GRAND PRIX 2000

Takatoshi TOMINAGA

Faculté d'Œnologie,
Université Victor Segalen Bordeaux 2

Recherches sur l'arôme variétal des vins de *Vitis vinifera* L. cv. sauvignon blanc et sa genèse à partir de précurseurs inodores du raisin

ACADEMIE AMORIM

PRÉFACE

Le Groupe Amorim, né du liège en 1870 au Portugal, a fondé les bases de son développement sur cette extraordinaire matière première, à travers la production de cet humble mais inséparable compagnon du Vin : le bouchon de liège.

Notre volonté de servir la cause du vin s'est toujours exprimée dans la recherche technologique sur la filière liège, base de notre activité. En 1992, nous avons souhaité aller plus loin et nous engager davantage aux côtés des chercheurs en œnologie en créant l'Académie Amorim, un lieu de rencontre et d'échange entre œnologues, ingénieurs, professeurs, sommeliers, auteurs, artistes… tous animés d'une même passion du Vin. Chaque année, notre Académie encourage et soutient la recherche en œnologie par la remise d'un Prix à un chercheur ou à une équipe de chercheurs ayant fait paraître des travaux significatifs qui concourent à la défense et à la promotion de la qualité du Vin. Que soient ici saluées les personnalités, membres de cette Académie, qui contribuent si généreusement à cette mission.

Je formule le vœux que cette collection, dédiée aux Lauréats du Grand Prix de l'Académie, devienne, au fil des ans, une référence et la mémoire vivante des efforts et des travaux engagés dans le monde entier pour servir la noble cause du Vin.

Americo Ferreira de AMORIM
Président du Groupe Amorim

LAURÉATS DE L'ACADÉMIE AMORIM

Grand Prix 2000 - Takatoshi TOMINAGA
«Recherches sur l'arôme variétal des vins de Vitis vinifera L. cv. sauvignon blanc et sa genèse à partir de précurseurs inodores du raisin.»

Coup de Cœur 2000 - Jean-Pierre GOT
«Le verre de vin dans la peinture Hollandaise de l'âge d'or. Les vins de Bergerac et les Provinces-Unies.»

Grand Prix 1999 - Isabelle CUTZACH-BILLARD
"Etude sur l'arôme des vins doux naturels non muscatés au cours de leur élevage et de leur vieillissement. Son origine. Sa formation."

Prix Chêne-Liège 1999 - Noël HEYES
"La Perméabilité à l'oxygène de la cire de paraffine macrocristalline et sa conséquence sur les traitements de surface des bouchons en liège naturel destinés aux vins tranquilles."

Coup de Cœur 1999 - Julien PILLOT & Jean-Christian LAMBORELLE
"Le décret du 1er décembre 1936 dit "code du vin" *: étude critique."*

Grand Prix 1998 - Virginie MOINE-LEDOUX
Faculté d'Oenologie Université Victor SEGALEN de Bordeaux 2
"Recherches sur le rôle des Mannoprotéines de levure vis à vis de la stabilité protéique et tartrique des vins."

Coup de Cœur 1998 - Marie-Laure CHAMUSSY-BOUTEILLE
Institut de la Vigne et du Vin Jules GUYOT, Université de Bourgogne
"Colette : un vin d'écrivain."

Grand Prix 1997 - Valérie LAVIGNE-CRUEGE
Faculté d'Oenologie Université Victor SEGALEN de Bordeaux 2
"Recherche sur les composés soufrés formés par la levure au cours de la vinification et l'élevage des vins blancs secs."

Grand Prix 1996 - Sylvie BIAU
Faculté d'Oenologie Université Victor SEGALEN de Bordeaux 2
"Etude de la matière colorante des vins blancs de Bordeaux."

Prix Chêne-Liège 1996 - Guillem ROIG I JOSA - Héctor RIU SAVALL Josep SANCHO I VALLS
Département d'Industries Agro-Alimentaires
Escola Superior d'Agricultura de Barcelona Universitat Politecnica de Catalunya
"Traitement des résidus de l'industrie du liège par la culture des champignons".

Mention d'Honneur du Jury 1995 - P.L. TEISSEDRE - A.L. WATERHOUSE R.L. WALZEM - J.-B. GERMAN - E.N. FRANKEL - A.J. CLIFFORD
Université de Californie, Davis
"Composés phénoliques du raisin et du vin et santé."

Grand Prix 1995 - Samuel LUBBERS
Institut de la Vigne et du Vin Jules GUYOT, Université de Bourgogne
"Etude des interactions entre les macromolécules d'origine levurienne du vin et les composés d'arôme."

Grand Prix 1994 - Ziya GÜNATA
INRA Institut des Produits de la Vigne de Montpellier
"Etude et exploitation par voie enzymatique des précurseurs d'arôme du raisin, de nature glycosidique."

Grand Prix 1993 - Pierre-Louis TEISSEDRE
Centre de Formation et de Recherche en Œnologie de Montpellier.
"Le plomb, du raisin au vin."

Grand Prix 1992 - Pascal CHATONNET
Institut d'Œnologie de Bordeaux
"Incidence du bois de chêne sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins, applications technologiques."

Laissons nous envahir
par les arômes varétiaux
des vins des cépages à “saveur simple”,
et suivons Takatoshi Tominaga
sur les chemins de la connaissance aromatique
du sauvignon blanc : des odeurs de buis,
de bourgeon de cassis, de pamplemousse
et de fruit de la passion nous submergent déjà !
Mais quels sont les composés
responsables de ces caractères odorants
qui sont l’essence-même de notre plaisir ?
Notre lauréat, à travers un travail
d’une grande rigueur scientifique,
aborde de façon claire et compréhensible
un sujet dont les répercussions théoriques
et pratiques sont déjà considérables
et le seront encore plus dans l’avenir.
“*There is more than aroma than meets the nose”*
nous glisse dans l’oreille
notre ami Brian Croser à propos de cet ouvrage.
Plus simplement, je dirai merci
à nos talentueux candidats qui hissent
chaque année plus haut
la recherche en œnologie.

Robert TINLOT
Président de l’Académie Amorim

Introduction

Le Sauvignon est l'un des grands cépages blancs de *Vitis vinifera*. Sa présence dans le vignoble bordelais (Graves, Sauternes, Coteaux de la rive droite de la Garonne) et ceux du Centre de la France (Sancerre, Pouilly) est attestée depuis le 18ème siècle. Les vins jeunes de Sauvignon ont un arôme caractéristique, aisé à distinguer des autres cépages. Ils présentent une vaste palette aromatique dont les principaux descripteurs sont le poivron vert, le buis, le genêt, le bourgeon de cassis, la feuille de tomate, le pamplemousse, le fruit de la passion et dans certains cas, la fumée. Ces caractères odorants, sont peu marqués dans le moût et se développent essentiellement au cours de la fermentation alcoolique (PEYNAUD,1980).

