

Utilisation d' $^{18}\text{O}_2$ pour évaluer l'impact du phénomène d'oxydation durant le brassage et le stockage de la bière

S. Collin¹, S. Noël¹, S. Bonte², N. Metais³, E. Bodart¹, F. Peladan³ & S. Dupire²

¹Université Catholique de Louvain, Unité de Brasserie et des Industries Alimentaires, Place Croix du Sud, 2 Bte 7, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

²Interbrew, Research Department, Vaartstraat 137, B-3000 Leuven, Belgium

³Tepral, Route d'Oberhausbergen 68, F-67037 Strasbourg, France

Descripteurs

Bière en bouteille, brassage, flaveur d'éventé, nonéanal-2, oxydation, oxygène

RESUME

Bien qu'il joue un rôle essentiel sur la dégradation des sulfites, des polyphénols et des isohumulones, aucune incorporation d'oxygène $^{18}\text{O}_2$, injecté dans le col de la bouteille, n'est détectée dans la fraction carbonylée, indiquant que l'arôme de carton des bières vieilles n'est pas issu de l'oxydation des lipides de la bière. Par ailleurs, l'impact de l'oxygène au brassage sur les teneurs en trans-2-nonéanal de la bière finie est étudié. Une comparaison des teneurs en trans-2-nonéanal de moûts produits sous azote, $^{16}\text{O}_2$ ou $^{18}\text{O}_2$, indique que trois voies de synthèse et deux mécanismes de dégradation influencent la concentration en alcénal des moûts avant ébullition. La mesure du potentiel nonéanal du moût filtré est un bon marqueur pour prédire le vieillissement de la bière.

The use of $^{18}\text{O}_2$ in appraising the impact of oxidation processes during mashing and beer storage

Descriptors

Bottled beer, mashing, 2-nonenal, oxidation, oxygen, stale flavour

SUMMARY

To understand the oxygen incidence in bottled beer, $^{18}\text{O}_2$ has been injected in the headspace just before ageing. Although very potent for sulfite, polyphenol and isohumulone degradations, bottled oxygen has been found not to be incorporated in the flavouring fraction, indicating that cardboard aroma is not issued from lipid oxidation. The impact of oxygen during mashing has been evidenced on the final beer. A comparison of trans-2-nonenal contents of worts produced in presence of nitrogen, $^{16}\text{O}_2$ or $^{18}\text{O}_2$ clearly indicates that three synthesis pathways and two degradation mechanisms modulate the alcenal concentration in the unboiled wort. The nonenal potential measurement after wort filtration appears to be a good indicator in predicting subsequent beer ageing.

Einsatz von $^{18}\text{O}_2$ zur Bewertung des Phänomens der Oxidation beim Brauen und bei der Lagerung von Bier

Deskriptoren

Alterungsgeschmack, Flaschenbier, Maischen, Nonenal-2, Oxidation, Sauerstoff

ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl Sauerstoff eine essentielle Rolle für den Abbau von Sulfiden, Polyphenolen und Isohumulonen spielt, ist keine Aufnahme von Sauerstoff $^{18}\text{O}_2$, der in den Flaschenhals eingespritzt wurde, in der Fraktion der Carbonyle festgestellt worden. Was zeigt, daß der Brotgeschmack von gealterten Bieren nicht von der Oxidation der Lipide im Bier herrührt. Außerdem ist der Einfluß von Sauerstoff beim Brauprozess im Hinblick auf den Gehalt an trans-2-Nonenal im Bier untersucht worden. Ein Vergleich des Gehalts an trans-2-Nonenal der Würze, hergestellt unter N_2 , $^{16}\text{O}_2$ - oder $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre, zeigt, daß drei Wege der Synthese und zwei Abbau-Mechanismen die Konzentration von Alkenal in der Würze vor dem Kochen beeinflussen. Die Messung des "Nonenal-Potentials" der abgeläuterten Würze ist ein guter Indikator, um eine Alterung des Bieres vorherzusagen.

INTRODUCTION

La stabilité des propriétés organoleptiques de la bière présente un intérêt considérable pour les brasseurs. De nombreuses recherches ont pour objectif de cerner les mécanismes impliqués dans le vieillissement du produit fini afin de contrôler, voire idéalement, neutraliser ce phénomène.

