

PAPEL DAS LEVEDURAS NA GÊNESE DO AROMA VARIETAL DERIVADO DE ENXOFRE DOS VINHOS : EXEMPLO DO SAUVIGNON

Denis Dubourdieu

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

Resumo

Numerosos tiois voláteis muito odorantes têm sido recentemente identificados como constituintes determinantes do aroma particular dos vinhos da casta Sauvignon : o 4-mercapto-4 metil-2-pentanona, o 4-mercapto-4-metil-2-pentanol, o 3-mercaptohexanol e o acetato de 3-mercaptohexanol. Estes diferentes compostos estão praticamente ausentes nas uvas e no mostos ; aparecem nos vinhos durante a fermentação alcoólica. A sua formação resulta da transformação pela levedura de certos precursores de aromas presentes no mosto ; estes compostos não voláteis e inodoros são S-combinados com a cisteína.

Num meio sintético, como no mosto, as leveduras enológicas pertencentes à espécie *Saccharomyces bayanus* (ex. *uvarum*) manifestam uma aptidão muito maior que a *Saccharomyces cerevisiae* em libertar alguns destes tiois a partir dos seus precursores. Existem igualmente diferenças de aptidão entre as estirpes de levedura no interior de uma dada espécie. Estes conhecimentos foram aplicados na selecção de leveduras destinadas à vinificação da casta Sauvignon.

Introdução

A incidência das leveduras na qualidade organoléptica dos vinhos é um assunto evocado há muito tempo em enologia. Em 1876, Pasteur escreveu : O gosto e as qualidades do vinho dependem certamente, numa grande parte, da natureza especial das leveduras que se desenvolvem durante a fermentação da vindima”. Em 1900, Jacquemin retomou os estudos de Pasteur sobre o vinho reconhecendo no entanto que as leveduras provenientes das vinhas de mostos de qualidade excepcional não eram suficientes para transformar um vinho comum num grande vinho”. A controvérsia entre os defensores do papel das leveduras e os partidários da influência preponderante do Terroir sobre as qualidade do vinho foi durante muito tempo académica na medida em que a fermentação do mosto de uva contrariamente à do pão ou da cerveja, era um fenómeno espontâneo assegurado pelas leveduras indígenas e quase nunca utilizando culturas de leveduras seleccionadas, difíceis de conservar de um ano para o outro. Há mais de vinte de anos que a possibilidade de implantar, nas cubas de vinificação, estirpes de leveduras seleccionadas, produzidas industrialmente e conservadas por secagem, repôs em termos práticos a questão do papel das leveduras no “gosto do vinho”.

Sabemos desde há muito tempo que o teor dos vinhos em produtos secundários voláteis da fermentação alcoólica (ésteres etílicos de ácidos gordos, acetato de álcoois superiores) depende para um determinado mosto não somente das condições de fermentação, em particular da temperatura, mas também da estirpe de levedura inoculada. No entanto, estes compostos responsáveis do aroma fermentativo do vinho jovem, hidrolisam-se após alguns meses de conservação. Não é pois pela sua maior ou menor aptidão em formar esteres que as leveduras podem influenciar os aromas do vinho de forma durável.

Os compostos aromáticos provenientes da uva, característicos da variedade e mais precisamente da sua expressão variável em função do « terroir », têm um papel determinante na qualidade dos vinhos. Estes constituem o aroma varietal dos vinhos. Paradoxalmente, este pode ser diferente do aroma existente no estado livre nas uvas. As variedades apelidadas de aromáticas ou « florais », como o moscatel dão origem a mostos muito aromáticos, cujo aroma terpénico recorda o dos seus vinhos. Em contrapartida os mostos de numerosas variedades, apelidadas de « gosto simples », são praticamente inodoros ; dão no entanto vinhos cujo aroma característico é mais ou menos específico da variedade. Isto acontece com

a maior parte das grandes castas (merlot, cabernets, pinots, chenin, sémillon, sauvignon, chardonnay...etc). Como escreveu a este propósito E. Peynaud, há aproximadamente 20 anos :...a vinificação revela o aroma primário oculto no fruto. O vinho apresenta mais aroma do fruto que a própria uva... A fermentação actua como um revelador de aromas e liberta os compostos aromáticos da uva ».

