

14

Contribution du 3-méthylthiopropionaldéhyde à la saveur de moût des bières sans alcool

Philippe Perpète, Sonia Collin

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

Descripteurs

Aldéhyde, bière sans alcool, goût de moût, résultat d'analyse du moût

RESUME

Le 3-méthylbutanal et le 2-méthylbutanal sont décrits comme responsables du goût de moût des bières sans alcool. Pourtant, bien qu'ils aient été rencontrés en grande quantité dans le malt et dans les extraits de moût, ces deux composés se sont montrés incapables de conférer un goût de moût. A la suite d'analyses par CG/MS et CG/olfactométrie de substances volatiles du moût, il s'est avéré que c'est le 3-méthylthiopropionaldéhyde qui est l'élément-clé. Le 3-méthylthiopropionaldéhyde est un substrat pour les enzymes réductrices de *Saccharomyces cerevisiae*. Le passage en revue de différentes souches nous a amenés à conclure que plus l'activité du 3-méthylbutanal est élevée, plus l'activité réductase du 3-méthylthiopropionaldéhyde est elle-même élevée. La concentration de 3-méthylthiopropionaldéhyde est désormais surveillée par fermentation par contact à froid.

Contribution of 3-methylthiopropionaldehyde to the warty flavour of alcohol-free beers

Descriptors

Alcohol free beer, aldehyde, wort analysis result, warty flavour

SUMMARY

3-Methylbutanal and 2-methylbutanal are described as responsible for the warty taste of alcohol-free beers. Yet although detected in large amounts in malt and wort extracts, both compounds have proven unable to confer warty taste. Following GC/MS and GC/olfactometry analysis of wort volatiles, 3-methylthiopropionaldehyde turned out to be the key feature. 3-Methylthiopropionaldehyde is a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* reducing enzymes. Screening of various strains led us to conclude that the higher the 3-methylbutanal activity, the higher the 3-methylthiopropionaldehyde reductase activity. Monitoring of 3-methylthiopropionaldehyde concentration through cold contact fermentation has been undertaken.

Die Beteiligung von 3-Methylthiopropionaldehyd am Würze flavour alkoholfreier Biere

Deskriptoren

Aldehyd, alkoholfreies Bier, Ergebnis von Würzeanalysen, Flavour nach Würze

ZUSAMMENFASSUNG

3-Methylbutanal und 2-Methylbutanal sollen für den würzeartigen Geschmack eines alkoholfreien Bieres verantwortlich sein. Beide Verbindungen hatten trotz ihres Vorkommens in großen Mengen in Würze und Malzextrakt jedoch nicht den würzeartigen Geschmack. Mit GC/MS und GC/Olfaktometrie von flüchtigen Würzeverbindungen konnte 3-Methylthiopropionaldehyd als Schlüsselkomponente identifiziert werden. 3-Methylthiopropionaldehyd ist ein Substrat für reduzierende Enzyme aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Untersuchung verschiedener Stämme führte uns zu folgender Feststellung: je höher die 3-Methylbutanalaktivität ist, desto höher ist auch die 3-Methylthiopropionaldehyd-Reduktaseaktivität. Das Verhalten der 3-Methylthiopropionaldehyd-Konzentration beim Kältekontaktverfahren wurde untersucht.

INTRODUCTION

Les bières sans alcool sont principalement produites selon deux procédés. Le premier consiste à retirer l'alcool synthétisé lors d'une fermentation classique (5, 11) tandis que dans le second, la production d'éthanol est réduite en fermentation, par exemple par application de la méthode "Cold Contact Process" (CCP) (10).

Les bières sans alcool présentent deux défauts majeurs : un arôme de moût prononcé et un manque d'esters et d'alcools supérieurs.

Plusieurs composés carbonylés, issus de la dégradation de Strecker, ont été proposés comme principaux responsables de l'arôme de moût. Plus particulièrement, le 3-méthylbutanal et le 2-méthylbutanal ont été identifiés par Beal et Mottram (1) comme les éléments clés de l'arôme du malt. Ces deux aldéhydes sont néanmoins efficacement réduits par les systèmes enzymatiques de la levure, même en conditions de fermentation à froid (6, 2, 4). Les concentrations en 3- et 2-méthylbutanal dans les bières sans alcool (de 5 à 60 ppb) (7) sont dès lors largement inférieures à leur seuil de perception (respectivement 600 ppb et plus de 1 ppm pour le 3-méthylbutanal et le 2-méthylbutanal). De plus, l'ajout de ces deux composés dans des bières de fermentation basse ne leur confère pas vraiment un arôme de moût.