Actuellement, l'altération du goût de la bière lors de son stockage est attribuée principalement à la présence de composés carbonylés. En particulier, le trans-2-nonénal a été identifié comme composé responsable de saveurs indésirables de type papier, carton (4). Son seuil de perception est estimé à 0.035 ppb (6).

Plusieurs informations contradictoires circulent dans la littérature quant à l'impact de l'oxygène sur la synthèse de cet alcénal. De nombreux auteurs reconnaissent la présence de l'oxygène dans le col de la bouteille comme néfaste pour la sauvegarde des propriétés organoleptiques de la bière après son conditionnement. La synthèse du trans-2-nonénal ne semble pourtant pas simplement liée à la présence d'oxygène dans le produit fini, d'autant qu'un col pauvre en oxygène est dans bien des cas totalement inefficace. Des précurseurs produits en amont du procédé de fabrication paraissent déterminants dans la formation d'off-flavours. De nombreuses hypothèses sont avancées, tantôt incriminant l'oxygène comme principal responsable de la production de précurseurs au brassage ou à l'ébullition (5), tantôt lui reconnaissant au contraire une aptitude à réduire les taux de trans-2-nonénal dans le moût (1). La teneur en aldéhydes du moût étant drastiquement réduite en fermentation, un nombre irraisonnable de précurseurs plus résistants à l'activité levurienne ont été proposés, tels que les acides trihydroxy, les cis-3-alcénals, les hydroxyalcanals ou les complexes carbonylés-SO₂, sans vérification, hélas, des mécanismes incriminés.

L'objectif de ce travail est de mieux définir l'impact de l'oxygène présent dans le col de la bouteille ainsi que de déterminer son rôle dans la production de précurseurs lorsqu'il est présent dans les premiers stades de la production.

MATERIELE ET METHODES

Ajouts d'oxygène.

15 ml d'oxygène sont injectés dans le col de bouteilles fermées au préalable par un bouchon en silicone (Vel n°4). Afin d'éviter l'insertion d'air, la bouteille est secouée juste avant la pose du bouchon. Les bouteilles sont ensuite recapsulées pour assurer l'étanchéité du système.

Pour étudier l'incorporation de l'oxygène dans les différentes fractions de la bière, des bières témoins sont préparées sous oxygène 16 (injection de 24 mg, 96 ppm) parallèlement aux bières préparées sous oxygène 18 (injection de 26 mg, 104 ppm).

Vieillisements des bières.

Deux types de vieillissement sont appliqués aux échantillons: un vieillissement accéléré, où la bière est maintenue 5 jours à 40°C, et un vieillissement naturel, où la bière est stockée à température ambiante (+/- 20°C) dans l'obscurité pour une période de 3 à 9 mois.

Extraction des polyphénols à l'acétate d'éthyle.

100 ml de bière dégazée additionnés de 100 ml d'HCl 1N, 300 ml d'H₂O et de 500ml d'isooctane, sont mélangés dans une boule à décanter. Après l'élimination de la phase organique, les 300 ml de phase aqueuse sont extraits trois fois de suite avec 300 ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont alors regroupées et concentrées au rotavapor à 30°C. L'extrait concentré est placé à -80°C une nuit pour être ensuite lyophilisé.

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé selon la méthode de De Clerck et Jerumanis (2).

Extraction des sulfates.

100 ml de bière dégazée additionnés de 1 ml HCl 6N sont chauffés dans un bain marie à 60°C. 20 ml de BaCl₂ à 10% sont alors ajoutés à la solution qui sera maintenue pendant une heure à température ambiante. La solution est ensuite filtrée sur filtre Millipore (S&S réf:400714, 3 µm, diamètre 50 mm). Le précipité est lavé à l'eau chaude trois fois de suite. Le filtre est récupéré et placé au four dans un creuset taré durant 24 H à 600°C. L'échantillon est alors pesé (PS) et la teneur en sulfates est obtenue en multipliant par le facteur 4,115.

Extraction des isohumulones.

