

BIOTRANSFORMACIÓN

MITOS Y REALIDADES



Hola, ¿qué
Tiol?



Tengo
mucho
Lyasa

TEORÍA & EXPERIENCIAS EN
BIOTRANSFORMACIÓN DE TERPENOIDES,
GLUCÓSIDOS & LIBERACIÓN DE TIOLES

¿QUIÉNES SOMOS?

Leandro Meiners



Laboratorio de Cerveza & Tap Room

@placebo.brewing



@birratecnia

Matías Cavanna



@cervezadosdingos



CONTENIDO

X Biotransformación

- Definición, tipos de biotransformación y trabajos de investigación en:
 - X Terpenoides
 - X Glucósidos
 - X Tioles
- Resultados y experiencias de investigación de **BIRRATECNIA**



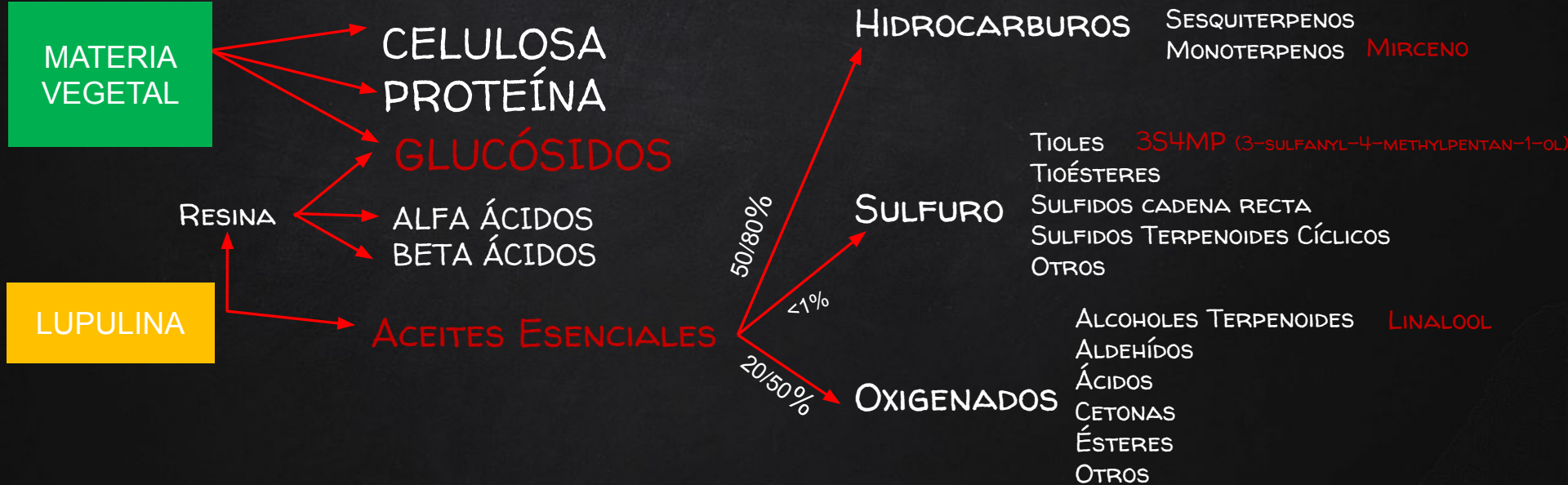
BIOTRANSFORMACIÓN

- ✗ Definición: la transformación de un compuesto (en este caso presente en el mosto) iniciada por un microorganismo

- ✗ Dos clases de biotransformación que nos importan:
 - La modificación de un compuesto aromático en otro aromático (por ejemplo, la conversión de geraniol en citronelol)
 - La hidrólisis (ruptura) o liberación de un compuesto, de los cuales al menos uno de los compuestos resultantes es aromático



COMPUESTOS DEL LÚPULO





MONOTERPENOIDES: ¿QUE SON?

- ✗ Monoterpenos modificados con un grupo oxigenado (alcohol) o con un grupo metílico faltante.

LINALOOL



NEROL



GERANIOL



α -TERPINEOL



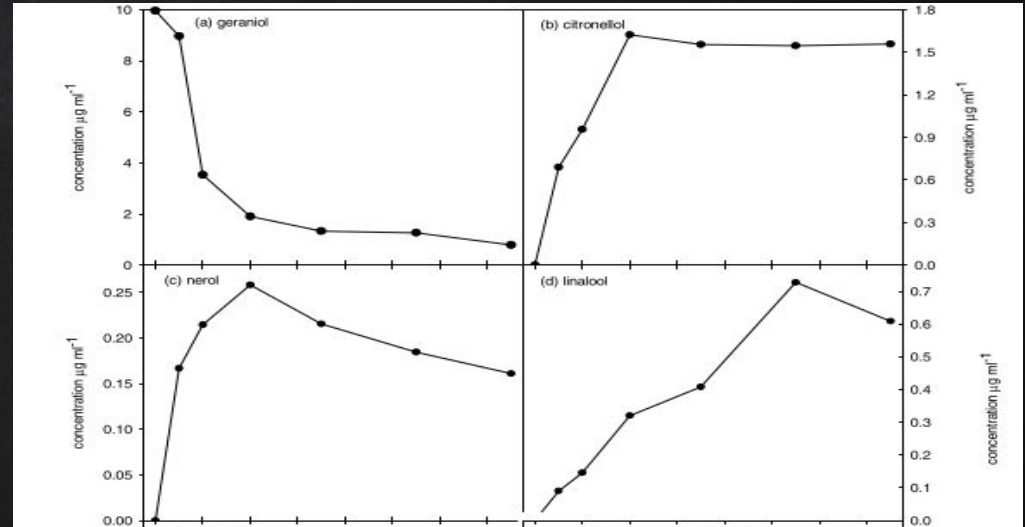
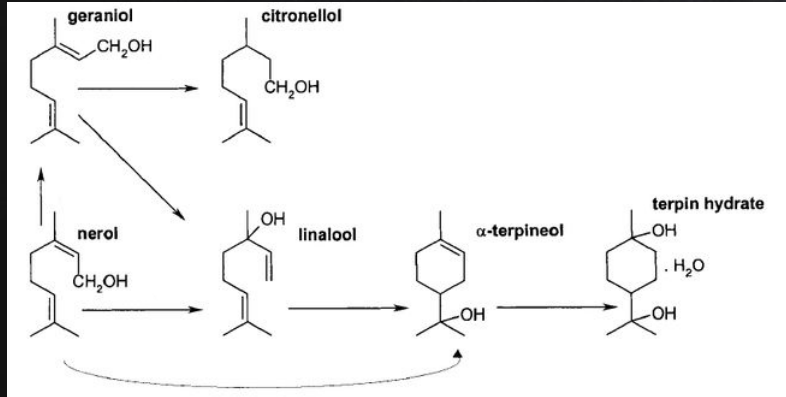
β -CITRONELLOL