Dans cet article, nous tenterons d'identifier les composés responsables de l'arôme de moût par AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis)(3). Nous évaluerons ensuite le taux de métabolisation de ces saveurs dans une fermentation CCP.

PROCEDURES EXPERIMENTALES

Souches

Toutes les souches de *Saccharomyces cerevisiae* de fermentation basse et de fermentation haute sont issues de la collection BRAS de l'Unité de Brasserie et des Industries Alimentaires de l'Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgique. *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces ludwigii* et *Candida boidinii* sont issues de la collection MUCL de l'Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgique.

Obtention des extraits aromatiques

Des extraits représentatifs du point de vue organoleptique de l'échantillon de départ ont été obtenus selon le protocole décrit par Perpète & Collin (8).

Olfactométrie et AEDA

Les analyses par flairage en sortie de colonne chromatographique ont été réalisées selon les méthodes décrites par Grosch (3) et Perpète & Collin (8).

Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse

Les aldéhydes de Strecker ont été dosés par headspace dynamique ou par dérivation au PFBOA (8, 9).

Activités enzymatiques et gels d'électrophorèse en conditions natives

Les activités cinétiques des extraits acellulaires de levures ont été mesurées selon la méthode décrite par Perpète & Collin (8). Les gels d'électrophorèse ont été réalisés selon le protocole de Van Iersel *et al.* (12).

RESULTATS ET DISCUSSION

Comparaison des profils aromatiques

La méthode AEDA a été appliquée à des extraits de moût et de bière sans alcool (Figure 1).

