

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DU CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES AGRONOMIQUES –  
MONTPELLIER SUPAGRO**

Ecole Doctorale : Sciences des Procédés – Sciences des Aliments

Spécialité : Biochimie, Chimie, Technologie des Aliments

Présentée et soutenue publiquement par

**Aurélie ROLAND**

Le 4 Novembre 2010

**Influence des phénomènes d'oxydation lors de  
l'élaboration des moûts sur la qualité aromatique des  
vins de Melon B. et de Sauvignon Blanc en Val de Loire**

**JURY**

<b>Doris Rauhut</b>	Professeur, Forschungsanstalt Geisenheim, Fachgebiet Mikrobiologie und Biochemie, Allemagne	Rapporteur
<b>Juan Cacho</b>	Professeur, Universidad de Zaragoza, Departamento de Química Analítica, Espagne	Rapporteur
<b>Eric Spinnler</b>	Professeur, AgroParisTech, Département Sciences et Procédés des Aliments et Bioproduits, Grignon, France	Examineur
<b>Florine Cavelier</b>	Directeur de Recherche CNRS, Institut des Biomolécules Max Mousseron, Montpellier, France	Examineur
<b>Frédéric Charrier</b>	Ingénieur Œnologue, Institut Français de la Vigne et du Vin, Pôle Val de Loire, Vertou, France	Membre Invité
<b>Etienne Goulet</b>	Directeur Technique, Interloire, Angers, France	Membre Invité
<b>Alain Razungles</b>	Professeur, Montpellier Supagro, UMR Sciences pour l'œnologie, France	Directeur de Thèse
<b>Rémi Schneider</b>	Directeur UMT Qualinov, Institut Français de la Vigne et du Vin, Pôle Rhône Méditerranée, Montpellier, France	Directeur de Thèse

# REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Plateau Technique des Volatils à l'INRA de Montpellier dans le cadre d'un contrat CIFRE avec INTERLOIRE et en partenariat avec l'Institut Français de la Vigne et du Vin et la SICAVAC de Sancerre.

En premier lieu, je souhaite remercier très sincèrement **Rémi Schneider**, mon directeur de thèse, pour avoir dirigé ce travail avec rigueur et enthousiasme, pour m'avoir encouragée dans mes choix et fait confiance tout au long de ma thèse. Merci Rémi !

J'adresse également tous mes remerciements à **Alain Razungles**, mon directeur de thèse, pour son appui technique et personnel.

Tous mes remerciements vont vers **Florine Cavalier**, mon coach en synthèse chimique, pour tous les conseils, les encouragements, l'enthousiasme et l'énergie dépensés pour moi. Cela a été un véritable plaisir de travailler ensemble. Merci pour tout.

Je remercie **Doris Rauhut** et **Juan Cacho** d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

J'adresse également tous mes remerciements à **Eric Spinnler**, pour avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je tiens également à remercier **Etienne Goulet**, directeur technique d'INTERLOIRE, pour m'avoir accueillie au sein de l'interprofession des vins du Val de Loire.

Ce projet a été initié par **Michel Moutounet** puis **Raymond Baumes**, je leur adresse mes sincères remerciements.

Je remercie tout particulièrement **Frédéric Charrier**, **Bertrand Daulny** et **Pascal Poupault** pour leur appui technique, leurs encouragements et leur aide très précieuse lors de chaque vendange. Merci d'avoir pris le temps de m'expliquer les ficelles du métier.

Je n'oublie pas non plus le personnel de l'IFV de Vertou et de la Sicavac de Sancerre qui m'ont toujours accueillie avec beaucoup de gentillesse et aidée dans mes expérimentations : **Aurélié Pain** (mille fois merci pour toutes tes contributions), **Morvan Coarer** (merci pour m'avoir secourue !), **Alain Poulard**, les **2 Yannick(s)**, **Marie Jaffre**, **Yann** et **Eric** ainsi que tous les stagiaires.

Ces trois années de thèse ont été ponctuées de divers comités dont je voudrais remercier les participants pour leur contribution scientifique et technique : **Elodie Besseas**, **Thierry Dufourcq**, **Fabrice Doucet**, **Jean-Luc Le Quéré**, **Guy Albagnac** et **Hélène Fulcrand**.

J'adresse un remerciement tout particulier à **Jean-Michel Salmon** pour tous ses bons conseils et sa gentillesse.

Je remercie la **société Bucher Vaslin** pour son appui technique lors des vendanges 2009 et plus particulièrement, **Pascal Noilet** et **Luc Godart**.

Un grand merci à **Jean-Marc** pour l'analyse des AH, **Clotilde** et **Jean Luc** pour l'initiation au pelage des baies, **Thérèse** pour le glutathion, **Christine** pour les RMN et enfin **Christian** pour les fermentations.

Durant ma thèse, j'ai eu la chance de travailler dans différents laboratoires : la Proteomics Core Facility à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne et le Laboratoire de Protéomique Fonctionnelle dont je remercie l'ensemble du personnel pour leur accueil : **Diego** (merci pour tous tes conseils en LC-MS), **Marc M.**, **Sandrine**, **Valérie(s)** (les 2), **Madeleine**, **Claude**, **Sylvain**, **Sonia**, **Marc T.**, **Thierry**, **Abasse**, **Jean-Benoît** et **Michel**.

Enfin, j'adresse avec beaucoup d'émotion tous mes remerciements à l'ensemble de l'équipe du PTV et de Nyséos. J'ai eu la chance de travailler avec vous pendant 3 ans et nous avons tellement partagé de choses ensemble. Un énorme merci à **Jean-Paul** (pour m'avoir accueillie dans ton bureau et trouvé un super surnom...), **Nicolas** (merci pour tout), **Peggy** (merci pour tous tes bons conseils), **Clément** (spéciale dédicace entre IUTiens de Castres), **Flo** (énorme ton second prénom !), **Laurent** (merci pour tes fameuses daganettes). Je remercie également **Jocelyne** pour son aide très précieuse dans les méandres administratifs et toutes les personnes qui ont contribué à ce travail : **Loïc**, **Stéphane**, **Virginie**, **Sandrine** et **Emilie**.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien quotidien de ma famille qui a toujours été là pour moi. Merci à **mes parents**, à mon frère **Sébastien** et à **Laurent** pour tous vos encouragements et vos marques d'affection. Enfin, et c'est le plus important, merci **Jérôme** pour ton soutien permanent et tout le bonheur que tu m'apportes. Je terminerai en dédiant ce manuscrit à la mémoire de ma marraine dont je garderai sa joie de vivre comme le plus beau des souvenirs.

# ABBREVIATIONS

Les acronymes dédiés aux méthodologies analytiques sont utilisés dans ce manuscrit sous leur dénomination anglaise.

3MH	3-mercaptohexan-1-ol
3MHA	Acétate de 3-mercaptohexyle
4MMP	4-mercapto-4-méthylpentan-2-one
AAA	Analyseur d'Acides-Aminés
Boc	<i>Tert</i> -butyloxycarbonyl
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
Cys3MH	S-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine
Cys4MMP	S-4-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine
DBU	1,8-diazabicyclo-[5,4,0]-undec-7-ène
DMS	Diméthylsulfure
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTNB	Acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque)
EDTA	Acide éthylène-Diamine-Tétra Acétique
EI-MS	Electronic Impact - Mass Spectrometry
Em	Longueur d'onde d'émission
eq	équivalent
ESI-MS	Electrospray Ionization - Mass Spectrometry
Ex	Longueur d'onde d'excitation
G3MH	S-3-(hexan-1-ol)-glutathion
G4MMP	S-4-(4-méthylpentan-2-one)-glutathion
GRP	Grape Reaction Product
GRP2	Acide di-glutathionyl-2,5-caféoyltartrique
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion oxydé
GC-MS	Gas Chromatography – Mass Spectrometry
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
IBMP	2-méthoxy-3-isobutylpyrazine
LC-MS/MS	Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
LSA	Levure Sèche Active
MMB	Monobromobimane
MRM	Multiple Reaction Monitoring
OPA	<i>o</i> -phtalaldéhyde
PFBBr	Bromure de 2,3,4,5,6-pentafluorobenzyle
PPO	Polyphénoloxydase
QqQ	Triple Quadripôle
qsp	Quantité suffisante pour
Q-TRAP	Quadripôle-Trappe Linéaire
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
rpm	Rotation par minute
RSD	Relative Standard Deviation
SIDA	Stable Isotope Dilution Assay
SIM	Selected Ion Monitoring
S/N	Rapport Signal sur Bruit
SRM	Selected Reaction Monitoring
T.A.	Température Ambiante
TES	Triéthylsilane
TFA	Acide trifluoroacétique
TMS	Triméthylsilane
TMSP	Acide triméthylsilylpropionique
TNB	2-nitro-5-thiobenzoate

# AVANT PROPOS

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont été réalisés en partenariat avec Interloire (Bourse CIFRE), l'Institut Français de la Vigne et du Vin, la Sicavac et l'INRA de Montpellier, au Plateau Technique des Volatils. La présentation de ce mémoire de thèse s'appuie sur les publications obtenues au cours de mes 3 années de recherche.

## Publications

1. Roland, A.; Schneider, R.; Le Guernevé, C.; Razungles, A.; Cavelier, F., Identification and quantification by LC-MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: Elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chem.* **2010**, 121, 847-855.
2. Roland, A.; Vialaret, J.; Moniatte, M.; Rigou, P.; Razungles, A.; Schneider, R., Validation of a nano liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the identification and the accurate quantification by isotopic dilution of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in white grape juices. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 1626-1635.
3. Roland, A.; Vialaret, J.; Razungles, A.; Rigou, P.; Schneider, R., Evolution of S-cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors during oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc musts. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, (7), 4406-4413.
4. Roland, A.; Schneider, R.; Charrier, F.; Cavelier, F.; Rossignol, M.; Razungles, A., Distribution of varietal thiol precursors in the skin and the pulp of Melon B. and Sauvignon Blanc grapes. *Food Chem.* **2010**, 125, 139-144.
5. Roland, A.; Schneider, R.; Razungles, A.; Le Guernevé, C.; Cavelier, F., Straightforward synthesis of deuterated precursor to demonstrate the biogenesis of aromatic thiols in wine. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 10684-10689.
6. Roland, A.; Schneider, R.; Razungles, A.; Cavelier, F., Varietal thiols in wine: Discovery, Synthesis and Applications. *Chem. Review* **2010**, under revision.

## Acte de congrès avec comité de lecture

1. Cavelier, F., Roland, A., Razungles, A., & Schneider, R., Straightforward syntheses of deuterated precursors to be used as powerful tracers under fermentative conditions *Peptides*, **2010**, 48-49.

## Communications orales

1. Roland, A.; Schneider, R.; Le Guernevé, C.; Razungles, A.; Cavelier, F., New evidence for the generation of 3-mercaptohexan-1-ol from S-substituted glutathione precursor during alcoholic fermentation. *In Vino Analytica Scientia*, **2009**, Angers (France).
2. Roland, A.; Vialaret, J.; Moniatte, M.; Rigou, P.; Razungles, A.; Schneider, R., Quantification of aroma precursors in grape juices by nanoLC-MS/MS: New elements for enhancing the release of aromatic potential during winemaking. *Intervitis Interfructa 2010*, Stuttgart (Allemagne).
3. Roland, A.; Charrier, F.; Cavelier, F.; Razungles, A.; Schneider, R., Incidence des phénomènes d'oxydation lors de l'élaboration des moûts sur le potentiel aromatique de type thiol. *O<sub>2</sub> in Wine 2010*, Florensac (France).

## Posters

1. Roland, A.; Schneider, R.; Le Guernevé, C.; Razungles, A.; Cavelier, F., Convenient synthesis of glutathione conjugates and identification of a novel precursor of 3-mercaptohexan-1-ol. *Groupe Français des Peptides et Protéines*, **2009**, Albéville (France).
2. Rigou, P.; Roland, A.; Dagan, L.; Schneider, R.; Baumes, R., Improved Solid Phase Extraction procedure for the analysis of S-cystein conjugates of 3-sulfanylhexanol and 4-methyl-4-sulfanylpentanone in grape using a stable isotope dilution assay. *In Vino Analytica Scientia*, **2009**, Angers (France).
3. Cavelier, F., Roland, A., Razungles, A., & Schneider, R., Straightforward syntheses of deuterated precursors to be used as powerful tracers under fermentative conditions *European Peptide Symposium*, **2010**, Copenhagen (Danemark)

# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>2</b>
<b>ABBREVIATIONS</b>	<b>4</b>
<b>AVANT PROPOS</b>	<b>5</b>
<b>Publications</b>	<b>5</b>
<b>Acte de congrès avec comité de lecture</b>	<b>5</b>
<b>Communications orales</b>	<b>6</b>
<b>Posters</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>11</b>
<b>2. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>14</b>
<b>2.1. Arômes du vin : de la vigne à la bouteille</b>	<b>15</b>
2.1.1. Arômes variétaux	15
2.1.1.1. Arômes libres du raisin	15
2.1.1.2. Arômes libérés à partir de précurseurs	17
2.1.2. Arômes fermentaires	20
2.1.3. Arômes de vieillissement	22
<b>2.2. Composés phénoliques du raisin impliqués dans le brunissement des moûts</b>	<b>23</b>
2.1.1. Esters hydroxycinnamoyltartriques	23
2.1.2. Flavonoïdes	25
2.1.3. Mécanismes d'oxydation pré-fermentaires	26
2.1.4. Réactions chimiques sur les quinones d'esters hydroxycinnamoyltartriques	27
2.2.4.1. Réactions d'oxydoréduction	27
2.2.4.2. Réactions d'addition du glutathion	28
2.2.4.3. Réactions de condensation	28
<b>2.3. Glutathion : un tripeptide clé en vinification ?</b>	<b>29</b>
2.3.1. Rôle du glutathion en conditions œnologiques	29
2.3.2. Techniques analytiques de dosage	29
<b>3. MATERIELS ET METHODES</b>	<b>31</b>
<b>3.1. Généralités</b>	<b>32</b>
3.1.1. Solvants et produits chimiques	32
3.1.2. Procédures analytiques	32
<b>3.2. Raisins et vins étudiés</b>	<b>33</b>
3.2.1. Réseau parcellaire	33

3.2.2.	Elaboration des moûts	35
3.2.2.1.	Echelle laboratoire	35
3.2.2.2.	Echelle pilote	36
3.2.2.3.	Echelle industrielle	36
3.2.3.	Vinifications	38
<b>3.3.</b>	<b>Modélisation des phénomènes d'oxydation</b>	<b>39</b>
3.3.1.	Pressurage sous vide	39
3.3.2.	Réacteur de caractérisation des moûts en composition	40
3.3.3.	Réacteur d'oxydation	41
<b>3.4.</b>	<b>Synthèses chimiques</b>	<b>42</b>
3.4.1.	Synthèses des précurseurs de thiols	42
3.4.1.1.	Synthèses du S-3-(hexan-1-ol)-glutathion et de son analogue deutéré	42
3.4.1.2.	Synthèses de la S-4-(4-méthylpentan-2-one)-glutathion et de son analogue deutéré	43
3.4.1.3.	Synthèses du S-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine et de son analogue deutéré	44
3.4.1.4.	Synthèses de la S-4-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine et de son analogue deutéré	45
3.4.2.	Synthèse du (E/Z)-2-hexène d <sub>2</sub>	45
<b>3.5.</b>	<b>Analyses chimiques</b>	<b>46</b>
3.5.1.	Esters hydroxycinnamoyltartriques et Grape Reaction Product	46
3.5.2.	Glutathion	46
3.5.3.	Composés en C6	46
3.5.4.	Précurseurs de thiols	46
3.5.5.	Thiols	46
<b>4.</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>48</b>
<b>4.1.</b>	<b>CHAPITRE 1 : DEVELOPPEMENT DE METHODOLOGIES ANALYTIQUES</b>	<b>49</b>
<b>4.1.1.</b>	<b>Analyse des marqueurs d'oxydation</b>	<b>50</b>
4.1.1.1.	Esters hydroxycinnamoyltartriques et Grape Reaction Product	50
4.1.1.2.	Glutathion	50
4.1.1.2.1.	Analyse enzymatique	50
4.1.1.2.2.	Analyse par analyseur d'acides aminés	53
4.1.1.3.	Composés en C6	53
4.1.1.3.1.	Synthèse des standards analytiques	53
4.1.1.3.2.	Performances analytiques	54
<b>4.1.2.</b>	<b>Analyse du potentiel aromatique de type thiol</b>	<b>55</b>
4.1.2.1.	Synthèses chimiques des standards analytiques	55
4.1.2.1.1.	Synthèses des précurseurs cystéinylés	55
4.1.2.1.2.	Synthèses du G3MH deutéré	56
4.1.2.1.3.	Synthèse de la G4MMP deutérée	58
4.1.2.2.	Performances analytiques	59
<b>4.1.3.</b>	<b>Conclusions</b>	<b>61</b>



**4.2. CHAPITRE 2 : ETUDE DE FILIATIONS A PARTIR DE TRACEURS SYNTHETIQUES ET DEUTERES POUR LE SAUVIGNON BLANC** **62**

---

<b>4.2.1. Etude de la filiation du G3MH en 3MH en conditions œnologiques</b>	<b>64</b>
<b>4.2.2. Etude de la filiation de la G4MMP en 4MMP en conditions œnologiques</b>	<b>66</b>
<b>4.2.3. Identification du G3MH et de la G4MMP dans divers cépages</b>	<b>66</b>
<b>4.2.4. Teneurs moyennes des S-conjugués rencontrés dans les différents cépages</b>	<b>67</b>
<b>4.2.5. Localisation des précurseurs de thiol dans la baie de raisin et implications pratiques</b>	<b>68</b>
4.2.5.1. Répartition relative des précurseurs glutathionylés et cystéinylés dans la baie de raisin	69
4.2.5.2. Implications pratiques	70
4.2.5.2.1. Influence du pressurage	70
4.2.5.2.2. Influence de la stabulation liquide à froid	71
<b>4.2.6. Conclusions</b>	<b>72</b>

**4.3. CHAPITRE 3 : MODELISATION DES PHENOMENES D'OXYDATION SUR LES MARQUEURS D'OXYDATION ET LE POTENTIEL AROMATIQUE DE TYPE THIOL POUR LE MELON B. ET LE SAUVIGNON BLANC** **73**

---

<b>4.3.1. Obtention des goûts en absence d'oxygène</b>	<b>74</b>
<b>4.3.2. Caractérisation des goûts en composition</b>	<b>74</b>
4.3.2.1. Marqueurs d'oxydation	74
4.3.2.1.1. Esters hydroxycinnamoyltartriques et Grape Reaction Product	74
4.3.2.1.2. Glutathion	76
4.3.2.1.3. Composés en C6	77
4.3.2.2. Potentiel aromatique de type thiol	78
<b>4.3.3. Oxydation des goûts</b>	<b>79</b>
4.3.3.1. Marqueurs d'oxydation	79
4.3.3.1.1. Esters hydroxycinnamoyltartriques et Grape Reaction Product	79
4.3.3.1.2. Glutathion	82
4.3.3.1.3. Composés en C6	83
4.3.3.2. Potentiel aromatique de type thiol	84
<b>4.3.4. Conclusions</b>	<b>86</b>

**4.4. CHAPITRE 4 : APPLICATIONS INDUSTRIELLES** **88**

---

<b>4.4.1. Démarche expérimentale</b>	<b>89</b>
<b>4.4.2. Analyse des marqueurs d'oxydation</b>	<b>91</b>
<b>4.4.3. Analyse du potentiel aromatique de type thiol</b>	<b>92</b>
4.4.3.1. Cas du Melon B.	92
4.4.3.2. Cas du Sauvignon Blanc	94
4.4.3.3. Dégustation	95
<b>4.4.4. Influence du type de pressurage sur la conservation des thiols variétaux au cours du vieillissement des vins</b>	<b>96</b>

4.4.5. Conclusions	97
<b>5. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES</b>	<b>98</b>
<b>6. LISTE DES FIGURES</b>	<b>103</b>
<b>7. LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>106</b>
<b>8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>109</b>
<b>9. PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES</b>	<b>121</b>

# 1. INTRODUCTION

Les mécanismes d'oxydation dans les moûts blancs, lors des opérations de vinification, sont à l'origine de profondes modifications physico-chimiques qui sont souvent décrites comme négatives pour la qualité aromatique des vins correspondants. D'un point de vue technologique, les vins de Melon B. et de Sauvignon Blanc, qui sont les deux cépages étudiés au cours de cette thèse, présentent des notes de fruits frais ou d'agrumes lorsque la vendange est protégée de l'oxydation. Les thiols variétaux qui participent à ces sensations organoleptiques sont principalement le 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) (1), l'acétate de 3-mercaptohexyle (3MHA) (2) ainsi que la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one (4MMP) (3-5). Cette dernière n'est décrite que dans un nombre limité de cépages tels que le Sauvignon Blanc (4-6), le Scheurebe (7), le Maccabeo (8), le Gewürztraminer, le Riesling, le Muscat, le Colombard et le Petit Manseng (9, 10). Ces composés d'arômes existent naturellement dans la baie de raisin sous forme de précurseurs inodores, de type S-conjugués à la cystéine (6, 11-13) qui, lors de la fermentation alcoolique, sont clivés par une activité enzymatique levurienne de type  $\beta$ -lyase (13). Du fait de leur structure chimique, les thiols variétaux sont sensibles à l'oxydation alors que paradoxalement, les précurseurs cystéinylés ne sont pas oxydables au stade pré-fermentaire puisque l'atome de soufre est impliqué dans une liaison thioéther.

Les objectifs de la thèse sont donc d'apporter des éléments de compréhension sur l'influence des mécanismes d'oxydation au niveau des moûts, sur le potentiel aromatique et l'arôme des vins correspondants. De manière finalisée, ces éléments doivent permettre une meilleure gestion et un pilotage de l'élaboration des moûts pour une valorisation des vins de Melon B. et de Sauvignon Blanc en Val de Loire.

Afin de mieux appréhender les mécanismes à l'origine de la perte aromatique, constatée par les praticiens en absence de protection de la vendange, l'évolution des principales espèces chimiques susceptibles d'être impliquées dans ces réactions a été étudiée : esters hydroxycinnamoyltartriques, glutathion, composés en C6 et précurseurs de thiols. La quantification de ces molécules, premier axe de travail de cette thèse, a requis le développement de stratégies analytiques suffisamment précises et justes, pour doser ces composés à l'état de traces dans des matrices complexes telles que les moûts de raisin.

Le second axe de travail concerne les études de filiations afin de mieux cerner la biogenèse des thiols variétaux dans les vins. Aujourd'hui, la majorité du 3MH formé dans les vins implique des mécanismes méconnus. Récemment, certains travaux ont suggéré l'existence d'un précurseur de thiol sous forme de S-conjugué au glutathion, qui pourrait expliquer une partie de la formation du 3MH (14, 15). Le glutathion étant lui-même impliqué dans les phénomènes de brunissement enzymatique des moûts, un intérêt particulier a été porté à ce possible précurseur au cours du travail. Ainsi, la mise en place de nouvelles stratégies de synthèse a permis l'obtention de molécules marquées avec des isotopes stables (deutérium), utilisables à la fois pour l'identification formelle et la quantification de ces composés dans les raisins et les moûts, mais également pour étudier, en milieu naturel, leur éventuelle conversion en thiols lors de la fermentation alcoolique.

La modélisation à l'échelle du laboratoire des phénomènes d'oxydations dans les moûts de Melon B. et de Sauvignon Blanc et le suivi des molécules cibles représentent le troisième axe de travail. Cette partie s'articule autour de deux objectifs :

- Caractérisation des moûts en composition pour quantifier les molécules cibles réellement présentes dans la baie de raisin. Cette étude suppose l'obtention de moût en absence totale d'oxygène.
- Oxydation séquentielle des moûts afin de mesurer l'évolution des composés cibles durant la consommation de l'oxygène par le moût.

Le travail a été finalement conclu par l'application industrielle d'un certain nombre de résultats obtenus au cours des deux premières années de thèse. Ainsi, des comparaisons de méthodes de pressurage dites traditionnelle et inertée ont été mise en place à la cave expérimentale de l'Institut Français de la Vigne et du Vin (Sicarex du Pays nantais), en collaboration avec la société Bucher Vaslin.

## 2. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

## 2.1. Arômes du vin : de la vigne à la bouteille

L'arôme du vin résulte d'un mélange complexe de nombreux composés volatils dont les interactions entre eux ou avec la matrice essentiellement constituée d'eau, d'éthanol, de polyphénols, d'acides gras, de protéines et de polysaccharides, module la contribution. La formation des molécules d'arôme est continue au cours de la vinification, depuis la vendange jusqu'à l'élevage et pendant le vieillissement du vin. Drawert *et al.* (16) proposent une classification en trois familles selon l'origine (bio)génétique des composés :

- Arômes variétaux
- Arômes fermentaires
- Arômes de vieillissement

### 2.1.1. Arômes variétaux

L'arôme variétal provient du raisin et est responsable en grande partie de la typicité des vins. Les composés d'arômes variétaux peuvent exister sous forme libre et sont alors directement perceptibles par les récepteurs olfactifs ou bien, sous forme de précurseurs inodores dans la baie de raisin, dont le clivage en composé odorant intervient au cours des différentes étapes de la vendange, de la vinification ou du vieillissement. Cette notion de précurseur doit être prise au sens strict : un précurseur donne naissance à un composé volatil odorant par 1 ou 2 clivages, le composé résultant conservant une partie reconnaissable de la structure chimique du précurseur (17). Ainsi, les sucres ou acide aminés qui sont à l'origine de composés volatils, notamment par le métabolisme secondaire de la levure, ne sont pas considérés comme précurseurs d'arômes. Ils sont non-spécifiques et trop fortement réarrangés au cours de la vinification.

#### 2.1.1.1. Arômes libres du raisin

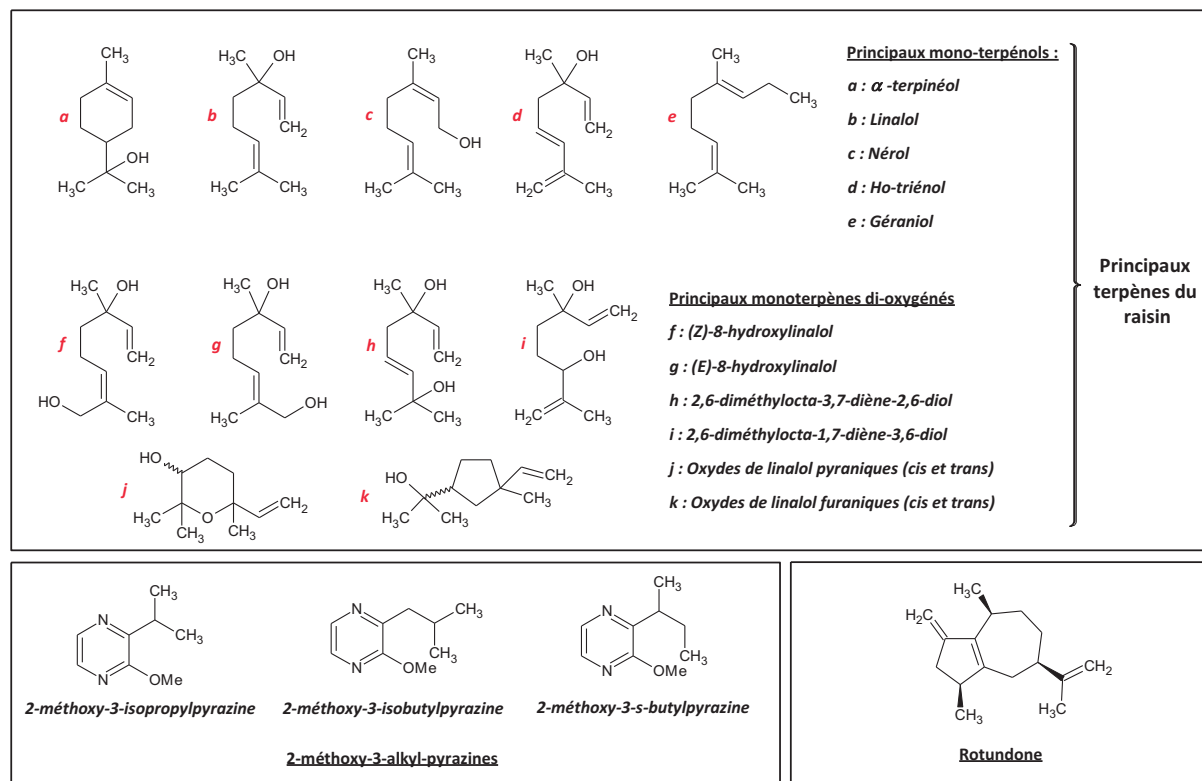
Les arômes libres dans le raisin sont représentés uniquement par trois classes de molécules (Figure 1) : les terpénols dans le cas des cépages muscatés, les pyrazines (2-alkyl-3-méthoxypyrazines) notamment pour les vins de Cabernet (18) et la rotundone (19), uniquement identifiée dans les raisins et vins de Syrah provenant d'Australie.

Les terpènes rencontrés le plus fréquemment dans le raisin sont des monoterpènes mono ou di-oxygénés. Les espèces mono-oxygénées tels que l' $\alpha$ -terpinéol (squelette cyclique), le linalol, le nérol, l'ho-triéniol, le géraniol et le citronellol sont les plus odorants et se situent préférentiellement dans les parties solides des baies. Les opérations de macération favorisent leur extraction dans les moûts. Ils apportent des notes florales typiques des cépages muscatés ou de type Alsacien et Ibérique tels que le Gewürztraminer, l'Alvarinho ou le Loureiro (20). Ils sont en général présents dans les vins en quantités supérieures à leurs seuils de perception olfactive bien que ceux-ci n'aient été mesurés que dans un moût modèle (21) et non dans un vin modèle. Dans le cas des vins doux naturels élaborés à partir de Muscat petits grains et de Muscat d'Alexandrie, le linalol atteint des concentrations importantes sous forme libre (500 à plus de 1000  $\mu\text{g/L}$ ), de même que le géraniol (100-400  $\mu\text{g/L}$ ) et le nérol (50 à plus de 100  $\mu\text{g/L}$ ) (20). Les monoterpènes di-oxygénés sont présents dans diverses variétés de raisin, les plus abondants étant des diols mono-terpéniques, des hydroxylinalols ou des oxydes de linalol (22). De façon générale, ces composés sont inodores mais peuvent être impliqués

dans des réactions chimiques de réarrangement, d'hydratation et d'oxydation, notamment au cours du vieillissement du vin (23, 24).

Les pyrazines sont responsables des odeurs végétales de poivron vert, de pois vert et d'asperge souvent décrites comme négatives (25). Identifiées pour la première fois dans des vins de Cabernet Sauvignon (18), trois pyrazines sont généralement décrites : la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine (IBMP), la 2-méthoxy-3-sec-butylpyrazine et la 2-méthoxy-3-isopropylpyrazine. Leurs teneurs sont légèrement supérieures à leurs seuils de perception olfactive, ces derniers étant variables d'un type de vin à l'autre et généralement de l'ordre du ng/L. L'IBMP, quantifiée par dilution isotopique, présente des teneurs comprises entre 3 et 60 ng/L dans les vins de Cabernet Sauvignon (26, 27) et de Sauvignon Blanc (25).

La rotundone, sesquiterpène responsable d'odeurs de poivre noir, grain de poivre ou encore de notes épicées, possède un seuil de perception olfactive de l'ordre de 16 ng/L dans le vin rouge et de 8 ng/L dans l'eau (19). Elle est quantifiée par dilution isotopique (rotundone d<sub>5</sub> utilisée comme standard interne) et SPME-GC-MS dans les vins et raisins de Syrah d'origine australienne à des teneurs pouvant atteindre 88 ng/kg (28).



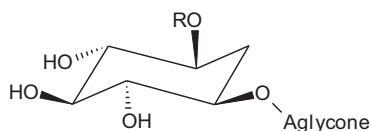
**Figure 1 : Les principaux composés d'arômes variétaux de type volatils et libres du raisin : terpènes, pyrazines et rotundone**



### 2.1.1.2. Arômes libérés à partir de précurseurs

Les arômes variétaux libérés à partir de précurseurs présents dans les raisins sont très différents d'un point de vue chimique et organoleptique. Six groupes de molécules chimiques peuvent être différenciés :

- Les précurseurs glycosidiques représentent un ensemble varié de composés inodores identifiés initialement dans le raisin (29). Ils sont constitués d'une partie osidique liée par une liaison  $\beta$ -glucosidique ( $\beta$  1-4) à un composé volatil (aglycone) (Figure 2). Quatre classes de précurseurs glycosidiques ont été identifiées (30, 31) et sont responsables de la libération d'alcools en C6, d'alcools aromatiques et aliphatiques, de phénols volatils, de dérivés terpéniques et de C<sub>13</sub>-norisoprénoïdes. Les glycosides, identifiés dans différents organes de la vigne tels que les feuilles ou les baies (32), présentent des concentrations de l'ordre du mg/L pour les cépages dits neutres (33, 34) et peuvent atteindre plusieurs dizaines de mg/L dans les jus de Muscat notamment pour la classe des monoterpénols qui est largement dominante (31). Les précurseurs glycosidiques sont hydrolysés par voie enzymatique ou chimique. La libération enzymatique des aglycones se fait par action de disaccharidase ou séquentiellement par différentes enzymes en clivant l'ose terminal puis l'unité  $\beta$ -D-glucopyranosidique (35). Au cours de la vinification, l'acidité et la teneur en glucose des moûts inhibent fortement les activités enzymatiques. De ce fait, seules les bactéries lactiques sont capables d'hydrolyser une partie des glycosides (36). *A contrario*, le pH acide des vins et des moûts favorise l'hydrolyse chimique des glycosides bien que le processus soit plus ou moins lent et dépendant de la température. De façon générale, ce mécanisme intervient lors du vieillissement des vins (31, 37, 38).



#### Classes de précurseurs glycosidiques :

R = H :  $\beta$ -D-glucopyranoside

R =  $\alpha$ -L-Rhamnosyl : 6-O-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside

R =  $\alpha$ -L-Arabinofuranosyl : 6-O-( $\alpha$ -L-arabinofuranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside

R =  $\beta$ -D-Apiosyl : 6-O-( $\beta$ -D-apiofuranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside

#### Aglycone-OH :

- Monoterpénols

- Alcools supérieurs

- Alcools en C6

- Phénols volatils

- C<sub>13</sub>-norisoprénoïdes

Figure 2 : Structures chimiques des différentes classes de précurseurs glycosidiques identifiés dans le raisin

- Le diméthylsulfure (DMS), avec un seuil de perception proche de 25 µg/L mais très variable en fonction de la matrice, est un produit secondaire du métabolisme azoté de la levure. En effet, il peut être libéré à partir de cystéine, cystine, glutathion ou encore de S-adenosylméthionine durant la fermentation alcoolique (39). La réduction du diméthylsulfoxyde (DMSO) en DMS, comme reportée pour la fabrication de la bière (40-42), serait envisageable en conditions œnologiques (43) mais la trop faible abondance du DMSO voire son absence dans les moûts (34), rend impossible cette voie de transformation. Au cours du vieillissement, les teneurs en DMS dans les vins augmentent et semblent dépendantes de la température de stockage (43, 44). Par conséquent, l'hypothèse d'une voie de formation autre que fermentaire a été formulée puis validée, qui correspond au clivage de la S-méthyl-méthionine en DMS (34, 45). Présent dans les vins à des teneurs variant de 5 à 50 µg/L (46), le DMS contribue à l'arôme des vins rouges par des odeurs de truffes à fortes teneurs tandis qu'à plus faibles concentrations, il renforce les notes fruitées (34, 47).
- Les thiols variétaux résultent du clivage, par l'activité β-lyase de la levure, de précurseurs inodores présents dans le raisin sous forme de S-conjugués à la cystéine ou au glutathion. Ces composés ont donné lieu à la rédaction d'une revue, jointe en annexe.
- Les phénols volatils (Figure 3) présentent des odeurs aux caractéristiques très diverses dont la plupart peut être considérée comme des défauts. Le 4-vinylphénol et le 4-vinylgâïacol responsables des odeurs de gouache et de clou de girofle dans les vins, sont produits par la levure *Saccharomyces cerevisiae* à partir des acides coumariques et féruliques, respectivement. Leur formation nécessite une double action enzymatique de la levure de type cinnamyl estérase puis cinnamate décarboxylase. Le 4-vinylphénol et le 4-vinylgâïacol contribuent positivement à l'arôme des vins tant que leurs teneurs sont inférieures à leurs seuils de perception olfactive : 770 et 440 µg/L respectivement (48, 49). Au cours de la conservation du vin, les teneurs en vinylphénols diminuent significativement (50) pour former d'autres espèces : éthoxyéthylphénols (51) et éthylphénols. Ces premiers, résultant de l'addition d'éthanol sur la double liaison vinylique des vinylphénols, ne présentent pas de notes aromatiques aux concentrations trouvées dans les vins. Les éthylphénols sont formés en faibles concentrations lors de la fermentation malolactique, mais peuvent atteindre de très fortes teneurs lors de la conservation du vin. En effet, la contamination du vin par la levure du genre *Brettanomyces* engendre une forte production de 4-éthylphénol et de 4-éthylgâïacol par réduction enzymatique de la liaison vinyl des vinylphénols (activité enzymatique de type vinylphénol réductase) (52-54). A fortes teneurs (> 425 µg/L pour des vins rouges de Bordeaux), les 4-éthylphénol et 4-éthylgâïacol sont responsables d'un défaut d'arôme défini par des notes « écurie, animal et cuir » (54). La formation de ces composés est variable, mais est particulièrement accentuée dans les vins rouges : d'une dizaine de µg/L jusqu'à 6 mg/L (54, 55). Le 2-éthylphénol et l'alcool benzylique existent sous forme de précurseurs glycosylés dans le raisin mais leur contribution est très faible par rapport à celle générée lors de la fermentation alcoolique par la levure.

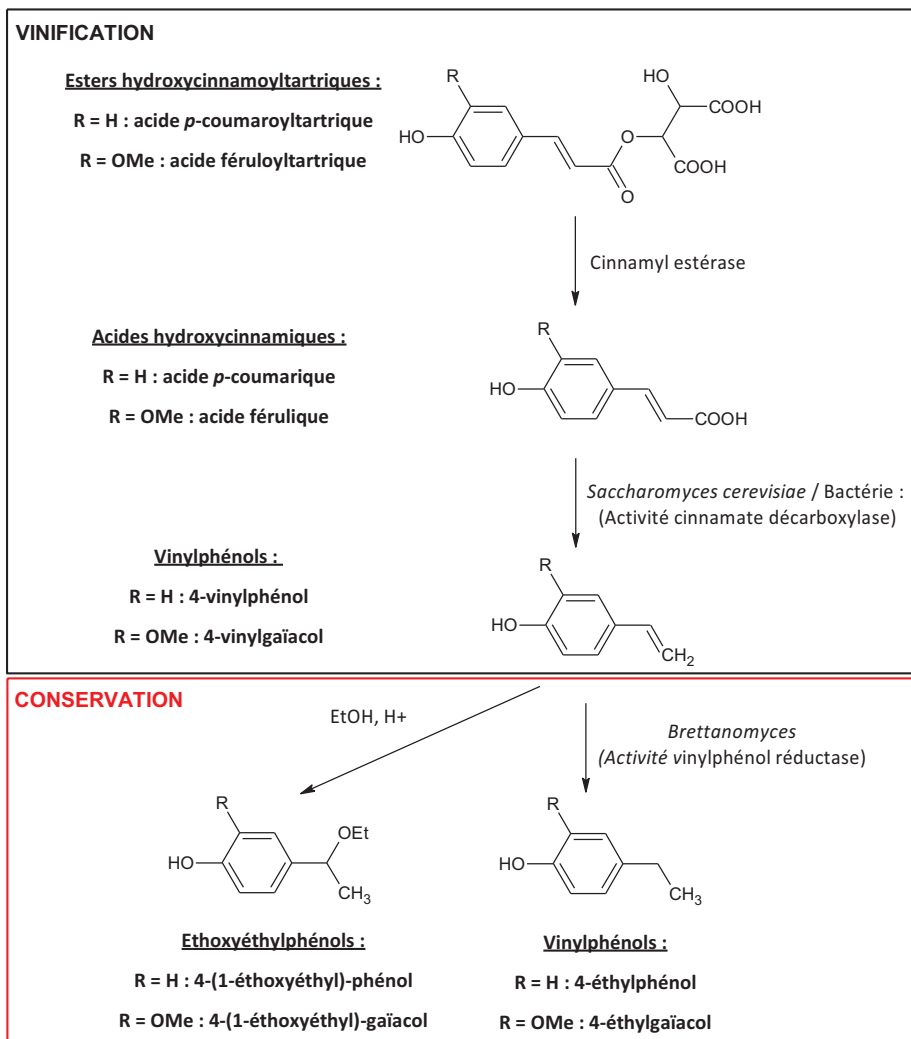


Figure 3 : Formation des phénols volatils durant la vinification et la conservation du vin

- Les composés en C6 de type hexène et hexanal, sont formés durant l'élaboration des moûts par action d'activités enzymatiques de type lipase, lipoxygénase et alcool déshydrogénase sur des acides gras insaturés tels que l'acide linoléique et linoléique (56). Du fait de leur mécanisme de formation, les composés en C6 sont classiquement désignés comme des espèces pré-fermentaires bien qu'une faible partie soit d'origine variétale (57) : identification de dérivés glycosylés dans les baies de raisin. Via l'activité alcool déshydrogénase du raisin, les alcools correspondants tels que l'hexène ou l'hexanol sont formés dans les moûts. Les composés en C6 sont responsables d'odeurs herbacées (herbe coupée) qui après fermentation, s'estompent par formation des alcools correspondants, dont les seuils de perception olfactive sont supérieurs aux concentrations effectivement rencontrées.

- Le furanéol (2,5-diméthyl-4-hydroxy-(2H)-furan-3-one) est caractéristique des odeurs de caramel ou de fraise selon qu'il est présent dans les vins à fortes ou faibles concentrations (58). Les vins issus de vignes américaines et de leurs hybrides sont très riches en furanéol (> 10 mg/L), dépassant ainsi son seuil de perception olfactive (30-300 µg/L selon la matrice) (48). Dans les vins (*Vitis vinifera*), le furanéol serait issu du métabolisme des sucres. Bien que des arguments militent pour sa présence dans le raisin (59, 60), aucune identification formelle d'un précurseur glycosidique n'a été démontrée. Un homologue du furanéol, l'homofuranéol, a été identifié dans divers vins de Merlot et de Cabernet Sauvignon (61) puis de Grenache rosé comme exhausteur de l'arôme du fruit en synergie avec le furanéol (62). Le mécanisme de formation de l'homofuranéol reste inexplicé à ce jour.

### 2.1.2. Arômes fermentaires

Les arômes issus de la fermentation sont généralement divisés en quatre catégories.

- **Les alcools supérieurs** : La production de ces composés est étroitement liée au métabolisme azoté et implique des voies de régulation complexes. Leur biogenèse s'effectue selon deux voies métaboliques distinctes : la voie d'Ehrlich (catabolisme des acides aminés) et la voie anabolique des acides aminés à partir des sucres (63, 64). Les proportions relatives de chacune des voies sont respectivement de 25 et 75 % (65), sachant que ces valeurs varient en fonction du taux d'azote assimilable et de la teneur en sucres fermentescibles du moût (66). Quantitativement, les principaux alcools supérieurs sont les 2- et 3-méthylbutanol, le propanol, le 2-méthylpropanol, le butanol, le pentanol, le 2-phényléthanol, le 3-méthylthiopropanol, le tyrosol et le tryptophol. Leur concentration totale moyenne peut atteindre dans le vin entre 400 et 500 mg/L, valeur optimale pour présenter un arôme acceptable par le consommateur (67-69). Au-delà de ces valeurs, ces composés entraînent des défauts d'odeur. Globalement, les alcools supérieurs sont peu favorables à l'arôme du vin, à l'exception du 2-phényléthanol qui apporte des notes florales (odeur de rose (70)). De façon générale, le ralentissement de la fermentation alcoolique par une diminution de la température, de faibles valeurs de pH du moût, une forte teneur en ions ammonium ou un débouillage poussé limitent la formation des alcools supérieurs par la levure.

- **Les acides gras à nombre pair d'atomes de carbone** : Cette famille se compose des acides gras à courte chaîne (C2 à C10) qui sont produits par la levure durant la fermentation alcoolique lors du métabolisme des lipides. Ils résultent de l'hydrolyse des acyl-S-CoA soit par  $\beta$ -oxydation des lipides en début de fermentation essentiellement tant que de l'oxygène est disponible (71), soit *via* l'anabolisme des acides gras qui représente la voie majoritaire. Dans le vin, seuls les acides gras ne comptant que 10 atomes de carbone au maximum sont les plus abondants car ils parviennent à traverser la membrane cellulaire levurienne. Tout comme les alcools supérieurs, les acides gras contribuent négativement à la qualité aromatique des vins. Leurs concentrations dans les vins ne dépassent que très rarement leur seuil de perception, mais ils semblent nécessaires au bon équilibre de l'arôme fermentaire (69). L'acide acétique représente près de 95 % de l'acidité volatile produite par la levure, avec des teneurs moyennes dans le vin de l'ordre de 250 mg/L avant fermentation malolactique, concentration supérieure à son seuil de perception (69). Malgré son odeur de vinaigre, l'acide acétique est nécessaire à l'arôme du vin, et des concentrations comprises entre 200 et 700 mg/L semblent être optimales (67, 68). Des conditions de fermentation telles qu'une anaérobiose

stricte, l'abaissement de la température ou une forte clarification du moût, amplifient la formation des acides gras dans le vin (70, 72-74). Les acides gras en C6 jusqu'en C12 ainsi que les esters correspondants sont des inhibiteurs de la multiplication cellulaire des levures (75, 76) et peuvent entraîner des arrêts de fermentation.

- **Les esters** : Trois classes d'esters, issus de la fermentation alcoolique, peuvent être distinguées. Le premier groupe correspond aux esters éthyliques d'acides gras linéaires qui sont associés au métabolisme des lipides. Les deux autres groupes dépendent du métabolisme de l'azote : ce sont les esters éthyliques d'acides gras ramifiés ou hydroxylés et les acétates d'alcools supérieurs. Ces esters sont formés par la levure à partir des acyl-S-CoA et des alcools correspondants (67). Les esters contribuent pour la plupart à l'arôme des vins jeunes, auxquels ils apportent des notes florales et fruitées (7, 77, 78). Quatre esters éthyliques participent particulièrement à l'arôme des vins jeunes : le butanoate d'éthyle, l'hexanoate d'éthyle, l'octanoate d'éthyle et le décanoate d'éthyle (77, 79). Ces esters sont à l'origine de notes fruitées agréables, alors que l'acétate d'éthyle reste difficilement perçu pour des teneurs de l'ordre de 100 mg/L (80-82). Parmi les acétates d'alcools supérieurs, seuls les acétates de 2- et 3-méthylbutyle, ainsi que de 2-phényléthyle donnent des notes fruitées et florales très caractéristiques aux vins (7, 69, 78). Enfin, certains esters ramifiés tels que le 2-méthylpropanoate, les 2- et 3-méthylbutanoate d'éthyle semblent avoir un rôle important dans l'arôme des vins (7, 61, 78, 83). De façon générale, la contribution des esters est dépendante du type de vin (84) et implique des effets de synergie (85). Au cours du vieillissement, les teneurs en esters éthyliques à nombre pair de carbone semblent diminuer (79), alors que celles des esters ramifiés restent stables ou augmentent (61).

- **Les composés soufrés** : En fin de fermentation, le vin présente divers composés soufrés issus du métabolisme du soufre et de l'azote : le sulfure d'hydrogène, le dioxyde de soufre, le sulfure de carbone, le disulfure de carbone ainsi que les méthyl-, éthylthio-, disulfures et thioéthers correspondants. En fonction de leur point d'ébullition (césure à 90°C), les composés soufrés sont dits soit « légers » et sont souvent associés à des défauts d'odeurs (réduit, œuf pourri) (67-69, 86, 87), soit « lourds ou supérieurs » et participent à l'arôme de façon plus complexe (67, 68, 88, 89). Les composés soufrés légers (sulfure d'hydrogène, dioxyde de soufre, sulfure et disulfure de carbone puis méthyl- et éthyl- mercaptans, thioacétates, sulfures et disulfures) n'apportent pas de défaut d'arôme en fin de fermentation tant que leurs concentrations n'excèdent pas quelques µg/L, valeur proche de leurs seuils de détection (86, 87, 89, 90). Sous l'influence de divers facteurs dont les principaux sont la souche de levure, la température de fermentation, la turbidité du moût, les teneurs en azote assimilable, en vitamines, en sulfates et sulfites du moût, les teneurs de ces composés sont modulées et peuvent donner lieu à des défauts d'arôme (90). La production de sulfure d'hydrogène, indispensable à la levure, est basée sur la réduction des sulfates à partir de sources inorganiques telles que les sulfites, le SO<sub>2</sub> ou les sulfates ou de sources organiques de type cystéine et glutathion. Les composés soufrés supérieurs tels que le 2-méthylthioéthanol, le 2-mercaptoéthanol, le 3-méthylthiopropanol et leurs dérivés sont soit issus du métabolisme de la cystéine soit du métabolisme de la méthionine et de l'homométhionine (88, 91-93). A l'exception du 3-méthylthiopropanol et de la N-(3-méthylthiopropyl)-acétamide, dont les concentrations peuvent dépasser le mg/L, les teneurs des autres composés soufrés supérieurs sont inférieures à 0,1 mg/L,

valeur correspondant à leur seuil de perception. D'autres espèces soufrées telles que le benzylthiol, le 2-furanméthanethiol et le 3-mercaptopropionate ont été identifiés dans des vieux vins de Champagne (94, 95), ainsi que dans divers cépages (96, 97) et possèdent des seuils de perception très faibles. Ils contribuent à l'arôme des vins au travers de notes empyreumatiques.

### 2.1.3. Arômes de vieillissement

Durant l'élevage et le vieillissement, diverses réactions chimiques modifient l'arôme du vin. Tout d'abord, l'hydrolyse de composés fermentaires tels que les esters est responsable de la modification des notes fruitées du vin. Ensuite, les composés variétaux de type monoterpénols et C<sub>13</sub>-norisoprénoïdes subissent des transformations chimiques produisant des molécules odorantes telles que les isomères du vitispirane (eucalyptus et camphre), la β-damascénone (exhausteur du fruité, rose et fleur exotique) ou le 1,1,6-triméthyl-1,2-dihydronaphtalène (TDN : odeur de pétrole) (98, 99). Ce dernier est notamment présent dans de vieux vins de Riesling aux notes marquées de kérosène.

Au cours de l'élevage en fût, les substances volatiles du bois diffusent dans le vin avec des cinétiques différentes suivant les composés chimiques mais également en fonction de l'origine botanique et géographique du bois de chêne et de la fabrication et utilisation des barriques (94, 100-102). Parmi les molécules volatiles extractibles figurent les composés à structure gäiacyl et syringyl, les furannes et pyranes substitués, des γ-lactones, des composés norisoprénoïdes, des pyrazines et des pyridines (67, 94, 103-106). Ainsi, des phénols volatils tels que le gäiacol, le 4-méthylgäiacol sont responsables des odeurs de bois brûlé (94). D'autre part, le 4-propylgäiacol, le 4-éthyl-2,6-diméthoxyphénol, l'eugénol, des phénylcétones telles que la butyrovanilline ou encore des aldéhydes comme la vanilline et le syringaldéhyde sont également extraits du bois au cours du vieillissement en barrique (94, 103, 107). Les molécules de la famille des β-méthyl-γ-octalactones sont sélectivement extraites du bois de chêne et contribuent également aux notes boisées (odeur de noix de coco). La formation d'aldéhydes tels que le furfural, le 5-méthylfurfural et le 5-hydroxyméthylfurfural est provoquée par brûlage du bois (94). Enfin, dans le cas de fermentations alcooliques et/ou malolactiques conduites en barriques, la formation du 2-furanméthanethiol est responsable d'odeur de café grillé dans le vin (108).

Dans des conditions spécifiques d'élevage, notamment sous voile de levure, le sotolon (3-hydroxy-4,5-diméthyl-2-(5H)-furanone) est présent à des teneurs élevées dans des vins de Xérès, Tokay de Hongrie et Vin Jaune du Jura (109, 110) et de façon plus anecdotique dans des vins blancs issus de vendanges botrytisées (111, 112)(5 à 20 µg/L), dans les vins de paille (109, 111)(6-51 µg/L) et dans les vins doux naturels de Grenache (113, 114). Le sotolon apporte des odeurs rappelant la noix ou le curry et possède un seuil de perception faible de l'ordre de 10 µg/L. Les Vins Jaunes, très typés par leur odeur de noix, peuvent renfermer des teneurs en sotolon supérieures à 350 µg/L (109, 115). Au cours du vieillissement sous voile de levure, la concentration en sotolon augmente et peut dépasser 1 mg/L pour des vins de plus de 20 ans. Le sotolon se forme par aldolisation de l'acide α-cétobutyrique et de l'acétaldéhyde (109, 110).

## 2.2. Composés phénoliques du raisin impliqués dans le brunissement des moûts

Les composés phénoliques sont à l'origine d'une grande partie des propriétés organoleptiques, mais également de la couleur des vins. De natures diverses, ils ont été divisés en deux classes distinctes :

- les composés non-flavonoïdes qui regroupent les esters hydroxycinnamoyltartriques (acides hydroxycinnamiques et hydroxybenzoïques) et les stilbènes. Seuls les esters hydroxycinnamoyltartriques, à l'origine des mécanismes d'oxydation pré-fermentaires, seront présentés dans la suite de ce manuscrit.
- les flavonoïdes qui sont caractérisés par un squelette de base à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6) de type 2-phényl-benzopyrone (Figure 4).

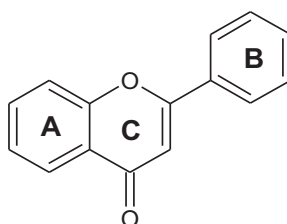


Figure 4 : Structure chimique de base des flavonoïdes

### 2.1.1. Esters hydroxycinnamoyltartriques

Historiquement, les esters hydroxycinnamoyltartriques que l'on retrouve dans le raisin (116), ont été improprement appelés acides phénols ou acides hydroxycinnamiques (AH). Dans la suite du manuscrit, l'utilisation de la dénomination « acide phénol » ou « acide hydroxycinnamique » fera référence aux esters hydroxycinnamoyltartriques.

Trois esters ont été identifiés à ce jour : l'acide caféoyltartrique, l'acide *p*-coumaroyltartrique et l'acide féruloyltartrique (Tableau 1).

Tableau 1 : Les esters hydroxycinnamoyltartriques présents dans les raisins

Noms	Dénominations simplifiées	Concentrations dans les moûts (mg/L)	Formules chimiques
Acide caféoyltartrique	Acide <i>trans</i> -caftarique	20 – 400	
Acide <i>p</i> -coumaroyltartrique	Acide <i>trans</i> -coutarique	0 - 20	
Acide féruloyltartrique	Acide <i>trans</i> -fertarique	Très faible quantité	

Les esters hydroxycinnamoyltartriques sont naturellement présents sous leur forme E mais une isomérisation peut se produire en présence de lumière (117). Les isomères Z, longtemps confondus avec les dérivés glucosylés, existent en faibles quantités dans le raisin (118). Seul l'adduit glucosylé de l'acide *trans*-coutarique a été identifié dans le genre *Vitis vinifera* (119).

Dans les moûts, les esters hydroxycinnamoyltartriques proviennent majoritairement de la pulpe, bien que leur présence soit plus marquée dans la pellicule. Cette observation s'explique par un rapport de masse entre pulpe et pellicule voisin de 7. Dans la pellicule, les teneurs s'échelonnent entre 0,06 et 0,78 mg/g de pellicule pour l'acide caftarique et entre 0 et 0,3 mg/g pour l'acide coutarique. L'acide fertarique est quant à lui présent en très faibles quantités dans la pellicule (< 0,06 mg/g de pellicule) (120). Les concentrations en esters hydroxycinnamoyltartriques varient considérablement en fonction du cépage (121-123) ainsi que la proportion de chaque composé, ce dernier paramètre pouvant servir de critère taxonomique (124).

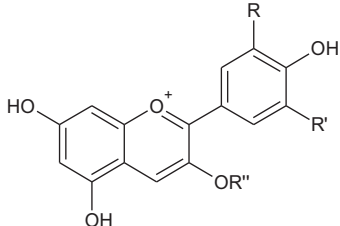
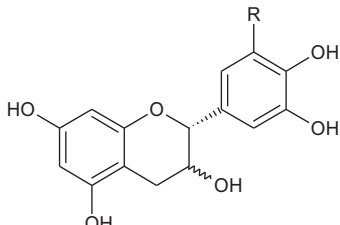
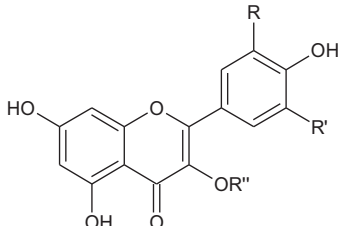
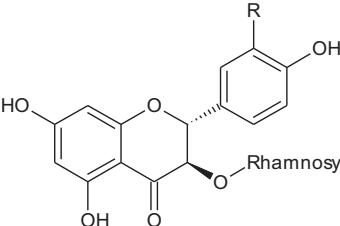
Durant le processus de développement de la baie, la concentration en esters hydroxycinnamoyltartriques diminue puis se stabilise à maturité œnologique (125).



## 2.1.2. Flavonoïdes

Cette classe de composés regroupe les anthocyanes, les 3-flavanols, les flavonols et les flavanonols. Ils diffèrent entre eux par le degré d'oxydation de leur noyau pyranique (Tableau 2).

**Tableau 2 : Les flavonoïdes présents dans le raisin**

Classes	Localisation	Nombre de composés	Teneurs dans les baies	Formules chimiques (Parties aglycones ou monomériques)
<b>Anthocyanes</b>	Pellicule (raisins rouges)	<b>20</b>	<b>500 – 3000 mg/kg</b>	
<b>3-flavanols ou proanthocyanidines</b>	Pellicule et pépins	<b>4</b>	<b>Variable</b> suivant l'espèce, le degré de maturité et la localisation (rafles, pépins et pellicules)	
<b>Flavonols</b>	Pellicule (raisins rouge et blanc)	<b>8</b> monoglycosides + <b>3</b> diglycosides	<b>10 – 100 mg/kg</b>	
<b>Flavanonols</b>	Pellicule (raisin blanc)	<b>2</b>	<b>9 mg/kg</b> (astilbine) <b>0,6 mg/kg</b> (engeletine)	

### 2.1.3. Mécanismes d'oxydation pré-fermentaires

La composition phénolique du raisin varie quantitativement et qualitativement selon le cépage, la maturité, l'état sanitaire, le site d'implantation et l'année (126, 127). De plus, le processus de vinification implique des modifications importantes au niveau des esters hydroxycinnamoyltartriques par l'action de diverses enzymes. Ainsi, la présence possible de deux polyphénoloxydases (PPO, EC 1.14.18.1) distinctes entraîne de profondes transformations des polyphénols (Figure 5):

- **Catécholoxydase** : Cette enzyme possède à la fois une activité catécholase (oxydation des *o*-diphénols en quinones) et crésolase (formation d'*o*-diphénol à partir de monophénol). L'acide *trans*-caféoyltartrique et *p*-coumaroyltartrique sont les substrats de cette enzyme.
- **Laccase** : Cette enzyme, exogène du raisin et provenant du champignon *Botrytis cinerea*, est capable d'oxyder une large gamme de substrats : *o*-, *p*- et *m*-diphénols, acide ascorbique, *o*-triphénols de type acide gallique, divers monophénols excepté l'acide *p*-hydroxybenzoïque, anthocyanidols (128-130), (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, procyanidols, esters hydroxycinnamoyltartriques (131) et le produit d'addition entre le glutathion et la quinone d'acide *trans*-caftarique : le Grape Reaction Product (GRP) (132).

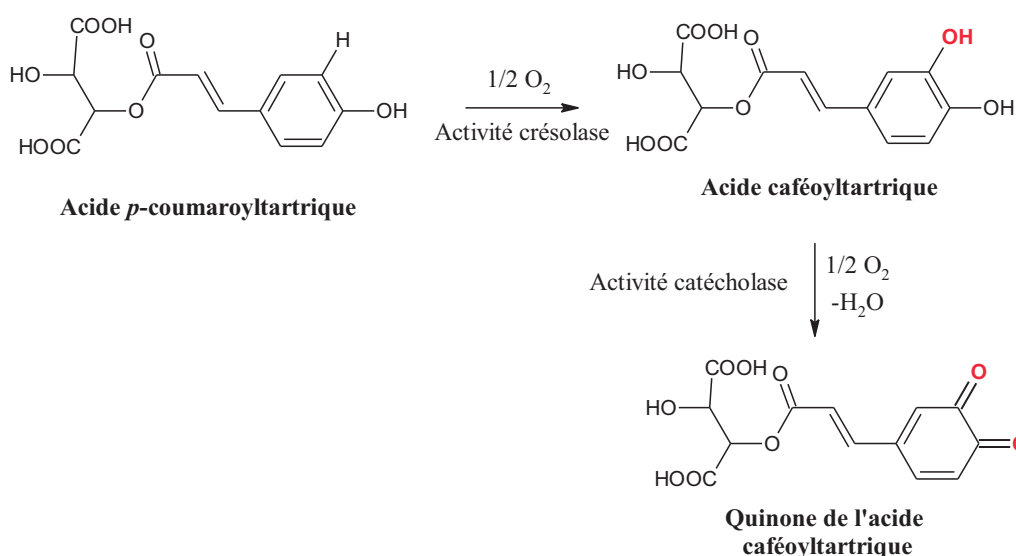


Figure 5 : Activités de la catécholoxydase

La catécholoxydase est d'autant plus active que les acides hydroxycinnamiques sont sous forme d'esters de l'acide tartrique (activité doublée entre acide caféique et caftarique) (133, 134). Cette enzyme est inhibée par de nombreux composés naturels ou non, tels que le métabisulfite de sodium, le sulfure d'hydrogène, le glutathion, la cystéine (131, 135, 136) ou encore par certains acides aromatiques tel que l'acide *p*-coumarique (137). L'enzyme présente une activité maximale à 30°C et une stabilité optimale à pH=7,2 vis-à-vis des traitements thermiques. Au cours de la vinification, l'activité enzymatique de la catécholoxydase varie considérablement. Le pressurage augmente particulièrement les activités soluble et totale de la catécholoxydase et ce d'autant plus que le pressurage est intense. Elle contribue au brunissement des moûts (138, 139). *A contrario*, le sulfitage des moûts au cours de leur élaboration diminue partiellement l'activité jusqu'à sa disparition complète selon les doses utilisées. Le débourageage et l'utilisation de bentonite entraînent également

une diminution de l'activité enzymatique qui s'ajoute ainsi à celle due au sulfitage (140). Au début et durant la fermentation alcoolique, la formation d'éthanol, la diminution du pH, la précipitation des protéines, ainsi que la présence de SO<sub>2</sub> libre entraînent une décroissance de l'activité enzymatique (141), si bien qu'en fin de fermentation, l'activité résiduelle est quasi-nulle. De la même façon, certaines souches de levures inhibent l'activité catécholoxdase (142).

La laccase, enzyme extracellulaire et soluble dans le milieu où elle est excrétée par *Botrytis cinerea* (143), est stable au pH du moût et résistante vis-à-vis du sulfitage (144, 145). Au cours des opérations pré-fermentaires, l'activité enzymatique de la laccase n'est modifiée ni par le sulfitage à doses œnologiques, ni par le collage à la bentonite (146). De même, elle n'est pas inhibée par les conditions de fermentation alcoolique (144) et se retrouve donc présente dans les vins où elle pose de sérieux problèmes de stabilité et de qualité.

## 2.1.4. Réactions chimiques sur les quinones d'esters hydroxycinnamoyltartriques

### 2.2.4.1. Réactions d'oxydoréduction

Les quinones des acides *trans*-caftarique et *trans*-coutarique peuvent subir des réactions couplées d'oxydoréduction en présence de réducteurs tels que l'acide ascorbique ou le SO<sub>2</sub> rajoutés à doses œnologiques (147, 148). Naturellement présent dans le raisin, l'acide ascorbique est capable de régénérer les esters hydroxycinnamoyltartriques en formant de l'acide déhydroascorbique. Le SO<sub>2</sub> joue le même rôle protecteur des vendanges vis-à-vis de l'oxydation. Le brunissement est ainsi plus ou moins différé dans le temps selon les quantités présentes de réducteurs (Figure 6).

A cause du fort potentiel d'oxydoréduction du couple acide *trans*-caftarique/quinone de l'acide *trans*-caftarique, l'*o*-quinone formée peut également réagir avec d'autres composés di-phénoliques tels que les flavanols monomères (139), les dimères (149), le Grape Reaction Product (150) et les anthocyanes *o*-dihydroxylés (151) pour former des quinones secondaires. Ces réactions d'oxydation couplées contribuent, dans certains cas, à la production d'espèces colorées et donc au brunissement des moûts (Figure 6).