BIOTRANSFORMACIÓN DE MONOTERPENOS

✗ (King & Dickinson, 2003)

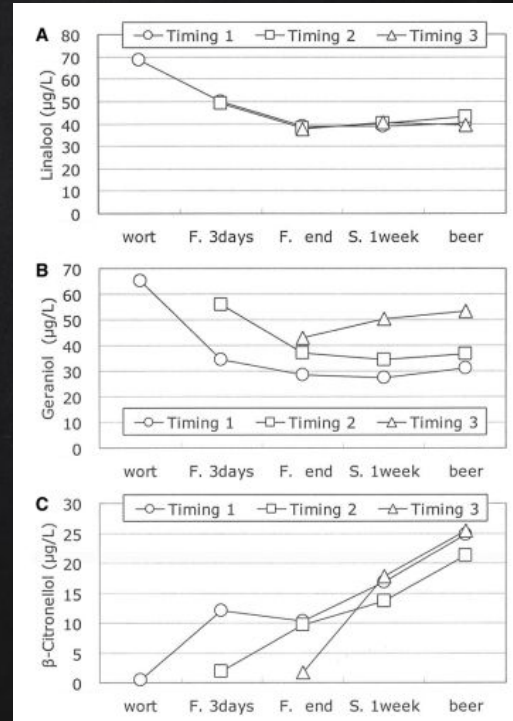




BIOTRANSFORMACIÓN DE MONOTERPENOS: MOMENTOS DE ADICIÓN

✗ (Takoi et al., 2014)

- El contenido de geraniol en la cerveza puede ser aumentado realizando la adición post etapa de crecimiento de la levadura
- El contenido de β -citronellol (generado por biotransformación) no depende del momento de adición y sigue sucediendo incluso en el almacenaje
- Linalool se mantiene estable





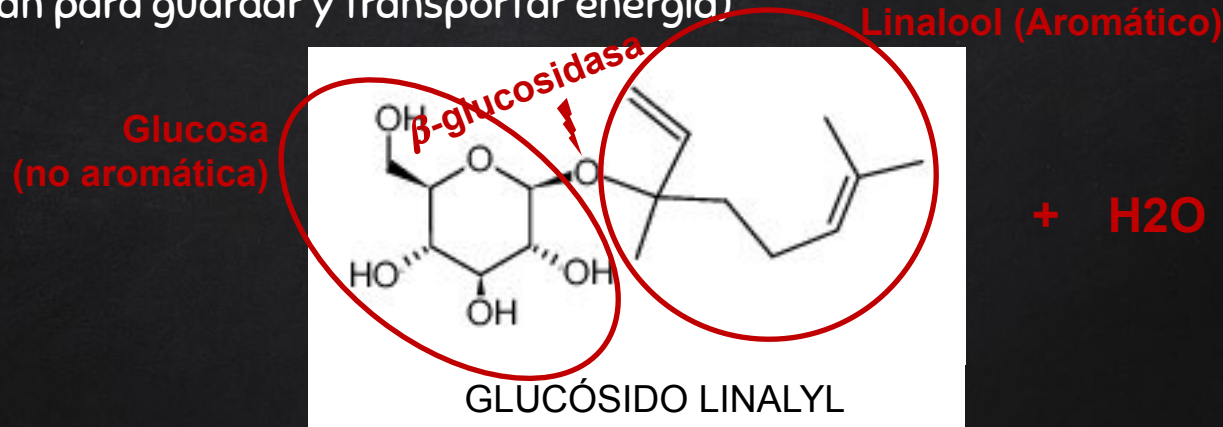
RESUMEN – BIOTRANSFORMACIÓN DE MONOTERPENOIDES: MITOS & REALIDADES

- ✗ La biotransformación de monoterpenoides se produce durante la fermentación por la levadura (King & Dickinson, 2003)
- ✗ La biotransformación de monoterpenoides no ocurre sobre todos los terpenoides; por ejemplo si el geraniol/nerol/linalool pero no otros... (King & Dickinson, 2003)
- ✗ Levaduras ale y lager pueden realizar la biotransformación pero las transformaciones que realizan son diferentes (King & Dickinson, 2003)
- ✗ Los momentos de adición tienen un impacto sobre la cerveza pero no lo que comúnmente se dice... (Takoi et al., 2014).
- ✗ No hay en la bibliografía información sobre las cepas y sus capacidades de biotransformación de terpenoides; sólo experiencias



GLUCÓSIDOS: ¿QUE SON? Y COMO SE BIOTRANSFORMAN

- ✗ Glucósido es una molécula (ni volátil ni aromática) dónde un azúcar está unida a otro grupo funcional llamado aglicona a través de un enlace glicosídico (plantas lo generan para guardar y transportar energía)



- ✗ En el caso de biotransformación de compuestos del lúpulo, la aglicona se trata de un compuesto aromático, que puede ser liberado del azúcar por acción de una enzima.



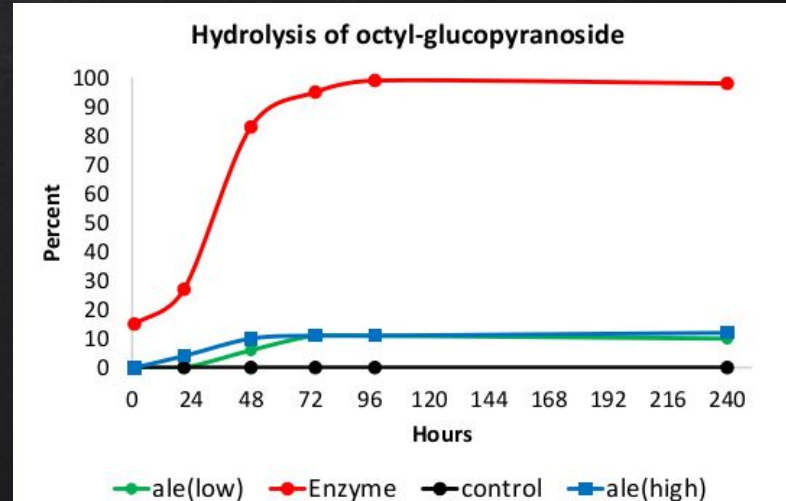
KOLLMANNNSBERGER, BIENDL, & NITZ, 2006

Enzymatic hydrolysis β -Glucosidase, pH 5, 24 h, 40 °C	Addition of enzyme	Without enzyme
3(Z)-Hexenol	9	0
1-Octen-3-ol	484	0
1,5-Octadien-3-ol	39	0
Linalool	9	0
α -Terpineol	17	0
8-Hydroxy-linalool I	6	0
8-Hydroxy-linalool II	32	0
Benzylalcohol	82	15
3-Hydroxy-7,8-dihydro- β -ionol	10	0



¿MITO O REALIDAD?