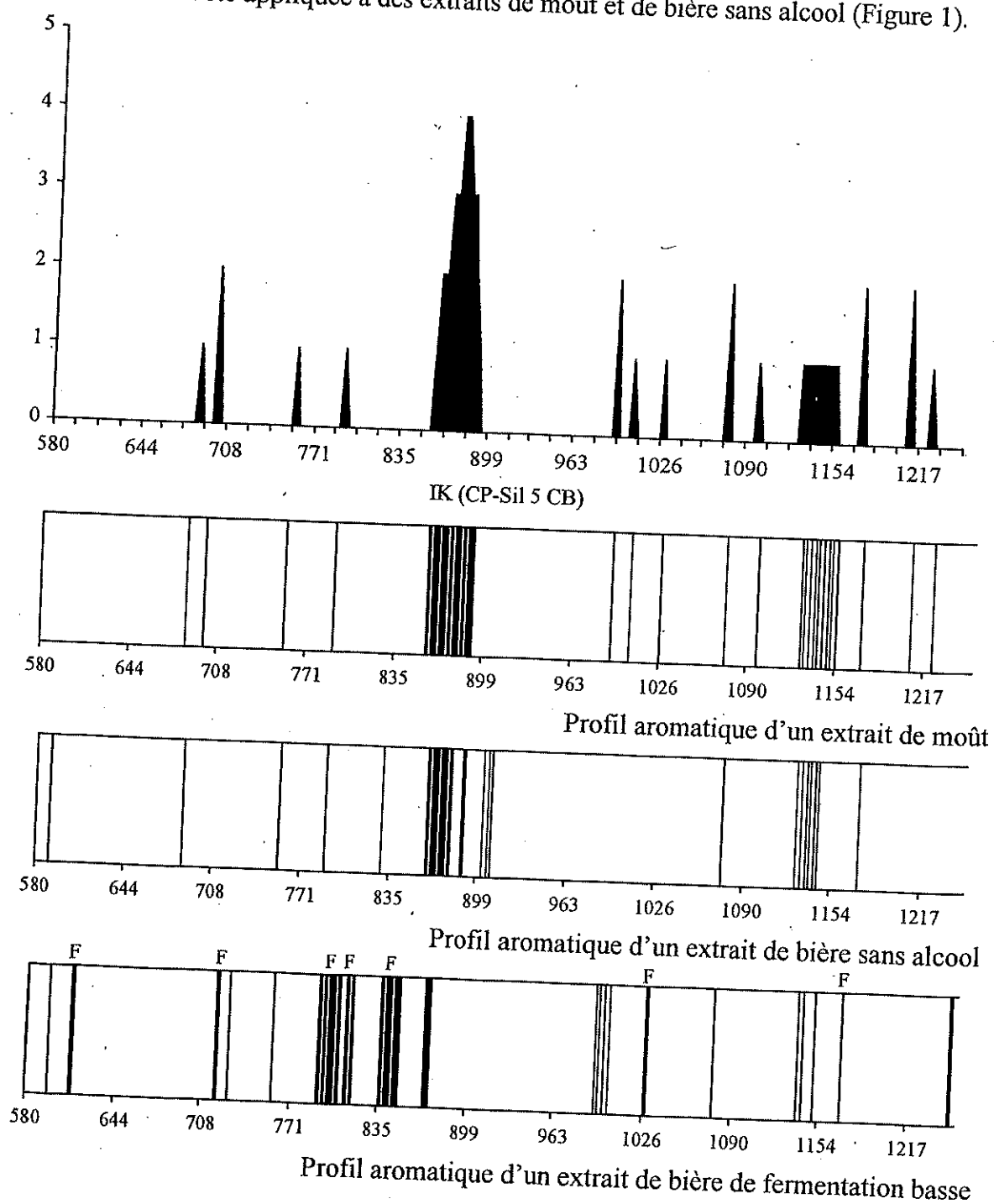


Figure 1 : Comparaison des profils aromatiques d'extrait de moût, de bière sans alcool et de bière de fermentation basse (F = arôme fruité).

Un composé, identifié par spectrométrie de masse comme étant le 3-méthylthiopropionaldéhyde (méthional, $IK(CPSil-5\ CB) = 862$), s'est révélé particulièrement

persistant au fil des dilutions. Cet aldéhyde, dérivé de la méthionine par dégradation de Strecker, a de plus été décrit par tous les expérimentateurs par le descripteur "moût". Le profil aromatique obtenu pour l'extrait de bière sans alcool est très semblable à celui d'un extrait de moût, plus particulièrement en ce qui concerne la région du 3-méthylthiopropionaldéhyde. L'extrait obtenu à partir d'une bière de fermentation basse est, quant à lui, logiquement caractérisé par des odeurs fruitées, fleuries ou soufrées.

Le 3-méthylthiopropionaldéhyde comme substrat de *Saccharomyces cerevisiae*

Il est généralement accepté que *Saccharomyces cerevisiae* est capable de réduire les aldéhydes du moût en composés organoleptiquement plus neutres (6, 2, 4, 9). Les mesures d'activités *in vitro* présentées à la Figure 2, effectuées, soit avec le cofacteur NADH, soit avec le cofacteur NADPH, montrent que le 3-méthylthiopropionaldéhyde est un bon substrat en particulier en présence de NADPH.