L'extraction des isohumulones est basée sur la méthode rapide mise au point par Rigby et Bethune (9). Dans un cylindre gradué, 2,5 ml d'HCl 6 N, 25 ml de bière dégazée et 50 ml d'isooctane sont mélangés à l'horizontale pendant 1 minute. Le mélange est gardé au repos pendant un quart d'heure. La phase isooctane est mélangée dans un rapport 1:1 avec du méthanol acidifié (3.2 volumes d'HCl 4 N + 6.8 volumes de méthanol pur). Après repos de la solution, la phase isooctane est séparée de la phase méthanol et concentrée au rotavapor à 30°C pour l'analyse au cyclotron.

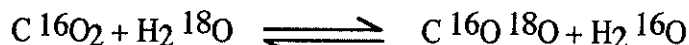
Le dosage des isohumulones est obtenu par lecture de la densité optique (DO) à 255 nm de 5 ml de la phase isooctane portés à 25 ml avec du méthanol alcalinisé (100 ml de méthanol contenant 0.2 ml de NaOH 1.5 N). La teneur en isohumulones (en ppm) est déterminée par l'équation $2 \times (DO \times 96,15 + 0,4)$.

Analyse de l'oxygène 18 au cyclotron.

50 mg des divers extraits sont pressés dans un porte-échantillon en tantale, de manière à éviter toute dilution de l'échantillon par l'oxygène de l'air. Pour transformer l'oxygène 18 en fluor 18, l'échantillon est irradié pendant 30 minutes avec un faisceau de 7 MeV à 15 nA (Cyclotron faisceau 100 MeV; Institut de Physique Nucléaire, Cyclotron, LLN). Il est alors soumis à l'analyse du fluor 18 par détection durant 8 heures des rayons gamma issus de la désintégration en oxygène 18. Un traitement informatique permet ensuite de calculer avec précision la valeur de l'activité en ^{18}F et donc en ^{18}O présente à l'origine dans l'échantillon, ceci en tenant compte des interférences liées à la présence d' ^{13}N et de ^{11}C .

Analyse de l'eau par MS Isotopique.

La détermination de la teneur en oxygène 18 dans l'eau est effectuée selon une méthode indirecte décrite par Epstein et Mayeda (3) sur base de la réaction d'échange isotopique à une température contrôlée de 25°C pendant 24 H:



Les échantillons de bières dégazées sont préalablement congelés dans des ballons fermés hermétiquement. Après avoir mis le système sous vide, une quantité connue de CO_2 est ajoutée afin de réaliser l'échange isotopique à 25°C. Le CO_2 présent dans les ballons est alors analysé à l'aide d'un spectromètre de masse à double collection (CNRS Vernaison) sachant que le rapport $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ dans le CO_2 est fonction du rapport $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de l'eau suivant l'équation:

$$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}(\text{CO}_2) = \alpha * ^{18}\text{O}/^{16}\text{O}(\text{H}_2\text{O}) \text{ où } \alpha = 1,0409 \text{ à } 25^\circ\text{C}$$

Le $\delta \text{ } ^{18}\text{O}$ est alors déterminé (écart relatif de la teneur en oxygène 18 entre l'échantillon et un standard de référence (SMOW)):

$$\delta \text{ } ^{18}\text{O} = \left(\left(\frac{^{18}\text{O}/^{16}\text{O}(\text{échantillon})}{^{18}\text{O}/^{16}\text{O}(\text{SMOW})} \right) - 1 \right) \times 1000 \text{ où } ^{18}\text{O}/^{16}\text{O} \text{ de SMOW} = 0,20052$$

Détermination du trans-2-nonénal dans la bière.

Le protocole d'analyse des composés carbonylés est basé sur la méthode proposée par Currie et al (1) sans dérivation de la fonction carbonyle. Tel que nous l'appliquons, le protocole comprend les étapes suivantes: une distillation sous vide, un transfert de phase, une concentration des aldéhydes au Kuderna, et l'analyse chromatographique. La méthode permet de détecter 0,03 ppb avec un coefficient de variation inférieur à 5 %.

