

GRAND PRIX 2011

Axel Marchal

Recherches sur les bases moléculaires de la saveur sucrée des vins secs

Approches analytique et sensorielle



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 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 vœu 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

Grand Prix 2010 -Caroline LE GOFFIC
La protection des indications géographiques en France, dans la Communauté européenne et aux États-Unis

Grand Prix 2009 - Katharina ZOTT
Les levures non-Saccharomyces : dynamique, caractérisation et interaction avec Saccharomyces durant les étapes pré-fermentaires et la fermentation alcoolique

Grand Prix 2008 – Elise SARRAZIN
Recherches sur l'arôme des vins liquoreux de pourriture noble issus des cépages Sémillon et Sauvignon blanc
Caractérisation de composés clés et étude de leur genèse

Grand Prix 2007 – Alexandre PONS
Recherche sur l'arôme de vieillissement prématuré des vins blancs sec

Grand Prix 2006 - Paulo LOPEZ
« Etude des phénomènes oxydatifs pendant le vieillissement des vins en bouteille. Rôle de l'obturateur »

Grand Prix 2005 - Stéphane LA GUERCHÉ
« Les défauts moisissureux des vins : la géosmine identifiée comme principale responsable »

Grand Prix 2004 - Michael JOURDES
« Réactivité, sythèse, couleur et activité biologique d'Ellagitannins C-Glycosidique et Flavano-Ellagi tannins »

Grand Prix 2003 Dominique ROUJOU DE BOUBÉE
« Recherches sur la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine dans les raisins et dans les vins »

Grand Prix 2002 - Catherine PEYROT DES GACHONS
« Recherches sur le potentiel aromatique des raisins de Vitis vinifera L.cv Sauvignon »

Grand Prix 2001 - René SIRET
« Etude du polymorphisme génétique de la vigne cultivée (Vitis vinifera L.) à l'aide de marqueurs microsatellites : application à la caractérisation des cépages dans les vins »

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 »

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 »

Grand Prix 1998 - Virginie MOINE-LEDoux
« Recherches sur le rôle des Mannoprotéines de levure vis à vis de la stabilité protéique et tartrique des vins »

Grand Prix 1997 - Valérie LAVIGNE-CRUEGE
« 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
« Etude de la matière colorante des vins blancs de Bordeaux »

Grand Prix 1995 - Samuel LUBBERS
« Etude des interactions entre les macromolécules d'origine levurienne du vin et les composés d'arôme »

Grand Prix 1994 - Ziya GÜNATA
« Etude et exploitation par voie enzymatique des précurseurs d'arôme du raisin, de nature glycosidique »

Grand Prix 1993 - Pierre-Louis TEISSEDRÉ
« Le plomb, du raisin au vin »

Grand Prix 1992 - Pascal CHATONNET
« Incidence du bois de chêne sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins, applications technologiques »

Un candidat passionné pour un sujet passionnant !
Axel Marchal a bâti un pont entre la perception sensorielle du dégustateur et la rigueur scientifique du chimiste.

En érigeant ce pont, il lève le voile sur la saveur sucrée des vins blancs secs, cette douceur qui est le fondement de l'équilibre gustatif et dont l'origine chimique était jusqu'alors parfaitement inconnue.

En alliant l'approche sensorielle et l'approche analytique, notre lauréat est parvenu à découvrir de nouveaux composés qui ouvrent le monde de l'œnologie sur de nombreuses perspectives.

L'Académie Amorim a particulièrement apprécié la rigueur scientifique de ce travail de thèse et l'enthousiasme de son auteur qui semble réunir toutes les qualités pour marquer de son empreinte l'œnologie de demain.

Axel Marchal peut d'autant plus se réjouir d'être le lauréat de ce 20^{ème} Grand Prix de l'Académie que celui-ci a été marqué par l'excellence des travaux présentés.

Cette année 2011 voit également la création d'un Prix de l'Initiative qui s'adresse aux jeunes entrepreneurs ayant réalisé concrètement un projet innovant autour du vin.

Parmi les nombreuses initiatives qui nous sont parvenues, nous avons retenu la « Vieri Carafe », une carafe design qui permet la maîtrise de la température du vin pendant la décantation, l'aération et le service... de quoi appliquer, sans se poser de questions, la recommandation régulièrement inscrite sur les étiquettes : « *Aérer deux heures et servir à 18°* ».

Merci à nos talentueux lauréats pour leur formidable contribution à faire avancer les connaissances sur le vin ... et à en faciliter la consommation raisonnable !

Robert Tinlot

Président de l'Académie Amorim

Recherches sur les bases moléculaires de la saveur sucrée des vins secs

Approches analytique et sensorielle

Axel MARCHAL

THÈSE pour le doctorat en science de l'Université Bordeaux Ségalen
Soutenue publiquement le 15 décembre 2010.

DIRECTEUR DE THÈSE

Monsieur **Denis DUBOURDIEU**
Professeur de l'Université Bordeaux Ségalen

MEMBRES DU JURY

Monsieur **Jean-Marie LEHN** (*Président*)
*Professeur au Collège de France (Paris), membre de l'Institut
Prix Nobel de chimie en 1987*

Monsieur **Erick DUFOURC** (*Rapporteur*)
Directeur de recherche au CNRS (Bordeaux)

Monsieur **Michel MOUTOUNET** (*Rapporteur*)
Directeur de recherche à l'INRA (Montpellier)

Monsieur **Eric FRÉROT** (*Examineur*)
Principal scientist, société Firmenich SA (Genève)

Monsieur **Pierre WAFFO-TEGUO** (*Examineur*)
Maître de conférences à l'Université Bordeaux Ségalen

INTRODUCTION

La dégustation d'un vin est un acte complexe, impliquant des mécanismes physiques, physiologiques et cognitifs, au cours duquel le dégustateur construit une représentation d'objets chimiques dans son champ de conscience¹. Cette représentation repose, d'un point de vue sensoriel, sur les paramètres visuels, tactiles, olfactifs et gustatifs du vin dégusté. De nombreux travaux se sont attachés, depuis plusieurs années, à la caractérisation moléculaire des composés volatils intervenant dans l'olfaction ; il est désormais possible d'associer certains arômes du vin à une ou plusieurs molécules, parfois seulement présentes à l'état de traces dans les vins².