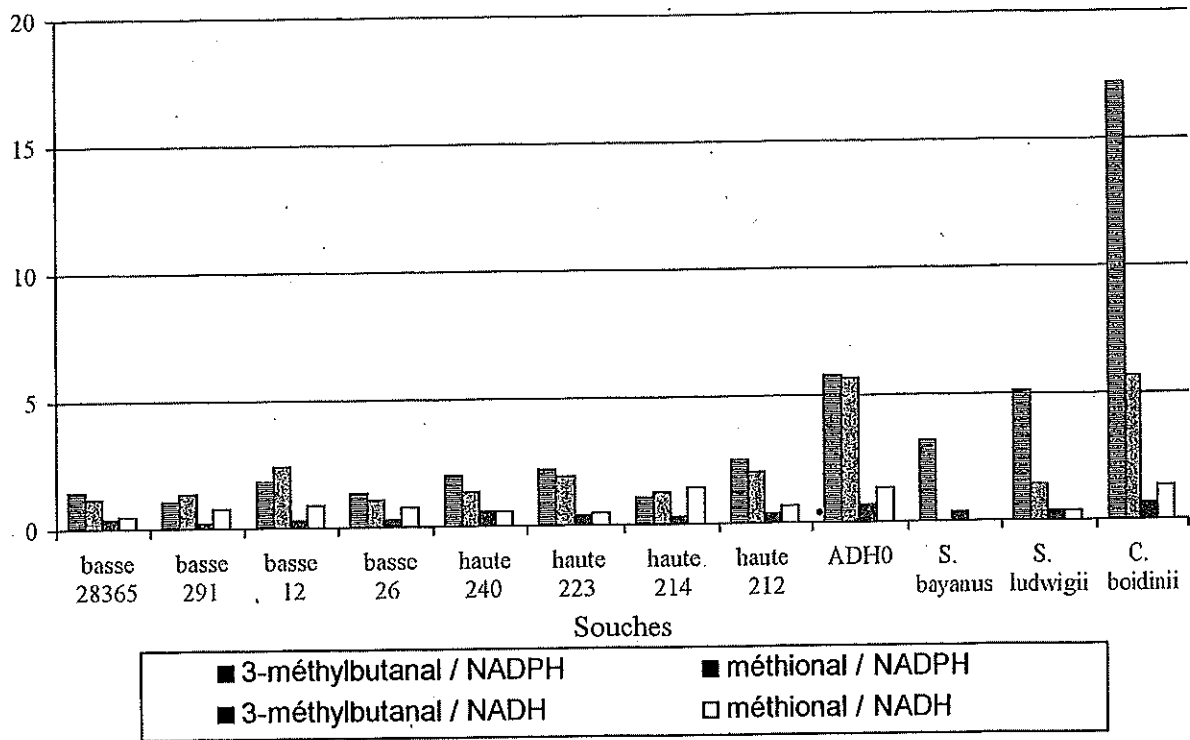


Figure 2 : Activités cinétiques des extraits acellulaires de levures. Les activités spécifiques sont exprimées en 10^{-5} U/mg de protéines (U = μ mole de cofacteur oxydé par heure à 25°C).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'activité 3-méthylbutanal réductasique est corrélée à l'activité 3-méthylthiopropionaldéhyde réductasique (coefficient de corrélation de 0,96, Figure 3).

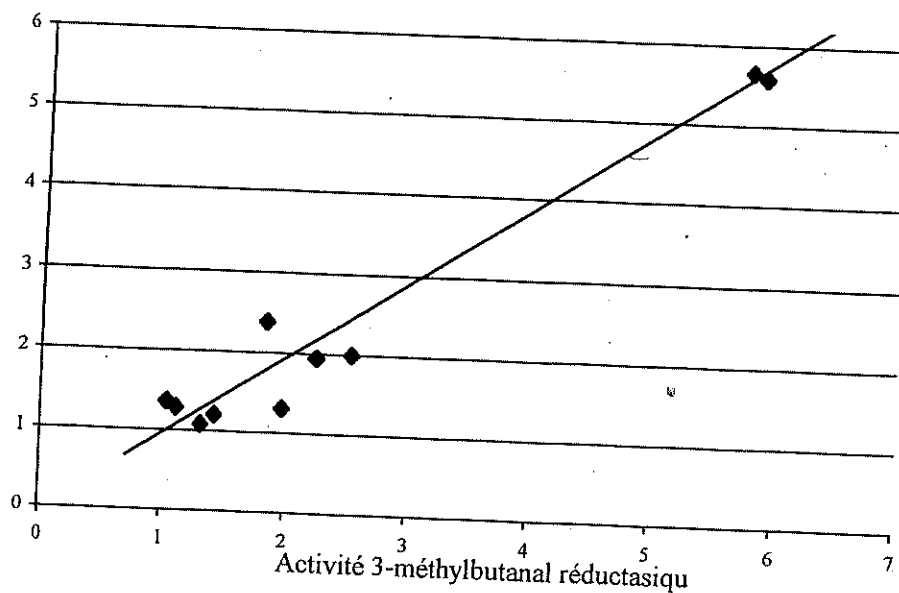


Figure 3 : Corrélation entre les activités 3-méthylthiopropionaldéhyde et 3-méthylbutanal réductase en présence de NADPH chez *Saccharomyces cerevisiae*. Les activités spécifiques sont exprimées en $\cdot 10^{-5}$ U/mg de protéines (U = μ mole de cofacteur oxydé par heure à 25°C).

