

## #5

Sonia COLLIN (responsable de l'unité)  
(sonia.collin@uclouvain.be)

# Méthodologies sensorielles nouvelles pour l'amélioration de la stabilité organoleptique des aliments :

développements récents dans l'Unité de Brasserie et des Industries Alimentaires (INBR) de l'Université catholique de Louvain  
[www.uclouvain.be/inbr](http://www.uclouvain.be/inbr)

## Préambule

L'unité de Brasserie et des Industries Alimentaires de l'UCL développe l'essentiel de son activité de recherche dans le cadre de la maîtrise de la qualité organoleptique des denrées alimentaires au cours de leur vieillissement. Bien qu'initialement exclusivement orientées vers les matières premières et produits du secteur brassicole, les recherches actuelles visent aussi d'autres denrées alimentaires telles que le chocolat, le vin, les miels monofloraux, les olives, ...

Dans une politique commerciale européenne, voire mondiale, il est crucial d'adapter les procédés de fabrication en vue d'augmenter la «stabilité organoleptique» du produit au cours de son stockage. «Stabilité organoleptique» implique **absence de défauts odorants (I)** et **maintien des caractères «fraîcheur» initiaux (II)**. Afin d'apporter des solutions concrètes, nous tentons d'établir des **procédures permettant un diagnostic rapide** quant au risque de vieillissement **(III)**. Enfin, après parfaite compréhension des mécanismes chimiques impliqués, nous tentons de trouver des solutions pour **ralentir, voire empêcher les processus de dégradation (IV)**.

L'identification de toutes ces molécules organoleptiquement actives, souvent à l'état de traces, nécessite la mise en place de méthodologies sensorielles nouvelles. Ainsi, nous utilisons principalement les techniques suivantes : 1) la GC-olfactométrie quantitative (outre les analyses GC-MS traditionnelles, nous couplons le chromatographe en phase gazeuse avec le nez humain - analyse de dilutions successives d'extraits/AEDA - détermination de seuils de perception en sortie de colonne chromatographique appelés BE-GC-LOADS [1,2]), 2) l'analyse sensorielle réalisée par un jury de dégustation formé au départ de données AEDA [3], 3) la chimie combinatoire permettant la caractérisation d'un grand nombre d'arômes tout en évitant les étapes fastidieuses de purification [4-8].

## 1. Détermination des voies de synthèse générant des défauts odorants au cours du vieillissement des denrées alimentaires

Dans ce contexte, le laboratoire INBR a été le premier à identifier la nature des précurseurs du *trans*-2-nonénel responsable de l'arôme de carton des bières vieilles [9-13]. Cet aldéhyde, issu de l'oxydation de l'acide linoléique au touraillage, au brassage et à l'ébullition, s'est avéré être protégé de l'activité réductrice de la levure par des liaisons aux matières azotées du moût (Figure 1). Une bière moins acide présente dès lors moins de risque à libérer l'arôme de carton au cours du vieillissement [3]. L'ajout de sulfites dans la bière est également un remède efficace puisqu'il permet de masquer momentanément le *trans*-2-nonénel libre. Il semble cependant souhaitable de prévenir l'apparition de tels défauts plus en amont du processus de fabrication, en améliorant par exemple le pouvoir réducteur du moût.

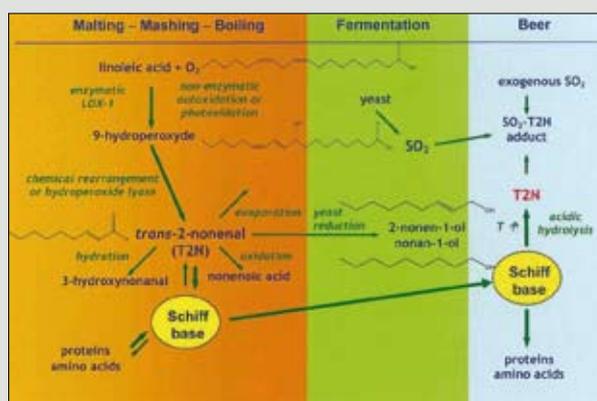


Figure 1. Voies de formation du *trans*-2-nonénel (arôme de carton) dans le moût et la bière.

