



## Le houblonnage à cru des bières spéciales belges est bien plus qu'une simple dissolution des composés aromatiques du houblon

Sonia Collin\*, Sabrina Nizet, Jacques Gros

Unité de brasserie et des industries alimentaires, Earth and Life Institute ELIM, Faculté d'Ingénierie biologique, agronomique et environnementale, Université catholique de Louvain, Croix du Sud, 2 bte L7.05.07, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

### ARTICLE INFO

#### Mots clés :

houblonnage à cru  
glucosidase  
terpènes  
linalool  
citronellol  
thiols polyfonctionnels

#### Keywords:

dry hopping  
glucosidase  
terpenes  
linalool  
citronellol  
polyfunctional thiols

### ABSTRACT

Le suivi de tanks de garde d'une production industrielle montre que les arômes du houblon se solubilisent dans la bière dès les deux premières semaines du processus de houblonnage à cru (cas du linalool, du myrcène et de l'acide 3-méthylbutanoïque). Par contre, trois semaines sont nécessaires pour la production de molécules odorantes issues de glycosides du houblon (4-vinylsyringol, citronellol, *bé*ta-damascénone). De nombreux arômes soufrés (thiols polyfonctionnels) aux odeurs de fruits exotiques sont également libérés. Le procédé de houblonnage à cru se révèle donc bien plus complexe qu'une simple solubilisation des huiles essentielles du houblon, surtout si la période de maturation est prolongée.

© 2011 the Associations of the Former Students of the Belgian Brewing Schools. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### Introduction

Les variétés de houblon se différencient sur base de leur contenu en acides  $\alpha$ . C'est à l'ébullition que leurs humulones vont être isomérisées en acides iso- $\alpha$ , responsables de l'amertume de la bière mais aussi de la stabilité de la mousse et du pouvoir bactériostatique du houblon (Lermusieau et Collin, 2002). Outre les acides  $\alpha$ , le houblon renferme un potentiel odorant exceptionnel, ainsi que de nombreux polyphénols (flavanoïdes, prénylchalcones, stilbènes, acides phénoliques...) (Collin *et al.*, 2011).

Dans un procédé de houblonnage classique, très peu d'arômes de la bière préexistent, tels quels, dans le houblon. Les composés les plus volatils sont entraînés par les vapeurs d'ébullition ou par le gaz carbonique libéré durant la fermentation. Les composés les plus apolaires sont également éliminés par adsorption sur le trub, la levure, les parois des cuves et les matériaux filtrants. De nombreuses transformations chimiques (à l'ébullition) et enzymatiques (en fermentation) réduisent encore les chances de retrouver les molécules intactes dans la bière finie (Murray *et al.*, 1987; Seaton *et al.*, 1982).

Ainsi, bien que le bergamotène et le farnésène soient utilisés pour discriminer les variétés fines de houblon comme le Saaz (Lermusieau et Collin, 2001), ces terpènes sont

organoleptiquement inactifs dans la bière finie. Si quelques rares molécules aux odeurs agréables (acétate de géranyl, humuladiénone, ...) sont suspectées de participer à l'arôme « noble hop » de bières houblonnées au Saaz, ces dernières se distinguent surtout par de faibles teneurs en composés soufrés aux notes olfactives agressives (diméthyldisulfure, diéthylsulfure, ...) (Lermusieau *et al.*, 2001).

Lorsque le houblonnage est effectué tardivement en chaudière d'ébullition (late-hopping), voire même dans le Whirlpool, les molécules organoleptiquement les plus actives de la bière houblonnée sont le 3-méthyl-2-butène-1-thiol (MBT, odeur épicée de houblon), le linalool (odeur de coriandre), la  $\beta$ -damascénone (odeur de fruits rouges, de compote de pomme), le diméthyltrisulfure (odeur d'oignon), le cinnamate d'éthyle (odeur de fraise) et la  $\gamma$ -nonalactone (odeur de noix de coco) (Lermusieau *et al.*, 2001). Des études très récentes montrent par ailleurs un rôle majeur des thiols polyfonctionnels dans l'arôme houblonné de la bière (Gros *et al.*, 2011). Des variétés comme le Tomahawk (super-alpha, USA) ou le Nelson Sauvin (Nouvelle-Zélande) peuvent générer des arômes citronnés, de Sauvignon ou de fruit de la passion. A nouveau, les molécules impliquées ne sont que très minoritairement présentes dans le houblon, l'ébullition et la fermentation jouant un rôle décisif sur leur formation.

L'ajout de houblon après fermentation principale est connu sous le nom de houblonnage à cru (dry-hopping) (Daenen *et al.*, 2009). Un arôme plus proche de celui du houblon est ainsi

\* Corresponding author.

