

PAPEL DE LAS LEVADURAS EN LA REVELACIÓN DEL AROMA VARIETAL AZUFRADO DE LOS VINOS: EJEMPLO DEL SAUVIGNON

Denis Dubourdieu

Faculté d'Oenologie, Université Victor Ségalen Bordeaux 2
351, Cours de la Libération 33405 Talence France.

Resumen

Numerosos tioles volátiles muy odoríferos, han sido recientemente identificados como constituyentes determinantes del aroma particular de los vinos de la variedad Sauvignon: la 4-mercapto-4-metil-2-pentanona, el 4-mercapto-4-metil-2-pentanol, el 3-mercaptohexanol y el acetato de 3-mercaptohexanol. Estos diferentes compuestos prácticamente no están presentes en la uva ni en los mostos; aparecen en los vinos recién durante la fermentación alcohólica. Su formación resulta de la transformación, por parte de las levaduras, de algunos precursores de aromas, presentes en el mosto; estos compuestos, no volátiles e inodoros, son S-combinados con la cisteína.

En un medio ideal, como el mosto, las levaduras de vinificación pertenecientes a la especie *Saccharomyces bayanus* (ex. *uvarum*), manifiestan una mayor aptitud que las *Saccharomyces cerevisiae*, para liberar algunos de estos tioles, a partir de sus precursores. Existen también, diferencias de aptitud entre las familias de levaduras, en el interior de una especie dada. Estos conocimientos han sido aplicados a la hora de seleccionar las familias de levaduras destinadas a la vinificación del sauvignon.

Introducción

La incidencia de las levaduras sobre las cualidades organolépticas de los vinos es un tema mencionado desde hace mucho tiempo en Enología. En 1876, Pasteur escribía: « Seguramente, el gusto y las cualidades de un vino dependen, en gran parte, de la naturaleza especial de las levaduras que se desarrollan durante la fermentación de la vendimia ». En 1900, Jacquemin, retomando los estudios de Pasteur sobre el vino, reconocía, sin embargo, que las levaduras provenientes de viñedos de grandes crus no eran suficientes « para transformar un vino común en un gran vino ». La controversia entre los defensores del rol de las levaduras y los partidarios de la influencia preponderante del suelo, en las cualidades del vino, ha seguido siendo académica, en la medida que la fermentación del mosto de uva, contrariamente a la del pan y la cerveza, sigue siendo un fenómeno espontáneo, asegurado por levaduras indígenas y casi nunca utilizando levaduras seleccionadas, difíciles de conservar de un año a otro. Desde hace veinte años, la posibilidad de implantar en las cubas de vinificación, familias de levaduras seleccionadas, producidas industrialmente y conservadas por secado, se basa, en términos prácticos, en el papel que cumplen las levaduras en el « gusto del vino ».

Se sabe desde hace mucho tiempo que la concentración de productos secundarios volátiles de la fermentación alcohólica (ésteres etílicos de ácidos grasos, acetato de alcoholes superiores), para un mosto dado, no depende solamente de las condiciones de fermentación, en particular de la temperatura, sino también de la familia de levaduras inoculada. Sin embargo, estos compuestos responsables del aroma fermentario del vino joven, se hidrolizan luego de algunos meses de conservación. No se debe, entonces, a la mayor o menor aptitud que posean las levaduras para formar ésteres, la influencia durable que puedan ejercer en el aroma de los vinos .

Los compuestos aromáticos provenientes de la uva, característicos de la variedad y más precisamente de su expresión variable según el « terroir », juegan un rol determinante en la calidad de los vinos. Estos constituyen el aroma varietal de los vinos. Paradójicamente, este puede diferir del aroma que existe en estado libre, en la uva. Las variedades llamadas aromáticas o « florales », como las moscatel, dan mostos muy aromáticos, cuyo aroma a terpenico recuerda al de sus vinos. Por el contrario, los mostos de numerosos cepajes,

llamados de « sabor simple », son prácticamente inodoros. Dan, sin embargo, vinos cuyo aroma característico es más o menos específico de la variedad. Esto sucede en la mayoría de los grandes cepajes (merlot, cabernet, pinots, chenin, semillon, sauvignon, chardonnay...etc). Como hacía referencia E. Peynaud, hace cerca de 20 años: « ...la vinificación revela el aroma primario oculto en el fruto. El vino presenta más aroma a fruta que la uva misma. La fermentación actúa como revelador de aromas y libera los principios odoríferos de la uva ». El hecho de que la fermentación modifique poco el aroma terpénico de las variedades florales, se interpreta fácilmente; en efecto, las levaduras de vinificación no intervienen en la transformación de los terpenos heterogéneos inodoros, en terpenoles libres y odoríferos. Por el contrario, la formación del aroma varietal de los vinos de cepajes « de sabores simples » no pudo ser explicada durante mucho tiempo, como así tampoco, la naturaleza química de estos aromas. Los trabajos expuestos a continuación, proponen un inicio en la explicación, para la variedad sauvignon.