O facto de que a fermentação modifica pouco o aroma terpénico das variedades florais interpreta-se facilmente; efectivamente, as leveduras de vinificação não intervêm na transformação dos heterósidos terpénicos inodoros em terpenos livres e aromáticos. Em contrapartida, a génese do aroma varietal de vinhos de castas « de gosto simples » continuou inexplicável, durante muito tempo, bem como, a natureza química destes aromas. Os trabalhos que apresentamos propõem um início da explicação para a casta Sauvignon

Aquisições recentes sobre o aroma varietal dos vinhos de Sauvignon

O Sauvignon é uma das grandes castas brancas mundiais. Estes vinhos são marcados pelos aromas característicos, com diferentes notas, herbáceos a frutados, evocando a pimenta verde, o buxo, a giesta, a “pamplemousse”, a maracujá e o fumo. Até há bem pouco tempo, com excepção das metoxipirazinas (Augustyn *et al.*, 1982 ; Allen *et al.*, 1991) responsáveis pelo aroma a pimenta verde, tornando-se mais marcados com o evoluir da maturação, os compostos responsáveis por outras características aromáticas dos vinhos de Sauvignon permaneceram desconhecidos. Alguns deste acabam de ser identificados pela nossa equipa da Faculté d’Oenologie de l’Université de Bordeaux.

Tabela 1: Incidência organoléptica dos tióis voláteis identificados nos vinhos de Sauvignon

Compostos identificados	Descritores	Limites de percepção*	Teores (ng/l)
4-Mercapto-4-metil-2-pentanona	Buxo Giesta	0,8 ng/l	0-40
Acetato de 3-mercapto hexanol	Buxo Maracujá	4 ng/l	0-700
3-Mercaptohexanol	Maracujá Casca de “pamplemousse”	60 ng/l	150-3500
4-Mercapto-4-metil-2-pentanol	Casca de citrinos	55 ng/l	15-150
3-Mercapto-3-metil-1-butanol	Buxo	1500 ng/l	20-150

*em solução hidroalcoólica

A primeira molécula descoberta (Tabela 19 foi a 4-mercapto-4-metil-2-pentanona (Darriet, 1993 ; Darriet *et al.*, 1995). Esta mercaptocetona (4-MMP) que possui um aroma marcado de buxo e de giesta é extremamente odorante ; o seu limite de percepção é de 0,8 ng/l em solução modelo. O seu papel organoléptico é indiscutível porque nos vinhos de sauvignon « típicos » (Bouchilloux *et al.*, 1995) pode atingir o valor de 40 ng/l. Para além disso demonstramos (Tominaga et Dubourdieu, 1997) que este composto se encontra nas folhas do buxo e nos ramos com folhas da giesta em concentrações de alguns ng a algumas dezenas de ng/g de peso líquido. Assim, o descritor “buxo, giesta” utilizado desde há muito tempo pelos técnicos para evocar o aroma do sauvignon corresponde bem a uma realidade química. Colegas nossos sul-africanos (Duplessis et Augustyn, 1981) já tinham considerado por analogia olfactiva, mas sem o provarem que o 4-MMP pode intervir no aroma de goyave do chenin e da colombar. Também Rapp e Pretorius (1990) consideraram a hipótese de que

estes compostos derivados do enxofre não identificados originam os aromas de cassís, que podem aparecer nos vinhos das castas scheurebe, kerner, bacchus et Muller-Thurgau.

Mais recentemente outros tióis voláteis aromáticos foram identificados no vinho de Sauvignon : O acetato do 3-1-mercaptohexanol (Tominaga *et al.*, 1996), o 4-mercapto-4-metil-2-pentanol, o 3-mercapto-1-hexanol e o 3-mercapto-3-metil-1-butanol (Tominaga *et al.*, 1998a). O acetato de 3-mercapto-1-hexanol (acetato de 3-MH) possui um aroma complexo de buxo, mas também de casca de “pamplemousse” e de maracujá; já foi até identificado neste fruto por outros autores (Engel et Tressel, 1991). O seu limite de percepção é de 4ng/l e em certos vinhos de Sauvignon podemos encontrar valores de algumas centenas de ng/l. O aroma do 3-mercaptohexanol lembra também a “pamplemousse” e o maracujá nos quais foram igualmente identificados. O seu nível de percepção é da ordem dos 60 ng/l ; está sempre presente nos vinhos de Sauvignon com valores de algumas centenas de ng/l, por vezes algumas µg/l.