E-mail address: [sonia.collin@uclouvain.be](mailto:sonia.collin@uclouvain.be) (S. Collin).

attendu (Steinhaus et Schieberle, 2000). Toutefois, les mono- et sesqui- terpènes (myrcène, humulène,) sont très lipophiles, rendant leur solubilisation difficile, même dans un milieu hydro-alcoolique. Par ailleurs, étant donné que les cônes ou pellets (100–300 g/hl) sont habituellement ajoutés durant la maturation, on ne peut pas exclure que les molécules du houblon soient transformées par la levure après solubilisation (King et Dickinson, 2000).

L'objectif de cette étude était d'évaluer la contribution des molécules nouvellement générées par le procédé de dry-hopping comparativement à celles préexistant dans le houblon. Forts de ces données, des conclusions ont été tirées quant aux paramètres clés à optimiser.

## Matériel et méthodes

**Echantillons.** Les échantillons de bières en cours de maturation ont été produits industriellement.  $T_0$  est prélevé avant houblonnage à cru ;  $T_{14}$  et  $T_{21}$ , correspondent à 14 et 21 jours de houblonnage à cru.

**Produits chimiques.** Le diéthyl ether (99.9%), le dodécane (99.9%), l'acide p-hydroxymercuribenzoïque (pHMB), l'HCl 37%, le 3-sulfanyl-3-méthylbutan-1-ol (3S3MBol) et le 3-méthyl-2-butène-1-ol (3MBOH) ont été fournis par Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium). Le 4-méthoxy-2-méthylbutan-2-thiol (IST), le 3-méthyl-2-butène-1-thiol (MBT) et le thiazole proviennent d'Oxford Chemicals (Oxford, UK). Le dichlorométhane (99.9%), fourni par Romil (Cambridge, UK), a été distillé deux fois avant utilisation. Le méthanol est obtenu chez Analar Normapur (Fontenay-sous-bois, France). La résine amberlite XAD 2 est fournie par Supelco (Bellefonte, PA) (pores, 9 nm; surface spécifique, 330 m<sup>2</sup>/g). La résine Dowex fortement basique (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) est stockée dans du HCl 0.1 M. Le sulfate de sodium anhydre a été fourni par Merck (Darmstadt, Germany) et le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris) par USB (Cleveland, Ohio, USA).

**Extraction des arômes de la bière (Lermusieau et al., 2001).** La résine XAD 2 est préalablement lavée durant 4 heures par du diéthyl ether dans un appareil de Soxhlet. La même opération est répétée en présence de méthanol. Après lavage, celle-ci est stockée dans du méthanol à 4 °C. Chaque extraction a été réalisée en double. La bière à dégager est versée dans un erlenmeyer d'un litre dont l'embouchure est ensuite fermée à l'aide d'un papier Parafilm. L'erlenmeyer est placé dans un sonicateur pendant environ une minute. Avant d'être utilisée, la résine est rincée avec de l'eau ultrapure (mQ) dans un fritté relié à un büchner. 2 g de résine sont placés dans un flacon Schott de 100 mL contenant 50 mL de bière pré-traitée durant 2 heures (200 rpm). La colonne destinée à accueillir la résine est remplie d'un lit de billes capables de retenir celles-ci. Les billes sont lavées successivement par 2 fois 50 mL d'eau mQ, 50 mL d'acétone et 2 fois 50 mL d'éther diéthylique. La résine est alors transférée dans la colonne. Elle est rincée avec 4 fois 25 mL d'eau milliQ. L'élution des molécules se fait par 2 portions de 20 mL d'éther. L'éluat est séché par du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre. 500 µL de dodécane (20 ppm) sont alors ajoutés à l'extrait avant concentration jusqu'à 500 µL dans un bain d'eau maintenu à 39 °C. Les extraits concentrés sont conservés à -80 °C jusqu'à injection.

**Extraction des thiols polyfonctionnels par le pHMB (Tomimaga et al., 1998).** 500 ml de bière sont mis en contact avec 200 ml de dichlorométhane bidistillé et 0,5 ml de standard interne sont ajoutés au mélange (= 2-sulfanyl-4-méthoxy-2-méthylbutane, 67 ppm préparé dans l'éthanol – concentration calculée pour l'échantillon de bière = 0,67 ppb). Après 30 minutes d'agitation magnétique, l'ensemble est centrifugé une première fois dans des tubes en pyrex à 3500 tr/min, afin de séparer grossièrement la phase aqueuse du solvant. A ce stade, seuls la phase organique et le liquide blanchâtre situé à l'interface sont récoltés. Ils sont centrifugés à 7500 tr/min. de manière à casser l'émulsion résiduelle. La phase