Adquisiciones recientes sobre el aroma varietal en los vinos sauvignon.

El sauvignon es uno de los cepajes blancos mundiales más importantes. Sus vinos están marcados por aromas característicos, cuyos diferentes matices, herbáceos a frutados evocan el pimiento verde, boj, retama, pomelo, fruta de la pasión, humo. Hasta hace poco tiempo, a excepción de las metoxipiracinas (Augustyn et al., 1982 ; Allen et al., 1991) responsables del olor a pimiento verde, más marcado cuando la uva está inmadura, los compuestos responsables de otros caracteres odoríferos de los vinos de sauvignon, seguían siendo desconocidos. Varios de ellos acaban de ser identificados por nuestro equipo, en la Facultad de Enología de la Universidad de Burdeos.

Tabla 1: Incidencia organoléptica de tioles volátiles identificados en los vinos Sauvignon

Compuestos identificados	Descriptor	Umbral de percepción*	Cantidades (ng/L)
4-Mercapto-4-metil-2-pentanona	Boj, retama	0,8 ng/L	0-40
Acetato de 3-mercapto hexanol	Boj Fruto de la pasión	4 ng/L	0-700
3-Mercaptohexanol	Fruto de la pasión Cáscara de pomelo	60 ng/L	150-3500
4-Mercapto-4-metil-2-pentanol	Cáscara de cítricos	55 ng/L	15-150
3-Mercapto-3-metil-1-butanol	Boj	1500 ng/L	20-150

*en solución ideal hidroalcohólica

La primer molécula descubierta (Tabla 1) como componente característico del aroma de los vinos sauvignon es la 4-mercapto-4-metil-2-pentanona (Darriet, 1993; Darriet et al., 1995). Esta mercaptocetona (4-MMP) que posee un olor marcado a boj y retama, es extremadamente odorífera; su umbral de percepción es de 0,8 ng/L en solución ideal. Su rol organoléptico es indiscutible, ya que su contenido en los vinos Sauvignon « tipo » (Bouchilloux et al., 1995) puede alcanzar 40 ng/L. Además, hemos demostrado (Tominaga y Dubourdieu, 1997) que este compuesto se encuentra en las hojas de boj y en los tallos foliados e la retama, en concentraciones que van desde algunos ng a algunas decenas de ng/g de peso fresco. De esta manera, el descriptor « boj, retama » utilizado desde hace mucho tiempo por los técnicos, para evocar el aroma del Sauvignon, corresponde a una realidad química. Nuestros colegas sudafricanos (Duplessis y Augustyn, 1981) ya lo habían

considerado, por analogía olfativa, pero sin aportar pruebas de que la 4-MMP pudiera intervenir en el aroma de guayaba del chenin y del colombar. Igualmente, Rapp y Pretorius (1990) dieron la hipótesis de que compuestos azufrados no identificados, fueran los generadores de los olores a casís, que puedan aparecer en los vinos de cepajes scheurebe, kerner, bacchus y Muller-Thurgau.

Más recientemente, otros tioles volátiles odoríferos fueron identificados en los vinos Sauvignon: el acetato de 3-mercapto-1-hexanol (Tominaga et al., 1996), el 4-mercapto-4-metil-2-pentanol, el 3-mercapto-1-hexanol y el 3-mercapto-3-metil-1-butanol (Tominaga et al., 1998a). El acetato de 3-mercapto-1-hexanol (acetato de 3-MH) posee un olor complejo de boj, pero también de cáscara de pomelo y de fruta de la pasión; de todos modos, ya había sido identificado en este fruto, por otros autores (Engel y Tressel, 1991). Su umbral de percepción es de 4 ng/L y algunos vinos Sauvignon pueden poseer varios centenares de ng/L. El aroma del 3-mercaptohexanol recuerda también al del pomelo y al de fruta de la pasión en el cual fue también identificado. Su umbral de percepción es del orden de 60 ng/L; está siempre presente en los vinos Sauvignon, con un contenido de varias centenas de ng/L, a veces varios µg/L.