Les échantillons de bière ou de moût sont distillés sous vide (2 mm Hg) pendant une heure à 30°C suivie d'une demi-heure à 35°C. Les composés carbonylés sont récupérés dans un piège maintenu dans l'azote liquide durant toute la distillation.

Le distillat recueilli (environ 300 ml) ainsi que 20 ml de méthanol 25% sont passés sur une colonne Bond Elut C18 apolaire (500 mg de phase). Celle-ci est, au préalable, conditionnée successivement par 40 ml de méthanol et 30 ml de dichlorométhane. Le vide est ajusté de manière à obtenir un débit de 2 gouttes par seconde. Les composés carbonylés sont ensuite désorbés par 25 ml de dichlorométhane.

L'éluat est additionné de 5 ml d'une solution de nonané (IST) 0.5 ppm dans le dichlorométhane. Les 30 ml sont alors concentrés par évaporation dans un Danish Kuderna maintenu à 45°C. Quelques grains de carborundum (SiC) sont ajoutés pour régulariser l'ébullition. Ramené ainsi à 0,5 ml (facteur de

concentration 3000), l'extrait est analysé en chromatographie gazeuse. La concentration finale en IST avoisine 5 ppm.

Lors de l'analyse de moût, un détecteur à ionisation de flamme suffit à la quantification des aldéhydes (chromatographe HP 5890 équipé d'un injecteur automatique HP 7673) alors que lors de l'analyse des composés carbonyles d'une bière, les teneurs élevées en huiles de fusel et esters nécessitent l'utilisation d'un spectromètre de masse (HP 5988, impact électronique 70 eV) en mode single ion monitoring (SIM, ions sélectionnés : 70, 81, 83, 85, 98, 140, 142). Dans les deux cas, les conditions opératoires sont les suivantes :

- colonne WCOT CP-SIL 5 CB de 50 m x 0.32 mm; DF = 1.2 µm;
- gaz vecteur : He; pression : 0.85 bars; débit : 1.3 ml/min;
- injecteur de type on column (moût): température du four +3°C ou injecteur de type splitless (bière): température : 250°C; temps de fermeture : 0.8 min; débit de split : 30 ml/min;
- programmation de température : température initiale : 50°C, première pente : 20°C/min jusque 80°C, deuxième pente : 2°C/min jusque 200°C, troisième pente : 40°C/min jusque 250°C, temps final : 30 min;
- quantité injectée : 2 µl.

Détermination du nonenal potential.

Le moût est ajusté à pH 4 avec de l'acide phosphorique 85% avant barbottage à l'argon pendant 15 minutes dans une fiole Schott. La bouteille est ensuite fermée hermétiquement et placée 2H dans un bain-marie à 100°C. La détermination du trans-2-nonénal est effectuée sur l'échantillon refroidi préalablement 12H en chambre froide.

Brassage en présence d'azote ou d'oxygène.

Les brassins sont réalisés dans un fermenteur de 30L (Biostat U) équipés de deux sondes à oxygène, l'une en phase liquide (Ingold) et l'autre en phase gazeuse (WTW-Oxi digi 550, électrode EO 166/K) et d'un agitateur (200 rpm).

Sous atmosphère inerte, la farine de malt (4,8 l) en mouture grossière (moulin DLFU), désaéré dans un lyophilisateur, est ajoutée à 18 litres d'eau déminéralisée, préalablement bullés à l'azote et amenés à 36,5°C (température du premier palier du brassage). La cuve est fermée hermétiquement et la programmation de température suivante est appliquée au système: 15 minutes à 36,5°C, 30 minutes à 49,5°C, 15 minutes à 63,5°C et 10 minutes à 76°C (les montées en température entre chaque palier sont effectuées en 10 minutes).

Sous oxygène, les brassins sont réalisés de la même manière que sous azote, mis à part l'injection de 0,5 L d'oxygène durant le premier palier de température et la recirculation du HS durant tout le brassin. L'ajout de l'oxygène s'effectue par l'intermédiaire d'un fritté en inox plongeant au fond de la cuve et d'un débitmètre massique 5850 TR (Brooks, fixé à un débit de 10). La recirculation du gaz est réalisée par une pompe (Watson-Marlow, fixée à 100 rpm) reliée directement sur le fritté.