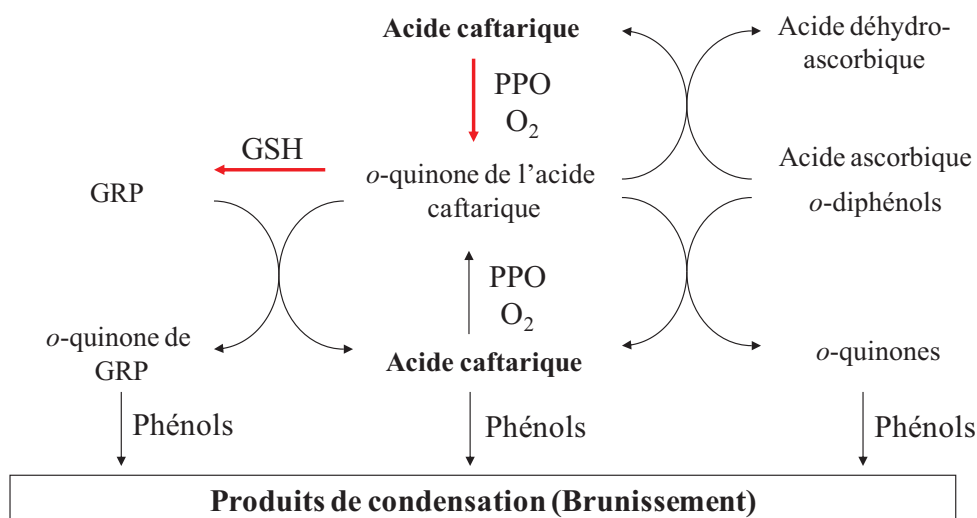


Figure 6 : Mécanismes d'oxydations pré-fermentaires conduisant à un brunissement irréversible du moût (152)

#### 2.2.4.2. Réactions d'addition du glutathion

Lors du foulage, des pertes importantes en acides *trans*-caftarique et *trans*-coutarique sont observées : de 35 à 100 % et de 12 à 75 % respectivement. De façon concomitante, le Grape Reaction Product (GRP) (153) ou acide *S*-glutathionyl-2-caféoyltartrique apparaît (154) (Figure 7). La formation de ce composé passe inévitablement par la formation d'une quinone mise en évidence par blocage sous forme d'un dérivé de type sulfone (152). La formation de GRP, composé incolore, agit comme un piège à quinone lors de l'élaboration des moûts : c'est une voie de limitation du brunissement des moûts.

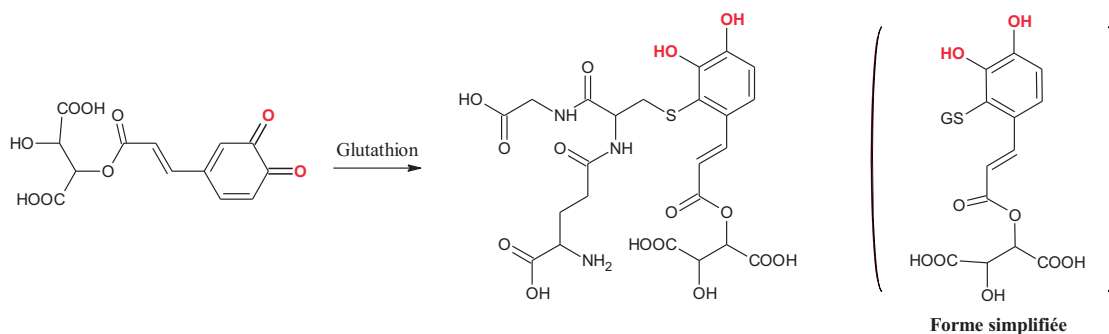


Figure 7 : Formation du GRP

Le GRP n'est pas substrat de la polyphénoloxydase (PPO), mais la laccase de *Botrytis cinerea* est capable de l'oxyder en quinone, pour former de l'acide di-glutathionyl-2,5-caféoyltartrique (GRP2) tant que du glutathion reste disponible dans le milieu (Figure 8).

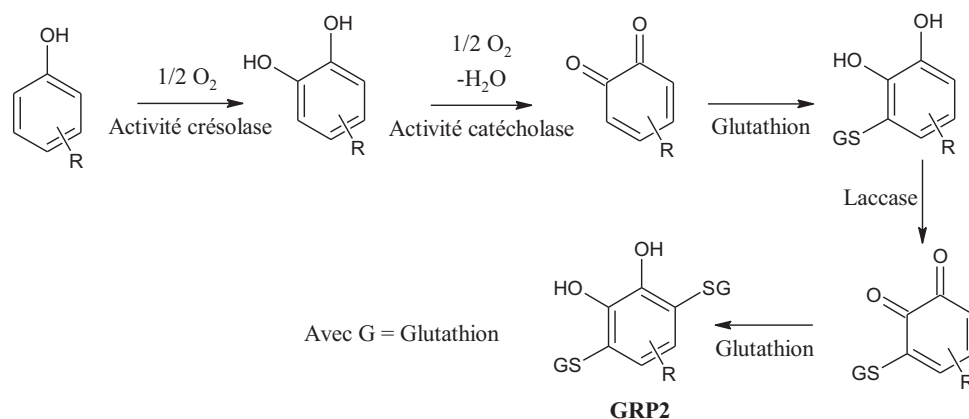


Figure 8 : Formation du GRP2

#### 2.2.4.3. Réactions de condensation

Les quinones de l'acide caftarique peuvent provoquer des réactions de condensation et de polymérisation avec les autres familles de polyphénols. Par analogie avec les jus de pomme (152, 155), les cinétiques d'oxydation de solutions modèles contenant de l'acide *trans*-caftarique et de la catéchine suggèrent la formation d'un produit de condensation entre ces deux espèces (152). De façon similaire, le 3-glucoside du malvidol se dégrade rapidement en présence d'acide *trans*-caftarique et de PPO pour former un produit de condensation via l'*o*-quinone de l'acide *trans*-caftarique (151, 156).

## 2.3. Glutathion : un tripeptide clé en vinification ?

### 2.3.1. Rôle du glutathion en conditions œnologiques

Le glutathion (GSH), tripeptide constitué de glycine, de cystéine et d'acide glutamique, est notamment très largement répandu dans les plantes, les champignons et les aliments (155). Dans sa forme réduite, il est impliqué dans divers processus biologiques tels que la détoxification et régulation de la prolifération des cellules, la synthèse de l'ADN et des acides aminés mais aussi le transport de certaines formes de la cystéine (157). Le glutathion participe également à l'inhibition des mécanismes de brunissement concernant les jus de fruits et autres produits alimentaires (155, 158-160). Depuis son identification dans le raisin (154), son rôle au cours de la vinification est encore mal défini. Selon le cépage, les concentrations en glutathion peuvent varier entre 56 et 372  $\mu\text{mol/kg}$  dans les baies de raisin tandis que dans les moûts correspondants, elles sont comprises entre 46 et 333  $\mu\text{M}$  (161). Au cours de la maturation des raisins de Koshu et de Cabernet Sauvignon, les concentrations en glutathion augmentent significativement pour atteindre des valeurs maximales proches de 100 et 60  $\mu\text{mol/kg}$  respectivement (162). En revanche, durant le processus de vinification, les teneurs en glutathion diminuent significativement pour atteindre les niveaux les plus bas en fin de fermentation alcoolique (162-164). Les réactions d'additions de Michaël du glutathion sur les quinones pour former entre autres du GRP (132, 153, 154) ou son oxydation en disulfure, sont responsables des diminutions observées. Cependant, des résultats divergent en termes d'évolution du glutathion au cours de la vinification. En effet, selon la composition initiale du moût en acides aminés, en azote assimilable et selon le type de levure, les concentrations en glutathion peuvent augmenter au cours de la fermentation (165, 166). La conservation du glutathion dans les moûts et dans les vins est également reliée aux pratiques œnologiques (sulfitage, inertage, élevage sur lies) mais aussi à la présence d'antioxydants tels que l'acide ascorbique (163, 164).

### 2.3.2. Techniques analytiques de dosage

La quantification du glutathion dans des matrices biologiques ou végétales nécessite une grande sélectivité et spécificité, pour ne doser que l'espèce réduite parmi toutes les espèces ayant une fonction thiol et une sensibilité suffisante, pour mesurer des teneurs inférieures au  $\text{mg/L}$ , notamment dans le cas des vins.

De nombreuses stratégies analytiques ont été développées pour quantifier le glutathion dans des matrices biologiques (157) mais très peu sont appliquées à l'œnologie. En effet, seulement cinq méthodes permettant de doser le glutathion à l'état réduit et/ou oxydé dans les raisins, moûts et vins sont reportées dans la littérature (Tableau 3).

**Tableau 3 : Méthodologies analytiques permettant le dosage du glutathion dans des matrices de type raisins, moûts et vins.**

Méthodes	Dérivatisation	Détection	Analytes	Matrices	LOD (µg/L)	Références
HPLC-UV	DTNB	330 nm	GSH	Raisins entiers, moûts	nr	(161)
HPLC-Fluo	OPA	Ex = 340 nm ; Em = 450 nm	GSH, Cys, MetSH et EtSH	Moûts et vins	1-60	(165, 167)
Enzymatique	DTNB	412 nm	GSH, GSSG	Raisins entiers, moûts et vins	nr	(162)
CE-Fluo	MBB	Ex = 410 nm ; Em = 482 nm	GSH	Moûts et vins	20	(164)
LC-MS/MS	/	MRM 308 Da → 179,1 Da (GSH) 613 Da →355,1 Da (GSSG)	GSH, GSSG	Moûts et vins	400 (GSH) ; 200 (GSSG)	(163)

(CE-Fluo : Capillary Electrophoresis-Fluorimetry; DTNB : 5,5'-DiThio-bis(2-NitroBenzoic acid) ; OPA : o-PhtalAldehyde; MBB : MonoBromoBimane, Ex : longueur d'onde d'excitation, Em : longueur d'onde d'émission, MRM : Multiple Reaction Monitoring, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, nr : non reporté)

### **3. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## 3.1. Généralités

### 3.1.1. Solvants et produits chimiques

Les solvants utilisés tels que le pentane, l'acétonitrile, l'acétate d'éthyle, l'éther diéthylique, le méthanol, le dichlorométhane, le dioxane ou l'hexane sont tous de qualité analytique (> 98 %) et proviennent de chez Riedel de Haen et Carlo Erba. La pyridine (Fluka) est distillée et stockée sur tamis moléculaire (4 Å).

Les produits chimiques présentent tous une pureté supérieure à 98 %. Le glutathion provient de chez Duchefa Biochemie. La Boc-Cys-OH provient de chez Novabiochem. L'oxyde de mésityle, la ninhydrine, le nitroprussiate de sodium, le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , le  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , le  $\text{NaBH}_4$ , le  $\text{NaBD}_4$  et l'acide trifluoroacétique (TFA) proviennent de chez Sigma-Aldrich. La triéthylamine et le triéthylsilane (TES) proviennent de chez Fluka. Le carbonate de sodium provient de chez Rhône-Poulenc, le sulfate de sodium de chez Carlo Erba et l'acide acétique ainsi que le butan-1-ol de chez Merck. L'acide chlorhydrique provient de chez Acros Organics.

Les produits œnologiques tels que les levures VIN13, Vitilevure KD et IOC 18-2007 proviennent de chez Anchor Yeasts, Martin Vialatte Œnologie et l'Institut Œnologique de Champagne respectivement. Les enzymes pectolytiques Lafazym CL et les sels ammoniacaux (sulfate ou phosphate d'ammonium) proviennent de chez Laffort.

### 3.1.2. Procédures analytiques

Les chromatographies sur colonne sont effectuées avec de la silice Merck (70-230 ou 230-400 mesh).

Les chromatographies sur couche mince (CCM) analytiques ont été réalisées sur plaques Silica gel 60F254 Merck. Leur révélation est effectuée sous lumière ultraviolette à une longueur d'onde de 254 nm, par révélation à l'iode, ou par chauffage après pulvérisation d'une solution de ninhydrine (95 mL de butan-1-ol, 5 mL d'acide acétique 2 N et 400 mg de ninhydrine) ou de nitroprussiate de sodium (1,5 g de nitroprussiate de sodium, 5 mL d'HCl 2M, 95 mL de méthanol et 10 mL d'ammoniaque à 25 % en volume).

Les purifications par HPLC préparative ont été effectuées sur un appareil Waters Delta 4000 muni d'une colonne Waters Symmetry Shield RP18 (19 x 100 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) et d'un détecteur UV Waters 486 utilisé à 214 nm, avec un débit de 50 mL/min et un gradient adapté à chaque substrat (phase mobile A : eau avec 0,1 % TFA et phase mobile B : acétonitrile avec 0,1 % TFA).

Les spectres de masse ESI-MS (electrospray ionization) des composés non volatils sont enregistrés avec un spectromètre Micromass Platform II équipé d'une source électrospray, couplé à une HPLC Waters. Le volume d'injection est de 2  $\mu\text{L}$  et la température de la colonne est maintenue à 22°C. La séparation est réalisée sur une colonne monolithique de type phase inverse ONYX 18 (4,6 mm x 2,5 cm ; 2  $\mu\text{m}$  ; Phenomenex). Le débit est constant (3 mL/min) au cours du gradient d'éluion : 0 à 100 % d'acétonitrile (2,5 min) puis 100 % d'acétonitrile (1 min) avant retour aux conditions initiales (100 % eau). La détection s'opère en mode positif (ESI) avec une tension de cône et une température de source égales à 3 kV et 120°C respectivement.



Les spectres de masse EI-MS (electronic impact) des composés volatils sont réalisés avec un spectromètre de masse MS Engine (HP-5989A) équipé d'une source d'ionisation à impact électronique et couplé à un chromatographe en phase gazeuse (HP-5890 II).

Les spectres de masse haute résolution (HRMS) sont réalisés à partir d'un spectromètre JEOL JMS-SX-102A.

Les spectres RMN sont enregistrés à 500 MHz sur un spectromètre Varian Unity Inova équipé d'une source inverse de diamètre 3 mm. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport aux signaux du triméthylsilane (TMS) ou de l'acide triméthylsilylpropionique (TMSP) en utilisant le logiciel VNMRJ (Varian). La pureté des composés de synthèse est mesurée par RMN <sup>1</sup>H en utilisant le TMSP comme étalon interne.

Les précurseurs de thiols sont analysés au moyen de deux appareillages distincts :

- une **nanoLC-MS/MS** (NanoLC Waters Acquity couplée à un spectromètre de masse de type triple quadripôle Thermo TSQ Vantage Extended Mass Range) : ionisation electrospray positive (ESI) et détection en mode SRM (Selected Reaction Monitoring) (Cf. article (2)).
- une **nanoLC-MS/MS** (Nano LC Agilent 1200 couplée à un spectromètre de masse de type Q-TRAP 4000 Applied Biosystem) : ionisation électrospray positive (ESI) et détection en mode SRM (Cf. article (4)).

L'analyse des thiols variétaux s'effectue par **GC-MS** (Shimadzu QP5050), après extraction et dérivatisation, par ionisation chimique négative (méthane) et détection en mode SIM (Selected Ion Monitoring).

Les composés en C6 de type (*E*)-2-hexène et (*E*)-2-hexénol sont analysés par **GC-MS** (HP-6890 couplé à un spectromètre de masse de type quadripôle HP-5973) en impact électronique et détection en mode SIM (Cf. article (3)).

L'analyse des esters hydroxycinnamoyltartriques et du Grape Reaction Product (GRP) est réalisée par **HLPC-DAD** (Waters Millenium) (Cf. article (3)).

Le glutathion réduit est analysé au moyen d'un **analyseur d'acides aminés** (Biochrom 30) (Cf. article (3)).

## 3.2. Raisins et vins étudiés

### 3.2.1. Réseau parcellaire

Le dispositif d'échantillonnage comprend 10 parcelles réparties sur l'ensemble du vignoble du Val de Loire : Nantes, Tours et Sancerre (Tableau 4). Les parcelles ont été choisies sur 2 vignobles différents pour le Sauvignon Blanc afin de disposer de contextes viticoles distincts.

Tableau 4 : Caractéristiques du réseau de parcelles dans les vignobles du Val de Loire

Code parcelle	Localisation	Vignobles	Cépage	Année de plantation	Porte-greffe	Sélection	Type de sol	Exposition	Pente	Densité de plantation (pieds/ha)	Mode de conduite
HAI	La Haie Fouassière	Nantes	Melon B.	> 20 ans	3309C	Clonale	Gneiss	sens des rangs : NS	sens des rangs : 3-7 %	6500	Non-palissé
REG	La Regripierre	Nantes	Melon B.	> 20 ans	3309C	Clonale	Micaschiste	sens des rangs : NS	sens des rangs : Faible	6500	Palissé
LOR	Le Loroux-Bottereau	Nantes	Melon B.	> 20 ans	3309C	Clonale	Roche verte	sens des rangs : NS	sens des rangs : 4-7 %	6500	Non-palissé
VER	Vertou	Nantes	Melon B.	> 20 ans	3309C	Clonale	Gneiss	sens des rangs : NS	sens des rangs : Faible	6500	Palissé
Sauv.L	Seigy	Tours	Sauvignon Blanc	1981	SO4	297	Limoneux-argileux sur argile lourde	NS	6%	6500	Palissage taille 2 baguettes
Sauv.G	Meusnes	Tours	Sauvignon Blanc	1990	3309C	Massale	Argile caillouteuse	NS	3-4%	6500	Palissage taille Guyot
Sauv.M	Pouillé	Tours	Sauvignon Blanc	1986	3309C	297	Limoneux-sableuse et caillouteuse sur argile lourde	ESE	5%	6500	Palissage taille Guyot
S	Saint Satur	Sancerre	Sauvignon Blanc	1970	3309C	Massale	Sol brun d'érosion à silex sur marnes de cénomanien	W	16 %	6700	Taille Guyot Désherbage chimique
G	Vinon	Sancerre	Sauvignon Blanc	1981	41B	Massale	Rendzine brune sur calcaire oxfordien	ESE	10 %	6800	Taille Guyot Sol cultivé
TB	Sancerre	Sancerre	Sauvignon Blanc	1988	3309C et 41B	Clones 297 et 376	Sol brun calcaire sur marnes kimméridgien	SE	60 %	8000	Taille Guyot Désherbage chimique

### 3.2.2. Elaboration des moûts

---

Selon les expérimentations, l'élaboration des moûts a été réalisée à trois échelles différentes:

- **Echelle laboratoire** : Ces moûts ont été élaborés lors des vendanges 2007 et 2008 afin de caractériser le potentiel d'oxydation et le potentiel de type thiol des raisins de Melon B. et de Sauvignon Blanc, puis de modéliser les phénomènes d'oxydation en absence et présence d'excès de (*E*)-2-hexénal et/ou de glutathion.
- **Echelle pilote** : Lors des vendanges 2008, des moûts de Melon B. et de Sauvignon Blanc ont fait l'objet de mini-vinifications (50 et 10 L respectivement) pour étudier l'influence de l'addition de glutathion et/ou de (*E*)-2-hexénal sur la libération des thiols variétaux.
- **Echelle industrielle** : Au cours des vendanges 2009, la comparaison du pressurage traditionnel et du pressurage inerté, pour les raisins de Melon B. et Sauvignon Blanc du vignoble Nantais, a été réalisée à l'échelle industrielle en partenariat avec l'Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV) et la société Bucher-Vaslin. Les pressurages ont été menés en parallèle sur deux pressoirs pneumatiques : le RPF22 (traditionnel) et le XPlus22 Inertys (Inerté), ce dernier ayant été mis à disposition par la société Bucher Vaslin.

Les modalités d'élaboration des moûts pour les essais conduits aux échelles laboratoire et pilote sont détaillées dans l'article (3). Une description succincte du protocole est néanmoins reportée dans les paragraphes suivants.

#### 3.2.2.1. Echelle laboratoire

---

Pour chaque parcelle, environ 30 grappes de raisin ont été collectées sur les ceps d'un rang à trois différentes dates : J-7, J et J+7 avec J, le jour réel des vendanges. Ces raisins sont ensuite divisés en 2 lots pour réaliser deux types d'échantillons au cours des vendanges 2007 et 2008 :

- **Echantillons de caractérisation** (vendanges 2007) : Environ 1,5 kg de baies saines sont pressées manuellement en absence totale d'oxygène pour former 0,5 L de moût, qui après homogénéisation, est échantillonné (125 mL). Ces échantillons sont réalisés en triplicat pour chaque date de récolte et chaque parcelle.
- **Echantillons d'oxydation** (vendanges 2007 et 2008) : Environ 3 kg de baies saines sont pressées manuellement en absence totale d'oxygène pour former 1,5 L de moût, qui est séquentiellement oxydé par la suite (Cf. paragraphe 3.3.3). Trois parcelles ont fait l'objet d'une étude d'oxydation des moûts : HAI (Nantes), Sauv.L (Tours) et TB (Sancerre).

Les échantillons sont traités avec du métabisulfite de sodium (4,5 mg/mL) et de l'acide benzène sulfonique (1 mg/mL) puis stockés à -20°C avant analyse. Le protocole de stabilisation des échantillons est identique pour toutes les études réalisées et présentées dans ce mémoire.

### 3.2.2.2. Echelle pilote

---

Les moûts de Melon B. ont été obtenus à l'échelle pilote par pressurage pneumatique à froid (10°C) en utilisant 90 kg de vendange (parcelle HAI) préalablement éraflée. Le moût obtenu (60 L) est clarifié au moyen d'enzymes pectolytiques (Lafazym CL, 1 g/hL) puis débourbé au bout de 48 h. Après stabulation liquide à froid durant 5 jours (5°C), le moût estensemencé avec la levure Vitilevure KD (20 g/hL). Les conditions de vinification sont décrites au paragraphe 3.2.3.

Les moûts de Sauvignon Blanc provenant de Sancerre ont été élaborés à partir de 50 kg de vendange (parcelle TB) au moyen d'un petit pressoir à vis vertical dont la cage possède un volume de 80 L. Le moût (30 L) a été sulfité à raison de 7 g/hL puis débourbé après 24 h à température ambiante par décantation sans ajout d'enzymes pectolytiques. Les mini-vinifications sont réalisées à partir de jus clair (10 L) dans des bonbonnes en verre après ensemencement des moûts avec la levure IOC 18-2007. Les conditions de vinification sont décrites au paragraphe 3.2.3.

Les moûts de Sauvignon Blanc provenant de Tours ont été obtenus à partir de 43 kg de raisins (parcelles Sauv.L et Sauv.M) par pressurage pneumatique. Le moût (23 L) a été sulfité à hauteur de 5 g/hL au cours du pressurage puis débourbé durant 1 nuit à 5°C sans ajout d'enzymes pectolytiques. Le moût estensemencé avec la levure Vitilevure KD (15 g/hL). Les conditions de vinification sont décrites au paragraphe 3.2.3.

### 3.2.2.3. Echelle industrielle

---

Au sein de la Sicarex du Pays nantais, dans le cadre d'essais industriels, deux types de pressurage (traditionnel et inerté) sont menés en parallèle sur deux pressoirs pneumatiques de marque Bucher Vaslin d'une capacité de 22 hL (RPF22 : pressurage traditionnel, Xplus22 Inertys : pressurage inerté par de l'azote). Dans la suite du manuscrit, l'extraction des jus de presse sous gaz inerte correspondra à des conditions d'élaboration de moût sous azote. Sept modalités ont été réalisées pour les vendanges 2009, dont six correspondent à du Melon B. et une correspond à du Sauvignon Blanc « essai 5 » (Tableau 26). Les programmes de pressurage sont similaires pour les deux pressoirs mais adaptés au type de vendange (Tableau 5, Tableau 6).

Tableau 5 : Programme de pressurage pour de la vendange mécanique

Séquences	Pression (mbar)	RPF22			Xplus 22 INERTYS		
		Durée (min)	Rotation	Répétition	Durée	Rotation	Répétition
1	0,15	10	0	0	2	0	0
2	0,2	5	0	0	5	0	0
3	0,3	4	0	0	4	0	0
4	0,45	4	1	1	4	1	1
5	0,3	5	0	0	5	0	0
6	0,5	4	0	0	4	0	0
7	0,6	4	1	1	4	1	1
8	0,5	4	0	0	4	0	0
9	0,7	4	0	0	4	0	0
10	0,9	4	1	0	4	1	0
11	0,8	4	0	0	4	0	0
12	1,0	4	0	0	4	0	0
13	1,2	3	1	0	3	1	0
14	1,1	3	0	0	3	0	0
15	1,3	3	0	0	3	0	0
16	1,5	3	2	0	3	2	0
17	1,4	3	0	0	3	0	0
18	1,6	3	0	0	3	0	0
19	1,8	3	0	0	3	0	0
20	2,0	3	3	1	3	3	1

Tableau 6 : Programme de pressurage pour de la vendange manuelle

Séquences	Pression (mbar)	RPF22			Xplus 22 INERTYS		
		Durée (min)	Rotation	Répétition	Durée	Rotation	Répétition
1	0,16	10	0	0	2	0	0
2	0,2	3	0	0	3	0	0
3	0,4	3	0	0	3	0	0
4	0,6	3	0	0	3	0	0
5	0,8	3	0	0	3	0	0
6	1,0	3	1	2	3	1	2
7	0,4	3	0	0	3	0	0
8	0,6	3	0	0	3	0	0
9	0,8	3	0	0	3	0	0
10	1,0	3	0	0	3	0	0
11	1,2	3	0	0	3	0	0
12	1,4	3	2	1	3	2	1
13	0,8	3	0	0	3	0	0
14	1,0	3	0	0	3	0	0
15	1,2	3	0	0	3	0	0
16	1,4	3	0	0	3	0	0
17	1,7	3	3	1	3	3	1

Dans le cas de vendange manuelle, le chargement des pressoirs s'effectue par gravité tandis qu'il s'opère au moyen d'une pompe à vendange pour de la vendange mécanique après passage dans

l'érafloir Bucher Delta E2. Les jus de bennes, d'un volume proche de 1 hL, sont éliminés. Ensuite, le remplissage est fractionné et alterné entre les deux pressoirs. A partir de l'essai 4, la cuve et la maie du pressoir Inertys sont inertées. Le circuit de transfert du moût de la maie à la cuve de réception des jus est inerté au CO<sub>2</sub>. Le pompage des jus des maies est fractionné en simultané entre les deux pressoirs : de manière automatique sur Xplus22, commandé manuellement sur RPF22 pour reproduire les pompages du précédent. Le sulfitage du moût s'effectue de manière fractionnée, à la maie pour le RPF22, à la cuve de réception pour Xplus22 : 5 g/hL à l'exception de l'essai 6 à 6 g/hL. Les fins de presses sont séparées lorsqu'on observe une augmentation de la conductivité proche de 20 %. Les prises d'échantillon sont réalisées sur cuve en fin de pressurage et après débouillage. Les échantillons sont immédiatement traités avec du métabisulfite de sodium (4,5 mg/mL) et de l'acide benzène sulfonique (1 mg/mL), puis stockés à -20°C avant analyse.

### 3.2.3. Vinifications

De la même façon que les moûts ont été élaborés à différentes échelles, les vinifications sont conduites selon trois protocoles distincts :

- **Micro-vinifications** : Les conditions de fermentation sont détaillées dans l'article (1) (paragraphe 2.1.3 : « *fermentations conditions* »).

1 L de moût obtenu à partir d'essais à l'échelle pilote estensemencé par la souche de levure VIN13 (10 g/hL) et la température de fermentation est maintenue à 20°C. L'avancement des fermentations est suivi par mesure de la perte de poids due au dégagement de CO<sub>2</sub>. En fin d'activité fermentaire, les vins sont centrifugés (3000 rpm, 15 min, 4°C) puis stockés à 4°C avant analyse.

- **Mini-vinifications** : Les conditions de fermentation sont détaillées dans l'article (3) (paragraphe « *fermentation experiments* » dans la section « *material and methods* »).

Les mini-vinifications ont été conduites sur des moûts débouillés de Melon B. (Nantes, 50 L) et de Sauvignon Blanc (Tours et Sancerre, 10 L) initialement enrichis en glutathion (50 et 100 mg/L respectivement) et/ou (*E*)-2-hexènal (1 mg/L) puisensemencés par diverses souches de levures (Vitilevure KD ou IOC 18-2007) à différentes teneurs (20 ou 15 g/hL) entre 18-20°C. L'avancement des fermentations est suivi par mesure quotidienne de la densité. La fermentation est considérée comme achevée lorsque la quantité de sucres résiduels est inférieure à 2 g/L.

Nantes : En fin d'activité fermentaire (sucres résiduels inférieurs à 2 g/L), les vins sont refroidis à 10°C puis soutirés 7 jours plus tard et sulfités (6 g/hL). Un élevage sur lies fines est conduit durant 3 mois à 12°C. Après stabilisation (collage avec gel de silice et gélatine), les vins sont filtrés successivement sur membranes de 5, 2 et 0,65 µm puis mis en bouteilles (conditionnement en ligne sous inertage, bouchage synthétique Nomacorc Classic).

Sancerre : En fin de fermentation, les vins sont sulfités (7 g/hL) puis soutirés sous gaz inerte. Un élevage sur lies fines est conduit durant 9-11 semaines selon les essais (8-10°C). Après traitement au froid (7 jours à -5°C), les vins sont mis en bouteilles (bouchage synthétique Nomacorc Classic) en ayant préalablement ajusté les teneurs en CO<sub>2</sub> (1000 mg/L) et SO<sub>2</sub> libre (35 mg/L). Les vins sont conservés entre 8 et 10°C avant analyses.

Tours : Lorsque la fermentation est achevée, les vins sont sulfités à 4 g/hL, soutirés puis élevés durant 7 mois à 12°C pour l'ensemble des modalités (ajustement des teneurs en SO<sub>2</sub> au cours de l'élevage). Après filtration sur cartouche (2 µm et 0,65 µm), les vins sont mis en bouteilles (bouchage liège naturel).

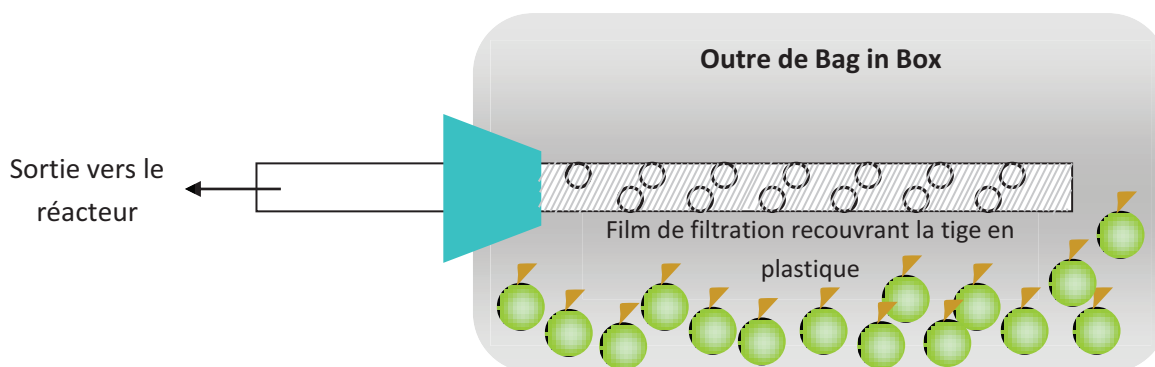
- **Vinifications** : Les vinifications à l'échelle industrielle ont toutes été conduites dans les mêmes conditions à la cave expérimentale de la Sicarex du Pays nantais. Les moûts obtenus en fin de pressurage sont clarifiés à 12°C en présence d'enzymes pectolytiques (1 g/hL, Lafazym CL). Après débourbage, les moûts sontensemencés par la souche de levure VIN13 (LSA, 15 g/hL) et la température de fermentation est maintenue entre 17 et 18°C. Oxygène (4 mg/L au total) et activateurs de fermentation tels que les sels ammoniacaux (sulfate ou phosphate d'ammonium qsp 200 mg/L au total en azote assimilable) sont ajoutés après une perte de densité de 40 à 50 points, c'est-à-dire au milieu de la fermentation. L'avancement des fermentations est suivi par mesure des sucres fermentescibles (densimétrie). En fin d'activité fermentaire (sucres résiduels inférieurs à 2 g/L), les vins sont refroidis à 10°C puis soutirés 7 jours plus tard et sulfités (6 g/hL). Un élevage sur lies fines est conduit durant 3 mois à 12°C. Après stabilisation (collage avec gel de silice et gélatine), les vins sont filtrés successivement sur membranes de 5, 2 et 0,65 µm puis mis en bouteilles (conditionnement en ligne sous inertage, bouchage synthétique Nomacorc Classic).

### 3.3. Modélisation des phénomènes d'oxydation

Le détail des conditions expérimentales est consigné dans l'article (3) (paragraphe « *Elaboration of grapes juices at laboratory scale* » et « *Addition of oxygen, glutathione and hexenal in grape juices* » dans la section « *material and methods* »). Un résumé concis en est néanmoins rapporté dans les paragraphes suivants.

#### 3.3.1. Pressurage sous vide

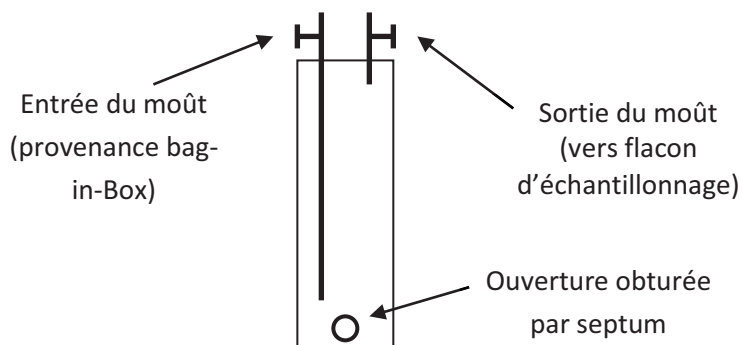
L'élaboration des moûts à l'échelle laboratoire est basée sur un pressurage manuel des baies de Melon B. et de Sauvignon Blanc. Des baies saines et entières sont introduites dans une outre de bag-in-box directement connectée à un système de pompe à vide (Figure 9). L'écoulement et l'échantillonnage des jus se font en absence totale d'oxygène. Les échantillons destinés à la caractérisation des moûts en composition et ceux destinés au suivi de l'oxydation sont générés à partir de 1,5 kg et 3 kg de baies saines et entières respectivement, qui après pressurage fournissent environ 0,5 L et 1,5 L de jus respectivement.



**Figure 9 : Schéma du système de pressurage sous vide et manuel des baies**

### 3.3.2. Réacteur de caractérisation des moûts en composition

Le terme « réacteur » est improprement utilisé pour l'élaboration des moûts de caractérisation puisqu'aucune réaction chimique et/ou enzymatique ne se produit en son sein, en absence d'oxygène. Néanmoins, il sera utilisé dans la suite du manuscrit. En pratique, le réacteur, d'un volume de 0,5 L, est connecté en série au système de pressurage et à un flacon d'échantillonnage *via* une pompe à vide (Figure 10). Après passage dans le réacteur pour homogénéisation, le moût est échantillonné par soutirage sous vide dans un flacon contenant du métabisulfite de sodium (4,5 mg/mL) et de l'acide benzène sulfinique (1 mg/mL) puis stocké à -20°C.



**Figure 10 : Réacteur dédié aux caractérisations des moûts en composition**



### 3.3.3. Réacteur d'oxydation

Deux types de réacteurs d'oxydation ont été utilisés lors des vendanges 2007 et 2008.

La première génération est constituée d'un réacteur d'une capacité de 1,5 L, qui est maintenu sous vide durant la phase de pressurage. Lorsque les jus sont collectés, le réacteur est remis à pression atmosphérique par addition de gaz inerte (azote). L'oxydation est réalisée par additions successives de volumes connus d'oxygène à la base du réacteur. La dissolution et la consommation de l'oxygène par le moût sont suivies à l'aide d'une sonde de Clark (Oxi 197, WTW).

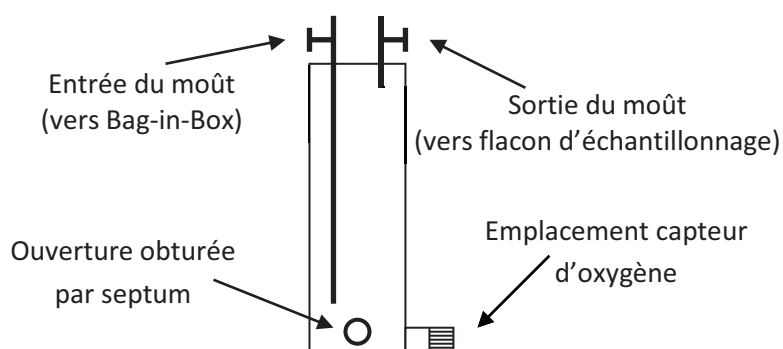


Figure 11 : 1<sup>ère</sup> génération de réacteur dédiée aux oxydations des moûts de laboratoire

La seconde génération est basée sur deux réacteurs placés en série, l'un de 1,5 L et l'autre de 0,5 L, le premier servant de réserve de moût et l'oxydation se produisant dans le second de plus faible volume (Figure 12). La dissolution et la consommation d'oxygène par le moût sont suivies par chemiluminescence, au moyen du système Presens (Appareil de mesure Fibox 3 utilisé avec des spots de type PSt6).

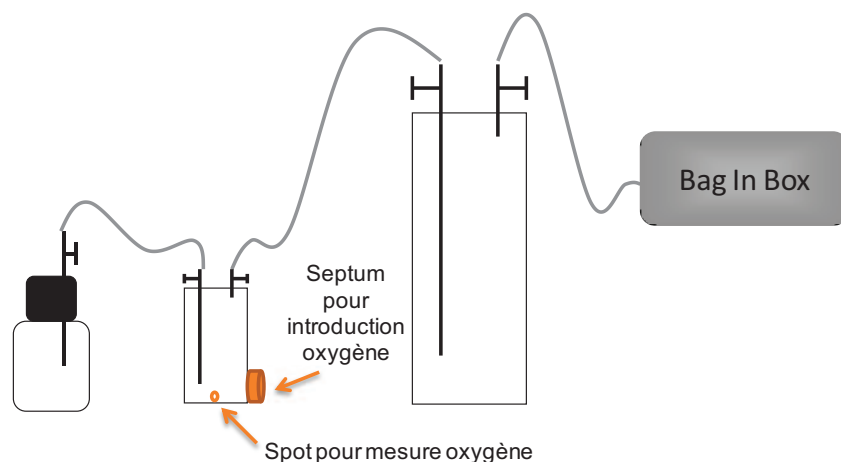


Figure 12 : 2<sup>nde</sup> génération de réacteur dédiée aux oxydations des moûts de laboratoire

Quel que soit le type de réacteur utilisé, le moût est soutiré sous vide dans un flacon d'échantillonnage contenant du métabisulfite de sodium (4,5 mg/mL) et de l'acide benzène sulfinique (1 mg/mL) puis stocké à -20°C.

### 3.4. Synthèses chimiques

Les synthèses chimiques des précurseurs glutathionylés (G3MH/G3MH d<sub>2</sub> et G4MMP d<sub>10</sub>) sont décrites dans les articles suivants :

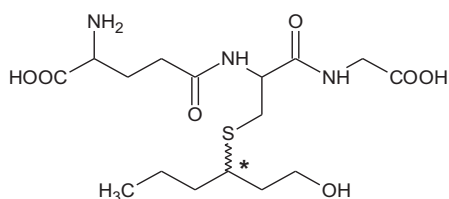
- G3MH/G3MH d<sub>2</sub> : articles (1) et (5)
- G4MMP d<sub>10</sub> : article (5)

Un rappel concis des conditions opératoires est donné dans les paragraphes suivants.

#### 3.4.1. Synthèses des précurseurs de thiols

Les synthèses de précurseurs de thiols sont toutes basées sur l'addition nucléophile de type Michaël du glutathion ou de la cystéine sur des électrophiles conjugués : (*E*)-2-hexenal et oxyde de mésityle.

##### 3.4.1.1. Synthèses du S-3-(hexan-1-ol)-glutathion et de son analogue deutéré

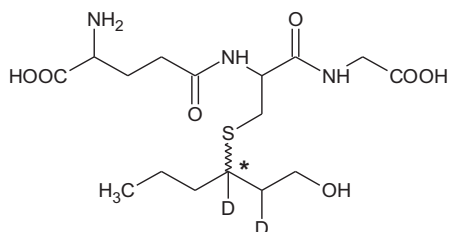


##### G3MH

C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S

407 g/mol

Solide blanc



##### G3MH d<sub>2</sub>

C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>D<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S

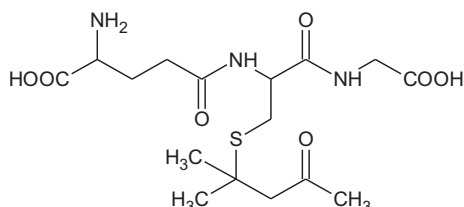
409 g/mol

Solide blanc

Le S-3-(hexan-1-ol)-glutathion (G3MH) et son analogue deutéré (G3MH d<sub>2</sub>) ont tout d'abord été obtenus par une stratégie de synthèse multi-étapes (7 étapes) utilisant des groupements protecteurs acido-labiles (Cf. article (1)). En pratique, la fonction thiol de la cystéine et la fonction amine de l'acide glutamique sont tout d'abord protégées par un thioester (utilisation du chlorure de palmitoyle) et un uréthane (insertion d'un groupement Boc) respectivement. Les acides carboxyliques sont ensuite estérifiés par du diméthylformamide dinéopentylacétal en mélange avec du *t*-butanol et de façon concomitante, la liaison thioester sur le résidu cystéine est clivée. L'addition conjuguée sur du (*E*)-2-hexenal (naturel ou deutéré) suivie d'une réduction de la fonction aldéhyde en alcool puis déprotection au TFA des groupements protecteurs, conduisent aux produits désirés. Le rendement global de la réaction est inférieur à 1 %, l'étape d'estérification étant limitante. Le produit final est obtenu en mélange avec le glutathion.

Dans un second temps, ces mêmes composés ont été obtenus par synthèse directe *via* l'addition de Michaël du glutathion sur le (*E*)-2-hexénal ou sur le (*E/Z*)-2-hexénal d<sub>2</sub> dans des conditions de pH, température et durée spécifiques (rendement = 11 %) (Cf. article (5)).

### 3.4.1.2. Synthèses de la *S*-4-(4-méthylpentan-2-one)-glutathion et de son analogue deutéré

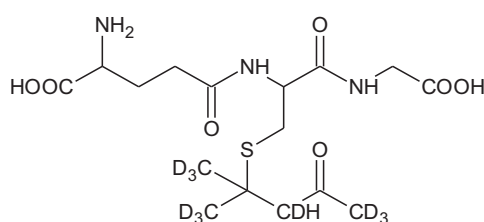


#### G4MMP

C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S

405 g/mol

Solide blanc



#### G4MMP d<sub>10</sub>

C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>D<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S

415 g/mol

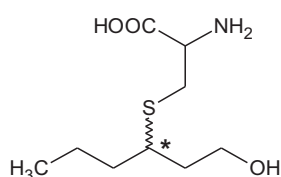
Solide blanc

La *S*-4-(4-méthylpentan-2-one)-glutathion (G4MMP) est synthétisée selon le protocole de Fedrizzi *et al.* (168) modifié comme suit :

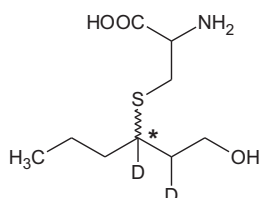
A une solution de glutathion (564 mg, 1,8 mmol) dans l'eau (4 mL) sont successivement additionnés de la pyridine (1 mL, 12,4 mmol, 6,8 eq) et de l'oxyde de mésityle (200 µL, 1,6 mmol, 0,9 eq). La réaction est laissée à température ambiante (3 j) et sous agitation. En fin de réaction, de l'eau (10 mL) est additionnée au milieu réactionnel puis la phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (3x10 mL). La phase aqueuse est ensuite concentrée à sec, puis reprise dans un mélange eau/EtOH (3 mL/40 mL). Un précipité blanc correspondant à la G4MMP se forme après refroidissement ; il est filtré et séché (229 mg, 31 %). **LC-MS** : [M+H]<sup>+</sup> = 406,2 Da, t<sub>R</sub>=0,75 min, **<sup>1</sup>H RMN** (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) : (δ : ppm) 1,40 (2 CH<sub>3</sub>, 6H, s); 2,16 (CH<sub>2</sub>βGlu, 2H, m); 2,24 (CH<sub>3</sub>, 3H, s); 2,52 (CH<sub>2</sub>γGlu, 2H, m); 2,84 (CH<sub>2</sub>, 2H, s); 2,95 et 3,10 (CH<sub>2</sub>βCys, 2H, m), 3,77 (CH<sub>α</sub>Glu, 1H, m), 3,90 (CH<sub>2</sub>Gly, 2H, s), 4,58 (CHCys, 1H,m).

L'analogue deutéré de la *S*-4-(4-méthylpentan-2-one)-glutathion (G4MMP d<sub>10</sub>) est synthétisé selon une stratégie similaire d'addition de Michaël du glutathion sur de l'oxyde de mésityle d<sub>10</sub>, dans des conditions de pH, durée et température spécifiques (84 %) (Cf. article (5)).

### 3.4.1.3. Synthèses du S-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine et de son analogue deutéré



**Cys3MH**  
 $C_9H_{19}NO_3S$   
221 g/mol  
Solide blanc



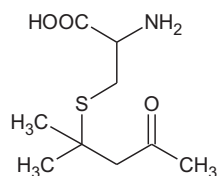
**Cys3MH d<sub>2</sub>**  
 $C_9H_{17}D_2NO_3S$   
223 g/mol  
Solide blanc

Le S-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine et son analogue deutéré (Cys3MH/Cys3MH d<sub>2</sub>) sont synthétisés selon le protocole de Dagan (169) modifié comme suit :

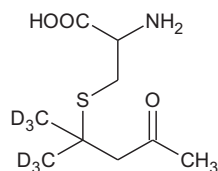
A une solution de Boc-Cys-OH (495 mg, 2,2 mmol) dans du dioxane (10 mL) sont successivement additionnés de la triéthylamine (655  $\mu$ L, 4,7 mmol, 2,1 eq) et du (*E*)-2-hexène en trois portions ( $t_0$  : 655  $\mu$ L, 4,7 mmol, 2,1 eq ;  $t_{12h}$  : 400  $\mu$ L, 3,5 mmol, 1,5 eq ;  $t_{24h}$  : 200  $\mu$ L, 1,8 mmol, 0,8 eq). La réaction est maintenue à température ambiante, sous agitation et atmosphère inerte durant 36 h. En fin de réaction, le milieu réactionnel est concentré à sec. Le résidu est lavé au pentane (3x5 mL) puis repris dans un tampon phosphate ( $NaH_2PO_4/Na_2HPO_4$ ; pH = 8 ; 12 mL) auquel est additionnée une solution de  $NaBH_4$  (287 mg, 7 mmol, 3 eq molaire) dans l'eau (4 mL). La réaction est maintenue à température ambiante durant 3 h. En fin de réaction, le milieu réactionnel est acidifié (pH = 6-7) en utilisant une solution d'acide acétique dans l'eau à 25 %. La phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (3x25 mL) puis les phases organiques sont séchées ( $Na_2SO_4$  anhydre) et concentrées à sec. Le résidu huileux est repris dans un mélange TFA/TES (1,8 mL/0,2 mL) pendant 20 min à température ambiante puis concentré à sec sous flux d'azote et lavé à l'éther diéthylique (3x5 mL). Une poudre blanche correspondant au Cys3MH est obtenue (83 mg, 17 %). **LC-MS** :  $[M+H]^+ = 222,3$  Da,  $t_R = 0,71$  min. **<sup>1</sup>H RMN** ( $D_2O$ , 500 MHz) : ( $\delta$  : ppm) 0,90 ( $CH_3$ , 3H, t); 1,42 ( $CH_2$ , 2H, m); 1,60 ( $CH_2$ , 2H, m); 1,75 et 1,88 ( $CH_2$ , 2H, m); 2,9 (CH, 1H, m); 3,14 et 3,18 ( $CH_2\beta$ Cys, 2H, m), 3,72 ( $CH_2$ , 2H, m), 4,3 ( $CH\alpha$ Cys, 1H, m).

L'analogue deutéré du S-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine (Cys3MH d<sub>2</sub>) est obtenu selon le même protocole en utilisant du (*Z/E*)-2-hexène d<sub>2</sub> (41 mg, 8 %). **LC-MS** :  $[M+H]^+ = 224,2$  Da,  $t_R = 0,71$  min. Le spectre <sup>1</sup>H RMN du Cys3MH d<sub>2</sub> est similaire en tout point à celui du Cys3MH, excepté pour les signaux des deutériums.

### 3.4.1.4. Synthèses de la *S*-4-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine et de son analogue deutéré



**Cys4MMP**  
 $C_9H_{17}NO_3S$   
219 g/mol  
Solide Blanc



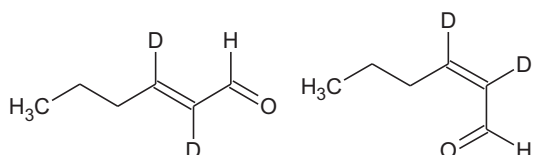
**Cys4MMP d<sub>6</sub>**  
 $C_9H_{11}D_6NO_3S$   
225 g/mol  
Solide Blanc

La *S*-4-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine et son analogue deutéré (Cys4MMP/Cys4MMP d<sub>6</sub>) sont synthétisés selon le protocole de Dagan (169) modifié comme suit :

A une solution de Boc-Cys-OH (1,04 g, 4,7 mmol) dans l'eau (30 mL) sont additionnés du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (383 mg, 3,6 mmol, 0,8 eq) puis de l'oxyde de mésityle (2 mL, 17,5 mmol, 3,7 eq). La réaction est maintenue à température ambiante durant 24 h. En fin de réaction, le milieu réactionnel est lavé à l'éther diéthylique (3x20 mL) puis acidifié (pH = 5) avec une solution d'acide acétique dans l'eau à 25 %. La phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (3x50 mL), puis les phases organiques sont séchées (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et concentrées à sec. Le résidu huileux est repris dans un mélange TFA/TES (1,8 mL/0,2 mL) pendant 20 min à température ambiante puis concentré à sec sous flux d'azote et lavé à l'éther diéthylique (3x5 mL). Une huile transparente correspondant à la Cys4MMP est obtenue (191 mg, 35 %). **LC-MS** : [M+H]<sup>+</sup> = 220,2 Da, t<sub>R</sub> = 0,55 min. **<sup>1</sup>H RMN** (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) : (δ : ppm) 1,42 (2 CH<sub>3</sub>, 6H, s); 2,25 (CH<sub>3</sub>, 3H, s); 2,88 (CH<sub>2</sub>, 2H, m); 3,14 et 3,22 (CH<sub>2</sub>βCys, 2H, m); 4,05 (CHαCys, 1H, m).

L'analogue deutéré de la *S*-4-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine (Cys4MMP d<sub>6</sub>) est obtenu selon le même protocole en utilisant de l'oxyde de mésityle d<sub>10</sub> (339 mg, 69 %). **LC-MS** : [M+H]<sup>+</sup> = 226,4 Da, t<sub>R</sub> = 0,55 min. Le spectre <sup>1</sup>H RMN de la Cys4MMP d<sub>6</sub> est similaire en tout point à celui de la Cys4MMP, excepté pour les signaux des deutériums.

### 3.4.2. Synthèse du (*E/Z*)-2-hexène d<sub>2</sub>



**(*Z/E*)-2-hexène d<sub>2</sub>**  
 $C_6H_8D_2O$   
100 g/mol  
Huile jaune

La synthèse du (*E/Z*)-2-hexène d<sub>2</sub> est intégralement décrite dans l'article (1). L'obtention de ce composé est basée sur la deutération de l'hexyn-1-ol en (*Z*)-hexèn-2-ol d<sub>2</sub> (100 %) en présence de palladium de Lindlar qui, après oxydation ménagée au dioxyde de manganèse, fournit un mélange d'isomères *E* et *Z* du 2-hexène d<sub>2</sub> (93 %).

## 3.5. Analyses chimiques

### 3.5.1. Esters hydroxycinnamoyltartriques et Grape Reaction Product

Les esters hydroxycinnamoyltartriques et le GRP sont quantifiés par HPLC-DAD en utilisant un étalonnage externe. Les étalons analytiques sont soit générés enzymatiquement (GRP), soit extraits du raisin (acide *trans*-caftarique) selon la méthode de Cheynier *et al.* (150). La détection est réalisée à 320 nm. (Cf. article (3), paragraphe “*Analysis of trans-Caftaric Acid and Grape Reaction Product*” dans la section “*Material and Methods*”).

### 3.5.2. Glutathion

Le glutathion présent dans les moûts est analysé sous sa forme réduite au moyen d'un analyseur d'acides aminés dont le principe est basé sur une séparation par chromatographie ionique des analytes, puis une dérivatisation « *post-column* » à la ninhydrine (formation du pourpre de Ruhemann) et détection à 570 nm par un détecteur UV-visible. La quantification s'effectue par étalonnage externe. (Cf. article (3), paragraphe “*Analysis of Glutathione by Amino Acid Analyzer*” dans la section “*Material and Methods*”).

### 3.5.3. Composés en C6

Les composés en C6 tels que le (*E*)-2-hexenal et le (*E*)-2-hexenol, sont quantifiés dans les échantillons de moût par dilution isotopique puis analysés en SPME-GC-MS (fibre SPME Carboxen/PDMS, Varian). L'ionisation et la détection s'effectuent en impact électronique et mode SIM respectivement. (Cf. article (3), paragraphe “*Analysis of (E)-2-Hexenal and (E)-2-Hexenol by GC-MS*” dans la section “*Material and Methods*”).

### 3.5.4. Précurseurs de thiols

Les précurseurs glutathionylés et cystéinylés sont quantifiés dans les échantillons de moûts par dilution isotopique, puis analysés en NanoLC-MS/MS. L'ionisation et la détection des analytes sont réalisées par electrospray positif et mode SRM respectivement. (Cf. article (2), paragraphe “*NanoLC-MS/MS analyses*” dans la section “*Material and Methods*”).

### 3.5.5. Thiols

Les thiols variétaux sont analysés selon la méthode de Rodriguez-Bencomo *et al.* (170) modifiée comme suit :

Dans chaque échantillon de vin (100 mL) sont successivement introduits les étalons internes deutérés (3MH d<sub>2</sub> à 500 ng/L, 3MHA d<sub>5</sub> à 50 ng/L et 4MMP d<sub>10</sub> à 20 ng/L), de l'acide éthylène-diamine-tétra acétique (EDTA : 250 mg), de la cystéine (158 mg) et de l'*o*-méthylhydroxylamine (100 mg). Les flacons sont ensuite purgés à l'azote, puis chauffés à 50°C durant 45 min. Après refroidissement, le pH est ajusté à 7,0 (solution de NaOH concentrée) puis les échantillons sont purifiés sur cartouches C18 (500 mg Bond Elut-ENV, Varian) préalablement conditionnées avec du dichlorométhane (5 mL), du méthanol (5 mL) et enfin de l'eau (5 mL). Après percolation des vins, différentes solutions sont successivement percolées : tampon phosphate (20 mL, 0,2 M en solution méthanolique à 40 % en volume), eau distillée (5 mL), solution de 1,8-diazabicyclo-[5,4,0]-undec-7-ène (DBU, 5 mL, 6,7 % en

poids dans l'eau), solution de bromure de 2,3,4,5,6-pentafluorobenzyle (PFBBBr, 1 mL, 200 mg/L dans l'hexane, 20 min), solution de mercaptoglycérol (1 mL, 400 mg/L dans la solution de DBU, 20 min), tampon phosphate (20 mL), eau distillée (5 mL). Les thiols dérivatisés sont finalement élués par un mélange hexane/éther diéthylique (4 mL, 1/3 en volume). Les éluats sont lavés cinq fois avec une solution de NaCl (1 mL, 200 g/L), séchés sur sulfate de sodium anhydre, puis concentrés à sec sous flux d'azote.

Les échantillons sont analysés par SPME (Divinylbenzène/Carboxen/Polydiméthylsiloxane, Supelco), la fibre étant préalablement conditionnée à 270°C durant 25 min sous un flux d'azote. Les analytes sont adsorbés à 110°C durant 30 min puis désorbés dans l'injecteur du chromatographe couplé à un spectromètre de masse, à 250°C pendant 10 min (injection en mode splitless). La séparation des analytes s'effectue sur une colonne capillaire Optima-Wax (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Macherey Nagel). La programmation de température du four débute à 80°C (10 min) puis est augmentée à 220°C à raison de 5°C/min, augmentée à 245°C à 15°C/min durant 15 min. L'hélium est utilisé en tant que gaz vecteur avec un débit constant de 1,2 mL/min. La détection est réalisée en ionisation chimique négative (méthane) et mode SIM.

## 4. RESULTATS ET DISCUSSION



## **4.1. CHAPITRE 1 : DEVELOPPEMENT DE METHODOLOGIES ANALYTIQUES**

Le premier axe de travail de la thèse concerne le développement de méthodologies analytiques pour quantifier les marqueurs d'oxydation et le potentiel aromatique de type thiol des raisins de Melon B. et de Sauvignon Blanc. Les molécules ciblées sont de natures chimiques très différentes, impliquant une diversité de techniques analytiques utilisées telles que la GC-MS ou la LC-MS/MS.

#### 4.1.1. Analyse des marqueurs d'oxydation

Les marqueurs d'oxydation correspondent à trois classes de familles chimiques :

- les esters hydroxycinnamoyltartriques : Formés de noyaux aromatiques, ils sont facilement détectables en UV-visible et plus précisément à une longueur d'onde de 320 nm (Cf. article (3)).
- le glutathion : Tripeptide présent à fortes concentrations dans les raisins, il peut être analysé par diverses méthodes analytiques telles que l'HPLC, l'électrophorèse capillaire ou encore par kits enzymatiques. Une discussion sur les différentes approches est présentée dans le paragraphe 2.3.2 (Cf. article (3))
- les composés en C6 : Le (*E*)-2-hexène et le (*E*)-2-hexèneol sont des espèces volatiles, aisément analysables en GC-MS (Cf. article (3)).

##### 4.1.1.1. Esters hydroxycinnamoyltartriques et Grape Reaction Product

Les esters hydroxycinnamoyltartriques (acides *trans* et *cis*-caftarique, acides *trans* et *cis*-coutarique, acide *trans*-fertarique) et le GRP ont été quantifiés par HPLC-DAD dans des moûts de Melon B. et Sauvignon Blanc. La quantification de ces molécules, présentes à fortes concentrations, est donc d'autant plus aisée dans la matrice « moût ». La méthodologie utilisée, basée sur un étalonnage externe, s'appuie sur de précédents travaux (154).

##### 4.1.1.2. Glutathion

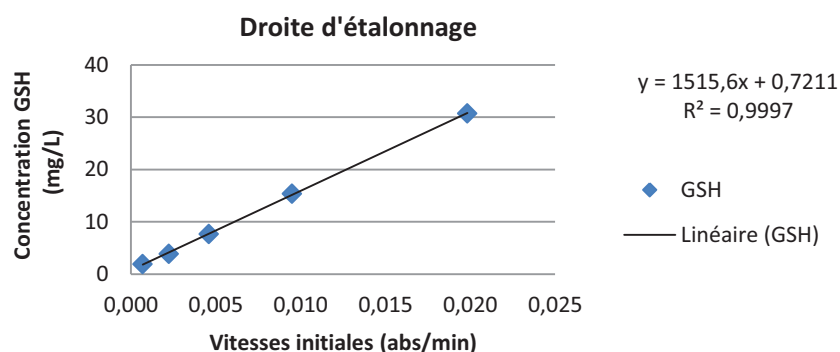
###### 4.1.1.2.1. Analyse enzymatique

Au vu des techniques analytiques présentées auparavant (Cf. 2.3.2 « Techniques analytiques de dosage »), l'analyse du glutathion par dosage enzymatique semble rapide, économique et sensible. Le dosage est basé sur des réactions d'oxydoréduction couplées impliquant d'une part le réactif d'Ellman (DTNB : acide 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)) et d'autre part le couple NADPH/glutathion réductase (Figure 13). L'étape (1) est non sélective et permet d'oxyder toutes les espèces chimiques comportant une fonction thiol en son disulfure correspondant. L'étape (2) confère la spécificité de la méthode puisque seul le glutathion oxydé est substrat de l'enzyme « glutathion réductase ». Le dosage se faisant par recyclage (le NADPH est le seul réactif limitant), la méthode est hautement sensible par amplification du signal. La détection est réalisée en UV à 420 nm par mesure de l'apparition de la couleur jaune due à la libération de TNB (2-nitro-5-thiobenzoate).



Figure 13 : Dosage du glutathion par voie enzymatique

En pratique, la quantification s'opère par étalonnage externe en mesurant l'absorbance de chaque standard en fonction du temps. Ainsi, les vitesses initiales représentées par les pentes de chaque cinétique, permettent d'établir la droite d'étalonnage :  $[GSH] = f(V_i)$  avec  $[GSH]$ , la concentration en glutathion réduit introduit et  $V_i$ , les vitesses initiales. Pour une gamme de concentration comprise entre 2 et 30 mg/L, la linéarité observée est satisfaisante avec une variation analytique inférieure à 1 % lors de mesures réalisées en triplicat (Figure 14).

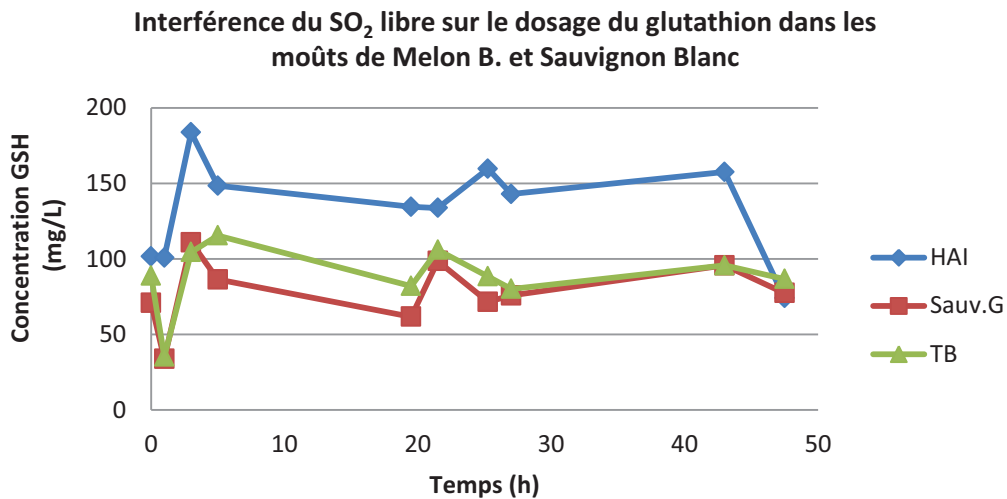


**Figure 14 : Exemple de droite d'étalonnage obtenue pour une gamme de concentration du glutathion entre 2 et 30 mg/L.**

Le sulfitage des moûts et des vins interfère avec le dosage enzymatique par réaction d'oxydoréduction entre le  $SO_2$  libre et le réactif d'Ellman. Pour palier ce problème, diverses techniques d'élimination du  $SO_2$  libre et/ou combiné ont été testées telles que :

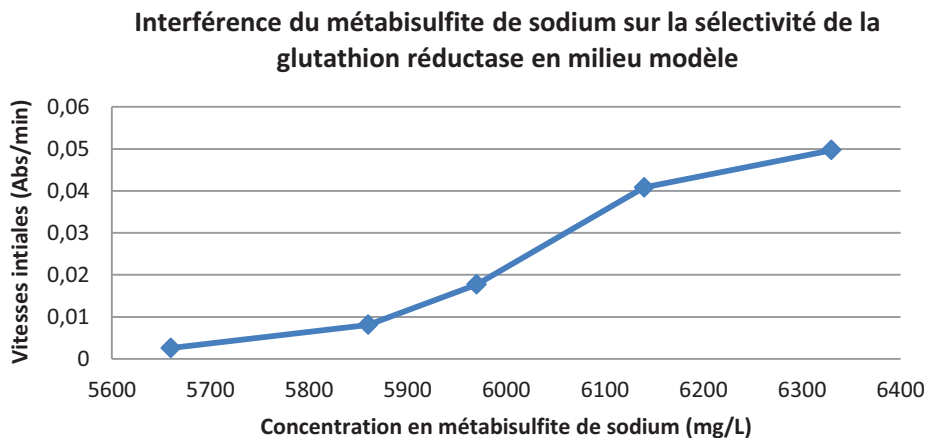
- Combinaison avec l'acétaldéhyde (variation du pH, de la température et de la durée de la réaction, Figure 15)
- Evaporation sous vide poussé des moûts et sous flux d'azote
- Méthode de Franz Paul : Bullage d'azote à température ambiante (élimination  $SO_2$  libre) puis à  $100^\circ C$  (élimination  $SO_2$  libre et combiné).

Quelle que soit la technique utilisée, la suppression du  $SO_2$  est incomplète dans nos échantillons et le dosage du glutathion reste impossible. Cependant, il faut noter que les doses de  $SO_2$  employées pour stabiliser les échantillons sont très fortes. Il est donc fort probable que l'élimination du  $SO_2$  libre dans des moûts sulfités à doses œnologiques (5-7 g/hL) soit suffisante pour envisager un dosage du glutathion par voie enzymatique.



**Figure 15 : Evolution de la concentration en glutathion pour trois échantillons de moût d'origines différentes en fonction de la cinétique de combinaison du SO<sub>2</sub> libre avec l'acétaldéhyde durant 5 jours à 40°C.**

La présence de métabisulfite de sodium dans les moûts semble également avoir une influence sur la sélectivité de l'enzyme glutathion réductase. En effet, des doses croissantes en métabisulfite de sodium dans un moût modèle entraînent une variation considérable des vitesses initiales, même en absence de glutathion (Figure 16). Par conséquent, le dosage du glutathion par voie enzymatique est inapproprié dans nos échantillons et une technique séparative permettant un dessalage des moûts semble être la solution.



**Figure 16 : Evolution des vitesses initiales en fonction de la concentration en métabisulfite de sodium dans un moût synthétique**

#### 4.1.1.2.2. Analyse par analyseur d'acides aminés

Le glutathion, présent à l'état réduit dans les moûts, a été quantifié au moyen d'un analyseur d'acides aminés (Cf. article (3)).

D'un point de vue instrumental, l'analyseur d'acides aminés combine un système de séparation chromatographique (résine cationique) et un réacteur de dérivatisation à la ninhydrine *post-column*. Les acides aminés et peptides sont ainsi séparés en fonction de leur point isoélectrique selon un gradient de pH et une charge ionique prédéfinis. Les composés dérivatisés (formation du pourpre de Ruhemann) sont détectés par UV-Visible à 570 nm dont l'absorbance est directement proportionnelle à la quantité présente selon la loi de Beer-Lambert.