De la même façon, des études récentes, portant sur les interactions entre les polyphénols du vin et les protéines salivaires, permettent d'interpréter la sensation d'astringence³⁻⁵. Toutefois, l'équilibre gustatif d'un vin ne repose pas uniquement sur sa structure tannique ou son acidité, mais également sur sa douceur⁶, le mot doux répondant à la définition

suivante : « *qui procure une sensation agréable au goût, suave* » (Grand Larousse, 1988). Le vocabulaire de la dégustation emprunte ainsi plusieurs mots au champ lexical de la douceur, et notamment le terme « sucrosité ». Ce néologisme, récurrent dans les commentaires de dégustation des professionnels du vin, décrit l'aptitude d'un vin à procurer une impression sucrée. Or, dans les vins secs, les hydrates de carbone sont présents à des concentrations nettement inférieures à leur seuil de perception ; la douceur ressentie correspond donc à une « sucrosité sans sucre ».

Cette sucrosité contribue à la complexité et à la typicité des vins, et plus particulièrement des grands vins. Elle est d'autant plus valorisée dans la gustation par l'attraction innée qu'elle exerce sur le dégustateur (cette valence attractive ou répulsive dépend de sa propre glycémie), alors que l'appréciation des saveurs acides ou amères nécessite un apprentissage culturel, même si la composante innée n'est pas négligeable.

Néanmoins, les déterminants moléculaires de la saveur sucrée dans les vins secs n'ont pas encore été caractérisés, en dépit de l'évidence de leur importance sensorielle. Compte tenu de la nature du sujet d'étude et du manque de données le concernant, nous avons adopté une double approche, utilisant conjointement des techniques analytiques et sensorielles.

Après avoir clarifié le rôle de l'éthanol et du glycérol, nous avons ainsi étudié deux facteurs qui pourraient, d'après beaucoup de vinificateurs, concourir à l'augmentation de la sucrosité des vins secs au cours de leur élaboration : la macération post-fermentaire des vins rouges et l'élevage des vins dans des contenants de bois de chêne. L'utilisation de techniques analytiques nous a permis de donner une interprétation moléculaire à ces observations empiriques, en identifiant plusieurs nouvelles molécules possédant des propriétés gustatives.

I. Rôles de l'éthanol et du glycérol sur la saveur sucrée des vins secs

L'éthanol et le glycérol sont, avec l'eau, les espèces chimiques majoritaires des vins secs. Ces deux molécules sont essentiellement formées au cours de la fermentation alcoolique des hexoses par *Saccharomyces cerevisiae*. Plusieurs auteurs ont décrit le goût sucré de l'éthanol et du glycérol en solution aqueuse⁷⁻⁹, mais aussi l'amertume et le caractère brûlant associé à l'éthanol^{8,10,11}.

On prête fréquemment à l'éthanol et au glycérol un effet sur la sucrosité des vins secs. Néanmoins, les études sur ce sujet sont contradictoires, et il nous a semblé utile de clarifier leur impact sensoriel dans les vins.

A cette fin, des quantités connues d'éthanol et de glycérol ont été ajoutées à un vin rouge (Bordeaux 2007, 12.2% Vol, 6.9 g/L de glycérol, 0.37 g/L de glucose+fructose). Deux séries ont été proposées aux dégustateurs : l'une consistant en des ajouts d'éthanol, l'autre en des ajouts de glycérol. Ces composés ont été additionnés au vin de base, une heure avant la dégustation, dans les quantités mentionnées au tableau 1.

Tableau 1 - Modalités préparées pour l'analyse sensorielle de l'influence de l'éthanol et du glycérol sur la perception de la sucrosité.

Modalité	Modalité 1	Modalité 2	Modalité 3	Modalité 4
Quantité d'éthanol ajoutée (teneur finale)	Témoin (12.2 %)	+ 0.5 % (12.7 %)	+ 1 % (13.2 %)	+ 1.5 % (13.7 %)
Quantité de glycérol ajoutée (teneur finale)	Témoin (6.9 g/L)	+ 1 g/L (7.9 g/L)	+ 3 g/L (9.9 g/L)	+ 5 g/L (11.9 g/L)

Les modalités obtenues ont été proposées à un panel de dégustateurs dans le cadre d'un test de classement. La session rassemblait 38 étudiants du Diplôme Universitaire d'Aptitude à la Dégustation, tous professionnels du vin, auxquels il a été demandé de classer les échantillons par ordre croissant d'intensité de la saveur sucrée. Le traitement statistique utilisé a fait appel au test de Page (AFNOR ISO 8587:2006). Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 - Résultats de la dégustation des ajouts d'éthanol et de glycérol interprétée par le test de Page.

Facteur étudié	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	L	L'	Résultat
Ethanol	98	88	94	100	956	0.34	Non significatif
Glycérol	89	93	99	99	968	1.01	Non significatif

La statistique de Page permet de conclure que le test n'est pas significatif, au risque de 5 %, pour chacun des deux composés. Les valeurs de L' (paramètre du test de Page) sont nettement inférieures à la valeur critique (1.645) et indiquent que les dégustateurs n'ont pas été capables de classer les vins de façon significative en fonction de leur sucrosité.

Le vin de base utilisé présente des concentrations faibles en glucose+fructose, nettement inférieures aux seuils de perception ; il s'agit bien d'un vin sec. Les tests effectués après addition d'éthanol et de glycérol montrent que les dégustateurs n'ont pas pu classer les différentes modalités de façon significative. Ainsi, l'ajout de ces deux molécules n'a impliqué aucune modification nette de la sucrosité perçue dans le vin utilisé. Des résultats similaires ont été obtenus à partir d'un vin blanc. Cette étude corrobore les conclusions de travaux publiés précédemment^{10,11}.

En conclusion, l'analyse sensorielle a permis de montrer que l'éthanol et le glycérol ne possèdent pas d'impact sur la sucrosité dans les conditions décrites. Il est possible qu'un effet matrice existe et que ces résultats puissent être légèrement modifiés en utilisant des vins de base différents. Toutefois, au regard des faibles variations de concentrations fréquemment observées dans des vins présentant des écarts nets de saveur sucrée, le rôle de l'éthanol et du glycérol sur la sucrosité des vins secs nous semble très limité.