Les travaux essayant d'expliquer, par l'analyse chimique, l'arôme particulier des vins de Sauvignon sont relativement récents. La mise en évidence d'au moins deux thiols volatils à odeur de buis, dans l'arôme variétal des vins de Sauvignon est un travail fondateur dans la recherche sur les arômes variétaux des cépages non muscatés (DARRIET *et al.*, 1993, DUBOURDIEU et DARRIET, 1993). L'un de ces deux composés a été identifié à la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one (4MMP) (DARRIET *et al.*, 1995). L'identification de ce composé a démontré qu'un thiol volatil très odorant possédant un seuil de perception olfactive très faible (0,8 ng/L en solution hydroalcoolique) pouvait contribuer à l'arôme caractéristique des vins de ce cépage, et en particulier à l'odeur de buis et de genêt. Cependant, l'intervention de ce seul composé ne peut rendre compte de la complexité aromatique du cépage Sauvignon dont l'odeur *sui generis* évoque outre celle du buis, des nuances plus fruitées de pamplemousse et de fruit de la passion.

Quand aux composés responsables des nuances fruitées des vins de Sauvignon, ils restaient inconnus ainsi que le deuxième thiol volatil sentant le buis avant le présent travail. De même, l'apparition de l'arôme variétal du Sauvignon au cours de la fermentation alcoolique demeurait un phénomène en grande partie inexpliquée. En effet, bien que les travaux de DARRIET (1993) et DARRIET *et al.*, (1993) aient mis en évidence l'existence d'un précurseur non glycosilé de la 4MMP dans le raisin et dans le moût, ce composé difficile à purifier n'avait pas pu être identifié.

Nos recherches sur les arômes et précurseurs d'arômes du Sauvignon comportent trois parties. La première porte sur l'identification, le dosage et les propriétés organoleptiques de nouveaux thiols volatils participant aux arômes des vins de Sauvignon. La présence éventuelle de ces composés dans les fruits, les plantes ou les vins d'autres cépages dont les arômes évoquent ceux du Sauvignon, est également recherchée. La deuxième partie concerne l'identification des précurseurs de l'arôme variétal des vins de Sauvignon. Enfin, la troisième partie traite du dosage de ces précurseurs dans le moût et de leur évolution au cours de la maturation du raisin.

1. Recherches sur l'arôme soufré des vins de Sauvignon

1. Mise au point d'une méthode d'extraction spécifique des thiols volatils à l'état de trace dansles vins blanc

Un réactif, composé organomercurique, l'acide *p*-hydroxymercuribenzoïque (*p*-HMB), se combine spécifiquement avec les composés possédant une fonction thiol (JOCELYN, 1972 ; ASHWORTH, 1976). Le complexe formé est décombiné par un autre thiol en excès tel que la cystéine (JOCELYN, 1987) (figure 1).

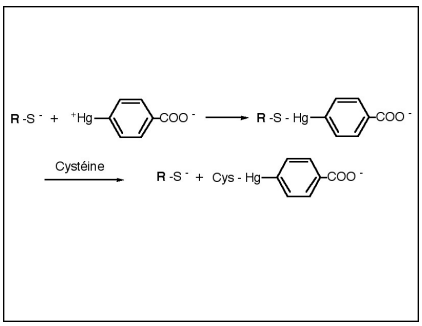


Fig 1 : Réaction de combinaison d'un thiol par le *p*-HMB et décombinaison du complexe par addition de cystéine.

L'addition de ce réactif dans un vin de Sauvignon conduit à la disparition de la nuance buis, ainsi que d'autres nuances fruitées, notamment de type fruit de la passion et pamplemousse. De plus, l'arôme disparu est rétabli par l'addition de cystéine. De ce fait, outre la 4MMP, la contribution d'autres thiols volatils à l'arôme caractéristique des vins de Sauvignon est très vraisemblable. L'identification de ces composés nécessite la mise au point d'une méthode d'extraction spécifique à partir du vin. Nous avons donc cherché à exploiter les propriétés du *p*-HMB dans le but de préciser le rôle des thiols volatils sur l'arôme de vins de Sauvignon.

Après extraction de composés volatils totaux par dichlorométhane, les thiols volatils dans la phase organique sont extraits par une solution aqueuse du *p*-HMB. L'originalité de la méthode réside dans la purification du complexe par percolation sur une colonne de résine anionique type Dowex (TOMINAGA *et al.*, 1998b). Les thiols volatils combinés avec le *p*-HMB peuvent y être fixés par la fonction carboxylique du *p*-HMB. Evidemment, les autres constituants chargés négativement dans la phase aqueuse du *p*-HMB, les acides gras par exemple, sont également retenus sur la résine. Les contaminants non chargés ou chargés positivement sont éliminés par lavage de la colonne avec un tampon adéquat. Après lavage de la colonne, l'élution sélective des thiols volatils est réalisée par percolation d'une solution de cystéine. Ce progrès analytique permet d'identifier de nouveaux thiols volatils odorants des vins et les doser précisément.

2. Identification de nouveaux thiols volatils intervenant dans l'arome caractéristique des vins de Sauvignon

L'extrait de vin obtenu par la méthode mise au point est analysé par CPG-FPD sur colonne BP-20 (figure 2). Les pics 1, 2, 3, 5, 7 et 9 ont déjà été identifiés dans les vins. Le pic 1 correspond à la 4-méthyl-4-mercaptopentan-2-one (DARRIET *et al.*, 1995), composé à odeur de buis, participant à l'arôme des vins de Sauvignon. L'acétate de 2-mercaptoéthyle et l'acétate de 3-mercaptopropyle (pics 2 et 5), évoquant une odeur de viande rôtie, et le 3-mercaptopropan-1-ol (pic 7) possédant une odeur de sueur ont été identifiés et dosés dans les vins par LAVIGNE *et al.* (1998). Le pic 3 correspond au 2-mercaptoéthanol dont la présence dans les vins est connue depuis longtemps (RAPP *et al.*, 1985) ; ce composé est malodorant mais sa teneur dans les vins est généralement inférieure à son seuil de perception. Le pic 9 a été signalé pour la première fois par LAVIGNE (1996) dans les vins blancs ; et il a été identifié par BOUCHILLOUX *et al.* (1998) dans les vins rouges. Il

s'agit du 3-mercapto-2-méthylpropan-1-ol. Son odeur qui évoque l'ail et le caoutchouc est désagréable.