El rol organoléptico del 4-mercapto-4-metil-2-pentanol (4-MMPOH), de olor a cáscara de cítricos, es más limitado. Su concentración en los vinos supera, escasamente, el umbral de percepción (55ng/L). Sin embargo, este valor puede alcanzarse en algunos vinos.

El 3-mercapto-3-metil-1-butanol, de olor a puerros cocidos, es mucho menos odorífero; su umbral de percepción es de 1500 ng/L, valor que nunca se alcanza en los vinos.

En nuestro laboratorio fue acondicionado un método de dosificación específico por cromatografía en fase gaseosa (CPG) para estos diferentes tioles volátiles, presentes en los vinos, en una muy pequeña cantidad perceptible (Tominaga et al., 1998b). Los compuestos volátiles son, en primer lugar, extraídos de 500 mL de vino, por el diclorometano. Los tioles presentes en el extracto orgánico son extraídos por una solución acuosa de p-hidroximecuribenzoato (pHMB). Luego, los productos de combinación tioles-pHMB son fijados sobre una columna de intercambio aniónico, esta a su vez es enjuagada por una solución tampón para eliminar todos los compuestos contaminantes. Los tioles retenidos sobre la columna son descombinados del pHMB por lixiviación de la columna con una solución de cisteína y, finalmente, son extraídos del diclorometano y analizados por CPG conectado a la espectrometría de masa. Se da un ejemplo del cromatograma de tioles en un vino sauvignon en la figura 1.

En la tabla 2, se muestran los análisis realizados en 1997, en 4 vinos blancos de Burdeos, de la cosecha 1996, que presentan un aroma sauvignon marcado. Las mismas dosis fueron administradas en los vinos de Sancerre, del mismo año de cosecha, también bien característico sauvignon (tabla 3) y en cosechas diferentes (92 a 95) de un mismo cru de Burdeos. El impacto olfativo de la 4MMP y del 3MH es indiscutible en estos diferentes vinos, ya que su contenido es muy elevado, en relación a los umbrales de percepción. El rol del acetato de 3-MH muy importante en los vinos jóvenes, es después más limitado; probablemente formado por acetilación del 3-MH, se hidroliza en el tiempo en 3-MH

Tabla 2 : Dosis de tioles volátiles (ng/L) en 4 vinos blancos de Sauvignon de Burdeos, cosecha 1996

Compuestos	Muestras			
	1	2	3	4
4-Mercapto-4-metil-2-pentanona	5 (6)	4 (5)	10 (13)	4 (5)
Acetato de 3-mercapto-hexanol	724(181)	451 (113)	451 (113)	275 (69)
3-Mercapto-1-hexanol	8402(140)	12822(214)	7465(123)	3736(63)
4-Mercapto-4-metil-2-pentanol	18 (0,3)	20 (0,4)	22 (0,4)	20 (0,4)
3-Mercapto-3-metil-1-butanol	78 (0,05)	86 (0,06)	97 (0,07)	82 (0,06)

(): Índice aromático de cada compuesto

Tabla 3 : Dosis de tioles volátiles (ng/L) en vinos blancos de Sauvignon de Sancerre, cosecha 1996

Compuestos	Muestras		
	1	2	3
4-Mercapto-4-metil-2-pentanona	22 (28)	24 (30)	4 (5)
Acetato de 3-mercapto-hexanol	254 (64)	212 (53)	777 (194)
3-Mercapto-1-hexanol	1291 (22)	733 (12)	3415 (57)
4-Mercapto-4-metil-2-pentanol	11 (0,2)	20 (0,4)	1 (0,02)
3-Mercapto-3-metil-1-butanol	123 (0,08)	134 (0,09)	34 (0,02)

(): Índice aromático de cada compuesto

Tabla 4 : Dosis de tioles volátiles (ng/L) en los vinos de varias cosechas de un mismo cru de Burdeos

Compuestos	Muestras			
	1992	1993	1994	1995
4-Mercapto-4-metil-2-pentanona	7 (9)	40 (50)	10 (13)	44 (55)
Acetato de 3-mercapto-hexanol	0 (0)	0 (0)	0,4 (0,08)	2,8 (0,7)
3-Mercapto-1-hexanol	871 (15)	1178 (20)	600 (10)	1686 (28)
4-Mercapto-4-metil-2-pentanol	46 (0,8)	111 (2)	25 (0,5)	33 (0,6)
3-Mercapto-3-metil-1-butanol	128 (0,08)	89 (0,06)	97 (0,06)	104 (0,07)

(): Índice aromático de cada compuesto

Demostración e identificación, en los mostos, de los precursores del aroma azufrado de los vinos de sauvignon.