D'autres défauts odorants créés durant le stockage de la bière ont été identifiés (le méthional [14], le diméthyltrisulfure [15-17], la  $\epsilon$ -damascénone [17-18], le sotolon, et tout récemment, le 4-vinylsyringol [19]) (Figure 2). La plupart d'entre eux se sont avérés peu affectés par le pouvoir réducteur du moût. Seul l'ajout

de sulfites augmente les teneurs en diméthyltrisulfure, en raison d'une protection accrue de son précurseur, le méthional (mécanisme de dégradation radicalaire) [17]. A nouveau, le pH joue un rôle crucial puisqu'un milieu plus acide accroît le taux d'hydrolyse des glycosides précurseurs de la  $\epsilon$ -damascénone et augmente les teneurs du principal précurseur du diméthyltrisulfure (dérivé sulfite du méthional). Par contre, augmenter le pH favorise les réactions de Maillard à l'origine des aldéhydes de Strecker (méthional, phénylacétaldéhyde, ... ; mécanisme également investigué dans le cas du conchage du chocolat [20]).

Les produits de dégradation de la cystéine [5] sont responsables de défauts odorants dans de nombreuses denrées. Ainsi, le « goût de lumière » apporté par le 3-méthyl-2-butène-1-thiol (MBT) [17,23] dans une bière exposée à la lumière visible en présence de riboflavine est issu de l'association des radicaux isopentenyl (dégradation des isohumulones du houblon) et thiyil (Figure 3).

Nous venons de démontrer qu'il peut également provenir de la substitution nucléophile de l'isopentényl alcool en présence de sulfure d'hydrogène (produit du métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae*) [24,25]. Les seuils de perception de ces thiols sont habituellement de quelques ppt. Dès lors, on comprendra aisément que la dégradation de moins d'un ppm de cystéine puisse expliquer l'apparition de défauts organoleptiques majeurs. La compréhension des mécanismes de dégradation de la cystéine nous paraît d'autant plus intéressante qu'elle est également présente dans des antioxydants puissants tels que le glutathion [26] (tripeptide d'acide glutamique, de cystéine et d'alanine).

Enfin, dans diverses matrices riches en terpènes (cas des jus d'orange, des eaux aromatisées, ...), nous avons étudié les mécanismes d'hydrolyse acide (formation d' $\epsilon$ -terpinéol, de terpin hydrate, ...) et d'oxydation (formation de carvone, ...) de molécules telles que le limonène ou le linalol.

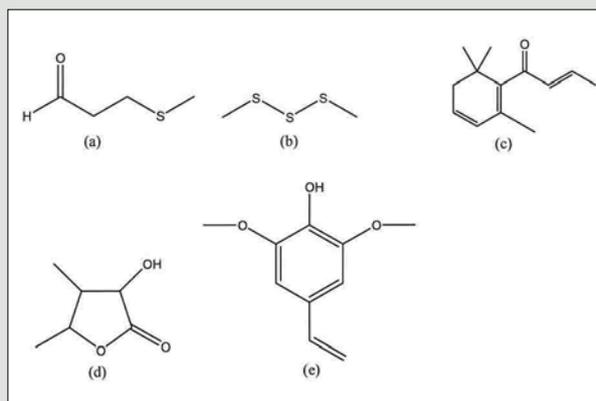


Figure 2. Structures chimiques de molécules odorantes générées au cours du vieillissement de la bière. (a) méthional (moût), (b) diméthyltrisulfure (oignon), (c)  $\epsilon$ -damascénone (compote de pomme), (d) sotolon (curry), et (e) 4-vinylsringol (pharmacie/vieille bière).

## 2. Voies de dégradation des molécules responsables du caractère « fraîcheur »

Nos travaux montrent que de nombreux terpènes et esters du houblon sont rapidement oxydés lors du stockage des cônes ou pellets, même à basse température [27,28]. C'est également le cas des arômes frais de l'olive verte que l'on retrouve dès lors rarement dans l'huile qui en dérive [29]. La famille des thiols polyfonctionnels a fait l'objet de nombreux travaux dans notre laboratoire en raison de leur caractère « fraîcheur » exceptionnel (descripteurs de type rhubarbe, buis, carottes fraîches, ...). Afin d'apporter une contribution originale à l'étude de ces saveurs, nous avons synthétisé une centaine de thiols polyfonctionnels [4-8] par chimie combinatoire et les avons caractérisés (odeur, BE-GC-LOADS, indices de Kovats, ...). Forts de ces données, nous avons pu identifier une série de thiols polyfonctionnels très odorants dans les vins de Sauternes [30]. Dans le cas de ce vin, bien connu pour s'améliorer au cours du vieillissement, certains mercaptans semblent encore pouvoir être produits dans la barrique d'élevage. D'autres disparaissent dans la bouteille au profit de nouveaux arômes d'abricots séchés, de vins botrytisés, notamment apportés par divers hétérocycles (Figure 4).