Ainsi, à l'exception de la 4MMP, la contribution de ces thiols volatils à l'arôme particulier des vins de Sauvignon est peu vraisemblable.

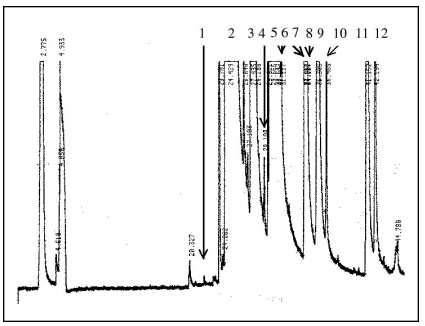


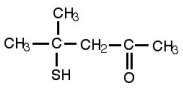
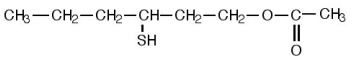
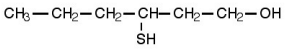
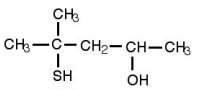
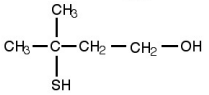
Fig 2 : Analyse par couplages CPG-FPD des thiols volatils extraits d'1,5 L de vin de sauvignon (Clos Froridène, 1995).

(**pic 1**: *4-mercapto-4-méthylpentan-2-one (4MMP) ;* **pic 2**: *acétate de mercaptoéthyle ;* **pic 3**: *2-mercaptoéthanol ;* **pic 4**: *4-mercapto-4-méthylpentan-2-ol (4MMPOH) ;* **pic 5**: *acétate de 3-mercaptopropyle ;* **pic 6**: *composé non identifié ;* **pic 7**: *3-mercaptopropanol ;* **pic 8**: *3-mercapto-3-méthylbutan-1-ol (3MMB) ;* **pic 9**: *3-mercapto-2-méthyl-propan-1-ol ;* **pic 10**: *acétate de 3-mercaptohexyle (A3MH) ;* **pic11**: *3-mercaptohexan-1-ol (3MH) ;* **pic 12**: *composé non identifié)*

Les pics 4,8,10 et 11 sont nouvellement identifiés dans cette étude. Le pic 10 (figure 2) correspond, en olfactométrie, à une zone fortement odorante évoquant le buis, déjà signalée par DARRIET et al. (1991), mais avec une nuance plus complexe de fruits tropicaux. Le temps de rétention de ce composé est proche de celui du méthionol, composé très abondant dans le vin, ce qui interdisait son identification avant que nous ne disposions d'une méthode d'extraction des thiols suffisamment spécifique. Il est maintenant identifié à l'acétate de 3-mercaptohexyle (A3MH) (TOMINAGA *et al.*, 1996). En même temps que l'A3MH, la méthode d'extraction spécifique des thiols volatils décrite ci-dessus permet d'identifier trois nouveaux mercaptoalcools dans les vins de Sauvignon. Il s'agit du 4-mercapto-4-méthylpentan-2-ol (4MMPOH) (pic 4), du 3-mercapto-3-méthylbutan-1-ol (3MMB) (pic 8) et du 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) (pic 11) (TOMINAGA *et al.*, 1998a) (tableau I).

Grâce à la mise au point d'une méthode d'extraction spécifique des thiols volatils des vins, outre la 4MMP à forte odeur de buis, 4 thiols volatils odorants ont été identifiés dans les vins du cépage de Sauvignon. Le 3MH et l'A3MH n'avaient été jusqu'ici caractérisé que dans le fruit de la passion (ENGEL et TRESSL, 1991). Le 3MMB a été identifié dans le café torréfié (HOLSCHER *et al.*, 1992). En revanche, jusqu'à présent le 4MMPOH, n'a jamais été mis en évidence dans la nature.

La contribution à l'arôme des vins de Sauvignon des différents thiols volatils identifiés a été précisée. Le seuil de perception olfactif en solution hydroalcoolique modèle par test de dégustation triangulaire et la teneur dans les vins par le dosage ainsi que l'indice aromatique (concentration dans le vin/seuil de perception) ont été déterminés.

Composés	Structures	Descripteurs olfactifs	Seuils (ng/L)
4MMP[1)]		Buis, Genêt	0.8
A3MH		Buis, Fruit de la passion	4
3MH		Pamplemousse Fruit de la passion	60
4MMPOH		Zeste d'agrume	55
3MMB		Poireaux cuits	1500

1) DARRIET et al., (1995)

Tableau 1 : Seuils de perception et descripteurs olfactifs des thiols volatils identifies dans les vins de sauvignon.

Le seuil de perception de l'A3MH est en solution modèle hydroalcoolique de 4,2 ng/L. Il s'agit donc d'un composé fortement odorant mais toutefois moins que la 4MMP détectée à 0,8 ng/L en solution modèle selon DARRIET *et al.*(1995). L'odeur de l'A3MH, comme celle de la plupart des thiols est désagréable à forte concentration ; elle change au voisinage de son seuil de perception, en évoquant le buis, mais aussi le fruit de la passion et le zeste de pamplemousse, descripteurs fréquemment utilisés pour caractériser l'arôme des vins de Sauvignon. Les seuils de perception du 4MMPOH et du 3MH sont proches et relativement bas (50 à 60 ng/L). Ils sont cependant moins odorants que la 4MMP et l'A3MH. L'odeur du 4MMPOH évoque le zeste d'agrume et le pamplemousse. L'arôme du 3MH rappelle à la fois celui du pamplemousse et du fruit de la passion. Par contre, le 3MMB, à odeur de poireaux cuits, a un seuil de perception beaucoup plus élevé (1500 ng/L).

Les dosages des 5 thiols volatils ont été pratiqués sur plusieurs vins de Sauvignon de Sancerre et de Bordeaux (tableau II). Les teneurs en 4MMP, et 3MH sont toujours supérieures à leurs seuils de perception dans les vins analysés. En conséquent, l'indice aromatique de ces composés est largement supérieur à 1. Cependant l'A3MH n'est plus présent dans les vins de vieux millésimes. Les teneurs en 4MMPOH et 3MMB sont toujours inférieures à leurs seuils de perception indépendamment de l'age des vins analysés.

L'impact olfactif de la 4MMP à odeur de buis, et du 3MH à odeur de pamplemousse et de fruit de la passion est donc indéniable dans l'arôme des vins de Sauvignon. L'A3MH contribuera à l'odeur de buis dans certains vins jeunes, tandis que la contribution du 4MMPOH et du 3MMB sur l'arôme des vins de ce cépage est peu vraisemblable.