II. Effet des macromolécules de levures sur la sucrosité des vins.
Mise en évidence du rôle de la protéine Hsp12

Au cours de l'autolyse des levures, diverses modifications organoleptiques majeures sont observées dans les vins. Les praticiens constatent en particulier une nette augmentation de la saveur sucrée des vins rouges pendant la macération post-fermentaire, qui est concomitante à l'autolyse des levures.

I. Étude de l'effet de l'autolyse des levures sur la perception de la sucrosité

Afin d'étudier le rôle éventuel des lies de levures sur la sucrosité, des quantités différentes de levures sont additionnées dans un même vin de base, placé ensuite dans les conditions d'autolyse caractéristiques des vins rouges, à 32°C pendant 10 jours¹². La variable de cette expérience est la quantité de levures introduite. Quatre modalités sont préparées : une modalité témoin (sans ajout de levures), et trois modalités correspondant à des ajouts de levures à hauteur de 2.10⁸, 4.10⁸ et 8.10⁸ cellules/mL respectivement. Les levures sont ajoutées dans des vins secs ; comme elles ne disposent pas de nutriments dans le milieu, elles n'ont aucune activité fermentaire. Après ajout des levures, les vins sont conservés à 32°C pendant 10 jours. Ces conditions reproduisent celles de la macération post-fermentaire de la vinification en rouge, favorables à l'autolyse des levures.

Les différentes modalités sont proposées à un panel de dégustateurs sous forme d'un test de classement par rangs, selon le critère de sucrosité. L'interprétation statistique fait appel au test de Page (tableau 3).

Tableau 3 - Résultats de la dégustation interprétée par le test de Page.

Facteur étudié	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	L	L'	Résultat
Lies de levures	67	71	106	123	1019	3.87	Significatif à 0.1 %

La statistique de Page permet de conclure que le test est significatif au risque de 1 % : les échantillons ont été jugés globalement différents par les dégustateurs. On voit que les sommes de rangs augmentent avec les modalités, c'est-à-dire que la sucrosité perçue par les dégustateurs augmente avec la quantité de levures introduite.

Cette expérience a permis de relier de façon rigoureuse l'augmentation de sucrosité observée dans les vins au cours de la phase post-fermentaire avec l'autolyse des levures. Il apparaît en effet que la saveur sucrée des vins rouges augmente de façon significative avec la quantité de lies de levures présentes au cours de l'autolyse.

Ces résultats nouveaux suggèrent la libération de composés de la levure au cours de la phase d'autolyse, modifiant la perception gustative des vins secs.

2. Rôle de la protéine Hsp12 dans l'augmentation de la perception de sucrosité au cours de l'autolyse

Ces travaux, initiés par le Docteur Virginie Moine, se sont attachés au fractionnement et à la purification d'extraits de levures, en vue d'identifier les composés sapides libérés au cours de l'autolyse¹². Les mises en œuvre successives d'ultrafiltrations et de méthodes chromatographiques telles que la CLHP de tamisage moléculaire LH20 et la CLHP C18 ont permis de collecter une fraction sapide. L'analyse de cette fraction en chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse a révélé la présence de peptides majoritairement issus d'une protéine de choc thermique membranaire de la levure : Hsp12.

Afin d'étudier l'hypothèse d'une contribution de cette protéine au gain de sucrosité consécutif à l'autolyse, nous avons comparé, dans un vin rouge, l'impact organoleptique de levures capables ou non de synthétiser cette protéine.

Pour des raisons sanitaires, l'analyse sensorielle a été effectuée à partir de levures ne possédant pas de protéines recombinantes d'origine bactérienne. Un « mutant zéro » Δ^{hsp12} a ainsi été construit en collaboration avec le Docteur Philippe Marullo, et comparé à la levure œnologique Fx10, dont il ne diffère que par l'absence du gène HSP12. Les levures ont été introduites dans un vin sec à des concentrations identiques et cohérentes avec la réalité œnologique (2.10^8 cellules/mL). Les conditions utilisées sont celles de la macération post-fermentaire des vins rouges, décrites précédemment.

Un test triangulaire est effectué et montre une différence organoleptique significative entre les deux modalités (au seuil de 5 %). Selon les dégustateurs, la présence de la protéine Hsp12 est en outre associée à une augmentation de la sucrosité, ce qui confirme l'implication de cette protéine dans le gain de saveur sucrée lié à l'autolyse.

A notre connaissance, ces résultats constituent le premier exemple de la mise en évidence d'un lien entre une protéine de la levure et un caractère gustatif du vin. En raison de la masse moléculaire des constituants de la fraction sapide, il est vraisemblable que le gain de sucrosité soit imputable à des peptides issus de Hsp12 et libérés au cours de l'autolyse sous l'action d'enzymes endogènes.

Par ailleurs, l'expression du gène *HSP12* est notamment régulée par la température, le stress oxydatif ou bien encore la concentration en éthanol et en glycérol ; de nombreuses applications œnologiques sont donc envisageables. Dans cette optique, la détermination de la structure moléculaire exacte des peptides impliqués ainsi que l'étude des mécanismes de leur formation devront faire l'objet d'études ultérieures.

III. Effet de l'élevage sous bois de chêne sur la sucrosité des vins secs

L'élaboration des grands vins et de nombreux spiritueux met en jeu un élevage en barrique de bois. Au cours de ce vieillissement, les vins et les alcools subissent différentes modifications physico-chimiques se traduisant par une évolution de leurs caractéristiques organoleptiques. En pratique, on observe à la fois un apport de composés d'arômes et un gain de saveur, notamment de sucrosité, vraisemblablement imputables à l'extraction de composés volatils et non volatils présents dans le bois de chêne. De nombreux travaux ont porté sur l'identification et le dosage des substances aromatiques clés apportées par l'élevage en barriques : la vanilline, la whisky-lactone, le furfurylthiol, ou encore des

phénols volatils¹³⁻¹⁴. En outre, le bois de chêne contient des composés non volatils extractibles, de type phénolique, auxquels il a été prêté des propriétés gustatives d'astringence et d'amertume¹⁵⁻¹⁶.

En revanche, peu d'études se sont intéressées au phénomène d'édulcoration observé lors de l'élevage en barrique. Aucun composé non volatil à saveur sucrée n'a d'ailleurs été identifié jusqu'ici dans le bois de chêne.