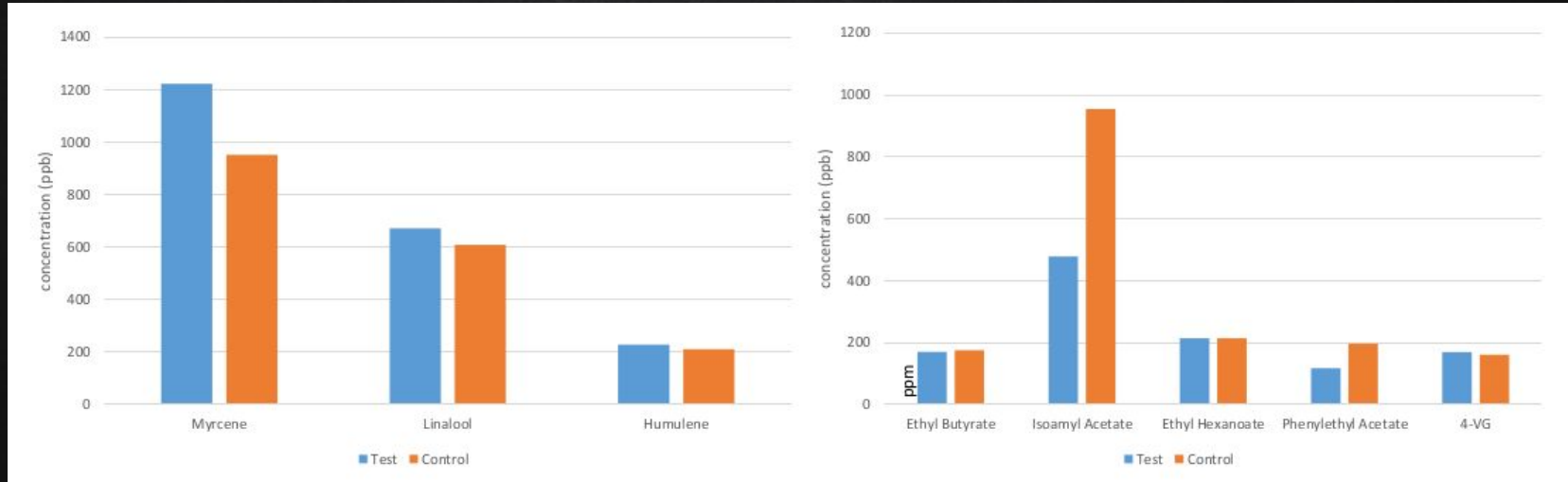
- ✗ (Sharp, Steensels, & Shellhammer, 2017): registran la liberación, durante la fermentación, de una aglicona a partir de un glicósido “artificial” agregado:





ANALÍTICO: EXPERIMENTO DE KIRKPATRICK (NEW BELGIUM)

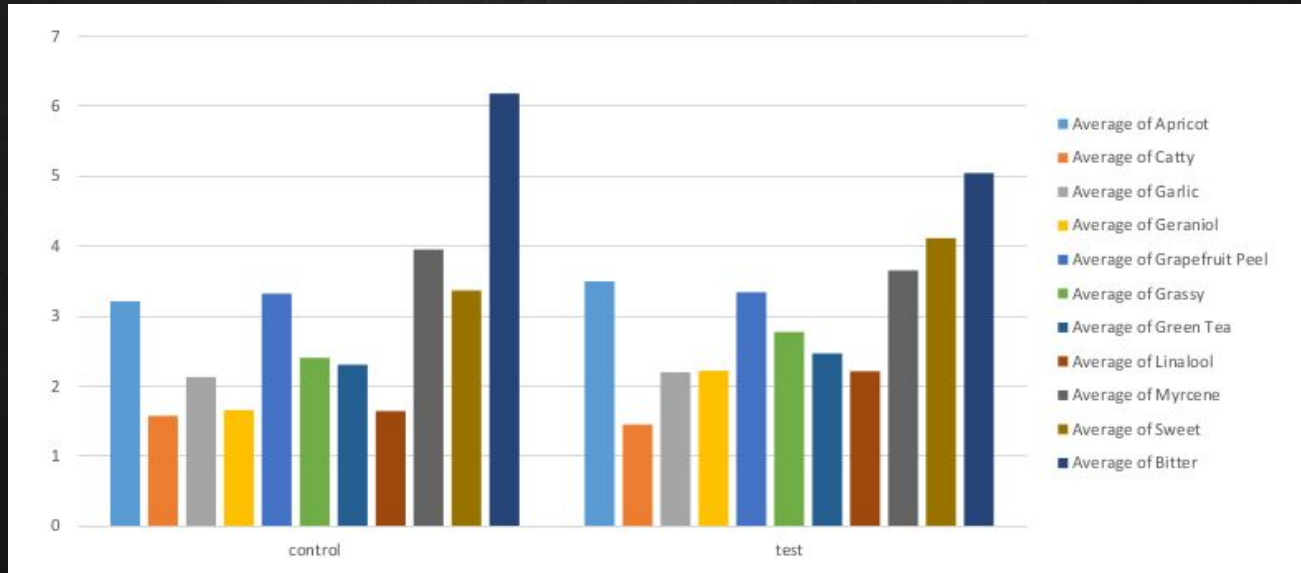
✗ No observan un cambio significativo medible mediante SPME-GCMS





SENSORIAL: EXPERIMENTO DE KIRKPATRICK (NEW BELGIUM)

✗ Sensorial les da más significativo: ¿tíoles? ¿sinergia?





RESUMEN – BIOTRANSFORMACIÓN DE GLUCÓSIDOS: MITOS & REALIDADES

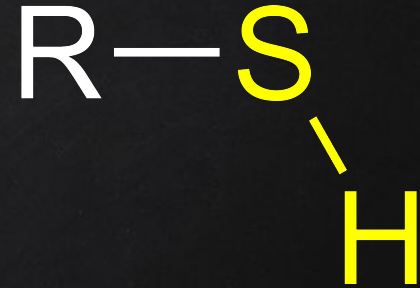
- ✗ La biotransformación de Glucósidos libera compuestos con impacto aromático (Kollmannsberger, Biendl, & Nitz, 2006)
- ✗ La biotransformación de Glucósidos por las levaduras o mediante enzimas es un realidad: (Sharp, Steensels, & Shellhammer, 2017)
- ✗ De querer liberar glucósidos con impacto significativo es necesario el uso de enzimas exógenas (Sharp, Steensels, & Shellhammer, 2017)
- ✗ La biotransformación usando lúpulos no produjo cambios significativos en las concentraciones de compuestos aromáticos pero si a nivel sensorial: Experimento de Kirkpatrick (2016)
- ✗ La biotransformación de Glucósidos no se produce con extractos de CO₂ (Kollmannsberger, Biendl, & Nitz, 2006)



¿QUÉ SON LOS TIOLES?