Composés	Teneurs (ng/L)	Indice aromatique
4MMP	4~44	5~55
A3MH	600~12000	10~200
3MH	0~800	0~200
4MMPOH	0~100	0~2
3MMB	80~130	0

Tableau 2 : Incidence organoleptique des thiols volatils identifiés dans les vins de Sauvignon

L'incidence des trois premiers composés sur la perception par le dégustateur des trois nuances de l'arôme des vins de Sauvignon, buis, fruit de la passion et pamplemousse a été étudiée. Nous avons étudié pour chaque descripteur la relation entre l'indice aromatique d'un composé et l'intensité de l'odeur perçue. L'intensité de l'odeur de buis perçue par les dégustateurs est fortement corrélée à l'indice aromatique de la 4MMP dans les vins (r = 0,956). Les odeurs de fruit de la passion et de pamplemousse sont également bien corrélées à l'indice aromatique du 3MH. Le coefficient de corrélation est plus élevé pour le descripteur pamplemousse (r = 0,952) que pour le descripteur fruit de la passion (r = 0,703). Quant à l'A3MH, L'intensité de l'odeur de buis est fortement corrélée (r = 0,971) à l'indice aromatique de l'A3MH. En revanche, l'A3MH contribue peu ou pas aux nuances de pamplemousse et de fruit de la passion des vins de Sauvignon, bien qu'en solution modèle son odeur évoque à la fois celle du buis et des fruits tropicaux. Cette analyse sensorielle permet de confirmer la contribution de la 4MMP, du 3MH et de l'A3MH aux nuances de buis, fruit de la passion et pamplemousse des vins de Sauvignon.

3. Contribution des thiols volatils à l'arome de vins blancs, fruits ou plantes dont l'odeur rappelle celle du Sauvignon

Certains descripteurs des vins du Sauvignon, voire l'arôme du Sauvignon lui-

même, sont aussi parfois utilisés pour évoquer les nuances particulières de vins d'autres cépages. Ainsi, l'arôme des cépages mansengs est comparé à ceux du pamplemousse ou du fruit de la passion, tandis que le colombard, le muscat d'Alsace et certains riesling peuvent avoir des nuances " sauvignonnées ". Les thiols volatils intervenant dans l'arôme des vins de Sauvignon, sont également identifiés dans d'autres vins blanc, fruits ou plantes possédant des odeurs comparables (TOMINAGA et DUBOURDIEU, 1997 ; TOMINAGA *et al.*, 2000).

La 4MMP se trouve en quantité particulièrement importante dans les vins de muscat d'Alsace ; les valeurs atteintes dépassent même celles trouvées jusqu'ici dans les vins de Sauvignon les plus riches (tableau III). Ce composé existe également dans le buis, le genêt et l'eucalyptus en quantité abondante. Le 3MH est présent en quantités largement supérieure à son seuil de perception dans les vins de gewurztraminer, petit manseng et colombard (tableau III). Ce composé est aussi dosé en quantité variable dans la rhubarbe, la feuille de tomate, la goyave, le jus de pamplemousse et le fruit de la passion. L'A3MH est trouvé dans les vins jeunes de petit manseng et colombard ainsi que dans la goyave et le fruit de la passion.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats montre que certaines analogies olfactives utilisées empiriquement pour décrire l'arôme de vins de Sauvignon reposent sur des similitudes chimiques.

Cépages	4MMP	4MMPOH	3MMB	A3MH	3MH
Gewurztraminer	0~15	5~10	900~1400	2~6	2000~3300
Riesling	0~8	0~4	45~110	0~3	550~1000
Muscat	30~100	4~30	20~140	0	260~600
Petit manseng	0	0	20~40	5~100	1000~5000
Colombard	0	0	0	20~60	400~1000

Tableau 3 : Teneur en thiols volatils (ng/L) dans les vins d'autres cépages blancs.

2. Recherches sur les précurseurs des arômes soufrés des vins de Sauvignon

1. Identification d'un nouveau type de précurseur d'arome dans le mout de Sauvignon

Les variétés de raisin dites "florales" comme les Muscats, donnent des moûts dont l'arôme, ressemble à celui de leur vin. Il est essentiellement constitué de monoterpènes (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975) dont une partie existe sous forme glycosylée (STAHL-BISKUP *et al.*, 1993 ; WINTERHALTER *et al.*, 1990 ; STRAUSS *et al.*, 1988 ; WILLIAMS *et al.*, 1982). En revanche, chez les cépages dits à "saveur simple" ou "non floraux", tel le Sauvignon, l'arôme caractéristique de la variété est beaucoup plus intense dans le vin que dans le moût. Les mécanismes de formation des composés volatils identifiés des vins de cépages "non floraux" de Sauvignon au cours de la fermentation alcoolique étaient jusqu'à présent inconnus.

L'existence d'un précurseur d'arôme de Sauvignon explique le surprenant phénomène du " retour aromatique ", décrit par PEYNAUD (1980) et bien connu des praticiens. Lorsque l'on croque un grain de raisin de Sauvignon, ou lorsque l'on en déguste le moût, on en ressent d'abord que très faiblement les arômes caractéristiques ; on ne les perçoit que quelques

secondes, voire une minute plus tard, par rétro-olfaction dans l'arrière cavité buccale. D'où l'image du " retour en bouche ", utilisée pour rendre compte de cette perception différée de l'arôme des moûts de Sauvignon.

De précédents travaux (DARRIET, 1993) ont clairement montré que la 4MMP ne peut pas être libérée de son précurseur par les glycosidases capables d'hydrolyser les hétérosides, précurseurs des monoterpénols et de certains dérivés norisoprénoides intervenant dans l'arôme des cépages muscatés, catégorie de précurseurs d'arômes aujourd'hui bien connus grâce aux nombreux travaux de CORDONNIER et BAYONOVE (1974), WILLIAMS *et al.*, (1982), GUNATA *et al.*, (1988, 1990), STRAUSS *et al.*, (1988). Le précurseur de la 4MMP n'est donc vraisemblablement pas un hétéroside.

Parmi les activités enzymatiques, capables d'assurer la rupture d'une liaison carbone-soufre en libérant un thiol, la ß-lyase des S-conjugués de la cystéine (EC4.4.1.13) a retenu notre attention. Cette enzyme, produite par une bactérie intestinale Eubacterium limosum (LARSEN, 1985 ; LARSEN et STEVENS, 1986) catalyse la coupure de la liaison thioéther de nombreux conjugués (S-alkyl- et S-aryl-) de la L-cystéine, en libérant outre le mercaptan, de l'ammonium et de l'acide pyruvique (figure 3).