Les gels d'électrophorèse en conditions natives (Figure 4) indiquent que les mêmes enzymes sont vraisemblablement impliquées dans la réduction du 3-méthylbutanal et du 3-méthylthiopropionaldéhyde chez *Saccharomyces cerevisiae*. Une certaine hétérogénéité entre souches est cependant constatée. Chez *Saccharomyces bayanus*, par contre, aucune enzyme 3-méthylthiopropionaldéhyde réductasique n'est mise en évidence par notre test alors que deux bandes apparaissent lorsque le 3-méthylbutanal est utilisé comme substrat.

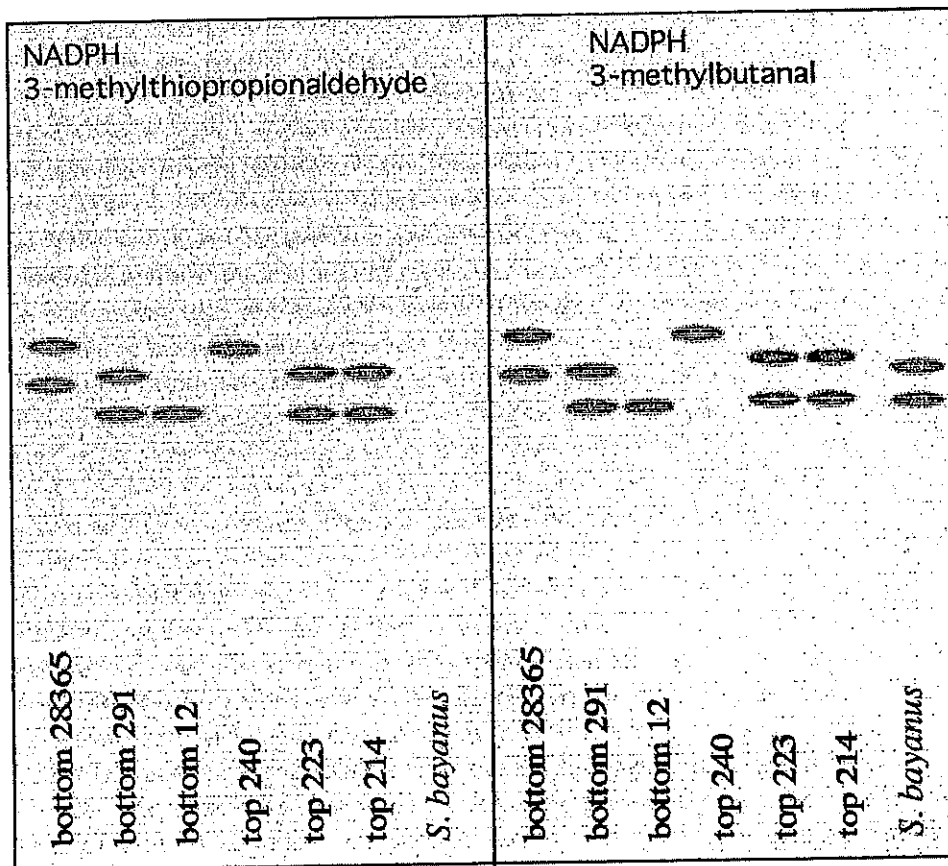


Figure 4 : Représentation du gel d'électrophorèse en conditions natives d'extraits acellulaires de levure, utilisant une coloration spécifique pour la détection des réductases.

Evolution du 3-méthylthiopropionaldéhyde durant une fermentation CCP

Les concentrations en 3-méthylthiopropionaldéhyde et 3-méthylbutanal diminuent rapidement durant les 3 premières heures de CCP. Une stabilisation est ensuite observée, laissant des teneurs résiduelles non négligeables comparativement au seuil de perception, tout au moins dans le cas du 3-méthylthiopropionaldéhyde (thr. = 1,7 ppb dans l'eau) (3) (Figure 4).