Production de bière en présence d'oxygène ou de CO₂ au brassage.

Les brassins sont réalisés dans une cuve de 90L équipée de sondes à oxygène et d'un agitateur. La farine de malt (18.2 Kg broyés à l'aide d'un moulin à marteaux), désaéré dans un lyophilisateur, est ajoutée à 57 litres d'eau déminéralisée, préalablement bullés au CO₂ et amenés à 36,5°C (température du premier palier du brassage). L'atmosphère du brassin ainsi que la programmation de température sont obtenues de la même manière qu'au paragraphe précédent (sous oxygène, l'injection est dans ce cas de 4L). En fin de brassin, le moût est amené à 78°C et filtré sur filtre 2001. Le moût filtré, ajusté à 12°P avec de l'eau déminéralisée, est porté à ébullition durant une heure trente (une évaporation plus intense est obtenue les 15 dernières minutes). Après 20 minutes de clarification, le trub est éliminé par le bas de la cuve. Le moût clarifié est alors ajusté à pH 5.2 avec de l'acide sulfurique et amené à 12°C pour débiter la fermentation. Le moût est oxygéné à 8 ppm (à l'aide d'un fritté plongeant directement en solution) et ensemencé avec une levure basse (15x10⁶ cellules/ml). Après fermentation et garde, la bière est filtrée et soutirée en bouteille de 25 cl.

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans le but de mieux définir l'impact de l'oxygène présent dans le col de la bouteille, nous avons injecté 104 ppm d'un isotope stable non radioactif de l'oxygène, l'¹⁸O₂, dans le headspace de bières fraîches pauvres en sulfites. Les fractions les plus intéressantes des bières vieilles, à savoir : les polyphénols extraits à l'acétate d'éthyle, les sulfates issus de l'oxydation des sulfites, les isohumulones et les composés

carbonylés, ont ensuite été analysées par bombardement protonique. Ces expériences rappellent celles de Owades et Jacovac (8) qui avaient observé une incorporation d'oxygène 18, après un vieillissement de 8 mois, dans 65% des tannins, 5% des isohumulones et 30% des composés carbonylés post-dérivatisés à la 2,4-dinitrophénylhydrazine. Les résultats les plus significatifs étaient l'absence d'oxygène 18 dans la fraction eau obtenue après dérivation, excluant par là, la formation de composés carbonylés par oxydation *in situ* des lipides.

Bien que ne remettant pas totalement en cause les conséquences pratiques des expériences de Owades et Jacovac, nos résultats diffèrent significativement des leurs. Contrairement à Owades et Jacovac, nous nous sommes attachés à extraire les composés carbonylés par distillation sous vide et transfert dans un solvant organique de manière à ne pas perdre, lors d'une dérivation, l'oxygène aldéhydique. Outre les aldéhydes de C6 à C12 avec un recouvrement de 80% pour le trans-2-nonénel, cette fraction comprend également les principaux composés de dégradation du trans-2-nonénel dans une bière, à savoir : l'acide nonénoïque et le 3-hydroxynonanal. Les résultats, présentés au tableau I, démontrent que les quantités irraisonnables d'oxygène introduites dans le col de la bouteille n'ont pas mené à des teneurs inhabituelles en trans-2-nonénel après vieillissement.

Tableau I. Concentrations en trans-2-nonénel (ppb) mesurées après vieillissements de bières industrielles pauvres en sulfites en présence et en absence d'oxygène injecté préalablement dans le col des bouteilles.

Teneurs en nonénel (ppb)	Sans ajout d'oxygène dans le col des bouteilles	Avec ajout d'oxygène dans le col des bouteilles (104 ppm)
Bière fraîche	0,09	0,10
Bière après un vieillissement accéléré	0,35	0,29
Bière après un vieillissement naturel de 3 mois	0,21	0,22

L'analyse par bombardement protonique de cette fraction n'a par ailleurs révélé aucune incorporation significative d'oxygène 18 dans les composés carbonylés. Ces résultats confirment dès lors que l'oxydation des lipides de la bière ne constitue pas une voie de synthèse du trans-2-nonénel durant le vieillissement.