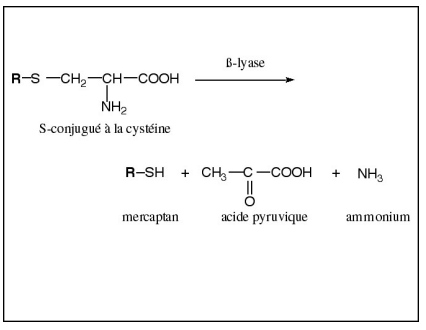


Fig 3 : Réaction d'une ß-lyase sur un S-conjugué à la cystéine.

L'extrait brut et non volatil de précurseurs d'arômes soufrés (EBPAS) de jus de Sauvignon, préparé par percolation sur colonne de silice greffée C_{18}, et élué par l'éthanol, est soumis à l'action du broyat cellulaire d'Eubacterium limosum. Après incubation pendant 15 minutes à 30°C, une forte odeur rappelant les arômes de Sauvignon se dégage du milieu réactionnel. Les composés volatils formés sont analysés (figure 4). Les pics 1,2 et 3 sont identifiés par l'analyse de spectrométrie de masse. La 4MMP (pic 1), le 4MMPOH (pic 2) et le 3MH (pic 3) sont formés par action du broyat cellulaire sur l'EBPAS. En présence de broyat bactérien inactivé par la chaleur aucun thiol n'est libéré (TOMINAGA *et al*., 1995a,b).

Compte tenu de la spécificité de l'activité ß-lyase présente dans la préparation bactérienne, on peut envisager que les précurseurs de ces différents thiols dans ces fruits soient des S-conjugués à la cystéine.

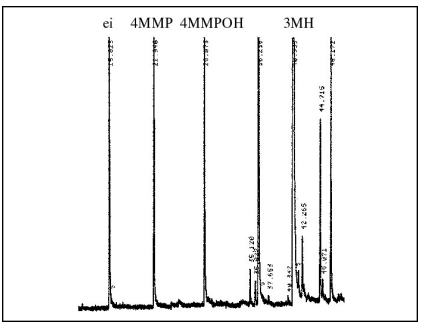


Fig 4 : Libération enzymatique de la 4MMP, du 4MMPOH et du 3MH à partir d'un extrait non volatil de moût de sauvignon en présence du broyât cellulaire d'*Eubacterium limosum* (Analyse par couplage CPG-FPD).

L'identification directe de S-conjugués à la cystéine a été effectuée comme suit. L'EBPAS contenant les précurseurs d'arômes soufrés à identifier sont purifiés par percolation sur une colonne de Chelating Sepharose 4B possédant la propriété de fixer certains acides aminés par l'intermédiaire du cuivre chélaté (BELEW et PORATH, 1990). La fraction retenue est éluée par HCl (50 mM). Après évaporation à sec de l'éluat, extraction à l'éthanol du résidu et séchage, les extraits de précurseurs d'arômes purifiés sont analysés par CPG-SM sous forme de dérivés triméthylsilylés. Cette analyse permet d'identifier les structures des précurseurs de trois thiols volatils aux *S*-4-(4-

méthylpentan-2-one)-L-cystéine, *S*-4-(4-méthylpentan-2-ol)-L-cystéine, *S*-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine (figure 5) (TOMINAGA *et al.*, 1998c).

L'identification d'un précurseur cystéinylé du 3MH dans le raisin de Sauvignon nous a donné l'idée de vérifier si un tel composé existe aussi dans le fruit de la passion, car ce fruit contient abondamment le 3MH (ENGEL et TRESSL, 1991). Les mêmes analyses chromatographiques sont donc effectuées sur l'extrait du jus de fruit de la passion. La présence d'un S-conjugué à la cystéine, la *S*-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine a été mise en évidence dans ce fruit (TOMINAGA *et al.*, 2000b). Ainsi, les S-conjugués à la cystéine constituent une nouvelle famille chimique de précurseurs d'arômes des fruits.

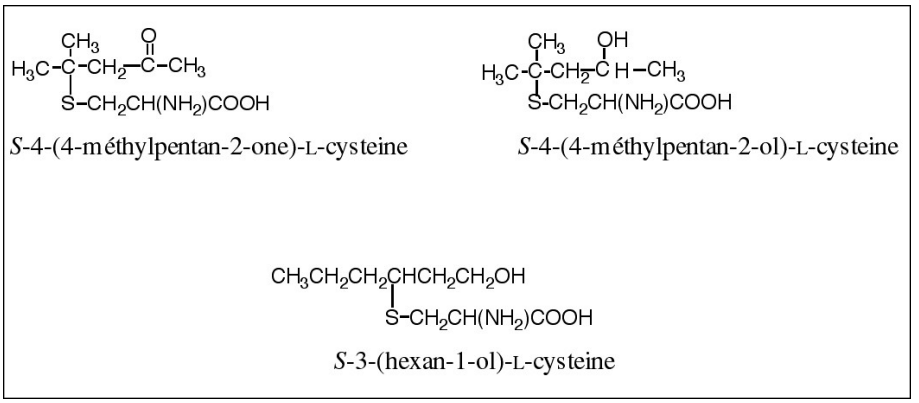


Fig 5 : Précurseurs des thiols volatils identifiés dans le moût de Sauvignon : S-conjugués à la cystéine.

2. LIBÉRATION DES AROMES DU SAUVIGNON ET DÉGRADATION DES S-CONJUGUÉS À LA CYSTÉINE CORRESPONDANTS

Lorsque l'on fait agir le broyat cellulaire d'*Eubacterium limosum* sur l'EBPAS, la libération de thiols volatils observée *in vitro* résulte de la dégradation enzymatique des S-conjugués à la cystéine, ce que la figure 6 montre pour le 3-mercaptohexan-1-ol et la *S*-(3-hexan-1-ol)-L-cystéine. Au cours de la fermentation alcoolique d'un jus de raisin (var. Sauvignon), on observe un net accroissement de ses teneurs en thiols odorants (figure 7). Cette amplification de l'arôme du cépage par le métabolisme de la levure de vinification (*Saccharomyces cerevisiae*) procède d'une dégradation des précurseurs d'arômes cystéinylés du raisin, conduisant à la formation des thiols volatils correspondants comme le montre l'expérience suivante. Un milieu modèle additionné de S-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine (1 nmol/ml) synthétisée au laboratoire, est inoculé par *Saccharomyces cerevisiae* (souche VL3c). La figure 8 montre la libération de 3-mercaptohexanol au cours de la fermentation alcoolique. Une petite partie du précurseur d'arôme dégradé est transformée en arôme libre. Lorsque la fermentation est inhibée par la pimaricine, la libération d'arôme et la dégradation du précurseur sont très limitées.