I. Effet de la nature du contenant d'élaboration sur la sucrosité des vins secs

Le phénomène d'édulcoration observé empiriquement mérite d'être étudié de façon plus approfondie. Dans cette perspective, quatre contenants différents ont été utilisés pour la fermentation et l'élevage d'un lot homogène de moût de Bordeaux blanc 2007 d'une part, et pour l'élevage d'un lot de Crozes-Hermitage rouge (tableau 4).

Tableau 4 - Panels et modalités utilisés pour l'étude de l'effet du contenant sur la sucrosité.

Vin	Panel	Modalité 1	Modalité 2	Modalité 3	Modalité 4
Bordeaux blanc 2007	32 dégustateurs DUAD	Cuve inox 4 hL	Cuve bois 50hL	Barriques 1 an	Barriques neuves
Crozes-Hermitage rouge 2008	28 dégustateurs ISVV	Cuve bois 85 hL	Barriques 2 ans	Barriques 1 an	Barriques neuves

À l'issue de leur élevage, les quatre modalités obtenues pour chaque expérimentation ont été soumises à une analyse sensorielle : il a été demandé à un panel de classer les vins en fonction de leur sucrosité (caractère moelleux/suave). Les résultats obtenus, en appliquant un test statistique de Friedman, sont consignés au tableau 5.

Tableau 5 - Résultats du test de classement par rangs.

Vin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	F	Λ à 5 %	Λ à 1 %	Résultat
Bordeaux blanc 2007	52	73	90	105	30.63	7.81	11.34	Significatif à 1 %
Crozes-Hermitage rouge 2008	52	71	74	83	10.93	7.81	11.34	Significatif à 5 %

Pour les deux expérimentations, le test est significatif. Ces résultats traduisent la capacité des dégustateurs à distinguer et hiérarchiser de façon statistiquement significative les vins dégustés en fonction de leur saveur sucrée. Les modalités ont été classées par ordre croissant de l'influence du bois, ce qui confirme l'observation initiale, c'est-à-dire que l'élevage au contact du bois de chêne confère un supplément de sucrosité aux vins.

2. Incidence des composés volatils du bois de chêne sur la sucrosité

La mise en évidence du pouvoir édulcorant de l'élevage en barrique suggère l'existence de composés provenant du bois de chêne et participant à la saveur sucrée des vins secs. Ces molécules sont vraisemblablement extraites par le vin au cours de l'élevage.

Or, l'élaboration des vins sous bois conduit à la libération de molécules volatiles telles que la vanilline ou la whisky-lactone, dont les descripteurs aromatiques sont généralement associés à des goûts sucrés dans l'alimentation. Ces composés pourraient alors contribuer non au goût, au strict sens physiologique du terme, mais à la « représentation sucrée » construite dans le cerveau du dégustateur. Nous avons par conséquent souhaité étudier l'incidence de ces composés volatils sur la perception de la saveur sucrée des vins.

La vanilline, la whisky-lactone et l'eugénol ont été quantifiés en GC-MS dans les différentes modalités de Bordeaux blanc et de Crozes-Hermitage rouge décrites précédemment¹⁷. Les concentrations en ces composés ont ensuite été ajustées aux valeurs les plus élevées, retrouvées dans les modalités « barriques neuves », afin d'homogénéiser l'arôme boisé

dans les différents échantillons. Les vins obtenus ont alors été dégustés par les mêmes panels, dans des conditions similaires (tableau 6).

Tableau 6 - Résultats du test de classement par rangs obtenus après ajout de vanilline, whisky-lactone et 2-furaneméthanethiol

Vin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	F	Λ à 5 %	Λ à 1 %	Résultat
Bordeaux blanc 2007	57	66	89	108	29.81	7.81	11.34	Significatif à 1 %
Crozes-Hermitage rouge 2008	54	69	74	83	9.47	7.81	11.34	Significatif à 5 %

Pour chaque série, le classement de la sucrosité des échantillons et la significativité du test apparaissent invariants après ajout des composés volatils. Ces résultats montrent que les écarts de saveur sucrée perçus entre des vins provenant de différents types de contenants ne sont pas imputables aux molécules volatiles étudiées (vanilline, whisky-lactone et l'eugénol).

De même que l'autolyse des levures engendre la libération de peptides augmentant la saveur sucrée, il apparaît que l'élaboration sous bois participe à une édulcoration des vins, qui ne peut être attribuée aux composés volatils clés issus du bois de chêne.

Dès lors, nous pouvons conjecturer l'existence de molécules non-volatiles, libérées par le bois de chêne et participant à la saveur sucrée des vins secs.

IV. Purification et identification de molécules non-volatiles du bois de chêne à saveur sucrée

I. Développement d'une technique de purification guidée par le goût

Nous avons cherché à purifier et à identifier des composés du bois de chêne à saveur sucrée. En raison de la grande diversité chimique des molécules possédant des propriétés édulcorantes, la stratégie développée repose essentiellement sur une démarche inductive, basée sur la purification d'extraits de bois.

L'étape préliminaire à la mise en œuvre de la purification consiste à extraire des molécules par macération du bois de chêne dans un milieu liquide. Des copeaux de bois de cœur de chêne sessile du Caucase mûré à l'air libre pendant 3 ans ont été macérés dans un mélange eau/éthanol 50/50 pendant 20 jours à 22°C environ.

Après filtration du macérat, nous avons développé un protocole de fractionnement basé sur la dégustation et impliquant diverses techniques séparatives.

La première étape consiste en des extractions liquide/liquide, en utilisant successivement 3 solvants : le *n*-heptane, l'acétate d'éthyle et le méthyl *ter*-butyl éther (MtBE). Ces trois extractions sont réalisées en série. À l'issue de chacune d'elles, les phases organique et aqueuse sont lyophilisées puis dégustées. La phase présentant la saveur sucrée la plus intense est conservée pour être utilisée dans l'extraction ultérieure. La phase organique de l'extraction au MtBE est ainsi sélectionnée après la dernière extraction.

La deuxième étape du protocole de purification fait appel à la chromatographie de partage centrifuge (CPC). Cette technique est une méthode de chromatographie liquide/liquide sans support solide [8]. Elle est basée sur les différences de partage de divers solutés entre deux phases non miscibles, de densité différente. L'appareil est constitué d'une colonne comportant un grand nombre de cellules de petite taille, pour un volume total d'environ 200 mL. Cette technique permet un fractionnement de l'extrait à l'échelle préparative et le caractère liquide de la phase stationnaire évite toute adsorption irréversible, ce qui augmente considérablement le rendement de la séparation.