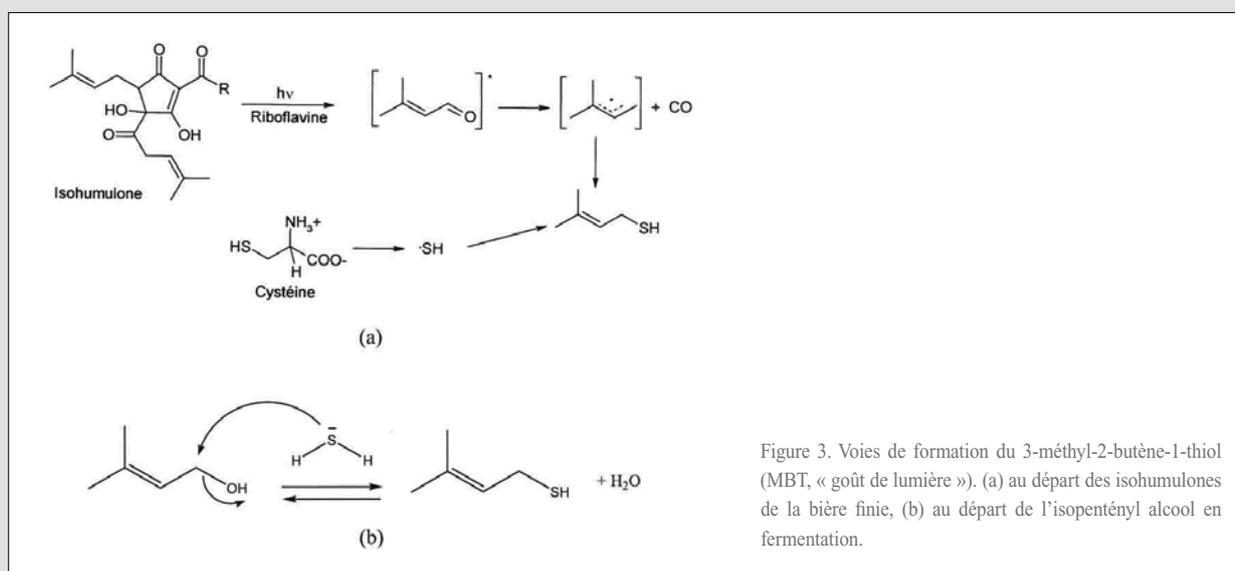


Figure 3. Voies de formation du 3-méthyl-2-butène-1-thiol (MBT, « goût de lumière »). (a) au départ des isohumulones de la bière finie, (b) au départ de l'isopentényl alcool en fermentation.



Le houblon s'est avéré une matière première exceptionnelle en terme de pouvoir antioxydant. Bien qu'à des teneurs cent fois inférieures que le malt, il apporte près de 30 % des polyphénols de la bière [37]. Ces flavanoïdes permettront de limiter les phénomènes d'oxydation au cours de l'ébullition du moût ou lors du stockage. Hélas, ils généreront parfois aussi des produits colorés [38] et astringents, responsables de l'instabilité colloïdale (Figure 6).

caractérisent par contre par des teneurs particulièrement élevées en flavanoïdes totaux (> 3000 mg/kg). Des teneurs très élevées en *trans*-stilbènes (> 4 mg/kg) n'ont finalement été retrouvées que dans les houblons aromatiques américains (teneurs en acides  $\epsilon$  inférieures à 5 %) (ex. : Willamette et Cascade) et un échantillon de Saaz. Dans les variétés amères, une compétition existe probablement pour l'utilisation d'acétyl CoA, précurseur fondamental aussi bien pour la synthèse d'acides  $\epsilon$  que pour celle des stilbènes. Le resvératrol étant une phytoalexine, une grande