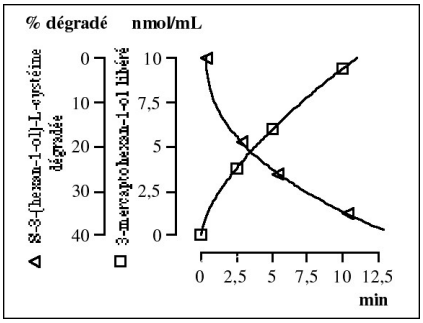


Fig 6 : Libération *in vitro* du 3MH par action enzymatique du broyât cellulaire d'*Eubacterium limosum* sur la *S*-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine de l'EBPAS : libération du 3MH (□) et dégradation de la *S*-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine (Δ).

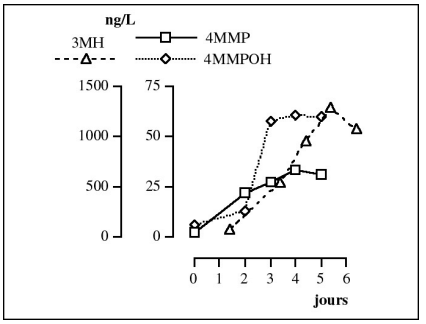


Fig 7 : Libération de thiols volatils au cours de la fermentation alcoolique d'un moût de Sauvignon. Le jour 0 correspond à celui de l'inoculation par la souche de levure VL3c.

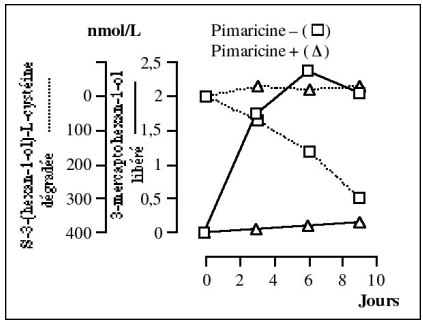


Fig 8 : Libération du 3MH au cours de la fermentation alcoolique d'un milieu modèle additionné en *S*-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine de synthèse sans (□) et avec (Δ) pimaricine. Le jour 0 correspond à celui de l'inoculation par la souche de levure VL3c.

Chez *Passiflora edulis* (fruit de la passion), le 3-mercaptohexanol et son précurseur cystéinylé coexistent dans le fruit. Dans le raisin de cépage Sauvignon, les composés soufrés odorants caractéristiques de l'arôme de cette variété, n'existent qu'à l'état de traces. Ils sont libérés au cours de la fermentation alcoolique par dégradation, par la levure, des *S*-conjugués à la cystéine correspondants. Cette amplification de l'arôme du raisin par la vinification, jusqu'ici inexpliquée, reçoit une interprétation moléculaire.

3. Recherches sur le potentiel aromatique du raisin

1. Mise au point d'une méthode de dosage du potentiel aromatique du moût de Sauvignon

La qualité des raisins destinés à élaborer des vins blancs aromatiques ne peut se définir seulement par la richesse en sucre et l'acidité des moûts. Leur composition en arômes et, pour les cépages à saveur simple, en précurseurs d'arômes variétaux, intervient aussi de façon déterminante. Or il n'existe pas de coïncidence systématique entre la composition optimum des raisins en précurseurs d'arômes et leur teneur maximum en sucre ou leur niveau optimum d'acidité. La " maturité aromatique ", notion pourtant communément utilisée par les praticiens et les œnologues, n'est pas simple à définir et encore moins à mesurer. Jusqu'à présent, il n'est pas possible d'apprécier analytiquement le potentiel d'arôme variétal des cépages non muscatés. En fait, la qualité aromatique des raisins n'est vraiment constatée qu'*a posteriori* par l'intensité et la finesse des arômes variétaux du vin obtenu.

Connaissant maintenant le substrat (*S*-conjugués à la cystéine) et les produits de la réaction étudiée (thiols volatils correspondants), nous avons cherché une méthode enzymatique de libération des thiols volatils à partir du moût. L'originalité réside dans la libération des thiols volatils par percolation directe du moût sur une colonne d'enzyme immobilisée de type d'une b-lyase. Pour ce but, nous nous somme intéressés à la tryptophanase d'*Echerichia coli* (EC 4.1.99.1), disponible dans le commerce sous une forme partiellement purifiée, pouvant catalyser le même type de réaction que la ß-lyase d'*Eubacterium limosum* (MORINO et SNELL, 1967).

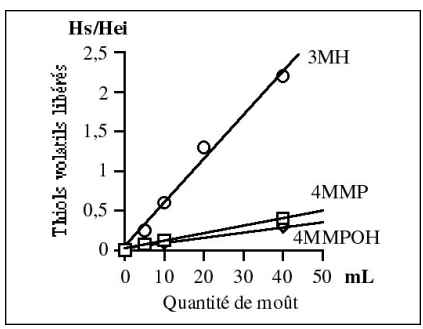


Fig 9 : Linéarité de la libération enzymatique des thiols volatils par rapport aux volumes croissants de moût percolés sur la tryptophanase immobilisée.

50 mL de milieu réactionnel contenant différentes quantités de moût (5, 10, 20, 40 mL) sont percolés sur la tryptophanase immobilisée. Les thiols volatils formés pendant la percolation sont analysé par CPG-FPD. La figure 9 montre la linéarité de la libération des thiols volatils par rapport aux volumes de moût croissants percolés. Autrement dit, la quantité en thiols volatils libérées est proportionnelle à la teneur en précurseurs dans un moût.

Lors de la percolation du moût sur la colonne, une partie seulement des précurseurs est transformée en arômes. Ainsi la détermination de la teneur absolue en précurseurs du moût est réalisée par plusieurs percolations du même moût jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de libération ; ce qui permet d'établir les courbes étalons. Elles permettent de doser la teneur en précurseurs d'un moût à partir d'une seule percolation sur la tryptophanase immobilisée. Ainsi une méthode de mesure du potentiel aromatique des raisins de Sauvignon blanc basée sur le dosage des S-conjugués à la cystéine dans les moûts a été mise au point.

2. Evolution du potentiel aromatique du mout pendant la maturation du raisin

La méthode de dosage des précurseurs d'arômes soufrés du Sauvignon mise au point ci-dessus est appliquée pour suivre l'évolution du potentiel aromatique du moût pendant la maturation du raisin. Les deux terroirs de la région des Graves étudiés, au cours de la maturation du millésime 1996, ont été choisis pour leur aptitude à produire des vins " typés " de Sauvignon. Le terroir A, plutôt tardif, correspond à un sol de sable argileux sur dalle calcaire ; le terroir B, précoce, est une grave sableuse.