La méthode développée est suffisamment répétable, juste et sensible pour doser le glutathion dans des échantillons de moût de Melon B. et de Sauvignon Blanc (Tableau 7).

**Tableau 7 : Paramètres de validation de la méthode de dosage du glutathion dans des échantillons de moûts par l'analyseur d'acides aminés et détection UV**

Paramètres de validation	Valeurs	Méthodes de calcul
Justesse (%)	99	Triplicat (dopage d'un moût à 4 ; 10 et 20 mg/L ; 1 x 3 niveau)
Répétabilité (RSD %)	7	Triplicat (dopage d'un moût à 38 mg/L ; 3 x 1 niveau)
Limite de détection (mg/L)	1	graphique : S/N = 3
Domaine de linéarité (mg/L)	5 – 120	Lack-Of-Fit test
Effet matrice	Aucun	Ajouts dosés (3 points de dopage)

(S/N : Rapport Signal sur Bruit)

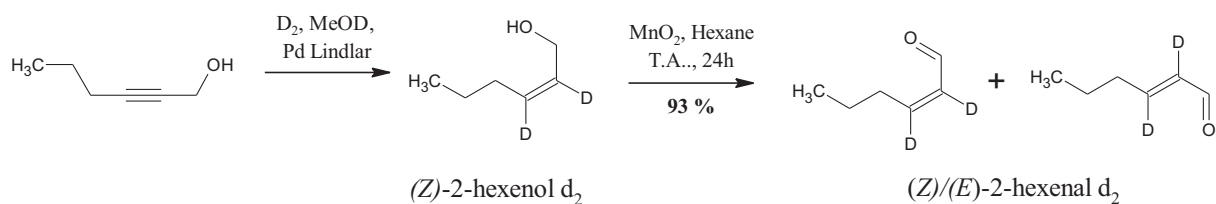
Bien que cette méthodologie soit moins sensible que celles présentées au paragraphe 2.3.2, elle reste adaptée au dosage du glutathion dans les moûts de raisin, où les teneurs minimales observées sont toujours supérieures au mg/L.

#### 4.1.1.3. Composés en C6

##### 4.1.1.3.1. Synthèse des standards analytiques

Les composés en C6 de type 2-hexène et/ou 2-hexèneol sont particulièrement réactifs d'un point de vue chimique et peuvent subir des réactions d'addition de type 1-4 ou 1-2 selon la nature du nucléophile. Pour palier ces problèmes, ces composés sont dosés par dilution isotopique, ce qui suppose la synthèse des étalons marqués correspondants. Seuls les travaux de Schneider *et al.* (171) rapportent la synthèse chimique du 2-hexène  $d_8$  par oxydation de Dess-Martin du butanol  $d_{10}$ , puis réaction de Wittig-Horner sur le butanal  $d_8$  formé (rendement : 11 %). Aucune synthèse du 2-hexèneol marqué n'est rapportée dans la littérature.

Pour simplifier la procédure existante, une stratégie de synthèse alternative pour former du 2-hexenal  $d_2$  a été développée par deutération de l'hexyn-1-ol suivie d'une oxydation ménagée au dioxyde de manganèse du (Z)-2-hexénol  $d_2$  obtenu de façon intermédiaire (Cf. article **(1)**) (Figure 17).



**Figure 17** : Synthèse du (Z)-2-hexénol  $d_2$  et du mélange (Z) et (E) du 2-hexenal  $d_2$  (Cf. article **(1)**)

Cette synthèse permet l'obtention des deux étalons marqués qui ont ensuite été utilisés pour développer une méthode de quantification du (E)-2-hexénol et du (E)-2-hexenal dans les moûts de Melon B. et Sauvignon Blanc par SIDA-SPME-GC-MS (Cf. article **(3)**).

#### 4.1.1.3.2. Performances analytiques

Le dosage des composés en C6 est basé sur de précédents travaux (172) qui utilisent le (E)-2-hexenal  $d_8$  et le (E)-2-hexénol  $d_1$  en tant que standards internes. Comme la synthèse du (E)-2-hexenal  $d_8$  est particulièrement délicate et l'utilisation d'un standard mono-marqué est peu rigoureuse, nous avons développé une autre stratégie analytique par SIDA-SPME-GC-MS.

Après validation, la méthode d'analyse du (E)-2-hexénol et (E)-2-hexenal est suffisamment sensible, répétable et juste pour doser ces espèces dans des matrices complexes telles que les moûts de raisin (Tableau 8) (Cf. article **(3)**).

**Tableau 8** : Paramètres de validation de la méthode de dosage des composés en C6 dans des échantillons de moûts par SIDA-SPME-GC-MS

Paramètres de validation	(E)-2-hexénol	(E)-2-hexenal	Méthodes de calcul
Justesse (%)	94	92	3 répétitions (dopage d'un moût à 80 µg/L ; 3 x 1 niveau x 2 types de moût)
Répétabilité (RSD %)	4	5	5 répétitions (5 x 1 niveau)
Limite de détection (µg/L)	5	5	graphique : S/N=3
Domaine de linéarité (µg/L)	20 – 300	20 – 350	Lack-Of-Fit test
Effet matrice	Aucun	Aucun	Ajouts dosés (4 points de dopage)

#### 4.1.2. Analyse du potentiel aromatique de type thiol

La quantification des précurseurs cystéinylés et glutathionylés du 3MH et de la 4MMP a fait l'objet d'une publication intitulée : « *Validation of a nano liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the identification and the accurate quantification by isotopic dilution of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in white grape juices* » (Cf. Article (2)). Un résumé de la publication est présenté dans les paragraphes suivants.

##### 4.1.2.1. Synthèses chimiques des standards analytiques

La quantification du potentiel aromatique de type thiol par dilution isotopique requiert l'utilisation de standards analytiques marqués par des isotopes stables tels que le deutérium ou le  $^{13}\text{C}$ . Bien souvent pour des raisons de coût, le marquage au deutérium est le plus utilisé.

L'obtention des précurseurs de thiols deutérés, en particulier les précurseurs glutathionylés, a deux finalités dans le contexte de notre étude : utilisation en tant que standards analytiques et utilisation comme traceurs lors d'expérimentations en conditions œnologiques. Pour cette dernière finalité, le marquage de la molécule doit intervenir sur la partie « arôme » de la structure afin que sa métabolisation par la levure libre de probables composés d'arômes marqués, aisément analysables en GC-MS. De plus, pour disposer d'un standard analytique deutéré fiable, il doit induire une différence minimum de 2 unités de masse pour négliger la contribution naturelle du  $^{13}\text{C}$  mesuré par spectrométrie de masse. Enfin, les atomes de deutérium doivent être en position non-échangeables (non-énolisables par exemple) et/ou stables dans les conditions de préparation des échantillons et d'analyse.

La synthèse chimique des précurseurs glutathionylés a donné lieu à deux publications (Cf. articles (1) et (5)) dont seules les parties relatives aux synthèses des analogues marqués seront discutées dans les paragraphes suivants.

##### 4.1.2.1.1. Synthèses des précurseurs cystéinylés

Les précurseurs cystéinylés ont été synthétisés dans leurs formes naturelles et deutérées selon la méthode de Dagan (169). De façon générale, la stratégie de synthèse repose sur l'addition de Michaël de la Boc-L-cystéine sur le (*E*)-2-hexenal ou sur l'oxyde de mésityle puis déprotection au TFA pour obtenir le Cys3MH (Figure 18) et la Cys4MMP (Figure 19) respectivement.

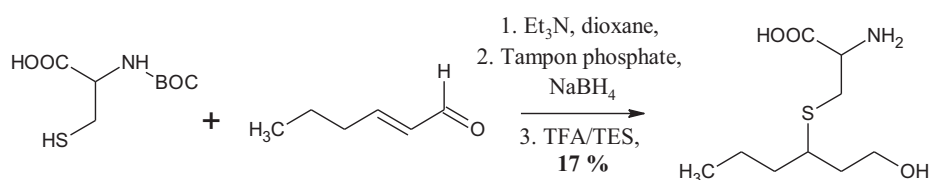
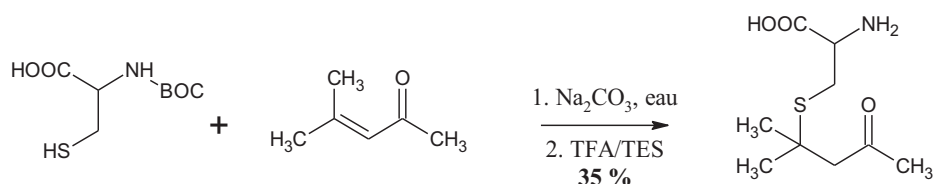


Figure 18 : Synthèse du Cys3MH naturel selon la méthode de Dagan (169)



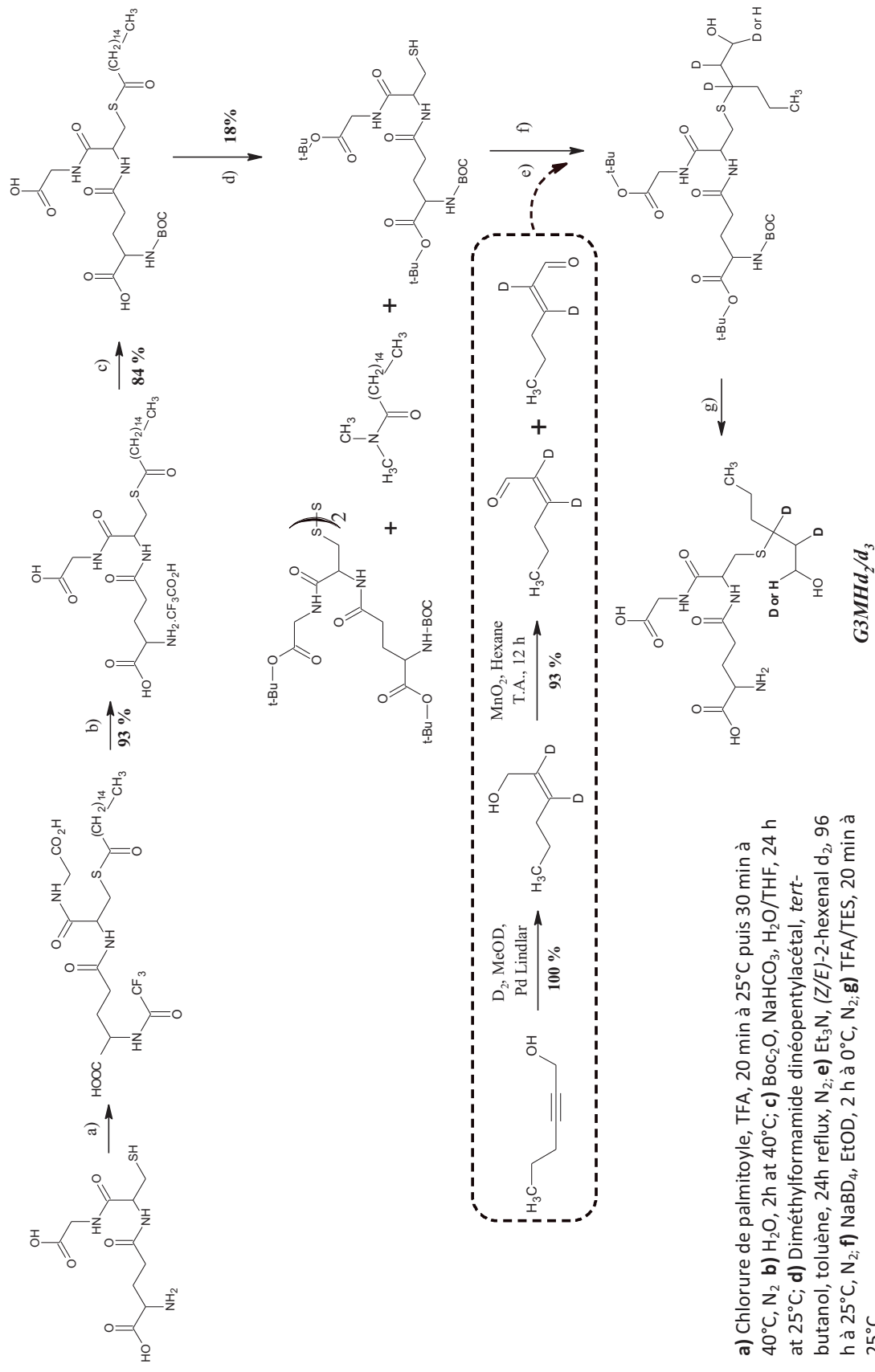
**Figure 19 : Synthèse de la Cys4MMP naturelle selon la méthode de Dagan (169)**

L'obtention des analogues deutérés (Cys3MH  $d_2$  et Cys4MMP  $d_6$ ) nécessite l'utilisation d'hexène  $d_2$ , synthétisé selon la méthode de Roland *et al.* (173) et d'oxyde de mésityle  $d_{10}$ , ce dernier étant disponible commercialement. Les conditions de synthèse et les rendements sont similaires à ceux observés pour les composés naturels.

#### 4.1.2.1.2. Synthèses du G3MH deutéré

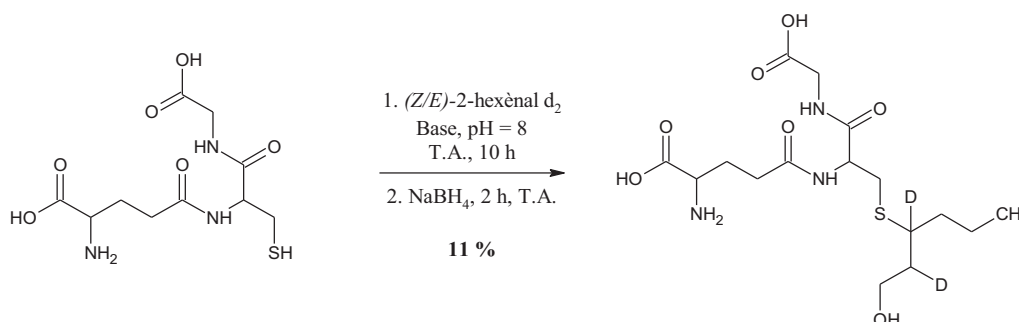
Deux stratégies ont été élaborées pour la synthèse du G3MH deutéré. La première voie de synthèse, qui utilise des groupements protecteurs acido-labiles, se compose de 7 étapes (Figure 20) (Cf. article (1)). Le rendement global de la réaction est faible (étape d limitante) à cause d'étapes délicates de purification à mettre en œuvre. Le produit final est obtenu en mélange avec du glutathion. Aucune purification supplémentaire n'a été effectuée puisque le glutathion est naturellement présent en fortes quantités dans les moûts de raisin. La pureté du G3MH  $d_2/d_3$  obtenu a été estimée par RMN  $^1H$  en utilisant l'acide triméthylsilylpropionique comme standard interne.





**Figure 20** : Synthèse du G3MH d<sub>2</sub>/d<sub>3</sub> selon la méthode de Roland et al. (173)

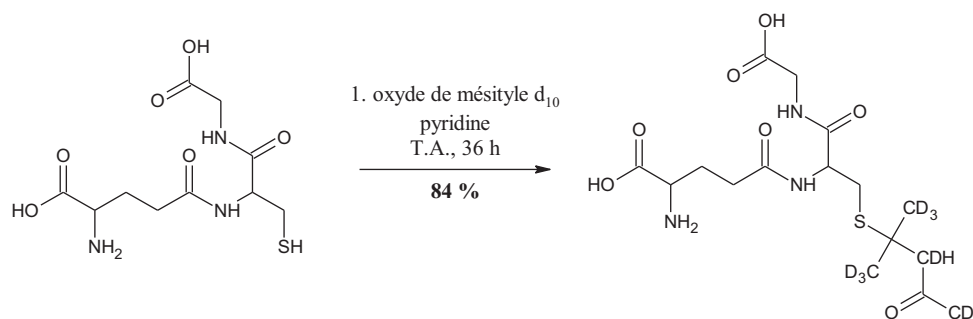
Une seconde voie de synthèse directe du G3MH deutéré a été développée ultérieurement, pour faciliter la mise en œuvre, améliorer le rendement global de la réaction et la pureté du produit. Cette stratégie est basée sur l'addition de Michaël du glutathion sur le (Z/E)-2-hexénal d<sub>2</sub>, obtenu selon la méthode de Roland *et al.* (173), pour former le G3MH d<sub>2</sub> correspondant (Figure 21). Dans des conditions spécifiques de pH (utilisation d'un tampon phosphate, pH = 8,0), de dilution (3x0,33 eq de (Z/E)-2-hexénal d<sub>2</sub>), de température (25°C) et de durée (10 h), le G3MH d<sub>2</sub> pur est obtenu avec 11 % de rendement (174).



**Figure 21 : Synthèse du G3MH d<sub>2</sub> selon la méthode de Roland *et al.* (174)**

#### 4.1.2.1.3. Synthèse de la G4MMP deutérée

La synthèse de la G4MMP deutérée a été adaptée du protocole rapporté par Grant-Preece *et al.* (175). La stratégie est basée sur l'addition de Michaël du glutathion sur l'oxyde de mésityle d<sub>10</sub>, pour obtenir la G4MMP d<sub>10</sub> pur avec un rendement satisfaisant (84 %) (Figure 22).



**Figure 22 : Synthèse de la G4MMP d<sub>10</sub> selon la méthode de Roland *et al.* (174)**

Bien que des deutériums soient en positions énoles, l'isotopomère majoritairement obtenu est la G4MMP d<sub>10</sub>. Dans les conditions de pH des moûts, aucun échange proton/deutérium n'est observé.

Un des buts des synthèses des S-conjugués à la cystéine et au glutathion présentées et discutées ci-dessus, est leur utilisation en tant que standards analytiques, pour la mise au point du dosage de ces composés dans les moûts élaborés au cours de l'étude.

#### 4.1.2.2. Performances analytiques

---

Le dosage du potentiel aromatique de type thiol s'effectue par SIDA-NanoLC-MS/MS et les performances analytiques de la méthode sont regroupées dans le Tableau 9 (Cf. article (2)). La méthode a été validée selon les recommandations de l'International Conference on Harmonization.

Tableau 9 : Performances analytiques de la méthode de quantification des précurseurs de thiols par SIDA-NanoLC-MS/MS (Cf. article (2)).

Composés	G3MH	Cys3MH	G4MIMP	Cys4MIMP	Méthode de calcul
Sélectivité	La détection en mode SRM (Selected Reaction Monitoring) assure la sélectivité de la méthode.				
Justesse (%)	89	108	104	80	3 moûts différents x 1 niveau de dopage (10 et 50 nM pour les précurseurs glutathionylés et cystéinylés respectivement) x 9 réplicats G4MIMP : 3 moûts différents x 3 niveaux de dopage (5 ; 10 et 20 nM) x 3 réplicats
Fidélité (RSD %)	5	6	7	15	idem méthode dédié au calcul de la justesse
Répétabilité (RSD %)	2	2	9	7	1 moût x 3 réplicats (G4MIMP) ou x 6 réplicats (autres précurseurs)
Reproductibilité intermédiaire (RSD %)	4	11	9	17	1 moût x 5 jours consécutifs
LOD (nM)	0,15	1,44	0,02	0,58	S/N = 3
LOQ (nM)	0,50	4,75	0,07	1,91	S/N = 10
Modèle de regression	Quadratique	Quadratique	Linéaire	Linéaire	Lack-Of-Fit test
Gamme d'étalonnage (nM)	0,1-10	1-100	0,1-10	1-100	
Méthode de quantification	SIDA	SIDA	Etalonnage externe	SIDA	
Rendement de récupération (%)	/	/	11 – 20 %	/	3 moûts différents x 3 niveaux de dopage (5 ; 10 et 20 nM) x 3 réplicats Ajouts dosés pour les dosages par SIDA et méthode de Matuszewski <i>et al.</i> pour le G4MIMP (176)
Effet matrice	non	non	non (96 – 107 %)	non	
Concentrations trouvées dans les moûts étudiés (nM)	0,5 – 18,44	4,75 – 270,52	0 – 10,62	1,9 – 28,40	

(LOD : Limite de détection, LOQ : Limite de Quantification, RSD : Relative Standard Deviation, S/N : Rapport signal sur bruit)

### 4.1.3. Conclusions

Le premier axe de travail avait pour objectif le développement analytique de méthodologies dédiées à la quantification des marqueurs d'oxydation et du potentiel aromatique de type thiol. Seule la quantification des esters hydroxycinnamoyltartriques et du GRP repose sur des stratégies existantes et présentées dans la littérature (154). Les autres espèces chimiques (GSH, composés en C6 et précurseurs de thiol) ont nécessité le développement et la validation de méthodologies permettant de quantifier ces composés dans la matrice moût. Les principales performances des techniques sont reprises dans le Tableau 10.

**Tableau 10 : Résumé des performances analytiques pour le dosage du GSH, des composés en C6 et des précurseurs de thiols**

Composés chimiques	GSH	Composés en C <sub>6</sub>	Précurseurs de Thiols
Technique	AAA	SIDA-SPME-GC-MS	SIDA-NanoLC-MS/MS
Justesse (%)	99	92-94	80-108
Répétabilité (RSD %)	7	5	5-15
LOD (S/N=3)	1 mg/L	5 µg/L	8 – 320 ng/L

(AAA : Analyseur Acides-Aminés)

La majorité des techniques analytiques est basée sur la quantification par dilution isotopique. Cette méthodologie implique l'utilisation de standards marqués par des isotopes stables, souvent le deutérium, qui peuvent par la suite être de puissants traceurs lors d'études de filiations en milieu naturel.

**4.2. CHAPITRE 2 : ETUDE DE FILIATIONS A PARTIR  
DE TRACEURS SYNTHETIQUES ET DEUTERES POUR  
LE SAUVIGNON BLANC**

A ce jour, la formation du 3MH dans les vins résulte de diverses voies de biogenèse qui impliquent, soit des précurseurs inodores de type S-conjugués à la cystéine (13) ou au glutathion (14), soit l'hexénal (171) (Figure 23).

La voie du précurseur cystéinylé et celle de l'hexénal ne permettent d'expliquer qu'entre 15 et 17 % de l'origine du 3MH dans les vins. En effet, certains travaux rapportent des rendements de conversion du Cys3MH en 3MH et 3MHA jusqu'à 10,2 % pour les cépages Cabernet Sauvignon et Merlot (177). Néanmoins, ces valeurs sont souvent sur-estimées car elles supposent le Cys3MH comme unique précurseur du 3MH et 3MHA. Seuls les travaux de Subileau et al. (15) utilisant un analogue marqué du Cys3MH (Cys3MH d<sub>8</sub>) permettent d'estimer correctement le rendement de conversion molaire de libération du 3MH en conditions naturelles (0,48-0,81 % pour le cépage Sauvignon Blanc). D'après ces valeurs, seuls 5 à 7 % du 3MH produit dans les vins de Sauvignon Blanc proviennent du précurseur cystéinylé. D'autre part, la voie de l'hexénal, mesurée avec un traceur deutéré (hexénal d<sub>8</sub>), peut représenter jusqu'à 10 % de la production totale en 3MH dans le cas du Melon B. (171). En fonction de la composition du moût et des conditions de vinification, ces valeurs sont plus ou moins modulées, mais ne permettent pas d'expliquer complètement l'origine du 3MH. Par conséquent, l'existence d'autres voies de biosynthèse ne peut donc pas être exclue pour tenter d'expliquer la biogenèse du 3MH dans les vins.

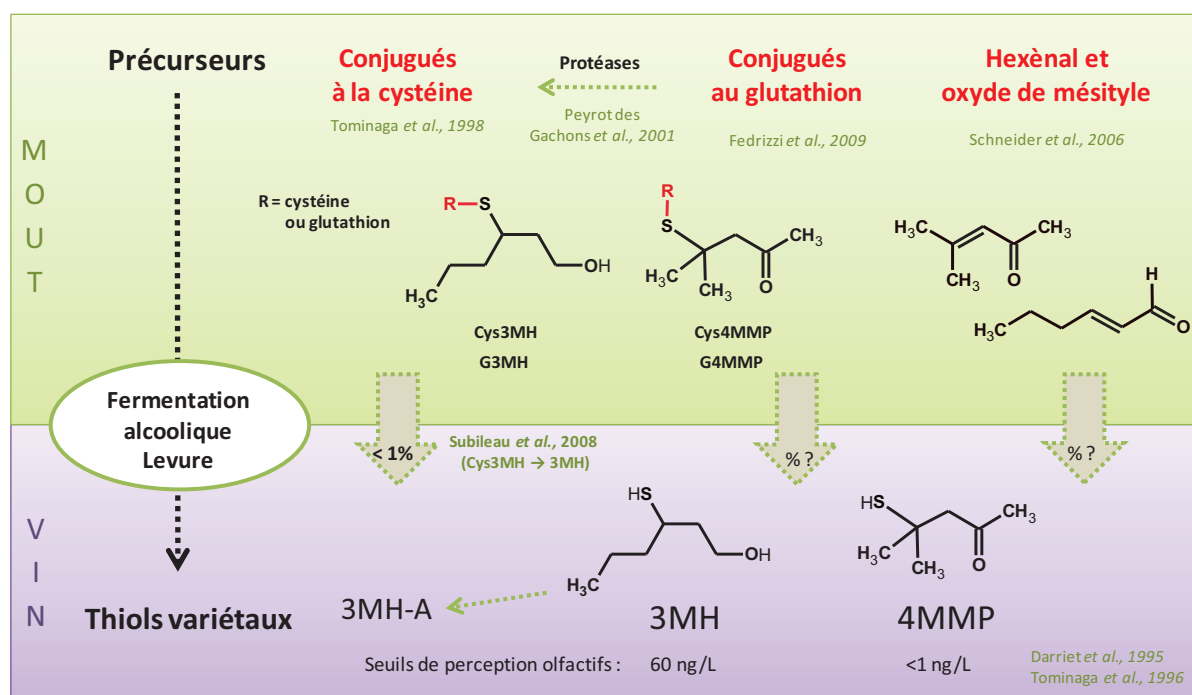


Figure 23 : Les différentes voies de biogenèse des thiols variétaux dans le vin

Des travaux récents font état d'un pro-précurseur du Cys3MH, le S-3-(hexan-1-ol)-glutathion (14) qui, identifié dans un moût de Sauvignon Blanc, pourrait conduire au dérivé cystéinylé par clivage enzymatique. Or, l'activité  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, nécessaire à la libération du Cys3MH à partir de ce pro-précurseur, n'a jamais été identifiée dans un moût. D'autres arguments sont néanmoins en faveur d'un précurseur glutathionylé du 3MH. En effet, l'utilisation d'une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* présentant une répression du gène du principal transporteur de glutathion

(Opt1p), entraîne une diminution par deux des concentrations en 3MH et 3MHA (15). Dans l'hypothèse où le S-3-(hexan-1-ol)-glutathion serait transporté *via* le même transporteur que le glutathion dans la levure, ces travaux soulignent une possible filiation directe entre ce dérivé glutathionylé d'une part et le 3MH d'autre part.

Un dérivé glutathionylé de la 4MMP, la S-4-(4-mercapto-4-méthylpentan-2-one)-glutathion, mis en évidence récemment dans des moûts de Sauvignon Blanc (168), Gewürztraminer et Riesling (178), pourrait être un nouveau précurseur de la 4MMP, bien qu'aucune preuve formelle de la filiation n'ait encore été apportée.

Afin d'apporter une réponse claire et précise, les S-conjugués au glutathion du 3MH et de la 4MMP, le S-3-(hexan-1-ol)-glutathion (G3MH) et la S-4-(4-méthylpentan-2-one)-glutathion (G4MMP) deutérés, dont la synthèse est décrite au chapitre 1, ont été utilisés comme traceurs pour étudier la possible conversion des précurseurs glutathionylés en thiols volatils, lors de la fermentation alcoolique.

Cette étude a fait l'objet de deux publications (Cf. articles (1) et (5)) dont un résumé concis est présenté dans les paragraphes suivants.

#### 4.2.1. Etude de la filiation du G3MH en 3MH en conditions œnologiques

Un moût synthétique et un moût de Sauvignon Blanc ont été enrichis en G3MH  $d_2/d_3$  à différentes concentrations (Tableau 11) pour étudier l'éventuelle filiation entre G3MH et 3MH en conditions œnologiques. En fin de fermentation, les vins obtenus ont été analysés selon la méthode de Schneider *et al.* (179) afin d'identifier la formation possible de 3MH  $d_2/d_3$ . L'identification formelle du 3MH  $d_2/d_3$  (alignement des temps de rétention et spectres de masse MS/MS similaires avec les composés de référence) dans les vins démontre la filiation entre G3MH et 3MH en conditions œnologiques.

La filiation peut être considérée à deux niveaux distincts : directe si le G3MH libère du 3MH sans aucun composé intermédiaire, ou indirecte si le G3MH est d'abord dégradé en Cys3MH puis converti en 3MH. Dans ce second cas, le G3MH peut alors être considéré comme un pro-précurseur du 3MH. Dans la littérature, il a été démontré qu'en présence d'une souche de levure modifiée (activité cystéine  $\beta$ -lyase exacerbée), 3,7 % du G3MH introduit dans un milieu modèle est converti en Cys3MH (175). Cette observation sous-entend que la filiation entre G3MH et 3MH est majoritairement directe.

L'influence de la quantité initiale en G3MH  $d_2/d_3$  sur le rendement de conversion a été étudiée uniquement en moût synthétique (Tableau 11). La libération de 3MH à partir du précurseur glutathionylé est faible (0,6 %, résultat similaire à ceux de Subileau (180) sur le Cys3MH) et indépendante de la concentration initiale en précurseurs, en conditions synthétiques. Dans un moût de Sauvignon Blanc enrichi en G3MH  $d_2/d_3$ , le rendement de conversion moyen s'élève à 4,4 % et correspond à 3,3 % de la production totale en 3MH. Des résultats semblables (rendement de conversion (R)-G3MH  $\rightarrow$  (R)-3MH : 3 %) ont été obtenus en milieu modèle enrichi en (R)-G3MH avec des conditions de fermentation similaires (VIN13, 22°C) (175). De même, le rendement global de



conversion du G3MH+Cys3MH → 3MH+3MHA, après fermentation d'un moût de Kosu (souche de levure VL3), s'élève à 3,05 % (181).

**Tableau 11 : Conditions de fermentation, d'enrichissement en précurseur G3MH d<sub>2</sub>/d<sub>3</sub> et rendements de conversion molaire pour l'étude de filiation G3MH → 3MH (Cf. article (1))**

Conditions de fermentation	Synthétique	Sauvignon Blanc
Souche de levure	VIN13	VIN13
Température	20°C	20°C
Ensemencement (g/hL)	10	10
Dopage G3MH d <sub>2</sub> /d <sub>3</sub> (µg/L)	15	12 (n=2)
	75	
	150	
Rendements de conversion molaire (%)	0,6 <sup>1</sup>	4,4

<sup>1</sup> : Valeur obtenue quelle que soit la quantité initiale en G3MH d<sub>2</sub>/d<sub>3</sub> introduite dans le moût.

Une étude complémentaire a été menée en moût synthétique pour étudier l'influence de la teneur en glutathion sur la libération du 3MH à partir du G3MH. L'ajout de glutathion, en complément de l'enrichissement en G3MH d<sub>2</sub>/d<sub>3</sub>, induit une diminution d'un facteur 4 du rendement de conversion du G3MH en 3MH en conditions synthétiques (Tableau 12). Au vu de ces résultats, le probable effet de masse au niveau du transporteur de glutathion pourrait être responsable de la diminution de 3MH produit.

**Tableau 12 : Influence de la concentration en glutathion sur le rendement de conversion du G3MH → 3MH en conditions synthétiques (Moût synthétique MS300).**

Conditions de fermentation	Fermenteur 1	Fermenteur 2
Souche de levure	VIN13	VIN13
Température	20°C	20°C
Ensemencement (g/hL)	10	10
GSH additionné (mg/L)	0	100
G3MH d <sub>2</sub> /d <sub>3</sub> (µg/L)	158	158
Rendements de conversion molaire (%)	0,65 %	0,17 %

#### 4.2.2. Etude de la filiation de la G4MMP en 4MMP en conditions œnologiques

La G4MMP  $d_{10}$ , obtenue par synthèse chimique, a servi de traceur dans des essais de fermentations pour étudier la filiation probable entre la G4MMP et la 4MMP en conditions œnologiques. Pour cela, un moût synthétique et un moût de Sauvignon Blanc ont été enrichis en G4MMP  $d_{10}$  à des teneurs de 4,5 nmol/L, valeurs voisines de l'abondance naturelle de la G4MMP dans les moûts de Sauvignon Blanc (178). Les conditions de fermentations sont présentées dans le Tableau 13. L'identification formelle de la 4MMP  $d_{10}$  dans les vins synthétiques et de Sauvignon Blanc obtenus après fermentation, prouve la filiation directe entre G4MMP et 4MMP en conditions œnologiques. Le rendement de conversion molaire, estimé par ajouts dosés, est égal à 0,3 %. Cette valeur est cohérente avec celle de transformation de la Cys4MMP en 4MMP rapportée dans la littérature (180). Au vu des abondances naturelles moyennes de la G4MMP et de la Cys4MMP dans les moûts de Sauvignon Blanc (178), environ 20 % de la production de 4MMP provient de la métabolisation de la G4MMP par la levure.

**Tableau 13 : Conditions de fermentation, d'enrichissement en précurseur G4MMP  $d_{10}$  et rendements de conversion molaire pour l'étude de filiation G4MMP → 4MMP (Cf. article (5))**

Conditions de fermentation	Synthétique	Sauvignon Blanc
Souche de levure	VIN13	VIN13
Température	20°C	20°C
Ensemencement (g/hL)	10	10
Dopage G4MMP $d_{10}$ (nM)	4,5	4,5
Rendements de conversion molaire (%)	nc	0,3 %

(nc : non calculé)

Les deux études de filiation ont ainsi montré le rôle des S-conjugués au glutathion en tant que précurseurs de thiols. Il convenait donc d'examiner leur présence dans différents cépages, et leur localisation dans les différentes parties de la baie, qui peut avoir des conséquences technologiques importantes.

#### 4.2.3. Identification du G3MH et de la G4MMP dans divers cépages

Les précurseurs glutathionylés et cystéinylés constituent le potentiel aromatique de type thiol dans la baie de raisin. Le développement d'une méthode analytique par SIDA-NanoLC-MS/MS (Cf. article (2)), dédiée à la mesure du potentiel aromatique de type thiol, a permis l'identification des précurseurs glutathionylés dans différents cépages. En effet, l'alignement des temps de rétention et la répartition des ions statistiquement identique entre le composé synthétique et celui d'origine naturelle permet l'identification formelle des précurseurs glutathionylés dans la baie de raisin.

Initialement identifiés dans le Sauvignon Blanc (14, 168), le G3MH est également présent dans le Melon B., Riesling et Gewürztraminer (Figure 24) tandis que la G4MMP, plus spécifique, n'a été détectée que dans le Riesling et le Gewürztraminer (Cf. articles (1) et (2)). D'autres travaux rapportent également la présence du G3MH dans des cépages tels que le Chardonnay et le Pinot Grigio (182).

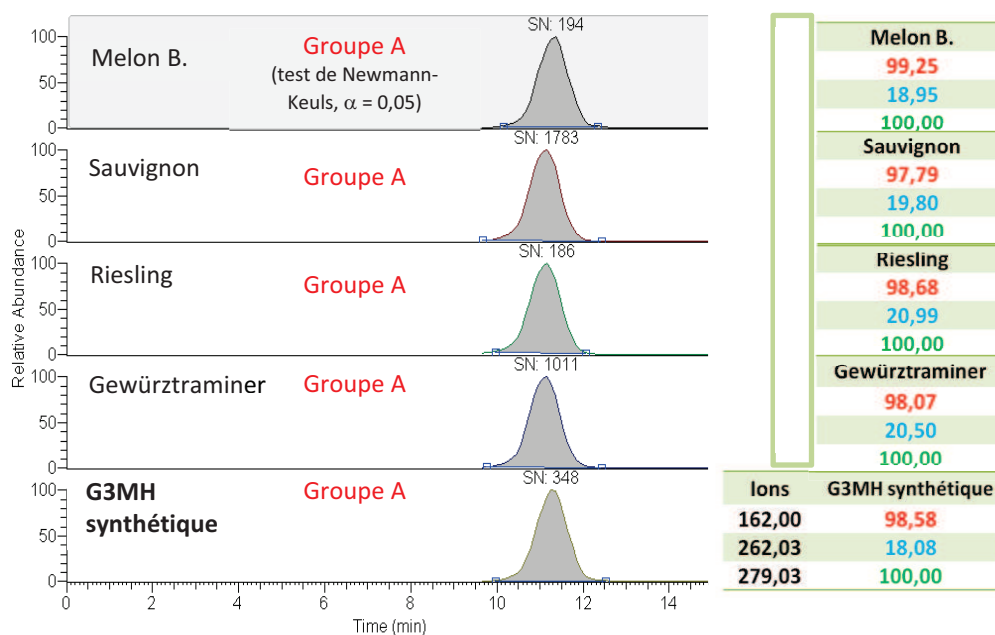


Figure 24 : Identification du G3MH dans divers cépages

#### 4.2.4. Teneurs moyennes des S-conjugués rencontrées dans les différents cépages

Les précurseurs glutathionylés et cystéinylés ont été quantifiés dans des moûts industriels de Sauvignon Blanc, Riesling et Gewürztraminer et des moûts de laboratoire de Melon B (Tableau 14) (Cf. article (2)). De façon systématique, les précurseurs cystéinylés sont plus abondants que les précurseurs glutathionylés dans les moûts. Ces résultats sont contradictoires avec ceux de Capone *et al.* (182), qui rapportent des teneurs moyennes en G3MH et Cys3MH proches de 400 µg/L et 200 µg/L respectivement pour le Sauvignon Blanc d'origine australienne. De façon similaire aux précurseurs cystéinylés (183), le G3MH est présent à de plus fortes teneurs que la G4MMP dans les moûts étudiés.

**Tableau 14 : Quantification du potentiel aromatique de type thiols dans divers cépages (Lorsque les teneurs détectées sont inférieures aux limites de détection, aucune valeur n'est reportée dans le tableau pour les concentrations minimum et maximum.)**

Cépage		Melon B.	Sauvignon	Riesling	Gewürztraminer
<b>Nombre d'échantillon</b>		36	21	9	5
<b>Concentration G3MH (nmol/L)</b>	Moyenne	<0,50	10,72	3,11	14,62
	Minimum		3,31	1,67	13,66
	Maximum		18,44	4,96	17,33
<b>Concentration Cys3MH (nmol/L)</b>	Moyenne	<4,75	101,14	108,59	263,34
	Minimum		35,92	70,16	263,20
	Maximum		177,50	138,67	270,52
<b>Concentration G4MMP (nmol/L)</b>	Moyenne	nd	2,21	1,36	0,45
	Minimum	nd	0,07	1,17	0,25
	Maximum	nd	10,62	4,53	0,53
<b>Concentration Cys4MMP (nmol/L)</b>	Moyenne	12,23	18,24	<1,90	3,42
	Minimum	4,87	11,79		2,46
	Maximum	17,45	28,40		3,72

L'étude particulière du potentiel aromatique de type thiol dans les moûts de Melon B. et Sauvignon Blanc est détaillée au chapitre 3.

#### **4.2.5. Localisation des précurseurs de thiol dans la baie de raisin et implications pratiques**

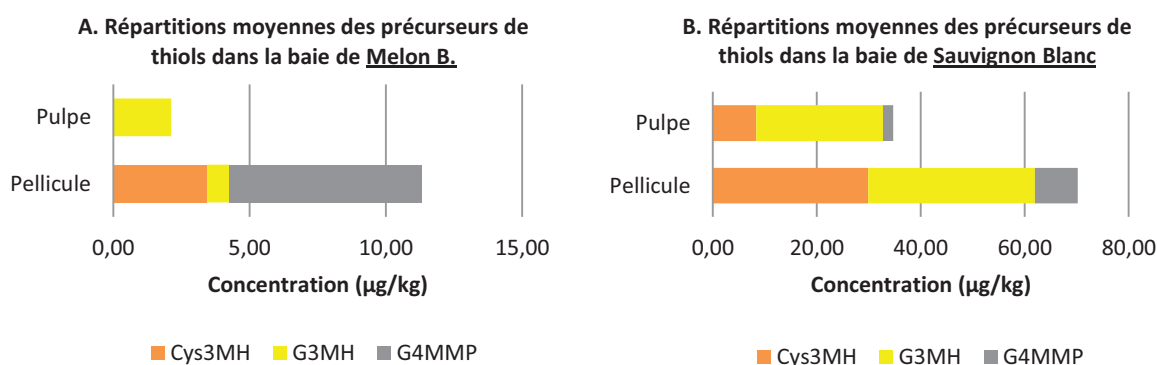
Lors de l'élaboration des moûts blancs, les divers constituants sont principalement issus de la pulpe des baies qui, selon les cépages, représente 83 à 91 % de la masse de la baie entière. Diverses études montrent l'influence des opérations pré-fermentaires sur l'extraction des précurseurs de thiols (177, 184, 185), suggérant une distribution différentielle au sein de la baie. Ainsi, le Cys3MH est préférentiellement localisé dans la pellicule (60 %) alors que la Cys4MMP est répartie de façon similaire entre pellicule et pulpe de la baie de Sauvignon Blanc (186). Au cours de la maturation des baies de Koshu, les teneurs en Cys3MH et G3MH atteignent leur maximum 16 semaines après la véraison dans les feuilles de la vigne ainsi que dans la pellicule et la pulpe de la baie, avant de chuter très rapidement (181).

Comme nous disposons d'une méthode sensible, répétable et reproductible (Cf. 4.1.2.2), une étude précise de la localisation des précurseurs à la fois glutathionylés et cystéinylés a été menée sur des raisins de Melon B. et Sauvignon Blanc. Ce travail conforte les variations de teneurs en thiols variétaux observées lors de différents traitements pré-fermentaires et a fait l'objet d'une publication (Cf. article (4)) dont les principaux résultats sont résumés dans les paragraphes suivants.

#### 4.2.5.1. Répartition relative des précurseurs glutathionylés et cystéinylés dans la baie de raisin

Cette étude a été réalisée sur une partie du réseau parcellaire détaillé au paragraphe 3.2.1 mais également sur le vignoble du campus de Montpellier Supagro dans le cas du Sauvignon Blanc. Pour avoir un échantillonnage représentatif de chaque parcelle, un total de 400 baies avec pédicelle est collecté sur chaque parcelle selon le protocole de Carbonneau *et al.* (187). Les baies sont pelées et partagées en deux manuellement afin de séparer les pépins, la pellicule et la pulpe qui sont immédiatement congelés dans de l'azote liquide, pour stopper instantanément toutes réactions enzymatiques. Après broyage, chaque échantillon est analysé selon la méthode de Roland *et al.* (178) modifiée pour s'adapter à ce type d'échantillon et quantifier l'abondance naturelle de chaque précurseur dans la pellicule et la pulpe des deux cépages étudiés. Les teneurs en Cys4MMP sont inférieures à la limite de détection avec l'appareillage utilisé pour cette étude (Q-TRAP, LOD ~ 5 µg/L) et ne sont donc pas rapportées.

Globalement, les précurseurs de thiols (Cys3MH, G3MH et G4MMP) sont préférentiellement localisés dans la pellicule quel que soit le cépage (Figure 25). Pour le Melon B., la localisation de ces composés semble plus spécifique puisque le G3MH est uniquement détecté dans la pulpe.



**Figure 25 : Localisation des précurseurs de thiols dans la baie de Melon B. (A) et de Sauvignon Blanc (B). (Les valeurs correspondent à la moyenne des concentrations relevées pour un échantillon de 400 baies prélevées sur trois parcelles différentes par cépage.)**

En fonction du vignoble, les distributions et concentrations des précurseurs entre pulpe et pellicule varient significativement (Tableau 15). En effet, le Sauvignon Blanc de Montpellier présente des teneurs en précurseurs quatre fois plus importantes que dans le Val de Loire. Ce constat est cohérent avec les travaux de Choné (188), qui démontre qu'un stress hydrique modéré implique de plus fortes teneurs en Cys3MH dans des raisins de Sauvignon Blanc.

D'autre part, les teneurs en précurseurs dépendent de la maturité de la baie (189). En effet, les concentrations en G3MH, Cys3MH et G4MMP augmentent significativement autour de la date de récolte (+ 400 %, + 65 % et +150 % respectivement). Les baies de Sauvignon Blanc provenant de Montpellier présentent un degré de maturité plus élevé que celles issues de la vallée de la Loire (sucres : 237 g/L à Montpellier Vs. 213 g/L pour la vallée de la Loire), ce qui pourrait également expliquer leur plus forte abondance en précurseurs de thiols.

**Tableau 15 : Influence du site d’implantation sur la concentration et la distribution des précurseurs de thiols dans la pellicule et la pulpe de la baie de Sauvignon Blanc (concentrations exprimées en µg par kg de matière fraîche)**

Parcelles	Cépage	Vignobles		Concentration (µg/kg)		
				Cys3MH	G3MH	G4MMP
SM	Sauvignon Blanc	Montpellier (Campus INRA)	Pellicule	66,54	67,13	7,08
			Pulpe	11,42	54,70	4,70
ST	Sauvignon Blanc	Touraine (hors réseau parcellaire)	Pellicule	13,85	16,80	7,29
			Pulpe	8,80	12,69	1,22
TB	Sauvignon Blanc	Sancerre	Pellicule	9,28	12,38	10,26
			Pulpe	4,83	5,83	nd

#### 4.2.5.2. Implications pratiques

Dans les expérimentations présentées aux paragraphes 4.2.5.2.1 et 4.2.5.2.2, seuls les précurseurs du 3MH ont été étudiés : G3MH et Cys3MH.

##### 4.2.5.2.1. Influence du pressurage

Lors de l’élaboration des moûts (échelle industrielle), les jus dits de « cuvée » présentent des concentrations en précurseurs plus faibles que ceux issus des fins de presse (Tableau 16). Bien qu’un pressurage poussé favorise également l’extraction d’importantes fractions polyphénoliques (190), les vins issus des jus de fins de presse sont plus riches en 3MH et 3MHA (Tableau 16). Ces résultats sont contradictoires avec ceux obtenus par Patel *et al.* (190) qui démontrent une perte significative en 3MH et 3MHA dans les vins issus de fins de presses. D’autre part, le gain en précurseurs entre moûts issus de cuvées et moûts issus de fins de presse n’est pas toujours du même ordre de grandeur que celui en thiols dans les vins résultants, notamment pour le Sauvignon Blanc provenant de Tours (Tableau 16). En fonction des conditions de vinifications (fermentation alcoolique, embouteillage et stockage) et de la composition initiale du moût (azote assimilable et teneurs en polyphénols), la révélation et la préservation des thiols variétaux peuvent être grandement modulées. Divers travaux illustrent l’effet des conditions de vinification sur le taux de conversion des précurseurs de thiols en thiols (souche de levure, température de fermentation, composition azotée du moût) (180, 191-193). De plus, au cours du stockage et du vieillissement des vins, les thiols variétaux sont susceptibles d’être piégés par des espèces électrophiles de type polyphénoliques (formation de quinones de la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine en présence d’ions ferriques et/ou cuivriques) pour former des adduits spécifiques (194), responsables de la disparition des thiols.

Ainsi, pour compléter cette étude, des analyses de thiols (3MH et 3MHA) devraient être conduites sur ces mêmes vins au cours de leur vieillissement afin de comparer les pertes aromatiques sur cuvée et fins de presse. Ce travail pourrait ouvrir la voie à la valorisation des fins de presse.

**Tableau 16 : Influence du pressurage sur l'extraction du Cys3MH et G3MH dans les moûts de Melon B. et Sauvignon Blanc et sur la révélation du 3MH et 3MHA.**

Vignobles	Analytes	Unités	Concentrations	
			Cuvée	Fins de Presses
Nantes	G3MH	ng/L	3618	4477
	Cys3MH	ng/L	2497	4420
	3MH+3MHA	nM	3,00	3,72
Tours	G3MH	ng/L	52223	56722
	Cys3MH	ng/L	31143	90798
	3MH+3MHA	nM	12	14
Sancerre	G3MH	ng/L	46651	66579
	Cys3MH	ng/L	32226	45073
	3MH+3MHA	nM	13	16

#### 4.2.5.2.2. Influence de la stabulation liquide à froid

Du fait de la localisation préférentielle des précurseurs du 3MH dans la pellicule, la stabulation liquide à froid devrait permettre une meilleure extraction de ces composés. En effet, lors de cette opération, les bourbes totales restent en contact prolongé avec le moût, ce qui pourrait permettre une extraction accrue des précurseurs contenus dans ces parties solides.

Des essais de stabulation liquide à froid ont donc été conduits sur Sauvignon Blanc (Sancerre) durant 1, 3 et 7 jours. Chaque lot de moût est fermenté séparément par la suite. Durant 7 jours de stabulation liquide à froid, les concentrations en précurseurs n'évoluent pas. En revanche, les vins correspondants présentent des teneurs en 3MH+3MHA croissantes entre 0 et 7 jours de macération (Tableau 17). On constate parallèlement une diminution des composés en C6 sur la même période.

Cette diminution des composés en C6 pourrait être la conséquence de la formation d'autres formes de précurseurs du 3MH du type S-3-(hexan-1-yl)-glutathion ou S-3-(hexan-1-yl)-L-cystéine ou d'autres dérivés. Métabolisés par la levure, ces nouveaux précurseurs pourraient contribuer à la libération de 3MH.

**Tableau 17 : Influence de la stabulation liquide à froid sur les teneurs en précurseurs de thiols, composés en C6 et thiols variétaux (Sauvignon Blanc)**

Analytes	Unités	Durée de la stabulation liquide à froid (jours)		
		1	3	7
Cys3MH	µg/L	58,9	58,6	56,7
G3MH	µg/L	36,4	36,9	31,4
(E)-2-hexènal	µg/L	524,1	518,6	383,3
(E)-2-hexènole	µg/L	238,0	135,0	130,3
3MH+3MHA	nM	11,4	13,8	17,7

Une étude préliminaire a été menée sur le S-3-(hexan-1-yl)-glutathion et S-3-(hexan-1-yl)-L-cystéine. Ces composés étant des intermédiaires de synthèse lors de l'obtention du G3MH d<sub>2</sub> et du Cys3MH d<sub>2</sub>, ils ont aisément été synthétisés puis utilisés en tant que traceurs lors de mini-vinifications en milieu modèle et naturel (Sauvignon Blanc) pour étudier leur rôle de précurseurs du 3MH. Le S-3-(hexan-1-yl)-glutathion d<sub>2</sub> et le S-3-(hexan-1-yl)-L-cystéine d<sub>2</sub> ont été introduits dans les moûts à des teneurs proches de celles observées pour le G3MH et le Cys3MH : 20 et 80 µg/L respectivement. Après fermentation et analyse des vins correspondants, aucune trace de 3MH deutéré n'a été détectée. Dans nos conditions, la levure ne semble donc pas métaboliser ces composés pour former du 3MH. Cependant, d'autres formes de précurseurs ne peuvent être exclues et nécessitent des études plus poussées.

#### 4.2.6. Conclusions

Cet axe de travail portait sur des études de filiation entre les précurseurs de type S-conjugués au glutathion et les thiols variétaux afin de mieux cerner les différentes voies de genèse de ces composés odorants. A l'échelle du laboratoire, les filiations entre les précurseurs glutathionylés et le 3MH et la 4MMP sont clairement établies en conditions œnologiques (milieu modèle et Sauvignon Blanc). Les rendements de conversion molaires, estimés à 4,4 % et 0,3 % pour le G3MH et la 4MMP respectivement, démontrent l'importance des précurseurs glutathionylés dans la genèse des thiols variétaux. Des études complémentaires doivent néanmoins être envisagées afin de mesurer l'influence de la vinification (température, souche de levure, composition du moût,...) sur la révélation des thiols.

En parallèle, les précurseurs glutathionylés ont été identifiés dans divers cépages tels que le Melon B. (uniquement pour le G3MH), Riesling et Gewürztraminer. Le potentiel aromatique de type thiol est donc composé à la fois des précurseurs cystéinylés et des précurseurs glutathionylés.

Les précurseurs de thiols sont préférentiellement localisés dans la pellicule au sein des baies de Melon B. et de Sauvignon Blanc. La localisation des précurseurs semble plus spécifique dans le cas du Melon B. (G3MH uniquement détecté dans la pulpe) par comparaison au Sauvignon Blanc, où chaque composé est détecté dans la pellicule et dans la pulpe. Du fait de leur localisation, les précurseurs de thiols sont plus abondants dans des moûts issus de fins de presse (échelle industrielle). Les vins résultants de moûts de fins de presse présentent des teneurs en 3MH et 3MHA plus élevées que ceux issus de la cuvée. Par ailleurs, la stabulation liquide à froid influence positivement la libération des thiols sans pour autant influencer sur les teneurs en précurseurs dans les moûts de Sauvignon Blanc. La formation d'autres types de précurseurs au cours de cette opération n'est pas à exclure, bien que des essais préliminaires sur les dérivés aldéhydiques n'aient pas pu prouver leur rôle de précurseurs. L'existence vraisemblable d'autres précurseurs pourrait étoffer les voies de biogenèse des thiols en fermentation, qui restent pour le moment partielles, même en tenant compte des formes glutathionylées mises en évidence.



**4.3. CHAPITRE 3 : MODELISATION DES  
PHENOMENES D'OXYDATION SUR LES MARQUEURS  
D'OXYDATION ET LE POTENTIEL AROMATIQUE DE  
TYPE THIOL POUR LE MELON B. ET LE SAUVIGNON  
BLANC**

Cette étude a été réalisée à l'échelle laboratoire en deux étapes distinctes :

- Caractérisation des moûts en composition afin de connaître les quantités des marqueurs d'oxydation et des précurseurs de thiol dans la baie de raisin.
- Oxydation séquentielle et manuelle des moûts pour suivre l'évolution de ces composés cibles.

#### 4.3.1. Obtention des moûts en absence d'oxygène

Pour caractériser les moûts en composition c'est-à-dire dans l'état de la baie, les moûts ont été obtenus sous vide par pressurage manuel. En pratique, des baies saines et entières sont introduites dans une outre de bag-in-box puis le pressurage commence après que la totalité du système de récupération des jus est sous vide (Cf. article (3)).

L'étanchéité du système de pressée traduite par le rapport molaire entre GRP et acide *trans*-caftarique est totale (rapports molaires inférieurs à 1 % sur l'ensemble des pressurages, données non présentées) : le pressurage manuel sous vide est donc validé d'un point de vue technique. D'un point de vue technologique, le moût obtenu, supposé représentatif de la baie, peut être apparenté aux jus de première presse.

#### 4.3.2. Caractérisation des moûts en composition

##### 4.3.2.1. Marqueurs d'oxydation

##### 4.3.2.1.1. Esters hydroxycinnamoyltartriques et Grape Reaction Product

Les quantités observées en esters hydroxycinnamoyltartriques sont très différentes entre chaque composé et pour chaque isomère. L'isomère *trans* de chaque ester hydroxycinnamoyltartrique étant la forme naturellement présente dans le jus de raisin, il est normal que les teneurs en composés *cis* soient quasiment nulles. Pour les formes *trans*, seuls les acides *trans*-caftarique et *trans*-coutarique montrent des concentrations au-dessus des limites de quantification ; l'acide fertarique est, quant à lui, présent à l'état de traces (données non présentées). L'acide *trans*-caftarique étant le plus représentatif d'un jus de raisin parmi les autres esters hydroxycinnamoyltartriques, les analyses de variance ont été uniquement réalisées sur celui-ci.

Le Melon B. présente des quantités d'acide *trans*-caftarique nettement supérieures au Sauvignon Blanc, observation en accord avec la littérature (195). Pour l'année 2007, le Melon B. contient en moyenne 504,5 mg/L d'acide *trans*-caftarique contre 186,3 mg/L pour le Sauvignon Blanc dans les différentes parcelles considérées. Ces valeurs sont variables d'une année sur l'autre en fonction des conditions climatiques. En revanche, la tendance reste la même : le Melon B. est toujours plus riche en esters hydroxycinnamoyltartriques que le Sauvignon Blanc (Tableau 18).

**Tableau 18 : Concentrations moyennes en acide *trans*-caftarique (La parcelle S présente des variations significatives de concentration au cours de la maturation. Chaque valeur représente une date de récolte : J-7, J et J+7).**

Parcelles	Cépages/Vignobles	Concentration acide <i>trans</i> -caftarique (mg/L ou mM)
HAI	Melon B./Nantes	515,7 (1,653)
LOR	Melon B./ Nantes	458,6 (1,470)
REG	Melon B./ Nantes	553,2 (1,773)
VER	Melon B./ Nantes	486,7 (1,560)
Sauv.L	Sauvignon Blanc/Tours	192,5 (0,617)
Sauv.G	Sauvignon Blanc/Tours	215,6 (0,691)
Sauv.M	Sauvignon Blanc/Tours	201,2 (0,645)
S	Sauvignon Blanc/Sancerre	179,1/158,2/139,2 (0,574/0,507/0,446)
G	Sauvignon Blanc/Sancerre	189,4 (0,607)
TB	Sauvignon Blanc/Sancerre	161,0 (0,516)

En parallèle, un effet dû au site d'implantation est également observé entre les vignobles tourangeau et sancerrois. En effet, l'analyse de variance met en évidence une différence significative des concentrations moyennes relevées en acide *trans*-caftarique : 203,1 mg/L dans le vignoble de Tours contre 169,7 mg/L à Sancerre (Tableau 19). Néanmoins, cet effet est statistiquement plus faible que l'effet cépage.

**Tableau 19 : Effets « cépage » et « site d'implantation » sur la teneur en acide *trans*-caftarique sur l'ensemble du réseau parcellaire dans la région du Val de Loire**

Vignobles	Concentration moyenne (mg/l ou mM)	Test de Newmann-Keuls ( $\alpha = 0,05$ )
Nantes	504,5 (1,617)	A
Tours	203,1 (0,651)	B
Sancerre	169,7 (0,544)	C

Les échantillons ont été récoltés à trois dates au cours de la maturation afin de pouvoir étudier l'effet de la date de récolte. D'après les résultats obtenus, aucun effet significatif n'a pu être démontré par analyse de variance, exception faite pour la parcelle Silex située dans le vignoble sancerrois. En effet, cette dernière présente une décroissance significative de la teneur en acide *trans*-caftarique dans les baies au cours de la période considérée (Tableau 20), comme déjà démontrée par de précédents travaux (196).

**Tableau 20 : Effet « date de récolte » sur la teneur en acide *trans*-caftarique pour la parcelle Silex (Sauvignon Blanc, Sancerre)**

Dates de vendanges	Concentration moyenne (mg/L ou mM)	Test de Newmann-Keuls ( $\alpha = 0,05$ )
13/09/2007	179,1 (0,574)	A
20/09/2007	158,2 (0,507)	B
27/09/2007	139,2 (0,446)	C

#### 4.3.2.1.2. Glutathion

Les teneurs en glutathion dans les échantillons de caractérisation démontrent une très forte importance variétale. En effet, les concentrations rencontrées dans les moûts de Melon B. sont en moyenne de 16 mg/L contre 51 mg/L pour le Sauvignon Blanc (Tableau 21). Les travaux de Cheyner *et al.* (161) ont permis de classer les moûts en fonction de leur oxydabilité selon le rapport esters hydroxycinnamoyltartriques sur glutathion. Pour simplifier notre classement, seul le rapport entre l'acide *trans*-caftarique et le glutathion a été pris en compte dans notre étude. Les moûts de Melon B. présentent en moyenne un rapport proche de 30 contre 4 et 3 pour les moûts de Sauvignon Blanc de Tours et de Sancerre. Ceci est en parfait accord avec les observations technologiques : les moûts de Melon B. sont fortement oxydables et leur brunissement intervient très tôt lors du pressurage.

Le site d'implantation influence dans une moindre mesure les teneurs en glutathion dans les moûts de Sauvignon Blanc provenant de Tours et de Sancerre : 46 et 57 mg/L respectivement.

Aucun effet de la date de récolte n'est quant à lui observable, exception faite pour 2 parcelles de Sauvignon Blanc : Sauv.M et TB. De précédents travaux ont démontré une corrélation entre maturité du raisin et teneurs en glutathion dans des cépages tels que le Koshu et le Cabernet Sauvignon (162). Dans notre étude, l'effet date de récolte n'a été étudié que sur une période limitée (deux semaines), ce qui peut expliquer les teneurs en glutathion statistiquement identiques entre les 3 dates dans la majeure partie des cas.

**Tableau 21 : Concentrations moyennes en glutathion dans les moûts de Melon B. et Sauvignon Blanc provenant des différentes parcelles situées en Val de Loire**

Parcelles	Cépages/Vignobles	Concentrations GSH (mg/L ou mM)
HAI	Melon B./Nantes	21,2 (0,069)
LOR	Melon B./Nantes	17,5 (0,057)
REG	Melon B./Nantes	9,4 (0,031)
VER	Melon B./Nantes	15,1 (0,041)
Sauv.G	Sauvignon Blanc/Tours	38,9 (0,127)
Sauv.L	Sauvignon Blanc/Tours	44,0 (0,143)
Sauv.M	Sauvignon Blanc/Tours	48,4 / 55,6 / 65,2 (0,158/0,181/0,212)
G	Sauvignon Blanc/Sancerre	60,6 (0,197)
S	Sauvignon Blanc/Sancerre	52,3 (0,170)
TB	Sauvignon Blanc/Sancerre	48,1 / 54,9 / 68,3 (0,157/0,179/0,222)

#### 4.3.2.1.3. Composés en C6

Les échantillons de caractérisation obtenus sous vide ne doivent pas théoriquement contenir de composés en C6. En effet, la formation du (*E*)-2-hexènal et du (*E*)-2-hexènole résulte de l'oxydation enzymatique de l'acide linoléique par la lipoxygénase en présence d'oxygène, et de la réduction de l'aldéhyde en alcool par l'activité alcool deshydrogénase du raisin (56, 140). Précédemment, l'étanchéité du système de pressée a été validée en mesurant des teneurs en GRP inférieure à 1 % de la quantité initiale de substrat. Néanmoins, de faibles quantités de composés en C6 sont détectées dans les échantillons de caractérisation, en raison de la présence de traces d'oxygène (Tableau 22), confirmant ainsi la très forte activité enzymatique de la lipoxygénase du raisin (140).

Les teneurs en (*E*)-2-hexènal dans les moûts de Melon B. et Sauvignon Blanc diffèrent statistiquement d'un cépage à l'autre : 152 et 100 µg/L respectivement. En revanche, les concentrations en (*E*)-2-hexènole sont similaires pour les deux types de cépages : 18 et 16 µg/L respectivement. Selon l'activité enzymatique, la quantité de (*E*)-2-hexènal peut être plus ou moins modulée dans la baie de raisin et expliquerait la différence de teneurs entre Melon B. et Sauvignon Blanc. Effectivement, des mesures de l'activité lipoxygénase sur divers cépages montrent de très nettes différences : 10 contre 32,9 mM/min/mg de protéines pour l'Ugni Blanc et le Carignan respectivement (140).

D'autre part, les effets « site d'implantation » pour le Sauvignon Blanc provenant de Tours et Sancerre et « date de récolte » sur l'ensemble du réseau parcellaire ne sont pas statistiquement significatifs pour le millésime considéré (2007).

**Tableau 22 : Concentrations moyennes en (*E*)-2-hexènal et en (*E*)-2-hexènole dans les moûts de Melon B. et de Sauvignon Blanc provenant des différentes parcelles situées en Val de Loire (Les valeurs sont calculées à partir d'échantillons recueillis en triplicat pour trois dates de vendanges.)**

Parcelles	Cépages/Vignobles	( <i>E</i> )-2-hexènal (µg/L ou µM)	( <i>E</i> )-2-hexènole (µg/L ou µM)
HAI	Melon B./Nantes	153,6 (1,57)	19,8 (0,20)
LOR	Melon B./ Nantes	143,4 (1,46)	17,1 (0,17)
REG	Melon B./ Nantes	155,1 (1,58)	18,7 (0,19)
VER	Melon B./ Nantes	154,6 (1,57)	15,4 (0,15)
Sauv.L	Sauvignon Blanc/Tours	57,7 (0,59)	13,4 (0,13)
Sauv.G	Sauvignon Blanc/Tours	94,8 (0,97)	17,2 (0,17)
Sauv.M	Sauvignon Blanc/Tours	151,2 (1,54)	19,2 (0,19)
S	Sauvignon Blanc/Sancerre	89,1 (0,91)	20,7 (0,21)
G	Sauvignon Blanc/Sancerre	115,3 (1,18)	7,8 (0,08)
TB	Sauvignon Blanc/Sancerre	59,3 (0,61)	18,8 (0,19)

#### 4.3.2.2. Potentiel aromatique de type thiol

Ce paragraphe a fait l'objet d'une publication (Cf. article (3)) dont les principaux résultats sont résumés ci-dessous.

Comme démontré dans le chapitre 2, à côté des précurseurs cystéinylés, les précurseurs glutathionylés font également partie du potentiel aromatique de type thiol. Ces composés ont été quantifiés, selon la méthode de Roland *et al.* (178), mise au point par nos soins, dans des moûts de Melon B. et de Sauvignon Blanc, obtenus à l'échelle du laboratoire et en absence d'oxygène. Les principaux résultats sont résumés dans le Tableau 23.

Globalement, trois effets statistiquement significatifs sont observés :

- Le Sauvignon Blanc est plus riche en précurseurs de thiols que le Melon B.
- En fonction du site d'implantation, les abondances et la distribution des précurseurs varient significativement dans les moûts de Sauvignon Blanc.
- Au cours de la maturation, les teneurs en G3MH, G4MMP et Cys3MH dans le Sauvignon Blanc augmentent considérablement entre J-7 et J+7 (J étant le jour réel des vendanges). Les concentrations en Cys4MMP, quant à elles, évoluent différemment en fonction du site d'implantation et de la parcelle considérée.