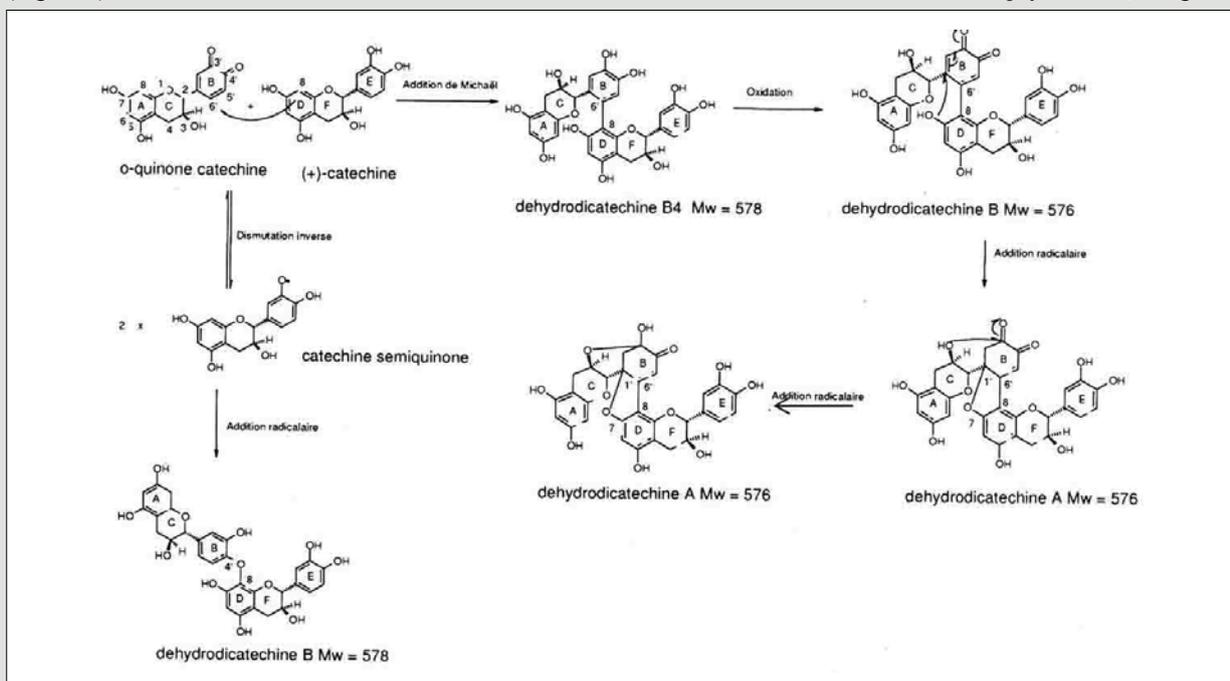


Figure 6. Voie de formation de composés colorés (A, MW = 576) au départ de (+)catéchine.

Des fractions anti-oxydantes très prometteuses ont également été identifiées dans le chocolat [39]. Près de 8000 ppm de procyanidines ont ainsi été retrouvées dans des variétés nobles de cacao (Nacional, Criollo), généralement plus pauvres en arômes (fermentation plus courte) [39]. A ces antioxydants du cacao viennent s'ajouter des mélanoidines très réductrices synthétisées durant la torréfaction du cacao et le conchage du chocolat. Le savoir-faire du chocolatier résidera dans sa capacité à développer les arômes souhaités sans détruire un tel potentiel anti-oxydant.

Une autre découverte importante de notre laboratoire est celle de la présence de resvératrol dans le cacao [40] et le houblon [36,41-43]. Ce stilbène, associé depuis quelques années au *French paradox* et à la consommation de vin rouge, n'y avait jamais été identifié. Parmi les 19 cultivars de houblon investigués, tous contenaient trois stilbènes (*trans*-picéide, *cis*-picéide et *trans*-resvératrol), le premier d'entre eux étant toujours largement majoritaire [41,42] (Figure 7). A l'instar d'autres polyphénols, certaines variétés se sont avérées plus aptes à s'enrichir en stilbènes. Les premières analyses menées sur des pellets américains nous laissaient entrevoir une relation inverse entre stilbènes et acides  $\epsilon$  (substances amères du houblon) [41]. Une étude plus large nous a montré que les choses étaient plus complexes puisque toutes les variétés allemandes contenaient moins de 1.6 mg/kg de *trans*-stilbènes totaux même s'il s'agissait de variétés aromatiques [42]. Ces variétés se