En collaboration avec le Docteur Pierre Waffo-Tégou du laboratoire GESVAB (ISVV) dirigé par le professeur Mérillon, nous avons développé une méthode de CPC permettant le fractionnement de la phase organique de l'extraction au MtBE, obtenue à l'issue de l'étape précédente.

Les tubes récoltés sont analysés en CLHP-UV, puis regroupés en 15 fractions (I à XV),

sur la base de leur profil chromatographique. Après double lyophilisation, ces quinze fractions ont été présentées à quatre dégustateurs entraînés. Ils ont tenté de caractériser la perception gustative associée à chaque échantillon, et d'en évaluer l'intensité sur une échelle de 0 à 5 (figure 1).

Les aromaticiens couplant la chromatographie en phase gazeuse et l'olfaction emploient les termes d'olfactométrie et d'olfactogramme. Par analogie, nous avons convenu d'utiliser les termes de gustatométrie et de gustatogramme dans le cadre de la gustation des fractions issues d'un fractionnement.

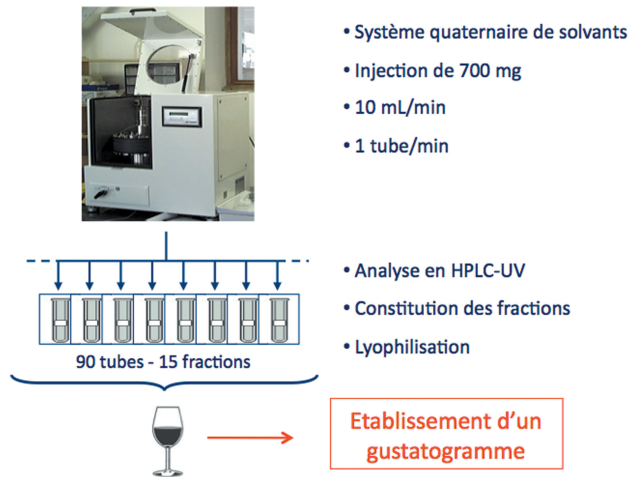


Figure 1 – Principe et mise en œuvre de la Chromatographie de Partage Centrifuge couplée à la Gustatométrie (CPC-G).

Le gustatogramme obtenu présente plusieurs fractions sucrées, d'intensité variable. La fraction **X** (59 mg) est la plus sucrée d'entre elles et présente un profil chromatographique relativement simple, avec quatre pics majoritaires (figure 2).

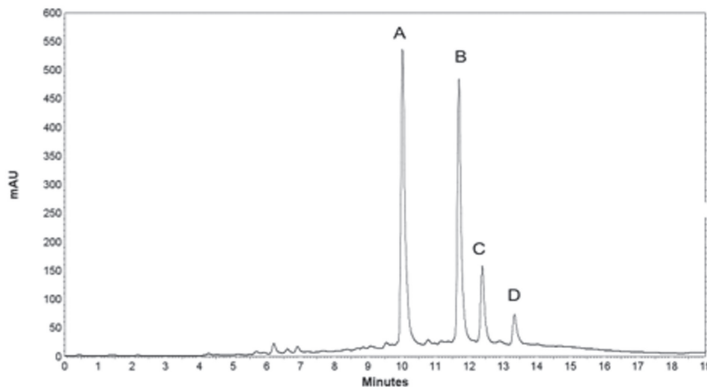


Figure 2 - Chromatogramme HPLC à 280 nm de la fraction sucrée **X** obtenue par CPC-G.

Le couplage CPC-Gustatométrie, développé dans le cadre de notre travail, a permis d'isoler une fraction sapide contenant quatre composés majoritaires, notés **A**, **B**, **C** et **D**. Cette nouvelle technique apparaît particulièrement prometteuse pour l'étude des substances non-volatiles possédant des propriétés organoleptiques.

La troisième étape du protocole a mis en œuvre la purification des molécules **A**, **B**, **C** et **D** par CLHP préparative. L'obtention de ces quatre composés (tableau 7) conclut le protocole de purification développé dans notre étude.

Tableau 7 - Aspect et masse des composés **A**, **B**, **C** et **D** après lyophilisation.

Composé	Aspect	Masse obtenue
A	Poudre blanche	16 mg
B	Poudre blanchâtre	4,9 mg
C	Poudre blanche	1,2 mg
D	Poudre blanche	0,3 mg

2. Détermination de la structure chimique des composés **A**, **B**, **C** et **D**

La purification des quatre composés constituant la fraction **X** permet d'envisager leur identification. A cette fin, nous avons utilisé deux outils analytiques puissants et complémentaires : la spectrométrie de masse à transformée de Fourier (FT/MS) et la résonance magnétique nucléaire (RMN).

Notre laboratoire a acquis, en janvier 2010, un spectromètre de masse équipé d'un analyseur Orbitrap. Cette nouvelle technologie de FT/MS permet une mesure très précise des rapports m/z (< 1 ppm), couplée à résolution élevée ($> 100\,000$ à $m/z=400$ Th). Ces performances analytiques sont à l'origine de l'enregistrement de spectres de masse particulièrement informatifs et conduisent à une détermination fiable de la formule brute des composés analysés (figure 3).

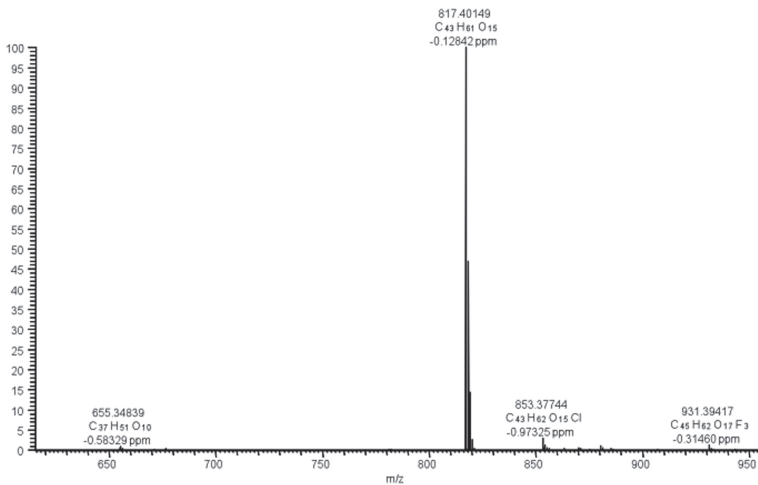


Figure 3 - Spectre de masse du composé **C** en mode négatif.