L'évolution du potentiel aromatique sur les deux terroirs différents est présenté à la figure 10. Au début de la maturation, l'évolution de la teneur en précurseur de la 4MMP sur les deux terroirs est parallèle. Cependant la teneur en ce composé sur le terroir B, diminue plus tôt, plus brutalement, et atteint des valeurs beaucoup plus basses que sur le terroir A. Au contraire, elle baisse plus lentement sur le terroir A.

Au début de la période de maturation étudiée, le raisin ne contient pas de précurseur du 4MMPOH, quel que soit le terroir considéré. La teneur des moûts en ce composé augmente ensuite de façon linéaire puis atteint un maximum. Elle est plus élevée sur le terroir B, mais chute une semaine après son maximum ; elle est plus stable sur le terroir A.

La biosynthèse du précurseur du 3MH se déclenche beaucoup plus tôt sur le terroir B que sur le terroir A. Au début de la période de maturation étudiée, les moûts du terroir B sont beaucoup plus riches en précurseur du 3MH que ceux du terroir A, mais leur concentration en précurseur du 3MH baisse rapidement, alors qu'elle ne cesse pas d'augmenter dans les moûts du terroir A. Le maximum en précurseur du 3MH correspond à peu près à la date de récolte

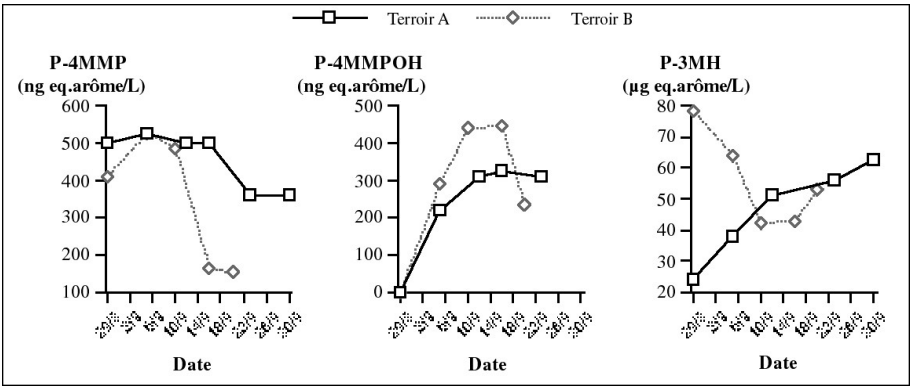


Fig 10 : Evolution de la teneur du moût de sauvignon en précurseurs de la 4MMP, du 4MMPOH et du 3MH au cours de la maturation de deux parcelles différentes en 1996 : terroir A tardif et terroir B précoce.

pour le terroir A. En revanche, pour le terroir B, la récolte intervient alors que la teneur des raisins en précurseur du 3MH a déjà fortement décru.

Un point surprenant est la différence d'évolution des différents précurseurs étudiés, notamment pour le terroir A. La teneur maximale du précurseur de la 4MMP précède clairement celle du précurseur du 4MMPOH et du précurseur du 3MH. Cela explique un fait bien connu des praticiens : sur un terroir donné, le vin de Sauvignon possède une nuance buis d'autant plus marquée que la cueillette est précoce tandis qu'il est plus fruité s'il provient de raisins cueillis quelques jours plus tard.

Ces observations demandent à être renouvelées et étendues à d'autres conditions pédoclimatiques pour tirer de véritables conclusions sur le comportement du Sauvignon sur les différents terroirs du bordelais, ainsi que l'amélioration de la méthode de dosage du potentiel aromatique du moût (PEYROT des GACHONS *et al.*, 2000). Cependant ces premiers résultats s'accordent bien avec les notions empiriques sur la maturité aromatique du cépage Sauvignon.

Conclusion

De tous les grands cépages non muscatés, le Sauvignon est aujourd'hui le seul dont l'arôme soit partiellement interprétable par l'analyse chimique. Des composés soufrés, responsables de certaines nuances odorantes caractéristiques des vins de ce cépage, ont été identifiés, ainsi que leurs précurseurs inodores dans le raisin. Pour autant, ces quelques molécules clefs ne rendent certainement pas compte, à elles seules, de la complexité aromatique des plus grands vins. Certes, les plus typés sont toujours les plus riches en 4MMP et 3MH, mais d'autres composés, peut-être également soufrés, interviennent sûrement. D'autres molécules odorantes restent vraisemblablement à identifier. Le dosage des thiols volatils dans les vins et de leurs précurseurs cystéinylés dans le raisin, sont un outil précieux pour mieux comprendre et maîtriser la typicité aromatique de ce cépage.

Enfin notre travail ouvre la voie à de nouvelles recherches dans deux domaines : la chimie des arômes et l'enzymologie des levures. Il faut préciser le mécanismes de la synthèse des précurseurs correspondants dans le raisin en relation avec le métabolisme soufré ainsi que la nature et propriétés de (des) enzyme(s) de la levure assurant la transformation des précurseurs cystéinylés en arômes.

Références Bibliographiques

ASHWORTH, M. R. F., 1976. The determination of sulphur-containing groups, **2**, Eds.; Academic Press. London.

BELEW M., PORATH J., 1990. Immobilized metal ion affinity chromatography. Effect of solute structure, ligand density and salt concentration on the retention of peptides. *J. Chrom.*, **516**, 333-354.

BOUCHILLOUX P., DARRIET P., HENRY R., LAVIGNE V., DUBOURDIEU D. 1998. Identification of volatile and powerful odorous thiols in Bordeaux red wine varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3095-3099.

CORDONIER R., BAYONOVE C., 1974. Mise en évidence dans la baie de raisin, variété Muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieus enzymes du fruit. *C.R.Acad.Sci.Paris*, **278, D**, 3387-3390.

DARRIET P., LAVIGNE V., BOIDRON J. N., DUBOURDIEU D., 1991. Caractérisation de l'arôme variétal des vins de Sauvignon par couplage chromatographie en phase gazeuse-odométrie. *J. Int. Sci. Vigne Vin,* **25**, 3, 167-174.

DARRIET P. 1993. Recherches sur l'arôme et les précurseurs d'arôme du Sauvignon. Thèse de doctorat de l'université de Bordeaux II.

DARRIET P., TOMINAGA T., DEMOLE E., DUBOURDIEU D., 1993. Mise en évidence dans le raisin de *Vitis vinifera* (var. Sauvignon) d'un précurseur de la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one. *C.R. Acad. Sci*. Paris, Biologie et Pathologie végétale, **316**, 1332-1335.