**Tableau 23 : Influence du cépage, du site d'implantation et de la date de récolte sur le potentiel aromatique de type thiol (J = Jour réel des vendanges)**

		Concentrations (nM)			
Cépages	Précurseurs	Melon B.	Sauvignon Blanc		Commentaires
Effet cépage	G3MH	0,2	2,9		Test de Newmann-Keuls ( $\alpha = 0,05$ ) : Groupe 1 : Melon B. Groupe 2 : Sauvignon Blanc
	G4MMP	nd	1,0		
	Cys3MH	1,8	21,3		
	Cys4MMP	12,4	24,5		
Vignobles	Précurseurs	Nantes	Tours	Sancerre	Commentaires
Effet site d'implantation	G3MH	/	3,2	2,7	Ratio Cys3MH/Cys4MMP significativement différents entre Tours et Sancerre
	G4MMP	/	1,7	0,3	
	Cys3MH	/	29,6	13,1	
	Cys4MMP	/	28,2	20,8	
Cépages	Précurseurs	Melon B.	Sauvignon Blanc		Commentaires
Effet date de récolte (J-7 → J+7)	G3MH	Pas de différences significatives	2 → 10		Augmentation significative pour le G3MH, la G4MMP et le Cys3MH entre J-7 et J+7  Dépend du site d'implantation
	G4MMP		0,6 → 0,5		
	Cys3MH		35 → 60		
	Cys4MMP		variable		

Pour représenter la composition des moûts de Melon B. et de Sauvignon Blanc en fonction des données de maturité, des marqueurs d'oxydation et du potentiel aromatique de type thiol, une analyse en composantes principales a été réalisée (Cf. article (3), Figure 26). Dans le premier plan (FP1 x FP2) qui représente 75 % de la variabilité, le Melon B. se différencie du Sauvignon Blanc selon l'axe 1 c'est-à-dire en fonction de l'oxydabilité du moût (rapport acide *trans*-caftarique/GSH). L'effet site d'implantation pour le Sauvignon Blanc est par ailleurs bien représenté par l'axe 2 : les moûts provenant de Sancerre sont plus riches en azote assimilable et en acide malique. Enfin, les variables

liées aux précurseurs de thiols sont toutes corrélées, signe probable d'une origine biogénétique commune dans la baie de raisin.

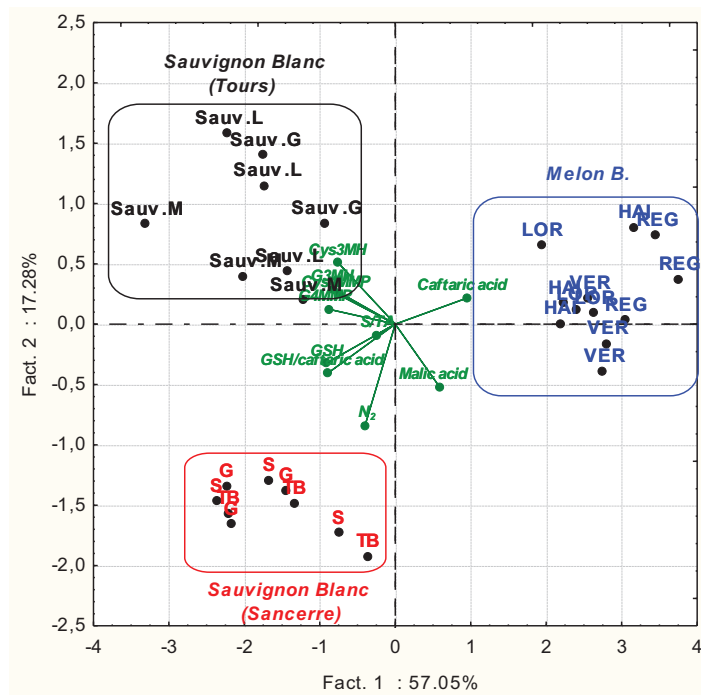


Figure 26 : Caractérisation des goûts de Melon B. et Sauvignon Blanc en composition (Analyse en Composantes Principales)

### 4.3.3. Oxydation des goûts

#### 4.3.3.1. Marqueurs d'oxydation

##### 4.3.3.1.1. Esters hydroxycinnamoyltartriques et Grape Reaction Product

Le système de pressée utilisé pour les réacteurs d'oxydation est identique à celui des réacteurs de caractérisation. Les oxydations ont été réalisées sur 3 parcelles (une par site d'implantation) pour trois modalités et sans répétition.

Pour les esters hydroxycinnamoyltartriques et pour les mêmes raisons qu'invoquées précédemment, seul l'acide *trans*-caftarique est pris en compte pour l'interprétation des profils d'oxydation. Les quinones des acides *trans*-caftarique ou *trans*-coutarique ne sont pas détectées dans nos échantillons. En effet, l'utilisation combinée de métabisulfite de sodium et d'acide benzène sulfonique pour bloquer toute réaction enzymatique dans les goûts, provoque une réduction chimique des quinones avant de pouvoir les combiner.

Globalement, les tendances dégagées pour les analyses en composition se rapprochent de celles observées en oxydation. Aucun effet date de récolte n'a été constaté pour l'ensemble des échantillons et ceci, pour chaque composé cible. Ainsi, les trois modalités peuvent constituer trois répétitions d'un même échantillon et permettre de chiffrer l'intervalle de confiance associé.

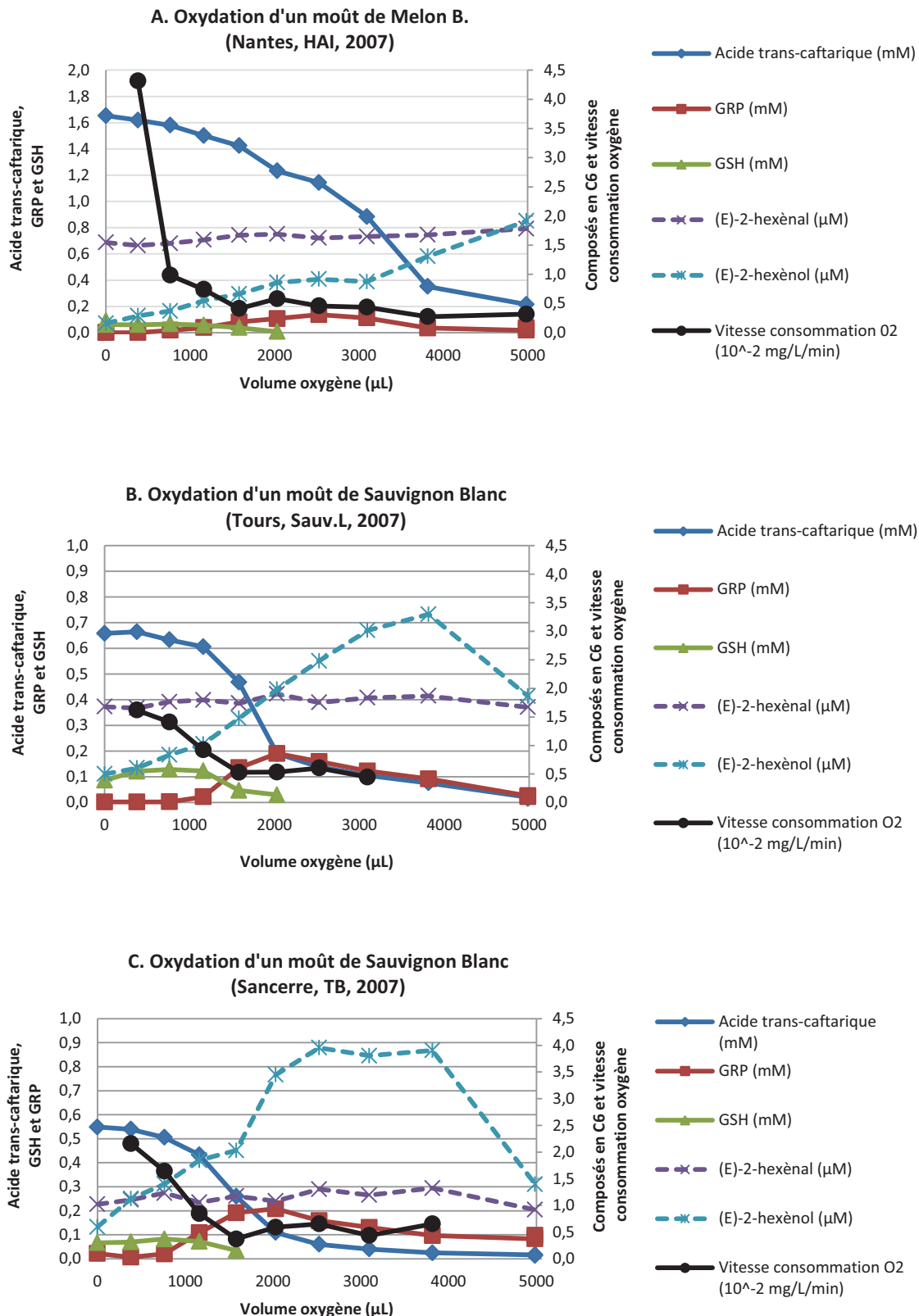
Bien que différenciés en composition, les sites d'implantations ne modifient pas le comportement des moûts de Sauvignon Blanc vis-à-vis de l'oxydation : les différences de composition en substrats pour les raisins provenant de Tours et Sancerre ne sont en effet pas de nature à bouleverser les mécanismes.

La composition en substrats oxydables étant très différenciée pour les deux cépages, le comportement à l'oxydation l'est aussi. L'oxydation des moûts de Melon B. se traduit par des concentrations moyennes en GRP plus faibles que dans le cas du Sauvignon Blanc bien que le premier présente des teneurs bien plus élevées en acide *trans*-caftarique. Les phénomènes d'oxydation sont complexes non seulement parce que beaucoup de réactions sont couplées ou en concurrence mais aussi, parce que tous ces mécanismes sont dynamiques. Par conséquent, il est difficile d'émettre sans ambiguïté une hypothèse quant à cette différence de comportement vis-à-vis de l'oxydation. En revanche, les teneurs en glutathion libre très différentes au sein des deux cépages pourraient expliquer un tel phénomène puisque le GRP résulte d'une addition du glutathion sur la quinone d'acide *trans*-caftarique.

Les quinones des acides *trans*-caftarique ou *trans*-coutarique, qui ne sont pas piégées par le glutathion, restent disponibles pour les autres voies d'oxydation qui sont généralement décrites comme négatives pour les moûts. Le glutathion protège donc naturellement les vendanges des autres processus d'oxydation.

L'acide ascorbique participe également à la protection de l'oxydation en réduisant les quinones des esters hydroxycinnamoyltartriques. Puissant réducteur, il réagit en premier avec les quinones d'acide *trans*-caftarique pour régénérer, par réactions couplées, le substrat de départ. Par voie chimique, la vendange est donc préservée de l'oxygène. Graphiquement, ce phénomène se traduit par un palier plus ou moins long au début des ajouts d'oxygène (Figure 27).





**Figure 27 : Evolution des teneurs en marqueurs d'oxydation au cours de l'addition d'oxygène dans des moûts de Melon B. (A) et de Sauvignon Blanc (B et C) élaborés à l'échelle du laboratoire. Les valeurs rapportées correspondent à la moyenne des concentrations pour les trois dates de récolte.**

La quantité de quinones d'acide *trans*-caftarique disponibles pour participer à d'autres réactions que celle de formation du GRP correspond à la différence entre la teneur maximale en GRP et celle de l'acide *trans*-caftarique présente au même moment. Dans les moûts de Melon B., la proportion de quinones disponibles est très largement supérieure à celle observée dans le Sauvignon Blanc (Tableau 24). Ces espèces, hautement réactives, sont souvent responsables du brunissement irréversible des moûts (197).

**Tableau 24 : Quantités de quinones d'acide *trans*-caftarique disponibles et pouvant être impliquées dans des réactions de brunissement des moûts**

Parcelles	Cépage/Vignoble	Quinones d'acide <i>trans</i> -caftarique disponibles (mg/L ou mM)	Quinones d'acide <i>trans</i> -caftarique disponibles (% d'acide <i>trans</i> -caftarique initial)
HAI	Melon B./Nantes	314,5 (1,008)	87
Sauv.L	Sauvignon Blanc/Tours	17,2 (0,055)	20
TB	Sauvignon Blanc/Sancerre	2,5 (0,008)	4

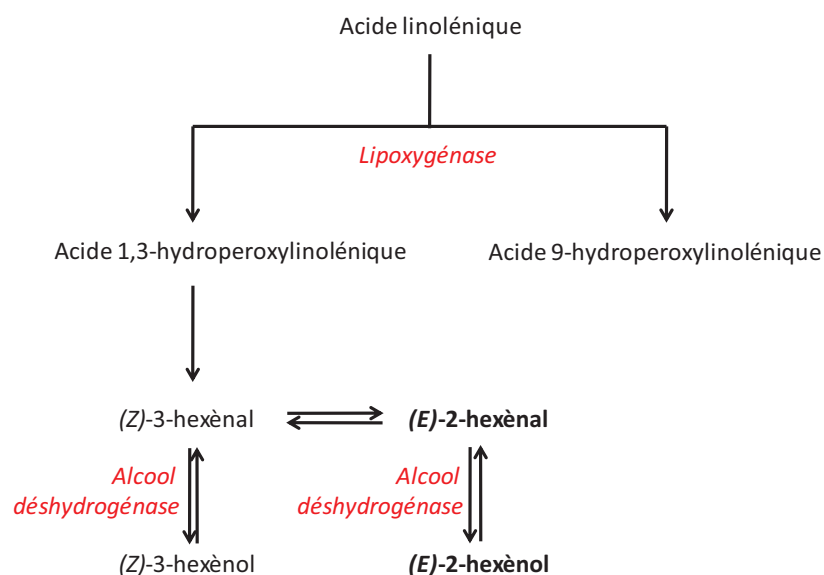
#### 4.3.3.1.2. Glutathion

Les teneurs en glutathion diminuent rapidement au cours du processus d'oxydation et deviennent non-déTECTABLES lorsque la quantité de GRP formée est à son maximum. Ainsi, la disparition du glutathion (<1 mg/L) est concomitante avec l'apparition du pic de GRP (Figure 27). Globalement, un volume d'oxygène compris entre 1000 et 1500 µL pour 1,5 L de moût suffit à consommer la totalité du glutathion. En terme quantitatif, il apparaît que les teneurs en GRP dosées sont plus importantes que ne le permet la stoechiométrie de la réaction de formation. La méthode de dosage du glutathion étant validée, il semble que celle du GRP surestime les valeurs réelles, probablement à cause du mode de génération de l'étalon analytique. En pratique, le GRP synthétique est produit *in situ* à partir d'acide *trans*-caftarique et de PPO extraits de raisin, sans que des contrôles poussés de pureté soient systématiquement réalisés. Néanmoins, les teneurs mesurées en GRP au cours de l'oxydation d'un moût restent valables puisque seules les tendances et évolutions sont prises en compte dans l'étude.

En cave, la vendange est protégée des mécanismes d'oxydation par sulfitage, inertage au CO<sub>2</sub> ou autres procédés. Par conséquent, la disparition du glutathion doit être plus ou moins modulée par rapport au modèle du laboratoire.

La formation des composés en C6 lors de l'oxydation des moûts de Melon B. et Sauvignon Blanc ne sont pas comparables : les teneurs en (*E*)-2-hexènal sont constantes tandis que celles du (*E*)-2-hexènoï augmentent significativement, notamment lors de l'observation du pic de concentration du GRP (Figure 27).

Le (*E*)-2-hexènal est une espèce intermédiaire dans le processus global d'oxydation enzymatique de l'acide linoléique : il résulte du clivage enzymatique de l'acide 1,3-hydroperoxylinoléique pour former dans un premier temps le (*Z*)-3-hexènal, qui après isomérisation, conduit au (*E*)-2-hexènal. De façon dynamique, il est consommé par l'activité alcool déshydrogénase pour former le (*E*)-2-hexènoï (Figure 27). Par conséquent, la mesure des teneurs en (*E*)-2-hexènal est la résultante de tous ces mécanismes enzymatiques. Si la vitesse de consommation du (*E*)-2-hexènal est équivalente à celle de sa formation, la résultante est constante au cours du processus d'oxydation.



**Figure 28 : Voie de formation du (*E*)-2-hexènal et du (*E*)-2-hexènoï via l'oxydation enzymatique de l'acide linoléique dans le raisin**

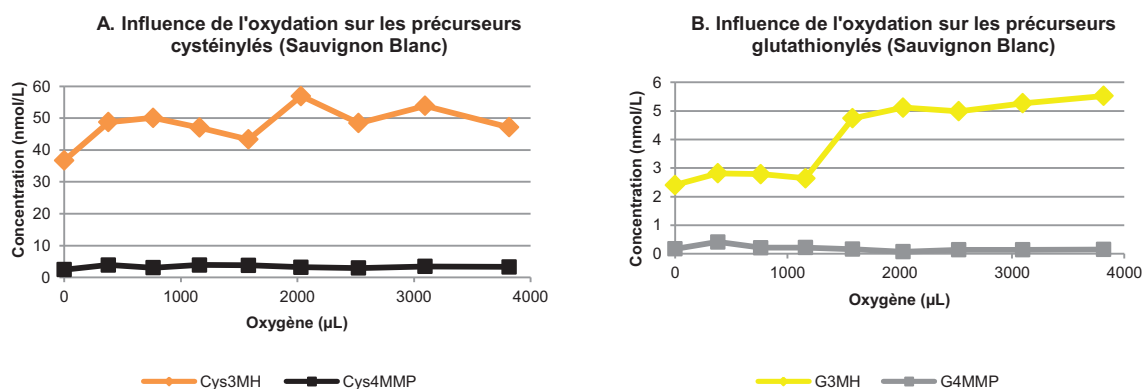
La libération du (*E*)-2-hexènoï, purement enzymatique, suit une loi de Michaelis-Menten. Etant un composé de fin de voie métabolique dans les moûts (Figure 28), il est cohérent qu'il s'accumule au cours du temps (140).

A partir d'un certain volume d'oxygène consommé par le moût, les teneurs en (*E*)-2-hexènoï évoluent différemment selon le cépage. Dans le cas du Melon B., la concentration en (*E*)-2-hexènoï double lorsque la consommation d'oxygène est proche de 3 mg/L. Pour le Sauvignon Blanc, la teneur en (*E*)-2-hexènoï diminue d'un facteur 1,5 à 2,5 selon le site d'implantation dès que le moût a consommé environ 4 mg/L d'oxygène. Ces observations peuvent être dues à la variabilité des activités lipoxygénase et alcool déshydrogénase entre les deux cépages. Pour le genre *Vitis vinifera*, 18 membres de lipoxygénase sont répertoriés (198) et pourraient effectivement expliquer les différentes évolutions de la teneur en (*E*)-2-hexènoï lors de l'oxydation d'un moût.

#### 4.3.3.2. Potentiel aromatique de type thiol

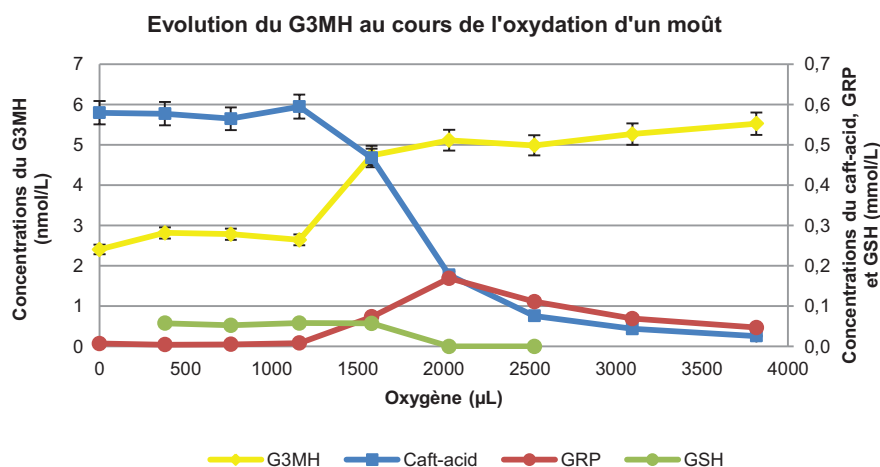
Ce paragraphe a fait l'objet d'une publication (Cf. article (3)) dont les principaux résultats sont résumés ci-dessous.

Les mécanismes d'oxydation impliquant les esters hydroxycinnamoyltartriques sont bien connus (154, 197, 199) alors qu'aucune donnée ne décrit précisément l'impact de l'oxygène sur le potentiel aromatique de type thiol. Par conséquent, les précurseurs de thiols ont été quantifiés dans des moûts de Melon B. et de Sauvignon Blanc soumis à une oxydation progressive à l'échelle laboratoire. Au cours du processus d'oxydation (Cf. paragraphe 3.3.3 : « 1<sup>ère</sup> génération de réacteur »), les teneurs en précurseurs cystéinylés n'évoluent pas, observation en cohérence avec leur structure chimique (liaison thioéther non oxydable) (Figure 29A). Il en est de même pour la G4MMP. En revanche, la concentration en G3MH augmente significativement pour un volume d'oxygène consommé proche de 1500 µL c'est-à-dire voisin de 2 mg/L (Figure 29B).



**Figure 29 : Evolution des teneurs en précurseurs cystéinylés (A) et glutathionylés (B) au cours du processus d'oxydation d'un moût de laboratoire (Sauvignon Blanc, Sancerre, 2007)**

Cette production de G3MH est concomitante avec le pic de GRP (Figure 30), suggérant une formation *in situ* de ce dernier au cours du pressurage. En effet, le glutathion résiduel présent dans le moût pourrait réagir sur le (*E*)-2-hexènal pour former le G3MH. Des résultats similaires sont observés pour des moûts de Melon B. oxydés progressivement à l'échelle du laboratoire.



**Figure 30 : Evolution des concentrations en G3MH, GRP, GSH et acide *trans*-caftarique au cours de l'oxydation d'un moût de Sauvignon Blanc (Sancerre, 2007)**

Pour confirmer cette production de G3MH au cours de l'oxydation d'un moût, une étude complémentaire a été conduite. En pratique, des moûts de Melon B. et de Sauvignon Blanc ont été enrichis en glutathion et/ou (*E*)-2-hexènal (1 mg/L) puis oxydés progressivement (Cf. paragraphe 3.3.3 « 2<sup>nde</sup> génération de réacteur) afin de mesurer l'évolution des teneurs en G3MH. Les doses de glutathion ajoutées aux moûts de Melon B. et Sauvignon Blanc sont de 50 et 100 mg/L respectivement, quantité permettant normalement de piéger les quinones disponibles.

Dans le cas du Melon B., l'addition de (*E*)-2-hexènal entraîne une sur-production d'environ + 200 % en G3MH alors que l'ajout de glutathion n'a aucun effet (Tableau 25A). Il semble donc que le (*E*)-2-hexènal soit le réactif limitant dans la formation de G3MH d'origine pré-fermentaire.

Dans le cas du Sauvignon Blanc, les augmentations en G3MH sont plus modestes au cours de l'oxydation et les ajouts de glutathion et /ou de (*E*)-2-hexènal ne permettent pas d'atteindre les sur-productions constatées sur le Melon B. Dans ce cas précis, le glutathion et le (*E*)-2-hexènal semblent tous deux être les réactifs limitants pour la formation de G3MH d'origine pré-fermentaire. Le glutathion, hautement sensible à l'oxydation, et le (*E*)-2-hexènal, issu de l'oxydation enzymatique des acides gras, ne peuvent être en contact lors de l'élaboration des moûts que dans des conditions bien spécifiques qui nécessitent des études plus poussées.

Au vu des résultats précédents, une concentration minimale en (*E*)-2-hexènal proche de 200 µg/L. semble être une valeur seuil à partir de laquelle du G3MH d'origine pré-fermentaire se forme dans le moût.

Selon le type de cépage, la proportion de G3MH d'origine pré-fermentaire peut atteindre jusqu'à 67 % de la quantité totale, soulignant l'importance des opérations conduisant à l'élaboration des moûts dans sa production (Tableau 25A). La maîtrise des phénomènes d'oxydation semble plus importante dans les variétés non-aromatiques.

**Tableau 25 : Influence de l'addition de glutathion et/ou de (E)-2-hexènal sur la production de G3MH (A) au cours de l'oxydation d'un moût de Melon B. et de Sauvignon Blanc et sur la révélation du 3MH et du 3MHA (B) après fermentation alcoolique (A : essais conduits à l'échelle du laboratoire, B : essais conduits à l'échelle pilote. Les teneurs en thiols sont exprimées par la somme du 3MH et 3MHA compte tenu de leur commune origine biogénétique dans le raisin.)**

Enrichissement du moût	A. Production de G3MH	
	Melon B.	Sauvignon Blanc
Témoin	+ 60 %	+ 5 %
Glutathion	+ 55 %	+ 15 %
(E)-2-hexènal	+ 200 %	+ 35 %
Glutathion et (E)-2-hexènal	+ 270 %	+ 40 %
Réactif limitant	(E)-2-hexènal	Glutathion et (E)-2-hexènal
Origine du G3MH	67 % pré-fermentaire	2 % pré-fermentaire

Enrichissement du moût	B. Production de 3MH + 3MHA	
	Melon B.	Sauvignon Blanc
Glutathion	comparable au témoin	+ 25 %
(E)-2-hexènal	+ 61 %	+ 41 %

Par ailleurs, l'étude a été complétée par des essais de mini-vinification (échelle pilote) sur des moûts initialement enrichis en glutathion ou (E)-2-hexènal (Tableau 25B). Ainsi, les vins de Melon B. dont les moûts ont été enrichis en (E)-2-hexènal, présentent des teneurs en 3MH et 3MHA supérieures au témoin, observation cohérente avec la sur-production de G3MH dans les mêmes conditions. Les moûts de Sauvignon Blanc enrichis en glutathion ou (E)-2-hexènal, donnent des vins plus riches en 3MH et 3MHA. Cette observation est cohérente avec l'augmentation de G3MH dans les mêmes conditions.

#### 4.3.4. Conclusions

Cet axe de travail avait pour but de modéliser l'impact des phénomènes d'oxydation sur les marqueurs d'oxydation et le potentiel aromatique de type thiol du Melon B. et du Sauvignon Blanc. Pour ce faire, les modèles ont été établis à l'échelle du laboratoire en utilisant des réacteurs de caractérisation et d'oxydation.

Globalement, le cépage Melon B. produit des moûts fortement oxydables (rapport acide *trans*-caftarique sur glutathion élevé, quantité de quinones disponibles importantes) et les dosages des composés en C6 suggèrent la présence d'une activité de type lipoxygénase plus forte que pour le cépage Sauvignon Blanc. Sur l'ensemble des marqueurs d'oxydation, l'influence variétale est beaucoup plus marquée que l'influence des sites d'implantation et des dates de récoltes, ce dernier paramètre n'ayant pas d'effet significatif sur la durée étudiée. Les moûts de Melon B. présentent des

teneurs en précurseurs de thiols plus faibles que ceux de Sauvignon Blanc. En fonction des sites d'implantations, le ratio Cys3MH/Cys4MMP est modulé pour le cépage Sauvignon Blanc. Enfin, les concentrations en précurseurs augmentent significativement au cours de la maturation du cépage Sauvignon Blanc, même sur une durée restreinte autour de la date de récolte. Seule la Cys4MMP semble évoluer différemment en fonction de la parcelle et du site d'implantation pour le cépage Sauvignon Blanc. Finalement, la caractérisation globale des moûts en composition (Figure 26) démontre un antagonisme variétal très fort pour les deux cépages considérés : l'un fortement oxydable et pauvre en précurseur de thiols, l'autre peu oxydable et riche en précurseurs de thiols.

Au cours de l'oxydation d'un moût, l'acide *trans*-caftarique, substrat majoritaire de la PPO, est oxydé pour former du GRP. De façon concomitante au pic de formation du GRP, les teneurs en glutathion deviennent non-détectables (< 1 mg/L). En fonction du cépage, les profils d'oxydation sont distincts en termes de quinones disponibles, le Melon B. étant plus riche en substrats d'oxydation. Paradoxalement, l'oxydation complète de l'acide *trans*-caftarique ne requiert pas davantage d'oxygène dans un moût de Melon B. que dans un moût de Sauvignon Blanc malgré une différence significative de la teneur en substrat. Par hypothèse, le Melon B. pourrait contenir des doses plus fortes en 3-flavanols ((+)-catéchine et (-)-épicatéchine) qui, par des réactions d'oxydations couplées, expliquerait la consommation similaire en oxygène pour les deux types de cépage. Enfin les composés en C6 présentent des teneurs constantes en (*E*)-2-hexènal (composé intermédiaire) et des évolutions très différentes en (*E*)-2-hexènole (composé de fin de voie métabolique), probablement liées à une activité lipoxygénase différente entre les cépages. En ce qui concerne le potentiel aromatique de type thiol, les teneurs en précurseurs cystéinylés et en G4MMP n'évoluent pas, phénomène en cohérence avec la structure chimique non-oxydable de ces composés. En revanche, la production de G3MH au cours du processus d'oxydation démontre une origine pré-fermentaire de ce dernier. En fonction du cépage, cette composante pré-fermentaire peut paraître négligeable (2 % pour le Sauvignon Blanc) ou majeure (67 % pour le Melon B.). L'oxydation ménagée des moûts peut donc, au cours des opérations pré-fermentaires, induire une augmentation du potentiel aromatique de type thiol.

Afin de valider ces modèles, des essais à l'échelle industrielle ont été conduits au cours des vendanges 2009 et sont présentés dans le chapitre suivant.

## 4.4. CHAPITRE 4 : APPLICATIONS INDUSTRIELLES



Les essais à l'échelle industrielle, présentés dans ce chapitre, ont été conduits lors des vendanges 2009 en partenariat avec l'Institut Français de la Vigne et du Vin (cave expérimentale de la Sicarex du Pays nantais) et la société Bucher Vaslin.

#### 4.4.1. Démarche expérimentale

Le but de cette étude est de comparer un pressurage traditionnel (RPF22) et un pressurage sous gaz inerte (Xplus 22 Inertys). Afin de ne faire varier que le type de pressurage, le procédé est totalement inerté dès la sortie du pressoir (inertage des tuyaux et des cuves de réception). Par ailleurs, des programmes de pressurage similaires ont assuré un fonctionnement identique des deux pressoirs.

L'étude a été réalisée sur sept vendanges différentes provenant du vignoble nantais dont six de cépage Melon B. et une de cépage Sauvignon Blanc (Tableau 26). Les vendanges, manuelle ou mécanique, sont réparties en deux lots homogènes dans chacun des pressoirs. Les jus de benne sont écartés de l'étude.

Lors du pressurage, les jus de goutte et de presse constituent la cuvée, tandis que ceux issus des fins de presse (séparation des jus effectuée lorsque la conductivité subit une augmentation entre 15 et 20 %) sont vinifiés séparément. Les deux pressoirs ont des rendements d'extraction similaires puisque les volumes de cuvée et de fins de presse sont similaires pour chaque essai (Tableau 26). La couleur des jus en sortie de pressoir est très différente selon le procédé utilisé (Figure 31).

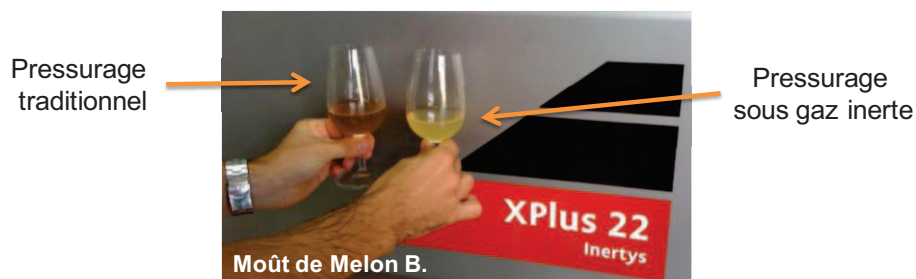


Figure 31 : Couleurs des jus de Melon B. en sortie de pressoir traditionnel et sous gaz inerte

Les moûts issus d'un pressurage traditionnel présentent un état de brunissement plus avancé que ceux extraits sous gaz inerte. Cette observation est également à mettre en corrélation avec les analyses élémentaires réalisées sur moûts après débourbage où les  $A_{420}$  (couleur jaune) sont plus faibles sur les jus obtenus sous gaz inerte (Tableau 26). Globalement, les moûts élaborés sous azote sont plus riches en polyphénols totaux ( $A_{280}$ ), en esters hydroxycinnamoyltartriques ( $A_{320}$ ) et en  $SO_2$  libre. Le pressurage sous gaz inerte protège bien les moûts du brunissement enzymatique.

Tableau 26 : Caractéristiques des expérimentations industrielles

Codes essai	Essai 1		Essai 2		Essai 3		Essai 4		Essai 5		Essai 6		Essai 7	
	P1		P2		P3		P4		P5		P6		P7	
Cépage	Melon B.	Melon B.	Melon B.	Melon B.	Melon B.	Melon B.	Melon B.	Melon B.	Sauvignon Blanc	Sauvignon Blanc	Melon B.	Melon B.	Melon B.	Melon B.
Commune de la parcelle	Loroux-Bottereau	Haie-Fouassière	Haie-Fouassière	Haie-Fouassière	Haie-Fouassière	Haie-Fouassière	Vertou	Vertou	Haute Goulaine	Haute Goulaine	Loroux-Bottereau	Loroux-Bottereau	Loroux-Bottereau	Vertou
Etat sanitaire (% pourri)	5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 1	< 1	10 - 15	10 - 15	10 - 15	5
Mode de récolte	Manuel	Mécanique	Mécanique	Mécanique	Mécanique	Mécanique	Mécanique	Mécanique	Mécanique	Mécanique	Manuel	Manuel	Manuel	Mécanique
Pressurage														
Codes essais	Classique P11	Inerté P12	Classique P21	Inerté P22	Classique P31	Inerté P32	Classique P41	Inerté P42	Classique P51	Inerté P52	Classique P61	Inerté P62	Classique P71	Inerté P72
Jus de Goutte (hL)	/	/	5,0	5,0	4,0	3,1	15,3	11,9	4,0	4,0	/	/	2,8	2,8
Jus de Presse (hL)	6,0	6,0	9,0	8,7	10,3	11,2	5,9	5,3	4,0	4,0	7,2	7,2	7,2	9,4
Jus de Fins de Presse (hL)	1,0	1,0	2,5	2,5	1,25	1,0	2,5	2,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,6	0,9
Augmentation conductivité (%)	/	/	12	12	16	16	16	15,5	17	19	/	/	40*	40*
<b>Caractéristiques analytiques des moûts après débouillage</b>														
Turbidité	45	40	55	55	80	75	135	120	40	40	20	20	90	80
Sucres (g/L)	188	188	179	180	180	176	172	171	175	175	190	192	172	172
Acidité totale (g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /L)	4,7	4,8	3,9	3,8	4,1	3,9	4,4	4,4	5,2	5,3	4,9	5,1	4,2	4,1
pH	3,33	3,37	3,39	3,38	3,46	3,45	3,37	3,39	3,38	3,39	3,36	3,39	3,33	3,28
Acide tartrique (g/L)	5,5	5,3	4,4	4,0	4,6	4,1	4,7	4,7	5,8	5,9	5,5	5,9	4,8	4,3
Acide malique (g/L)	4,2	4,3	3,4	3,6	4,1	4,0	4,3	4,3	5,3	5,3	4,2	4,8	4,0	3,9
Potassium (mg/L)	1 156	1 212	1 136	1 110	1 542	1 324	1 324	1 346	1 312	1 318	1 254	1 328	1 330	1 226
Azote assimilable (mg/L)	99	117	72	70	96	96	72	75	178	178	103	103	129	129
SO <sub>2</sub> libre (mg/L)	5	17	5	13	4	13	8	10	4	10	8	26	4	13
A <sub>420</sub>	0,275	0,216	0,236	0,220	0,390	0,284	0,178	0,114	0,155	0,146	0,129	0,084	0,153	0,125
A <sub>320</sub>	10,1	11,2	12,5	13,3	11,6	15,2	14,0	16,9	4,4	5,6	7,0	9,0	13,3	14,6
A <sub>280</sub>	9,1	9,6	10,6	10,9	10,8	12,5	11,7	13,5	6,0	6,4	6,5	7,7	11,4	12,1

(\* défaut de capteur)

Les expérimentations 1 et 7 ne sont pas valides pour deux raisons distinctes :

- P1 : défaillance de programmation sur le presseur Xplus 22 Inertys qui a entraîné un pressurage non inerté.
- P7 : séparation des jus de fins de presse tardifs à cause d'un défaut de capteur de conductivité.

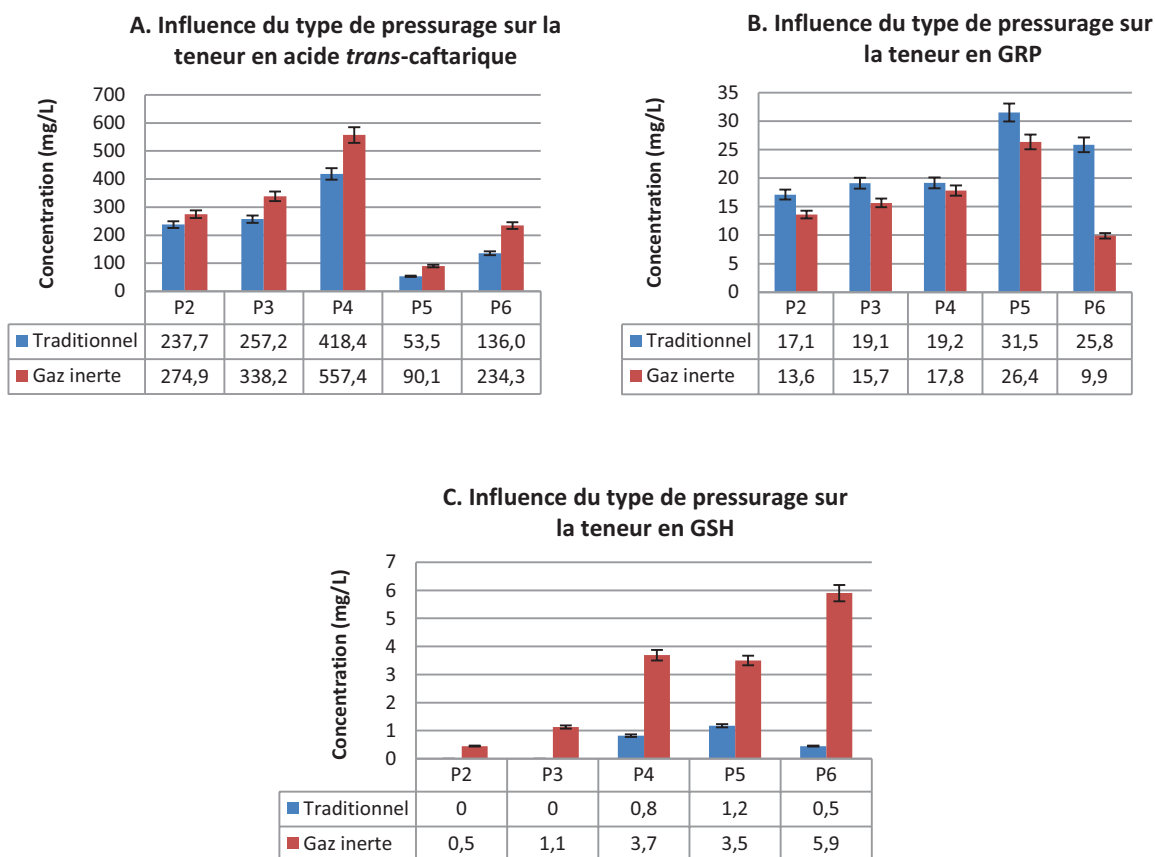
Par conséquent, seules les modalités P2 à P6 seront discutées dans les paragraphes suivants.

#### 4.4.2. Analyse des marqueurs d'oxydation

L'analyse de l'acide *trans*-caftarique, du GRP et du glutathion entre cuvées traditionnelle et sous gaz inerte montre une différence significative de concentration quel que soit le cépage considéré (Figure 32). En cohérence avec les indices globaux ( $A_{280}$ ,  $A_{420}$  et  $A_{320}$ ), les moûts obtenus sous inertage sont plus riches en acide *trans*-caftarique et en glutathion puisque les mécanismes d'oxydation impliquant l'activité enzymatique polyphénoloxydase sont limités. De même, les quantités de GRP dans les modalités inertées sont moindres. Le pressurage en condition d'inertage préserve bien les moûts de l'oxydation.

Les écarts de concentration entre cuvées traditionnelle et inertée sont plus importants pour les modalités P4, P5 et P6. Les modalités inertées ont subi un inertage plus poussé par saturation en  $CO_2$  de la maie et du presseur au remplissage. Par conséquent, l'inertage est intervenu beaucoup plus tôt dans le cycle de pressurage, préservant d'autant mieux les espèces réactives vis-à-vis des phénomènes d'oxydation

Les teneurs en glutathion mesurées sur les moûts en sortie de presseur sont faibles mais cohérentes avec les données de caractérisation. En effet, des concentrations en glutathion dans les baies de Melon B. comprises entre 9,4 et 21,2 mg/L selon les parcelles considérées ont été mesurées dans les échantillons de caractérisation. Lors des essais industriels, la majeure partie du glutathion a déjà réagit sous forme de GRP mais le bilan en équivalent de glutathion ( $n \text{ GRP} + n \text{ GSH}$ ) pour l'ensemble des modalités qui s'échelonne entre 8 et 17 mg/L, est cohérent avec les valeurs de caractérisations. Bien que ces teneurs soient plus faibles que celles présentées dans de précédents travaux (200, 201), elles reposent sur une méthodologie de dosage validée par ajouts dosés qui assurent la fiabilité des résultats. Ces faibles valeurs de glutathion sont à relier aux teneurs limitées en azote assimilable qui traduisent une alimentation azotée de la vigne déficiente, connue pour son effet négatif sur les concentrations en glutathion (202, 203).



**Figure 32 : Influence du type de pressurage sur les marqueurs d'oxydation de type acide *trans*-caftarique (A), GRP (B) et glutathion (C). (Les analyses sont réalisées sur des moûts en sortie de pressoir et issus des jus de cuvées. P2, P3, P4 et P6 : Melon B. ; P5 : Sauvignon Blanc)**

Il faut noter que même au cours d'un inertage total tel que nous l'avons réalisé, il y a systématiquement formation de GRP puisque des réactions d'oxydations peuvent se dérouler en amont des opérations pré-fermentaires (vendange) ou même au sein de la baie dès que son intégrité est rompue (présence d'oxygène dans les volumes interstitiels des cellules de la baie).

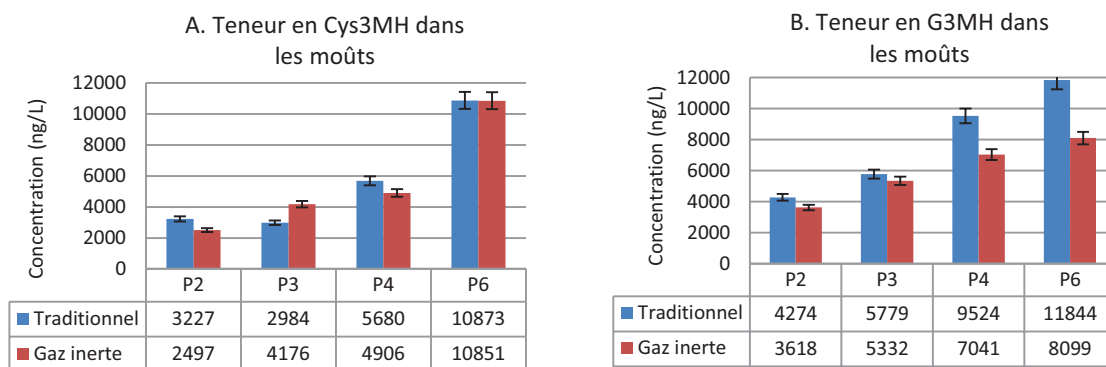
#### 4.4.3. Analyse du potentiel aromatique de type thiol

Pour des raisons de sensibilité, seuls les précurseurs du 3MH (Cys3MH et G3MH) ont été quantifiés dans les moûts de Melon B. et de Sauvignon Blanc.

##### 4.4.3.1. Cas du Melon B.

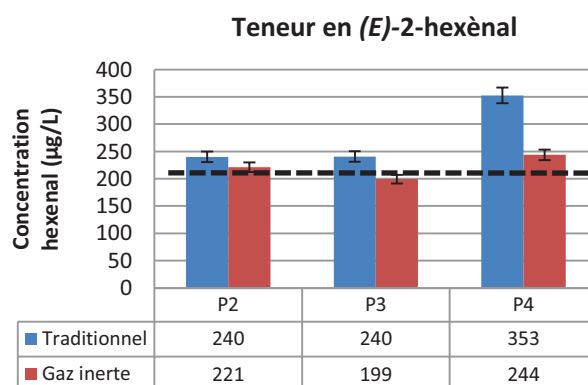
Les teneurs en Cys3MH sont similaires dans les cuvées des deux modalités (test de Newman-Keuls,  $\alpha = 0,05$ ) (Figure 33A). Selon l'origine des vendanges et notamment pour P6, l'abondance naturelle en Cys3MH varie significativement. Dans le cas de baies de raisin totalement infestées par *Botrytis cinerea*, les teneurs en Cys3MH augmentent fortement, jusqu'à 100 fois la dose initiale (204, 205). Ainsi au vu de l'état sanitaire de la vendange P6 (environ 10-15 % de *Botrytis cinerea*), un effet conjoint de la pourriture et du site d'implantation explique probablement les différences de teneurs en précurseurs.

*A contrario*, les concentrations en G3MH présentent des tendances globalement plus faibles dans les cuvées obtenues sous gaz inerte que dans les cuvées traditionnelles (Figure 33B). L'écart est d'autant plus important pour les essais P4 et P6 lorsque les jus de goutte ont été collectés sous gaz inerte. Cette observation est en cohérence avec le concept de formation pré-fermentaire du G3MH décrit par Roland *et al.* (189) pour des moûts élaborés puis oxydés à l'échelle du laboratoire. Il semblerait que l'inertage des jus de goutte soit l'opération qui influe le plus sur la formation de G3MH d'origine pré-fermentaire : Son absence entraîne une production de G3MH dans les moûts.



**Figure 33 : Influence du type de pressurage sur les teneurs en Cys3MH (A) et G3MH (B) dans des moûts de Melon B. (Les analyses sont réalisées sur des moûts en sortie de pressoir et issus des jus de cuvées.)**

La formation du G3MH lors des opérations pré-fermentaires dépend des quantités de (*E*)-2-hexène présentes dans les moûts. Une valeur seuil proche de 200 µg/L semble conditionner cette production dans les conditions du laboratoire (189). Dans les modalités P2 et P3, les teneurs en (*E*)-2-hexène sont similaires entre cuvées traditionnelles et inertées (Figure 34). De plus, les teneurs en (*E*)-2-hexène produites étant proches de la valeur seuil (200 µg/L), la production de G3MH d'origine pré-fermentaire dans ces modalités reste très modérée. En revanche, la modalité P4 contenant 353 µg/L de (*E*)-2-hexène (Figure 34), induit une production plus forte de 35 % en G3MH. Globalement, l'oxydation ménagée des moûts de Melon B. est favorable à l'augmentation du potentiel aromatique de type thiol.

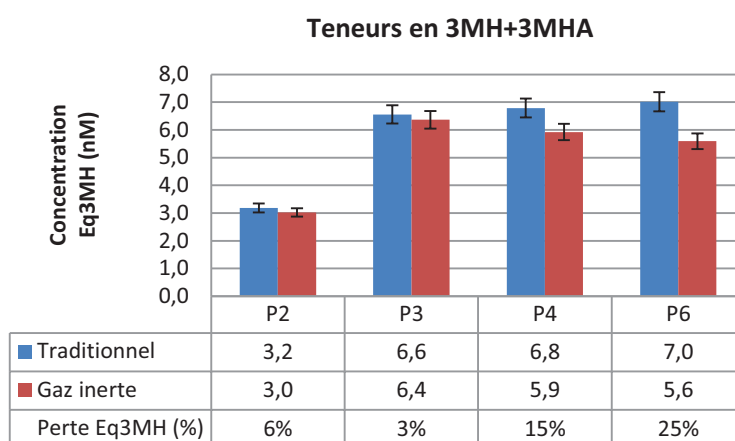


**Figure 34 : Influence du type de pressurage sur la teneur en (*E*)-2-hexène dans des moûts de Melon B. (Les analyses sont réalisées sur des moûts en sortie de pressoir et issus des jus de cuvées. Modalité P6 : problème analytique)**

Après vinification, les quantités de thiols (3MH et 3MHA) ont été mesurées dans les vins issus de chaque modalité. Les résultats sont exprimés en équivalent 3MH, puisque le 3MH et le 3MHA ont la même origine biogénétique en termes de précurseurs cystéinylés et glutathionylés. D'un point de vue aromatique, les deux composés présentent des seuils de perception très différents (60 ng/L pour le 3MH, 4,2 ng/L pour le 3MHA). Dans nos expérimentations, la proportion entre 3MH et 3MHA varie d'une matière première à l'autre, vraisemblablement à cause des teneurs en azote assimilable différentes, mais les deux modalités pour chaque matière première présente des ratios 3MH/3MHA similaires. Dans ces conditions, le raisonnement global sur les équivalents 3MH reste valable également en terme aromatique.

Les vins des cuvées P4 et P6 présentent des teneurs en thiols cohérentes avec celles des précurseurs : les cuvées traditionnelles sont globalement plus riches en thiols variétaux que les cuvées obtenues sous gaz inerte. Pour les essais P2 et P3, aucune différence significative ne peut être observée.

Dans ces expérimentations sur Melon B., l'utilisation d'un procédé inerté n'est pas en mesure d'apporter un gain de qualité sur l'arôme des vins. Une oxydation ménagée de ces moûts semble au contraire favorable.



**Figure 35 : Libération du 3MH et 3MHA dans les vins de Melon B. issus des cuvées traditionnelles et sous gaz inerte (Les concentrations sont exprimées en Eq3MH : Eq3MH = 3MH + 3MHA)**

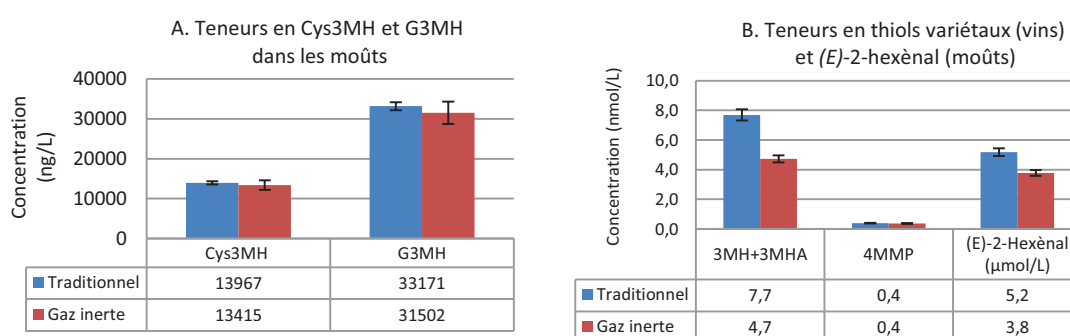
#### 4.4.3.2. Cas du Sauvignon Blanc

Les teneurs en précurseurs de thiols sont similaires entre cuvées traditionnelles et inertées (Figure 36A). Aucune production significative de G3MH d'origine pré-fermentaire n'est observée dans la cuvée traditionnelle malgré une concentration en (*E*)-2-hexènal proche de 500 µg/L (*i.e.* 5,2 µM) (Figure 36B). Cette observation est cohérente avec la proportion de G3MH d'origine pré-fermentaire estimée à 2 % dans des moûts de laboratoire (189). De plus, des essais d'ajout de (*E*)-2-hexènal dans des modalités réalisées à l'échelle pilote, se sont avérés modérément efficaces vis-à-vis de la production de G3MH pré-fermentaire (189) et conforte donc les résultats observés.

Après vinification, les teneurs en 4MMP sont strictement équivalentes pour les deux types de cuvée. En revanche, la libération de 3MH et de 3MHA est très influencée par le type de procédé puisque la

cuvée traditionnelle est dans notre cas, beaucoup plus riche en thiols que la cuvée inertée. Il faut remarquer cependant que l'augmentation de thiols obtenue ne se traduit pas par une différence olfactive notable (Figure 36B). La différence de concentration en 3MH et 3MHA sur les deux cuvées pourrait être expliquée par la voie de l'hexènal décrite par Schneider *et al.* (171). En effet, cette voie de biogenèse suppose l'existence d'un donneur de soufre (non-identifié à ce jour) qui pourrait impliquer le glutathion résiduel (ou tout autres dérivés peptidiques contenant un résidu cystéine) ou le sulfure d'hydrogène au cours de la fermentation alcoolique.

Ces essais ayant été conduits uniquement sur une seule vendange, une confirmation des résultats reste néanmoins nécessaire.



**Figure 36 : Influence du type de pressurage sur les teneurs en précurseurs (A), en (E)-2-hexènal (B) et en thiols variétaux (B) après vinification des moûts de Sauvignon Blanc. (Les analyses de précurseurs et (E)-2-hexènal sont réalisées sur des moûts en sortie de presseoir et issus des jus de cuvées.)**

#### 4.4.3.3. Dégustation

Dans les conditions de notre expérimentation, l'oxydation ménagée des moûts de Sauvignon Blanc semble contribuer positivement à la plus forte production de thiols. Néanmoins, ces résultats doivent être contre-balançés par les analyses sensorielles. Après 5 mois de conservation en bouteilles, les vins traditionnel et sous gaz inerte ont été présentés, sous forme d'épreuves triangulaires, à l'appréciation d'un collège de dégustateurs initiés. A cette occasion, les vins « Classiques » et « sous gaz inerte » de chacun des essais n'ont pu être différenciés (Tableau 27) malgré des hausses significatives en 3MH et 3MHA. L'explication réside peut être dans le fait qu'on ait des teneurs en thiols élevées si bien que la réponse intensité/concentration peut atteindre un palier (Loi de Stevens).

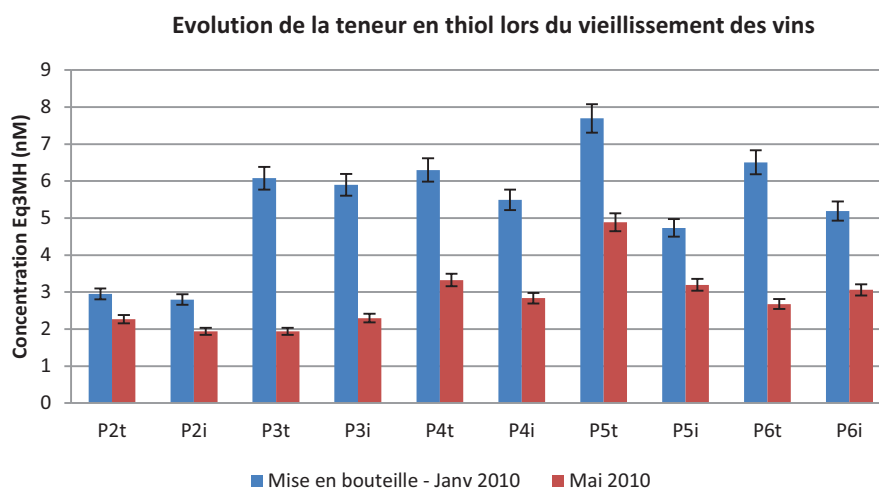
**Tableau 27 : Résultats des épreuves de dégustation triangulaires (juillet 2010)**

Modalités	P2	P3	P4	P5	P6
Nombre juges	13	13	13	13	13
Nombre réponses correctes	5	6	7	3	2
Signification statistique	NS	NS	NS	NS	NS

NS : non significatif au seuil 5%

#### 4.4.4. Influence du type de pressurage sur la conservation des thiols variétaux au cours du vieillissement des vins

Au cours du vieillissement, des mécanismes physico-chimiques modifient profondément l'arôme du vin par des phénomènes essentiellement oxydatifs (206, 207). Les vins obtenus après pressurage sous gaz inerte présentent une fraction polyphénolique plus importante que ceux dits « traditionnels ». Par conséquent, il est important de mesurer l'impact des substances oxydables sur la conservation des thiols. Pour cela, les vins ont été analysés lors de la mise en bouteilles (Janvier 2010) et 4 mois plus tard (Mai 2010). Globalement, les teneurs en 3MH+3MHA ont considérablement diminuées puisqu'une perte moyenne de 45 % est observée sur l'ensemble des modalités (Figure 37). Cette observation confirme les observations technologiques sur la tenue aromatique des vins de type thiol. Les modalités traditionnelles et inertées présentent des pertes aromatiques similaires dans quatre cas sur six, qui s'étagent selon l'origine de la vendange entre 20 et 70 %. Dans les expérimentations P3 et P6, la perte aromatique est plus accentuée pour la modalité traditionnelle alors qu'elle est plus atténuée dans l'essai P2. Les différences, quand elles existent, sont au maximum de 10 points, ce qui reste faible.



<b>Perte en Eq3MH</b>	<b>23%</b>	<b>31%</b>	<b>68%</b>	<b>61%</b>	<b>47%</b>	<b>48%</b>	<b>36%</b>	<b>33%</b>	<b>59%</b>	<b>41%</b>
<b>Modalités</b>	P2t	P2i	P3t	P3i	P4t	P4i	P5t	P5i	P6t	P6i

**Figure 37 : Influence du type de procédé sur la teneur en 3MH+3MHA et perte en Eq3MH au cours des premiers mois de vieillissement des vins (Pxt et Pxi avec x, le nombre d'essai et t ou i, les modalités traditionnelle et inertée respectivement)**

Dans nos conditions d'expérimentation et de stockage (température et durée), il apparaît donc que le type de pressurage semble peu influencer la perte aromatique au cours des premiers mois de vieillissement. Néanmoins, des études complémentaires (durée et température de stockage) sont nécessaires pour mieux cerner les conditions optimales de conservation des thiols variétaux dans les vins.



#### 4.4.5. Conclusions

Cette partie représente l'aboutissement des travaux de thèse par le transfert des modèles élaborés au laboratoire à l'échelle industrielle.

Dans le cas du Melon B., des différences de teneurs en précurseurs de thiols (G3MH) et en thiols entre les deux itinéraires technologiques peuvent être observées. Dans certains cas, les mouts issus du pressurage traditionnel présentent des teneurs en potentiel aromatique de type thiol plus élevées, dues à une augmentation de la teneur en G3MH, et les vins correspondants confirment cette tendance en termes de thiols libérés. Cette différence n'est cependant pas suffisante pour entraîner une différence organoleptique au niveau des produits.

Dans le cas du Sauvignon Blanc, aucune modification significative entre pressurages traditionnel et inerté n'intervient sur les précurseurs de thiols qu'ils soient cystéinylés ou glutathionylés. Dans ce seul essai sur Sauvignon Blanc, les vins finis présentent néanmoins des teneurs en thiols nettement inférieures dans la cuvée inertée. Ce résultat reste à confirmer d'autant plus qu'aucune explication ne peut être fournie à ce stade.

De manière générale, il apparaît que dans le cas de vendanges au potentiel aromatique de type thiol peu élevé et présentant une aptitude importante à l'oxydation comme le Melon B., l'inertage au cours du procédé n'est pas une solution adaptée pour améliorer la qualité aromatique des vins. Les gains qualitatifs sont vraisemblablement plus à rechercher du côté des pratiques culturales (fertilisation azotée ou pulvérisation azotée foliaire (202, 203), ou au niveau de la maîtrise des conditions de fermentations alcooliques (souche de levure, température et azote (191-193, 208-211) puis de stockage (194).

## **5. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES**

Fondée sur un constat technologique, la problématique de ce travail était d'élucider les mécanismes pré-fermentaires à l'origine de la perte aromatique dans les vins de Melon B. et de Sauvignon Blanc, lors de vendanges non-protégées de l'oxydation.

A l'issue de la thèse, un certain nombre d'avancées, tant scientifiques que technologiques, peuvent être dégagées :

- 1. Des apports méthodologiques :** Le développement et la validation de méthodes analytiques fiables permet désormais de quantifier l'ensemble des marqueurs d'oxydation tels que le glutathion et les composés en C6 en plus des esters hydroxycinnamoyltartriques et GRP, mais également le potentiel aromatique de type thiol. Cet axe de travail a requis la synthèse d'analogues marqués au deutérium des précurseurs de thiols et composés en C6 afin d'être utilisés en tant qu'étalons analytiques ou bien de traceurs lors d'essais de fermentation. Ces outils analytiques sont de véritables atouts en termes de caractérisation en composition et oxydation des raisins et des moûts, pour la compréhension des mécanismes d'élaboration de la qualité à la vigne et au chai.
- 2. L'acquisition de nouvelles connaissances scientifiques sur les mécanismes à l'origine de la biogenèse des thiols variétaux dans le vin :** L'utilisation de traceurs deutérés synthétiques a permis de démontrer par des outils microbiologiques, les filiations directes entre précurseurs glutathionylés et thiols variétaux (3MH et 4MMP), en conditions œnologiques. Les rendements de conversion observés les désignent comme seconds précurseurs majoritaires après les S-conjugués à la cystéine. Désormais, il faut considérer le potentiel aromatique de type thiol comme constitué à la fois des S-conjugués à la cystéine et ceux conjugués au glutathion.  
D'autre part, la modélisation des phénomènes d'oxydation à l'échelle laboratoire a permis de suivre les évolutions des précurseurs de thiols au cours du brunissement des moûts. Le potentiel aromatique de type thiol n'est pas affecté à ce stade par des mécanismes oxydatifs. Au contraire, une formation de G3MH concomitante avec l'apparition du pic de GRP est observée. L'origine pré-fermentaire du G3MH peut être négligeable ou majeure selon le type de cépage considéré. Dans le cas d'un cépage neutre comme le Melon B., cette origine est majoritaire (67 %). En revanche, elle reste négligeable pour le Sauvignon Blanc (2 %).  
Au vu des résultats, l'oxygène consommé par le moût conduit majoritairement à la formation de GRP et dans une moindre mesure au G3MH pré-fermentaire. La clé de l'amélioration du potentiel aromatique de type thiol pourrait se situer au niveau des cinétiques de chacune des réactions et des modulations de la température, des inhibiteurs partiels de la PPO ou encore une limitation des substrats (acide *trans*-caftarique) permettraient de favoriser la voie du G3MH.
- 3. Des aspects finalisés permettant une meilleure maîtrise de la qualité aromatique au cours des opérations pré-fermentaires :** Les modèles conçus à l'échelle laboratoire ont été éprouvés à l'échelle industrielle par comparaison de pressurages traditionnels et inertés. L'élaboration des moûts de Melon B. en conditions inertées défavorise la production de G3MH d'origine pré-fermentaire, si bien, qu'au niveau analytique, des pertes aromatiques jusqu'à 25 % en 3MH+3MHA peuvent être observées. Ces différences cohérentes en termes

mécanistiques avec les observations de laboratoire, ne sont pas cependant de nature à modifier la qualité aromatique des vins dans nos conditions expérimentales. Dans l'optique d'obtenir des vins de Melon B. et de Sauvignon Blanc de plus en plus aromatiques, l'élaboration des moûts en conditions d'inertage total ouvre la porte à l'utilisation de micro-oxygénations ou oxydations, ménagées et raisonnées, des jus afin de favoriser la formation de G3MH d'origine pré-fermentaire ou bien, de favoriser la voie de l'hexènal, tout deux, à l'origine de la libération de 3MH dans les vins.

Les travaux de thèse ont également ouvert la voie à des programmes de recherche finalisés, initiés au cours de la campagne viticole 2010 par l'Institut Français de la Vigne et du Vin, Interloire et la Sicavac sur les axes suivants :

1. Extraction des jus et contrôle de l'oxygène : étude de différents niveaux de protection de la vendange au cours de l'élaboration des moûts et impacts sur les marqueurs d'oxydations et potentiel aromatique de type thiol sur moût ainsi que sur la révélation des thiols variétaux sur vin.
2. Fractionnement et sélection des jus : suivi des marqueurs d'oxydation et du potentiel aromatique de type thiol au cours des différents cycles de pressurage et étude de différents type de collage sur des jus de fins de presses pour une meilleure valorisation.
3. Clarification des moûts : étude de la stabulation liquide à froid et du couple oxygène/température au cours de la fermentation alcoolique sur la révélation des thiols variétaux.

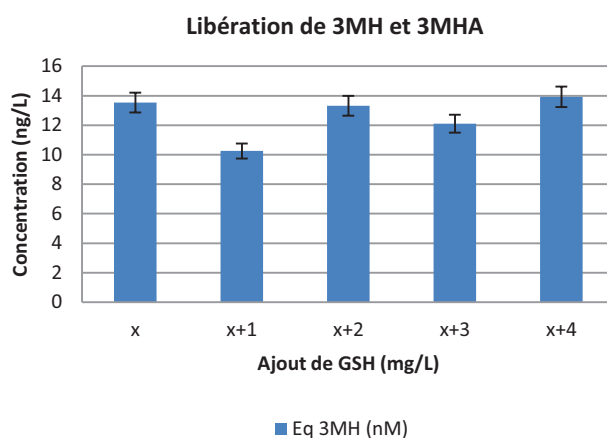
A terme, cette étude devrait apporter des préconisations techniques en matière de gestion et pilotage de la qualité aromatique des vins au cours de l'élaboration des mouts.

Après trois années de recherche, des questions subsistent quant au(x) rôle(s) joué(s) par le glutathion aux stades pré-fermentaire et fermentaire.

Lors de l'élaboration des moûts, le glutathion est impliqué dans le piégeage des quinones pour former du GRP et dans certains cas, dans la formation pré-fermentaire du G3MH. Cependant, des additions de glutathion effectuées dans des moûts de Melon B. et Sauvignon Blanc en sortie de pressoir, ne permettent pas dans la cuvée, la formation de G3MH supplémentaire. Néanmoins, les vins de Melon B. et de Sauvignon Blanc correspondants issus de jus de cuvée, présentent des teneurs en 3MH et 3MHA nettement plus fortes que les témoins. L'effet contraire est obtenu pour des vins élaborés à partir de jus de fin de presse enrichis en glutathion. Aucune explication ne peut être apportée à ces observations mais ce travail ouvre des pistes pour des études ultérieures.