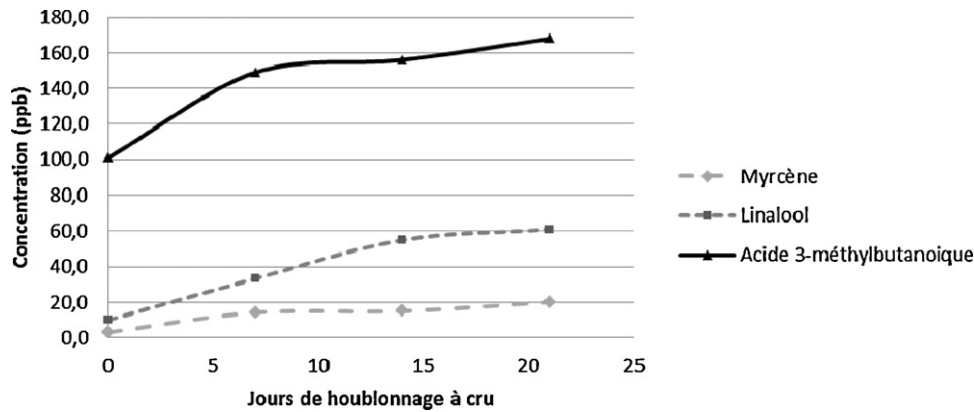
limpide est ensuite extraite par 2 x 20 ml d'une solution aqueuse de pHMB (360 mg de pHMB et 24,6 g de TRIS pour un litre d'eau) et ce, pendant 5 minutes puis 10 minutes. Les phases mercuriques retenant les thiols sous forme de complexes sont rassemblées et déposées en tête de la colonne échangeuse d'ions (1,5 x 3 cm de résine échangeuse d'anions préalablement activée par le passage successif de 50 ml de NaOH 2 M, d'eau mQ, de 50 ml de HCl 2 M, et encore d'eau mQ). Le tout est alors lavé par 50 ml d'acétate de sodium (0,1 M – pH 6). Les thiols sont, quant à eux, libérés par la percolation de 60 ml d'une solution de cystéine (640 mg – pH 7,5) préalablement lavée par 2 x 5 ml de dichlorométhane bidistillé (5 minutes). L'éluat est récupéré dans une fiole de 100 ml, et extrait par 4 puis 3 ml de dichlorométhane bidistillé. Les phases organiques rassemblées dans un tube à essai sont alors séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, puis concentrées (volume final = 500 µl) dans un Kuderna-Danish. 1 ml de standard externe (solution de thiazole 0,1996 ppm préparée dans du dichlorométhane bidistillé – concentration calculée dans l'extrait = 399,2 ppb) est ajouté à la solution avant cette concentration. Une concentration plus poussée dans un appareil de Dufton peut également être appliquée. L'extrait obtenu est analysé en chromatographie gazeuse.

**Chromatographie gazeuse couplée à un détecteur olfactif (GC-O).** 1 µL de l'extrait XAD 2 a été analysé sur un chromatographe Chrompack CP9001 équipé d'un injecteur splitless maintenu à 250 °C (split ouvert 0,5 min après injection). Les composés ont été séparés sur une colonne apolaire Wall Coated Open Tubular (WCOT) CP-Sil5-CB (50 m x 0,32 mm i.d., épaisseur du film de 1,2 µm). L'azote fut utilisé comme gaz vecteur à une pression de 50 kPa. La programmation de température était la suivante: de 36 à 85 °C à 20 °C/min, de 85 à 145 °C à 1 °C/min, de 145 à 250 °C à 3 °C/min, avec un palier final de 30 min. Pour étudier le potentiel olfactif de l'extrait, la colonne a été connectée au port olfactométrique maintenu à 250 °C. L'effluent est dilué par un volume d'air préalablement humidifié dans une solution de sulfate de cuivre. Le facteur de dilution FD définit le nombre de fois que l'on peut diluer l'extrait initial avant de faire disparaître l'odeur en sortie de colonne.

**Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse à impact électronique (GC-MS).** L'ionisation des composés se fait par impact électronique (EI, 70 eV). Le spectromètre MS est connecté à un chromatographe ThermoFinnigan Trace GC 2000 équipé d'un injecteur splitless. La colonne chromatographique et la programmation de température sont identiques à celles décrites pour la GC-O. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à une pression de 100 kPa. Le traitement des données est réalisé par Xcalibur, par comparaison aux spectres de masse de la banque NIST.

**Chromatographie gazeuse couplée à un détecteur photométrique à flamme pulsée (PFPD).** 2 µL d'extrait pHMB sont analysés sur un chromatographe ThermoFinnigan Trace GC 2000 équipé d'un injecteur splitless maintenu à 250 °C (ouverture du split après 0,5 min) et d'un détecteur O.I. Analytical PFPD, modèle 5380. La colonne chromatographique et la programmation de température sont identiques à celles décrites pour la GC-O. Le gaz vecteur est l'hélium (90 kPa). Les paramètres du détecteur sont les suivants : 250 °C, 600 V, H<sub>2</sub> : 8,5 ml/minute, air 1 : 8,7 ml/minute, air 2 : 10,8 ml/minute, fréquence relative à la pulsation de la flamme: 3,45 Hz.