O papel organoléptico do 4-mercapto-4metil-2-pentanol (4-MMPOH), com aroma de casca de citrinos é mais limitado. A sua concentração nos vinhos raramente ultrapassa o limite de percepção (55ng/L) mas este valor pode ser atingido nalguns vinhos.

O 3-mercapto-3-metil-1-butanol com aroma de alhos-porros cozidos, é bastante menos aromático ; o seu nível de percepção é de 1500 ng/l, valor que jamais foi alcançado nos vinhos.

Um método de doseamento específico por cromatografia em fase gasosa (CG) destes diferentes tióis voláteis presentes no vinho em quantidades vestigiais foi otimizado no nosso laboratório (Tominaga *et al.*, 1998b). Os compostos voláteis primeiro são extraídos de 500 ml de vinho através do diclorometano ; os tióis presentes no extracto orgânico são ao mesmo tempo extraídos por uma solução aquosa de p-hidroximecuribenzoato (pHMB) ; os produtos de combinação tióis-pHMB são de seguida fixados por uma coluna de troca aniónica sendo esta lavada com uma solução tampão para eliminar todos os compostos de contaminação. Os tióis retidos na coluna são libertados do pHMB por percolação da coluna com uma solução de cisteína, e finalmente são extraídos do diclorometano e analisados por CG ligada á espectrometria de massa. Um exemplo de um cromatograma de tióis de um vinho de Sauvignon é dado na figura 1.

A tabela 2 mostra as análises efectuadas no ano de 1997 em 4 vinhos brancos de Bordeaux da colheita de 1996 que apresentavam um aroma de Sauvignon marcado. Os mesmos doseamentos foram praticados em vinhos de Sancerre da mesma colheita igualmente muito típicos de sauvignon (tabela 3) e de colheitas diferentes (92 a 95). O impacto olfactivo do 4MMP e do 3MH é inegável nestes diferentes vinhos porque os seus teores são muito elevados por comparação com os limites de percepção. O papel do acetato de 3-MH muito importante nos vinhos jovens é depois mais limitado; provavelmente formado por acetilação do 3-MH, hidrolisa-se com o tempo em 3-MH.

Tabela 2 : Doseamento dos tióis voláteis (ng/L) nos 4 vinhos brancos de Sauvignon de Bordeaux Colheita 1996

Compostos	Amostras			
	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 composto

Tabela 3 : Doseamento dos tióis voláteis (ng/L) em 3 vinhos brancos de Sauvignon de Sancerre, colheita 1996

Compostos	Amostras		
	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 composto

Tabela 4 : Doseamento dos tióis voláteis (ng/L) em várias colheitas.

Compostos	Amostras			
	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 composto

Demonstração e identificação nos mostos de precursores do aroma derivado do enxofre dos vinhos de sauvignon

A existência na uva de Sauvignon de um precursor não volátil e não glicosilado do 4-mercapto-4-metil-2-pentanona, foi já demonstrada por Darriet (1993) mas a estrutura deste composto não foi explicada. A experiência seguinte (Tominaga *et al.*, 1998c) demonstra que a 4-MMP, o 3-MH e o 4-MMPOH podem ser libertados de um extracto não volátil de mosto de Sauvignon por uma actividade β -liase. Um extracto bruto dos precursores do aroma derivado do enxofre do Sauvignon (EBPAS) é preparado por percolação de 500 ml de mosto numa coluna de sílica ligada C₁₈ e eluição dos compostos retidos pelo etanol (1%). O extracto obtido é sujeito à acção degradante de uma bactéria intestinal (*Eubacterium limosum*) que

possui uma actividade β -liase de S-conjugado com a cisteína. Uma reacção catalítica desta enzima é a seguinte :