La moitié de la production en thiols étant réalisée durant les premiers jours de la fermentation alcoolique, un transport efficace du G3MH dans la levure permettrait d'augmenter les rendements de conversion molaires. Etant donné que les transporteurs du G3MH et du GSH semblent identiques (15, 180), le glutathion pourrait catalyser l'entrée du G3MH dans la levure. Cette hypothèse a été testée par des essais de mini-vinifications sur un moût de Sauvignon Blanc, enrichi avec des quantités croissantes de glutathion. Dans nos conditions, les teneurs en 3MH et 3MHA ne varient pas

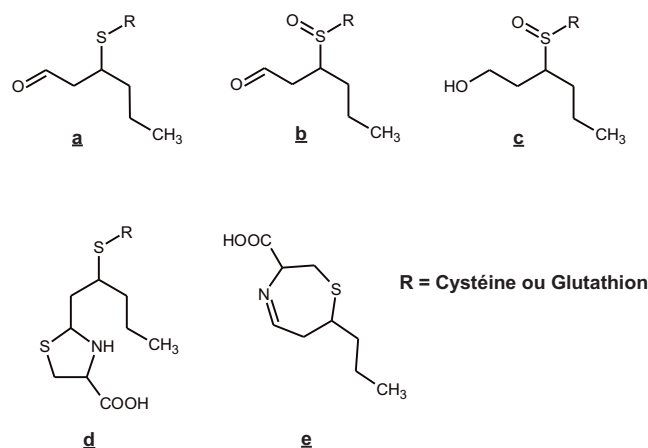
significativement, quelle que soit la dose initiale en glutathion ajoutée (Figure 38). Néanmoins, d'autres études avec différentes doses de glutathion et diverses conditions de fermentation doivent être envisagées.



**Figure 38 : Influence du glutathion sur la révélation du 3MH et 3MHA  
(Sauvignon Blanc, Sancerre)**

Les travaux réalisés uniquement au stade pré-fermentaire ne montrent aucune perte en potentiel aromatique de type thiol, l'effet contraire ayant été observé. *A priori*, les mécanismes à l'origine de la perte aromatique sont décalés dans le temps. Par hypothèse, ils pourraient avoir lieu au cours de la phase de latence de la fermentation alcoolique, phase durant laquelle les thiols commencent à être produits et où la quantité d'oxygène résiduel présente pourrait être non-négligeable. Par conséquent, les thiols peuvent être, soit oxydés en disulfures, soit piégés par des espèces de type quinones comme rapporté en milieu modèle (194). Cette étude nécessite le suivi des disulfures dans les vins (méthode en cours de développement) et la synthèse d'acide *trans*-caftarique deutéré comme marqueur pour suivre la formation des probables adduits.

Enfin, une dernière piste de travail concerne l'identification d'autres précurseurs de thiols. Les essais de stabulation à froid démontrent une forte corrélation entre libération du 3MH et 3MHA et durée de macération. Les teneurs en Cys3MH et G3MH ne variant pas et celles en (*E*)-2-hexène diminuant, la formation d'autres précurseurs pourrait expliquer cette sur-production de thiols. Des structures ayant un degré d'oxydation plus important (Figure 39) que les *S*-conjugués au glutathion ou à la cystéine, pourraient aisément être réduits.



**Figure 39 : Hypothèses de structures d'autres précurseurs du 3MH**

Une étude préliminaire en milieu modèle et naturel a été conduite sur le composé **a** (S-conjugué à la cystéine et au glutathion). Ces composés étant des intermédiaires de synthèse lors de l'obtention du G3MH  $d_2$  et du Cys3MH  $d_2$ , ils ont été aisément obtenus puis utilisés en tant que traceurs lors de mini-vinifications. Après fermentation, aucune trace de 3MH  $d_2$  n'a été détectée dans les vins modèles et de Sauvignon Blanc. Néanmoins, les autres structures restent à tester.

## **6. LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Les principaux composés d'arômes variétaux de type volatils et libres du raisin : terpènes, pyrazines et rotundone .....	16
Figure 2 : Structures chimiques des différentes classes de précurseurs glycosidiques identifiés dans le raisin .....	17
Figure 3 : Formation des phénols volatils durant la vinification et la conservation du vin.....	19
Figure 4 : Structure chimique de base des flavonoïdes .....	23
Figure 5 : Activités de la catécholoxydase.....	26
Figure 6 : Mécanismes d'oxydations pré-fermentaires conduisant à un brunissement irréversible du moût (152).....	27
Figure 7 : Formation du GRP .....	28
Figure 8 : Formation du GRP2 .....	28
Figure 9 : Schéma du système de pressurage sous vide et manuel des baies .....	40
Figure 10 : Réacteur dédié aux caractérisations des moûts en composition.....	40
Figure 11 : 1 <sup>ère</sup> génération de réacteur dédiée aux oxydations des moûts de laboratoire .....	41
Figure 12 : 2 <sup>nde</sup> génération de réacteur dédiée aux oxydations des moûts de laboratoire .....	41
Figure 13 : Dosage du glutathion par voie enzymatique.....	50
Figure 14 : Exemple de droite d'étalonnage obtenue pour une gamme de concentration du glutathion entre 2 et 30 mg/L.....	51
Figure 15 : Evolution de la concentration en glutathion pour trois échantillons de moût d'origines différentes en fonction de la cinétique de combinaison du SO <sub>2</sub> libre avec l'acétaldéhyde durant 5 jours à 40°C.....	52
Figure 16 : Evolution des vitesses initiales en fonction de la concentration en métabisulfite de sodium dans un moût synthétique .....	52
Figure 17 : Synthèse du (Z)-2-hexèno-1,3-diol d <sub>2</sub> et du mélange (Z) et (E) du 2-hexèno-1,3-diol d <sub>2</sub> (Cf. article (1)) .....	54
Figure 18 : Synthèse du Cys3MH naturel selon la méthode de Dagan (169).....	55
Figure 19 : Synthèse de la Cys4MMP naturelle selon la méthode de Dagan (169) .....	56
Figure 20 : Synthèse du G3MH d <sub>2</sub> /d <sub>3</sub> selon la méthode de Roland <i>et al.</i> (173) .....	57
Figure 21 : Synthèse du G3MH d <sub>2</sub> selon la méthode de Roland <i>et al.</i> (174) .....	58
Figure 22 : Synthèse de la G4MMP d <sub>10</sub> selon la méthode de Roland <i>et al.</i> (174) .....	58
Figure 23 : Les différentes voies de biogenèse des thiols variétaux dans le vin .....	63
Figure 24 : Identification du G3MH dans divers cépages.....	67
Figure 25 : Localisation des précurseurs de thiols dans la baie de Melon B. (A) et de Sauvignon Blanc (B). (Les valeurs correspondent à la moyenne des concentrations relevées pour un échantillon de 400 baies prélevées sur trois parcelles différentes par cépage.).....	69
Figure 26 : Caractérisation des moûts de Melon B. et Sauvignon Blanc en composition (Analyse en Composantes Principales) .....	79
Figure 27 : Evolution des teneurs en marqueurs d'oxydation au cours de l'addition d'oxygène dans des moûts de Melon B. (A) et de Sauvignon Blanc (B et C) élaborés à l'échelle du laboratoire. Les valeurs rapportées correspondent à la moyenne des concentrations pour les trois dates de récolte.....	81
Figure 28 : Voie de formation du (E)-2-hexèno-1,3-diol et du (E)-2-hexèno-1,3-diol via l'oxydation enzymatique de l'acide linoléique dans le raisin .....	83
Figure 29 : Evolution des teneurs en précurseurs cystéinylés (A) et glutathionylés (B) au cours du processus d'oxydation d'un moût de laboratoire (Sauvignon Blanc, Sancerre, 2007) .....	84



Figure 30 : Evolution des concentrations en G3MH, GRP, GSH et acide <i>trans</i> -caftarique au cours de l'oxydation d'un moût de Sauvignon Blanc (Sancerre, 2007) .....	85
Figure 31 : Couleurs des jus de Melon B. en sortie de pressoir traditionnel et sous gaz inerte.....	89
Figure 32 : Influence du type de pressurage sur les marqueurs d'oxydation de type acide <i>trans</i> -caftarique (A), GRP (B) et glutathion (C). (Les analyses sont réalisées sur des moûts en sortie de pressoir et issus des jus de cuvées. P2, P3, P4 et P6 : Melon B. ; P5 : Sauvignon Blanc) .....	92
Figure 33 : Influence du type de pressurage sur les teneurs en Cys3MH (A) et G3MH (B) dans des moûts de Melon B. (Les analyses sont réalisées sur des moûts en sortie de pressoir et issus des jus de cuvées.).....	93
Figure 34 : Influence du type de pressurage sur la teneur en ( <i>E</i> )-2-hexènal dans des moûts de Melon B. (Les analyses sont réalisées sur des moûts en sortie de pressoir et issus des jus de cuvées. Modalité P6 : problème analytique) .....	93
Figure 35 : Libération du 3MH et 3MHA dans les vins de Melon B. issus des cuvées traditionnelles et sous gaz inerte (Les concentrations sont exprimées en Eq3MH : Eq3MH = 3MH + 3MHA) .....	94
Figure 36 : Influence du type de pressurage sur les teneurs en précurseurs (A), en ( <i>E</i> )-2-hexènal (B) et en thiols variétaux (B) après vinification des moûts de Sauvignon Blanc. (Les analyses de précurseurs et ( <i>E</i> )-2-hexènal sont réalisées sur des moûts en sortie de pressoir et issus des jus de cuvées.) .....	95
Figure 37 : Influence du type de procédé sur la teneur en 3MH+3MHA et perte en Eq3MH au cours des premiers mois de vieillissement des vins (Pxt et Pxi avec x, le nombre d'essai et t ou i, les modalités traditionnelle et inertée respectivement).....	96
Figure 38 : Influence du glutathion sur la révélation du 3MH et 3MHA .....	101
Figure 39 : Hypothèses de structures d'autres précurseurs du 3MH .....	102

## **7. LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Les esters hydroxycinnamoyltartriques présents dans les raisins.....	23
Tableau 2 : Les flavonoïdes présents dans le raisin .....	25
Tableau 3 : Méthodologies analytiques permettant le dosage du glutathion dans des matrices de type raisins, moûts et vins.....	30
Tableau 4 : Caractéristiques du réseau de parcelles dans les vignobles du Val de Loire.....	34
Tableau 5 : Programme de pressurage pour de la vendange mécanique.....	37
Tableau 6 : Programme de pressurage pour de la vendange manuelle .....	37
Tableau 7 : Paramètres de validation de la méthode de dosage du glutathion dans des échantillons de moûts par l'analyseur d'acides aminés et détection UV.....	53
Tableau 8 : Paramètres de validation de la méthode de dosage des composés en C6 dans des échantillons de moûts par SIDA-SPME-GC-MS .....	54
Tableau 9 : Performances analytiques de la méthode de quantification des précurseurs de thiols par SIDA-NanoLC-MS/MS (Cf. article (2)). .....	60
Tableau 10 : Résumé des performances analytiques pour le dosage du GSH, des composés en C6 et des précurseurs de thiols .....	61
Tableau 11 : Conditions de fermentation, d'enrichissement en précurseur G3MH d <sub>2</sub> /d <sub>3</sub> et rendements de conversion molaire pour l'étude de filiation G3MH → 3MH (Cf. article (1)) .....	65
Tableau 12 : Influence de la concentration en glutathion sur le rendement de conversion du.....	65
Tableau 13 : Conditions de fermentation, d'enrichissement en précurseur G4MMP d <sub>10</sub> et rendements de conversion molaire pour l'étude de filiation G4MMP → 4MMP (Cf. article (5)) .....	66
Tableau 14 : Quantification du potentiel aromatique de type thiols dans divers cépages (Lorsque les teneurs détectées sont inférieures aux limites de détection, aucune valeur n'est reportée dans le tableau pour les concentrations minimum et maximum.) .....	68
Tableau 15 : Influence du site d'implantation sur la concentration et la distribution des précurseurs de thiols dans la pellicule et la pulpe de la baie de Sauvignon Blanc (concentrations exprimées en µg par kg de matière fraîche).....	70
Tableau 16 : Influence du pressurage sur l'extraction du Cys3MH et G3MH dans les moûts de Melon B. et Sauvignon Blanc et sur la révélation du 3MH et 3MHA.....	71
Tableau 17 : Influence de la stabulation liquide à froid sur les teneurs en précurseurs de thiols, composés en C6 et thiols variétaux (Sauvignon Blanc).....	71
Tableau 18 : Concentrations moyennes en acide <i>trans</i> -caftarique (La parcelle S présente des variations significatives de concentration au cours de la maturation. Chaque valeur représente une date de récolte : J-7, J et J+7). .....	75
Tableau 19 : Effets « cépage » et « site d'implantation » sur la teneur en acide <i>trans</i> -caftarique sur l'ensemble du réseau parcellaire dans la région du Val de Loire.....	75
Tableau 20 : Effet « date de récolte » sur la teneur en acide <i>trans</i> -caftarique pour la parcelle Silex (Sauvignon Blanc, Sancerre).....	76
Tableau 21 : Concentrations moyennes en glutathion dans les moûts de Melon B. et Sauvignon Blanc provenant des différentes parcelles situées en Val de Loire .....	76
Tableau 22 : Concentrations moyennes en ( <i>E</i> )-2-hexènal et en ( <i>E</i> )-2-hexènoïl dans les moûts de Melon B. et de Sauvignon Blanc provenant des différentes parcelles situées en Val de Loire (Les valeurs sont calculées à partir d'échantillons recueillis en triplicat pour trois dates de vendanges.) .....	77
Tableau 23 : Influence du cépage, du site d'implantation et de la date de récolte sur le potentiel aromatique de type thiol (J = Jour réel des vendanges) .....	78

Tableau 24 : Quantités de quinones d'acide <i>trans</i> -caftarique disponibles et pouvant être impliquées dans des réactions de brunissement des moûts .....	82
Tableau 25 : Influence de l'addition de glutathion et/ou de ( <i>E</i> )-2-hexènal sur la production de G3MH (A) au cours de l'oxydation d'un moût de Melon B. et de Sauvignon Blanc et sur la révélation du 3MH et du 3MHA (B) après fermentation alcoolique (A : essais conduits à l'échelle du laboratoire, B : essais conduits à l'échelle pilote. Les teneurs en thiols sont exprimées par la somme du 3MH et 3MHA compte tenu de leur commune origine biogénétique dans le raisin.).....	86
Tableau 26 : Caractéristiques des expérimentations industrielles .....	90
Tableau 27 : Résultats des épreuves de dégustation triangulaires (juillet 2010) .....	95

## **8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Tominaga, T.; Furrer, A.; Henry, R.; Dubourdieu, D., Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavor Fragrance J.* **1998**, 13, (3), 159-162.
2. Tominaga, T.; Darriet, P.; Dubourdieu, D., Identification of 3-mercaptohexanol acetate, compound having a powerful odor reminiscent of box-tree, involved in the aroma of Sauvignon wines *Vitis* **1996**, 35, 207-210.
3. Darriet, P. Recherches sur l'arôme et les précurseurs d'arôme du Sauvignon. Université Victor Segalen, Bordeaux II, 1993. p
4. Darriet, P.; Lavigne, V.; Boidron, J. N.; Dubourdieu, D., Caractérisation de l'arôme variétal des vins de Sauvignon par couplage CPG-Olfactométrie. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **1991**, 25, (3), 167-174.
5. Darriet, P.; Tominaga, T.; Lavigne, V.; Boidron, J. N.; Dubourdieu, D., Identification of a powerful aromatic component of *Vitis Vinifera* L.var. Sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one *Flavor Fragrance J.* **1995**, 10, 385-392.
6. Darriet, P.; Tominaga, T.; Lavigne, V.; Boidron, J. N.; Dubourdieu, D., Mise en évidence dans le raisin de *Vitis Vinifera* J. (var. Sauvignon) d'un précurseur de la 4-méthyl-4-mercaptopentan-2-one. *C. R. Acad. Sci. Paris* **1993**, 316, 1332-1335.
7. Guth, H., Identification of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, (8), 3022-3026.
8. Escudero, A.; Gogorza, B.; Melus, M. A.; Ortin, N.; Cacho, J.; Ferreira, V., Characterization of the aroma of a wine from maccabeo. Key role played by compounds with low odor activity values. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, (11), 3516-24.
9. Tominaga, T.; Baltenweck-Guyot, R.; Gachons, C. P. D.; Dubourdieu, D., Contribution of Volatile Thiols to the Aromas of White Wines Made From Several *Vitis vinifera* Grape Varieties. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, 51, (2), 178-181.
10. Dubourdieu, D.; Tominaga, T., Polyfonctionnal Thiol Compounds. In *Wine chemistry and biochemistry*, Moreno-Arribas, V.; Polo, C., Eds. Springer: 2009; p 275.
11. Tominaga, T. Recherche sur l'arôme des vins de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc et sa genèse à partir de précurseur inodore dans le moût. Université Victor Segalen, Bordeaux II, 1998. p
12. Tominaga, T.; Masneuf, I.; Dubourdieu, D., Mise en évidence d'un S-conjugué de la cystéine, précurseurs d'arôme du Sauvignon. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **1995**, 29, 227-232.
13. Tominaga, T.; Peyrot des Gachons, C.; Dubourdieu, D., A New Type of Flavor Precursors in *Vitis Vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-Cysteine Conjugates. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 5215-5219.
14. Peyrot des Gachons, C.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D., Sulfur Aroma Precursor Present in S-glutathione Conjugate Form: Identification of S-3-(Hexan-1-ol)-glutathione in Must from *Vitis Vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 4076-4079.
15. Subileau, M.; Schneider, R.; Salmon, J.-M.; Degryse, E., New Insights on 3-Mercaptohexanol (3MH) Biogenesis in Sauvignon Blanc Wines: Cys-3MH and (E)-Hexen-2-al Are Not the Major Precursors. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, (19), 9230-9235.
16. Drawert, F., The chemistry of winemaking as a biological-technological sequence. In *Chemistry of winemaking*, Society, A. C., Ed. Webb, A.D.: Washington, 1974; pp 1-10.
17. Baumes, R.; Schneider, R., Arômes. In *Le vin Rosé*, Flanzky, C.; Masson, G.; Millo, F., Eds. Féret: Bordeaux, 2009; pp 71-79.
18. Bayonove, C.; Cordonnier, R.; Dubois, P., Etude d'une fraction caractéristique de l'arôme du raisin de variété Cabernet-Sauvignon: mise en évidence de la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine. *C. R. Acad. Sci.* **1975**, D-281, 75-78.
19. Wood, C.; Siebert, T. E.; Parker, M.; Capone, D. L.; Elsey, G. M.; Pollnitz, A. P.; Eggers, M.; Meier, M.; Vossing, T.; Widder, S.; Krammer, G.; Sefton, M. A.; Herderich, M. J., From Wine to Pepper: Rotundone, an Obscure Sesquiterpene, Is a Potent Spicy Aroma Compound. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, (10), 3738-3744.
20. Torres, P., Vins de Liqueur - Vins Doux Naturels. In *Oenologie, Fondements Scientifique et Technologiques*, Flanzky, C., Ed. Tec & Doc Lavoisier: Paris, 1998; pp 848-858.

21. Ribereau-Gayon, P.; Boidron, J. N.; Terrier, A., Aroma of Muscat Grape Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **1975**, 23, (6), 1042-1047.
22. Razungles, A.; Günata, Z. Y.; Pinatel, S.; Baumes, R.; Bayonove, C., Etude quantitative de composés terpéniques, norisoprénoides et de leurs précurseurs dans diverses variétés de raisins. *Sci. Aliments* **1993**, 13, 59-72.
23. Usseglio-Tomasset, L.; R., D. S., Profilo aromatico del Moscato Bianco del Piemonte. *Riv. Vitic. Enol.* **1980**, 33, 145-168.
24. Strauss, C. R.; Wilson, B.; Gooley, P. R.; Williams, P. J., In *Biogenesis of Aromas*, Parliment, T. H.; Croteau, R., Eds. American Chemical Society: Washington, 1986.
25. Lacey, M. J.; Allen, M. S.; Harris, R. L. N.; Brown, W. V., Methoxypyrazines in Sauvignon blanc Grapes and Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, 42, (2), 103-108.
26. Allen, M. S.; Lacey, M. J.; Boyd, S., Determination of Methoxypyrazine in Red Wines by Stable-Isotope Dilution Gas-Chromatography Mass-Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, (8), 1734-1738.
27. Kotseridis, Y.; Baumes, R. L.; Bertrand, A.; Skouroumounis, G. K., Quantitative determination of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in red wines and grapes of Bordeaux using a stable isotope dilution assay. *J. Chromatogr. A* **1999**, 841, (2), 229-237.
28. Siebert, T. E.; Wood, C.; Elsey, G. M.; Pollnitz, A. P., Determination of rotundone, the pepper aroma impact compound, in grapes and wine. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, (10), 3745-3748.
29. Cordonnier, R.; Bayonove, C., Mise en évidence dans la baie de raisin, variété Muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzymes de fruits. *C. R. Ac. Sciences* **1974**, D-278, (26), 3387-3390.
30. Williams, P. J.; Strauss, C. R.; Wilson, B.; Massywestropp, R. A., Novel Monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis-vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry* **1982**, 21, (8), 2013-2020.
31. Voirin, S. G.; Baumes, R. L.; Bitteur, S. M.; Gunata, Z. Y.; Bayonove, C. L., Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis-vinifera* grapes. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, (6), 1373-1378.
32. Wirth, J.; Guo, W. F.; Baumes, R.; Gunata, Z., Volatile compounds released by enzymatic hydrolysis of glycoconjugates of leaves and grape berries from *Vitis vinifera* Muscat of Alexandria and Shiraz cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, (6), 2917-2923.
33. Schneider, R.; Razungles, A.; Charrier, F.; Baumes, R., Effet du site, de la maturité et de l'éclaircissement des grappes sur la composition aromatique des baies de *Vitis vinifera* L. cv. Melon B. dans le vignoble du Muscadet. *Bull. OIV* **2002**, 75, 269-282.
34. Ségurel, M. A.; Razungles, A. J.; Riou, C.; Trigueiro, M. G. L.; Baumes, R. L., Ability of Possible DMS Precursors To Release DMS during Wine Aging and in the Conditions of Heat-Alkaline Treatment. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, (7), 2637-2645.
35. Gunata, Z.; Blondeel, C.; Vallier, M. J.; Lepoutre, J. P.; Sapis, J. C.; Watanabe, N., An endoglycosidase from grape berry skin of cv. M. Alexandria hydrolyzing potentially aromatic disaccharide glycosides. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, (7), 2748-2753.
36. Ugliano, M.; Genovese, A.; Moio, L., Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, (17), 5073-5078.
37. Winterhalter, P., The generation of C13-norisoprenoids volatiles in Riesling wine. In *Connaissance aromatique des cépages et qualité des vins*, Crouzet, J.; Flanzy, C.; Martin, C.; Sapis, J. C., Eds. Montpellier, 1993; pp 65-73.
38. De La Presa-Owens, C.; Noble, A. C., Effect of storage at elevated temperatures on aroma of Chardonnay wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1997**, 48, (3), 310-316.
39. De Mora, S. J.; Eschenbruch, R.; Knowles, S. J.; Spedding, D. J., The formation of dimethyl sulphide during fermentation using a wine yeast. *Food Microbiol.* **1986**, 3, (1), 27-32.
40. Bamforth, C. W.; Anness, B. J., The role of dimethylsulfoxide reductase in the formation of dimethyl sulfide during fermentations. *J. I. Brewing* **1981**, 87, (1), 30-34.
41. Anness, B. J.; Bamforth, C. W., Dimethyl sulfide - A review. *J. I. Brewing* **1982**, 88, (4), 244-252.

42. Gibson, R. M.; Large, P. J.; Bamforth, C. W., The use of radioactive labeling to demonstrate the production of dimethyl sulfide from dimethyl-sulfoxide during fermentation of wort. *J. I. Brewing* **1985**, 91, (6), 397-400.
43. Anocibar Beloqui, A. Les composés soufrés volatils des vins rouges. Victor Segalen Bordeaux II, 1998. p 169.
44. Marais, J., Effect of storage time and temperature on the formation of dimethyl sulfide and on white wine quality. *Vitis* **1979**, 18, (3), 254-260.
45. Loscos, N.; Ségurel, M.; Dagan, L.; Sommerer, N.; Marlin, T.; Baumes, R., Identification of S-methylmethionine in Petit Manseng grapes as dimethyl sulphide precursor in wine. *Anal Chim Acta* **2008**, 621, (1), 24-29.
46. Leppanen, O.; Denslow, J.; Ronkainen, P., Gas-chromatographic method for the accurate determination of low concentrations of volatiles sulfur-compounds in alcoholic beverages. *J. I. Brewing* **1979**, 85, (6), 350-353.
47. Segurel, M. A.; Razungles, A. J.; Riou, C.; Salles, M.; Baumes, R. L., Contribution of dimethyl sulfide to the aroma of Syrah and Grenache Noir wines and estimation of its potential in grapes of these varieties. *J Agric Food Chem* **2004**, 52, (23), 7084-93.
48. Blaise, A., Altérations organoleptiques des vins. In *Oenologie, Fondements Scientifique et Technologiques*, Flanzy, C., Ed. Tec & Doc Lavoisier: Paris, 1998; pp 1182-1216.
49. Guedes de Pinho, P. Caractérisation des vins de la région de Vinhos Verdes au Portugal. Reconnaissance chimique et sensorielle des vins de cépages blancs non *Vitis vinifera*. Bordeaux II, 1994. p
50. Dugelay, I.; Gunata, Z.; Sapis, J. C.; Baumes, R.; Bayonove, C., Role of cinnamoyl esterase-activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, 41, (11), 2092-2096.
51. Dugelay, I.; Baumes, R.; Gunata, Z.; Razungles, A.; Bayonove, C., Aroma evolution during wine aging - Formation of 4-(1-ethoxyethyl)-phenol and 4-(1-ethoxyethyl)-gaïacol. *Sci. Aliments* **1995**, 15, (5), 423-433.
52. Heresztyn, T., Metabolism of volatile phenolic-compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. *Arch. Microbiol.* **1986**, 146, (1), 96-98.
53. Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, J. N.; Pons, M., The origins of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, 60, (2), 165-178.
54. Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, J. N., Le caractère phénolé des vins rouges : caractérisation, origine et moyens de lutte. *Rev. Fran. Oenol.* **1992**, 138, 21-24.
55. Etievant, P. X.; Issanchou, S. N.; Marie, S.; Ducruet, V.; Flanzy, C., Sensory impact of volatile phenols on red wine aroma - Influence of carbonic maceration and time of storage. *Sci. Aliments* **1989**, 9, (1), 19-33.
56. Crouzet, J., Les enzymes et l'arôme des vins. *Rev. Fran. Oenol.* **1986**, 102, 42-49.
57. Cordonnier, R.; Bayonove, C., Etude de la phase pré-fermentaire de la vinification : extraction et formation de certains composés de l'arôme ; ces des terpénols, des aldéhydes et des alcools en C6. *Conn. Vigne Vin* **1981**, 15, 269-286.
58. Rapp, A.; Knipser, W.; Engel, L.; Ullemeyer, H.; Heimann, W., Off-flavor compounds in the berry and wine aroma of grapevine hybrids. 1. The strawberry-like flavour. *Vitis* **1980**, 19, (1), 13-23.
59. Ségurel, M. Contribution des précurseurs glycosidiques et du sulfure de diméthyle des baies de *Vitis vinifera* L. cv Grenache noir et Syrah à l'arômes des vins de la vallée du Rhône. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, Montpellier, 2005. p 248.
60. Guedes de Pinho, P.; Bertrand, A., Analytical determination of furaneol (2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone). Application to differentiation of white wines from hybrid and various *Vitis vinifera* cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, 46, (2), 181-186.
61. Kotseridis, Y. Etude de l'arôme des vins de Merlot et Cabernet Sauvignon de la région bordelaise. Université Victor Segalen Bordeaux II, 1999. p 268.



62. Ferreira, V.; Ortin, N.; Escudero, A.; Lopez, R.; Cacho, J., Chemical characterization of the aroma of Grenache rose wines: aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory reconstitution studies. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, (14), 4048-54.
63. Ayrapaa, T., On the formation of higher alcohols by yeast and its dependence on nitrogenous nutrients. *Kem. Tidskr.* **1971**, 83, 79-90.
64. Nykänen, L., Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages *Am. J. Enol. Vitic.* **1986**, 37, 84-96.
65. Bidan, P., Relation entre la teneur des vins en alcools supérieurs et la teneur des moûts en substances azotées, en particulier en acides aminés. *Bull. OIV* **1975**, 48, 842-867.
66. Jiranek, V.; Langridge, P.; Henschke, P. A. In *Nitrogen requirement of yeast during wine fermentation*, Proceedings of the seventh Australian wine industry technical conference, 1990; Williams, P. J.; Davidson, D. M.; Lee, T. H., Eds. Australian Industry Publishers: Adelaide, 1990; pp 166-171.
67. Dubois, P., Les arômes des vins et leurs défauts. *Rev. Fran. Oenol.* **1994**, 145, 27-40.
68. Dubois, P., Les arômes des vins et leurs défauts. *Rev. Fran. Oenol.* **1994**, 145, 39-50.
69. Etiévant, P., Wine. In *Volatile Compounds in Foods and Beverages*, H., M., Ed. Dekker Inc.: New-York, Basel, Hong-Kong, 1991; pp 483-546.
70. Simpson, R. F., Some important aroma components of white wine. *Food Technol. Aust.* **1979**, 31, (12), 516-522.
71. Herraiz, T.; Herraiz, M.; Reglero, G.; Martin-Alvarez, P. J.; Cabezudo, M. D., Changes in the composition of fatty acids during the alcoholic fermentation of grape must. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm/* **1990**, 12, 185-188.
72. Houtman, A. C.; Marais, J.; Duplessis, C. S., Factors affecting the reproducibility of fermentation of grape juice and of the aroma composition of wines. 1. Grape maturity, sugar, inoculum concentration, aeration, juice turbidity and ergosterol. *Vitis* **1980**, 19, (1), 37-54.
73. Nykanen, L., Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am. J. Enol. Vitic.* **1986**, 37, (1), 84-96.
74. Shinohara, T., L'importance des substances volatiles du vin. Formation et effet sur la qualité. *Bull. OIV* **1984**, 641/642, 606-618.
75. Geneix, S.; Lafon-Lafourcade; Ribéreau-Gayon, P., Les causes, la prévention et le traitement des arrêts de la fermentation alcoolique. *Conn. Vigne Vin* **1983**, 17, 205-217.
76. Ribéreau-Gayon, P., New developments in wine microbiology. *Am. J. Enol. Vitic.* **1985**, 36, (1), 1-10.
77. Etiévant, P., Volatile phenol determination in wine. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 29, 65-67.
78. Guth, H., Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, (8), 3027-3032.
79. Bertrand, A.; Anocibar Beloqui, A.; Guedes de Pinho, P.; Kotseridis, Y. In *Arômes variétaux et de fermentation*, OIV, 1995; Punta des este (Uruguay), 1995; pp 63-94.
80. Ribéreau-Gayon, P., In *Flavor of foods and beverages. Chemistry and technology*, Charalambous, G.; Inglette, G. E., Eds. Academic Press: New-York, 1978; pp 362-371.
81. Amerine, M. A.; Roessler, E. B., In *Wines. Their sensory evaluation.*, Freeman: New-York, 1976; pp 72-77.
82. Bertuccioli, M.; Daddi, C.; Sensidoni, A., Evaluating wine quality by the application of statistical methods to analytical GC data. In *Sensory quality in foods and beverages: definition, measurement and control*, Williams, A. A.; Atkin, R. K., Eds. Society of Chemical Industry: London, 1993; pp 353-358.
83. Ferreira, V.; Lopez, R.; Escudero, A.; Cacho, J. F., The aroma of Grenache red wine: Hierarchy and nature of its main odorants. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, 77, (2), 259-267.
84. Ferreira, V.; Fernandez, P.; Pena, C.; Escudero, A.; Cacho, J., Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of young spanish wines by multivariate analysis. *J. Sci. Food Agric.* **1995**, 67, 381-392.

85. Piggott, J. R.; Findlay, A. J. F., Detection thresholds of ester mixtures. In *Flavour research of alcoholic beverages - Instrumental and sensory analysis*, Nykänen, L.; Lehtonen, P., Eds. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research: Helsinki, 1984; pp 189-197.
86. Lavigne, V.; Boidron, J. N.; Dubourdieu, D., Dosage des composés soufrés volatils légers dans les vins par chromatographie en phase gazeuse et photométrie de flamme. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **1993**, 27, 1-12.
87. Park, S. K.; Boulton, R. B.; Bartra, E.; Noble, A. C., Incidence of volatile sulfur-compounds in California wines - A preliminary survey. *Am. J. Enol. Vitic.* **1994**, 45, (3), 341-344.
88. Anocibar Beloqui, A.; Bertrand, A., Study on sulfur compounds in wine: preliminary results. *Ital. J. Food Sci.* **1995**, 3, 279-289.
89. Chatonnet, P.; Lavigne, V.; Boidron, J. N.; Dubourdieu, D., Identification and analysis of heavy volatile sulfur-compounds in wines by gas-chromatography and flame photometry. *Sci. Aliments* **1992**, 12, (3), 513-532.
90. Rauhut, D.; Kuerbel, H., The production of H<sub>2</sub>S from elemental sulfur residues during fermentation and its influence on the formation of sulfur metabolites causing off-flavours in wine. *Wein-Wissenschaft* **1994**, 49, (1), 49 (1) 27-36.
91. Schreier, P., Flavor composition of wines - Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrition* **1979**, 12, (1), 59-111.
92. Rapp, A.; Gunter, M.; Almy, J., Identification and significance of several sulfur-containing compounds in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1985**, 36, 219-221.
93. Rapp, A.; Mandery, H., Wine aroma. *Experientia* **1986**, 42, (8), 873-884.
94. Chatonnet, P.; Boidron, J. N.; Pons, A., Elevage des vins rouges en fûts de chêne: Evolution de certains composés volatils et de leur impact aromatique. *Sci. Aliments* **1990**, 10, 565-587.
95. Tominaga, T.; Guimberteau, G.; Dubourdieu, D., Role of certain volatile thiols in the bouquet of aged champagne wine. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 1016-1020.
96. 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), 1799-1802.
97. Tominaga, T.; Guimbertau, G.; Dubourdieu, D., Contribution of benzenemethanethiol to smoky aroma of certain *Vitis vinifera* L. wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, (5), 1373-1376.
98. Simpson, R., Aroma composition of bottle aged white wines. *Vitis* **1979**, 18, 148-154.
99. Simpson, R.; Miller, G. C., Aroma composition of aged Riesling wine. *Vitis* **1983**, 22, 51-63.
100. Aiken, J. W.; Noble, A. C., Composition and sensory properties of Cabernet Sauvignon wine aged in French versus American oak barrels. *Vitis* **1984**, 23, (1), 27-36.
101. Francis, I. L.; Sefton, M. A.; Williams, P. J., A study by sensory descriptive analysis of the effects of oak origin, seasoning, and heating on the aromas of oak model wine extracts. *Am. J. Enol. Vitic.* **1992**, 43, (1), 23-30.
102. Masson, G.; Puech, J. L.; Moutounet, M., Composition chimique du bois de chêne de tonnellerie. *Bull. OIV* **1996**, 785-786, 635-657.
103. Boidron, J. N.; Chatonnet, P.; Pons, M., Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *Conn. Vigne Vin* **1988**, 22, 275-294.
104. Nishimura, K. M.; Ohnishi, M.; Masuda, M.; Koga, K.; Matsuyama, R., Reactions of wood components during maturation. In *Flavour of distilled beverages. Origin and development*, Ellis Horwood: Chichester, 1983; pp 241-255.
105. Maga, J. A., The contribution of wood to the flavor of alcoholic beverages. *Food Rev. Int.* **1989**, 5, (1), 39-100.
106. Sefton, M. A.; Francis, I. L.; Williams, P. J., Volatile norisoprenoid compounds as constituents of oak woods used in wine and spirit maturation. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, (11), 2045-2049.
107. Dubois, P., Apports du fût de chêne neuf à l'arôme des vins. *Rev. Fran. Oenol.* **1989**, 144, 63-72.

108. Blanchard, L.; Tominaga, T.; Dubourdiou, D., Formation of Furfurylthiol Exhibiting a Strong Coffee Aroma during Oak Barrel Fermentation from Furfural Released by Toasted Staves. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, (10), 4833-4835.
109. Guichard, E.; Pham, T. T.; Charpentier, C., Le sotolon, marqueur de la typicité de l'arôme des vins du Jura. *Rev. Oenologues* **1997**, *82*, 32-34.
110. Pham, T. T.; Guichard, E.; Charpentier, C., Conditions optimales de formation du sotolon à partir de l'acide  $\alpha$ -cétobutyrique dans le vin jaune du Jura. In *5ème symposium international d'oenologie de Bordeaux*, Lonvaud-Funel, A., Ed. Lavoisier, Tec-Doc: Paris, 1996; pp 613-616.
111. Guichard, E.; Pham, T. T.; Charpentier, C., Quantitative determination of sotolon in wines by high performance liquid chromatography. *Chromatographia* **1993**, *37*, 539-542.
112. Masuda, M.; Okawa, E.; Nishimura, K.; Yunome, H., Identification of 4,5-dimethyl-3-hydroxy-2(5H)-furanone (Sotolon) and ethyl 9-hydroxynonanoate in botrytized wine and evaluation of the roles of compounds characteristic of it. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, (11), 2707-2710.
113. Cutzach, I.; Chatonnet, P.; Dubourdiou, D., Rôle du sotolon dans l'arôme des Vins Doux Naturels non muscatés. Influence des conditions d'élevage et de vieillissement. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **1998**, *32*, (2), 223-233.
114. Schneider, R.; Baumes, R.; Bayonove, C.; Razungles, A., Volatile compounds involved in the aroma of sweet fortified wine. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3230-3237.
115. Dubois, P.; Rigaud, J.; Dekimpe, J., Identification of 4,5-dimethyl tetrahydrofuran-2,3-dione in a french flor sherry wine. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1976**, *9*, (6), 366-368.
116. Ribéreau-Gayon, Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies. *C. R. Ac. Sciences* **1965**, *260*, 341.
117. Ong, B. Y.; Nagel, C. W., High-pressure liquid-chromatographic analysis of hydroxycinnamic acid, tartaric acid-esters and their glucose esters in *Vitis vinifera*. *J. Chromatogr.* **1978**, *157*, (SEP), 345-355.
118. Singleton, V. L.; Timberlake, C. F.; Lea, A. G. H., The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *J. Sci. Food Agric.* **1978**, *29*, 403-410.
119. Somers, T. C.; Verette, E.; Pocock, K. F., Hydroxycinnamate esters of *Vitis-vinifera* - Changes during white vinification, and effects of exogenous enzymatic-hydrolysis. *J. Sci. Food Agric.* **1987**, *40*, (1), 67-78.
120. Cheynier, V.; Moutounet, M.; Sarni-Manchado, P., Les composés phénoliques. In *Oenologie, Fondements Scientifique et Technologiques*, Flanzy, C., Ed. Tec & Doc Lavoisier: Paris, 1998; pp 124-162.
121. Okamura, S.; Watanabe, M., Determination of phenolic cinnamates in white wine and their effect on wine quality. *Agric. Biol. Chem.* **1981**, *45*, (9), 2063-2070.
122. Romeyer, F. M.; Sapis, J. C.; Macheix, J. J., Hydroxycinnamic esters and browning potential in mature berries of some grape varieties. *J. Sci. Food Agric.* **1985**, *36*, (8), 728-732.
123. Cheynier, V.; Souquet, J. M.; Moutounet, M., Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis-vinifera* grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* **1989**, *40*, (4), 320-324.
124. Boursiquot, J. M.; Sapis, J. C.; Macheix, J. J., Application of hydroxycinnamic ester determinations to taxonomy problems in *Vitis* genus - Preliminary results. *C. R. Ac. Sciences* **1986**, *302*, (6), 177-180.
125. Romeyer, F. M.; Macheix, J. J.; Goiffon, J. J.; Reminiac, C. C.; Sapis, J. C., Browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, (2), 346-349.
126. Ribéreau-Gayon, P.; Sudraud, P.; Milhe, J. C.; Canbas, A., Recherches technologiques sur les composés phénoliques des vins rouges. *Conn. Vigne Vin* **1970**, *4*, 133-144.
127. Morlat, R.; Asselin, C., L'effet terroir et sa gestion. Application en Val de Loire. *Rev. Fran. Oenol.* **1992**, *139*, 43-53.
128. Dubernet, M.; Ribereaugayon, P., Study of some characteristic properties of laccase from *Botrytis-cinerea*. *C. R. Ac. Sciences* **1975**, *280*, (10), 1313-1316.

129. Mayer, A. M.; Harel, E., Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* **1979**, 18, (2), 193-215.
130. Gunata, Y. Z.; Moutounet, M., Activités de la polyphénoloxydase du raisin et de la laccase de *Botrytis cinerea* sur les dérivés hydroxycinnamiques comparés à d'autres substrats polyphénoliques. *Rev. Fran. Oenol.* **1988**, 113, 10-15.
131. Dubernet, M.; Ribereau, P., Polyphenoloxidases of healthy grapes and grapes parasitized by *Botrytis-cinerea*. *C. R. Ac. Sciences* **1973**, 277, (11), 975-978.
132. Salgues, M.; Cheynier, V.; Gunata, Z.; Wylde, R., Oxidation of grape juice 2-S-glutathionyl caffeoyl tartaric acid by *Botrytis cinerea* laccase and characterization of a new substance 2,5-di-S-glutathionyl caffeoyl tartaric acid. *J. Food Sci.* **1986**, 51, 1191-1194.
133. Gunata, Z. Y.; Sapis, J. C.; Moutounet, M., Substrates and aromatic carboxylic acid inhibitors of grape phenol oxidases. *Phytochemistry* **1986**, 26, 1-3.
134. Gunata, Z.; Moutounet, M., Activités de la polyphénoloxydase du raisin et de la laccase de *Botrytis cinerea* sur les dérivés hydroxycinnamiques comparées à d'autres substrats phénoliques. *Rev. Fran. Oenol.* **1988**, 113, 42-47.
135. Lee, C. Y.; Smith, N. L.; Pennesi, A. P., Polyphenoloxidase from De Chaunac grapes. *J. Sci. Food Agric.* **1983**, 34, (9), 987-991.
136. Wissemann, K. W.; Lee, C. Y., Characterization of polyphenoloxidase from Ravat 51 and Niagara grapes. *J. Food Sci.* **1981**, 46, (2), 506-&.
137. Gunata, Y. Z.; Sapis, J. C.; Moutounet, M., Substrates and aromatic carboxylic inhibitors of grape phenol oxidases. *Phytochemistry* **1987**, 26, (6), 1573-1575.
138. Singleton, V. L., Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems - Observations and practical implications. *Am. J. Enol. Vitic.* **1987**, 38, (1), 69-77.
139. Cheynier, V.; Osse, C.; Rigaud, J., Oxidation of grape juice phenolic-compounds in model solutions. *J. Food Sci.* **1988**, 53, (6), 1729-&.
140. Crouzet, J.; Flanzy, C.; Gunata, Y. Z.; Pellerin, P.; Sapis, J. C., Les enzymes en oenologie. In *Oenologie, Fondements Scientifique et Technologiques*, Flanzy, C., Ed. Tec & Doc Lavoisier: Paris, 1998; pp 362-411.
141. Macheix, J. J.; Sapis, J. C.; Fleuriet, A., Phenolic-compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *CR. Food Sci. Nutr.* **1991**, 30, (4), 441-486.
142. Guerzoni, M. E.; Suzzi, G., Inhibition by yeast strain of tyrosinase activity in must and wine. *Vitis* **1976**, 14, (4), 14 (4) 302-314.
143. Dubernet, M.; Ribereau-Gayon, P.; Lerner, H. R.; Harel, E.; Mayer, A. M., Purification and properties of laccase from *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **1977**, 16, (2), 191-193.
144. Mayer, A. M., Grape and wine oxidases. *Ann. Technol. Agric.* **1978**, 27, (1), 149-159.
145. Kovac, V., Inactivation of grape oxidases by chemical methods. *Bull. OIV* **1979**, 52, (584), 809-826.
146. Kovac, V., Recent results on use of bentonites. Enzymatic aspects. *Bull. OIV* **1979**, 52, (581/582), 560-574.
147. Cheynier, V.; Rigaud, J.; Moutounet, M., Oxidation-kinetics of *trans*-caffeoyltartrate and its glutathione derivatives in grape musts. *Phytochemistry* **1990**, 29, (6), 1751-1753.
148. Rigaud, J.; Cheynier, V.; Souquet, J. M.; Moutounet, M., Influence of must composition on phenolic oxidation-kinetics. *J. Sci. Food Agric.* **1991**, 57, (1), 55-63.
149. Cheynier, V.; Ricardo-da-Silva, J. M., Oxidation of grape procyanidins in model solutions containing *trans*-caffeoyl tartaric acid and polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, (6), 1047-1049.
150. Cheynier, V. F.; Van Hulst, M. W. J., Oxidation of *trans*-caftaric acid and 2-S-glutathionylcaftaric acid in model solutions. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, 36, (1), 10-15.
151. Sarni, P.; Fulcrand, H.; Souillol, V.; Souquet, J. M.; Cheynier, V., Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like model solutions. *J. Sci. Food Agric.* **1995**, 69, (3), 385-391.
152. Cheynier, V.; Basire, N.; Rigaud, J., Mechanism of *trans*-caffeoyl tartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, 37, (4), 1069-1071.

153. Singleton, V. L.; Salgues, M.; Zaya, J.; Trousdale, E., Caftaric Acid Disappearance and Conversion to Products of Enzymic Oxidation in Grape Must and Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1985**, *36*, (1), 50-56.
154. Cheynier, V. F.; Trousdale, E. K.; Singleton, V. L.; Salgues, M. J.; Wylde, R., Characterization of 2-S-glutathionyl caftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, (2), 217-221.
155. Friedman, M., Improvement in the safety of foods by sulfhydryl-containing amino acids and peptides. A review. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, (1), 3-20.
156. Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V.; Moutounet, M., Reactions of polyphenoloxidase generated caftaric acid *o*-quinone with malvidin 3-O-glucoside. *Phytochemistry* **1997**, *45*, (7), 1365-1369.
157. Camera, E.; Picardo, M., Review: Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *J. Chromatogr. B* **2002** *781*, 181-206.
158. Friedman, M., Food Browning and Its Prevention: An Overview. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, (3), 631-653.
159. Molnar-Perl, I.; Friedman, M., Inhibition of browning by sulfur amino acids. 3. Apples and potatoes. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, (8), 1652-1656.
160. Molnar-Perl, I.; Friedman, M., Inhibition of browning by sulfur amino acids. 2. Fruit juices and protein-containing foods. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, (8), 1648-1651.
161. Cheynier, V.; Souquet, J. M.; Moutounet, M., Glutathione Content and Glutathione to Hydroxycinnamic Acid Ratio in *Vitis vinifera* Grapes and Musts. *Am. J. Enol. Vitic.* **1989**, *40*, (4), 320-324.
162. Okuda, T.; Yokotsuka, K., Levels of glutathione and activities of related enzymes during ripening of koshu and Cabernet Sauvignon grapes and during winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, *50*, (3), 264-270.
163. Du Toit, W. J.; Lisjak, K.; Stander, M.; Prevoo, D., Using LC-MSMS To Assess Glutathione Levels in South African White Grape Juices and Wines Made with Different Levels of Oxygen. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 2765-2769.
164. Lavigne, V.; Pons, A.; Dubourdieu, D., Assay of glutathione in must and wines using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection Changes in concentration in dry white wines during alcoholic fermentation and aging *J. Chromatogr. A* **2007**, *1139* 130-135.
165. Park, S. K.; Boulton, R. B.; Noble, A. C., Automated HPLC analysis of glutathione and thiol-containing compounds in grape juice and wine using pre-column derivatization with fluorescence detection. *Food Chem.* **2000**, *68*, (4), 475-480.
166. Park, S. K.; Boulton, R. B.; Noble, A. C., Formation of Hydrogen Sulfide and Glutathione During Fermentation of White Grape Musts. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51*, (2), 91-97.
167. Janes, L.; Lisjak, K.; Vanzo, A., Determination of glutathione content in grape juice and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *674*, (2), 239-242.
168. Fedrizzi, B.; Pardon, K. H.; Sefton, M. A.; Elsey, G. M.; Jeffery, D. W., First Identification of 4-S-Glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a Potential Precursor of 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon Blanc Juice. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, (3), 991-995.
169. Dagan, L. Potentiel aromatique des raisins de *Vitis Vinifera* L. cv. Petit Manseng et Gros Manseng. Contribution à l'arôme des vins de pays Côtes de Gascogne. PhD, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 2006. p 238.
170. Rodríguez-Bencomo, J. J.; Schneider, R.; Lepoutre, J. P.; Rigou, P., Improved method to quantitatively determine powerful odorant volatile thiols in wine by headspace solid-phase microextraction after derivatization. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, (30), 5640-5646.
171. Schneider, R.; Charrier, F.; Razungles, A.; Baumes, R., Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wines. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, (1-2), 58-64.

172. Schneider, R. Contribution à la connaissance de l'arôme et du potentiel aromatique du Melon B. (*Vitis Vinifera* L.) et des vins de Muscadet. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Montpellier, 2001. p 222.
173. Roland, A.; Schneider, R.; Le Guernevé, C.; Razungles, A.; Cavelier, F., Identification and quantification by LC-MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: Elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chem.* **2010**, 121, 847-855.
174. Roland, A.; Schneider, R.; Razungles, A.; Le Guernevé, C.; Cavelier, F., Straightforward synthesis of deuterated precursors to demonstrate the biogenesis of aromatic thiols in wine. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, doi: 10.1021/jf101996p.
175. Grant-Preece, P. A.; Pardon, K. H.; Capone, D. L.; Cordente, A. G.; Sefton, M. A.; Jeffery, D. W.; Elsey, G. M., Synthesis of Wine Thiol Conjugates and Labeled Analogues: Fermentation of the Glutathione Conjugate of 3-Mercaptohexan-1-ol Yields the Corresponding Cysteine Conjugate and Free Thiol. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, (3), 1383-1389.
176. Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M., Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **2003**, 75, (13), 3019-3030.
177. Murat, M.-L.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D., Assessing the Aromatic Potential of Cabernet Sauvignon and Merlot Musts Used to Produce Rose Wine by Assaying the Cysteinylated Precursor of 3-Mercaptohexan-1-ol. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 5412-5417.
178. Roland, A.; Vialaret, J.; Moniatte, M.; Rigou, P.; Razungles, A.; Schneider, R., Validation of a nano liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the identification and the accurate quantification by isotopic dilution of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in white grape juices. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 1626-1635.
179. Schneider, R.; Kotseridis, Y.; Ray, J. L.; Augier, C.; Baumes, R., Quantitative determination of sulfur-containing wine odorants at sub parts per billion levels. 2. Development and application of a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, (11), 3243-3248.
180. Subileau, M. Paramètres influants sur la libération des thiols variétaux par la levure *saccharomyces cerevisiae* : d'un milieu synthétique à la complexité d'un moût de Sauvignon blanc. PhD, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier, 2008. p 156.
181. Kobayashi, H.; Takase, H.; Kaneko, K.; Tanzawa, F.; Takata, R.; Suzuki, S.; Konno, T., Analysis of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione and S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine in *Vitis vinifera* L. cv. Koshu for aromatic wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2010**, 61, (2), 61 (2) 176-185.
182. Capone, D. L.; Sefton, M. A.; Hayasaka, Y.; Jeffery, D. W., Analysis of Precursors to Wine Odorant 3-Mercaptohexan-1-ol Using HPLC-MS/MS: Resolution and Quantitation of Diastereomers of 3-S-Cysteinylohexan-1-ol and 3-S-Glutathionylhexan-1-ol. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, (3), 1390-1395.
183. Peyrot des Gachons, C.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D., 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. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 3387-3391.
184. Maggu, M.; Winz, R.; Kilmartin, P. A.; Trought, M. C. T.; Nicolau, L., Effect of Skin Contact and Pressure on the Composition of Sauvignon Blanc Must. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, (25), 10281-10288.
185. Roland, A.; Schneider, R.; Charrier, F.; Cavelier, F.; Rossignol, M.; Razungles, A., Distribution of varietal thiol precursors in the skin and the pulp of Melon B. and Sauvignon Blanc grapes. *Food Chem.* **2010**, doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.050.
186. Peyrot des Gachons, C.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D., Localisation of S-cysteine conjugates in the berry: Effect of skin contact on aromatic potential of *Vitis Vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc must. . *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, 53 (2), 144-146.

187. Carbonneau, A.; Moueix, A.; Leclair, N.; Renoux, J. L., Proposition d'une méthode de prélèvement de raisins à partir de l'analyse de l'hétérogénéité de maturation sur un cep. *Bull. OIV* **1991**, 64, 679-690.
188. Choné, X. Contribution à l'étude des terroirs de Bordeaux : étude des déficits hydriques modérés, de l'alimentation en azote et de leurs effets sur le potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. PhD thesis, University of Bordeaux, 2001. p 188.
189. Roland, A.; Vialaret, J.; Razungles, A.; Rigou, P.; Schneider, R., Evolution of S-cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors during oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc musts. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, (7), 4406-4413.
190. Patel, P.; Herbst-Johnstone, M.; Lee, S. A.; Gardner, R. C.; Weaver, R.; Nicolau, L.; Kilmartin, P. A., Influence of Juice Pressing Conditions on Polyphenols, Antioxidants, and Varietal Aroma of Sauvignon blanc Microferments. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, (12), 7280-7288.
191. Dubourdiou, D.; Tominaga, T.; Masneuf, I.; Peyrot des Gachons, C.; Murat, M. L., The Role of Yeasts in Grape Flavor Development during Fermentation: The Example of Sauvignon blanc. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, 57, (1), 81-88.
192. Masneuf-Pomarede, I.; Mansour, C.; Murat, M. L.; Tominaga, T.; Dubourdiou, D., Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, 108, (3), 385-90.
193. Thibon, C.; Marullo, P.; Claisse, O.; Cullin, C.; Dubourdiou, D.; Tominaga, T., Nitrogen catabolic repression controls the release of volatile thiols by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *FEMS Yeast Res* **2008**, 8, (7), 1076-86.
194. Nikolantonaki, M.; Chichuc, I.; Teissedre, P.-L.; Darriet, P., Reactivity of volatile thiols with polyphenols in a wine-model medium: Impact of oxygen, iron, and sulfur dioxide. *Anal. Chim. Acta* **2009**, 660, (1-2), 102-109.
195. Boursiquot, J. M. Contribution à l'étude des esters hydroxycinnamoyltartriques chez le genre *Vitis*. Recherche d'application taxonomique. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 1987. p 194.
196. Romeyer, F. M.; Macheix, J. J.; Goiffon, J. P.; Reminiac, C. C.; Sapis, J. C., The browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid tartaric acid-esters during development and maturation of the fruit. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, 31, (2), 346-349.
197. Cheynier, V.; Rigaud, J.; Souquet, J. M.; Duprat, F.; Moutounet, M., Must Browning in Relation to the Behavior of Phenolic Compounds During Oxidation. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, 41, (4), 346-349.
198. Podolyan, A.; White, J.; Jordan, B.; Winefield, C., Identification of the lipoxygenase gene family from *Vitis vinifera* and biochemical characterisation of two 13-lipoxygenases expressed in grape berries of Sauvignon Blanc. *Functional Plant Biology* **2010**, 37, 767-784.
199. Cheynier, V.; Schneider, R.; Salmon, J.-M.; Fulcrand, H., Chemistry of Wine. In *Comprehensive Natural Products II, Chemistry and Biology*, Mander, L.; Lui, H.-W., Eds. Elsevier: Oxford, 2010; Vol. 3, pp 1119-1172.
200. Lavigne, V.; Pons, A.; Dubourdiou, D., Assay of glutathione in must and wines using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection Changes in concentration in dry white wines during alcoholic fermentation and aging *J Chromatogr A* **2007**, 1139 130-135.
201. Du Toit, W. J.; Lisjak, K.; Stander, M.; Prevo, D., Using LC-MSMS To Assess Glutathione Levels in South African White Grape Juices and Wines Made with Different Levels of Oxygen. *J Agric Food Chem* **2007**, 55, 2765-2769.
202. Choné, X.; Lavigne-Cruège, V.; Tominaga, T.; Leeuwen, C. V.; Castagnède, C.; Saucier, C.; Dubourdiou, D., Effect of vine nitrogen status on grape aromatic potential: Flavor precursors (S-cysteine conjugates), glutathione and phenolic content in *Vitis Vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc grape juice. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **2006**, 40, (1), 1-6.
203. Lacroux, F.; Tregoat, O.; Leeuwen, C. V.; Pons, A.; Tominaga, T.; Lavigne-Cruège, V.; Dubourdiou, D., Effect of foliar nitrogen and sulphur application on aromatic expression of *Vitis Vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **2008**, 42, (3), 125-132.

204. Thibon, C.; Dubourdieu, D.; Darriet, P.; Tominaga, T., Impact of noble rot on the aroma precursor of 3-sulfanylhexanol content in *Vitis vinifera* L. cv Sauvignon blanc and Semillon grape juice. *Food Chem.* **2009**, 114, (4), 1359-1364.
205. Thibon, C.; Shinkaruk, S.; Jourdes, M.; Bennetau, B.; Dubourdieu, D.; Tominaga, T., Aromatic potential of botrytized white wine grapes: Identification and quantification of new cysteine-S-conjugate flavor precursors. *Anal Chim Acta* **2010**, 660, (1-2), 190-196.
206. Hofmann, T.; Schieberle, P.; Grosch, W., Model Studies on the Oxidative Stability of Odor-Active Thiols Occurring in Food Flavors. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, (1), 251-255.
207. Skouroumounis, G. K.; Kwiatkowski, M. J.; Francis, I. L.; Oakey, H.; Capone, D. L.; Duncan, B.; Sefton, M. A.; Waters, E. J., The impact of closure type and storage conditions on the composition, colour and flavour properties of a Riesling and a wooded Chardonnay wine during five years' storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2005**, 11, (3), 369-377.
208. Howell, K. S.; Swiegers, J. H.; Elsey, G. M.; Siebert, T. E.; Bartowsky, E. J.; Fleet, G. H.; Pretorius, I. S.; de Barros Lopes, M. A., Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. *FEMS Microbiol Lett* **2004**, 240, (2), 125-9.
209. Murat, M.-L.; Masneuf, I.; Darriet, P.; Lavigne, V.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D., Effect of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strains on the Liberation of Volatile Thiols in Sauvignon blanc Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, 52, (2), 136-139.
210. Subileau, M.; Schneider, R.; Salmon, J.-M.; Degryse, E., Nitrogen catabolite repression modulates the production of aromatic thiols characteristic of Sauvignon Blanc at the level of precursor transport. *FEMS Yeast Res* **2008**, 8, 771-780.
211. Swiegers, J. H.; Willmott, R.; Hill-Ling, A.; Capone, D. L.; Pardon, K. H.; Elsey, G. M.; Howell, K. S.; de Barros Lopes, M. A.; Sefton, M. A.; Lilly, M.; Pretorius, I. S., Modulation of volatile thiol and ester aromas by modified wine yeast. In *"Flavour science - recent advances and trends"*, Elsevier: Amsterdam, 2006; Vol. 43 of Development in Food science.



## **9. PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES**



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

Analytical Methods

## Identification and quantification by LC–MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: Elements for understanding the 3MH production in wine

Aurélié Roland<sup>a,b,\*</sup>, Rémi Schneider<sup>c,\*</sup>, Christine Le Guernevé<sup>b</sup>, Alain Razungles<sup>b</sup>, Florine Cavalier<sup>d</sup><sup>a</sup> Interloire, 12 rue Etienne Pallu, BP 1921, 37019 Tours Cedex 01, France<sup>b</sup> UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, INRA, SupAgro, Université Montpellier I, 34060 Montpellier Cedex 01, France<sup>c</sup> Institut Français de la Vigne et du Vin, at UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, INRA, 34060 Montpellier Cedex 01, France<sup>d</sup> IBMM, UMR-CNRS 5247, Universités Montpellier I et II, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 July 2009

Received in revised form 24 December 2009

Accepted 28 December 2009

## Keywords:

Glutathione

3-Mercaptohexan-1-ol

Stable isotope dilution assay

Fermentation

Wine

Aroma precursor

Thiols

## ABSTRACT

The isotopically labelled S-3-(hexan-1-ol)-glutathione  $d_2/d_3$  (G3MHD<sub>2</sub>/d<sub>3</sub>) was synthesized with a strategy based on acid-labile protecting groups. The natural analogue of this compound could be a precursor of 3-mercaptohexanol, a varietal thiol reminiscent of grape fruit, released during alcoholic fermentation. In a first time, deuterated glutathione conjugate was used to perform identification and quantification by stable isotope dilution assay of G3MH in musts from several varieties: Sauvignon, Riesling and Gewürztraminer.

In a second time, synthetic and natural musts (Sauvignon Blanc) were spiked by G3MHD<sub>2</sub>/d<sub>3</sub> at different levels from 12 to 150  $\mu\text{g L}^{-1}$  to demonstrate the relationship between 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) and G3MH. GC–ITMS/MS analysis of the resulting wines clearly showed the formation of the corresponding deuterated 3MH, that proves the direct connection with G3MH under enological conditions. In Sauvignon Blanc grape juice, a conversion yield of 4.4% was found in duplicate for an initial spiking of G3MH  $d_2/d_3$  equivalent to 12  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Although volatile thiols exhibit generally unpleasant smelling (Etiévant, 1991), some of them have been identified as qualitative contributors to the varietal and typical aroma of some wines. Among those, three compounds, 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one (4MMP), 3-mercaptohexan-1-ol (3MH also called 3-sulfanylh-exan-1-ol according to IUPAC recommendations) and 3-mercaptohexyl acetate (3MHA), are widely recognised as key aroma compounds in wines. If 4MMP seems to be specific to few varieties such as Chenin (Du Plessis & Augustyn, 1981), Bacchus (Rapp & Pretorius, 1989), Sauvignon (Darriet, Tominaga, Lavigne, Boidron,

& Dubourdieu, 1995) and Scheurebe (Guth, 1997), 3MH and 3MHA are ubiquitous and have been identified in many white varieties (Colombard, Chenin, Sauvignon, Manseng, Melon B., Semillon) (Dagan, 2006; Tominaga, Baltenweck-Guyot, Peyrot des Gachons, & Dubourdieu, 2000) but also in red grapes such as Grenache (Ferreira, Ortin, Escudero, Lopez, & Cacho, 2002). Sensorial descriptors linked to these thiols correspond to fruity aromas (grape fruit, passion fruit) for 3MH and 3MHA, whereas 4MMP is reminiscent of box tree and blackcurrant bud (Tominaga et al., 2000).

The 3MH constitutes the most abundant thiol in comparison to other thiols with a concentration in wine ranging from 100 to 3500  $\text{ng L}^{-1}$  (Mateo-Vivaracho, Cacho, & Ferreira, 2007). In hydro-alcoholic model solution, enantiomers of 3MH exhibit very low perception thresholds (R/S forms: 50/60  $\text{ng L}^{-1}$ ) but slightly different odours: grape fruit and passion fruit, respectively (Tominaga, Niclasc, Frerot, & Dubourdieu, 2006).

The major biogenesis pathway of 3MH was first identified from a S-substituted cysteine conjugate precursor present in grapes and musts (Tominaga, Darriet, & Dubourdieu, 1996), the S-3-(hexan-1-ol)-cysteine (Cys3MH). Conversion of that precursor into 3MH occurs during alcoholic fermentation due to carbon–sulphur lyase activity of yeast but, at a very low conversion yield (Tominaga,

*Abbreviations:* G3MH, S-3-(hexan-1-ol)-glutathione; 3MH, 3-mercaptohexan-1-ol; 4MMP, 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one; 3MHA, 3-mercaptohexyl acetate; GSH, glutathione; GC–ITMSMS, gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry; CIMSMS, chemical ionisation tandem mass spectrometry; RT, retention time; SIDA, stable isotope dilution assay; TFA, trifluoroacetic acid; TES, triethylsilane; BDL, below detection limit; SRM, selected reaction monitoring.

\* Corresponding authors. Address: Institut Français de la Vigne et du Vin, at UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, INRA, 34060 Montpellier Cedex 01, France. Tel.: +33 4 99 61 23 11; fax: +33 4 99 61 28 57 (A. Roland).

E-mail address: [roland@supagro.inra.fr](mailto:roland@supagro.inra.fr) (A. Roland).

Gachons, & Dubourdiu, 1998). In natural must, molar conversion yields of Cys3MH are below to 12% (Masneuf-Pomarede, Mansour, Murat, Tominaga, & Dubourdiu, 2006; Murat, Tominaga, & Dubourdiu, 2001), and in certain cases could only corresponds to 3–7% of 3MH produced in wine (Subileau, 2008; Subileau, Schneider, Salmon, & Degryse, 2008). Another biogenesis pathway of 3MH from (*E*)-2-hexen-1-al was demonstrated (Schneider, Charrier, Razungles, & Baumes, 2006) but reported conversion yields are quite different according to the considered grape variety: 0.01% for Sauvignon (Subileau, 2008) and 10% for Melon B. (Schneider et al., 2006). A third pathway to generate 3MH via Cys3MH from S-3-(hexan-1-ol)-glutathione (G3MH) was also hypothesized (Peyrot des Gachons, Tominaga, & Dubourdiu, 2002). Indeed, these authors showed that percolation of an extract of Colombard must through a column containing  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase released Cys3MH from G3MH. However, this specific enzyme has never been identified in grapes, although others proteases, which are naturally occurring in grapes, might be able to degrade G3MH. Nevertheless, these proteases require an optimum temperature of about 55 °C, far away from enological conditions (Cordonnier & Dugal, 1968). Recently, a new conjugate of glutathione, the 4-S-glutathionyl-4-methylpentan-2-one, susceptible to be a pro-precursor of 4MMP was clearly identified in Sauvignon Blanc juice (Fedrizzi, Pardon, Sefton, Elsey, & Jeffery, 2009). Nevertheless, the mechanisms of conversion of glutathionylated precursors into thiols directly or through the cysteinylated precursors still remain non-elucidated.