**Identification et quantification.** L'identification MS a été faite par comparaison des spectres de masse expérimentaux avec ceux obtenus pour des standards commerciaux injectés dans les mêmes conditions et/ou présents dans la banque NIST. La comparaison des indices de rétention (obtenus par l'injection d'alcanes dans les mêmes conditions chromatographiques) et l'odeur permettent de confirmer ou non la présence de la molécule. Dans le cas du PFPD, l'injection de thioesters (Khan et al., 1999) permet le calcul des



**Figure 1.** Evolution des teneurs en acide 3-méthylbutanoïque (a), en myrcène (b) et en linalool (c) durant le processus de houblonnage à cru (productions industrielles, moyenne sur trois tanks de garde).

indices de rétention. La quantification des molécules est faite en standard externe équivalents (dodécane).

### Résultats et discussion

Les contenus de trois tanks de garde (17-20 millions de cellules de levures) soumis à un houblonnage à cru (300 g/hl de cônes de houblon) ont été suivis durant 21 jours à 15 °C. Les molécules odorantes présentes dans les échantillons ont été extraites sur une résine XAD 2 avant analyse chromatographique (détecteur olfactométrique et spectrométrie de masse) (Tableau 1). Notons d'ores et déjà une grande similitude d'évolution du profil aromatique dans chaque tank malgré des contenances nominales différentes (100 hl et deux fois 230 hl).

Une série de molécules odorantes voient leur concentration croître durant les trois semaines de maturation de la bière, indépendamment du processus de houblonnage à cru (acides hexanoïque et décanoïque/odeurs de fromage et de bougie, furanéol/odeur de barbe à papa.). Dans cette publication, nous nous intéresserons toutefois uniquement aux substances résultant de l'ajout de houblon.

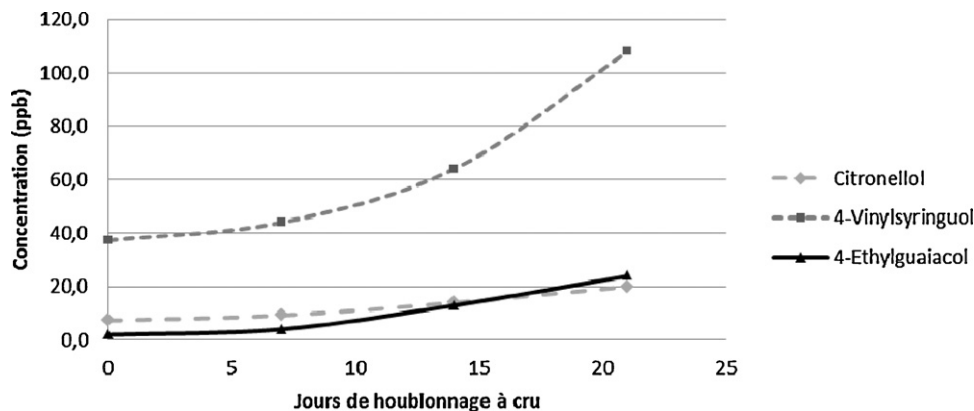
Comme l'indique la Figure 1, des arômes présents dans le houblon se solubilisent dès les deux premières semaines de garde. Ainsi, 17 ppb de myrcène, 52 ppb de linalool et 67 ppb d'acide 3-méthylbutanoïque sont apportés dans la bière, ramenant leur concentration à des valeurs voisines de leur seuil de perception (respectivement de 13, 20 et 120 ppb). On ne s'étonnera dès lors pas de retrouver des odeurs typiques de fromage et de coriandre dans les bières produites. La dernière semaine de fermentation

secondaire apporte à ces trois molécules une contribution tout à fait négligeable.

D'autres molécules ne voient, par contre, leur concentration croître que sur la fin du processus de houblonnage à cru (Figure 2). C'est le cas du citronellol (apport de 13 ppb supplémentaires; seuil de perception = 15 ppb), du 4-vinylsyringol (apport de 71 ppb; seuil de perception = 500 ppb) et du 4-éthylguaicol (apport de 22 ppb; seuil de perception = 130 ppb). Il ne s'agit plus cette fois d'une simple solubilisation des huiles essentielles du houblon. Nous démontrons ici que les enzymes levuriennes jouent aussi un rôle dans le houblonnage à cru. Le phénomène d'autolyse accélère très certainement ce processus.