Nous ne préconisons bien sûr pas de réduire les efforts entrepris pour minimiser l'oxygène dans le col de la bouteille. En effet, l'analyse des autres fractions extraites de la bière (Tableau II) démontre que de nombreuses réactions d'oxydation se déroulent durant le stockage d'une bière. Trois fractions y sont plus particulièrement sensibles: les polyphénols, les sulfites et les isohumulones. L'oxydation de ces fractions va sans aucun doute modifier les propriétés organoleptiques de la bière.

Tableau II. Incorporation de l'oxygène 18, mesurée par bombardement protonique et MS isotopique, dans les différentes fractions extraites des bières vieilles en présence de 104 ppm d'oxygène 18.

	Vieillissement accéléré	Vieillissement naturel (3mois)	Vieillissement naturel (9 mois)	Teneur initiale
% polyphénols oxydés (voie des triols)	6,5 %	0,3 %	0,6 %	de 57,4 ppm
+ mg H ₂ ¹⁸ O (voie des quinones)	4 mg sur les 24 mg injectés		10 mg	
% sulfites oxydés	3,0 %	3,5 %	100 %	de 2,1 ppm
% isohumulones oxydés	2,7 %			de 26,8 ppm

L'importance relative des différentes réactions d'oxydation s'avère assez différente à 20 et 40°C. L'oxydation des polyphénols par la voie des triols est favorisée en vieillissement accéléré: 6.5% d'incorporation contre 0.3-0.6%. Après un vieillissement naturel de 9 mois, nous retrouvons, par contre, 100% des sulfites oxydés en sulfates marqués. Contrairement à Owades et Jacovak, nous retrouvons également dans ce cas 40% de l'oxygène 18 dans la fraction eau, indiquant une oxydation alternative des polyphénols par la voie des quinones.

Nous avons ensuite exploité la technique de bombardement protonique pour évaluer l'impact de différents traitements de stabilisation des bières tels que l'ajout de KMS, PVPP et acide ascorbique.

Outre ses capacités à minimiser l'arôme de carton des bières vieilles, le SO₂ s'est révélé excellent pour réduire l'oxydabilité de la fraction polyphénol, tout au moins par la voie des triols : 0.3% contre 6.5% (Tableau III).

Tableau III. Impact du traitement KMS sur l'oxydabilité de la bière. Incorporation de l'oxygène 18, mesurée par bombardement protonique dans les fractions polyphénols et sulfates extraites des bières vieilles sous un col d'air enrichi en oxygène 18 (5 jours à 40°C).

25-50 ppm de polyphénols	Bière A (2,1 ppm SO₂)	Bière B (15 ppm SO₂)
% polyphénols oxydés (voie des triols)	6,5 %	0,3 %
% sulfites oxydés	3,1 %	3,1 %

A l'inverse, une bière traitée au PVPP s'est révélée plus sensible en terme d'oxydabilité de ses sulfites : 12.5% contre 7.9% (Tableau IV).

Tableau IV. Impact du traitement PVPP sur l'oxydabilité de la bière. Incorporation de l'oxygène 18, mesurée par bombardement protonique dans les fractions polyphénols et sulfates extraites des bières vieilles sous un col d'air enrichi en oxygène 18 (5 jours à 40°C).

16-20 ppm de SO₂	Bière C (95 ppm polyphénols)	Bière D (50 ppm polyphénols)
% polyphénols oxydés (voie des triols)	0,4 %	0,4 %
% sulfites oxydés	7,9 %	12,5 %

Le résultat le plus intéressant ressort de la comparaison de deux bières traitées au KMS, avec ou sans ajout d'acide ascorbique (Tableau V). Contrairement à l'effet espéré, la bière traitée à l'acide ascorbique subit une importante oxydation de ses fractions sulfites et polyphénols : 37% contre 8% pour les sulfites et 0.9% contre 0.4% pour les polyphénols.

Tableau V. Impact du traitement acide ascorbique en présence de KMS sur l'oxydabilité de la bière. Incorporation de l'oxygène 18, mesurée par bombardement protonique dans les fractions polyphénols et sulfates extraites des bières vieilles sous un col d'air enrichi en oxygène 18 (5 jours à 40°C).