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 Fragr. J.*, **10**, 385-392.

DUBOURDIEU D. et DARRIET P., 1993. Recherches sur l'arôme variétal du cépage Sauvignon. Mise en évidence dans les vins de composés soufrés à fort pouvoir odorant, formés au cours de la fermentation alcoolique à partir de précurseurs non volatils du moût. *Connaissance Aromatique des Cépages et Qualité des Vins,* Actes du Symposium International de Montpellier, Février 1993.

ENGEL K. H., TRESSL R., 1991. Identification of new sulfur-containing volatiles in yellow passion fruits (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 2249-2252.

GUNATA Z., BITTEUR S., BRIOULLET J. M., BAYONOVE C., CORDONNIER R., 1988. Sequential enzymatic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carb. Research,* **184,** 139-149.

GUNATA Z., DUGELAY I.,SAPIS J. C., BAUMES R., BAYONOVE C., 1990. Action des glycosidases exogènes au cours de la vinification : libération de l'arôme à partir de précurseurs glycosidiques. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **24**, 3, 133-144.

HOLSCHER W., VITZTHUM O. G., STEINHART H., 1992. Prenyl alcohol-Source for odorants in rosted coffee. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 655-658.

JOCELYN P.C., 1972. The occurrence, chemical properties, metabolism and biological function of thiols and disulfides. dans *Biochemistry of the SH group*; Eds.; Academic Press: London, U.K.

JOCELYN P. C., 1987. dans *Methode in Enzymology*; Jakoby W.B., Griffith O.W., Eds.; Acaademic Press: London, U.K. Vol. 143, p 44.

LARSEN G. L., 1985. Distribution of cysteine conjugate ß-lyase in gastrointestinal bacteria and in the environment. *Xenobiotica*, **15**, 3, 199-209.

LARSEN G. L., STEVENS J.L., 1986. Cysteine conjugate ß-lyase in the gastrointestinal bacterium *Eubacterium limosum*. *Mol. Pharmacol.*, **29**, 97-103.

LAVIGNE V., 1996. Recherches sur les composés soufrés volatils formés par la levure au cours de la vinification et de l'élevage des vins blancs secs. Thèse de doctorat de l'université de Bordeaux II.

LAVIGNE V., HENRY R., DUBOURDIEU D., 1998. Identification et dosage de composés soufrés intervenant dans l'arôme « grillé» du vin. *Sci. Aliments*, **18**, 175-191.

MORINO Y., SNELL E., 1967. A kinetic study of the reaction mechanism of tryptophanase-catalyzed reactions. *J. Biol. Chem.*, **242**, 2793-2799.

PEYNAUD E., 1980. dans Le Goût du Vin. Ed.; Dunod, Paris.

PEYROT des GACHONS C., TOMINAGA T., DUBOURDIEU D., 2000. Measuring the aromatic potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc grapes by assaying *S*-cysteine conjugates, Precursors of the volatile thiols responsible for their varietal aroma. Accepté pour la publication dans *J. Agric. Food Chem.*(à paraître).

RAPP A., GUNTERT M., ALMY J., 1985. Identification and signifiance of several sulfur-containing compounds in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**, 3, 219-221.

RIBEREAU-GAYON P., BOIDRON J. N., TERRIER A., 1975. Aroma of Muscat grape varieties. *J. Agric. Food. Chem.*, **23**, 6, 1042-1047.

STAHL-BISKUP E., INTERT F., HOLTHUIJZEN J., STENGELE M., SCHULZ G., 1993. Glycosidically bound volatiles - A review 1986-1991. *Flavour and Fragr. J.*, **8**, 61-80.

STRAUSS C. R., WILSON B., WILLIAMS P. J., 1988. Novel monoterpene diols and diol glycosides in *Vitis vinifera* grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 569-573.

TOMINAGA T., MASNEUF I., DUBOURDIEU D., 1995a. Mise en évidence d'un *S*-conjugué de la cystéine, précurseurs d'arôme du Sauvignon. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **29**, 4, 227-232.

TOMINAGA T., MASNEUF I., DUBOURDIEU D., 1995b. Des conjugués de la cystéine, Précurseur de certains arômes varietaux du Sauvignon. V ème Symposium International d'Œnologie. «Actualité Œnologiques 95», Juin Bordeaux. p 44-49.

TOMINAGA T., DARRIET P., DUBOURDIEU D., 1996. Identification de l'acétate de 3-mercaptohexanol, composé à forte odeur de buis, intervenant dans l'arôme des vins de Sauvignon. *Vitis*, **35**, 4, 207-210.

TOMINAGA T., DUBOURDIEU D., 1997. Identification of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one from the Box Tree (*Buxus sempervirens* L.) and Broom (*Sarothamnus scoparius* (L.) Koch.). *Flavour and Fragr. J.*, **12**, 373- 376.

TOMINAGA T., DUBOURDIEU D., 2000. Identification of cysteinylated aroma precursors of certain volatil thiols in passion fruit juice. *J. Agric. Food Chem*. (à paraître).

TOMINAGA T., FURRER A., HENRY R., DUBOURDIEU D., 1998a. Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour and Fragr. J.* **13**, 159-162.

TOMINAGA T., MURAT M. L. DUBOURDIEU D., 1998b. Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon blanc. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1044-1048.

TOMINAGA T., PEYROT DES GACHONS C., DUBOURDIEU D., 1998c. A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon blanc : *S*-cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 5215-5219.

TOMINAGA T., BALTENWECK-GUYOT R., PEYROT des GACHONS C., DUBOURDIEU D., 2000. Contribution of Volatile Thiols to the Aromas of White Wines made from Several *Vitis vinifera* Grape Varieties. *Am. J. Enol. Viti.* (à paraître).

TRESSL R., GRUNEWALD K. G., KAMPERSCHROER H., SILWAR R., 1980. Formation of pyrroles and aroma contributing sulphur compounds in malt and roasted coffee. *Prog. Food Nutr. Sci.*, **4**, 111.1-112.9.

WILLIAMS P. J., STRAUSS C. R., WILSON B., MASSY-WESTROPP R. A., 1982. Novel monoterpenes disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry*, **21**, 8, 2013-2020.

WINTERHALTER P., SEFTON M. A., WILLIAMS P. J., 1990. Volatile C_{13}-norisoprenoid compounds in Riesling wine are generated from multiple precursors. *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**, 4, 277-283.

ACADEMIE AMORIM

GREENWICH edition

11, villa St. Honoré - 75008 Paris - France
Tel : 01 58 05 10 70 - Fax : 01 58 05 10 71 - Email : contact@academie-amorim. com
http://www. academie-amorim. com