✗ Organosulfidos, análogo sulfuro (en lugar de oxígeno) de los alcoholes. Son Compuestos volátiles de alto impacto aromático

✗ Presentes en plantas, frutas, y comidas



✗ En el vino ya se hablaba del impacto de los tioles desde mediados de los '90

- (Darriet et al., 1995) $\Rightarrow$ tioles en Sauvignon Blanc
- (Jan H. Swiegers et al., 2007) $\Rightarrow$ levadura GMO para “liberar tioles”



TIOLES IMPORTANTES

- ✗ 4MMP (4-Mercapto-4-metil-2-pentanona): boj / grosella negra (cassis) / orina de gato
- ✗ 3MH (3-mercaptohexan-1-ol): maracuyá
- ✗ 3MHA (acetato de 3-mercaptohexilo): boj / cassis / maracuyá

- ✗ Umbrales de percepción bajísimos (Swiegers & Pretorius, 2007):
 - 4MMP: 0.0008 ppb
 - 3MH: 0.06 ppb
 - 3MHA: 0.004 ppb



¿QUÉ IMPACTO TIENEN?

- ✗ Impacto sobre el perfil varietal de un lúpulo:
 - Ejemplo de Nelson Sauvin: (Takoi et al., 2009b) determinan que un tiol (3M4MP) es lo que caracteriza organolépticamente a esta variedad

- ✗ Sinergia con otros compuestos aromáticos:
 - Efecto aditivo con linalool y geraniol en dosis por debajo del umbral de percepción del tiol 4MSP (Takoi et al., 2016)

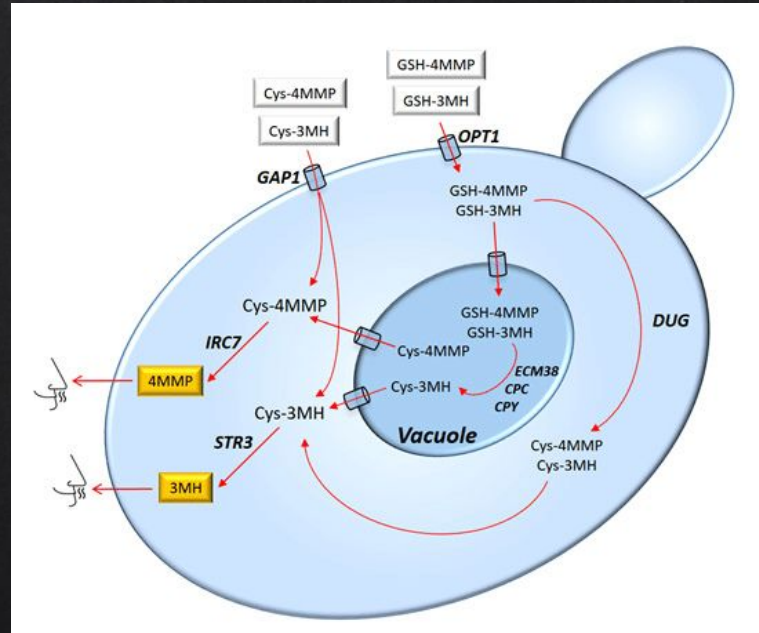


PRECURSORES DE LOS TIOLES

- ✗ Precursores son no-aromáticos (retienen al tiol)
- ✗ Precursores de tioles identificados en cerveza:
 - Lúpulo: (Gros et al., 2012) y (Roland et al., 2016) 
 - Malta: (Dagan et al., 2016) 
- ✗ Dos clases:
 - Conjugado de S-cisteína $\Rightarrow$ liberados mediante β -liasa (prefijo Cys al nombre del tiol)
 - Conjugados de glutatión (prefijo G al nombre del tiol)
 - son pro-precursores $\Rightarrow$ proteína que “contiene” al precursor
 - convertidos en precursores Cys mediante la acción de dos enzimas (γ -glutamil-transpeptidasa y carboxipeptidasa)



LIBERACIÓN POR LA LEVADURA

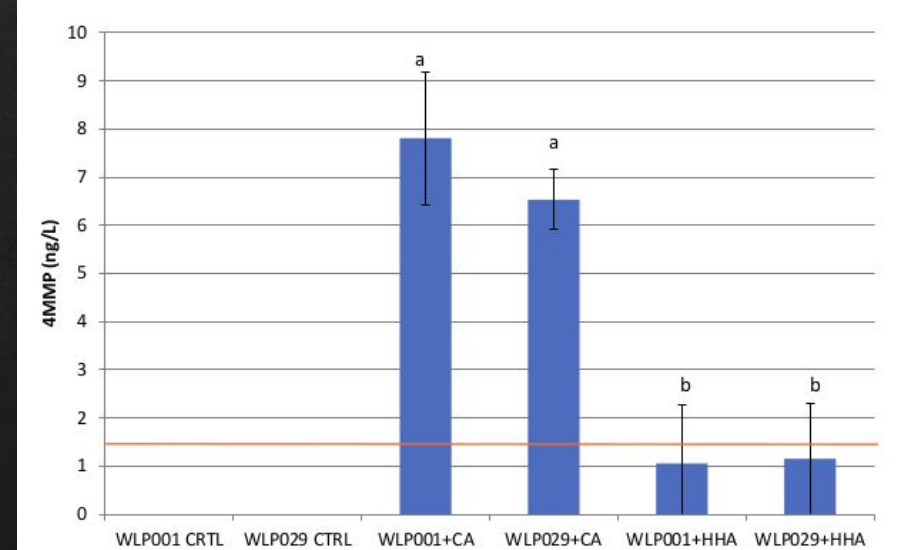
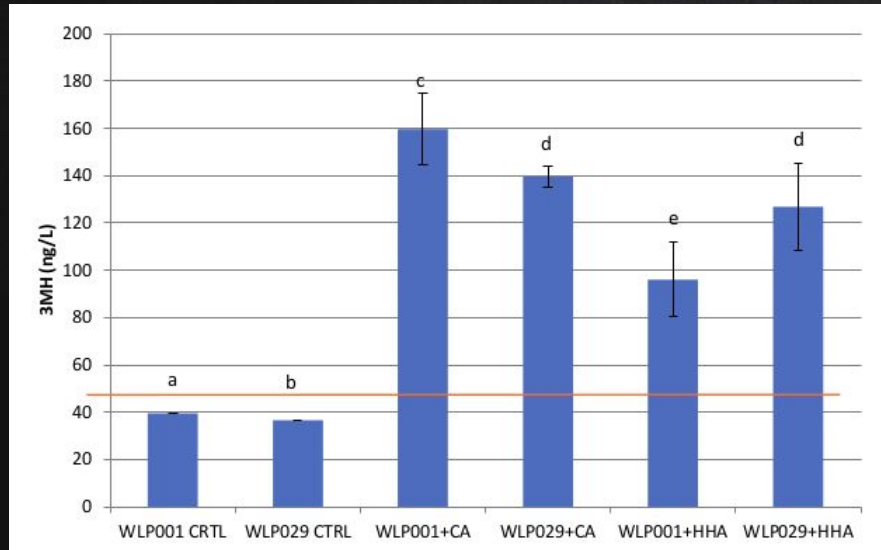


(Belda et al., 2017)



¿QUÉ SABEMOS DE LAS CEPAS DE LEVADURAS Y LOS TIOLES?