This work has two objectives:

- The identification and the quantification by nanoLC–MS/MS of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione in Sauvignon, Riesling and Gewurztraminer musts.
- The demonstration of direct conversion of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione in 3-mercaptohexan-1-ol during alcoholic fermentation under synthetic and enological conditions.

These two aspects of this study are based on the use of deuterated analogue of G3MH, whose synthesis is also reported here.

## 2. Material and methods

### 2.1. Generality

All solvents were analytical pure grade (>98%). Reduced glutathione was purchased from Duchefa Biochemie (Amsterdam, The Netherlands). Trifluoroacetic acid, di-*tert*-butyldicarbonate, dimethylformamide dineopentylacetal, *trans*-2-hexen-1-al, sodium borodeuteride or borohydride, manganese dioxide, 2-hexyn-1-ol, deuterium, dithiothreitol, cation exchange resin DOWEX 50WX4-100 and hydrochloride were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Palmitoyl chloride, ethyl acetate, *tert*-butanol, triethylamine and triethylsilane were obtained from Fluka (St Quentin Fallavier, France), tetrahydrofurane, dichloromethane, hexane and pentane from Riedel de Haen (St Quentin Fallavier, France), acetic acid, toluene, dioxane and sodium sulphate from Merck (Darmstadt, Germany). All gases, nitrogen, isobutane and helium, were purchased from Air Product (Paris, France). Flash chromatographies were performed using Merck (Darmstadt, Germany) silica gel (grade 9385, 230–400 Mesh). Ammonium dihydrogenphosphate was purchased from Acros Organics (Halluin, France). Cartridges C18 Sep-Pak were purchased from Waters (Baden, Switzerland). Acetonitrile was purchased from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands). Formic acid was purchased from Fluka (Epalinges, Switzerland) and methanol from Merck (Darmstadt, Germany).

Instrumental analysis for synthesis monitoring: ESI (Electrospray ionisation) mass spectra were recorded on micromass Platform II quadrupole mass spectrometer (Micromass) fitted with an electrospray source coupled with an HPLC Waters. HRMS (Q-TOF) were recorded on a JEOL JMS-SX-102A spectrometer. EI (Electron impact ionisation) mass spectra were recorded on MS Engine 5989A (Hewlett Packard) fitted with electron impact source coupled with a gas chromatograph 5890 II (Hewlett Packard). NMR spectra were recorded on a Varian Unity Inova 500 equipped with a 3 mm reverse probe and chemical shifts were referenced to tetramethylsilane signal. NMR acquisitions were performed using VNMRJ software.

### 2.2. Synthesis of S-palmitoyl-glutathione

To a solution of reduced glutathione (1.53 g; 4.9 mmol) in trifluoroacetic acid (16.5 ml), palmitoyl chloride (3.6 ml; 11.8 mmol; 2.4 eq) was added dropwise. The reaction mixture was stirred for 20 min at room temperature then for 30 min at 40 °C under nitrogen atmosphere. Deionized water (750  $\mu$ l; 41.7 mmol; 8.3 eq) was added and the reaction was continued for 2 h 30 min at 40–45 °C. When the hydrolysis was complete, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure to afford the trifluoroacetate salt of the title compound as a white solid, washed with ethyl acetate (20 ml) at 0 °C, filtrated and dried under vacuum (2.54 g; 81%). LC–ESI MS: [M+H]<sup>+</sup> 546.2 Da; [2M+H]<sup>+</sup> 1091.7 Da.

### 2.3. Synthesis of S-palmitoyl-N-Boc-glutathione

To a solution of S-palmitoyl glutathione (2.54 g; 3.9 mmol) in a mixture of THF/water (50 ml; 1/2.4), sodium bicarbonate (2.07 g; 24.7 mmol; 5.3 eq) then di-*tert*-butyldicarbonate (1.1 ml; 4.8 mmol; 1.1 eq) were added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. A new portion of di-*tert*-butyldicarbonate (322  $\mu$ l; 1.4 mmol; 0.3 eq) was added and the stirring was continued for another 2 h at room temperature. After removal of THF, aqueous phase was washed with ethyl acetate (3  $\times$  10 ml) and acidified to 4–5 by adding acetic acid, then extracted into ethyl acetate (3  $\times$  30 ml) to afford a white solid (2.56 g; 84%) after removal of the solvent from the dried solution. LC–ESI MS [M–H]<sup>–</sup> 644.5 Da; [M+Na]<sup>–</sup> 666.5 Da.

### 2.4. Synthesis of N-Boc-di-*tert*-butyl ester glutathione

To a solution of S-palmitoyl-N-Boc glutathione (1.99 g; 3.1 mmol) in toluene (20 ml), *tert*-butanol (8 ml; 83.7 mmol; 27 eq) was added slowly and the mixture was warmed up to reflux. Then, dimethylformamide dineopentylacetal (5.2 ml; 18.6 mmol; 6 eq) was added dropwise and the reaction mixture was stirred for 24 h at reflux under nitrogen atmosphere. After cooling down at room temperature, NaHCO<sub>3</sub> solution (2 ml) was added and the ester compound was extracted into dichloromethane (40 ml). The solvent was removed from the dried solution (MgSO<sub>4</sub>) to afford yellow oil, which was purified by flash chromatography (ethyl acetate/pentane = 50/50 then ethyl acetate) to give the pure product (187.2 mg; 18%). LC–ESI MS: [M+H]<sup>+</sup> 520.3 Da; [M+Na]<sup>+</sup> 542.4 Da; [M–tBu]<sup>+</sup> 464.2 Da; [M–Boc]<sup>+</sup> 420.3 Da; HRMS (Q-TOF): calculated for C<sub>23</sub>H<sub>42</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S: 520.2693 Da, found 520.2675 Da; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 1.39 (s, 9, <sup>t</sup>Bu), 1.41 (s, 18, <sup>t</sup>Bu), 1.76 (t, 1, *J* = 9.0 Hz, SH), 1.83 (m, 1, CH <sub>$\beta$</sub> H <sub>$\beta'$</sub> Glu), 2.13 (m, 1, CH <sub>$\beta$</sub> H <sub>$\beta'$</sub> Glu), 2.31 (t, 2, *J* = 7.2 Hz, CH<sub>2 $\gamma$</sub> Glu), 2.76 (m, 1, CH <sub>$\beta$</sub> H <sub>$\beta'$</sub> Cys), 3.04 (m, 1, CH <sub>$\beta$</sub> H <sub>$\beta'$</sub> Cys), 3.88 (m, 2, CH<sub>2</sub>Gly), 4.16 (m, 1, CH <sub>$\alpha$</sub> Glu), 4.62 (m, 1, CH <sub>$\alpha$</sub> Cys), 5.21 (d, 1, *J* = 7.3 Hz, NHGlu), 6.87 (broad s, 1, NHGly), 6.91 (d, 1, *J* = 6.5 Hz, NHCys). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 26.2 (1, CH <sub>$\beta$</sub> H <sub>$\beta'$</sub> Cys), 27.5 (9, <sup>t</sup>Bu), 29.1 (1, CH <sub>$\beta$</sub> H <sub>$\beta'$</sub> Glu), 32.2 (1, CH<sub>2 $\gamma$</sub> Glu), 41.9 (1, CH<sub>2</sub>Gly), 53.0 (1, CH <sub>$\alpha$</sub> Glu), 54.3 (1, CH <sub>$\alpha$</sub> Cys),

80.0 ( $C_{ipso}$ , tBu), 82.3 ( $C_{ipso}$ , tBu), 168.4 (1, COGly), 169.8 (1, COCys), 171.2 (1, COGlu), 172.3 (1, COGlu).

### 2.5. Synthesis of natural S-3-(hexan-1-ol)-glutathione

To a solution of N-Boc-di-*tert*-butylester glutathione (137 mg; 0.26 mmol) in dioxane (3 ml), triethylamine (43  $\mu$ l; 0.31 mmol; 1.2 eq) and (*E*)-2-hexen-1-al (36  $\mu$ l; 0.31 mmol; 1.2 eq) were added. The reaction mixture was stirred for 4 days at room temperature under nitrogen atmosphere. After removal of dioxane, absolute ethanol (6 ml) and sodium borohydride (35.1 mg; 0.92 mmol; 14.4 eq) were added and the reaction mixture was stirred for 2 h at 0 °C under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was acidified (pH 4–5) using a 25% aqueous solution of acetic acid. After removal of EtOH, the aqueous solution was extracted by ethyl acetate (3  $\times$  15 ml), dried and concentrated to afford a white solid (187.7 mg), which was treated by a mixture of trifluoroacetic acid and triethylsilane (15% in weight) for 20 min at room temperature. The reaction mixture was concentrated under nitrogen flux and washed by diethyl ether (3  $\times$  5 ml) to give the pure compound. LC-ESI MS:  $[M+H]^+$  408.3 Da; HRMS (Q-TOF): calculated for  $C_{16}H_{30}N_3O_7S$ : 408.1804 Da, found 408.1831 Da.

### 2.6. Synthesis of deuterated S-3-(hexan-1-ol)-glutathione

Conditions of deuterated S-3-hexan-1-ol glutathione were the same as those presented previously. Aldehyde function from S-3-(hexan-1-ol)-glutathione was reduced using sodium borodeuteride in EtOD with same equivalents of reagents and same reaction time as above. Purification method was similar to that of natural compound. LC-ESI MS:  $[M+H]^+$  410.3 Da ( $G3MHd_2$ );  $[M+H]^+$  411.2 Da ( $G3MHd_3$ ).

### 2.7. Synthesis of [2,3- $^2H_2$ ]-(*Z*)-2-hexen-1-ol

To a suspension of Lindlar catalyst (19.5 mg) in EtOD (4 ml), 2-hexen-1-ol (1 ml; 9.1 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 24 h under deuterium atmosphere at room temperature, then filtered on Celite and concentrated under vacuum to afford the desired compound as an oil with solvent traces (1.20 g; >100%). GC-EI MS (70 eV):  $m/z$ : 42 (31); 45 (26); 59 (100); 69 (21); 84 (23).  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 0.89 (t, 3,  $J = 7.5$  Hz,  $CH_3CH_2CH_2$ ); 1.38 (m, 2,  $J = 7.5$  Hz,  $CH_3CH_2CH_2$ ); 2.04 (broad t, 2,  $J = 7.5$  Hz,  $CH_3CH_2CH_2$ ); 4.18 (broad s, 2,  $CH_2OH$ ).

### 2.8. Synthesis of [2,3- $^2H_2$ ]-2-hexen-1-ol

To a solution of [2,3- $^2H_2$ ]-(*Z*)-2-hexen-1-ol (1.2 g) into hexane (80 ml),  $MnO_2$  (10.77 g; 101.8 mmol; 11.2 eq) was added. The reaction mixture was stirred for 36 h at room temperature under nitrogen atmosphere, then filtered on Celite and concentrated under vacuum to afford a yellow oil (933 mg; 93%) with satisfactory purity (93%, GC-MS). GC-EIMS (70 eV):  $m/z$ : 43 (89); 57 (93); 71 (71); 85 (100); 99 (18); 100 (18).  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 0.98 (t, 3,  $J = 7.5$  Hz,  $CH_3CH_2CH_2$ ); 0.99 (t, 3,  $J = 7.3$  Hz,  $CH_3CH_2CH_2$ ); 1.55 (m, 2,  $CH_3CH_2CH_2$ ); 1.56 (m, 2,  $CH_3CH_2CH_2$ ); 2.32 (broad t, 2,  $J_{H-H} = 7.4$  Hz,  $CH_3CH_2CH_2$ ); 2.59 (tt, 2,  $J_{H-D} = 1$  Hz,  $J_{H-H} = 7.4$  Hz,  $CH_3CH_2CH_2$ ); 9.51 (t, 1,  $J_{H-D} = 1$  Hz,  $CHO$ ); 10.09 (t, 1,  $J_{H-D} = 1.1$  Hz,  $CHO$ ).

### 2.9. Identification and quantification of G3MH into natural musts by nanoLC-MS/MS

Natural musts of Sauvignon, Riesling and Gewurztraminer were extracted on cation exchange resin (Dowex 50WX4-100) followed by a purification on C18 cartridges (Sep-Pak Waters). An aliquot of

grape juice (1200  $\mu$ l) was extracted using a micro column containing Dowex's resin (50 mg) previously conditioned with water and 2 M HCl solution, washed with water after percolation and using a phosphate buffer to elute the targeted compound. Purification consisted in loading Dowex's extract on C18 cartridges before being conditioned with MeOH/water, washed with water after percolation and then eluted with pure MeOH.

Analyses of extracts were performed using a nano liquid chromatography system (Waters Acquity) hyphenated to a triple quadrupole mass spectrometer (Thermo TSQ Quantum). A trapping (3 min at 5  $\mu$ l  $min^{-1}$ ) on a NanoEase Atlantis dC18 pre-column (0.18  $\times$  23.5 mm, 5  $\mu$ m) was firstly performed and the separation of analytes was carried out on a Magic-C18 column (75  $\mu$ m ID  $\times$  100 mm length, 5  $\mu$ m). Mobile phases were composed of (A) water with 0.1% of formic acid and (B) acetonitrile with 0.1% of formic acid. The gradient of solvent began with 0.5% B for 1.5 min, increased to 5.0% B in 0.5 min, increased to 30.0% B in 16 min, increased to 40% B in 2 min and then increased to 85.0% B in 6 min for 2 min before return to initial conditions. The flow rate was equivalent to 800 nL  $min^{-1}$ . The mass spectrometer worked with electrospray ion source in positive mode. The spray voltage was maintained to 1.0 kV and the source temperature was equal to 200 °C. Selected reaction monitoring (SRM) mode was used to identify and quantify target compounds by selecting three specific transitions per reference compounds. MS/MS conditions were adjusted by infusing a solution of synthetic compounds into triple quadrupole and measuring the optimal collision energy leading the better sensitivity (Table 1).

### 2.10. Calibration curves

Calibration curves of G3MH and Cys3MH were performed by analysing ten calibrating solutions (from 0.04 to 4  $\mu$ g  $L^{-1}$  and from 0.2 to 20  $\mu$ g  $L^{-1}$ , respectively) composed of a mix of both compounds at various concentrations of natural analogue and fixed amount of labelled analogue: 0.2  $\mu$ g  $L^{-1}$  for G3MH  $d_2$  and 10  $\mu$ g  $L^{-1}$  for Cys3MH  $d_2$ .

### 2.11. Accuracy and precision measurement

Accuracy and precision were evaluated through the addition of known amounts of 3MH precursors into three different musts at one level of concentration ( $n = 9$ ).

### 2.12. Preparation of synthetic must

A synthetic media simulating standard grape juice was composed of (per litre): glucose (200 g  $L^{-1}$ ), citric acid (6 g); DL-malic acid (6 ng); mineral salts ( $KH_2PO_4$ , 750 mg;  $K_2SO_4$ , 500 mg;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 250 mg;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 155 mg; NaCl, 200 mg;  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 4 mg;  $ZnSO_4$ , 4 mg;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 1 mg; KI, 1 mg;

**Table 1**  
Selected reaction monitoring conditions for liquid chromatography analysis.

Parent ions (Da)	Daughter ions (Da)	Collision energy (V)	Compounds
222.127	83.19	12	Cys3MH
222.127	101.12	8	
222.127	205.13	9	
224.153	85.19	13	Cys3MH $d_2$
224.153	103.12	9	
224.153	207.13	7	
408.272	162.00	17	G3MH
408.272	262.03	7	
408.272	279.03	12	
410.323	162.00	20	
410.323	264.22	15	
410.323	281.14	11	G3MH $d_2$

CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.4 mg; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1 mg; NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1 mg); vitamins (myoinositol, 20 mg; nicotinic acid, 2 mg; calcium pantothenate, 1.5 mg; thiamin–HCl, 0.25 mg; pyridoxine–HCl, 0.25 mg; biotin, 0.003 mg); anaerobic growth factors (ergosterol, 15 mg; sodium oleate, 5 mg; Tween 80, 0.5 ml); nitrogen source, 300 mg of nitrogen as ammoniacal nitrogen (18.6% NH<sub>4</sub>Cl); and amino acids (L-proline, 20.5%; L-glutamine, 16.9%; L-arginine, 12.5%; L-tryptophan, 6%; L-alanine, 4.9%; L-glutamic acid, 4%; L-serine, 2.6%; L-threonine, 2.6%; L-leucine, 1.6%; L-aspartic acid, 1.5%; L-valine, 1.5%; L-phenylalanine, 1.3%; L-isoleucine, 1.1%; L-histidine, 1.1%; L-methionine, 1.1%; L-tyrosine, 0.6%; L-glycine, 0.6%; L-lysine, 0.6%; and L-cysteine, 0.4%).

### 2.13. Fermentation conditions

The synthetic must was supplemented as follow

- Experimental set A: synthetic must supplemented with G3MHD<sub>3</sub>/d<sub>2</sub> (15; 75 and 150 μg L<sup>-1</sup>).
- Experimental set B: natural must of Sauvignon supplemented with G3MHD<sub>3</sub>/d<sub>2</sub> (12 μg L<sup>-1</sup>) in duplicate (B1 and B2).

Two control experiments were performed:

- Blank A: synthetic must without any addition.
- Blank A': synthetic must supplemented with glutathione (100 mg L<sup>-1</sup>).

Fermentations were performed into 1.2 L glass fermenters. Synthetic medium and natural must of Sauvignon (1 L) were inoculated with yeast strain VIN13 (10 mg L<sup>-1</sup>). All fermentations were carried out under strictly anaerobic and isotherm conditions (20 °C). The evolution of fermentation was monitored by measurement of CO<sub>2</sub> released using a gas mass flowmeter. At the end of the fermentation process, 3MHD<sub>8</sub> (internal standard (Schneider et al., 2006)) was added in each fermenter (5 μg L<sup>-1</sup>) and wines were clarified by centrifugation (9000g; 4 °C; 20 min). After volatiles extraction and purification of synthetic wines, the released deuterated thiols were analysed by GC–ITMS/MS.

### 2.14. Extraction and purification of thiols

Extraction and purification were performed using a method described previously (Schneider, 2001; Schneider, Kotseridis, Ray, Augier, & Baumes, 2003) and modified as follow: volatiles were extracted from wines (500 ml) at 0 °C using pentane/dichloromethane azeotrope (2/1; 100 ml) under magnetic stirring (20 min) and nitrogen atmosphere. This step was repeated. After centrifugation (9000g; 4 °C; 20 min) the organic phase was separated, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to a final volume of 2 ml.

Each extract was then purified using covalent chromatography on mercuric bounded agarose gel (1 ml) prepared according to the Biorad method. The resin was conditioned previously using isopropanol (5 ml) and pentane/dichloromethane azeotrope (5 ml). Extracts were loaded on the column and washed using pentane/dichloromethane azeotrope (20 ml). Elution was performed by a solution of 1,4-dithio-DL-threitol in pentane/dichloromethane azeotrope (5 mM, 5 ml). Extracts were washed by Millipore water, dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and concentrated at 35 °C (final volume of 300 μl). Samples were stocked at –20 °C.

### 2.15. Analysis of thiols by GC–ITMS/MS

GC–ITMS/MS analyses were performed using a Varian 3800 gas chromatograph coupled to a Varian Saturn 2000 ion trap mass

spectrometer. About 2 μL of each sample were injected using PTV injector (SPI 1079) at 25 °C. Temperature of injector was raised to 245 °C at 180 °C·min<sup>-1</sup> and kept at that temperature for 60 min. Separation was performed on a DB-WAX column (30 m, 0.25 μm ID, 0.25 μm thickness film; J&W Scientific). The carrier gas was helium 6.0 with a constant flow of 1 ml min<sup>-1</sup>. Oven temperature was programmed as follow: 60 °C for 3 min, raised at 110 °C at 3 °C min<sup>-1</sup>, then 140 °C at 1 °C min<sup>-1</sup> and 245 °C at 15 °C min<sup>-1</sup> for 10 min. The transfer line and the trap were set at 230 °C and 140 °C, respectively. Detection by ITMS/MS was performed by chemical ionisation using isobutane. Parent ions were chosen according to their intensity and selectivity: *m/z* 125, *m/z* 120 and *m/z* 119 for 3MHD<sub>8</sub>, 3MHD<sub>3</sub> and 3MHD<sub>2</sub>. Two daughter ions per compounds were selected for relative quantification: *m/z* 90, 59; *m/z* 86, 57; and *m/z* 85, 56 for 3MHD<sub>8</sub>, 3MHD<sub>3</sub> and 3MHD<sub>2</sub>. Excitation storage levels were *m/z* 41.1, *m/z* 39.4 and *m/z* 39.1 for 3MHD<sub>8</sub>, 3MHD<sub>3</sub> and 3MHD<sub>2</sub>. Amplitude excitation was equal to 28.0 V for all compounds.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Synthesis of glutathione conjugates

Commercially available reduced glutathione (GSH) represents a very convenient starting material for the synthesis of conjugates. Michael addition of glutathione on conjugate aldehyde (Henderson et al., 2005; Schmidt, Ak, & Mrowietz, 2007) and on *o*-quinones (Modica, Zanaletti, Freccero, & Mella, 2001; Nishizawa et al., 2006) is well-documented. Consequently, we envisaged using directly glutathione as the substrate for the nucleophilic addition of free thiol on *trans*-2-hexenal in water with a slightly alkaline pH to favour the formation of thiolate ion (data not shown). Unfortunately, this first attempt did not allow us to isolate the desired glutathione conjugate.

We then adopted another strategy based on acid-labile protecting groups (Fig. 1). As previously described (Falck, Sangras, & Capdevila, 2007), glutathione palmitoylation increases the solubility in organic solvent thus improving the yield in further steps. This reaction needed a careful adjustment of hydrolysis duration and temperature to convert totally the intermediate compound, *S*-palmitoyl-*N*-trifluoroacetamide glutathione **9**, into the expected compound (Fig. 1). A complete hydrolysis provided **2** in good yield (93%) with a satisfying purity. An attempt to selectively cleave the acetyl protection on the amine function from a mixture of the two compounds under basic conditions (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/MeOH, 24 h, 25 °C) failed since the palmitoyl group was also removed.

The free amine of glutamic acid residue of **2** was protected using large excess of reactant and a long reaction time (48 h) to give **3** in a good yield (84%).

The next step of the synthesis involved the protection of carboxylic acids. Unfortunately, we were not able to obtain an efficient esterification with the previously described protocol using *N,N*-diisopropylcarbodiimide in the presence of a catalytic amount of CuCl (Zhu, Hu, Dizin, & Pei, 2003). Carboxylic acid functions were esterified successfully using dimethylformamide dineopentylacetal and *tert*-BuOH (Widmer, 1983). Under those conditions, we observed a concomitant cleavage of thioester bond probably due to some dimethylamine released from dimethylformamide dineopentylacetal since dimethylpalmitamide **7** was identified as a by-product (Fig. 1). The thiol resulting from the cleavage of the thioester bond was very oxidizable under these conditions. This step required an inert atmosphere to prevent the oxidation of cysteine residue. The partial oxidation of the expected product and the difficulty of its purification due to the presence of dimethylpalmitamide might explain the moderate yield (18%) of this step.

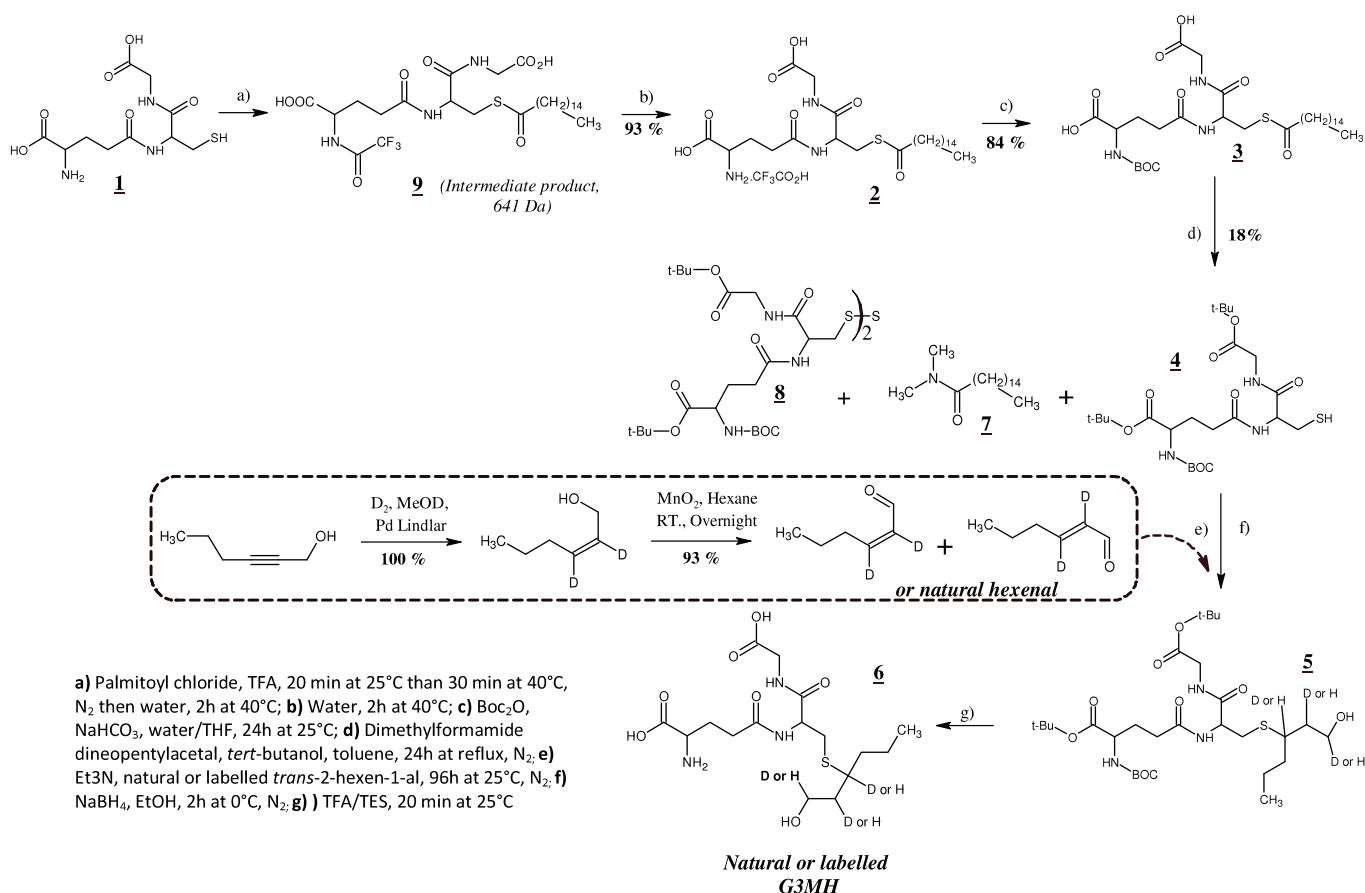


Fig. 1. Synthesis of glutathione conjugates.

Nevertheless, this glutathione derivative **4** was subjected to Michael addition with natural *trans*-2-hexen-1-al to form the G3MH after reduction of the aldehyde function **5** and deprotection of acid-labile groups **6**. Despite conditions optimisation, mainly by varying triethylamine stoichiometry to control the equilibrium between thiol and thiolate, the reaction did not reach completion.

The final acid deprotection was then carried out on the resulting mixture, leading to the wanted G3MH **6** along with GSH. This residual GSH should not interfere with fermentation experiments since it is naturally present in grapes and must at high concentrations. However, a control experiment with synthetic must spiked with commercial GSH had no potential production of thiol during

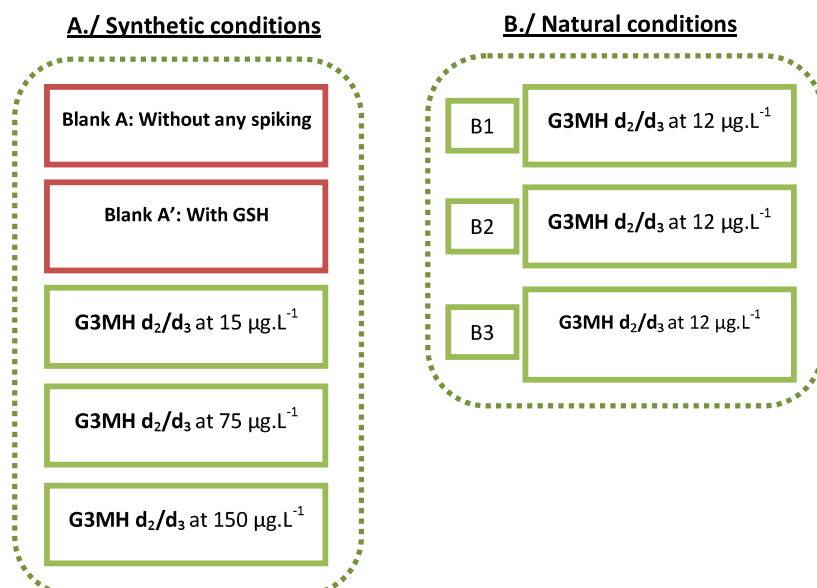


Fig. 2. Experimental protocol to prove the direct relationship between G3MH and 3MH.

alcoholic fermentation (Fig. 2) giving evidence that residual GSH did not interfere.

Stock solution of synthetic G3MH in water was quantified using  $^1\text{H}$  NMR by comparing signal of glycine protons with signal of an internal standard (trimethylsilylpropionic acid).

### 3.2. Deuteration of the *trans*-2-hexen-1-al

Labelling of compounds by deuterium or  $^{13}\text{C}$  enables to carry out stable isotope dilution assay to quantify natural analogues, which is a reliable technique to measure tiny amounts of compounds accurately.

Synthesis of *trans*-2-hexen-1-al from  $[\text{2}^2\text{H}_{10}]$ -butanol by Dess–Martin oxydation followed by Wittig reaction (Schneider et al., 2006) was already reported but with a very low yield. A different strategy for a double labelling of  $[\text{5,6-}^2\text{H}_2]$ -(*Z*)-1,5-octadien-3-one has been demonstrated previously (Lin, Welte, Vera, Fay, & Blank, 1999). We applied this method to our concern in two successive steps (Fig. 1) by monitoring the reaction using GC–EIMS. Labelling synthesis started by deuteration the 2-hexyn-1-ol into  $[\text{2,3-}^2\text{H}_2]$ -(*Z*)-2-hexen-1-ol in a very good yield without any by-product of reduction. The use of deuterium gas as reagent avoided purification step. The further oxydation step provided a mixture of (*Z/E*)-2-hexen-1-al position isomers with high purity, which was checked by GC–MS. Ratio of each position isomer was determined by  $^1\text{H}$  NMR analysis. Indeed, peaks area relative to proton of aldehyde function allowed us to calculate the *Z* and *E* ratio (*Z/E* = 60/40).

This compound constitutes a very convenient deuterated reagent to synthesize Cys3MHd<sub>2</sub>, 3MHd<sub>2</sub> and G3MHd<sub>2</sub> by Michael addition.

### 3.3. Labelling of the *S*-3-(hexan-1-ol)-glutathione (G3MH)

The previously described Michael addition was performed with  $[\text{2,3-}^2\text{H}_2]$ -2-hexen-1-al (mix of two isomers) to afford the G3MH labelled in three non-enolisable positions (Fig. 1, compound 6). Two deuterium atoms were introduced during the deuteration of 2-hexyn-1-ol whereas the latter resulted from reduction of aldehyde function by sodium borodeuteride. However this reduction did not enable the labelling of the methylene group bearing the

alcohol function even when using drastic conditions as EtOD as solvent and a perfectly dried glassware. The reaction resulted in a mixture of two isotopomers (G3MHd<sub>2</sub>/d<sub>3</sub>) in equivalent amounts. Nevertheless a double labelling was sufficient to delineate between the natural compound and its deuterated analogue by mass spectrometry.

This successful synthesis of G3MHd<sub>2</sub>/d<sub>3</sub> provided us with an efficient tool to study the evolution of glutathione conjugate in synthetic and natural must during alcoholic fermentation.

### 3.4. Identification of G3MH in Sauvignon, Riesling and Gewürztraminer grape juices

Efficiency of extraction method for cysteinylated precursors of 3MH and 4MMP was already proved for Petit and Gros Manseng grape juices (Dagan, 2006). For our purpose, many adjustments were performed to apply this methodology to G3MH and Cys3MH, which exhibited similar behaviour toward cation exchange resin. Purification step on C18 cartridges was adapted from a published method (Luisier, Buettner, Iker, Rausis, & Frey, 2008) to eliminate all interferences during the nanoLC–MS/MS analysis.

Identification of G3MH was performed by comparing measured ion ratios between real samples and standard solution. Consistency between retention times and ion ratios in our analyses allowed us to clearly identify glutathionylated precursor of 3MH into these grape varieties: Sauvignon, Riesling and Gewürztraminer (Fig. 3).

### 3.5. Quantification by stable isotope dilution assay of cysteinylated and glutathionylated precursors of 3MH

Quantification of G3MH and Cys3MH was performed by stable isotope dilution assay using the synthetic G3MH d<sub>2</sub> and Cys3MH d<sub>2</sub> as internal standards. The triple quadrupole mass spectrometer allowed us to perform selected reaction monitoring by selecting three specific transitions for each precursor to identify and to quantify the targeted compounds in natural matrices (Table 1).

Calibration curves were performed in model solutions using ten calibrating points for each precursor. Cys3MH and G3MH exhibited quadratic regression (validated by Lack-of-Fit test) with correlation coefficients superior to  $R^2 = 0.995$ . Limits of detection and quanti-

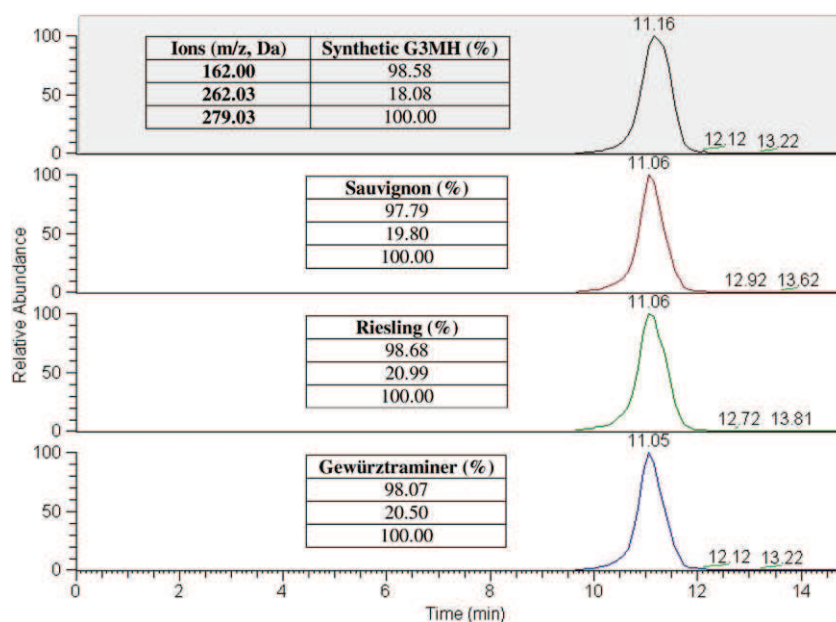


Fig. 3. Identification of G3MH in Sauvignon, Riesling and Gewürztraminer musts.

**Table 2**

Validation of an analytical method and quantification of G3MH and Cys3MH into Sauvignon Blanc, Riesling and Gewurztraminer grape juices.

		G3MH	Cys3MH	Cys3MH/G3MH
LODs (ng L <sup>-1</sup> )		59	195	
LOQs (ng L <sup>-1</sup> )		316	948	
Replicates		9	9	
Accuracy (%)		84	104	
Precision (RSDs%)		6	5	
Sauvignon (21 samples) (μg L <sup>-1</sup> )	Mean	4.4	22.3	5 <sup>A*</sup>
	Min	1.3	7.9	
	Max	7.5	35.5	
Riesling (9 samples) (μg L <sup>-1</sup> )	Mean	1.3	22.7	17 <sup>B*</sup>
	Min	0.7	15.1	
	Max	2.0	30.8	
Gewurztraminer (5 samples) (μg L <sup>-1</sup> )	Mean	6.0	57.1	10 <sup>C*</sup>
	Min	5.6	52.9	
	Max	7.1	65.2	

\* A,B,C: significant differences between means were determined by the Newman-Keuls test ( $\alpha = 0.05$ ).

fication were established in model solution for G3MH and Cys3MH for signal to noise ratio equal to 3 and 10, respectively. Accuracy and precision were calculated using nine samples of grape juices spiked with G3MH and Cys3MH at one level of concentration. The comparison of measured and spiked concentrations allowed us to evaluate the accuracy whereas the precision was measured by calculating the residual standard deviation of all responses for both compounds (Table 2). Analytical method was highly sensitive, accurate and precise to quantify precursors of 3MH into natural musts.

Thirty-five samples of Sauvignon Blanc, Riesling and Gewurztraminer grape juices from various sources were analysed by nanoLC-MS/MS. As shown in Table 2, the three varieties present very different levels of cysteinylated and glutathionylated precursors. Ratio between those two precursors seems to be also statistically different and could be considered as specific of each variety.

In spite of low concentrations, G3MH contributes to aromatic potential and it might be supposed that ripening and pre-fermentative operations to elaborate grape juice influenced its final concentration.

### 3.6. Identification of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione as a direct precursor of 3-mercaptohexan-1-ol

It was reported that 3MH is generated from cysteinylated precursor present in grapes and musts (Tominaga & Dubourdiu, 1998). Recently, new insights in biogenesis of 3MH showed that the quantity of 3MH issued from the transformation of Cys3MH could in certain cases represent only 3–7% of the total amount in wine (Subileau, 2008). Consequently, the presence of other precursors of 3MH was conceivable and Cys3MH might be not the main precursor.

The possibility of glutathionylated precursor of 3MH was suggested previously (Peyrot des Gachons et al., 2002), leading to a tentative identification. Percolation of a Colomard must through a column loaded with agarose gel exhibiting a  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase activity showed the release of Cys3MH into the medium. Consequently, these results indicated that a glutathionylated conjugate could be a pro-precursor of 3MH even if  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase has never been identified in grapes. However, if several proteases occur naturally in musts (Cordonnier & Dugal, 1968) and could break peptide bond, their optimum temperature is around 55 °C, which is far from enological temperature in white vinification (temperature <25 °C). Recent investigations also showed indirectly the potential existence of glutathionylated pre-

cursor of 3MH by using mutants exhibiting the deletion of the gene encoding for glutathione transport (Subileau, 2008; Subileau et al., 2008). In this case, concentrations of 3MH decreased considerably compared to classical conditions with non-modified yeast. These results support the hypothesis of 3MH generation from G3MH but no absolute relationship was evidenced under neither synthetic nor enological conditions.

The experimental study we performed aimed at demonstrating the biogenesis pathway between G3MH and 3MH in synthetic and natural must, using addition of G3MHd<sub>2</sub>/d<sub>3</sub> and monitoring the release of 3MHd<sub>2</sub>/d<sub>3</sub> during alcoholic fermentation.

In order to monitor more easily the deuterated 3MH released, a preliminary study was performed using high amounts of spiked precursors in a synthetic must (experiment set A, Fig. 2), reported as a convenient medium to observe the 3MH production during fermentation (Subileau, 2008). As trace amounts of the deuterated form were expected, blanks were performed in the same experiment, with or without addition of glutathione.

In a second time (experimental set B), similar experiments were performed using a real Sauvignon Blanc grape juice spiked with G3MH d<sub>2</sub>/d<sub>3</sub> to check its conversion yield in enological conditions (Fig. 2). Formation of 3MH and 3MH d<sub>2</sub>/d<sub>3</sub> were expected, either from cysteinylated conjugates or glutathionylated ones (naturally present in must, or added for G3MH d<sub>2</sub>/d<sub>3</sub>). Comparison between natural and labelled 3MH amounts would allow evaluating the proportion of 3MH production from glutathionylated precursor.

Fermentation processes were conducted at laboratory scale using yeast strain VIN13, identified in a previous work for its capability of releasing significant quantities of 3MH in a synthetic medium (Subileau, 2008). After selective extraction of thiols and purification, extracts were analysed by GC-ITMS/MS using isobutane as ionisation gas. Chemical ionisation was preferred than electron impact ionisation because of the smoother fragmentation. By analogy with natural 3MH, parent ions for deuterated analogues were selected according to their abundance and selectivity. Parent ion for 3MHd<sub>8</sub> was *m/z* 125, which generated ions *m/z* 90 and 59 by fragmentation (Schneider et al., 2006; Subileau, 2008). For 3MHd<sub>3</sub> and 3MHd<sub>2</sub>, parents ions corresponded to *m/z* 120 and 119 and they afforded *m/z* 86; 57 and 85; 56 as fragmentation ions, respectively. This analysis method was already reported (Schneider et al., 2003) as sensitive and selective enough to be applied to our synthetic and natural wines without modification of conditions.

Analysis results are shown in Fig. 4. Consistence between retention times (RT 3MHd<sub>8</sub> < RT 3MHd<sub>3</sub> and RT 3MHd<sub>2</sub>) and spectral data clearly demonstrated the relationship between G3MHd<sub>2</sub>/d<sub>3</sub> and 3MHd<sub>2</sub>/d<sub>3</sub> in synthetic must. In addition, no 3MH d<sub>2</sub>/d<sub>3</sub> was detected in the wines obtained from blank fermentation, either with or without addition of glutathione. Thus, under enological conditions on synthetic medium, yeast is able to metabolize the glutathionylated precursor of 3MH to release the corresponding varietal thiol.

Experimental set A allowed us also to study the influence of initial amount of precursor on conversion yield into thiol. Spiking G3MH at amounts ranged from 15 μg L<sup>-1</sup> to 150 μg L<sup>-1</sup> resulted in the same molar conversion yield at the end of the fermentation: 0.6% as average value as showed by the regression calculated on the experimental data: [3MHd<sub>2</sub>/d<sub>3</sub>] = 0.0061 × [G3MHd<sub>2</sub>/d<sub>3</sub>] + 0.0002 with R<sup>2</sup> = 0.985. The slope of the regression line is equivalent to the average value of molar conversion yield. This value is in accordance with conversion yields obtained under synthetic conditions for cysteinylated conjugate into 3MH (Subileau, 2008).

Experiments B were performed to confirm the relationship between G3MH d<sub>2</sub>/d<sub>3</sub> and 3MH under natural conditions. Levels of G3MH and Cys3MH naturally occurring in the Sauvignon Blanc must we used, were quantified by nanoLC-MS/MS previously.



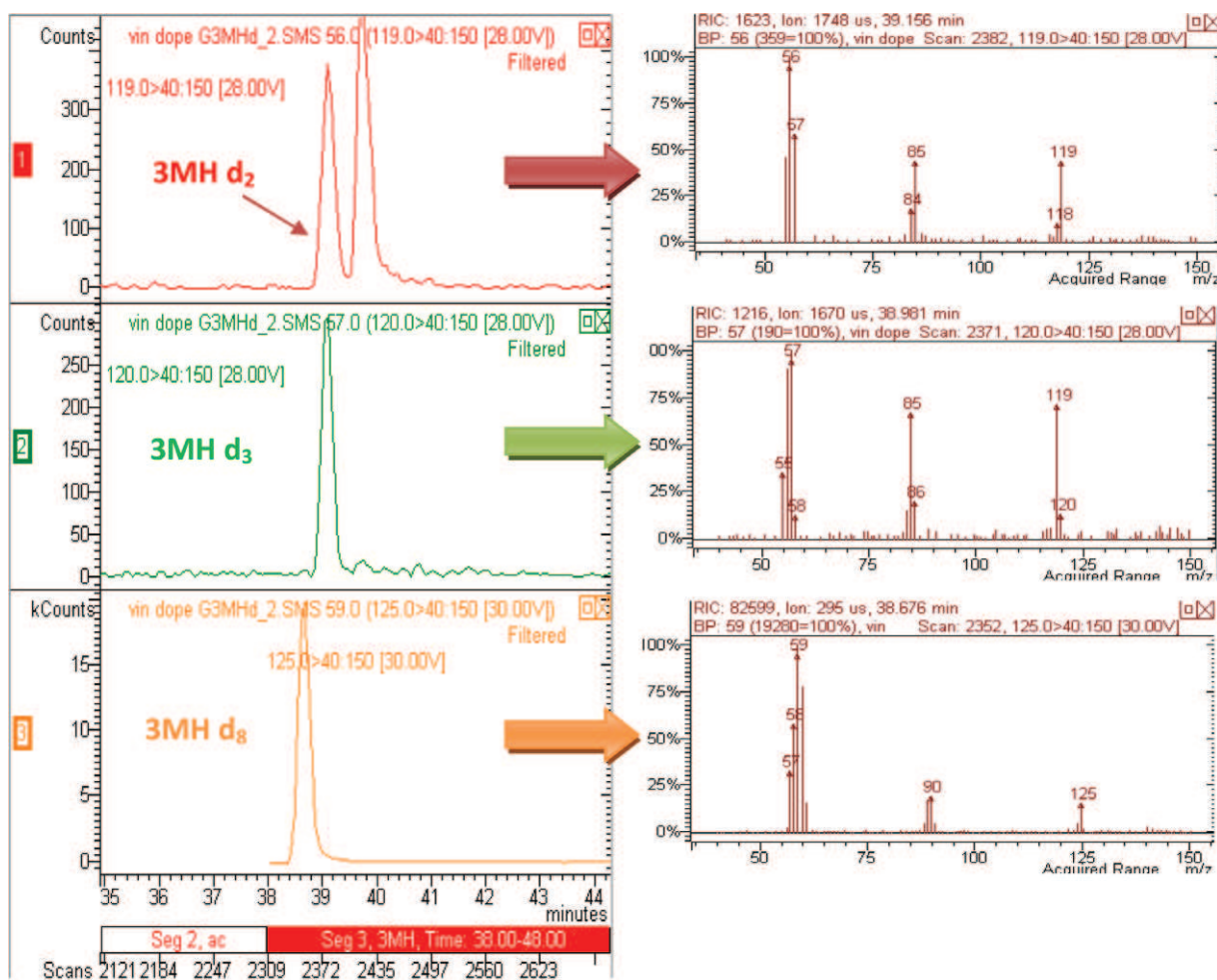


Fig. 4. Identification of 3MHd<sub>2</sub> and 3MHd<sub>3</sub> released from G3MHd<sub>2/3</sub> in synthetic media.

The concentration of G3MH and Cys3MH were equivalent to 5.6 and 25.1  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. The addition of G3MH d<sub>2/3</sub> was thus performed at only slightly higher level, *i.e.* 12  $\mu\text{g L}^{-1}$  as showed in Fig. 2.

In Sauvignon Blanc grape juice and according to our fermentation conditions, molar conversion yield of 3MH d<sub>2/3</sub> from G3MH d<sub>2/3</sub> was equivalent to 4.4%, which represented approximately a contribution of 60  $\text{ng L}^{-1}$  of resulting thiol. The production of 3MH from G3MH represented 3.3% of total 3MH production in Sauvignon Blanc wine. Recent investigations have shown that the contribution of Cys3MH for 3MH production in Sauvignon Blanc was closed to 3–7% with molar conversion yields below to 1% (Subileau et al., 2008). By assuming these values, we evaluated the proportion of 3MH due to Cys3MH in our experiments and we found similar contribution of G3MH and Cys3MH for the total production of 3MH. The conversion yield of G3MH into 3MH cannot be generalised because fermentations conditions and grape variety origin might influence the total production of thiol as shown for cysteinylated precursors (Subileau, 2008; Subileau et al., 2008).

## 5. Conclusion

For the first time, G3MH has been identified as an absolute precursor of 3MH, using labelled synthetic compounds. This unreserved relationship has been observed under enological conditions. The G3MH was clearly identified into Sauvignon Blanc, Riesling and Gewurztraminer grape juices. Glutathionylated and

cysteinylated precursors of 3MH were quantified accurately by stable isotope dilution assay in natural musts using a nanoLC–MS/MS in single reaction monitoring mode. This novel biogenesis pathway brings new elements for the understanding of 3MH production during alcoholic fermentation.

## Acknowledgement

We thank Jean-Michel Salmon and Christian Picou for helpful discussions and technical help. Interloire, IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin) and Sicavac are also acknowledged for technical and financial supports (CIFRE fellowship). We thank the Proteomics Core Facility (EPFL, Lausanne) for nanoLC–MS/MS devices support.

## References

- Cordonnier, R., & Dugal, A. (1968). Les activités protéolytiques du raisin. *Annales de Technologie Agricole*, 17, 189–206.
- Dagan, L. (2006). Potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. cv. Petit Manseng et Gros Manseng. Contribution à l'arôme des vins de pays Côtes de Gascogne. *Sciences et Procédés Biologiques et Industriels* (p. 238). Ph.D. Thesis.
- Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boiron, J. N., & Dubourdieu, D. (1995). Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines: 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavor and Fragrance Journal*, 10, 385–392.
- Du Plessis, C. S., & Augustyn, O. P. H. (1981). Initial study on the guava aroma of Chenin Blanc and Colombar wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 2, 101–103.
- Etiévant, P. X. (1991). Wine. In H. Maarse (Ed.), *Volatile compounds in food and beverages* (pp. 19–33). New York, Basel, Honk-Hong: Dekker Inc.

- Falck, J. R., Sangras, B., & Capdevila, J. H. (2007). Preparation of N<sup>t</sup>-Boc L-glutathione dimethyl and di-*tert*-butyl esters: Versatile synthetic building blocks. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15, 1062–1066.
- Fedrizzi, B., Pardon, K. H., Sefton, M. A., Elsey, G. M., & Jeffery, D. W. (2009). First identification of 4-S-glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a potential precursor of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon Blanc Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(3), 991–995.
- Ferreira, V., Ortin, N., Escudero, A., Lopez, R., & Cacho, J. (2002). Chemical characterization of the aroma of Grenache rose wines: Aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory reconstitution studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 4048–4054.
- Guth, H. (1997). Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3022–3026.
- Henderson, A. P., Bleasdale, C., Delaney, K., Lindstrom, A. B., Rappaport, S. M., Waidyanatha, S., et al. (2005). Evidence for the formation of Michael adducts from reactions of (E,E)-muconaldehyde with glutathione and other thiols. *Bioorganic Chemistry*, 33(5), 363–373.
- Lin, J., Welti, D. H., Vera, F. A., Fay, L. B., & Blank, I. (1999). Synthesis of deuterated volatile lipid degradation products to be used as internal standards in isotope dilution assays. 2. Vinyl ketones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7), 2822–2829.
- Luisier, J.-L., Buettner, H., Iker, S., Rausis, T., & Frey, U. (2008). Quantification of cysteine S-conjugate of 3-sulfanylhexan-1-ol in must and wine of petite arvine vine by stable isotope dilution analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 2883–2887.
- Masneuf-Pomarede, I., Mansour, C., Murat, M. L., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2006). Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon Blanc wines. *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), 385–390.
- Mateo-Vivaracho, L., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). Quantitative determination of wine polyfunctional mercaptans at nanogram per liter level by gas chromatography–negative ion mass spectrometric analysis of their pentafluorobenzyl derivatives. *Journal of Chromatography A*, 1146(2), 242–250.
- Modica, E., Zanaletti, R., Freccero, M., & Mella, M. (2001). Alkylation of amino acids and glutathione in water by *o*-quinone methide. Reactivity and selectivity. *Journal of Organic Chemistry*, 66(1), 41–52.
- Murat, M.-L., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2001). Assessing the aromatic potential of cabernet sauvignon and merlot musts used to produce rose wine by assaying the cysteinylated precursor of 3-mercaptohexan-1-ol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5412–5417.
- Nishizawa, C., Takeshita, K., Ueda, J., Nakanishi, I., Suzuki, K. T., & Ozawa, T. (2006). Reaction of para-hydroxybenzoic acid esters with singlet oxygen in the presence of glutathione produces glutathione conjugates of hydroquinone, potent inducers of oxidative stress. *Free Radical Research*, 40(3), 233–240.
- Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2002). Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form: Identification of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4076–4079.
- Rapp, A., & Pretorius, P. J. (1989). Foreign and undesirable flavors in wine. In Charalambous (Ed.), *Flavors and off-flavors* (pp. 1–21). Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Schmidt, T. J., Ak, M., & Mrowietz, U. (2007). Reactivity of dimethyl fumarate and methylhydrogen fumarate towards glutathione and N-acetyl-L-cysteine – Preparation of S-substituted thiosuccinic acid esters. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(1), 333–342.
- Schneider, R. (2001). Contribution à la connaissance de l'arôme et du potentiel aromatique du Melon B. (*Vitis vinifera* L.) et des vins de Muscadet (p. 222). Ph.D. Thesis.
- Schneider, R., Charrier, F., Razungles, A., & Baumes, R. (2006). Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wines. *Analytica Chimica Acta*, 563(1–2), 58–64.
- Schneider, R., Kotseridis, Y., Ray, J. L., Augier, C., & Baumes, R. (2003). Quantitative determination of sulfur-containing wine odorants at sub parts per billion levels. 2. Development and application of a stable isotope dilution assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3243–3248.
- Subileau, M. (2008). Paramètres influents sur la libération des thiols variétaux par la levure *Saccharomyces cerevisiae*: d'un milieu synthétique à la complexité d'un moût de Sauvignon blanc (PhD).
- Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J.-M., & Degryse, E. (2008). New insights on 3-mercaptohexanol (3MH) biogenesis in Sauvignon Blanc Wines: Cys-3MH and (E)-hexen-2-al are not the major precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9230–9235.
- Tominaga, T., Baltenweck-Guyot, R., Peyrot des Gachons, C., & Dubourdieu, D. (2000). Contribution of volatile thiols to the aroma of white wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 178–181.
- Tominaga, T., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (1996). Identification of 3-mercaptohexanol acetate, compound having a powerful odor reminiscent of box-tree, involved in the aroma of Sauvignon wines. *Vitis*, 35, 207–210.
- Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (1998). Identification of cysteinylated aroma precursors of certain volatile thiols in passion fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2874–2876.
- Tominaga, T., Gachons, C. P. d., & Dubourdieu, D. (1998). A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-cysteine conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5215–5219.
- Tominaga, T., Niclass, Y., Frerot, E., & Dubourdieu, D. (2006). Stereoisomeric distribution of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in dry and sweet white wines made from *Vitis vinifera* (Var. Sauvignon Blanc and Semillon). *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 54(19), 7251–7255.
- Widmer, U. (1983). A convenient preparation of *t*-butyl esters. *Synthesis*(2), 135–137.
- Zhu, J., Hu, X., Dizin, E., & Pei, D. (2003). Catalytic mechanism of S-ribosylhomocysteine (LuxS): Direct observation of ketone intermediates by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 125(44), 13379–13381.



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Chromatography A

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)

# Validation of a nanoliquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the identification and the accurate quantification by isotopic dilution of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in white grape juices

Aurélie Roland<sup>a,c,\*</sup>, Jérôme Vialaret<sup>b</sup>, Marc Moniatte<sup>b</sup>, Peggy Rigou<sup>c</sup>,  
Alain Razungles<sup>c</sup>, Rémi Schneider<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Interloire, 12 rue Etienne Pallu, BP 1921, 37019 Tours Cedex 01, France

<sup>b</sup> EPFL, Proteomics Core Facility, AI 0151, Station 15, CH-1015 Lausanne, Switzerland

<sup>c</sup> UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, INRA, SupAgro, Université Montpellier I, 34060 Montpellier Cedex 01, France

<sup>d</sup> Institut Français de la Vigne et du Vin, at UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, INRA 34060, Montpellier Cedex 01, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 19 October 2009

Received in revised form 5 January 2010

Accepted 8 January 2010

Available online 18 January 2010

## Keywords:

Glutathionylated conjugates

Cysteinylated conjugates

thiols

grape

stable isotope dilution assay

LC–MS/MS

## ABSTRACT

A rapid nanoLC–MS/MS method was developed and validated for the simultaneous determination of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercapto-hexan-1-ol (3MH) and 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one in grape juice using stable isotope dilution assay (SIDA). The analytes were extracted from must using a cation exchange resin and purified on C18 cartridges. They were chromatographically separated on a reverse phase column and finally analyzed by tandem mass spectrometry in selected reaction monitoring mode (SRM) using deuterated analogues as standards except for glutathionylated conjugate of 4MMP which was analyzed by external calibration. The method was validated according to the International Conference on Harmonization recommendations by determining linearity, accuracy, precision, recovery, matrix effect, repeatability, intermediate reproducibility, LODs and LOQs.

Calibration for each precursor was determined by performing Lack-of-Fit test and the best fitting for 3MH precursors was a quadratic model whereas a linear model was better adapted for 4MMP precursors. All calibration curves showed quite satisfactory correlation coefficients ( $R^2 > 0.995$  for SIDA quantification and  $R^2 > 0.985$  for external calibration). Quantification by SIDA and external calibration allowed a high level of accuracy since the averaged value ranged from 80 to 108%. Quantification of aroma precursors was accurate and reproducible over five days since intermediate precision (same analyst, same sample and same apparatus), which was evaluated by the calculation of RSD was inferior to 16%. Limits of quantification for G3MH and G4MMP were closed to 0.50 and 0.07 nmol/L and as 4.75 and 1.90 nmol/L for Cys3MH and Cys4MMP respectively.

This method was applied to the quantification of precursors into several types of grape juices: Melon B., Sauvignon, Riesling and Gewurztraminer.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Three volatile thiols are known to be ones of the major positive contributors of wine aroma: 4-methyl-4-mercapto-pentan-2-one (4MMP) [1], reminiscent of box tree and blackcurrant bud, 3-mercapto-hexan-1-ol (3MH) and its acetate (3MHA)[2], that are responsible of the fruity and citrus notes of lots of wine. These thiols are formed from odorless precursors naturally occurring in must and grapes.

The well-known and accepted biogenesis pathway of 3MH and 4MMP involves the cleavage of the corresponding cysteinylated conjugates (Cys4MMP and Cys3MH) present in grapes, by the carbon-sulfur lyase activity of yeast during alcoholic fermentation

**Abbreviations:** SIDA, stable isotope dilution assay; G3MH, S-3-(hexan-1-ol)-glutathione; G4MMP, S-3-(4-methyl-4-mercaptopentan-2-one)-glutathione; Cys3MH, S-3-(hexan-1-ol)-cysteine; Cys4MMP, S-3-(4-methyl-4-mercaptopentan-2-one)-cysteine; SRM, selected reaction monitoring; LSD, least significant difference test; CID, collision induced dissociation; BSTFA, N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide; TFA, trifluoroacetic acid.

\* Corresponding author at: UMR 1083 Sciences Pour l'Oenologie, Bat 28, 34060 MONTPELLIER Cedex 01, France. Tel.: +33 4 99 61 22 28; fax: +33 4 99 61 28 57.

E-mail address: [roland@supagro.inra.fr](mailto:roland@supagro.inra.fr) (A. Roland).

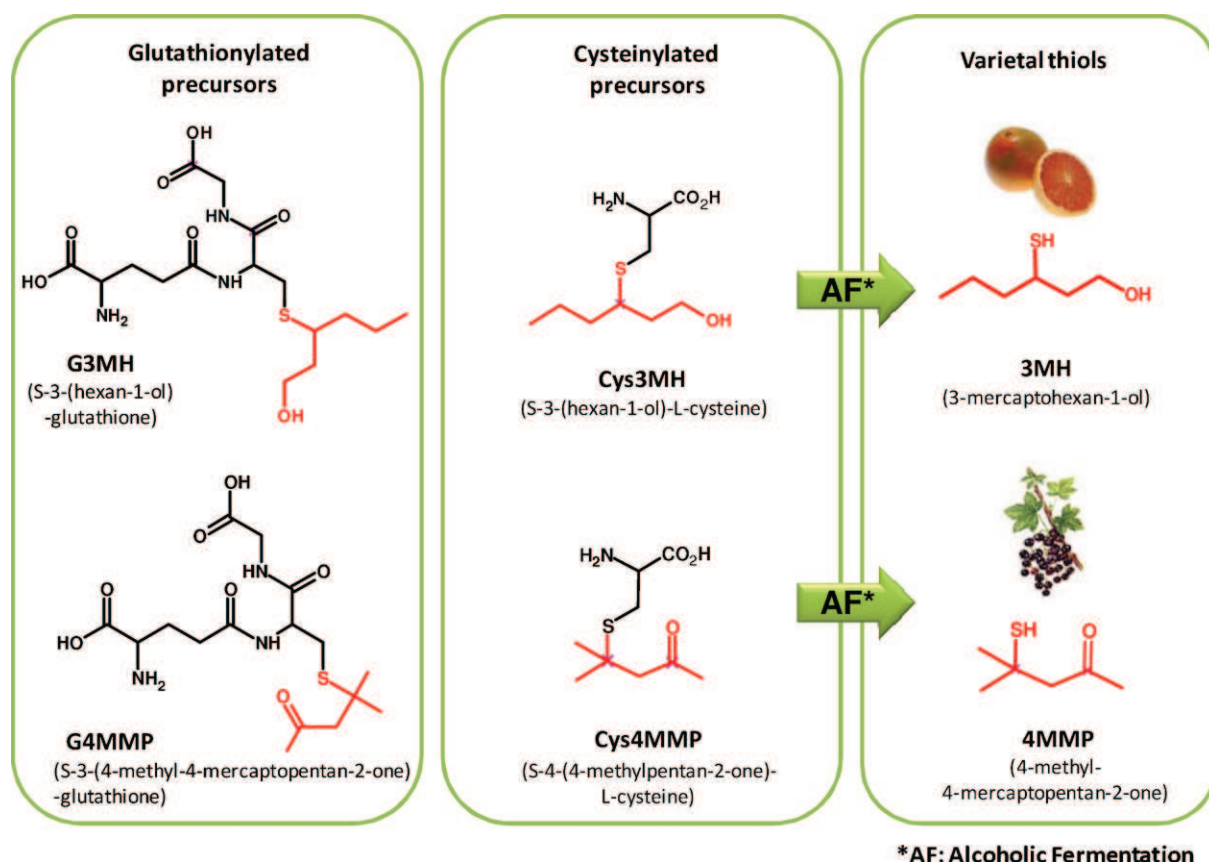


Fig. 1. Glutathionylated and cysteinylated precursor of 3MH and 4MMP, varietal thiols reminiscent of fruity notes and released during alcoholic fermentation.

[3,4] (Fig. 1). The conversion yield is generally below 1% and can only correspond in certain cases to 3–7% of the total 3MH produced [5].

Recently, other biogenesis pathways were proposed. Firstly, an alternative pathway was demonstrated from *trans*-2-hexen-1-ol and mesityl oxide leading to the corresponding thiols by sulfur addition during fermentation [6]. However, the mechanism of that conversion has not been yet elucidated. Another possible biogenesis pathway of 3MH would be the degradation of glutathionylated pro-precursor into cysteinylated precursors in grape juice by  $\alpha$ -glutamyltranspeptidase [7]. Glutathionylated conjugates of 4MMP and 3MH were formally identified in musts of different varieties [8,9], and the direct conversion of the S-3-(hexan-1-ol)-glutathione (G3MH) by yeast during fermentation was also demonstrated in Sauvignon Blanc grape juice [9] (Fig. 1).

Further studies are necessary to better elucidate the biogenesis pathway that involves the glutathionylated conjugates and the proportions of these different pathways. Such studies will require the use of an accurate and sensitive analytical method allowing the detection and the quantification of the different precursors in must at traces levels. The quantification of *trans*-2-hexen-1-ol, a volatile compound present in must at mg/L level, is quite easy and well documented [10,11]. However, the direct and accurate quantification of cysteinylated and glutathionylated conjugates is more problematical.

Several analytical methods were reported for the identification and quantification of cysteinylated precursors in must. GC-MS methods were described and required either a cleavage step [12,13], or a derivatization step using N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) [13] or ethylchloroformate [14]. These methods are time-consuming and require practical skills. More recently, Cys3MH has been quantified in Petite Arvine must using

HPLC-MS [15]. But to our knowledge, there is no published method allowing the simultaneous quantification of both glutathionylated and cysteinylated precursors in grape juice by stable isotope dilution assay.

Most of the methods previously described, were based upon gas-chromatography analysis which is widely used in food and wine industry for volatile compounds whereas for such non-volatile compounds, liquid chromatography represents the most appropriate technique for quantification at  $\mu\text{g/L}$  levels. However, to quantify thiols precursors present in must at ng/L levels (especially for Cys4MMP [12]) with a sufficient sensitivity, nanoliquid chromatography, firstly reported by Karlsson and Novotny in 1988 [16], seemed to be the most convenient method. It was already used for the quantification of biogenic amines in wines [17], pesticides in baby foods [18] and glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in licorice roots and candies [19].

Thus, the aim of this work was to develop and validate a rapid nanoLC-MS/MS method that would allow the accurate determination of precursors in must from different grape varieties.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Generality

For synthesis experiments: All solvents were analytical pure grade (>98%). Reduced glutathione was purchased from Duchefa Biochemie (Amsterdam, The Netherlands). Trifluoroacetic acid, di-*tert*-butyldicarbonate, dimethylformamide dineopentylacetal, *trans*-2-hexenal, sodium borodeuteride or borohydride, manganese dioxide, hexyn-1-ol, deuterium and dithiothreitol were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Palmitoyl chloride, ethyl acetate, *tert*butanol, triethylamine,

**Table 1**  
Purities of synthetic standards determined by <sup>1</sup>H NMR and calibration points made by diluting stock solutions in water.