Pour le citronellol et le 4-vinylsyringol (non retrouvés tels quels dans les variétés de houblon utilisées), nous suspectons la présence dans le houblon de précurseurs de type bêta-glucoside (Figure 3). Le caractère hydrophile du sucre permet d'améliorer le transfert vers la bière. La libération de l'aglycone se produit ensuite, lorsque l'autolyse libère petit à petit des bêta-glucosidases. Callemien *et al.* (2006) ont suggéré que ces mêmes glucosides pouvaient expliquer l'augmentation des teneurs en 4-vinylsyringol lors du vieillissement de la bière.

Une fraction de l'acide 3-méthylbutanoïque pourrait ne pas provenir de la simple solubilisation des huiles essentielles, mais bien de l'hydrolyse d'un précurseur bêta-glucosyl ester. Ce type de lien est effectivement susceptible d'être attaqué, à l'instar d'un glucoside traditionnel, par les bêta-glucosidases de la levure (Kiso *et al.*, 2000). Ce mécanisme permettrait d'expliquer l'augmentation encore significative de l'odeur de fromage après refermentation (390 ppb quantifiés dans la bière finie).



**Figure 2.** Evolution des teneurs en citronellol (a), en 4-vinylsyringol (b) et en 4-éthylguaicol (c) durant le processus de houblonnage à cru (productions industrielles, moyenne sur trois tanks de garde).

**Tableau 1**

Indices de rétention (IR), ions majoritaires en spectrométrie de masse, descripteurs odorants, seuils de perception et teneurs des composés aromatiques retrouvés dans une bière soumise au houblonnage à cru.

IR CPSi15	Composés	Odeurs	Tank 1 (100hl)						Tank 2 (230hl)			Tank 3 (230hl)			3 ions majoritaires en GC-MS m/z	Seuils de perception ppb, (a) dans la bière, (b) dans l'eau	
			T 0J		T 14J		T 21J		T 0J	T 14J	T 21J	T 0J	T 14J	T 21J			
			C (ppb)	FD	C (ppb)	FD	C (ppb)	FD	C (ppb)	C (ppb)	C (ppb)	C (ppb)	C (ppb)	C (ppb)			C (ppb)
			bière		bière		bière		bière	bière	bière	bière	bière	bière			bière
730	isobutylacétate	banane, fruité	11	128	39	512	40	>1024	14	52	49	12	51	56	43, 56, 73	510 <sup>a</sup> (Saison <i>et al.</i> , 2009)	
774	éthylbutyrate	banane, fruité	105	512	51	>1024	42	>1024	83	58	50	95	59	42	71, 43, 88	1 <sup>b</sup> (Schieberle <i>et al.</i> , 1991)	
812	acide 3-méthylbutanoïque	fromage	101	512	144	512	139	>1024	101	162	180	101	172	186	60, 43, 87	120 <sup>a</sup> (Meilgaard, 1982)	
852	isoamylacétate	banane, bonbon	1512	128	800	128	460	>1024	1220	802	434	1188	826	452	43, 70, 55	500 <sup>a</sup> (Meilgaard, 1982)	
921	acide 4-méthylpentanoïque	fromage	4	<128	8	<128	10	512	3	8	10	4	11	12	57, 74, 73	810 <sup>a</sup> (Meilgaard, 1982)	
957	acide hexanoïque	léger fromage	603	512	953	512	961	>1024	625	1088	1097	632	1122	1129	60, 73, 41	8500 <sup>a</sup> (Meilgaard, 1982)	
974	acide 2-méthyl-2-pentenoïque	verdure, acide	17	<128	27	<128	28	512	16	24	25	18	24	25	69, 41, 114	9300 <sup>b</sup> (Scnabel <i>et al.</i> , 1988)	
982	béta-myrcène	citron, sucré	5	<128	16	<128	21	<128	2	16	18	2	15	21	41, 93, 69	13 <sup>a</sup> (Meilgaard, 1982)	
1018	phénylacétaldéhyde	sucré, miel, bonbon	10	<128	15	<128	22	512	11	14	27	12	14	25	91, 92, 62	105 <sup>a</sup> (Saison <i>et al.</i> , 2009)	
1088	linalool	citron	17	<128	55	>128	59	>1024	6	54	60	6	56	64	71, 93, 41	20 <sup>a</sup> (Kaltner <i>et al.</i> , 2003)	
1101	béta-phényléthanol	rose	10672	512	7532	512	6185	>1024	11785	7789	6350	11852	7924	6221	91, 92, 65	47900 <sup>a</sup> (Sega <i>et al.</i> , 1967)	
1226	citronellol	citronné, frais	8	<128	13	<128	20	512	7	14	19	7	15	21	41, 69, 82	1700 <sup>a</sup> (Meilgaard, 1982)	
1260	4-éthylguaïacol	épice	1	ND	12	ND	25	>1024	2	13	24	2	13	23	137, 152, 122	130 <sup>a</sup> (Meilgaard, 1975a, 1975b), Wackerbauer, 1982)	
1294	4-vinylguaïacol	clou de girofle	348	<128	432	<128	514	>1024	357	441	509	359	452	506	135, 150, 107	300 <sup>a</sup> (Meilgaard, 1975a, 1975b)	
1532	4-vinylsyringol	dentiste	35	<128	62	<128	103	512	39	68	105	38	63	117	180, 165, 132	500 <sup>a</sup> (Meilgaard, 1975a, 1975b)	