WLP001 vs. WLP029 (CA: Cascade & HHA: Hallertauer Mittelfrüh)



(DH @ 4 mL oil/hL)

(Matsche et al., 2018)



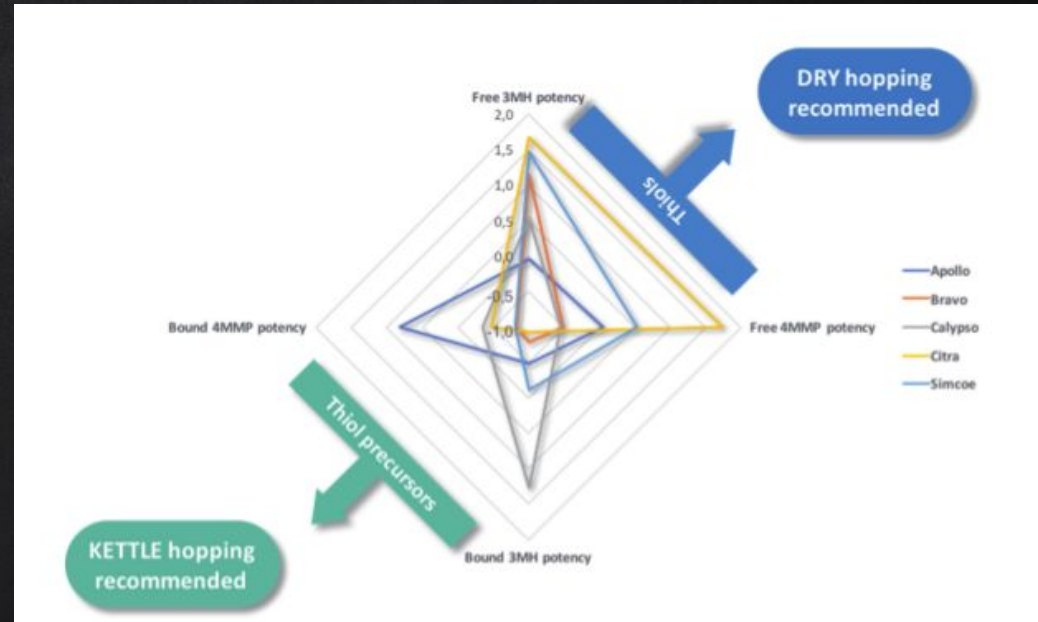
RESUMEN – BIOTRANSFORMACIÓN DE TIOLES: MITOS & REALIDADES

- ✗ La biotransformación/liberación de Tioles es una realidad y los precursores provienen del lúpulo (Gros et al., 2012) & (Roland et al., 2016) y la malta (Dagan et al., 2016)
- ✗ La biotransformación de Tioles ocurre por una enzima producida por algunas cepas de levaduras y otros microorganismos (Belda et al., 2017) y (Matsche et al., 2018); no todas las cepas exhiben la misma actividad (Michel et al., 2019)
- ✗ La biotransformación de Tioles libera compuestos aromáticos de baja umbral de percepción (Swiegers & Pretorius, 2007) y que tienen sinergia con otros componentes aromáticos del lúpulo (Takoi et al., 2016)



¿CÓMO NOS APROVECHAMOS?

(Roland et al., 2017) propone la medida de “potencia de tioles”, que pondera la concentración de tioles (libres o precursores) con respecto al umbral de percepción. En base a la relación entre la potencia de tioles libres y precursores recomienda su uso:





¿CÓMO NOS APROVECHAMOS?

- ✗ Whirlpool ⇒
 - pérdida de 4MMP
 - liberación de precursores 3MH
- ✗ DH en fermentación ⇒
 - liberación mediante β -liasa de la levadura
 - Transferencia (4MMP) en 1 a 2 días de DH (Reglitz et al., 2018)
- ✗ Búsqueda de cepas de levadura con:
 - alta actividad de β -liasa
 - alta capacidad de conversión de 3MH en 3MHA



EXPERIENCIA BIRRATECNIA



BIRRATECNIA

CIENCIA & TECNICA CERVECERA



ENZIMAS



Endozym Thiol: es un preparado enzimático pectolítico líquido de actividad secundaria específica, que favorece la hidrólisis de los precursores aromáticos tiólicos de la uva.