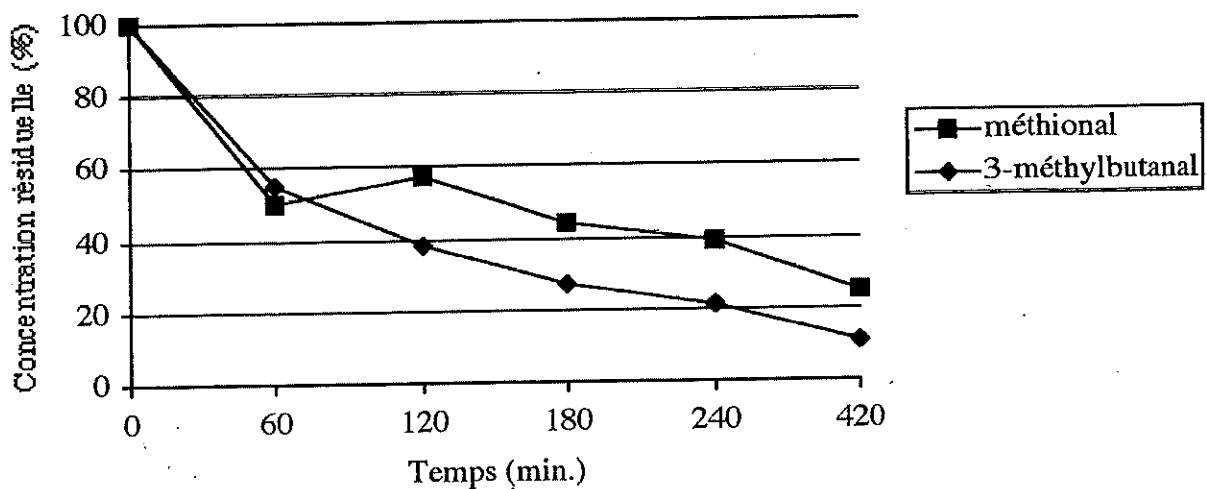


Figure 5 : Evolution de la concentration en aldéhydes durant un CCP. Les concentrations initiales (100 %) sont respectivement de 405 ppb et 501 ppb pour le 3-méthylbutanal et le 3-méthylthiopropionaldéhyde.

CONCLUSIONS

Le 3-méthylthiopropionaldéhyde s'est révélé le composé responsable de l'arôme de moût des bières sans alcool. La difficulté à extraire cet aldéhyde d'un milieu aqueux par les techniques classiques de headspace explique sa mise en évidence tardive. Les données cinétiques et les résultats des électrophorèses en conditions natives indiquent que les levures *Saccharomyces cerevisiae* possèdent les systèmes enzymatiques requis pour sa réduction en méthional. Il s'agit vraisemblablement des mêmes enzymes NADPH-dépendantes que celles qui sont impliquées dans la réduction du 3-méthylbutanal. En raison de son seuil de perception, beaucoup plus faible, le méthional résiduel (environ 30 % de la teneur initiale) sera perçu après une fermentation CCP. Un contrôle plus strict de la synthèse de cet aldéhyde de Strecker au maltage et au brassage est conseillé, non seulement dans le contexte des bières sans alcool, mais aussi pour des bières « classiques » où le méthional apparaît aujourd'hui un précurseur potentiel du diméthyltrisulfure.

REFERENCES

1. Beal, A.D. & Mottram, D.S., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42, 2880-2884.
2. Collin, S., Montesinos, M., Meersman, E., Swinkels, W. & Dufour, J.P., *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Lisbon, 1991*, 409-416.
3. Grosch, W., *Flavour and Fragrance Journal*, 1994, 9, 147-158.
4. Laurent, M., Geldorf, B., Van Nederveelde, L., Dupire, S. & Debourg, A., *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels, 1995*, 337-344.
5. Muller, R., *Ferment*, 1990, 3, 224-231.
6. Peppard, T.L. & Halsey, S.A., *The Journal of the Institute of Brewing*, 1981, 87, 386-390.
7. Perpète, P. & Collin, S., *Cerevisia*, 1999, 1/1999, 27-34.
8. Perpète, P. & Collin, S., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, in press.
9. Perpète, P. & Collin, S., *Food Chemistry*, 1999, in press.
10. Schur, F., *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, London, 1983*, 353-360.
11. Stein, W., *MBAA Technical Quarterly*, 1993, 30, 54 - 57.
12. Van Iersel, M.F.M., Eppink, M.H.M., Van Berkel, W.J.H., Rombouts, F.M. & Abee, T., *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63, 4079-4082.