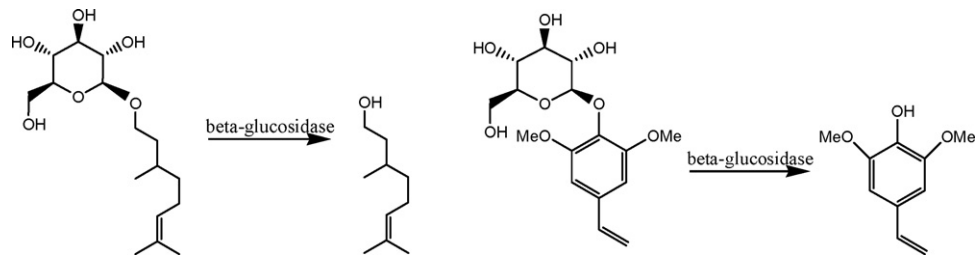


Figure 3. Voie de formation du citronellol et du 4-vinylsyringol au départ de leurs glucosides.

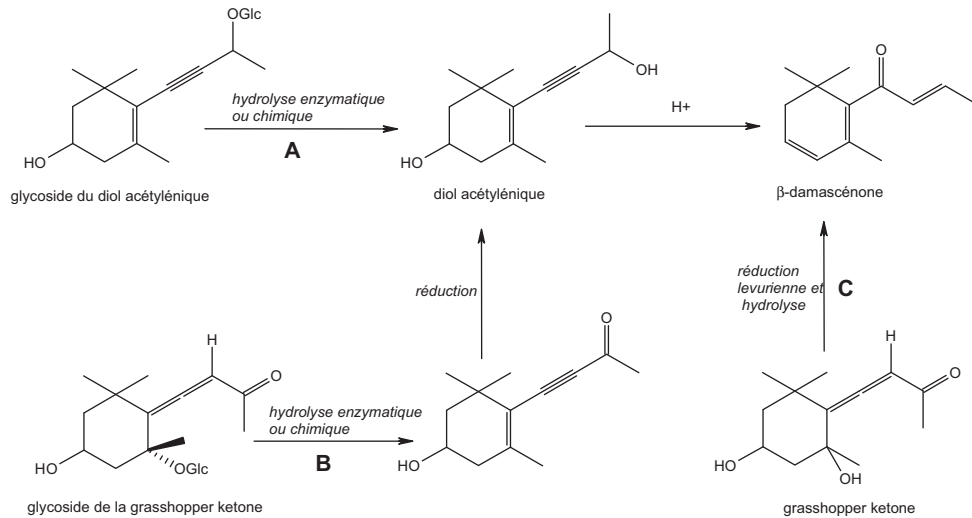


Figure 4. Voie de formation de la bêta-damascénone au départ de glucosides.

La GC-olfactométrie nous indique que la bêta-damascénone est également produite durant le houblonnage à cru (FD=4 dans la bière de traversage ; FD=256 après trois semaines de garde). Une quantification en mode SIM montre la présence de 21 ppb après houblonnage à cru pour un seuil de perception voisin de 10 ppb. A nouveau, des précurseurs glucosylés de la grasshopperketone sont vraisemblablement dissous, pour être ensuite transformés en molécules odorantes sous l'action d'enzymes (Figure 4).

Si d'autres microorganismes sont présents dans la suite du process (ex. : *Brettanomyces*), eux aussi peuvent apporter leur bagage enzymatique pour produire, par exemple, du 4-éthylguaiaicol (odeur d'écurie) au départ de 4-vinylguaiaicol (Figure 5).

En raison de leurs teneurs très faibles, seule la GC-olfactométrie nous a permis de constater l'impact organoleptique croissant des lactones (gamma-décalactone, delta-décalactone et dodécalactone ; odeurs de noix de coco, de pêche et d'olive, Tableau 2). Il est difficile de préciser sur base de nos données la contribution réelle du houblon dans cette production. On peut toutefois y suspecter la présence de précurseurs hydroxyacides sous forme de glucosides.