La existencia, en la uva Sauvignon, de un precursor no volátil y no glicosilado de la 4-mercapto-4-metil-2-pentanona, ya fue demostrada por Darriet (1993), pero la estructura de este compuesto no había podido ser dilucidada.

La experiencia que sigue (Tominaga et al., 1998c) demuestra que la 4-MMP, el 3-MH y el 4-MMPOH pueden ser liberados de un extracto no volátil de mosto de sauvignon por una actividad β -liasa.

Un extracto bruto de los precursores de aroma azufrado del sauvignon (EBPAS) se prepara por lixiviación de 500 mL de mosto sobre la columna de silicio injertado C₁₈ y eliminación de los compuestos retenidos por etanol (1%). El preparado obtenido es sometido a la acción degradante de una bacteria intestinal (*Eubacterium limosum*) que posee una actividad β -liasa S-desombinada con la cisteína. La reacción catalítica de esta enzima es la siguiente:



Luego de la incubación durante 15 minutos, a 30°C, los compuestos volátiles liberados son analizados por CPG-FPD (figura 1). Los 3 tioles volátiles anteriormente citados, están formados por acción de la degradación bacteriana, sobre el extracto no volátil del mosto de sauvignon. En presencia de la degradación bacteriana inactivada por el calor, ningún tiol es liberado. Habiendo tenido en cuenta el carácter específico de la actividad β -liasa presente en la preparación bacteriana (Larsen y Stevens, 1986), se podría considerar que los precursores de estos diferentes tioles fueran S-combinados con la cisteína, hipótesis verificada por la siguiente experiencia.

Los concentrados brutos de mosto (EBPAS), que contienen los precursores de aromas a identificar, son purificados por lixiviación sobre una columna de Chelating Sepharose 4BTM que posee la propiedad de fijar algunos amoniácidos, por intermedio del cobre quelado. La porción retenida es separada por HCl (0,1M). Después de la evaporación a seco de lo separado, extracción del etanol del residuo y secado, los extractos de precursores de aromas purificados, son analizados por CPG/MS como derivados triméthylsilylés. Los mismos análisis cromatográficos se realizan en 3 S-combinados con la cisteína, sintetizados en el laboratorio, susceptibles de liberar los tioles volátiles estudiados: S-(4-metil-2-pentanonea-L-cisteína, S-(4-metil-2-pentanol)-L-cisteína, S-(3-hexan-1-ol)-L-cisteína, respectivamente designados P_I, P_{II}, P_{III}. La figura 3 muestra los cromatogramas obtenidos (en corriente iónica total y para los iones 218, 246 y 320 seleccionados). Los tiempos de retención y los espectros de masa de los picos 1, 2, 3 corresponden a los de P_I, P_{II}, P_{III} silylés (Tominaga et al., 1998c).

Rol de las levaduras de vinificación, en la revelación del aroma azufrado del sauvignon

Durante la fermentación alcohólica de un jugo de uva (var. Sauvignon), se observa un neto crecimiento en el contenido de tioles odoríferos (figura 4). Esta amplificación del aroma del cepaje, por metabolismo de la levadura de vinificación, (*Saccharomyces cerevisiae*) procede de la degradación de los precursores de aromas cisteínicos de la uva, que conduce a la formación de los correspondientes tioles volátiles, tal como lo muestra la siguiente experiencia.

La figura 5 muestra la liberación de 3-mercaptohexanol durante la fermentación de un medio ideal, enriquecido por S-(3-hexan-1-ol)-L-cisteína (sintetizada en el laboratorio). Únicamente una parte del precursor del aroma degradado se transforma en aroma libre. Cuando la fermentación es inhibida por la pimarcina, la liberación de aroma y la degradación del precursor son muy limitados.

La aptitud de las cepas de *Sacch. cerevisiae* para revelar el aroma azufrado varía. El mismo mosto de sauvignon fermentado en cultivos puros por colonias de levaduras diferentes dan vinos cuyos contenidos en tioles volátiles que intervienen en el aroma varietal, pueden ser bastante diferentes. Algunas colonias (EG8, VL3) cuyos vinificadores

han constatado empíricamente que dan vinos sauvignon muy típicos, liberan los más fuertes 4-MMP (fig. 6). Estas diferencias de comportamiento entre las cepas de *Sacch. cerevisiae*, se manifiestan también durante la fermentación de medios ideales administrados con S-(4-metil-2-pentanona)-L-cisteína (fig.7).