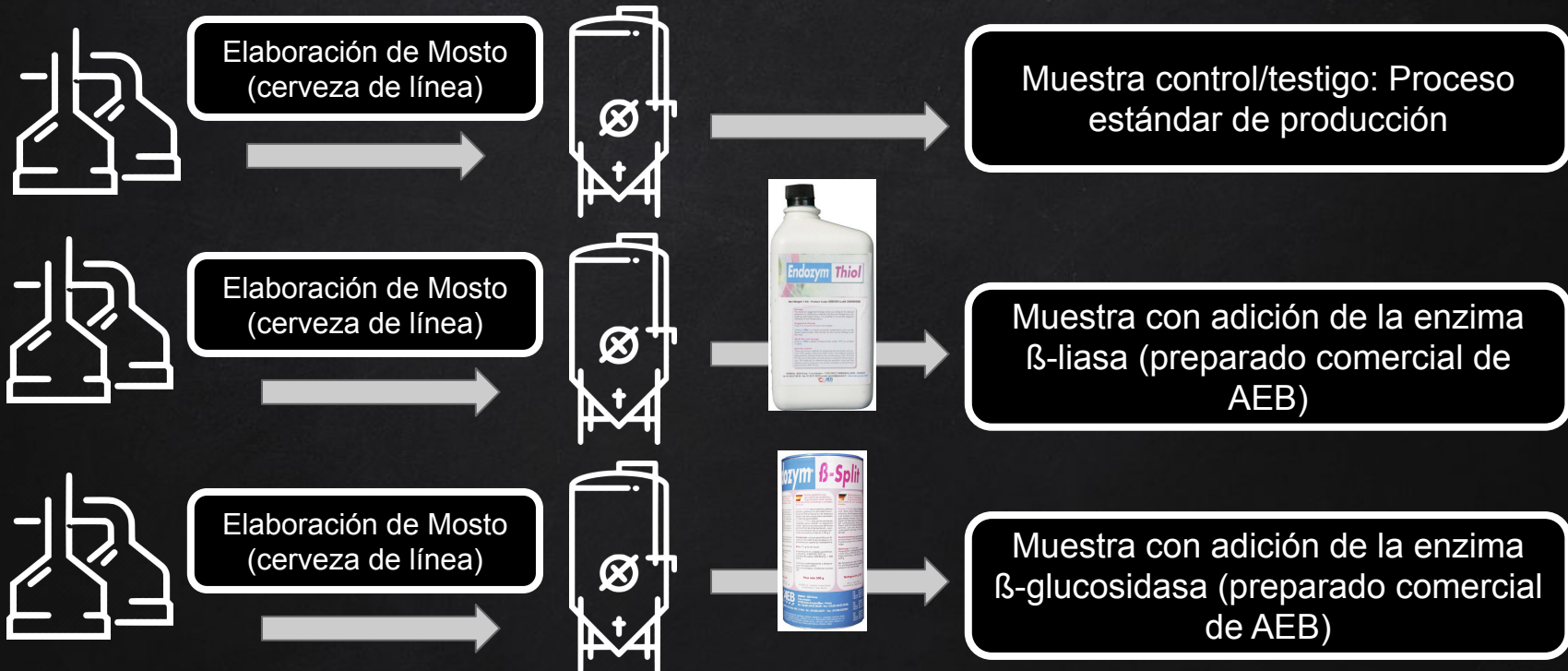


Endozym B-Split: Endozym B-Split es una enzima pectolítica líquida de elevada actividad β -glucosidásica capaz de aumentar de manera considerable la intensidad aromática en los vinos.

¡Gracias Alimentarg por suministrar las enzimas!



DISEÑO EXPERIMENTAL





¿FUNCIONÓ? ¿CÓMO SE?: CATA TRIANGULAR

- ✗ Para determinar si una muestra es **significativamente** diferente del control se utiliza una cata triangular
- ✗ La cata triangular consiste en presentar tres muestras a cada participante, dos de las cuales son iguales, e ir alternando entre los catadores si son dos del control o de la muestra tratada
- ✗ Si el número de catadores es grande, mediante un análisis estadístico podemos determinar, con un cierto grado de confianza, si las dos muestras son o no diferentes



CATA TRIANGULAR PARA ANALIZAR RESULTADOS



¡Muchas gracias a los 29 jueces y cerveceros que participaron!

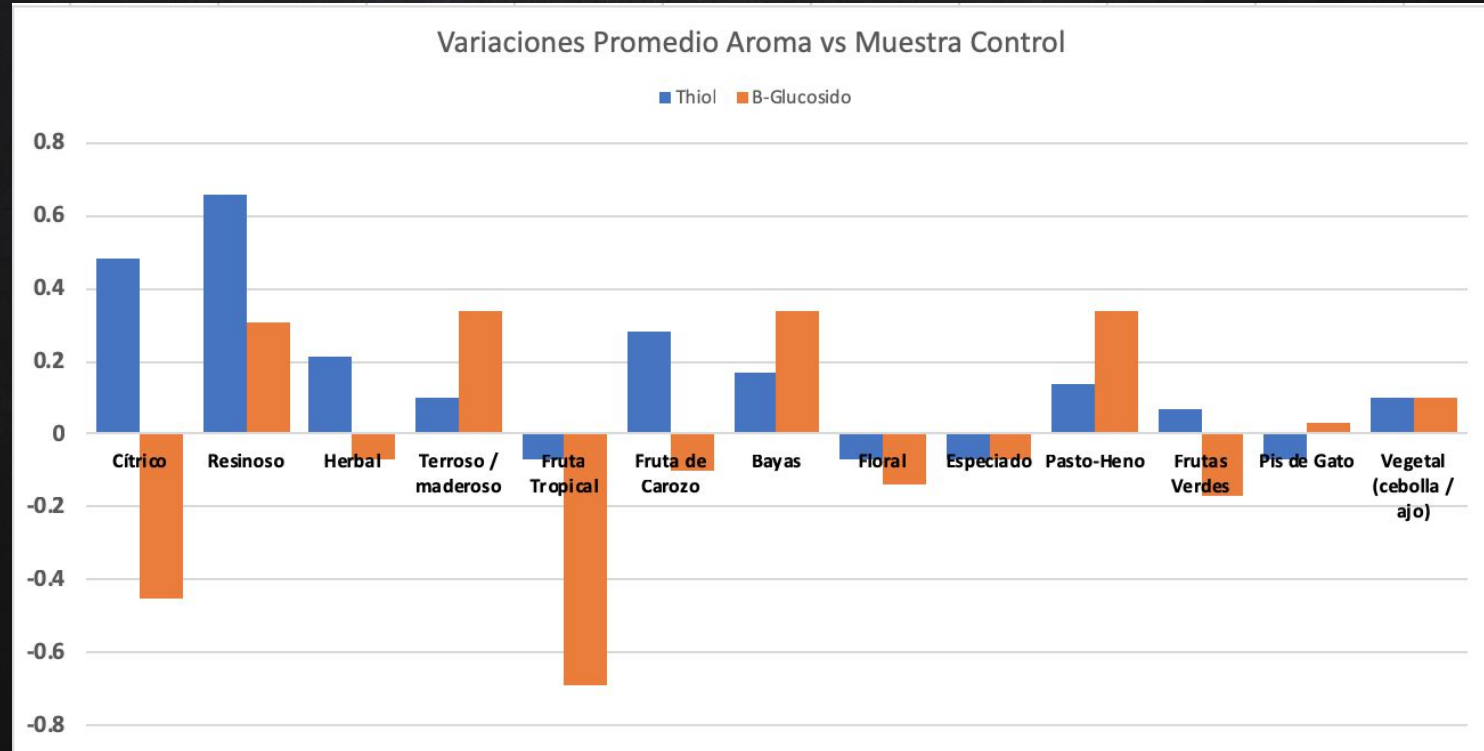


RESULTADOS

	Cata Triangular Tioles	Cata Triangular Glucósidos	Preferencia (rta correcta)
# Participantes	29	25	Normal = 10 Enzima = 4 Sin Preferencia = 2
# Rta Correcta	16	20	Normal = 12 Enzima = 7 Sin Preferencia = 1
¿Significativo?	SI (> 14) (valor $p = 0.013$)	SI (> 13) (valor $p = 0.000002$)	-