Les thiols des différents échantillons de bière ont été extraits de manière sélective avec du pHMB et injectés en chromatographie

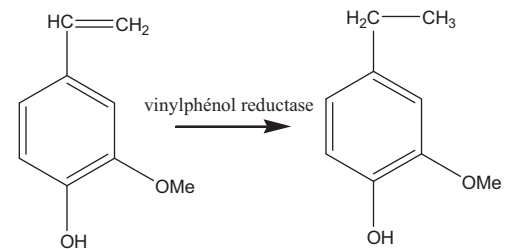


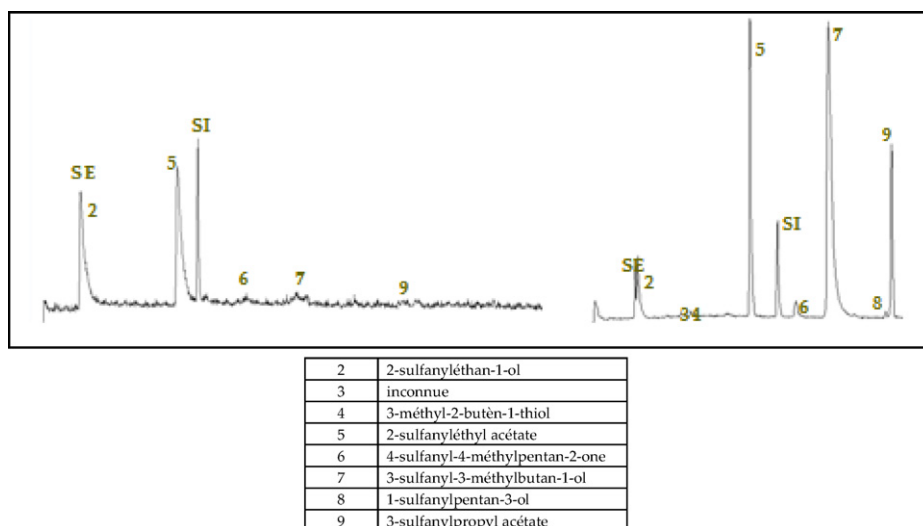
Figure 5. Voie de formation du 4-éthylguaiaicol au départ de 4-vinylguaiaicol en présence de *Brettanomyces*.

gazeuse couplée à un détecteur spécifique des composés soufrés (PFPD). Comme le montre la Figure 6, de nombreux arômes soufrés sont générés durant le houblonnage à cru. Parmi ceux-ci, on retrouve le 3-sulfanyl-3-méthylbutan-1-ol à l'arôme d'oignon. Nous pensons qu'il est issu de la réaction entre le 3-méthyl-2-butèn-1-ol présent dans le houblon et le sulfure d'hydrogène excrété par la levure (Gros et al., 2009). On notera également la présence du 3-méthyl-2-butèn-1-thiol (MBT) qui apporte un

Tableau 2

Indices de rétention (IR), ions majoritaires en spectrométrie de masse, descripteurs odorants, seuils de perception et facteur de dilution des lactones synthétisées lors du houblonnage à cru.

IR CPSi5	Composés	Odeurs	Facteurs de dilution						3 ions majoritaires en GC-MS m/z	Seuils de perception ppb (b) dans l'eau
			Tank 1 (100hl)		Tank 2 (230hl)		Tank 3 (230hl)			
			T 0J	T 21J	T 0J	T 21J	T 0J	T 21J		
1435	gamma-décalactone	coco	2	32	2	32	4	64	85, 55, 128	11 <sup>b</sup> (Engel et al., 1988)
1456	delta-décalactone	pêche	8	32	8	64	8	64	99, 71, 55	100 <sup>b</sup> (Engel et al., 1988)
1725	delta-dodécalactone	olive	4	16	4	16	4	16	85, 55, 41	10 <sup>b</sup> (Engel et al., 1988)



**Figure 6.** Chromatogrammes PFPD des extraits pHMB de bières échantillonnées après 0 et 3 semaines de houblonnage à cru (SE et SI = standards externe et interne).

caractère épicé prononcé à l'extrait malgré l'absence d'un grand pic sur le chromatogramme (seuil de perception au niveau du ppt). Gros *et al.* (2011) ont récemment montré que le houblon contenait aussi un pool important de précurseurs de thiols polyfonctionnels. A l'instar des bêta-glucosidases, on peut supposer que les bêta-lyases de la levure hydrolysent en fin de maturation des précurseurs cystéinés (molécules hydrophiles) solubilisés dans la bière en début de houblonnage à cru. Ce mécanisme expliquerait notamment la production de 4-sulfanyl-4-méthyl-pentan-2-one à l'odeur intense de buis/cassis.

En conclusion, le procédé de houblonnage à cru se révèle bien plus complexe qu'une simple solubilisation. Même si plusieurs huiles essentielles du houblon se solubilisent dès le début de la maturation, il est important de prolonger le contact avec la levure en vue de profiter des arômes houblonnés issus de l'action de bêta-glucosidases ou de bêta-lyases levuriennes. Un meilleur contrôle du houblonnage à cru requiert une sélection appropriée des microorganismes, une optimisation des conditions de culture et un contrôle strict de la température.