95 ppm de polyphénols 20 ppm SO₂	Bière E (0 ppm acide ascorbique)	Bière F (26 ppm acide ascorbique)
% polyphénols oxydés (voie des triols)	0,4 %	0,9 %
% sulfites oxydés	7,9 %	37,0 %

Outre les conclusions étonnantes qui ressortent de la comparaison de bières différemment traitées, les analyses par bombardement protonique ont définitivement exclu l'hypothèse selon laquelle le trans-2-nonénel serait synthétisé par un mécanisme d'oxydation dans la bière finie. Nous avons donc logiquement recherché les précurseurs éventuels qui auraient été créés en amont du procédé.

Pour ce faire, nous avons produit trois bières en présence ou en absence d'oxygène au brassage. Il ressort de ces expériences que l'élimination de l'oxygène au brassage est un excellent moyen pour réduire le taux de trans-2-nonénel dans la bière vieillie : 0.22 ppb contre 0.65 et 0.40 après un vieillissement accéléré et 0.27 ppb contre 2.69 et 0.98 après un vieillissement naturel de 3 mois (Tableau VI).

Tableau VI. Teneurs en trans-2-nonénel (ppb) mesurées dans les bières vieilles après un brassage sous oxygène ou CO₂.

	Production A (Brassage sous O₂)	Production B (Brassage sous O₂)	Production C (Brassage sous CO₂)
Après un vieillissement accéléré	0,65	0,40	0,22
Après un vieillissement naturel (3 mois)	2,69	0,98	0,27

La mesure du nonénel potentiel sur le moût filtré s'est révélée être un bon indicateur du risque de vieillissement de la future bière: seulement 0,3 ppb sont détectés après brassage sous CO₂ (production C) alors que 3,9 ppb (production A) et 4,5 ppb (production B) sont mesurés après brassage sous oxygène.

Pour comprendre ce que contenait la mesure du nonénel potentiel sur le moût filtré, nous avons ensuite étudié l'évolution des teneurs en trans-2-nonénel au brassage pour différents malts et sous différentes conditions (Tableau VII).

Tableau VII. Evolution des teneurs en trans-2-nonénel (en ppb) au cours du brassage avec barbottage d'azote ou d'oxygène durant le premier palier.

Paliers de température (°C)	Alexis 65°C désaéré		Alexis 84°C désaéré	
	Brassin sous O ₂	Brassin sous N ₂	Brassin sous O ₂	Brassin sous N ₂
36,5	10,3	9,2	23,5	21,1
49,5	16,4	6,6	15,1	-
63,5	3,0	2,3	4,6	-
76,0	1,3	0,6	1,4	0,3

Des teneurs importantes en trans-2-nonénel (10 ppb pour un malt Alexis touraillé à 65°C et 22 ppb pour un malt Alexis touraillé à 84°C) sont mesurées, dès le premier palier du brassage, quelle que soit la nature de l'atmosphère gazeuse. Le malt contient pourtant très peu de trans-2-nonénel libre (teneur inférieure à 1 ppb).

Ces quantités importantes proviennent donc d'une synthèse non lipoxygénasique, puisque se déroulant aussi en l'absence d'oxygène. Les teneurs en trans-2-nonéol présentes au premier palier sont fonction du nonenal potentiel du malt (Tableau VIII), bien que cette mesure nous paraisse entachée de multiples défauts (dégradation thermique simultanée à la transformation de précurseurs).

Tableau VIII. Relations entre le nonenal potentiel du malt et les teneurs en trans-2-nonéol (en ppb) mesurées après le premier palier du brassage en présence d'azote.