influencent de l'année de récolte a logiquement été observée. Les processus de conditionnement et de stockage jouent également un rôle prépondérant dans la conservation des stilbènes [43]. L'échantillonnage vertical de six variétés américaines nous a permis de tirer plusieurs conclusions intéressantes. La pelletisation provoque une dégradation importante (parfois supérieure à 50 %) du potentiel en stilbènes. L'extrait au  $\text{CO}_2$  supercritique ne contient pas de stilbènes. Par contre, les spents qui en découlent représentent une source particulièrement intéressante sur le plan commercial. Comme l'ont confirmé différents milieux modèles, les stilbènes sont instables, surtout en présence de lumière (100 % de perte après 4 mois de stockage). La dégradation est minimisée pour les pellets conservés à 4 °C dans un emballage opaque. Dès 8 mois de stockage, du *cis*-resvératrol est généralement relargué au départ du glucoside. Le resvératrol est également connu pour sa propension à former des dimères [44]. Si dans les houblons, nous n'avons pas observé l'apparition de ceux-ci, nous avons par contre relevé la présence de  $\epsilon$ viniférine après 10-12 mois de stockage dans des solutions contenant du *trans*-picéide [43].

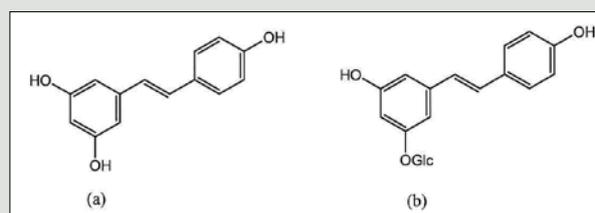


Figure 7. Stilbènes du cacao et du houblon : (a) resvératrol, (b) picéide

### Composition de l'unité INBR

Pour le volet recherche, 14 thèses de doctorat ont été présentées durant les dernières années, dont 2 en 2007 (V. Jerkovic et D. Callemien). L'unité compte actuellement 4 doctorants (S. Bailly, J. Laille, J. Gros, E. Monnart ; promoteur : S. Collin) ainsi que plusieurs mémorants (Masters Bioingénieurs et Master interuniversitaire en Sciences et Technologie des Aliments).

Plusieurs membres de l'Unité INBR (principalement Ir. L. Mélotte, Ing. Bras. M. Maudoux, Ing. M. Bröhan, E. Bodart, S. Nizet, P. Riguelle, A. Timmermans, Ch. Van Goethem) participent également aux activités du Centre de Référence pour la Qualité des Malts et de la Bière (CRQMB, analyses et consultance principalement au service des brasseurs et malteurs).

2 Professeurs invités issus de l'industrie (S. Dupire et L. Gijs) participent à l'enseignement spécialisé en brasserie (Master Bioingénieur : chimie et bioindustries – option 12C Brasserie/Diplôme international de 2 ans avec l'Université de Nancy et Master spécialisé de 1 an).