La RMN du proton ^1H et du carbone ^{13}C , à une et à deux dimensions, fournit quant à elle des informations majeures sur la formule développée des composés. Nous avons notamment utilisé diverses expériences de corrélation afin de déterminer l'enchaînement des atomes dans la molécule (COSY, HSQC, HMBC), la position des groupements fonctionnels (HMBC) et la stéréochimie relative des centres stéréogènes (ROESY). L'utilisation conjointe de ces deux techniques nous a permis d'enregistrer des données analytiques particulièrement complètes et ainsi d'identifier les composés **A**, **B**, **C** et **D** (figure 4).

Le composé **A** est un lignane, appelé **lyonirésinol**, dont la présence a été rapportée dans le genre *Quercus*¹⁹⁻²¹, mais aussi dans diverses eaux-de-vie élevées sous bois^{19,22} et dans les vins²³.

Le composé **B** est le dérivé 6'-O-gallate de l'acide (3S,4S)-4-β-D-glucopyranosyloxy-3-méthyl octanoïque, qui avait été identifié par dans un extrait de bois de *Quercus petraea*²⁴

comme l'un des précurseurs de la cis- β -methyl- γ -octalactone ou whisky-lactone. Nous le notons ainsi **P-WL**.

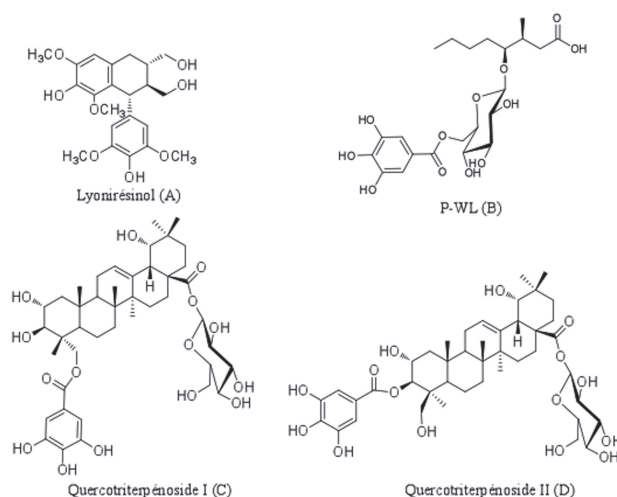


Figure 4 - Structure chimique des composés **A, B, C** et **D**

Les composés **C** et **D** sont deux isomères, de formule brute $C_{43}H_{62}O_{15}$, possédant un squelette triterpénique de type oléanolique, sur lequel sont fixés un glucopyranosyle et un galloyle. Ces deux molécules, qui diffèrent par la position du galloyle, n'avaient jamais été identifiées, ni dans un extrait de chêne, ni même dans aucune espèce naturelle. Nous les avons ainsi respectivement nommées **Quercotriterpénosides (QTT) I** et **II**, en référence au nom de l'espèce dans laquelle nous les avons identifiées pour la première fois. A notre connaissance, aucun triterpénoïde galloylé et glucosylé n'avait en outre été identifié dans le bois de chêne.

3. Utilisation de la LC-FT/MS pour l'identification de nouveaux triterpénoïdes dans les extraits de bois de chêne

L'étude structurale des composés de la fraction **X** nous a conduits à identifier deux nouvelles molécules, appartenant à une famille chimique inconnue dans le bois de chêne. Les performances de la FT/MS en termes de précision de mesure de masse permettent d'étudier la présence d'éventuels isomères ou de dérivés glycosylés dans un extrait de bois, par ciblage d'ions caractéristiques (figure 5). Nous recherchons ainsi les ions de formule brute $C_{43}H_{61}O_{15}$ (isomères, notés Mono-Glu), $C_{49}H_{71}O_{20}$ (dérivés glycosylés, notés Di-Glu) et $C_{55}H_{81}O_{25}$ (Tri-Glu).

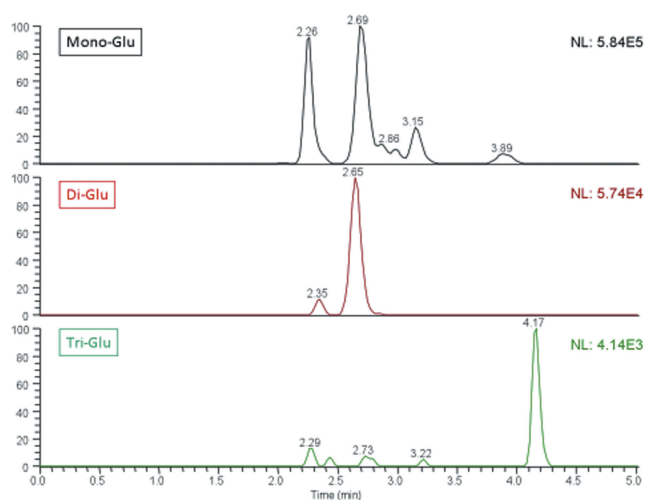


Figure 5 - Chromatogrammes d'ions extraits pour les *m/z* correspondant aux espèces mono- (Mono-Glu, en noir), di- (Di-Glu, en rouge) et tri-glycosylés (Tri-Glu, en vert) d'un extrait de bois.

La figure 5 montre la présence de plusieurs isomères des **QTT I** (2.28 min) et **II** (3.00 min) dans l'extrait de bois étudié. A ce stade, nous n'avons pas encore identifié l'isomère majoritaire, à 2.69 min (noté composé **E**). Le chromatogramme en rouge montre la présence d'un dérivé glycosylé majoritaire (2.85 min, noté composé **F**). L'intensité très faible du signal enregistré pour le chromatogramme en vert montre que les triterpènes tri-glycosylés ne sont présents qu'à l'état de traces.

Sur la base de ces observations, nous avons mis en place une stratégie de purification afin d'isoler l'isomère majoritaire des **QTT I** et **II** (composé **E**), ainsi que leur principal dérivé glycosylé (composé **F**). Ces deux composés ont ensuite été identifiés en utilisant la FT/MS et la RMN. Il s'agit également de nouvelles molécules, appelées respectivement **QTT III** et **IV** (figure 6).