Após incubação durante 15 minutos a 30°C, os compostos voláteis libertados são analisados por CG-FPD (figura 1). Os tióis voláteis anteriormente citados são formados por acção da degradação bacteriana sobre o extracto não volátil de mosto de Sauvignon. Em presença da degradação bacteriana inactivada pelo calor nenhum tiól é libertado. Considerando-se a especificidade da actividade β -liase presente na preparação bacteriana (Larsen et Stevens, 1986), podemos admitir que os precursores destes diferentes tióis sejam S-combinados com a cisteína, hipótese verificada pela experiência seguinte. Os extractos brutos de mosto (EBPAS) que contêm os precursores de aromas a identificar são purificados por eluição numa coluna de Chelating Sepharose 4BTM possuidora da propriedade de fixar certos ácidos aminados por intermédio do cobre quelatado. A fracção retida é separada por HCL (0,1M). Após evaporação a seco do eluido, extracção pelo etanol e secagem, os extractos de precursores de aromas purificados são analisados por CPG/MS sob a forma de derivados trimetilizados. As mesmas análises cromatográficas são efectuadas sobre os três S-conjugados com a cisteína, sintetizados no laboratório, susceptíveis de libertar os tióis voláteis estudados : S-(4-metil-2-pentanona)-L-cisteína, S-(4-metil-2-pentanol)-L-cisteína, S-(3-1-hexanol)-L-cisteína, respectivamente designados P_I, P_{II}, P_{III}. A figura 3 mostra os cromatogramas obtidos (em corrente iónica total e para os iões 218, 246 e 320 seleccionados). Os tempos de retenção e os espectros de massa dos picos 1,2,e 3 correspondem aos picos P_I, P_{II}, P_{III} acilados (Tominaga *et al.*, 1998c).

Papel das leveduras de vinificação na revelação do aroma derivado do enxofre do Sauvignon

Durante a fermentação alcoólica de um sumo de uva (var. sauvignon), observa-se um crescimento evidente dos teores em tióis aromáticos (figura 4). Esta amplificação do aroma da casta pelo metabolismo da levedura da vinificação (*Saccharomyces cerevisiae*) procede de uma degradação dos precursores de aromas cisteinilados da uva, que conduz à formação dos tióis voláteis correspondentes como demonstra a experiência seguinte.

A figura 5 mostra a libertação do 3-mercaptohexanol durante a fermentação de um meio sintético suplementado em S – (3-1-hexanol) -L-cisteína (sintetizado no laboratório). Somente uma parte do precursor do aroma degradado é transformada em aroma livre. Durante a fermentação é inibido pela pimaricina, a libertação do aroma e a degradação do precursor são muito limitadas.

A aptidão de certas estirpes de *Sacch. Cerevisiae* em revelar o aroma enxofrado do sauvignon é variável. O mesmo mosto de sauvignon fermentado em culturas puras por estirpes de leveduras diferentes origina vinhos em que os teores em tióis voláteis intervêm no aroma varietal podendo ser significativamente diferentes. Algumas estirpes, (EG8, VL3) cujos vinificadores empiricamente constataram que originavam vinhos de Sauvignon muito típicos libertam os mais activos 4-MMP (figura 6). Estas diferenças de comportamento entre estirpes de *Sacch. Cerevisiae* manifestam-se também durante a fermentação em meios sintéticos adicionados de S-(4-metil-2-pentanona)-L-cisteína (fig.7).

Em comparação com as estirpes de *Sacch. cerevisiae* habitualmente utilizadas em vinificação, certas estirpes indígenas de *Sacch. bayanus* (ex *Sacch. uvarum*) (Masneuf *et al.*, 1996) revelam-se particularmente aptas em libertar os aromas derivados do enxofre do Sauvignon (fig 6) (Masneuf, 1996). Estas estirpes, por outro lado, foram isoladas de certas fermentações espontâneas em adegas de Sancerre. Sabemos desde há muito tempo que estas estirpes

geralmente criófilas, formam também quantidades muito importantes de feniletanol e do acetato de feniletano, o que não é necessariamente desejável. No entanto, o interesse de certas estirpes de *Sacch. bayanus* (ex *Sacch. uvarum*) ou dos seus híbridos com *Sacch. cerevisiae* para a vinificação de algumas castas merece ser mencionado.

Conclusão

Na uva da casta Sauvignon, somente existem traços dos compostos enxofrados aromáticos característicos do aroma desta variedade. Estes são libertados durante a fermentação alcoólica por degradação, pela levedura, dos S-conjugados com a cisteína correspondente. Esta amplificação do aroma da uva através da vinificação, até aqui inexplicável, recebe uma interpretação molecular; mas o metabolismo secundário da levedura implicada nesta transformação permanece por determinar.

Références bibliographiques.

- 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-méthylpentan-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-méthylpentan-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