- [1] J. A. Khan, L. Gijs, C. Berger, N. Martin, G. Piraprez, H. E. Spinnler, E. N. Vulfsen & S. Collin. « Combinatorial approach to flavor analysis. I. Preparation and characterization of a S-methyl thioester library. » *J. Agric. Food Chem.*, **47** (1999), 3269-3273.
- [2] C. Berger, N. Martin, S. Collin, L. Gijs, J. A. Khan, G. Piraprez, H. E. Spinnler & E. N. Vulfsen. « Combinatorial approach to flavor analysis. 2. Olfactory investigation of a library of S-methyl thioesters and sensory evaluation of selected components. » *J. Agric. Food Chem.*, **47** (1999), 3274-3279.
- [3] Ch. Guyot-Declerck, N. François, C. Ritter, B. Govaerts & S. Collin. « Influence of pH and ageing on beer organoleptic properties. A sensory analysis based on AEDA data. » *Food Quality & Preference*, **16** (2005), 157-162.
- [4] C. Vermeulen, J. Pellaud, L. Gijs & S. Collin. « Combinatorial synthesis and sensorial properties of polyfunctional thiols. » *J. Agric. Food Chem.*, **49** (2001), 5445-5449.
- [5] C. Vermeulen & S. Collin. « Synthesis and sensorial properties of mercaptoaldehydes. » *J. Agric. Food Chem.*, **50** (2002), 5654-5659.
- [6] C. Vermeulen & S. Collin. « Combinatorial synthesis and sensorial properties of 21 mercapto esters. » *J. Agric. Food Chem.*, **51** (2003), 3618-3622.
- [7] C. Vermeulen & S. Collin. « Combinatorial synthesis and sensorial properties of mercapto primary alcohols and analogs. » *J. Agric. Food Chem.*, **51** (2003), 3623-3628.
- [8] C. Vermeulen & S. Collin. « Combinatorial synthesis and screening of novel odorants such as polyfunctional thiols. » *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, **9** (2006), 583-590.
- [9] S. Collin, C. Liégeois, S. Noël & G. Lermusieau. How labeled precursors synthesized in the kettle can release deuterated nonenal by a non-oxidative pathway during beer storage. » *European Brewery Convention*, IRL Press, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom (1999), 113-122.
- [10] S. Noël, N. Metais, S. Bonte, E. Bodart, F. Peladan, S. Dupire & S. Collin. « The use of oxygen 18 in appraising the impact of oxidation processes during beer storage. » *J. Inst. Brew.*, **105** (1999), 269-274.
- [11] S. Noël, C. Liégeois, G. Lermusieau, E. Bodart, C. Badot & S. Collin. « Release of deuterated nonenal during beer aging from labeled precursors synthesized in the boiling kettle. » *J. Agric. Food Chem.*, **47** (1999), 4323-4326.
- [12] G. Lermusieau, S. Noël, C. Liégeois & S. Collin. « Non-oxidative mechanism for development of trans-2-nonenal in beer. » *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **57** (1999), 29-33.
- [13] C. Liégeois, N. Meurens, C. Badot & S. Collin. « Release of deuterated (E)-2-nonenal during beer aging from labeled precursors synthesized before boiling. » *J. Agric. Food Chem.*, **50** (2002), 7634-7638.
- [14] Ph. Perpète & S. Collin. « Contribution of 3-methylthiopropionaldehyde to the worty flavor of alcohol-free beers. » *J. Agric. Food Chem.*, **47** (1999), 2374-2378.
- [15] L. Gijs, Ph. Perpète, A. Timmermans & S. Collin. « 3-Methylthiopropionaldehyde as precursor of dimethyltrisulfide in aged beers. » *J. Agric. Food Chem.*, **48** (2000), 6196-6199.
- [16] L. Gijs & S. Collin. « Effect of the reducing power of a beer on dimethyltrisulfide production during aging. » *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **60** (2002), 68-70.
- [17] L. Gijs, F. Chevanec, V. Jerkovic & S. Collin. « How low pH can intensify  $\epsilon$ -damascenone and dimethyltrisulfide production through aging. » *J. Agric. Food Chem.*, **50** (2002), 5612-5616.
- [18] F. Chevanec, Ch. Guyot-Declerck, J. Dupont & S. Collin. « Investigation of the  $\epsilon$ -damascenone level in fresh and aged commercial beers. » *J. Agric. Food Chem.*, **50** (2002), 3818-3821.
- [19] D. Callemien, S. Dasnoy & S. Collin. « Identification of a stale-beer-like odorant in extracts of naturally aged beer. » *J. Agric. Food Chem.*, **54** (2006), 1409-1413.
- [20] Ch. Counet, D. Callemien, C. Ouwerx & S. Collin. « Use of GC-olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. » *J. Agric. Food Chem.*, **50** (2002), 2385-2391.
- [21] Ch. Counet, C. Ouwerx, D. Rosoux & S. Collin. « Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. » *J. Agric. Food Chem.*, **52** (2004), 6243-6249.
- [22] C. Vermeulen, L. Gijs & S. Collin. « Sensorial contribution and formation pathways of thiols in foods: a review. » *Food Rev. Int.*, **21** (2005), 69-138.