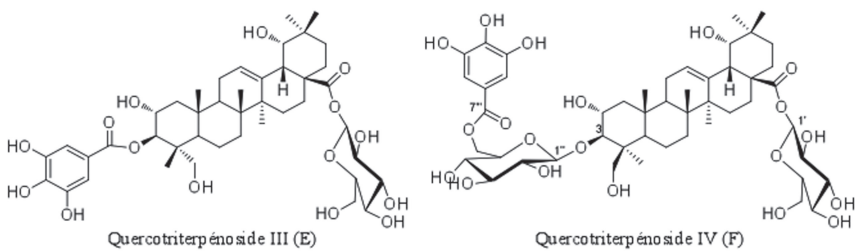


Figure 6 - Structure chimique des Quercotriterpénosides III et IV.

V. Propriétés sensorielles des composés identifiés dans le bois de chêne. Quantification et impact gustatif dans les vins et les eaux-de-vie

Parmi les composés identifiés dans l'extrait de bois de chêne, certains sont nouveaux (les **QTT**), d'autres n'ont jamais été l'objet d'études sensorielles approfondies (**lyonirésinol** et **P-WL**). Leur caractérisation gustative et leur quantification sont nécessaires pour discuter de leur impact organoleptique dans les vins.

En raison des faibles quantités purifiées, seuls quatre composés ont pu être dégustés, dans deux matrices différentes, à une concentration fixe de 10 mg/L (tableau 8).

Tableau 8 - Sensations associées à la présence des quatre composés étudiés dans une solution eau/éthanol 1 % v/v et dans un vin blanc.

Molécule	Solution eau/éthanol	Bordeaux blanc 2008
Lyonirésinol	Amertume persistante	Dureté et amertume renforcées en finale
P-WL	Pas de goût	Pas de goût
Quercotriterpénoside I	Légère douceur et sensation rémanente	Sucrosité augmentée, diminution de l'acidité et de l'amertume, sensation douce et persistante en finale
Quercotriterpénoside III	Légère douceur et sensation rémanente	Diminution de la perception acide en attaque, augmentation de la douceur

Si le **lyonirésinol** est amer et le **P-WL** ne possède pas de goût, la dégustation effectuée montre que le **QTT I** possède une saveur douce, particulièrement marquée dans un vin blanc. Ce composé contribue vraisemblablement à la sucrosité perçue dans la fraction **X**. Par ailleurs, les seuils de perception du **lyonirésinol** et du **QTT I** dans un vin blanc sont respectivement de 1.52 mg/L et 590 µg/L.

En outre, nous avons développé une méthode de quantification en LC-FT/MS du **lyonirésinol** ainsi que des **QTT I** et **III** dans les vins blancs.

Une trentaine de vins ont ainsi été analysés, et la plupart d'entre eux possèdent une teneur en **lyonirésinol** supérieure au seuil de perception, pouvant aller jusqu'à 3 mg/L. Ce composé possède donc un impact organoleptique direct et confère de l'amertume aux vins blancs élevés sous bois.

Les concentrations en **QTT I** et **III** sont nettement plus faibles, variant de quelques dizaines à quelques centaines de microgrammes par litre. Aucune d'entre elle n'atteint le seuil de perception du **QTT I** ; seul, ce composé ne possède donc pas d'impact sensoriel direct. En revanche, nous ne connaissons pas le seuil de perception des autres **QTT**, et il est vraisemblable que ces molécules, appartenant à la même famille chimique, développent des effets synergiques, à l'instar du glucose et du fructose par exemple. Il n'est donc pas exclu que les **QTT** contribuent à la saveur sucrée conférée par l'élevage sous bois de chêne.

CONCLUSION

La qualité des vins, c'est-à-dire l'agrément qu'ils procurent au dégustateur, dépend de la complexité et de l'harmonie de leurs odeurs et de leurs goûts. La représentation de cette qualité dans la conscience du dégustateur se construit par la perception sensorielle des nombreux composés volatils et non volatils du vin, suivie de l'intégration neurophysiologique et cognitive des stimuli perçus.

La saveur douce, évoquant celle du sucre, caractérise paradoxalement l'équilibre gustatif des vins secs, et plus particulièrement des grands vins. Elle atténue l'acidité, l'amertume ou bien encore l'astringence, générées par certaines molécules du vin comme les acides organiques ou les polyphénols. Les déterminants moléculaires de cette « *sucrosité sans sucre* » n'ont jamais été clairement caractérisés jusqu'ici. Leur connaissance est toutefois nécessaire à la compréhension des mécanismes neurophysiologiques impliqués lors de la dégustation.

Des expériences d'analyse sensorielle ont permis de montrer que l'impact de l'éthanol et du glycérol sur la sucrosité des vins secs est limité. Les faibles variations de leurs concentrations ne permettent pas d'expliquer des différences sensibles de l'intensité du goût sucré. Ces résultats invalident la théorie de leur contribution gustative déterminante et suggèrent l'existence de molécules édulcorantes dans les vins secs.

Nous avons en outre étudié le rôle gustatif des lies de levures dans la « *sucrosité sans sucre* » des vins rouges. L'utilisation couplée de techniques sensorielles et biomoléculaires a permis d'établir l'implication d'une protéine de choc thermique de *Saccharomyces cerevisiae* dans ce phénomène : Hsp12. L'expression du gène HSP12 est notamment régulée par la température ainsi que par la concentration en éthanol et en glycérol. De nombreuses applications œnologiques sont donc envisageables. A notre connaissance, il s'agit de la première mise en évidence d'un lien entre une protéine de la levure et un caractère gustatif des vins.

Par ailleurs, nous avons montré que l'élaboration des vins sous bois de chêne participe à une augmentation de leur sucrosité, et que cette modification organoleptique n'est pas imputable aux composés volatils extraits du bois.