Concentrations (nmol/L) (Purities (%))	Compounds			
	G3MH–G3MHd <sub>2</sub> (16–6)	G4MMP (26)	Cys3MH–Cys3MH d <sub>2</sub> (8–29)	Cys4MMP–Cys4MMPd <sub>6</sub> (9–48)
Standard 1	0.1–5	0.1	1–50	1–50
Standard 2	0.3–5	0.3	3–50	3–50
Standard 3	0.6–5	0.6	6–50	6–50
Standard 4	0.8–5	0.8	8–50	8–50
Standard 5	1–5	1	10–50	10–50
Standard 6	2–5	2	20–50	20–50
Standard 7	4–5	4	40–50	40–50
Standard 8	6–5	6	60–50	60–50
Standard 9	8–5	8	80–50	80–50
Standard 10	10–5	10	100–50	100–50

N-Boc-cysteine and triethylsilane were obtained from Fluka (St. Quentin Fallavier, France), tetrahydrofurane, dichloromethane, hexane and pentane from Riedel de Haen (St. Quentin Fallavier, France), acetic acid, toluene, dioxane and sodium sulfate from Merck (Darmstadt, Germany). All gases, nitrogen, helium were purchased from Air Product (Paris, France). Flash chromatographies were performed using Merck (Darmstadt, Germany) silica gel (grade 9385, 230–400 Mesh).

For extraction/purification experiments and LC analyses: Cation exchange resin DOWEX 50WX4-100, and hydrochloric acid were purchased from Sigma (St. Quentin en Fallavier, France). Ammonium dihydrogenphosphate was purchased from Acros Organics (Halluin, France). Cartridges C18 Sep-Pak were purchased from Waters (Baden, Switzerland). Acetonitrile was purchased from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands). Formic acid was purchased from Fluka (Epalinges, Switzerland) and methanol from Merck (Darmstadt, Germany).

## 2.2. Synthesis of natural and labeled standards

S-3-(hexan-1-ol)-glutathione (G3MH/G3MH d<sub>2</sub>) [9,20], S-3-(4-methyl-4-mercaptopentan-2-one)-glutathione (G4MMP)[8], S-3-(hexan-1-ol)-cysteine (Cys3MH/Cys3MH d<sub>2</sub>)[14] and S-3-(4-methyl-4-mercaptopentan-2-one)-cysteine (Cys4MMP/Cys4MMP d<sub>6</sub>)[14] were synthesized according to the respective described methods. Synthetic natural and deuterated compounds were characterized and quantified by <sup>1</sup>H NMR using trimethylsilyl-propionic acid as internal standard. Purities (Table 1) ranged from 6 to 48% according to the percentage of TFA (trifluoroacetic acid) salt occurring in each compound. The presence of TFA salt did not interfere with the analysis of thiol precursors since it was removed during the desalting step on reverse phase C18 cartridge.

## 2.3. Samples

Two types of samples were used for this study: grape juices prepared in our labs from fresh grapes, and industrial musts collected in several wineries.

Grape juice samples were prepared by crushing fresh berries of Melon B. and Sauvignon, under vacuum, in presence of benzene sulfonic acid (1 mg/mL) and sodium metabisulfite (4.5 mg/mL) as described by Cheynier et al. [21]. The grape samples were collected in different vineyard of the Loire Valley during the harvest in 2007 and 2008. After crushing, the stabilized grape juice obtained was stored at –20 °C until analysis.

Industrial musts were collected after the crushing step in different wineries from the Loire Valley for Sauvignon and in Alsace for Riesling and Gewurztraminer. After being collected, musts were stored at –20 °C without any further stabilization until analysis.

## 2.4. Sample preparation

Extraction was performed on an aliquot of must or grape juices (1200 μL) using DOWEX 50WX4-100 ion exchange resin (50 mg) in a micro-column. Resin was first conditioned by water (600 μL, 15 min), then HCl 2 M (600 μL, 15 min) and finally washed using water (4 mL).

Centrifugated samples (1200 μL) were spiked with internal standards: G3MH d<sub>2</sub> at 5 nmol/L and Cys3MH d<sub>2</sub> and Cys4MMP d<sub>6</sub> at 50 nmol/L, in initial volume of must. Then they were loaded on the resin and washed with water (1 mL). Elution was performed using an ammonium buffer (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, 1 M, 1 mL) and extracts were then purified on C18 cartridge (Sep-Pak) previously conditioned with MeOH (1 mL) then water (2 × 1 mL). Extracts were loaded on the cartridges, washed with water (600 μL) and the final elution was performed using MeOH (600 μL). The final extracts were concentrated to dryness, and then dissolved into an accurate volume of water (50 μL).

## 2.5. NanoLC–MS/MS analyses

Nanoliquid chromatography was performed on a Waters Acquity system coupled to a Thermo TSQ Vantage EMR (Extended Mass Range) mass spectrometer.

Analytes were first trapped (3 min at 5 μL/min) on a NanoEase Atlantis dC18 pre-column (Waters, 0.18 mm × 23.5 mm, 5 μm) and then separated on a Magic-C18 column (75 μm × 100 mm, 5 μm). The flow analytical flow rate was maintained at 800 nL/min. Mobile phases consisted of (A) water with 0.1% of formic acid and (B) acetonitrile with 0.1% of formic acid. The gradient profile started from 0.5% B for 1.5 min, increased to 5.0% B in 0.5 min, increased to 30.0% B in 16 min, increased to 40% B in 2 min and then increased to 85.0% B in 6 min for 2 min before returning to initial conditions.

The mass spectrometer was a triple-quadrupole, with electrospray ion source operated in positive mode. The spray voltage was maintained to 1.0 kV and the source temperature was 200 °C. Ionization and fragmentation parameters were optimized by infusing reference compounds at 2500 nmol/L in solution with MeOH (50%) and formic acid (0.1%). At such concentration, ionization of analytes induced a stable and intense spray allowing the optimization of key parameters as parents masses, S-lens and collision energy values. Fragmentations were studied and mass spectrometers parameters were optimized as shown in Table 2.

## 2.6. Calibration

Stock calibrant solutions were prepared by dissolving in water the synthesized compounds precisely weighed on a precision balance (Mettler Toledo, AX26 Comparator). Two stock solutions were prepared: one containing the 4 natural precursors, and the other

**Table 2**

MS/MS parameters (Quantifier ion in bold (*relative intensities*)) obtained by infusing solution of standards at 2500 nmol/L (mixture composed by 50% MeOH, 50% Water and 0.1% Formic acid) into mass spectrometer in manual tune mode (triple quadrupole, Thermo TSQ Vantage).

Parent ions (Da)	Daughter ions (Da)	Collision energy (V)	S-lens (V)	Scan segment (min)	Compounds
220.121	98.99 (30.83)	5	65		
220.121	105.05 (1.38)	5	65	5–9.5	Cys4MMP
220.121	<b>122.20</b> (100)	6	65		
226.161	105.09 (100)	11	66		
226.161	122.03 (61.87)	5	66	5–9.5	Cys4MMPd <sub>6</sub>
226.161	168.20 (1.51)	12	66		
222.127	83.19 (64.30)	12	67		
222.127	101.12 (10.87)	8	67	6.5–11.5	Cys3MH
222.127	<b>205.13</b> (100)	9	67		
224.153	85.19 (85.86)	13	67		
224.153	103.12 (18.60)	9	67	6.5–11.5	Cys3MH d <sub>2</sub>
224.153	207.13 (100)	7	67		
406.298	162.00 (88.17)	22	130		
406.298	<b>179.2</b> (100)	17	130	7.5–12	G4MMP
406.298	259.51 (16.08)	14	130		
408.272	<b>162.00</b> (98.47)	17	132		
408.272	262.03 (19.26)	7	132	9.5–15	G3MH
408.272	279.03 (100)	12	132		
410.323	<b>162.00</b> (100)	20	138		
410.323	264.22 (94.62)	15	138	9.5–15	G3MHd <sub>2</sub>
410.323	281.14 (83.32)	11	138		

**Table 3**

Influence of DOWEX amount during extraction step.

Compounds	m/z Ion (Da)	Average areas of labeled compounds after extraction on DOWEX resin (Arbitrary units, 10 <sup>9</sup> )		ANOVA ( $\alpha = 0.05$ )	
		50 mg of DOWEX (n = 3)	100 mg of DOWEX (n = 3)	P value	
Cys4MPP d <sub>6</sub>	226	17.7	16.0	0.6526 > 0.05	There is not a statistically significant difference between both extractions.
Cys3MH d <sub>2</sub>	224	11.3	7.7	0.1948 > 0.05	
G3MH d <sub>2</sub>	410	14.7	10.7	0.3436 > 0.05	

containing their deuterated analogues except for G4MMP which was not available as deuterated compound.

Stock solutions used for the preparation of the calibrating solutions were stocked at  $-20^{\circ}\text{C}$  and their stability was weekly checked over two months by analyzing known amounts and comparing all responses.

Calibration curves were performed by analyzing in duplicate ten aqueous calibrating solutions containing all target compounds at different levels of concentrations of natural compounds and a fixed amount of labeled compounds as reported in Table 1.

### 2.7. Identification criteria

Cysteinylylated and glutathionylated precursors were considered as identified in the samples when meeting the following criteria specified in Commission decision 2002/657/EC [22]:

- The relative retention time of an analyte in a sample and a calibration solution has to be within the  $\pm 2.5\%$  tolerance.

**Table 4**

Influence of water for the conditioning of C18 cartridges.

Grape variety (Place)	Response increasing (%)			
	G3MH	G4MMP	Cys3MH	Cys4MMP
Melon B. (Nantes)	23%	40%	17%	18%
Sauvignon (Tours)	5%	39%	22%	28%
Sauvignon (Sancerre)	18%	32%	31%	14%
Average	16%	37%	23%	20%

- The presence of four identification points (parent ion and three daughter ions (Table 2)).
- The relative ion intensities have to comply with the permitted tolerances (Newmann–Keuls comparison test).

### 2.8. Validation

#### 2.8.1. Linearity

Both linear and quadratic models were tested performing lack-of-fit test model. Calibration was performed every 5 days using ten calibrating points in duplicate and every time the stability of the model was checked. In addition, blank samples were analyzed to avoid any memory effect on chromatographic system.

#### 2.8.2. Recovery

The overall recovery was determined by spiking three different samples (2 Sauvignon, 1 Melon B) with known amounts of precursors at three levels of concentration for G4MMP (5, 10 and 20 nmol/L) and at one level of concentration for G3MH (10 nmol/L), Cys3MH and Cys4MMP (50 nmol/L). Analyses were performed in triplicate for G4MMP and with 9 repetitions for analytes quantified by SIDA. All added amounts were within the calibrated range. The comparison between spiked and non-spiked values allowed us to calculate the recovery, accuracy and precision for each grape variety. Matrix effect was evaluated according to Matuszewski et al. method [23,24].

#### 2.8.3. Repeatability

The mass spectrometry data obtained for recovery study were also used to determine the repeatability (3 musts with  $n = 9$ , for

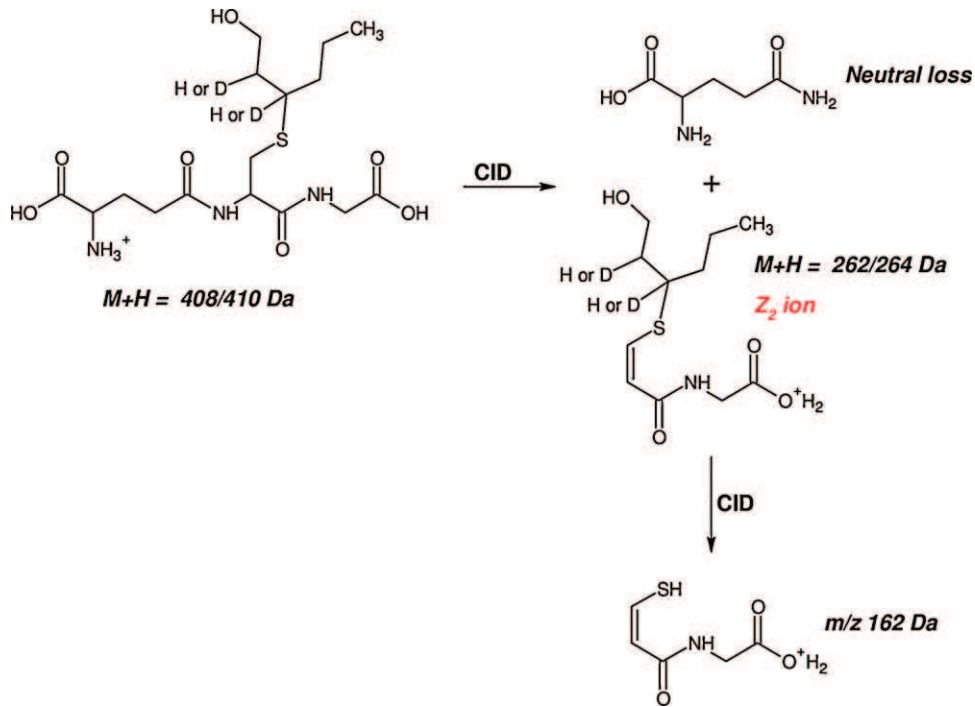


Fig. 2. Fragmentations of G3MH/G3MH  $d_2$  by collision induced dissociation (CID).

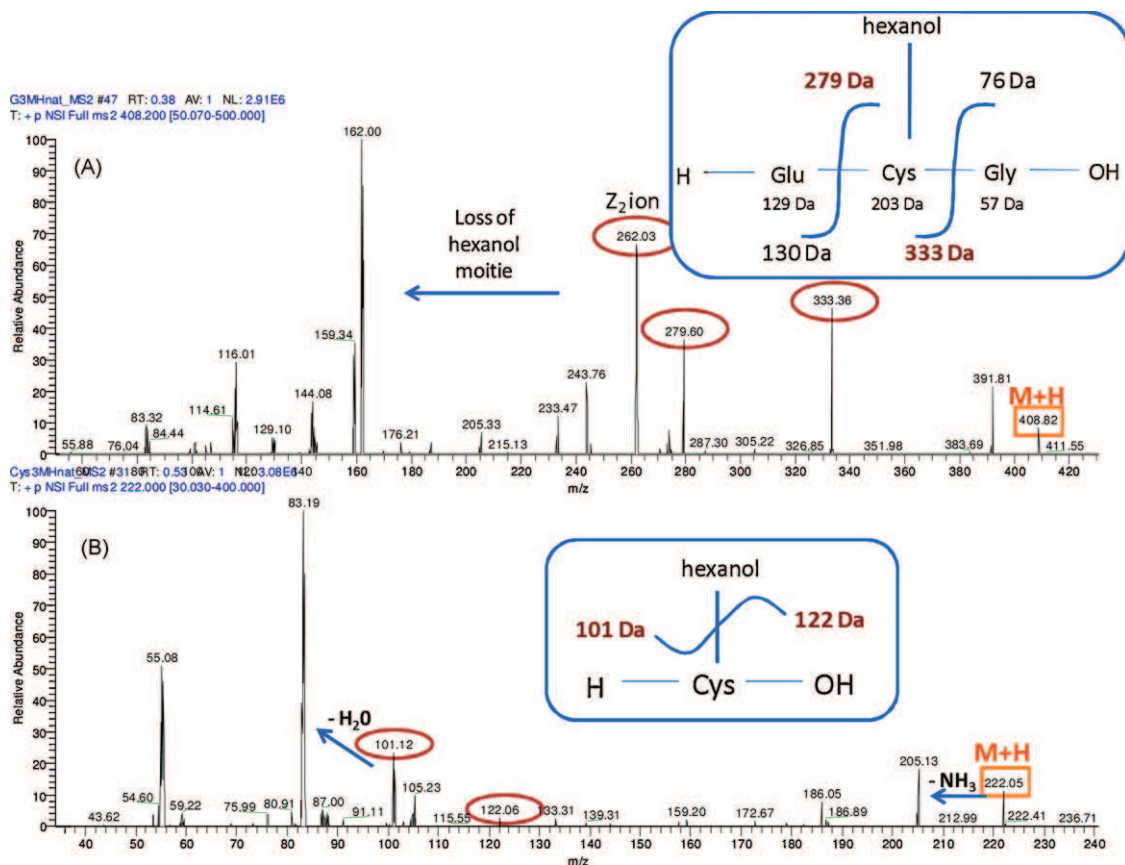


Fig. 3. Fragmentation pattern of G3MH (A) and Cys3MH (B) by infusing standard solutions at 2500 nmol/L into mass spectrometer (Thermo TSQ Vantage).

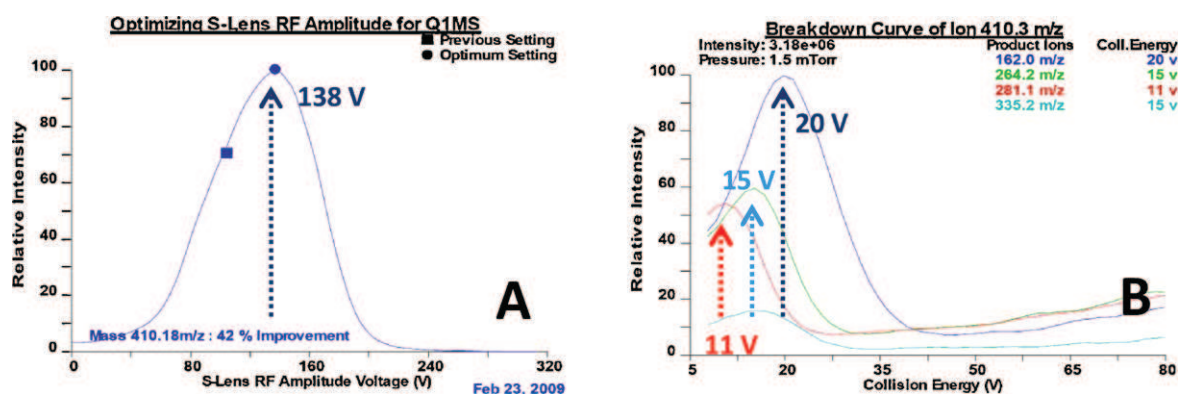


Fig. 4. Example of mass spectrometry parameters optimized for G3MH d<sub>2</sub> (A: S-lens optimization and B: CID optimization) obtained by infusing solution of standards at 2500 nmol/L into triple quadrupole (Thermo TSQ Vantage).

Table 5

Prediction of correlation model using the Lack-of-fit test.

Compounds	P-Value LOF	Model	Equation	Correlation coefficient (R <sup>2</sup> )	Range of validity model (nmol/L)
G3MH	0.8733 > 0.01	Quadratic	$Y = -6.1461X^2 + 28.835X - 0.012$	0.9981	0.1–10
	0.1590 > 0.01	Quadratic	$Y = 0.1325X^2 + 1.8301X - 0.0168$	0.9994	
Cys3MH	<b>0.0006 &lt; 0.01</b>	<b>Non-linear</b>		<b>0.9978</b>	<b>1–100</b>
G4MMP	0.9776 > 0.01	Linear	$Y = 17396X - 285.225$	0.9871	0.1–10
Cys4MMP	0.2475 > 0.01	Linear	$Y = 0.914X - 0.0268$	0.9973	1–100

analytes quantified by SIDA, and  $n=3$  for G4MMP quantified by external calibration).

#### 2.8.4. Limits of detections and quantifications (LODs and LOQs)

Limits of detection and quantification were evaluated on 18 samples of Sauvignon and Melon B. by measuring the corresponding signal to noise ratio (S/N) for each analytes signal. Limits of detection and quantification were averaged for the whole collection of samples considering S/N=3 and S/N=10 respectively [25].

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Mass spectrometer parameters optimization

Target compounds were infused into the mass spectrometer to determine their fragmentation pattern by collision induced dissociation (CID). Glutathione conjugates (G3MH and G4MMP) gave similar fragmentations due to their similar chemical structure. Major fragments were due to the loss of glutamic acid residue (−129 Da), the loss of glycine residue (−75 Da) and to the formation of Z<sub>2</sub> ion by a specific cleavage of glutamic acid residue (−146 Da) (Figs. 2 and 3). Cysteinylylated conjugates (Cys3MH and Cys4MMP) gave similar fragmentations resulting from the cleavage of the thioether bond between cysteine and alkyl groups (data not shown).

To perform selected reaction monitoring (SRM) experiments, three daughter ions resulting from parent mass fragmentation were selected for each compound according to their abundance and selectivity.

Table 6

Recovery yields and matrix effect for G4MMP.

Nominal concentrations (nmol/L)	Mean area of G4MMP (arbitrary units)				Recovery of G4MMP (%)			Matrix effects (%)		
	Neat standard	HAI	Sauv.G	S	HAI	Sauv.G	S	HAI	Sauv.G	S
5	76736	10004	13169	10074	13%	17%	12%	102%	99%	107%
10	157806	19926	31665	18784	13%	20%	12%	100%	99%	103%
20	330931	45776	62785	34990	14%	20%	11%	96%	96%	98%

Optimization of the mass spectrometer parameters that enhance selectivity (adjustment of monoisotopic parent masses) and sensitivity (S-lens and collision energy values) was also performed using the infusion of reference compounds as previously described. The optimized parameters are presented in Table 2 and examples of optimization for sensitivity are shown Fig. 4. S-lens and CID were chosen so that they maximize the intensity of the measured signal, as presented on the graphs. The quantification of such analytes in complex matrixes as musts and at sub μg/L levels required the best sensitivity as possible and the maximization of signal intensity is crucial.

It can be noted that similar S-Lens values were obtained for cysteine conjugates (from 65 to 67 V) and glutathione conjugates (from 130 to 138 V), due to the similarities of the structure. However, no obvious relation can be observed for collision energy.

#### 3.2. Sample preparation optimization

To our knowledge, extraction and purification protocols for both glutathionylated and cysteinylylated precursors of 3MH and 4MMP in must were not reported in literature. Consequently, they were adapted from methods already developed for cysteinylylated ones.

##### 3.2.1. Dowex extraction

Aroma precursors were extracted from different musts using cation exchange resin Dowex, as this method was already described as being convenient for cysteinylylated conjugates [14].

Firstly, the influence of resin amount was studied. Three different grape juices were chosen: one of Melon B. (from Nantes) and two of Sauvignon Blanc (from Tours and Sancerre). Small



**Table 7**  
Accuracy measurement.

Grape Variety	Place	% Accuracy (Spiked amounts into musts, $n=9$ )		
		G3MH (10 nmol/L)	Cys3MH (50 nmol/L)	Cys4MMP (50 nmol/L)
Melon B.	Nantes	99	116	70
Sauvignon	Tours	90	105	79
Sauvignon	Sancerre	77	102	92
Average		89	108	80
G4MMP spiking (nmol/L) $n=3$ for each level of spiking		Average accuracy at each level (%)	$P$ value ( $\alpha=0.05$ )	Global accuracy (%)
5		100	0.6599 > 0.05	104
10		107		
20		105		

**Table 8**  
Precision measurement.

Grape Variety	Place	RSD for $n=8$ analysis			
		G3MH (10 nmol/L)	Cys3MH (50 nmol/L)	Cys4MMP (50 nmol/L)	G4MMP (all considered levels of spiking)
Melon B.	Nantes	3%	7%	12%	11%
Sauvignon	Tours	5%	3%	6%	7%
Sauvignon	Sancerre	7%	7%	4%	27%

**Table 9**  
Limits of detection and quantification.

Compounds	Found concentrations in musts* (nmol/L)	S/N	LOD for S/N = 3 (nmol/L)	LOQ for S/N = 10 (nmol/L)
G3MH	23.91	491	0.15	0.50
G4MMP	0.41	53	0.02	0.07
Cys3MH	63.22	132	1.44	4.75
Cys4MMP	7.85	41	0.58	1.91

\* Values corresponds to the averaged concentrations measured on eighteen samples.

volumes of each must (600  $\mu$ L) were spiked with labeled compounds: Cys3MHD<sub>2</sub> and Cys4MMPd<sub>6</sub> at 1000 nmol/L and G3MHD<sub>2</sub> at 100 nmol/L. Extraction was then performed in triplicate on 50 and 100 mg of DOWEX resin. ANOVA test showed a non-significant difference of responses between the two amounts of resin (Table 3). Consequently, further extractions were performed using 50 mg of Dowex.

### 3.2.2. Purification on C18

Extraction on cation exchange resin allowed the elimination of polyphenols, sugars and other non-charged compounds from must. As a pre-column was used on the nanoliquid chromatograph, direct injection of Dowex extracts was tested. Important interferences were observed under these conditions that considerably decreased the sensitivity.

Thus, a purification step on C18 cartridge was developed, adapted from the protocol proposed for the quantification of S-cysteine conjugates in Petite Arvine musts [15]. Sep-Pak cartridges, convenient for amino-acids purification [26], were chosen and conditioning step was optimized using three different musts. As shown in Table 4, a conditioning with only MeOH, as proposed by Luisier et al. [15], resulted in lower responses than with MeOH follow by water. As a consequence, cartridges were conditioned with MeOH (1 mL) follow by water (2 mL) for all further experiments.

### 3.2.3. NanoLC separation optimization

Conventional liquid chromatography was used to quantify Cys3MH in Petite Arvine must [15], that is to say the most abundant thiol precursor naturally present in grapes ( $\mu$ g/L levels). To quantify others precursors occurring at lower levels (ng/L levels), it was necessary to use a more sensitive analytical approach. Nanoliquid chromatography seemed to be the method of choice since it provides a better sensitivity, efficiency and shorter analysis times.

Indeed, many references in literature proved its efficiency in the field of proteomics, pharmaceutical and environmental analysis [27].

To reach a very good sensitivity, thiol precursors were firstly focused on a pre-column composed by a reverse phase C18 as recommended by Mills et al. [28] and then separated on a similar analytical column. Under these conditions, limits of detection for target compounds were sufficient (inferior to ng/L levels) to be applied for real matrix analysis.

The separation of precursors was based on a classical gradient used in peptidomics [29,30] with acetonitrile and water both slightly acidified with formic acid at 0.1%. Under these conditions, cysteinylated precursors eluted sooner than glutathionylated ones. Even if chromatographic, separation of Cys3MH and Cys4MMP, and, in the same manner, of G3MH and G4MMP, could be optimized, a sufficient selectivity and specificity were reached to distinguish each precursor from the other one using tandem mass-spectrometry in selected reaction monitoring as detection mode. Thus, no further optimization was performed.

**Table 10**  
Repeatability and intermediate precision.

SAMPLES	Concentrations (nmol/L)			
	G3MH	Cys3MH	Cys4MMP	G4MMP
Sauvignon day 1	1.911	14.664	19.171	0.813
Sauvignon day 2	1.984	17.983	15.849	1.115
Sauvignon day 3	2.118	15.566	16.340	0.919
Sauvignon day 4	2.082	18.766	15.350	1.247
Sauvignon day 5	2.049	18.191	15.856	0.993
Mean concentration	2.029	17.034	16.513	1.017
Intermediate precision (%)	<b>4</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>17</b>
Repeatability (%)	<b>2</b> ( $n=6$ )	<b>2</b> ( $n=6$ )	<b>5</b> ( $n=6$ )	<b>7</b> ( $n=3$ )

**Table 11**Identification criteria for G3MH in neat standards (A) and in Melon B. samples (B) (Newmann–Keuls were performed using  $\alpha = 0.05$ ).

(A) Daughter ions	Daughter ions area of G3MH in NEAT STANDARDS (% of base peak)							
	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5	Mean	RSD (%)	Newmann–Keulstest
162.00	97.80	96.86	99.02	99.40	99.25	98.47	1.11%	Group A
262.03	19.00	18.84	18.69	19.58	20.20	19.26	3.24%	
279.03	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00%	
Retention time (min)	11.35	11.35	11.36	11.36	11.36	11.36	0.05%	
(B) Daughter ions	Daughter ions in SAMPLES (% area of G3MH of base peak)							
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Mean	RSD (%)	Newmann–Keulstest
162.00	96.29	98.79	96.44	96.01	95.99	96.70	1.22%	Group A
262.03	19.71	19.69	19.86	19.04	16.93	19.05	6.43%	
279.03	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00%	
Retention time (min)	11.35	11.36	11.35	11.36	11.35	11.35	0.05%	

### 3.3. Analytical method validation

#### 3.3.1. Selectivity

Cysteinylated and glutathionylated conjugates of 3MH and 4MMP are naturally occurring in grapes so blank matrix is not available. Nevertheless, our analytical method was based on selected reaction monitoring mode that ensures an accurate selection of parent and daughter ions avoiding most interferences. In the following paragraphs, the measurement of matrix effect and accuracy proved the high selectivity of the method.

#### 3.3.2. Calibration

Calibration for each compound was performed using LC-Quan 2.5 software (Thermo). The calibration curves for isotopic dilution were obtained by plotting the peak area ratio of quantifier ions ( $A_{\text{analyte}}/A_{\text{standard}}$ ) multiplied by the internal standard concentration versus the corresponding concentration of analytes with 1/X weighting. Calibration curve for G4MMP was obtained by plotting peak area against concentration.

Linearity of these curves was assessed by the lack-of-fit test. The linear model appeared to be adequate for both 4MMP precursors since the P-values for lack-of-fit were greater or equal to  $\alpha = 0.01$  (Table 5). However, for G3MH and Cys3MH, the quadratic model was the best regression model even if the Cys3MH calibration curve exhibited a satisfactory correlation coefficient in linear model. Each precursor family exhibited its own correlation model: quadratic for 3MH precursors and linear for 4MMP precursors; independently to the quantification method used (SIDA or external calibration).

#### 3.3.3. Recovery for G4MMP

Quantification of G3MH, Cys3MH and Cys4MMP was performed by stable isotope dilution assay. This technique avoids any recovery

studies since natural and labeled compound have similar behaviors. However, quantification of G4MMP by external calibration requires the evaluation of recovery yields because a non-negligible amount of analytes was lost during sample preparation (extraction and purification steps).

G4MMP was spiked into three different musts at three concentration levels (5, 10 and 20 nmol/L) in triplicate in view to evaluate the effect of initial spiked amount on recovery yields. Samples were extracted on cation exchange resin and purified on C18 cartridges followed by nanoLC-MS/MS analysis.

Recovery yields ranged from 11 to 20% as shown in Table 6. The Fisher's least significant difference test proved that recovery yields do not depend on spiking level and grape variety. Thus, it can be assumed that recovery yields are meanly equal to 14%. Even if an important amount of analyte was lost during sample preparation, the method sensitivity was sufficient to accurately quantify G4MMP in must.

#### 3.3.4. Matrix effects

As a blank matrix was not available, matrix effect was evaluated using the same experimental set as for recovery studies. In theory, matrix effects does not affect compounds quantified by stable isotope dilution assay since the suppression or enhancement of ion peak intensity, is similar for natural and labeled analyte. Consequently, we only measured matrix effect for G4MMP which was quantified by external calibration. In practice, peaks areas for neat standard and for samples spiked before extraction and purification steps were compared taking into account the recovery values. If global ratio (area sample/area standard) was inferior or superior to 100%, there is a significant influence of the matrix on analytes measurement [24].

**Table 12**

Quantification of precursors in Melon B., Sauvignon, Riesling and Gewurztraminer grape juices.

Grape variety		Melon B.	Sauvignon	Riesling	Gewurztraminer
Number of samples		36	21	9	5
G3MH concentration (nmol/L)	Mean	<0.5	10.72	3.11	14.62
	Max		3.31	1.67	13.66
	Min		18.44	4.96	17.33
Cys3MH concentration (nmol/L)	Mean	<4.75	101.14	108.59	270.52
	Max		35.92	70.16	263.34
	Min		177.50	138.67	263.20
G4MMP concentration (nmol/L)	Mean	nd	2.21	1.17	0.53
	Max	nd	0.07	1.36	0.25
	Min	nd	10.62	4.53	0.45
Cys4MMP concentration (nmol/L)	Mean	12.23	18.24	<1.9	3.42
	Max	17.45	11.79		2.46
	Min	4.87	28.40		3.72

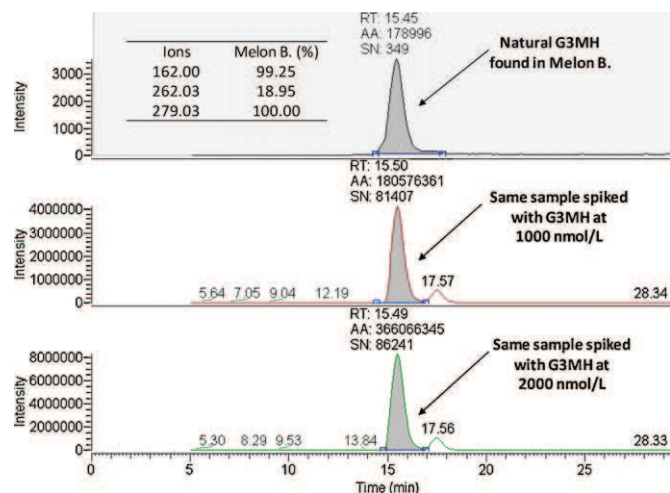


Fig. 5. Identification of G3MH in Melon B. must (Major fragments of synthetic G3MH: 408 Da =>162 Da (98%), 408 Da =>262 Da (18%) and 408 Da =>279 Da (100%).)

As shown in Table 6, no matrix effect is observed in our method as global ratios ranged from 95 to 105% [24]. Consequently, the spiking of known amounts of precursor gave an accurate and precise value. This observation allows performing calibration curves in model solutions instead of real matrix and can be used for quantification on all types of white musts.

### 3.3.5. Accuracy and precision

Accuracy was evaluated by adding known amounts of synthetic precursors into three different musts at different concentration levels. In parallel, control samples (no spiked musts) were performed to distinguish the natural amount of precursor from the one added. By comparing theoretical spiked amount and calculated amount, we evaluated the accuracy of the method.

Three different musts of Melon B. and Sauvignon Blanc from three different locations (Nantes, Tours, Sancerre) were chosen for this experiment in order to have nine replicates. The G3MH, Cys3MH, and Cys4MMP, quantified by SIDA, were added at one concentration only in these musts (10, 50, and 50 nmol/L, respectively) whereas G4MMP, quantified by external calibration, was spiked at three levels of concentrations (5, 10 and 20 nmol/L). Fisher's least significant difference test was performed to evaluate the influence of grape variety and initial amount spiked on recovery and accuracy.

Extractions and purifications of each sample were performed according to the previous method and analyzed by nanoLC-MS/MS.

Accuracy for all the compounds was satisfactory as averaged value ranged from 80 to 108% (Table 7). The Fisher's least significant difference test showed that accuracy was equivalent independently of the grape variety considered.

The same samples were used to determine the precision. For all compounds, precision was satisfactory since RSD values were inferior or equal to 12% for all data considered (Table 8).

### 3.3.6. Repeatability and intermediate reproducibility

Repeatability was calculated using one Sauvignon must spiked with known amounts of analytes. Samples were all analyzed the same day with  $n=3$  for G4MMP and  $n=9$  for other compounds. Relative standard deviations ranged from 2 to 7% for all analytes, demonstrating the satisfactory precision of the method (Table 10).

Intermediate reproducibility was evaluated along five consecutive days by extracting, purifying and analyzing the same Sauvignon must each day and by measuring the relative standard deviation of the concentrations obtained (same sample, same analyst and same

apparatus). Globally, stable isotope dilution assay provided better reproducibility than external calibration, showing the advantage of using labeled internal standard.

Quantification of all aroma precursors was reproducible with good accuracy and precision over five days (Table 10). Relative standard deviations were quite satisfactory because they were inferior to 11% for quantification by SIDA and inferior to 17% for external quantification.

### 3.3.7. Limits of detections and quantifications (LODs – LOQs)

Limits of detection and quantification were measured on a set of eighteen must samples. According to the International Conference on Harmonization recommendations, we evaluated limits of detection and quantification using a signal to noise ratio equal to 3 and 10 respectively. Therefore, we measured the average concentration of each precursor in different samples corresponding to a signal to noise ratio equal to 3 and 10. For cysteinylated precursors, LOQs were quite satisfactory (inferior to 4.75 nmol/L) considering levels at which these compounds occur in musts [5,12] (Table 9). For glutathionylated precursors, limits of quantification inferior to 0.5 nmol/L are very convenient to quantify these compounds at traces levels in must (Table 10).

## 4. Application to natural samples

### 4.1. Identification of G3MH in Melon B. grape juice

Glutathionylated precursor of 3MH was clearly identified in Melon B. musts using a method that responds to the recommendations specified in the Commission Decision 2002/657/EC [22]. The shift of G3MH retention times between samples and neat standard was inferior to 1% which was in accordance with  $\pm 2.5\%$  tolerance. One parent and three daughter ions were selected to identify the analyte in real matrix. Finally, ion ratio comparison between five samples of Melon B. and five neat standards demonstrated the statistical similarity of repartition using the Newmann–Keuls test (Table 11).

Also, the addition of known amounts of synthetic G3MH into extract involved the increase of initial signal, demonstrating that signal resulted from natural G3MH (Fig. 5).

Consistency between retention times and ion ratios in our analyses allowed us to clearly identify glutathionylated precursor of 3MH into Melon B.

### 4.2. Identification of G4MMP in Riesling and Gewurztraminer grape juices

The identification of glutathionylated precursor of 4MMP was performed using similar strategy as previously developed. The G4MMP was clearly identified into Sauvignon, Riesling and Gewurztraminer musts.

Considering these aspects, we observe that G3MH was ubiquitous whereas the G4MMP seemed to be more specific for certain grape varieties.

### 4.3. Quantification of precursors in several types of grape juices

Glutathionylated and cysteinylated precursors were quantified into two types of musts: directly prepared in wine cellars for Sauvignon, Riesling and Gewurztraminer and prepared in the laboratory for Melon B. Concentrations of glutathionylated conjugates were systematically lower than those of cysteinylated conjugates (Table 12). Also, G3MH concentrations were more important than those of G4MMP, as already reported for cysteinylated precursors [12].

Recent investigations demonstrated that conversion yield of G3MH into 3MH in Sauvignon Blanc was closed to 4.4%. Assuming this value, the contribution of G3MH for the total production of 3MH could be estimated for all grape varieties from 2 to 86 ng/L. Thus, the G3MH could be considered as another important precursor of 3MH.

## 5. Conclusion

This is the first analytical method by nanoLC–MS/MS allowing the direct and simultaneous quantification of four precursors of varietal thiols in white grape musts without any derivatization steps. The validation study demonstrated the impressive accuracy, precision and sensitivity of the method allowing the quantification of these compounds at traces levels in grapes. The formal identification of glutathionylated precursors in different grape varieties will bring new insight in the understanding of varietal thiol production in wine.

## Acknowledgements

We thank Diego Chiappe from the Proteomics Core Facility (EPFL, Lausanne) for technical support in LC–MS/MS devices. Interloire, IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin) and Sicavac are also acknowledged for technical and financial supports (CIFRE fellowship).

## References

- [1] T. Tominaga, D. Dubourdieu, Flavor Fragrance J. 12 (1997) 373.
- [2] T. Tominaga, P. Darriet, D. Dubourdieu, Vitis 35 (1996) 207.
- [3] T. Tominaga, D. Dubourdieu, J. Agric. Food Chem. 48 (1998) 2874.
- [4] T. Tominaga, C. Peyrot des Gachons, D. Dubourdieu, J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 5215.
- [5] M. Subileau, R. Schneider, J.-M. Salmon, E. Degryse, J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 9230.
- [6] R. Schneider, F. Charrier, A. Razungles, R. Baumes, Anal. Chim. Acta 563 (2006) 58.
- [7] C. Peyrot des Gachons, T. Tominaga, D. Dubourdieu, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 4076.
- [8] B. Fedrizzi, K.H. Pardon, M.A. Sefton, G.M. Eley, D.W. Jeffery, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 991.
- [9] A. Roland, R. Schneider, C. Le Guernevé, A. Razungles, F. Cavelier, In *Vino Analytica Scientia*, Angers (France) Oral Communication, 2009.
- [10] R. Schneider, Contribution à la connaissance de l'arôme et du potentiel aromatique du Melon B. (*Vitis Vinifera* L.) et des vins de Muscadet, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, PhD Thesis, 2001, p. 222.
- [11] R. Cordonnier, C. Bayonove, Connaissance de la vigne et du vin (1981) 269.
- [12] C. Peyrot des Gachons, T. Tominaga, D. Dubourdieu, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 3387.
- [13] M.-L. Murat, T. Tominaga, D. Dubourdieu, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 5412.
- [14] L. Dagan, Potentiel aromatique des raisins de *Vitis Vinifera* L. cv. Petit Manseng et Gros Manseng. Contribution à l'arôme des vins de pays Côtes de Gascogne, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, PhD Thesis, 2006, p. 238.
- [15] J.-L. Luisier, H. Buettner, S. Iker, T. Rausis, U. Frey, J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 2883.
- [16] K.E. Karlsson, M. Novotny, Anal. Chem. 60 (1988) 1662.
- [17] J. Hernández-Borges, G. D'Orazio, Z. Aturki, S. Fanali, J. Chromatogr. A 1147 (2007) 192.
- [18] K. Buonasera, G. D'Orazio, S. Fanali, P. Dugo, L. Mondello, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 3970.
- [19] S. Fanali, Z. Aturki, G. D'Orazio, M.A. Raggi, M.G. Quaglia, C. Sabbioni, A. Rocco, J. Sep. Sci. 28 (2005) 982.
- [20] A. Roland, R. Schneider, C.L. Guernevé, A. Razungles, F. Cavelier, Poster in Groupe Français des Peptides et Protéines, Albéville (France), 2009.
- [21] V. Cheynier, N. Basire, J. Rigaud, J. Agric. Food Chem. 37 (1989) 1069.
- [22] Commission decision No. 2002/657/EC, Official Journal of the European Communities L221 (2002) 8.
- [23] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Anal. Chem. 70 (1998) 882.
- [24] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Anal. Chem. 75 (2003) 3019.
- [25] Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts, OIV, vol. 1, 2009.
- [26] [http://www.waters.com/waters/nav.htm? locale=en\\_US&cid=513158#](http://www.waters.com/waters/nav.htm? locale=en_US&cid=513158#).
- [27] H.-B. Javier, A. Zeineb, R. Anna, F. Salvatore, J. Sep. Sci. 30 (2007) 1589.
- [28] M.J. Mills, J. Maltas, W. John Lough, J. Chromatogr. A 759 (1997) 1.
- [29] S.C. Colin, S.G. Philip, M.K. Peter, R. Lucy, Rapid Commun. Mass Spectrom. 20 (2006) 829.
- [30] S.J. Husson, E. Clynen, G. Baggerman, A. De Loof, L. Schoofs, Biochem. Biophys. Res. Commun. 335 (2005) 76.

## Evolution of S-Cysteinylated and S-Glutathionylated Thiol Precursors during Oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc Musts

AURÉLIE ROLAND,\*<sup>†</sup> JÉRÔME VIALARET,<sup>§</sup> ALAIN RAZUNGLES,<sup>#</sup> PEGGY RIGOU,<sup>#</sup> AND RÉMI SCHNEIDER<sup>‡</sup>

<sup>†</sup>Interloire, 12 rue Etienne Pallu, B.P. 1921, 37019 Tours Cedex 01, France, <sup>§</sup>EPFL, Proteomics Core Facility, AI 0151, Station 15, CH-1015 Lausanne, Switzerland, <sup>#</sup>UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, INRA, SupAgro, Université Montpellier I, 34060 Montpellier Cedex 01, France, and <sup>‡</sup>Institut Français de la Vigne et du Vin, at UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, INRA, 34060 Montpellier Cedex 01, France

Thiol precursor content in Melon B. and Sauvignon blanc grape juices obtained under vacuum was determined by quantifying cysteinylated and glutathionylated conjugates of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) and 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one (4MMP). This characterization allowed the study of thiol precursor evolution during ripening of Sauvignon blanc grapes in several viticultural situations together with grape reaction product (GRP) and the main substrate of polyphenoloxidase, that is, caffeic acid. Concentration of precursors greatly increased during ripening except for the cysteinylated conjugate of 4MMP. Precursor evolution was also monitored during the oxidation of grape juice. Addition of oxygen to a grape juice set off the enzymatic oxidation of hydroxycinnamic acids but did not negatively affect precursor concentrations. Part of the glutathionylated precursor of the 3MH was produced during prefermentative operations (up to 140% in Sauvignon blanc). Consequently, this precursor naturally occurring in grapes was also formed during prefermentative operations. The proportion of biogenetic and prefermentary formation of the glutathionylated precursor of 3MH was different under industrial conditions depending on the grape variety considered. Addition of glutathione and hexenal in grape juices of Melon B. and Sauvignon induced an increase of the production of 3MH and consequently of its acetate in the resulting wines. Residual glutathione in must has to be preserved to enhance the aromatic potential of grapes.

**KEYWORDS:** Oxygen; glutathione; hexenal; aroma precursors; thiols; Sauvignon blanc; Melon B.

### INTRODUCTION

Young wines of Sauvignon blanc and Melon B. exhibit fruity notes when grape harvest is protected against oxidation using carbon dioxide, additions of ascorbic acid or sulfur dioxide, or the application of moderate temperatures. Some varietal thiols are responsible for these organoleptic sensations: 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one (4MMP) (1), reminiscent of box tree and black currant bud; and 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) (2) and 3-mercaptohexyl acetate (3MH-A) (3), responsible for the fruity and citrus notes of lots of wines. 3MH and 4MMP resulted from odorless precursors in grapes, identified as cysteinylated (4) and glutathionylated (5, 6) conjugates. 3MHA came from the acetylation of 3MH by the yeast during the alcoholic fermentation. Both cysteinylated precursors (4) and G3MH (7, 8) are cleaved during alcoholic fermentation by the yeast.

Aromatic degradation observed in wines is well documented. During aging, an important decrease of 3MH occurs in wine due to the presence of dissolved oxygen (9). 3MH is probably oxidized

to its disulfide. Nevertheless, experiments under controlled conditions have shown that the disappearance of 3MH in oxygenated wine is not concomitant with the oxygen consumption but occurred 48 h later (9). Consequently, thiols could react with reactive species present in wine such as polyphenols (10, 11) and more specifically with the quinones of catechin and epicatechin. Additional investigations showed that Fe(III) plays a crucial role in the oxidation of polyphenols and, so, on the trapping of thiols in a wine model solution (12). On the contrary, specific conditions of aging (total lees) or the presence of chemical molecules (free sulfur dioxide and anthocyanins such as malvidin-3-glucoside (9)) enhance the stabilization of thiols in wine.

On the contrary, there is a lack of data in the literature to support the technical observation of a better production of thiols when the must is protected from oxidation as reported above. Oxygen consumption induces a color change of the must that can contribute to intensity of darkness. Indeed, release of *trans*-caftaric acid during crushing of the berries induced the production of quinones, via the enzymatic activity of polyphenol oxidase and in the presence of oxygen. Quinones are chemically unstable and can condense with other phenolic compounds such as flavonoids to form polymerized adducts. According to their

\*Address correspondence to this author at INRA-UMR Sciences Pour l'œnologie, 2 place Pierre Viala, F-34060 Montpellier, France (telephone +33 4 99 61 22 28; fax +33 4 99 61 28 57).

condensation degree, such polymers give yellow to brown pigments in must (13). Quinones can undergo Michael addition of glutathione to form the so-called grape reaction product (GRP) (14, 15). This derivative is not oxidizable by the polyphenol oxidase and does not modify the color of the must. However, it can undergo an additional oxidation under the laccase action (16) from *Botrytis cinerea*, on botrytized grapes. The laccase oxidation of GRP gives the corresponding *o*-quinones, which, in turn can proceed to brown polymers. As long as glutathione is available, GRP formation prevents quinones from participating in coupled reactions leading to pigment formation. At this step of winemaking, thiols, present as precursors, are not sensitive to oxidation because the sulfhydryl group is involved in a C–S bond. Thus, to our knowledge, there is no evidence to support an oxidation of thiol precursors consecutive to the enzymatic browning of must.

The aim of our work was first to characterize grape juices of Melon B. and Sauvignon blanc to estimate their aromatic potential. Second, we studied the influence of oxygen consumption by grape juices on aroma precursors and oxidation markers to elucidate the mechanism that could support the improved production of thiols observed in wine when must is prevented from oxidation.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** All solvents were of analytical pure grade (>98%). L-Glutathione reduced was purchased from Duchefa Biochemie (Amsterdam, The Netherlands) and from Sigma-Aldrich (St Quentin en Fallavier, France). *trans*-2-Hexen-1-ol, dithiothreitol, cation exchange resin Dowex 50WX4-100, sodium metabisulfite, benzene sulfonic acid, 5-sulfosalicylic acid, and hydrochloric acid were purchased from Sigma-Aldrich. Sodium sulfate was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All gases, nitrogen, isobutane, and helium, were purchased from Air Product (Paris, France). Ammonium dihydrogenphosphate was purchased from Acros Organics (Halluin, France). Sep-Pak C18 cartridges were purchased from Waters (Baden, Switzerland). Acetonitrile was purchased from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands). Pentane and dichloromethane were from Riedel de Haen (St Quentin en Fallavier, France). Formic acid and isopropanol were purchased from Fluka (Epalinges, Switzerland, or St Quentin en Fallavier, France), and methanol was purchased from Merck.

**Grape Sampling.** Ten parcels were selected in three different vineyards of the Val de Loire. Two grape varieties were harvested for comparison: Melon B. and Sauvignon blanc. Harvest was carried out on three different dates, D–7, D, and D+7, where D represents the date of harvest.

Sampling was made by picking one bunch per vine along one row of the parcel. About 30 bunches were collected to constitute one sample. On the sampling dates, Melon B. grapes exhibited levels of sugars ranging from 154 to 184 g/L and total acidity ranging from 7.6 to 5.6 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/L. Sauvignon blanc grapes exhibited levels of sugars ranging from 184 to 201 g/L and total acidity ranging from 6.8 to 5.7 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/L.

**Elaboration of Grape Juices at Laboratory Scale.** To clarify the terms used in this paper, “juices” refer to berries crushed manually in our reactor without fermentation, whereas “musts” were produced from pilot-scale experiments and were fermented (see later).

Grape juices (0.5 L) were prepared by crushing fresh entire berries of Melon B. and Sauvignon blanc (1.5 kg) under vacuum. The system used for grape juice preparation was based on Rigaud et al.'s (17) procedure but adapted to our study. Entire berries were manually introduced into a bag-in-box connected to a vacuum pump and sampling bottle. Crushing was started as soon as the system was completely under vacuum to avoid the occurrence of oxidative mechanisms in the bag-in-box. The resulting juice was directly recovered through a perforated pipe in a bottle containing benzene sulfonic acid (1 mg/mL) and sodium metabisulfite (4.5 mg/mL). Samples were then stored at –20 °C until analysis. These triplicate samples were used for the chemical characterization of grapes and to study the influence of ripening on thiol precursors.

**Addition of Oxygen, Glutathione, and Hexenal in Grape Juices.** Homogeneous samples (3 kg of healthy berries) of Melon B. and

Sauvignon blanc were used to produce a larger volume of juice (1.5 L). Two different experimental procedures were used for harvests 2007 and 2008.

In 2007, oxidations of grape juice were performed in a 1.5 L reactor specifically designed to allow the successive additions of oxygen through a septum located at the bottom of the glassware reactor. Dissolution and consumption of oxygen was monitored in real time using a Clark electrode introduced in the bottom of the reactor. A total of 1.7 mg of oxygen per liter of juice was added in 10 successive spikings. When all oxygen was consumed, 150 mL of juice was sampled in a flask containing benzene sulfonic acid (1 mg/mL) and sodium metabisulfite (4.5 mg/mL).

In the experiments set up in 2008, a 1.5 L reactor used to elaborate grape juice was connected to a 0.225 L reactor used to oxidize the juice. As for the 2007 setup of reactors, oxygen additions were performed at the bottom of the 0.225 L reactor via a septum. Oxygen dissolution and consumption were monitored using a chemiluminescence sensor Presens. Five different volumes of oxygen were spiked (300, 600, 1200, 2400, and 5000  $\mu$ L for 0.225 L of juice), and the total oxygen added ranged from 2 to 32 mg/L of oxygen. Juice was aliquoted (125 mL) at each oxidative phase and transferred in a 150 mL flask containing benzene sulfonic acid (1 mg/mL) and sodium metabisulfite (4.5 mg/mL) when the consumption of oxygen was finished.

Using the second-generation reactor (2008 harvest), an additional experimental set was designed to study the influence of glutathione, hexenal, and both compounds during the oxidation process. Experiments were set up as follows:

(A) *Control Experiment.* Each juice was progressively oxidized with the addition of increasing volumes of oxygen as previously described.

(B) *Glutathione Addition.* Glutathione was spiked in juices at two levels of concentration: 50 mg/L for Melon B. and 100 mg/L for Sauvignon blanc.

(C) *Hexenal Addition.* Hexenal was spiked in juices at 1 mg/L for both grape varieties.

(D) *Glutathione and Hexenal Spiking.* Glutathione and hexenal were spiked into juices at levels described in experimental sets B and C.

Sampling was made when the added oxygen was completely consumed by juice (measured by the chemiluminescence sensor Presens). Each experiment was performed in duplicate.

**Fermentation Experiments.** Industrial grape musts of Melon B. from Nantes (50 L) and Sauvignon blanc from Tours and Sancerre (10 L) were spiked with glutathione (50 mg/L for Melon B. and 100 mg/L for Sauvignon Blanc) and/or hexenal (1 mg/L for both grape varieties). Addition of glutathione was performed at the beginning of crushing, whereas hexenal was added at the end. Sauvignon blanc from Sancerre was inoculated with the yeast strain IOC 18-2007 at 20 g/hL. Fermentation temperature was maintained at 20 °C. Sauvignon blanc from Tours and Melon B. from Nantes were inoculated with the yeast strain Vitilevure KD at 20 and 15 g/hL, respectively, and fermentations were conducted at a temperature ranging between 18 and 20 °C.

**Analysis of *trans*-Cafutaric Acid and Grape Reaction Product.** *trans*-Cafutaric acid and GRP were analyzed by HPLC-DAD (Waters Millennium) by adapting a previously published method developed by Cheynier et al. (15). Analytes were either isolated from grapes (caftaric acid) or produced in a model solution (GRP) as described in ref 18.

Juice samples were centrifuged (15000 rpm, 5 min, 4 °C) and then analyzed by HPLC-DAD. Separation was performed on a reversed phase column (dC18 Atlantis, Waters, 4.6 mm  $\times$  250 mm  $\times$  5  $\mu$ m) protected with a guard column (Licrospher 100-RP18, Merck, 4 mm  $\times$  4 mm  $\times$  5  $\mu$ m). Oven temperature was maintained at 30 °C, and a volume of 10  $\mu$ L was injected. The mobile phases were composed of water/formic acid (98:2 in %) (A) and acetonitrile/water/formic acid (80:18:2 in %) (B), and the following gradient was used for the separation: A 100 (5 min), A/B = 90:10 (20 min), A/B = 80:20 (15 min), A/B = 75:25 (5 min), A/B = 20:80 (5 min), and B 100 (5 min). The flow rate was maintained at 1 mL/min. Detection was made at 320 nm, and external quantification was performed using Empower software.

**Analysis of Glutathione by Amino Acid Analyzer.** Juice samples (800  $\mu$ L) were mixed with an aqueous solution of 5-sulfosalicylic acid at 25% (200  $\mu$ L) during 1 h at 4 °C to precipitate the proteins. After centrifugation (15 min at 4 °C, 15000 rpm), samples were filtered on a polyvinylidene fluoride membrane (porosity = 125  $\mu$ m). Sample analysis

**Table 1.** Glutathione Analysis Conditions

time (min)	temperature (°C)	buffer <sup>a</sup>	pH	flow (mL/h)	ninhydrin
1	55	2	2.80 (0.2 M)	25	on
0	55	2	2.80 (0.2 M)	25	on
1	55	2	2.80 (0.2 M)	25	on
30	55	2	3.00 (0.3 M)	25	on
20	85	2	3.00 (0.3 M)	25	on
10	85	3	3.15 (0.5 M)	25	on
15	85	4	3.15 (0.5 M)	25	on
6	85	6	3.50 (0.3 M)	25	on
6	85	1	3.50 (0.9 M)	25	on
25	55	1	3.50 (0.9 M)	30	off
6	55	1	3.50 (0.9 M)	25	on

<sup>a</sup> Buffers 1–4, lithium citrate at various molarities and pH; buffer 6, lithium hydroxide at 0.3 M.

was performed with an amino acid analyzer (Biochrom 30). Reduced glutathione was separated on Ultrapac Resin 8 (Biochrom) according to a specific pH gradient (Table 1), and a postcolumn derivatization with ninhydrin was performed. Detection was made at 570 nm with a UV-visible detector.

**Analysis of Aroma Precursors by Nano-LC-MS/MS.** 4-*S*-Glutathionyl-4-methylpentan-2-one (G4MMP), 4-*S*-cysteinyl-4-methylpentan-2-one (Cys4MMP), 3-*S*-glutathionylhexan-1-ol (G3MH), and 3-*S*-cysteinylhexan-1-ol (Cys3MH) were quantified by stable isotope dilution assay and external calibration, using a well-optimized method previously published (19). Standards were synthesized according to published methods [cysteinylated precursors from Dagan et al. (20), G3MH from Roland et al. (8), and G4MMP from Fedrizzi et al. (5)]. Centrifuged samples (juices or musts, 1200  $\mu$ L) were spiked with internal standards (labeled compounds), and analytes were selectively extracted on a cation exchange resin Dowex 50WX4-100 (50 mg). The resin was washed with water (1 mL) and elution was made with a phosphate buffer ( $\text{NH}_4^+\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , 1 M, 1 mL). Extracts were then desalted on reverse phase cartridges (Sep-Pak, Waters), and analytes were finally eluted with methanol (600  $\mu$ L). Final extracts were concentrated to dryness and then diluted in an accurate volume of deionized water (50  $\mu$ L). Analytes were analyzed by nano liquid chromatography (Waters Acquity) hyphenated with a triple-quadrupole mass spectrometer (Thermo TSQ Vantage Extended Mass Range). Target compounds were trapped on a NanoEase Atlantis dC18 precolumn (Waters, 0.18 mm  $\times$  23.5 mm  $\times$  5  $\mu$ m), and separation was performed using a Magic-C18 column (Waters, 75  $\mu$ m  $\times$  100 mm  $\times$  5  $\mu$ m). Flow rate was maintained at 800 nL/min, and mobile phases were composed of water with 0.1% of formic acid (A) and acetonitrile with 0.1% of formic acid (B). The gradient profile started from 0.5% B for 1.5 min, increased to 5.0% B in 0.5 min, increased to 30.0% in 16 min, increased to 40% B in 2 min, and then increased to 85.0% B in 6 min before returning to the initial conditions after 2 min of column rinse. Ionization was performed in positive mode using nano electrospray ion source maintained at a voltage equal to 1.0 kV and a temperature equal to 200 °C. Detection was performed in selected reaction monitoring (SRM) mode.

**Analysis of Varietal Thiols by GC-MS/MS.** 3-Mercaptohexan-1-ol (3MH) and its acetate (3MH-A) were quantified in pilot-scale wines of Melon B. and Sauvignon blanc according to a published method (21, 22).

Volatile compounds were extracted from wines (250 mL) at 0 °C using pentane/dichloromethane azeotrope (2:1; 100 mL). The organic phase was separated, dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), and concentrated under vacuum to a final volume of 2 mL.

Each extract was then purified using covalent chromatography on mercuric bound agarose gel (1 mL) previously conditioned using isopropanol (5 mL) and pentane/dichloromethane azeotrope (5 mL). After loading and washing using pentane/dichloromethane azeotrope (20 mL), elution was performed with a solution of 1,4-dithio-DL-threitol in pentane/dichloromethane azeotrope (5 mM, 5 mL). Extracts were washed with Millipore water (1 mL), dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), and concentrated at 35 °C (final volume of 300  $\mu$ L) with subsequent analysis by GC-IT MS/MS (Varian 3800 gas chromatograph coupled to a Varian Saturn 2000 ion trap mass spectrometer). Separation was performed on a DB-WAX column (30 m, 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m thickness film; J&W Scientific). The carrier gas was

helium 6.0 with a constant flow of 1 mL/min. Oven temperature was programmed as follows: 60 °C for 3 min, increased to 110 °C at 3 °C/min, then to 140 °C at 1 °C/min and to 245 °C at 15 °C/min for 10 min. The transfer line and the trap were set at 230 and 140 °C, respectively. Detection was performed using chemical ionization with isobutane as reactive gas and MS/MS mode.

**Analysis of (*E*)-2-Hexenal and (*E*)-2-Hexenol by GC-MS.** (*E*)-2-hexenal and (*E*)-2-hexenol were quantified in juice by stable isotope dilution assay according to a previously published method (23) and modified as follows: 2 mL of centrifuged juice (3000 rpm, 15 min, 4 °C) was diluted five times in water (Millipore), and 4 g of NaCl was added. Then, internal standards were added at 50 and 15  $\mu$ g/L for (*E*)-2-hexenal-*d*<sub>2</sub> and (*Z*)-2-hexenol-*d*<sub>2</sub>, respectively. Natural compounds were commercially available, whereas the deuterated ones were synthesized (8).

Calibrations were performed in a blank juice (a nonoxidized juice prepared under vacuum and enzymatically blocked by sodium metabisulfite and benzene sulfonic acid) by adding known amounts of analytes from stock solutions, previously quantified by GC-AED using hexan-1-ol as internal standard.

Analyses were performed on a gas chromatograph (Hewlett-Packard 6890) hyphenated with a quadrupole mass spectrometer (Hewlett-Packard 5973). Analytes were first trapped on a carboxen/PDMS fiber (Varian, 2 cm) at room temperature during 20 min, and then they were separated on a DB-WAX column (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m) after desorption at 280 °C. The carrier gas was helium 6.0 with a constant flow equal to 1.2 mL. Injection was performed in split mode. Oven temperature was programmed as follows: 40 °C for 5 min, increased to 120 °C at 2 °C/min and then to 230 °C at 10 °C/min for 1 min. The transfer line was maintained at 250 °C. Detection was performed using electronic impact in selected ion monitoring (SIM) mode. Three ions per analyte were monitored, one for the quantification (**bold**) and two for the identification: *m/z* **98**, 83, 55 for (*E*)-2-hexenal; *m/z* **100**, 85, 57 for (*E*)-2-hexenal-*d*<sub>2</sub>; *m/z* 100, 82, **57** for (*E*)-2-hexenol; and *m/z* 102, 84, **59** for (*Z*)-2-hexenol-*d*<sub>2</sub>.

## RESULTS AND DISCUSSION

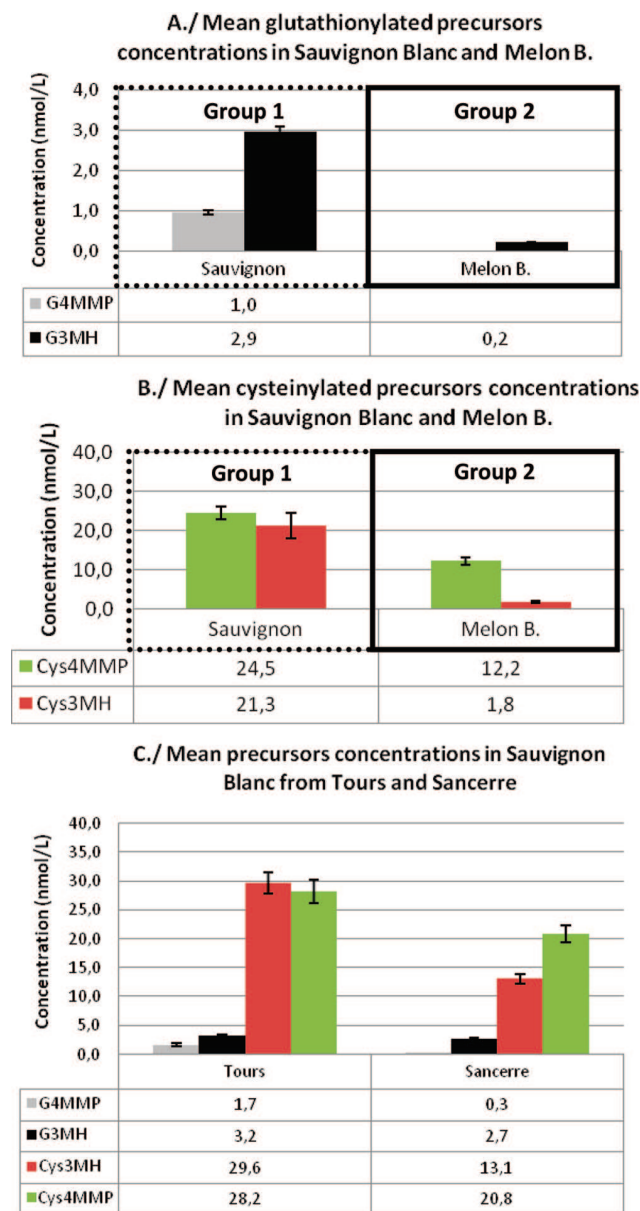
**Validation of the Crushing System under Vacuum.** All precautions were taken to avoid the occurrence of oxidation during juice preparation. Grape juices were collected in sampling bottles containing benzene sulfonic acid and sodium metabisulfite at high concentrations. Benzene sulfonic acid allowed the trapping of quinones that could be formed in the system from hydroxycinnamic acids, whereas sodium metabisulfite, at such a high concentration (4.5 mg/mL), inhibited polyphenol oxidase activity.

The airtightness and the absence of oxidation were evaluated a posteriori by quantifying the production of GRP, which represents a good oxidation marker in grape juice. GRP was formed as soon as polyphenol oxidase catalyzed the formation of quinones from caftaric acid and, subsequently, can undergo a Michael addition of glutathione (14, 15). For all samples, the production of GRP was below 1% (corresponding to the amount of converted caftaric acid), indicating sufficient airtightness of the crushing system.

**Characterization of Melon B. and Sauvignon blanc in Composition.** Grapes of Melon B. and Sauvignon blanc were crushed under vacuum to avoid oxidation prior to quantify their aromatic potential via the analysis of 3MH and 4MMP precursors: G4MMP, Cys4MMP, G3MH, and Cys3MH. Analysis of thiol precursors was performed according to a previously published method (19) allowing a good sensitivity (LOQ < 4.8 nmol/L), accuracy (mean value close to 95%), and precision (RSD < 10%).

In parallel, *trans*-caftaric acid, GRP, and glutathione were quantified in the same samples to correlate all data.

**Grape Variety Effect.** G3MH seemed to be ubiquitous because it occurred in Melon B. and Sauvignon blanc, whereas G4MMP, more specifically, was identified in only Sauvignon blanc. These data were coherent with the more specific presence of 4MMP in Sauvignon blanc and the ubiquity of 3MH in wines (24).