- [23] G. Lermusieau, M. Bulens & S. Collin. « Use of GC-olfactometry to identify the hop aromatic compounds in beer. » *J. Agric. Food Chem.*, **49** (2001), 3867-3874.
- [24] C. Vermeulen, D. Callemien, S. Bailly & S. Collin. « Occurrence of polyfunctional thiols in fresh and aged lager beers. New additional synthesis pathway for 3-methyl-2-buten-1-thiol (MBT). » *European Brewery Convention*, Nürnberg, Germany, Fachverlag Hans Carl (2005), n°93, 829-832.
- [25] C. Vermeulen, I. Lejeune, Tran T.T.H. & S. Collin. « Occurrence of polyfunctional thiols in fresh lager beers. » *J. Agric. Food Chem.*, **54** (2006), 5061-5068.
- [26] L. Gijs, Ph. Perpète, A. Timmermans, Ch. Guyot-Declerck, P. Delincé & S. Collin. « Assessment of added glutathione in yeast propagations, wort fermentations and beer storage. » *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **62** (2004), 97-102.
- [27] P. Perpète, L. Mélotte, S. Dupire & S. Collin. « Varietal discrimination of hop pellets. I. Comparison of fresh samples. » *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **56** (1998) 104-108.
- [28] G. Lermusieau & S. Collin. « Varietal discrimination of hop pellets. II. Comparison between fresh and aged samples. » *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **59** (2001), 39-43.
- [29] I. Rafika, C. Vermeulen, A. Benzekri & S. Collin. « Screening for key odorants in Moroccan green olives by GC-Olfactometry/Aroma Extract Dilution Analysis. » *J. Agric. Food Chem.*, **53** (2005), 1179-1184.
- [30] S. Bailly, V. Jerkovic, J. Marchand-Brynaert & S. Collin. « Aroma Extraction Dilution Analysis of Sauternes Wines. Key Role of Polyfunctional Thiols. » *J. Agric. Food Chem.*, **54** (2006), 7227-7234.
- [31] Ch. Guyot-Declerck, S. Renson, A. Bouseta & S. Collin. « Floral quality and discrimination of *Lavandula stoechas*, *Lavandula angustifolia* and *Lavandula angustifolia x latifolia* honeys. » *Food Chem.*, **79** (2002), 453-459.
- [32] D. Callemien, S. Dasnoy, O. Heynen, C. Badot & S. Collin. « Flavour stability of lager beer: identification of a new key staling compound. » *European Brewery Convention*, Nürnberg, Germany, Fachverlag Hans Carl (2005), n°91, 815-822.
- [33] C. Liégeois, G. Lermusieau & S. Collin. « Measuring antioxidant efficiency of worts, malt and hops against the 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. » *J. Agric. Food Chem.*, **48** (2000), 1129-1134.
- [34] G. Lermusieau, C. Liégeois & S. Collin. « Reducing power of hop cultivars and beer aging. » *Food Chem.*, **72** (2001), 413-418.
- [35] Ch. Counet & S. Collin. « Effect of the number of flavonol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate. » *J. Agric. Food Chem.*, **51** (2003), 6816-6822.
- [36] D. Callemien, V. Jerkovic, R. Rozenberg & S. Collin. « Hop as an interesting source of resveratrol for brewers: optimization of the extraction and quantitative study by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. » *J. Agric. Food Chem.*, **53** (2005), 424-429.
- [37] D. Callemien & S. Collin. « Use of RP-HPLC-ESI (-)-MS/MS to differentiate various proanthocyanidin isomers in lager beer extracts. » *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **66** (2008), sous presse.
- [38] D. Callemien & S. Collin. « Involvement of Flavonoids in Beer Color Instability during Storage. » *J. Agric. Food Chem.*, **55** (2007), 9066-9073.
- [39] Ch. Counet, D. Callemien, C. Ouwerx & S. Collin. « Use of gas chromatography-olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. » *J. Agric. Food Chem.*, **50** (2002), 2385-2391.
- [40] Ch. Counet, D. Callemien & S. Collin. « Chocolate and cocoa: new sources of trans-resveratrol and trans-piceid. » *Food Chem.*, **96** (2006), 649-657.
- [41] V. Jerkovic, D. Callemien & S. Collin. « Determination of stilbenes in hop pellets from different cultivars. » *J. Agric. Food Chem.*, **53** (2005), 4202-4206.
- [42] V. Jerkovic & S. Collin. « Occurrence of resveratrol and piceid in american and european hop cones. » *J. Agric. Food Chem.*, **55** (2007), 8754-8758.
- [43] V. Jerkovic & S. Collin. « Fate of resveratrol and piceid through different hop processings and storage times. » *J. Agric. Food Chem.*, **56** (2008), 584-590.
- [44] V. Jerkovic, F. Nguyen, S. Nizet & S. Collin. « Combinatorial synthesis, reversed-phase and normal-phase high-performance liquid chromatography elution data and liquid chromatography/positive atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectra of methoxylated and glycosylated resveratrol analogues. » *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **21**, (2007) 2456-2466.