Afin d'étudier la contribution des molécules non-volatiles du bois de chêne à la saveur sucrée des vins, nous avons adopté une démarche inductive et mis en place une méthode de purification basée sur la dégustation. Une nouvelle technique d'analyse des molécules à propriétés organoleptiques a ainsi été mise au point : la CPC-Gustatométrie. Cette dernière nous a permis d'isoler une fraction sapide à partir d'un extrait de bois de chêne. La spectrométrie de masse à transformée de Fourier et la résonance magnétique nucléaire ont été utilisées pour la caractérisation structurale des composés purifiés. Nous avons ainsi identifié plusieurs molécules, dont la plupart n'avaient jamais été découvertes

dans la nature ; nous les avons nommées **Quercotriterpénosides**. Certaines d'entre elles possèdent une saveur sucrée. Enfin, la quantification et la détermination du seuil de perception de plusieurs des composés purifiés a permis d'évaluer leur impact sensoriel dans les vins.

Ce travail constitue une première étape dans la compréhension des bases moléculaires du goût du vin, au sens ontologique du terme, et ouvre de nombreuses perspectives de recherche. A titre d'exemple, l'existence de variations importantes de sucrosité en fonction des terroirs et des cépages suggère la présence de composés non glycosidiques provenant du raisin et possédant une saveur sucrée. Ils sont l'apanage des grands vins et leur étude constitue un défi passionnant.

BIBLIOGRAPHIE

1. Brochet, F.; Dubourdieu, D., *Wine descriptive language supports cognitive specificity of chemical senses. Brain and Language* **2001**, 77, (2), 187-196.
2. Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D., *Traité d'Oenologie. Tome 2. Chimie du Vin. Stabilisation et Traitements*. Dunod: Paris, 1998.
3. Cala, O.; Fabre, S.; Fouquet, E.; Dufourc, E. J.; Pianet, I., NMR of human saliva protein wine tannin complexes. Towards deciphering astringency with physico-chemical tools. *Comptes Rendus Chimie* **2010**, 13, (4), 449-452.
4. Pianet, I.; Barathieu, K.; Tarascou, I.; Fouquet, E.; Simon, C.; Laguerre, M.; André, Y.; Dufourc, E., 3D-structure, colloidal behavior and Human saliva Protein recognition of wine tannins determined by NMR. *Acta Horticulturae* **2009**, 841, 389-396.
5. Simon, C.; Barathieu, K.; Laguerre, M.; Schmitter, J. M.; Fouquet, E.; Pianet, I.; Dufourc, E. J., Three-dimensional structure and dynamics of wine tannin-saliva protein complexes. A multitechnique approach. *Biochemistry* **2003**, 42, (35), 10385-10395.
6. Peynaud, E., *Le Goût du Vin*. Dunod: Paris, 1980.
7. Cardello, A. V.; Ball, D. H.; Alabran, D. M., The taste, odor and hedonic quality of polyglycerols. *Chemical Senses* **1984**, 9, (3), 285-301.
8. Scinska, A.; Koros, E.; Habrat, B.; Kukwa, A.; Kostowski, W.; Bienkowski, P., Bitter and sweet components of ethanol taste in humans. *Drug and Alcohol Dependence* **2000**, 60, (2), 199-206.
9. Thorngate, J. H., The physiology of human sensory response to wine: A review. *American Journal of Enology and Viticulture* **1997**, 48, (3), 271-279.
10. Gawel, R.; Van Sluyter, S.; Waters, E. J., The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2007**, 13, (1), 38-45.
11. Jones, P. R.; Gawel, R.; Francis, I. L.; Waters, E. J., The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Quality and Preference* **2008**, 19, (6), 596-607.
12. Marchal, A.; Marullo, P.; Moine, V.; Dubourdieu, D., Influence of yeast macromolecules on sweetness in dry wines: Role of the *Saccharomyces cerevisiae* protein Hsp12. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, 59, (5), 2004-2010.

13. Chatonnet, P. Influence des procédés de tonnellerie et des conditions d'élevage sur la composition et la qualité des vins élevés en fûts de chêne. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux II, 1995.
14. Tominaga, T.; Blanchard, L.; Darriet, P.; Dubourdieu, D., A powerful aromatic volatile thiol, 2-furanmethanethiol, exhibiting roast coffee aroma in wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *J Agric Food Chem* **2000**, 48, (5), 1799-802.
15. Hofmann, T.; Glabasnia, A.; Schwarz, B.; Wisman, K. N.; Gangwer, K. A.; Hagerman, A. E., Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose, castalagin, and grandinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, 54, (25), 9503-9509.
16. Quinn, M. K.; Singleton, V. L., Isolation and identification of ellagitannins from white oak wood and an estimation of their roles in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1985**, 36, (2), 148-155.
17. Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, J. N., Incidence des conditions de fermentation et d'élevage des vins blancs secs en barriques sur leur composition en substances cédées par le bois de chêne. *Sci. Aliments* **1992**, 12, 665-685.
18. Murayama, W.; Kobayashi, T.; Kosuge, Y.; Yano, H.; Nunogaki, Y.; Nunogaki, K., A new centrifugal counter-current chromatograph and its application. *Journal of Chromatography A* **1982**, 239, 643-649.
19. Nabeta, K.; Yonekubo, J.; Miyake, M., Phenolic compounds from the heartwood of European oak (*Quercus robur* L.) and brandy. *Mokuzai Gakkaishi* **1987**, 33, 408-415.
20. Seikel, M. K.; Hostettler, F. D.; Niemann, G. J., Phenolics of *Quercus rubra* wood. *Phytochemistry* **1971**, 10, (9), 2249-2251.
21. Vivas, N.; Pianet, I.; Bourgeois, G.; Vitry, C.; Servens, C.; Glories, Y., Characterization of heartwood lignin fractions from *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt) Liebl., the main oak species used for barrel making. *American Journal of Enology and Viticulture* **1998**, 49, (1), 49-55.
22. Koga, K.; Taguchi, A.; Koshimizu, S.; Suwa, Y.; Yamada, Y.; Shirasaka, N.; Yoshizumi, H., Reactive oxygen scavenging activity of matured whiskey and its active polyphenols. *Journal of Food Science* **2007**, 72, (3), S212-S217.
23. Moutounet, M.; Rabier, P. H.; Puech, J. L.; Verette, E.; Barillere, J. M., Analysis by HPLC of extractable substances in oak wood. Application to a Chardonnay wine. *Sci. Aliments* **1989**, 9, (1), 35-51.
24. Masson, E.; Baumes, R.; Le Guernevé, C.; Puech, J. L., Identification of a precursor of β -methyl- γ -octalactone in the wood of Sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 48, (9), 4306-4309.