## Références

- Callemien, D., Dasnoy, S., Collin, S., 2006. Identification of a stale-beer-like odorant in extracts of naturally aged beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 1409–1413.
- Collin, S., Callemien, D., Timmermans, A., Brohan, M., Nizet, S., Jerkovic, V., 2011. Les polyphénols du malt, du sorgho, du houblon et de la bière. Impact du maltage des céréales, des procédés de conditionnement du houblon et des étapes de fabrication de la bière. In: *Polyphénols et procédés*, Lavoisier. Tec & Doc, France, 159–218.
- Daenen, L., Saison, D., De Schutter, D.P., De Cooman, L., Verstrepen, K.J., Delvaux, F.R., Derdelinckx, G., Verachtert, H., 2009. Bioflavoring of beer through fermentation, refermentation and plant parts addition. *Beer in Health and Disease Prevention*, 33–49.
- Engel, K.H., Flath, R.A., Buttery, R.G., Mon, T.R., Ramming, D.W., Teranishi, R., 1988. Investigation of volatile constituents in nectarine. 1. Analytical and sensory characterization of aroma components in some nectarine cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36, 549–553.
- Gros J., Nizet S., Collin, S. Hop allylic alcohols are precursors of sulfur-containing odorants in fresh beer. *Acta Horticulturae*, 273–278.
- Gros, J., Nizet, S., Collin, S., 2011. Occurrence of odorant polyfunctional thiols in the Super Alpha Tomahawk hop cultivar. Comparison with the thiol-rich Nelson Sauvin bitter variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 8853–8865.
- Kaltner, D., Steinhaus, M., Mitter, W., Biendl, M., Schieberle, P., 2003. (R)-Linalool as key flavor for hop aroma in beer and its behavior during beer staling. *Monatsschrift fuer Brauwissenschaft* 56, 192–196.
- King, A., Dickinson, J.R., 2000. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 16, 499–506.
- Kiso, T., Kitahata, S., Okamoto, K., Miyoshi, S., Nakano, H., 2000. Hydrolysis of beta-glucosyl ester linkage of p-hydroxybenzoyl beta-D-glucose, a chemically synthesized glucoside, by beta-glucosidases. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90, 614–618.
- Lermusieau, G., Bulens, M., Collin, S., 2001. Use of GC-Olfactometry to identify the hop aromatic compounds in beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3867–3874.
- Lermusieau, G., Collin, S., 2001. Varietal discrimination of hop pellets: II. Comparison between fresh and aged samples. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 59, 39–43.
- Lermusieau, G., Collin, S., 2002. Hop aroma extraction and analysis. In: *Molecular Methods of Plant Analysis – Analysis of Taste and Aroma*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 21, 69–88.
- Meilgaard, M.C., 1982. Prediction of flavor differences between beers from their chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30, 1009–1117.
- Meilgaard, M.C., 1975a. Flavour chemistry of beer; part I: Flavor interaction between principal volatiles. *MBAA Technical Quarterly* 12, 107–117.
- Meilgaard, M.C., 1975b. Flavour chemistry of beer; part II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. *MBAA Technical Quarterly* 12, 151–168.
- Murray, J.P., Westwood, K., Daoud, I., 1987. Late-hop flavour. *Proceedings of the European Brewery Convention*. IRL Press, Oxford University Press, Royaume-Uni, 321–328.
- Saison, D., De Schutter, D.P., Uyttenhove, B., Delvaux, F., Delvaux, F.R., 2009. Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. *Food Chemistry* 114, 1206–1215.
- Scnabel, K.O., Belitz, H.D., Van Ranson, C., 1988. Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung 1. Mitteilung: Wahrnehmungsschwellenwerte und Geruchsqualitäten von gesättigten aliphatischen und alicyclischen Verbindungen mit Sauerstoff-Funktion. *Z Lebensm Unters Forsch* 187, 215–223.
- Seaton, J.C., Moir, M., Suggett, A., 1982. The refinement of hop flavour by yeast action. In: *Proceedings of the 17th Conv. Inst. Brew. Australia and New Zealand Section*, pp. 117–124.
- Sega, G.M., Lewis, M.J., Woskow, M.H., 1967. Evaluation of beer flavour compounds. *Proceedings of the American Society of Brewing Chemists*, 156–164.
- Steinhaus, M., Schieberle, P., 2000. Comparison of the most odor-active compounds in fresh and dried hop cones (*Humulus lupulus* L. Variety Spalter Select) based on GC-olfactometry and odor dilution techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1776–1783.

## Recommended Reading

- Schieberle, P., 1991. Primary odorants of pale lager beer. Differences to other beers and changes during storage. *Z Lebensm Unters Forsch* 193, 558–565.
- Wackerbauer, K., Kramer, P., Siepert, J., 1982. Phenolic aromatic substances in beer. Phenolic carboxylic acid and phenols in the raw material and beer preparation. *Brauwelt* 122, 758–760.