydation des acides octadécénoïques hydroxylés. European Brewery Convention. Proceedings of the 19th Congress, 1983, 19, 525-532.
- VERHAEGEN L.C., STRATING J. and TJADEN U.R.: Analysis of E-2-nonenal in beer at the ultra trace level by HPLC using precolumn derivatization and column switching techniques. *Journal of Chromatography*, 1987, 393, 85-96.
- VIRO M.: Heterocyclic nitrogen compounds in whisky and beer. *Chromatographia*, 1984, 19, 448-451.
- VISSER M.K. and LINDSAY R.C.: Ester precursors of aldehydes associated with staling of beer. *MBAA Technical Quarterly*, 1971, 8 (3), 123-128.
- WAKAURA M., FURUSAWA C., HARAYAMA K., MORI T. and YABUUCHI S.: Effect of malt lipxygenase on beer flavor stability. Poster presented at the 60th Amer. Soc. Brew. Chem. Annual Meeting, 1994.
- WANG P.S. and SIERBERT K.J.: Determination of trans-2-nonenal in beer. *MBAA Technical Quarterly*, 1974 a, 11 (2), 110-117.
- WANG P.S., SIERBERT K.J.: The influence of various storage conditions on the formation of 2-nonenal in bottled beer. Proceedings of Amer. Soc. Brew. Chem., 1974 b, 47-49.
- WALKER M.D. and WESTWOOD K.T.: Postfermentation adjustment of beer quality using extracts from specially malts. *J. Amer. Soc. Brew. Chem.*, 1993, 50 (1), 4-9.
- WHEELER R.E.: The role of aldehydes in maturation, conditions of factors affecting flavour stability in beer. European Brewery Convention, Proceedings of the 13th Congress, 1971, 423-435.
- WHOLEB R., JENNINGS W.G. and LEWIS M.J.: Some observations on trans-2-nonenal in beer as determined by a headspace sampling technique for gas-liquid chromatography. Proceedings of Amer. Soc. Brew. Chem., 1972, 1-3.
- YABUUCHI S.: Occurrence of a new lipoxigenase isoenzyme in germinating barley embryos. *Agr. Biol. Chem.*, 1976, 40 (10), 1987-1992.