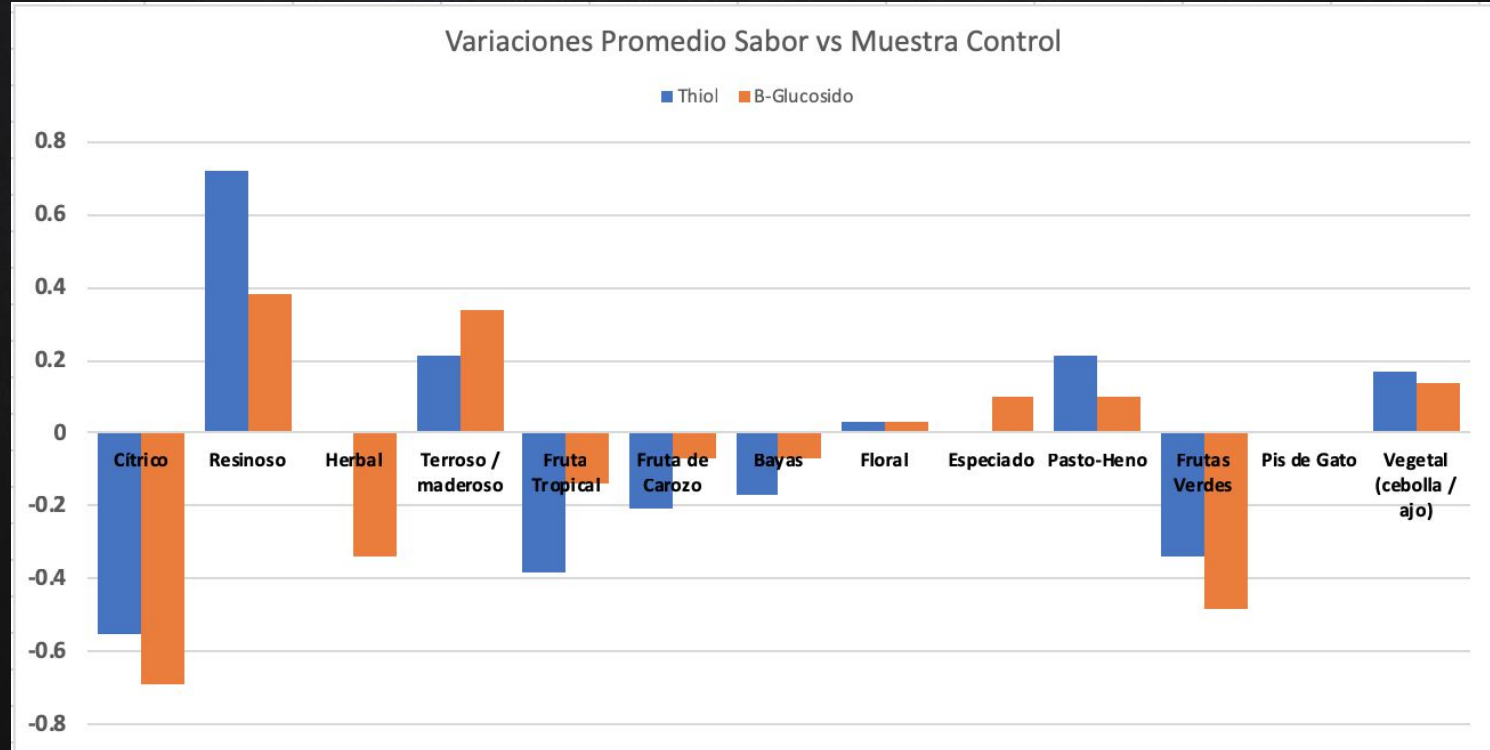


RESULTADOS DE LA CATA DESCRIPTIVA: AROMA





RESULTADOS DE LA CATA DESCRIPTIVA: SABOR





TRABAJOS FUTUROS

- ✗ Remediar la limitación experimental: Utilizar un mismo mosto para controlar posibles diferencias entre lotes y tiempos de embarrilado
- ✗ Preparar distintos mostos para compensar el descenso de densidad causada por la actividad enzimática $\Rightarrow$ ver si en cuanto a aroma y sabor a lúpulo hay una diferencia significativa
- ✗ Entre los catadores que indicaron la muestra correcta para las muestras tratadas con enzimas, indicaron que había un cierto “harsh” en la versión con enzimas o “menor tomabilidad” o un amargor más intenso $\Rightarrow$ ver si se debe a la densidad final más baja



MÁS INFORMACIÓN

- ✕ Nuestro podcast: <https://anchor.fm/birratecnia>
- ✕ Blog Zythología (de Leandro): <https://zythologia.home.blog>
- ✕ Bibliografía académica...



BIRRATECNIA

CIENCIA & TECNICA CERVECERA

¿Preguntas?

@birratecnia
birratecnia@gmail.com



REFERENCIAS GLUCÓSIDOS: I

- ✕ King, A. J., & Dickinson, J. R. (2003). Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts. *FEMS Yeast Research*, 3(1), 53–62. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2003.tb00138.x>
- ✕ Meilgaard, M. C. (1986). The flavor of beer in Food flavours – Part B: The flavour of beverages (I. D. Morton & A. J. Macleod, eds.). Amsterdam: Elsevier.
- ✕ Nielsen, T. (2009). Character impact hop aroma compounds in ale. *Op Flavor and Aroma – Proceedings of the 1st International Brewers Symposium Master Brewers Association of the Americas*.
- ✕ Nizet, S., Gros, J., Peeters, F., Chaumont, S., Robiette, R., & Collin, S. (2013). First Evidence of the Production of Odorant Polyfunctional Thiols by Bottle Refermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 71(1), 15–22. <https://doi.org/10.1094/asbcj-2013-0117-01>
- ✕ Peacock, V. E., & Deinzer, M. L. (1981). Chemistry of Hop Aroma in Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 39. <https://doi.org/10.1094/asbj-39-0136>
- ✕ Praet, T., Van Opstaele, F., Jaskula-Goiris, B., Aerts, G., & De Cooman, L. (2012). Biotransformations of hop-derived aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* upon fermentation. *Cerevisia*, 36(4), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.cervis.2011.12.005>



REFERENCIAS GLUCÓSIDOS: II

- ✕ Cibaka, M.-L. K., Ferreira, C. S., Decourrière, L., Lorenzo-Alonso, C.-J., Bodart, E., & Collin, S. (2017). Dry Hopping with the Dual-Purpose Varieties Amarillo, Citra, Hallertau Blanc, Mosaic, and Sorachi Ace: Minor Contribution of Hop Terpenol Glucosides to Beer Flavors. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 75(2), 122–129. <https://doi.org/10.1094/asbcj-2017-2257-01>
- ✕ Daenen, L., Saison, D., Sterckx, F., Delvaux, F. R., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. (2007). Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03566.x>
- ✕ Daenen, L., Sterckx, F., Delvaux, F., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. (2008). Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a *Brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) used in the production of special fruit beers. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1103–1114. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00421.x>
- ✕ Goldstein, H., Ting, P., Navarro, A., & Ryder, D. (1999). Water-soluble hop flavor precursors and their role in beer flavor. *Proceedings of Congress European Brewery Convention*, 27, 53–62.
- ✕ Kollmannsberger, H., Biendl, M., & Nitz, S. (2006). Occurrence of glycosidically bound flavour compounds in hops, hop products and beer. *Monatsschr. Brauwiss*, 5, 83–89.