En comparación con las cepas de *Sacch. cerevisiae*, habitualmente utilizadas en vinificación, algunas cepas salvajes de *Sacch. bayanus* (ex *Sacch. uvarum*) (Masneuf et al., 1996) resultan particularmente aptas para liberar los diferentes aromas azufrados del sauvignon (fig. 6) (Masneuf, 1996). Por otra parte, tales cepas han sido aisladas de algunas fermentaciones espontáneas, en las bodegas de los viñedos de Sancerre. Se sabe desde hace mucho tiempo que esta cepas, generalmente criófilas, forman también cantidades más importantes de feniletanol y de feniletil acetato, lo que no es necesariamente deseable. Sin embargo, el interés por algunas cepas de *Sacch. bayanus* (ex *Sacch. uvarum*) o de sus híbridos con *Sacch. cerevisiae* para la vinificación de algunas variedades merece ser mencionado.

Conclusión

En la uva de variedad sauvignon, los compuestos azufrados odoríferos característicos del aroma de esta variedad, existen solamente en una muy pequeña cantidad. Durante la fermentación alcohólica son liberados por degradación, por la levadura, de los S-unidos a la cisteína correspondientes. Esta amplificación aromática de la uva, por la vinificación, que hasta el momento es inexplicable, recibe una interpretación molecular; pero el metabolismo secundario de la levadura implicada en esta transformación, todavía no ha sido determinado.

Referencias bibliográficas

- Allen M.S., Lacey M.J., Harris R.L.N., Brown W.V. (1991). Contribution of methoxypyrazines to Sauvignon Blanc aroma. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 109-112.
- Augustyn O.P.H., Rapp A., van Wyck C.J. (1982). Some volatile aroma components of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *S. Afr. Enol. Viticult.*, 3, 53-60.
- Bouchilloux P., Darriet Ph., Dubourdieu D. Mise au point d'une méthode de dosage de la 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one dans les vins de Sauvignon. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 30, 23-29 (1996).
- Darriet Ph. (1993). Recherches sur l'arôme et les précurseurs d'arômes du Sauvignon. Thèse Doc. Univ. Bordeaux II.
- Darriet Ph., Tominaga T., Demole E. & Dubourdieu D. Mise en évidence dans le raisin de *Vitis vinifera* (var. Sauvignon) d'un précurseur de la 4- mercapto-4-methylpentan-2-one. *C.R. Acad. Sci. Paris, Biologie et Pathologie végétale*, 316, 1332-1335 (1993).
- Du Plessis C.S., Augustyn O.P.H. (1981) Initial study on the guava aroma of chenin blanc and colombar wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 2, 2, 1991.
- Darriet Ph., Tominaga T., Lavigne V., Boidron J.N., Dubourdieu D. (1995). Identification of a powerfull aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines : 4-mercapto-4-méthyl-pentan-2-one. *Flavour and Fragrance J.*, 10, 395-392.
- 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, 385-392.
- Masneuf I. (1996) Recherches sur l'identification génétique des levures de vinification. Applications œnologiques. Thèse Doctorat Université de Bordeaux II.
- Masneuf I. , Aigle M., Dubourdieu D. (1996) Development of a polymerase chain reaction/ restriction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* identification in oenology. *FEMS Microbiol.* , 138, 239-244
- Peynaud E. *Le Goût du Vin*. Dunod Ed. Paris (1980).
- Rapp A., Pretorius P.J. (1990). Foreign and undesirable flavours in wine. In « Development in food science » 24, Flavors and off flavors 89, Elsevier Sciences Publishers B.V, Amsterdam, 1-21.

- Tominaga T., Darriet Ph., 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-méthyl-pentan-2-one from the Box Tree (*Buxus sempervirens* L.) and Broom (*Sarothamnus scoparius* L. Koch). *Flavour and Fragrance J.*, 12, 373-376.
- Tominaga T., Furrer A., Henry R., Dubourdieu D. (1998a) ; Identification of new volatile thiols in aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour and Fragrance J.* (à paraître).
- Tominaga T., Murat M.L., Dubourdieu D. (1998b). Developing a method for analysing the volatile thiols in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. c.v. Sauvignon Blanc. *J. Agric. Food Chem*, 46, 1044-1048
- Tominaga T., Peyrot des Gachons C., Dubourdieu D. (1998c). soumis à publication