	Trans-2-nonéol fin 1 ^{er} palier sous azote	Nonenal potentiel du malt
Alexis 60°C	2,5	0,2
Alexis 65°C	9,2	0,3
Alexis 84°C	21,1	1,2
Plaisant 60°C	9,1	0,2
Plaisant 65°C	13,4	0,9

Dans le cas de l'Alexis 65°C, une synthèse *de novo* de trans-2-nonéol est clairement mise en évidence en présence d'oxygène au second palier de température (Tableau VII). Cette synthèse du trans-2-nonéol par la lipoxygénase a été confirmée par bombardement protonique des extraits carbonylés obtenus à partir d'un moût produit en présence d'oxygène 18. Dans le cas de l'Alexis 84°C, la synthèse enzymatique du trans-2-nonéol est moins visible en raison d'une activité lipoxygénasique logiquement amoindrie.

Parallèlement le trans-2-nonéol présent dès le début du brassage disparaît graduellement par un processus non oxydatif : de 9.2 à 0.6 ppb et de 21.1 à 0.3 ppb pour les deux brassages sous azote.

Un second mécanisme de dégradation est à considérer en présence d'oxygène, celui-ci permettant de ramener les teneurs en trans-2-nonéol à des valeurs proches du ppb malgré une production lipoxygénasique intense au second palier : passage de 16.4 à 1.3 ppb pour l'Alexis 65°C. Ce mécanisme de dégradation est déjà très important dès les premières minutes du brassage lorsque de l'oxygène est apporté par la farine, si l'on s'en réfère à une expérience réalisée avec de l'Alexis 65°C non désaéré où nous n'avons détecté que 4.6 ppb contre 10.3 après le premier palier de température. Cette dégradation en présence d'oxygène correspond vraisemblablement à la transformation du trans-2-nonéol en acide nonénoïque.

Le premier mécanisme de dégradation, non oxydatif, retiendra toute notre attention. Comme montré précédemment (7), le trans-2-nonéol du moût subit deux modes de dégradation majeurs en l'absence d'oxygène: une hydratation menant au 3-hydroxynonanal, d'une part, et une association par un lien covalent aux acides aminés et aux protéines du moût, d'autre part. Des mesures de nonenal potentiel menées sur ces fractions permettent de relibérer, dans les deux cas, des quantités significatives de trans-2-nonéol. La mesure du nonenal potentiel sur le moût filtré n'est donc rien d'autre qu'un dosage des produits de dégradation non oxydative du trans-2-nonéol.

CONCLUSION

Les premiers instants de la production d'une bière vont inévitablement conditionner sa résistance au vieillissement. Le brasseur aura intérêt à mettre tout en oeuvre pour limiter les teneurs en oxygène dans la farine et dans l'eau. Par ailleurs, un choix judicieux des matières premières devrait permettre de minimiser les réactions radicalaires induites par la lipoxygénase. La mesure du nonenal potentiel du moût filtré peut être proposée comme un indicateur des aptitudes au vieillissement de la future bière.

Au stade du produit fini, l'oxygène du col aura peu d'influence sur l'arôme de carton bien qu'il modifiera de façon draconienne la perception organoleptique du produit *via* la dégradation des polyphénols et des isohumulones. Dans ce cas, l'utilisation conjointe de KMS et d'acide ascorbique risque d'accroître les effets désastreux d'un excès d'oxygène.

REFERENCES

- (1) Currie B.R., Kulandai J., Fitzroy M.D., Hawthorne D.B. and Kavanagh T.E., Proceedings of the Institute of Brewing Convention, 1990, 117-125.

- (2) De Clerck J. et Jerumanis J., Bulletin de l'Ecole de Brasserie de Louvain, 1967, 64, 137-161.
- (3) Epstein S. and Mayeda T., Geochimica Cosmochimica Acta, 1953, 4, 213-224.
- (4) Jamieson A.M. and Van Gheluwe J.E.A., Proceedings of the American Society of Brewing Chemists, 1970, 192-197.
- (5) Kobayashi N., Kaneda H., Kano Y. and Koshino S., Journal of the Institute of Brewing, 1993, 99, 143-146.
- (6) Meilgaard M. C., Food Quality and Preference, 1993, 4, 153-167.
- (7) Noël S. and Collin S., Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Bruxelles, 1995, 483-489.
- (8) Owades J.L. and Jakovac J., Proceedings of the American Society of Brewing Chemists, 1966, 180-183.
- (9) Rigby F.L. and Bethune J.L., Journal of the Institute of Brewing, 1955, 61, 325-332.