REFERENCIAS GLUCÓSIDOS: III

- ✕ Murakami, A., Navarro, A., Ryder, D., & Goldstein, H. (2006). Use of glycosides extracted from hop plant parts to flavor malt beverages. Retrieved from <https://patents.google.com/patent/US20030211788>
- ✕ Sharp, D. C., Steensels, J., & Shellhammer, T. H. (2017). The effect of hopping regime, cultivar and β -glucosidase activity on monoterpene alcohol concentrations in wort and beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(2), 185–191. <https://doi.org/10.1002/jib.418>
- ✕ Takoi, K., Koie, K., Itoga, Y., Katayama, Y., Shimase, M., Nakayama, Y., & Watari, J. (2010). Biotransformation of Hop-Derived Monoterpene Alcohols by Lager Yeast and Their Contribution to the Flavor of Hopped Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5050–5058. <https://doi.org/10.1021/jf1000524>
- ✕ Kirkpatrick, K. (2016). Optimizing hop aroma in beer dry hopped with Cascade utilizing glycosidic enzymes. *Young Scientist Symposium*.



REFERENCIAS TIOLES: I

- ✕ Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., & Moreno-Arribas, M. (2017). Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules*, 22(2), 189. <https://doi.org/10.3390/molecules22020189>
- ✕ Dagan, L., Delpéch, S., Reillon, F., Roland, A., Schneider, R., & Viel, C. (2016). First evidence of cysteinylated and glutathionylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol in malts: Toward a better aromatic potential management? World Brewing Congress. <http://www.worldbrewingcongress.org/congress/Abstracts/Pages/143.aspx>
- ✕ Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J.-N., & Dubourdieu, D. (1995). Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour and Fragrance Journal*, 10(6), 385–392. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730100610>
- ✕ 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(16), 8853–8865. <https://doi.org/10.1021/jf201294e>
- ✕ Gros, J., Peeters, F., & Collin, S. (2012). Occurrence of Odorant Polyfunctional Thiols in Beers Hopped with Different Cultivars. First Evidence of an S-Cysteine Conjugate in Hop (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 7805–7816. <https://doi.org/10.1021/jf301478m>



REFERENCIAS TIOLES: II

- ✗ Gros, J., Tran, T. T. H., & Collin, S. (2013). Enzymatic release of odourant polyfunctional thiols from cysteine conjugates in hop. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(4), 221–227. <https://doi.org/10.1002/jib.80>
- ✗ Kishimoto, T., Kobayashi, M., Yako, N., Iida, A., & Wanikawa, A. (2008). Comparison of 4–Mercapto–4–methylpentan–2–one Contents in Hop Cultivars from Different Growing Regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 1051–1057. <https://doi.org/10.1021/jf072173e>
- ✗ Kishimoto, T., Morimoto, M., Kobayashi, M., Yako, N., & Wanikawa, A. (2008). Behaviors of 3–Mercaptohexan–1–ol and 3–Mercaptohexyl Acetate during Brewing Processes. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 66(3), 192–196. <https://doi.org/10.1094/asbcj-2008-0702-01>
- ✗ Liu, C.–J., Jia, J.–Y., Wang, H.–Y., Xue, L.–L., Kong, Y., & Wang, F.–X. (2016). Purification and characterization of a flavor–related enzyme, γ –glutamyl–transpeptidase, from *Toona sinensis* leaves. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 91(6), 611–618. <https://doi.org/10.1080/14620316.2016.1206455>
- ✗ Matsche, B., Munoz, I. A., Wiesen, E., Schonberger, C., & Krottenthaler, M. (2018). The influence of yeast strains and hop varieties on the aroma of beer. *BREWING SCIENCE*, 71, 31–38.
- ✗ Michel, M., Haslbeck, K., Ampenberger, F., Meier–Dörnberg, T., Stretz, D., Hutzler, M., Coelhan, M., Jacob, F., & Liu, Y. (2019). Screening of brewing yeast β –lyase activity and release of hop volatile thiols from precursors during fermentation. *BrewingScience*, 11/12.



REFERENCIAS TIOLES: III

- ✕ Swiegers, Jan H., Capone, D. L., Pardon, K. H., Elsey, G. M., Sefton, M. A., Francis, I. L., & Pretorius, I. S. (2007). Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. *Yeast*, 24(7), 561–574. <https://doi.org/10.1002/yea.1493>
- ✕ Reglitz, K., Lemke, N., Hanke, S., & Steinhaus, M. (2018). On the Behavior of the Important Hop Odorant 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP) during Dry Hopping and during Storage of Dry Hopped Beer. *BREWING SCIENCE*, 71, 96–99.
- ✕ Roland, A., Delpech, S., & Dagan, L. (2017). A Powerful Analytical Indicator to Drive Varietal Thiols Release in Beers: The "Thiol Potency". *BREWING SCIENCE*, 70, 170–175.
- ✕ Roland, A., Viel, C., Reillon, F., Delpech, S., Boivin, P., Schneider, R., & Dagan, L. (2016). First identification and quantification of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one in hops (*Humulus lupulus*). *Flavour and Fragrance Journal*, 31(6), 455–463. <https://doi.org/10.1002/ffj.3337>
- ✕ Steinhaus, M., Wilhelm, W., & Schieberle, P. (2006). Comparison of the most odour-active volatiles in different hop varieties by application of a comparative aroma extract dilution analysis. *European Food Research and Technology*, 226(1–2), 45–55. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0507-6>



REFERENCIAS TIOLES: IV

- ✗ Swiegers, J. H., & Pretorius, I. S. (2007). Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(5), 954–960. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0828-1>
- ✗ Takoi, K., Degueil, M., Shinkaruk, S., Thibon, C., Maeda, K., Ito, K., Bennetau, B., Dubourdieu, D., & Tominaga, T. (2009b). Identification and Characteristics of New Volatile Thiols Derived from the Hop (*Humulus lupulus* L.) Cultivar Nelson Sauvin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2493–2502. <https://doi.org/10.1021/jf8034622>
- ✗ Takoi, K., Itoga, Y., Takayanagi, J., Matsumoto, I., & Nakayama, Y. (2016). Control of hop aroma impression of beer with blend-hopping using geraniol-rich hop and new hypothesis of synergy among hop-derived flavour compounds. *BrewingScience*, 69, 85–93.
- ✗ Thibon, C., Cluzet, S., Mérillon, J. M., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2011). 3-Sulfanylhexanol Precursor Biogenesis in Grapevine Cells: The Stimulating Effect of *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1344–1351. <https://doi.org/10.1021/jf103915y>
- ✗ Tominaga, T., Niclass, Y., Frérot, E., & Dubourdieu, D. (2006). Stereoisomeric Distribution of 3-Mercaptohexan-1-ol and 3-Mercaptohexyl Acetate in Dry and Sweet White Wines Made from *Vitis vinifera* (Var. Sauvignon Blanc and Semillon). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7251–7255. <https://doi.org/10.1021/jf061566v>
- ✗ Vermeulen, C., Lejeune, I., Tran, T. T. H., & Collin, S. (2006). Occurrence of Polyfunctional Thiols in Fresh Lager Beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), 5061–5068. <https://doi.org/10.1021/jf060669a>