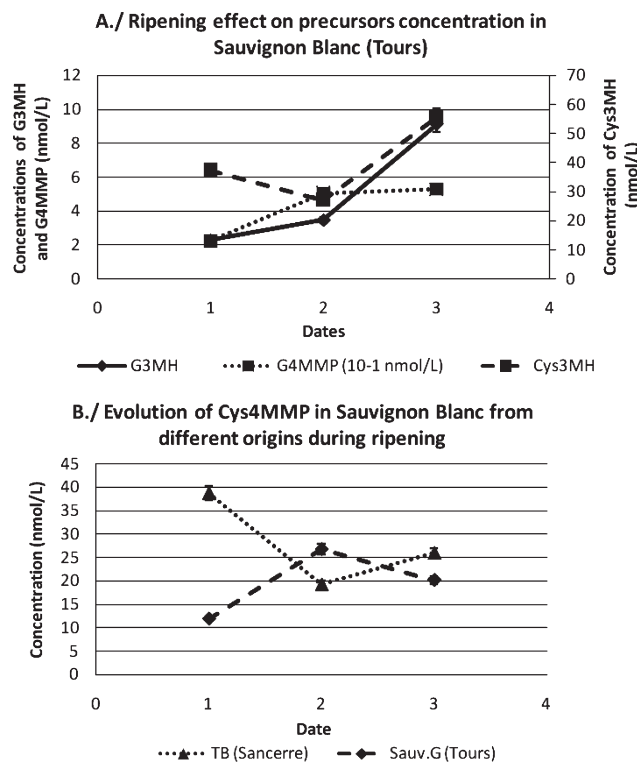


**Figure 1.** Precursor concentrations (A, B) and distribution (C) in grape juices of Melon B. and Sauvignon blanc (attribution of groups 1 and 2 was made using the Newmann–Keuls test,  $\alpha = 0.05$ ).

Mean G3MH concentrations in grapes were 0.2 and 2.9 nmol/L for Melon B. and Sauvignon blanc, respectively. As observed for the cysteinylated precursors (25), G3MH in Sauvignon blanc is 3 times more abundant in grapes than G4MMP and 10 times lower than Cys3MH (Figure 1).

Melon B. exhibited cysteinylated and glutathionylated precursor concentrations systematically and significantly lower than Sauvignon blanc (Newmann–Keuls test with  $\alpha = 0.05$ ) (Figure 1). A statistical treatment made on Sauvignon blanc samples showed a difference of concentration and distribution for cysteinylated precursors, depending on the grapes' origin (Tours and Sancerre). Indeed, concentrations of Cys3MH and Cys4MMP were similar in Sauvignon from Tours (close to 29 nmol/L), whereas the Cys4MMP amount was twice higher than Cys3MH in Sauvignon from Sancerre (close to 20 and 13 nmol/L, respectively).

Our handmade juices exhibited lower amounts of precursors than industrial ones reported by Capone et al. (26). For Cys3MH,



**Figure 2.** (A) Influence of ripening on precursor concentration in grapes of Sauvignon blanc (Tours) and (B) evolution of Cys4MMP in Sauvignon blanc from different origins during ripening.

this observation could be explained by its preferential location in the grape skin (27). Even if our handmade juices contained lower quantities of such compounds, the mechanisms involved during oxidation remained identical whatever the level of precursors occurring in juice.

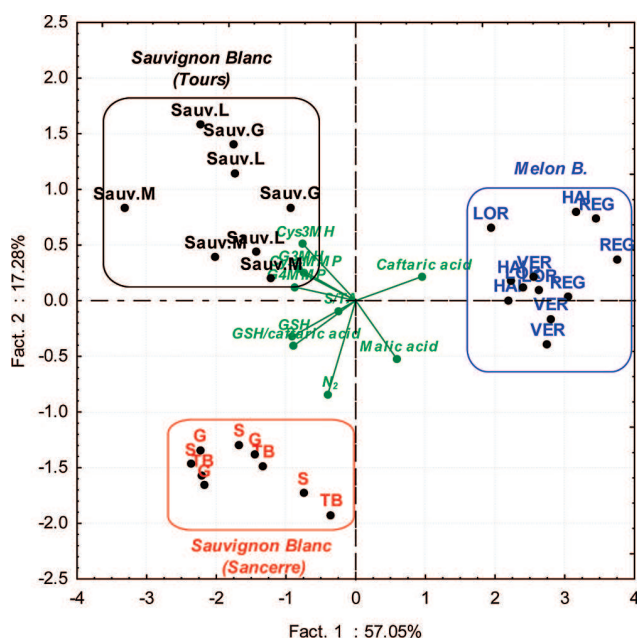
**Ripening Effect on Precursor Concentrations.** Ripening effect on precursor concentrations is shown in Figure 2. In Sauvignon blanc, G3MH and Cys3MH concentrations increased considerably between D−7 and D+7. G4MMP concentration increased slightly between D−7 and D+7 in comparison with G3MH and Cys3MH (Figure 2). Cys4MMP evolution was quite different depending on the samples' origin. Indeed, Cys4MMP amount in Sauvignon blanc from Sancerre was at lowest at harvest date, whereas, at the same date, it was highest for Sauvignon blanc from Tours.

In Melon B., no statistically significant variation of Cys3MH, G3MH, and G4MMP concentrations during ripening was observed. However, Cys4MMP concentrations exhibited important variations depending on the parcel considered.

**Classification of Grape Variety According to Composition and Ripeness Criteria.** A principal component analysis (PCA) was run on precursors, *trans*-caftaric acid, GRP, GSH, and ripeness data (Figure 3) using Statgraphics Plus 5.0 software.

In that PCA, caftaric acid, GSH, and 4MMP precursors contribute mainly to the first axis, which explained 57% of the variability, whereas assimilable nitrogen and malic acid are the main contributors of the second axis (17% of variability). In that first plane (axes 1 and 2, explaining 74% of the variability), Melon B. differed from Sauvignon blanc according to the first axis. As reported by Cheynier et al. (28), the ratio between glutathione and *trans*-caftaric acid could represent the oxidizability of grape juice. Thus, the distinction between Melon B. and Sauvignon blanc consisted of the higher oxidizability of the Melon B. juice and its lower 4MMP precursor content. Indeed, initial concentrations of





**Figure 3.** Principal component analysis on Melon B. and Sauvignon blanc composition. Abbreviations correspond to the names of parcels used for sampling. For Melon B. parcels: HAI, La Haie Fouassière; REG, La Regrepierre; LOR, Le Loroux; VER, Vertou. For Sauvignon blanc from Tours: Sauv.L, Seigy; Sauv.G, Meusnes; Sauv.M, Pouillé. For Sauvignon blanc from Sancerre: G, Griotte; S, Silex; TB, Terres Blanches. Each abbreviation appeared in triplicate on PCA, corresponding to the average value of the three sampling dates.

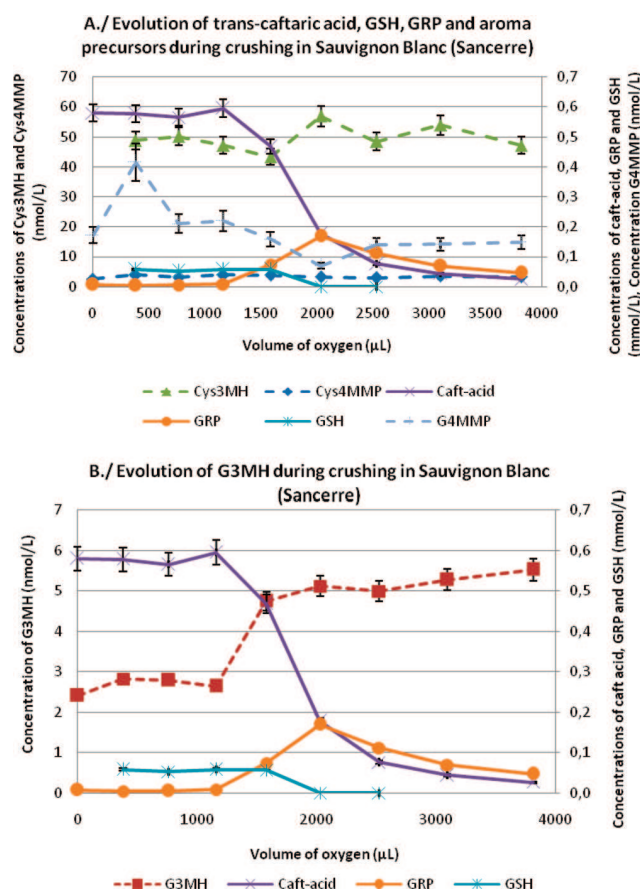
*trans*-caftaric acid in Melon B. and Sauvignon blanc juices were close to 1.6 and 0.6 mM, respectively, whereas the maximum amount of GRP produced was around 0.2 mM for both grape varieties.

Sauvignon blanc from Tours and Sancerre were separated in two different groups according to the second axis, that is, mainly according to the assimilable nitrogen content of the corresponding juice and, to a minor extent, their malic acid concentrations.

Finally, it could be noted that variables corresponding to thiol precursors (glutathionylated and cysteinylated) were correlated together, which could suggest a common biogenetic origin in grapes. On the contrary, precursors were not correlated with assimilable nitrogen because vector eigenvalues were orthogonal. This observation was not in coherence with the experimental data reported by Choné et al. (29).

**Influence of Oxygen Consumption on Precursor Concentration.** Mechanisms of enzymatic oxidation of polyphenols in must are well-known (15, 30). Significant modification of must's composition occurs during its preparation. Indeed, enzymatic activities such as polyphenol oxidase are able to convert hydroxycinnamic acids and, particularly, *trans*-caftaric acid, the most abundant one, into their corresponding quinones in the presence of oxygen. The quinone of *trans*-caftaric acid can undergo a Michael addition of glutathione to produce the grape reaction product (14). No precise data are available on thiol precursor evolution during must oxidation.

The effect of oxygen consumption on thiol precursors was studied at laboratory scale, using a 1.5 L reactor designed for the 2007 harvest experiments. It was equipped at the bottom with a septum for oxygen additions and with a Clark electrode to measure the dissolution and consumption of oxygen. Using this system, the juice was completely oxidized within 3 h at room temperature.



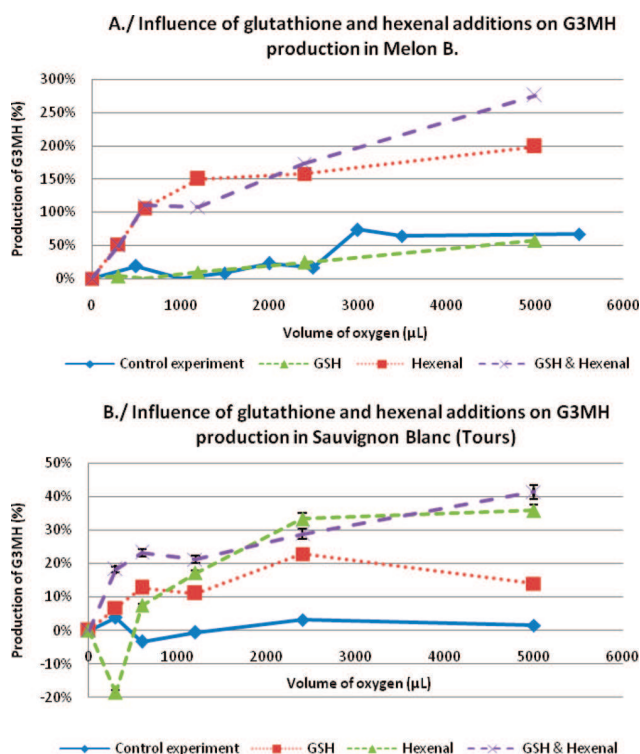
**Figure 4.** (A) Evolution of oxidation markers and aroma precursors and (B) production of G3MH under oxidative conditions.

As expected (28), these oxidized juice samples showed that reduced glutathione completely disappeared with the concomitant formation of GRP (Figure 4). However, cysteinylated precursors and G4MMP were not affected by oxygen consumption in juice because their concentrations did not vary along the oxidation process (Figure 4). Indeed, because of their chemical structure, such molecules cannot be oxidized because the thioether bond is stable under these conditions.

It must be noted that, after the addition of 1500 μL of oxygen to the juice (i.e., 2.1 mg/L), the initial concentration of G3MH (close to 2 nmol/L) increased significantly to 5 nmol/L (i.e., 2 μg/L). For example, we observed an important production of G3MH close to 140% in Sauvignon blanc from Sancerre when oxidation occurred during 3 h (5.7 mg/L of O<sub>2</sub> consumed) (Figure 4). This production could be responsible for 3MH release close to 60 ng/L if the average conversion yield of G3MH into 3MH is assumed to be equal to 4.4% (8).

Global production of G3MH in Melon B. and Sauvignon blanc juices ranged from 67 to 144%, respectively, under laboratory conditions. The oxidation process lasted 3 h using the first-generation reactor (used for Sauvignon samples) against 1 h with the 2008 one (used for Melon B. sample). The difference in duration and the higher oxidizability of Melon B. could be responsible of the difference in G3MH production observed during the oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc juices.

This production of G3MH during prefermentative operations could be due to the addition of residual glutathione on hexenal released from unsaturated fatty acids in the presence of lipoxigenase enzyme. Michael addition is a conjugate addition so that the adduct production curve is expected to be linear. The



**Figure 5.** Influence of glutathione and hexenal additions on G3MH production in Melon B. (A) and Sauvignon blanc (B). Initial concentrations of G3MH were close to 1 and 4 nmol/L for Melon B. and Sauvignon blanc, respectively.

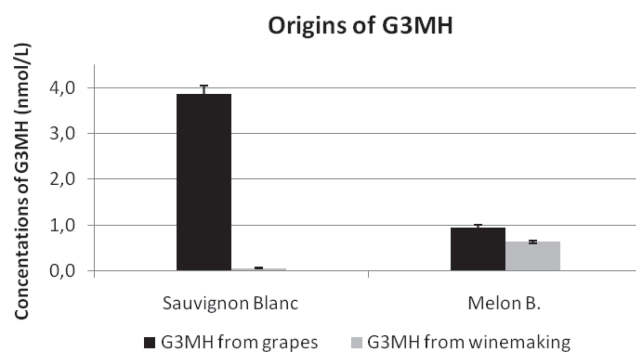
production shape of G3MH, similar to a Michaelis curve (Figure 4), could be explained by the enzymatic release of hexenal in juice.

G4MMP could be formed according to the same mechanisms in must by the addition of reduced glutathione on mesityl oxide. Nevertheless, this compound has never been identified in grape juice (31), which could explain the absence of G4MMP production under oxidative conditions.

**Effect of Glutathione and (*E*)-2-Hexenal Addition in Grape Juices on Precursor Concentration.** To investigate the influence of glutathione and hexenal on G3MH production during wine-making, a new reactor was designed for the 2008 harvest. The use of a smaller reactor for oxidation compared to the one used for 2007 harvest allowed a better oxygen dissolution in juice because headspace volume was minimized. Thus, under these conditions, complete oxidation of juice occurred in only 1 h.

The use of two different reactors did not affect the global oxidation mechanism occurring in juice because we adjusted the volume of oxygen added to the volume of juice. The monitoring of oxygen consumption was performed using two different means: Clark electrode and chemiluminescence sensor Presens. Even if these two techniques could provide different values, we just measured the absence of oxygen dissolved to be sure that all added oxygen was consumed by the juice. Consequently, our two reactors were convenient to design the evolution of precursors during oxidation.

In Melon B., the initial concentration of G3MH (0.9 nmol/L) increased from 60% in the control experiment to 200% in samples supplemented with hexenal (1 mg/mL) (Figure 5). The addition of glutathione did not induce the production of G3MH. These observations demonstrated that hexenal was the limiting reagent to form G3MH under our conditions. To consolidate our statement, we measured the release of hexenal in our handmade juices



**Figure 6.** Origins of G3MH in Melon B. and Sauvignon blanc.

in the control experiment, and its concentration at the end of oxidation < 200  $\mu\text{g/L}$ .

In Sauvignon blanc, the initial concentration of G3MH (close to 4 nmol/L) increased for juices supplemented with either glutathione (+15%) or hexenal (+35%) in separate additions (Figure 5). In that case, hexenal and then glutathione were limiting reagents for G3MH production. Hexenal release was also monitored in the control experiment juice, and a final concentration close to 300  $\mu\text{g/L}$  was detected.

The amount of available hexenal seemed to be crucial for G3MH production, and a value around 200  $\mu\text{g/L}$  could be the specific threshold for its formation.

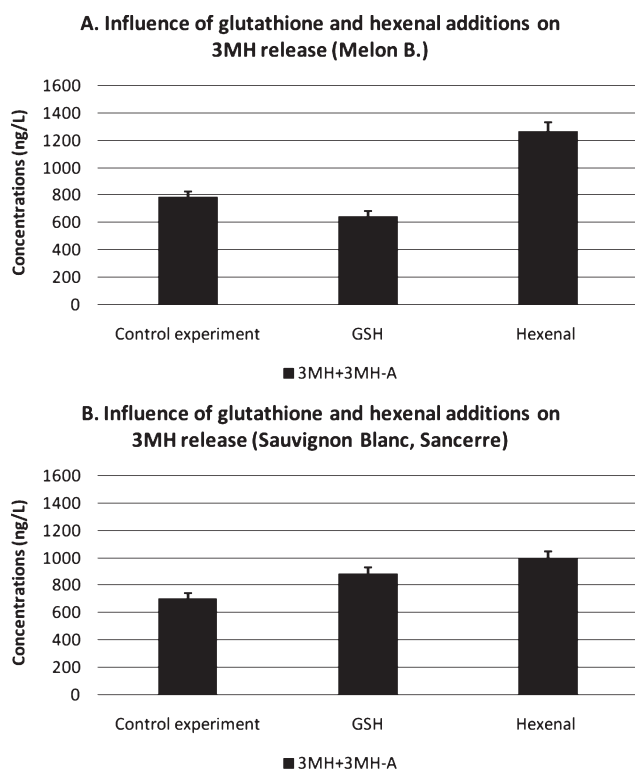
The proportions of G3MH originating from grapes and from the winemaking process for Melon B. and Sauvignon blanc were compared. In Melon B., 67% of G3MH came from prefermentative processes, whereas this was only 2% for Sauvignon blanc (Figure 6). Therefore, prefermentative operations that are often described as negatives can positively contribute to the production of G3MH and, consequently, to the positive improvement of the aromatic potential.

**Effect of Glutathione and Hexenal Additions in Must on Varietal Thiol Production.** To emphasize the influence of glutathione and hexenal on wine aroma in our context, experiments at pilot scale were performed that included fermentations and analysis of thiols released in wines, which are considered as key aroma compounds responsible for fresh and citrus fruit notes in many white wines and, especially, Sauvignon ones. Our finished wines were tasted by a trained sensorial panel, and no defect was detected due to the use of GSH or hexenal at such concentrations in must (data not shown).

For Melon B., the addition of glutathione did not change the production of 3MH and 3MHA in the resulting wines (Figure 7). Nevertheless, hexenal addition in must resulted in an increase of 3MH and 3MH-A equivalent to 61%. This observation is coherent with the increase of G3MH (+200%) observed under laboratory conditions when hexenal was added to the must (Figure 5). This suggests that hexenal is the limiting reagent for the Michael addition of GSH. However, we could not exclude, in those pilot-scale experiments, that 3MH overproduction when hexenal was added is due to the presence of other sulfhydryl donors such as  $\text{H}_2\text{S}$  in fermentation.

In Sauvignon blanc, additions of glutathione or hexenal induced significant increases in the production of 3MH and 3MH-A of 25 and 41%, respectively (Figure 7). This result is also in accordance with observations made at laboratory scale on the same grape variety and in the same conditions.

These experiments emphasized the key role of glutathione during prefermentative processes. Residual glutathione in juice could explain technological achievements as antioxidant at the



**Figure 7.** Influence of glutathione and hexenal additions on 3MH release in Melon B. (A) and Sauvignon blanc (B) wines during alcoholic fermentation.

beginning of alcoholic fermentation by preventing the trapping of thiols by reactive species. Glutathione was also involved in varietal thiol production through the G3MH production. Oxidation compounds such as hexenal are often considered to be off-flavors, but seem to have also a key role in G3MH formation. When present at low but sufficient concentration, they could be involved in positive reactions such as thiol production.

Production of the 3MH in wines seems to have two different origins: the first one from precursors naturally occurring in grapes and the second one linked to the winemaking technology (hexenal and G3MH pathways). The hexenal pathway described by Schneider et al. (32) implicated sulfur donors during winemaking, and glutathione seemed to be one of them producing the G3MH precursor.

#### ABBREVIATIONS USED

G4MMP, 4-*S*-glutathionyl-4-methylpentan-2-one; Cys4MMP, 4-*S*-cysteinyl-4-methylpentan-2-one; G3MH, 3-*S*-glutathionyl-hexan-1-ol; Cys3MH, 3-*S*-cysteinylhexan-1-ol; GRP, grape reaction product; GSH, glutathione; 3MH, 3-mercaptohexan-1-ol; 3MH-A, 3-mercaptohexyl acetate; 4MMP, 4-methyl-4-mercapto-pentan-2-one; SIM, selected ion monitoring.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank Diego Chiappe and Jean-Paul Lepoutre for technical support in LC-MS/MS and GC-MS/MS devices.

#### LITERATURE CITED

(1) Darriet, P.; Tominaga, T.; Lavigne, V.; Boidron, J. N.; Dubourdieu, D. Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour Fragrance J.* **1995**, *10*, 385–392.

(2) Tominaga, T.; Furrer, A.; Henry, R.; Dubourdieu, D. Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour Fragrance J.* **1998**, *13* (3), 159–162.

(3) Tominaga, T.; Darriet, P.; Dubourdieu, D. Identification of 3-mercaptohexanol acetate, compound having a powerful odor reminiscent of box-tree, involved in the aroma of Sauvignon wines. *Vitis* **1996**, *35*, 207–210.

(4) Tominaga, T.; Peyrot des Gachons, C.; Dubourdieu, D. A new type of flavor precursor in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: *S*-cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 5215–5219.

(5) Fedrizzi, B.; Pardon, K. H.; Sefton, M. A.; Elsey, G. M.; Jeffery, D. W. First identification of 4-*S*-glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a potential precursor of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon Blanc juice. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (3), 991–995.

(6) Peyrot des Gachons, C.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D. Sulfur aroma precursor present in *S*-glutathione conjugate form: identification of *S*-3-(hexan-1-ol)-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4076–4079.

(7) Grant-Preece, P. A.; Pardon, K. H.; Capone, D. L.; Cordente, A. G.; Sefton, M. A.; Jeffery, D. W.; Elsey, G. M. Synthesis of wine thiol conjugates and labeled analogues: fermentation of the glutathione conjugate of 3-mercaptohexan-1-ol yields the corresponding cysteine conjugate and free thiol. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1383–1389.

(8) Roland, A.; Schneider, R.; Guernevé, C. L.; Razungles, A.; Cavelier, F. Identification and quantification by LC-MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chem.* **2010**, DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.12.095.

(9) Darriet, P. Caractérisation des composés volatils associés à la vigne et au vin. Applications technologiques; Université Victor Segalen Bordeaux **2002**; p 97.

(10) Blanchard, L.; Darriet, P.; Dubourdieu, D. Reactivity of 3-mercaptohexanol in red wine: impact of oxygen, phenolic fractions, and sulfur dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* **2004**, *55* (2), 115–120.

(11) Murat, M. L.; Tominaga, T.; Saucier, C.; Glories, Y.; Dubourdieu, D. Effect of anthocyanins on stability of a key odorous compound, 3-mercaptohexan-1-ol, in Bordeaux rosé wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2003**, *54* (2), 135–138.

(12) Nikolantonaki, M.; Chichuc, I.; Teissedre, P.-L.; Darriet, P. Reactivity of volatile thiols with polyphenols in a wine-model medium: impact of oxygen, iron, and sulfur dioxide. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *668* (1–2), 102–109.

(13) Singleton, V. L. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines and model systems: observations and practical implications. *Am. J. Enol. Vitic.* **1987**, *38* (1), 69–77.

(14) Singleton, V. L.; Salgues, M.; Zaya, J.; Trousdale, E. Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1985**, *36* (1), 50–56.

(15) Cheynier, V. F.; Trousdale, E. K.; Singleton, V. L.; Salgues, M. J.; Wylde, R. Characterization of 2-*S*-glutathionyl caftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34* (2), 217–221.

(16) Salgues, M.; Cheynier, V.; Gunata, Z.; Wylde, R. Oxidation of grape juice 2-*S*-glutathionyl caffeoyl tartaric acid by *Botrytis cinerea* laccase and characterization of a new substance 2,5-di-*S*-glutathionyl caffeoyl tartaric acid. *J. Food Sci.* **1986**, *51*, 1191–1194.

(17) Rigaud, J.; Moutounet, M.; Cheynier, V. Relation entre la consommation d'oxygène et la composition en dérivés hydroxycinnamiques de quatre moûts de raisins blanc. *Sci. Aliment.* **1988**, *8*, 467–477.

(18) Cheynier, V. F.; Van Hulst, M. W. J. Oxidation of trans-caftaric acid and 2-*S*-glutathionylcaftaric acid in model solutions. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 10–15.

(19) Roland, A.; Vialaret, J.; Moniatte, M.; Rigou, P.; Razungles, A.; Schneider, R. Validation of a nano liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the identification and the accurate quantification by isotopic dilution of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in white grape juices. *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 1626–1635.

- (20) Dagan, L. Potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. cv. Petit Manseng et Gros Manseng. Contribution à l'arôme des vins de pays Côtes de Gascogne; Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, **2006**; p 238.
- (21) Kotseridis, Y.; Ray, J. L.; Augier, C.; Baumes, R. Quantitative determination of sulfur containing wine odorants at sub-ppb levels. 1. Synthesis of the deuterated analogues. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5819–5823.
- (22) Schneider, R.; Kotseridis, Y.; Ray, J. L.; Augier, C.; Baumes, R. Quantitative determination of sulfur-containing wine odorants at sub parts per billion levels. 2. Development and application of a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3243–3248.
- (23) Schneider, R. Contribution à la connaissance de l'arôme et du potentiel aromatique du Melon B. (*Vitis vinifera* L.) et des vins de Muscadet; Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Montpellier, France, **2001**; p 222.
- (24) Baumes, R. Wine aroma precursors. In *Wine Chemistry and Biochemistry*; Moreno-Arribas, V., Polo, C., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2009; p 261.
- (25) Peyrot des Gachons, C.; Tominaga, T.; Dubourdiou, D. 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. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3387–3391.
- (26) Capone, D. L.; Sefton, M. A.; Hayasaka, Y.; Jeffery, D. W. Analysis of precursors to wine odorant 3-mercaptohexan-1-ol using HPLC-MS/MS: resolution and quantitation of diastereomers of 3-*S*-cysteinylhexan-1-ol and 3-*S*-glutathionylhexan-1-ol. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1390–1395.
- (27) Peyrot des Gachons, C.; Tominaga, T.; Dubourdiou, D. Localisation of *S*-cysteine conjugates in the berry: effect of skin contact on aromatic potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc must. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53* (2), 144–146.
- (28) Cheynier, V.; Souquet, J. M.; Moutounet, M. Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* **1989**, *40* (4), 320–324.
- (29) Choné, X.; Lavigne-Cruège, V.; Tominaga, T.; Leeuwen, C. V.; Castagnède, C.; Saucier, C.; Dubourdiou, D. Effect of vine nitrogen status on grape aromatic potential: flavor precursors (*S*-cysteine conjugates), glutathione and phenolic content in *Vitis Vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc grape juice. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **2006**, *40* (1), 1–6.
- (30) Cheynier, V.; Rigaud, J.; Souquet, J. M.; Duprat, F.; Moutounet, M. Must browning in relation to the behavior of phenolic compounds during oxidation. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, *41* (4), 346–349.
- (31) *TNO, Volatile Compounds in Foods. Qualitative and Quantitative Data*; Nutrition and Food Research Institute: Zeist, The Netherlands, 1996.
- (32) Schneider, R.; Charrier, F.; Razungles, A.; Baumes, R. Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wines. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563* (1–2), 58–64.

---

Received for review November 26, 2009. Revised manuscript received February 19, 2010. Accepted February 20, 2010.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Distribution of varietal thiol precursors in the skin and the pulp of Melon B. and Sauvignon Blanc grapes

Aurélie Roland<sup>a,f,\*</sup>, Rémi Schneider<sup>b</sup>, Frédéric Charrier<sup>c</sup>, Florine Cavelier<sup>d</sup>, Michel Rossignol<sup>e</sup>, Alain Razungles<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Interloire, 12 rue Etienne Pallu, BP 1921, 37019 Tours Cedex 01, France

<sup>b</sup> Institut Français de la Vigne et du Vin, at UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, INRA, 34060 Montpellier Cedex 01, France

<sup>c</sup> Institut Français de la Vigne et du Vin, Pôle Val de Loire, Château de la Frémoire, 44120 Vertou, France

<sup>d</sup> IBMM, UMR-CNRS 5247, Universités Montpellier I et II, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 01, France

<sup>e</sup> Laboratoire de Protéomique, UR 1199 INRA, 2 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 01, France

<sup>f</sup> UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, INRA, SupAgro, Université Montpellier I, 34060 Montpellier Cedex 01, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 May 2010

Received in revised form 22 July 2010

Accepted 20 August 2010

#### Keywords:

Varietal thiols

Precursors

Skin

Pulp

Sauvignon Blanc

### ABSTRACT

In order to examine varietal thiol precursors in both the skin and the pulp of grapes, two grape varieties, Melon B. and Sauvignon Blanc, were considered. We found that cysteinylated and glutathionylated precursors of 3-mercapto-1-hexanol and 4-methyl-4-mercapto-2-pentanone were preferentially in skin. In the Sauvignon Blanc variety, precursors were detected both in the skin and the pulp, while in Melon B., only S-3-(1-hexanol)glutathione was detected in pulp, any other precursors being exclusively found in skin. During an industrial pressing cycle, extraction of thiol precursors was enhanced at the end of the cycle (highest pressures), thus producing more varietal thiols in the resulting wines. Cold prefermentation skin contact did not influence the concentration of the measured precursors in Sauvignon Blanc must. Nevertheless, the release of thiol in resulting wines increased significantly between 1 and 7 days of cold prefermentation skin contact. This increase could be due to the formation of other thiol precursors, such as S-3-(1-hexanal)glutathione or S-3-(1-hexanal)cysteine, during prefermentative operations.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Varietal thiols, such as 3-mercapto-1-hexanol (3MH or 3-sulfanyl-1-hexanol), its acetate (3MHA or 3-sulfanylhexyl acetate) and 4-methyl-4-mercapto-2-pentanone (4MMP or 4-methyl-4-sulfanyl-2-pentanone), are characterised by fruity notes (grapefruit, passionfruit, blackcurrant bud and box tree) and have been identified for the past ten years in Sauvignon Blanc (Darriet, Tominaga, Lavigne, Boidron, & Dubourdieu, 1995; Tominaga, Darriet, & Dubourdieu, 1996), Muscadet and Bacchus (Schneider, Kotseridis, Ray, Augier, & Baumes, 2003), Petit and Gros Manseng (Dagan, 2006) and Colombard white wines, as well as in red wines, such as Grenache (Ferreira, Ortin, Escudero, Lopez, & Cacho, 2002), Merlot and Cabernet Sauvignon (Murat, Tominaga, & Dubourdieu, 2001). These thiols are released from odourless precursors, known as cysteine (Darriet, Tominaga, Lavigne, Boidron, & Dubourdieu, 1993; Tominaga, Masneuf, & Dubourdieu, 1995; Tominaga, Peyrot des Gachons, & Dubourdieu, 1998) and glutathione conjugates

(Fedrizzi, Pardon, Sefton, Eley, & Jeffery, 2009; Kobayashi et al., 2010; Peyrot des Gachons, Tominaga, & Dubourdieu, 2002b; Roland, Schneider, Guernevé, Razungles, & Cavelier, 2010a) during alcoholic fermentation under the  $\beta$ -lyase activity of yeast (Tomina-ga et al., 1998).

In the early stages of winemaking, certain procedures, such as skin contact and pressing, can affect the extraction of the aroma precursors into the grape juice and therefore can induce modifications in the resulting wines. Location of the cysteinylated precursors of 3MH and 4MMP has already been investigated in the case of Sauvignon Blanc grapes. Indeed, Peyrot des Gachons, Tominaga, and Dubourdieu (2002a) demonstrated, during harvesting, that the S-3-(1-hexanol)cysteine (Cys3MH) was primarily located in the skin whereas the S-4-(4-methyl-4-mercapto-2-pentanone)cysteine (Cys4MMP) was found both in the skin and the pulp. Additional work (Murat et al., 2001) showed that Cys3MH concentrations, present at 60% in the skin, increased in Merlot and Cabernet Sauvignon grape juices with prolonged skin contact and by using higher maceration temperatures (up to 25 °C). In addition, Cys3MH concentration was also influenced by the process of pressing in the winery (Maggu, Winz, Kilmartin, Trought, & Nicolau, 2007). In fact, Cys3MH contents were shown to increase significantly in grape juices where skin contact had been prolonged

\* Corresponding author at: UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, INRA, SupAgro, Université Montpellier I, 34060 Montpellier Cedex 01, France. Tel.: +33 4 99 61 22 28; fax: +33 4 99 61 28 57.

E-mail address: [roland@supagro.inra.fr](mailto:roland@supagro.inra.fr) (A. Roland).

to 32 h at 2 atm pressure. In a complementary work (Patel et al., 2010), the effect of pressing on 3MH and 3MHA release in Sauvignon Blanc wines was studied. Pressed wines exhibited half the concentration of 3MH than control wines, losing the typical fruity notes of Sauvignon Blanc wines from New Zealand.

To our knowledge, there is no data dealing with the absolute quantification and location of both cysteinylated and glutathionylated precursors of 3MH and 4MMP in Melon B. and Sauvignon Blanc grape varieties. In order to determine the concentrations of such precursors in the skin and the pulp of these grapes, we used deuterated analogues, that we previously synthesised (Roland, Schneider, Le Guernevé, Razungles, & Cavelier, 2010a; Roland et al., 2010c). We studied the influence of industrial pressing and cold prefermentation skin contact on precursor extraction during the elaboration of must in the wine cellar and investigated its consequences on the release of varietal thiols in resulting wines.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals

For extraction/purification experiments and LC analyses cation exchange resin, DOWEX 50WX4–100, and hydrochloric acid were purchased from Sigma (St. Quentin en Fallavier, France). Ammonium dihydrogenphosphate was purchased from Acros Organics (Halluin, France). Cartridges C18 Sep-Pak were purchased from Waters (Baden, Switzerland). Acetonitrile was purchased from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands). Formic acid was purchased from Fluka (Epalinges, Switzerland) and methanol from Merck (Darmstadt, Germany). All solvents were analytical grade.

### 2.2. Sampling, peeling and crushing of Melon B. and Sauvignon Blanc grapes

One sample (1 kg) of healthy grapes representing two different grape varieties: Melon B. and Sauvignon Blanc (see Table 1A), were picked up randomly from six different areas located in the Loire Valley and Montpellier. Four hundred berries per sample were washed with water, dried and weighed. Each berry was cut with a scalpel to remove pedicels and seeds. The skin was separated from the pulp then frozen using liquid nitrogen. Then, each frozen batch containing either skin or pulp was crushed in liquid nitrogen for 1 min using a ball mill (Dangoumill 300, Lonjumeau, France). Each resulting grape sample was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  as white powder until analysis.

**Table 1**  
Characteristics of grapes used to elaborate powder grapes (A) and industrial musts (B) (Numbers in bold = Group 1, numbers in italic = Group 2 according to the Newman-Keuls test,  $\alpha = 0.01$ ).

Grape varieties	Melon B.			Sauvignon Blanc		
	Le Landreau	La Regrippière	La Haie-Fouassière	Touraine	Sancerre	Montpellier
<i>A. Grape Samples</i>						
Rainfall (mm) from July to Sept 2009	114 mm (data for Nantes vineyard)			70	129	15
Average Weight (g/berry)	<b>1.279</b>	<b>1.552</b>	<b>1.283</b>	1.890	2.100	1.877
% skin weight	25	27	25	32	37	42
% pulp weight	64	63	66	63	58	49
% seed weight	11	10	9	5	5	9
Sugar (g/L)	180	168	187	207	219	237
Total acidity (g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /L)	4.5	5.0	4.7	4.0	4.7	3.5
Grape varieties	Melon B		Sauvignon Blanc		Sauvignon Blanc	
Vineyards	Nantes		Tours		Sancerre	
<i>B. Industrial musts (Machine harvest)</i>						
Sugar (g/L)	207		205		211	
Total acidity (g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /L)	4.0		4.1		5.8	
pH	3.4		3.3		3.2	
Assimilable nitrogen (mg/L)	73		47		185	

### 2.3. Grape processing for the winery trial

Melon B. (Nantes) and Sauvignon Blanc (Tours and Sancerre) grapes were machine harvested. Maturity data are reported in Table 1B. A Bucher pneumatic press (RPF22) was used to process the Melon B. and Sauvignon Blanc grapes from Tours and a Vaslin (CEP650) plate press for Sauvignon Blanc from Sancerre. Typically, the temperature of the fruits arriving at the winery was around  $12\text{--}16^{\circ}\text{C}$ . The total crushing cycle lasted 4 h (from the time that the press was filled). Aliquots of grape juices (200 ml) were treated by adding sodium metabisulfite (4.5 mg/ml) and benzenesulfinic acid (1 mg/ml) and then frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis of thiol precursors and C<sub>6</sub> compounds.

### 2.4. Cold prefermentation skin contact experiments

An industrial, unclarified must of Sauvignon Blanc from Sancerre (obtained from an industrial trial) was divided into three different bottles ( $3 \times 10\text{ l}$ ) and preserved from oxygen using dry ice. Cold prefermentation skin contact experiments were conducted at  $5^{\circ}\text{C}$  for 1, 3 and 7 days. Each day, bottles were stirred for 1 min to mix the lees and then, the juices with different duration of cold prefermentation skin contact were fermented separately.

### 2.5. Fermentation conditions

All fermentations of Melon B. and Sauvignon Blanc were conducted under identical conditions. VIN13 (Anchor Yeast) was used as the yeast strain at 10 g/hl and the temperature was maintained between  $18$  and  $20^{\circ}\text{C}$ . Fermentation progress was followed by measuring residual sugar levels (below 2 g/l). Resulting wines were bottled (free SO<sub>2</sub> level adjusted to between 20 and 40 mg/l) and then stored at  $-4^{\circ}\text{C}$  until analysis. Aliquots of wines (100 ml) were analysed by stable isotope dilution assay (SIDA) using a well-optimised method (Rodríguez-Bencomo, Schneider, Lepoutre, & Rigou, 2009).

### 2.6. Synthesis of natural and deuterated thiol precursors

S-3-(1-Hexanol)glutathione (G3MH/G3MH d<sub>2</sub>) (Roland et al., 2010b), S-4-(4-methyl-4-mercapto-2-pentanone)-glutathione (G4MMP/G4MMP d<sub>10</sub>) (Fedrizzi et al., 2009; Grant-Preece et al., 2010), S-3-(1-hexanol)cysteine (Cys3MH/Cys3MH d<sub>2</sub>) (Dagan, 2006) and S-4-(4-methyl-4-mercapto-2-pentanone)cysteine (Cys4MMP/Cys4MMP d<sub>6</sub>) (Dagan, 2006) were synthesised according to the described methods. Synthetic natural and deuterated compounds were char-

acterised and quantified by  $^1\text{H}$  NMR using trimethylsilylpropionic acid as internal standard. Purities ranged from 6 to 48% according to the percentage of TFA (trifluoroacetic acid) salt occurring in each compound. The presence of TFA salt did not interfere with the analysis of thiol precursors since it was removed during the desalting step on a reverse-phase C18 cartridge (Roland et al., 2010c).

### 2.7. Analysis of precursors in powder grapes and industrial musts

An aliquot of each powder sample was dissolved into 2250  $\mu\text{l}$  of a solution containing sodium metabisulfite (4.5 mg/ml) and benzenesulfonic acid (1 mg/ml). Extraction, purification and analysis of precursors was based on the Roland et al. method (2010c) with the following modifications.

Extraction was performed on an aliquot of must (5 ml) or powdered grapes (2.25 ml) using a DOWEX 50WX4–100 ion exchange resin (100 mg) in a micro-column. Resin was initially conditioned by water (600  $\mu\text{l}$ , 15 min), then 2 M HCl (600  $\mu\text{l}$ , 15 min) and finally washed with water (4 ml). Centrifuged samples (5 ml) were spiked with internal standards (G3MH  $d_2$  and G4MMP  $d_{10}$  at 10 nmol/l, Cys3MH  $d_2$  and Cys4MMP  $d_6$  at 100 nmol/l), loaded on the resin and then washed with water (3 ml). Elution was performed using an ammonium buffer ( $\text{NH}_4^+\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , 1 M, 2 ml) and extracts were purified on a C18 cartridge (Sep-Pak) previously conditioned with MeOH (1 ml) then water ( $2 \times 1$  ml). Extracts were loaded onto the cartridges, washed with water (1 ml) and the final elution was performed using MeOH (600  $\mu\text{l}$ ). The final extracts were concentrated and then dissolved in water (25  $\mu\text{l}$  accurately).

Precursors were analysed using a nano liquid chromatography system (Agilent, 1200 Series; Agilent, Santa Clara, CA) hyphenated with a mass spectrometer (QTRAP 4000, Applied Biosystems, Carlsbad, CA).

Analytes were first trapped (3 min at 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) in a Zorbax 300SB C18 pre-column (Agilent, 0.3 mm  $2 \times 5$  mm  $2 \times 5$   $\mu\text{m}$ ) and then separated in a Zorbax 300SB C18 column (Agilent, 75  $\mu\text{m}^2 \times 150$  mm  $2 \times 3.5$   $\mu\text{m}$ ). Mobile phases consisted of (A) water (98%) with 2% acetonitrile and 0.1% formic acid then (B) acetonitrile (98%) with 2% water and 0.1% formic acid. The gradient profile started at 0.5% B for 1.5 min, increased to 5.0% B for

0.5 min, then to 30.0% B for 16 min, to 40% B for 2 min and then finally to 85.0% B for 6 min before returning to initial conditions. Detection was made in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode with mass spectrometer parameters described in Table 2.

### 2.8. Analysis of volatile compounds

Varietal thiols (3-mercapto-1-hexanol and its acetate) and  $\text{C}_6$  unsaturated compounds, such as (*E*)-2-hexenal and (*E*)-2-hexen-1-ol were analysed according to well-optimised methods (Rodríguez-Bencomo et al., 2009; Roland, Vialaret, Razungles, Rigou, & Schneider, 2010c) by stable isotope dilution assay (SIDA) and GC-qMS.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Precursor location in Melon B. and Sauvignon Blanc grapes

#### 3.1.1. Weight repartition of grapes

Initially, we compared the average weight per berry of the Melon B. and Sauvignon Blanc varieties (Table 1A). The Newmann-Keuls test ( $\alpha = 0.01$ ) was used to demonstrate the statistical difference of the average weight per berry between Melon B. and Sauvignon Blanc, 1.371 g/berry and 1.956 g/berry respectively.

Then, healthy berries of Melon B. and Sauvignon Blanc were cut to separate the skin from seeds and pulp. Because the peeling engendered a partial crushing of the pulp, we assigned the juice produced to the pulp. The skin-to-pulp ratio was measured for both grape varieties. Globally, the ratio for the Sauvignon Blanc grapes was higher than that of the Melon B. variety. More specifically, the skin-to-pulp ratio was more or less stable when considering the different origins of the Melon B. variety whereas it varied considerably for the different Sauvignon Blanc locations. This might be due to the restricted area of vineyards around Nantes where the Melon B. samples were taken from.

#### 3.1.2. Analysis of precursors

Since the levels of Cys4MMP occurring in grapes were below our detection limits (estimated LODs < 5  $\mu\text{g}/\text{l}$ ), reported data only concerned glutathionylated precursors (G3MH and G4MMP) and Cys3MH.

**3.1.2.1. Comparison of precursor distribution according to grape variety.** Generally, as we already reported (Roland et al., 2010c), more precursors occurred naturally in Sauvignon Blanc than in Melon B. In addition, considerable amounts of precursors were located in the skin whatever the grape variety (Fig. 1).

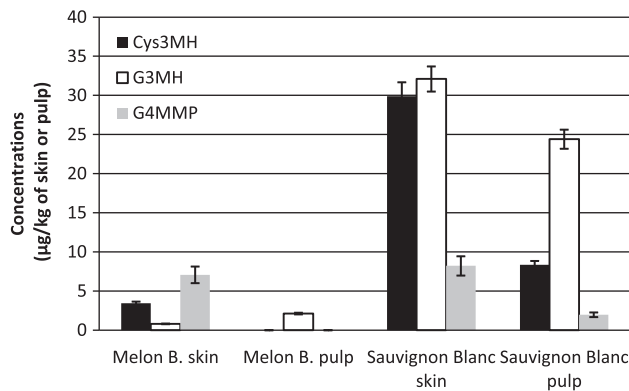
For the Sauvignon Blanc grapes, precursors were detected in both the skin and the pulp with varying distributions. Indeed, concentrations ranged from 1.5 to 4 times higher in the skin than in the pulp for all the considered precursors (Fig. 1). More precisely, the Cys3MH was present at 78% in the skin, as already described by Peyrot des Gachons, Tominaga, and Dubourdieu, (2002a), whereas G3MH was more or less equally distributed in the skin and the pulp (57% and 43% respectively). For G4MMP, a considerable amount was detected in the skin (81%); similar results were found for the Cys3MH precursor.

For the Melon B. variety, precursor localisation, more specifically that of Cys3MH and G4MMP, was much more area dependant as they were found to occur only in the skin (Fig. 1). However, G3MH was detected both in the skin and the pulp at very different levels (0.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 2.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.e., 27% and 72%, respectively).

In comparing precursor contents measured in our grape samples and data reported in literature for standard musts elaborated either at laboratory or industrial scale, we observed significant dif-

**Table 2**  
Mass spectrometer parameters for each analyte (Dwell time = 50 ms for each transition).

Compounds	Parent ions	Daughter ions	Declustering potential (V)	Collision energy (V)
Cys4MMP	220.20	202.00	30	40
		122.00	60	20
		99.00	60	20
Cys4MMPd6	226.20	208.20	30	40
		122.20	60	20
		105.00	60	20
Cys3MH	222.20	205.00	60	10
		101.00	60	20
		83.00	60	20
Cys3MH $d_2$	2240	207.00	60	10
		103.00	60	20
		85.00	60	20
C4MMP	406.20	259.20	120	20
		179.20	120	20
		162.00	120	40
C4MMP $d_{10}$	416.20	269.00	120	20
		179.00	120	20
		162.00	120	40
C3MH	408.20	333.00	120	20
		262.00	120	20
		162.00	120	40
C3MH $d_2$	410.30	333.00	120	20
		264.00	120	20
		162.00	120	40



**Fig. 1.** Mean precursor concentrations in Melon B. and Sauvignon Blanc skin and pulp (Results are expressed in  $\mu\text{g}$  of precursor per kg of initially fresh skin or pulp of the corresponding grapes.) For the Melon B. pulp, both Cys3MH and G4MMP concentrations were below the detection limit.

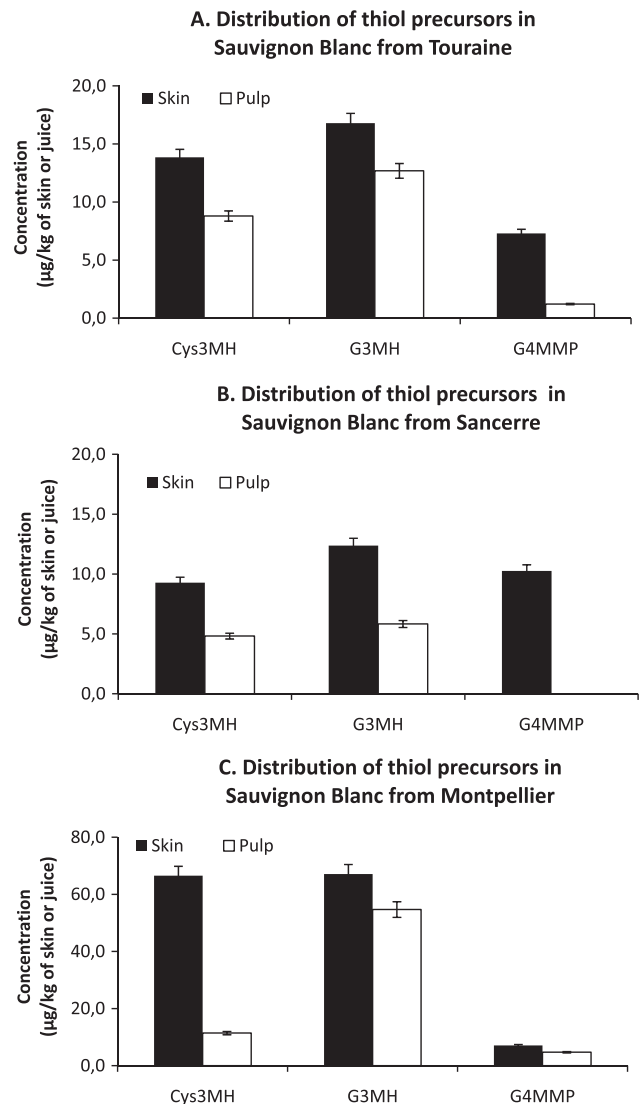
ferences. In musts, cysteinylated precursors were systematically more abundant than glutathionylated ones (Roland et al., 2010c), except for in Australian varieties (Capone, Sefton, Hayasaka, & Jeffery, 2010). In our grape samples, glutathionylated conjugates represented the most abundant precursors with concentrations ten times higher, compared to reported values for Melon B. and Sauvignon Blanc musts (Roland et al., 2010c). For the same comparison, between musts content of Cys3MH (Roland et al., 2010c), the grape samples showed a lower difference in abundance: Cys3MH was twice as high in our grape samples. The elaboration of must might affect the extraction of such precursors and modify their distribution.

**3.1.2.2. Comparison of precursor location according to Sauvignon Blanc origins.** The distribution and abundance of precursors varied according to the Sauvignon Blanc origins. Indeed, the 3MH precursor concentration in Sauvignon Blanc from Montpellier was five times higher than those from Sancerre and Touraine (Fig. 2) for only a slight difference of ripeness for the considered berries. As already reported (Choné, 2001), a moderate water deficit enhanced the concentration of Cys3MH in Sauvignon Blanc grapes and could explain the higher concentrations of precursors found in Sauvignon Blanc from Montpellier exposed to the Mediterranean dry climate (Table 1A).

G3MH was the most abundant precursor in the Sauvignon Blanc from the Loire Valley, whereas its concentration was close to that of Cys3MH in the Sauvignon Blanc from Montpellier (Fig. 2). This could be linked to the glutathione amount available in different locations, which could participate in G3MH biogenesis. Indeed, glutathione levels were quite different depending on vineyard locations: from 46 to 56 mg/l for Tours and Sancerre (Roland et al., 2010c) respectively whereas from 61 to 113 mg/l for Montpellier (Cheynier, Souquet, & Moutounet, 1989).

### 3.2. Study of Melon B. and Sauvignon Blanc wine cellar must

Considering the distribution of cysteinylated and glutathionylated conjugates, we studied the influence of the winery pressing cycle and cold prefermentation skin contact on precursor extraction. Because the levels of 4MMP precursors were below the limits of detection (lower than 5 and 0.5  $\mu\text{g}/\text{l}$  for Cys4MMP and G4MMP, respectively), only the precursors of 3MH were monitored during pressing and cold prefermentation skin contact in the wine cellar.



**Fig. 2.** Influence of vineyard locations on distribution of thiol precursors in Sauvignon Blanc from Tours (A), Sancerre (B) and Montpellier (B).

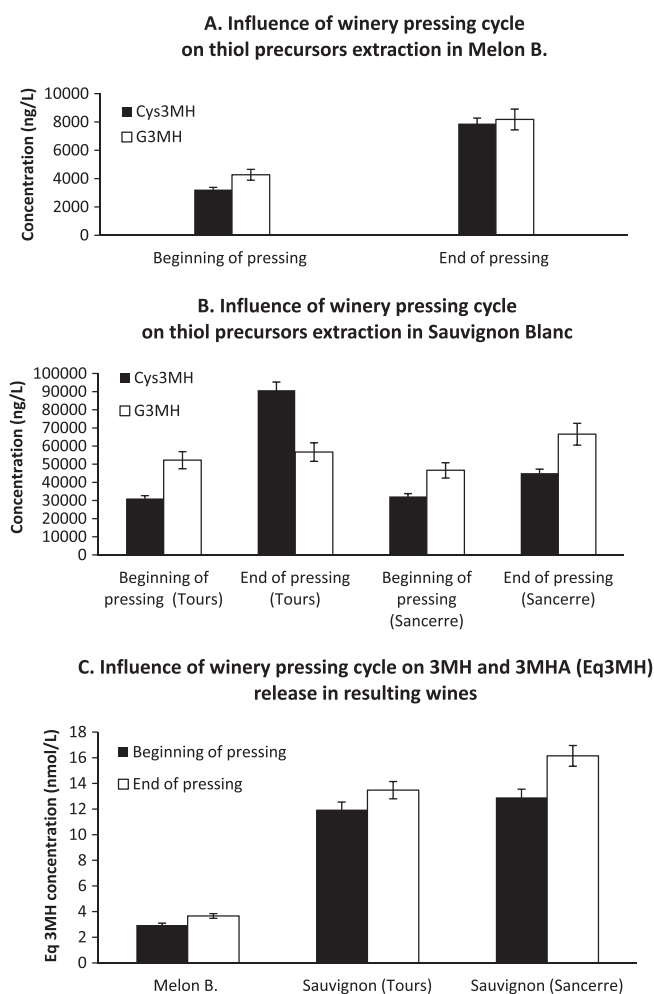
### 3.2.1. Influence of pressing cycle on precursors extraction

Usually, all grape juices contained more G3MH than Cys3MH and winery pressing cycles did not affect their relative composition, except for the Sauvignon Blanc from Tours where the Cys3MH became the major precursor at the end of pressing (Fig. 3A and B).

For Melon B., Cys3MH and G3MH were successfully extracted using high pressure, since a relative increase in the concentrations equal to +145% and +91% was observed at the end of pressing. The same outcome was observed for Sauvignon Blanc, as already reported for Cys3MH (Maggu et al., 2007). Nevertheless, extraction was different according to grape origins. Indeed, Cys3MH concentration went up to +192% and +40% in the Sauvignon Blanc from Tours and Sancerre, respectively, for a similar degree of maturity in both vineyards (Table 1B).

Considering these values, extraction of Cys3MH seemed easier than that of G3MH for both Melon B. and Sauvignon Blanc (Sancerre) varieties. Distribution of these precursors in different parts of the skin (epidermis or hypodermis) could influence their extraction and explain such differences. In the case of the Sauvignon Blanc from Tours, Cys3MH might be extracted earlier in the winery cycle pressing in comparison with other experiments, decreasing



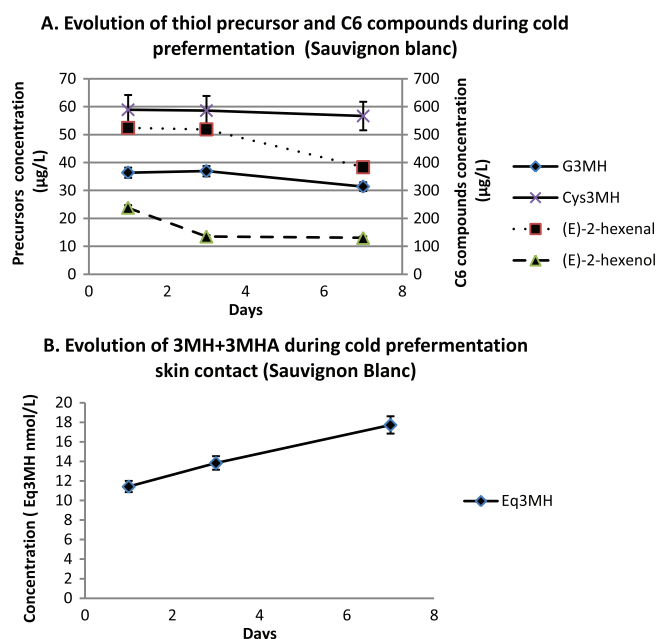


**Fig. 3.** Influence of winery pressing cycles on thiol precursor extraction in Melon B. (A) and Sauvignon Blanc (B), then on 3MH and 3MHA release in resulting wines (C) (beginning of pressing cycle: low pressure, i.e., below 1 atm; end of pressing cycle: high pressure, i.e., above 2 atm, 3MH and 3MHA were expressed as Eq3MH, since they have a common biogenetic origin.).

the difference in concentrations between juices taken at the beginning and at the end of pressing (only 40%, instead of 192% for Sancerre).

### 3.2.2. Analysis of varietal thiols in beginning- and end-pressing wines

To correlate the increase of aromatic potential in end-pressing grape juices and the release of varietal aroma, 3MH and its acetate were quantified in beginning- and end-pressing wines. Results were expressed in 3MH equivalents (Eq3MH), since both varietal thiols have a common biogenetic origin. Wines resulting from end-pressing must contained more thiols than the one originating from juices collected at the beginning of pressing (Figure 3C). This observation is in agreement with the higher extraction of precursors in end-pressing juices. However, these results are contradictory with those obtained by Patel and co-workers (Patel et al., 2010) who observed a 50% decrease of 3MH and 3MHA in end-pressing Sauvignon Blanc wines. Under their conditions, the pressed wines possessed lower acidity values, a rapid decrease in glutathione content, and an important polyphenolic fraction. According to the winemaking procedures (alcoholic fermentation, bottling, storage, ageing), varietal thiol contents can be hugely affected through biochemical reactions. Further studies have to be performed to better understand the mechanisms involved in aroma loss.



**Fig. 4.** Influence of cold prefermentation skin contact on 3MH precursors and C<sub>6</sub> unsaturated compounds in Sauvignon Blanc must (A) then on 3MH and 3MHA release in resulting wines (B) (Eq3MH corresponds to the sum of 3MH and 3MHA.).

### 3.2.3. Influence of cold prefermentation skin contact on precursor extraction and thiols release

Since thiol precursors were preferentially located in the skin, we can expect an increase in their concentration, due to the prolonged contact of juice with suspended solids. For this purpose, unclarified Sauvignon Blanc must was stirred for 7 days at 5 °C and the evolution of precursors and C<sub>6</sub> unsaturated compounds, such as (E)-2-hexenal and (E)-2-hexenol was monitored. No variation of Cys3MH and G3MH was observed during the 7 days stirring (Fig. 4A). Nevertheless, (E)-2-hexenal and (E)-2-hexenol concentrations decreased by up to 37% and 83% over 7 days of cold prefermentation skin contact. The 3MH and its acetate were quantified in the resulting wines and results were expressed in Eq3MH. We observed a significant increase in Eq3MH between Day 0 and Day 7 of up to 55% (Fig. 4B) corresponding to an overproduction of 3MH close to 750 ng/l. As (E)-2-hexenal was already reported as a powerful biogenesis pathway for 3MH, we could expect that this significant decrease could contribute to the formation of other thiol precursors as S-3-(1-hexanal)-glutathione or S-3-(1-hexanal)-cysteine. Further studies would be required to investigate new precursors of 3MH.

## 4. Conclusion

Cysteinylated and glutathionylated precursors of 3MH and 4MMP were in major part located in the skin of Melon B. and Sauvignon Blanc. For Sauvignon Blanc, each precursor was detected both in skin and pulp whereas for Melon B., they were only found in specific grape compartments. Sauvignon Blanc origins influenced the distribution and abundance of precursors. We demonstrated that precursor extraction was maximised using high pressure during pressing in the wine cellar, resulting in increased thiols release in end-pressing wines. These observations have to be modulated: the important polyphenolic fraction present in such juices (Patel et al., 2010) can induce a rapid oxidative browning of resulting wines. Consequently, pressed wines have to be consumed rapidly to preserve the appreciated fruity notes.

## Acknowledgements

Clotilde Verriès and Jean-Luc Guiraud are thanked for their technical support. Interloire, IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin) and Sicavac are also acknowledged for technical and financial supports (CIFRE fellowship).

## References

- Capone, D. L., Sefton, M. A., Hayasaka, Y., & Jeffery, D. W. (2010). Analysis of precursors to wine Odorant 3-Mercaptohexan-1-ol Using HPLC-MS/MS: Resolution and quantitation of diastereomers of 3-S-Cysteinylohexan-1-ol and 3-S-Glutathionylhexan-1-ol. *J. Agric. Food Chem.*, *58*(3), 1390–1395.
- Cheyrier, V., Souquet, J. M., & Moutounet, M. (1989). Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* Grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.*, *40*(4), 320–324.
- Choné, X. (2001). Contribution à l'étude des terroirs de Bordeaux: étude des déficits hydriques modérés, de l'alimentation en azote et de leurs effets sur le potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc., Vol. PhD Thesis (p. 188): University of Bordeaux.
- Dagan, L. (2006). Potentiel aromatique des raisins de *Vitis Vinifera* L. cv. Petit Manseng et Gros Manseng. Contribution à l'arôme des vins de pays Côtes de Gascogne. *Sciences et Procédés Biologiques et Industriels*, Vol. PhD Thesis (p. 238): Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.
- Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J. N., & Dubourdieu, D. (1993). Mise en évidence dans le raisin de *Vitis vinifera* J. (var. Sauvignon) d'un précurseur de la 4-méthyl-4-mercaptopentane-2-one. *C. R. Acad. Sci. Paris*, *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 Fragrance J.*, *10*, 385–392.
- Fedrizzi, B., Pardon, K. H., Sefton, M. A., Else, G. M., & Jeffery, D. W. (2009). First identification of 4-S-Glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a potential precursor of 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon Blanc juice. *J. Agric. Food Chem.*, *57*(3), 991–995.
- Ferreira, V., Ortin, N., Escudero, A., Lopez, R., & Cacho, J. (2002). Chemical characterization of the aroma of Grenache rose wines: Aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory reconstitution studies. *J. Agric. Food Chem.*, *50*(14), 4048–4054.
- Grant-Preece, P. A., Pardon, K. H., Capone, D. L., Cordente, A. G., Sefton, M. A., Jeffery, D. W., et al. (2010). Synthesis of wine thiol conjugates and labeled analogues: Fermentation of the glutathione conjugate of 3-Mercaptohexan-1-ol yields the corresponding cysteine conjugate and free thiol. *J. Agric. Food Chem.*, *58*(3), 1383–1389.
- Kobayashi, H., Takase, H., Kaneko, K., Tanzawa, F., Takata, R., Suzuki, S., et al. (2010). Analysis of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione and S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine in *Vitis vinifera* L. cv. Koshu for aromatic wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, *61*(2), 176–185.
- Maggu, M., Winz, R., Kilmartin, P. A., Trought, M. C. T., & Nicolau, L. (2007). Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon Blanc must. *J. Agric. Food Chem.*, *55*(25), 10281–10288.
- Murat, M.-L., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2001). Assessing the aromatic potential of cabernet sauvignon and merlot musts used to produce rose wine by assaying the cysteinylated precursor of 3-Mercaptohexan-1-ol. *J. Agric. Food Chem.*, *49*, 5412–5417.
- Patel, P., Herbst-Johnstone, M., Lee, S. A., Gardner, R. C., Weaver, R., Nicolau, L., et al. (2010). Influence of juice pressing conditions on polyphenols, antioxidants, and varietal aroma of Sauvignon Blanc microferments. *J. Agric. Food Chem.*, *58*(12), 7280–7288.
- Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2002a). Localisation of S-cysteine conjugates in the berry: Effect of skin contact on aromatic potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc must. *Am. J. Enol. Vitic.*, *53*(2), 144–146.
- Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2002b). Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form: Identification of S-3-(Hexan-1-ol)-Glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *J. Agric. Food Chem.*, *50*, 4076–4079.
- Rodríguez-Bencomo, J. J., Schneider, R., Lepoutre, J. P., & Rigou, P. (2009). Improved method to quantitatively determine powerful odorant volatile thiols in wine by headspace solid-phase microextraction after derivatization. *J. Chromatogr. A*, *1216*(30), 5640–5646.
- Roland, A., Schneider, R., Guernevé, C. L., Razungles, A., & Cavelier, F. (2010a). Identification and quantification by LC-MS/MS of a new precursor of 3-Mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: Elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chem.*, *121*, 847–855.
- Roland, A., Vialaret, J., Moniatte, M., Rigou, P., Razungles, A., & Schneider, R. (2010b). Validation of a nano liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the identification and the accurate quantification by isotopic dilution of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in white grape juices. *J. Chromatogr. A*, *1217*, 1626–1635.
- Roland, A., Vialaret, J., Razungles, A., Rigou, P., & Schneider, R. (2010c). Evolution of S-Cysteinyllated and S-Glutathionylated thiol precursors during oxidation of Melon B. and Sauvignon Blanc musts. *J. Agric. Food Chem.*, *58*(7), 4406–4413.
- Schneider, R., Kotseridis, Y., Ray, J. L., Augier, C., & Baumes, R. (2003). Quantitative determination of sulfur-containing wine odorants at sub parts per billion levels. 2. Development and application of a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.*, *51*(11), 3243–3248.
- Tominaga, T., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (1996). Identification of 3-mercaptohexanol acetate, compound having a powerful odor reminiscent of box-tree, involved in the aroma of Sauvignon wines. *Vitis*, *35*, 207–210.
- Tominaga, T., Masneuf, I., & Dubourdieu, D. (1995). Mise en évidence d'un S-conjugué de la cystéine, précurseurs d'arôme du Sauvignon. *J. Int. Sci. Vigne. Vin.*, *29*, 227–232.
- Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., & Dubourdieu, D. (1998). A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-Cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.*, *46*, 5215–5219.

## Straightforward Synthesis of Deuterated Precursors To Demonstrate the Biogenesis of Aromatic Thiols In Wine

AURÉLIE ROLAND,<sup>\*,†</sup> RÉMI SCHNEIDER,<sup>§</sup> ALAIN RAZUNGLES,<sup>#</sup>  
CHRISTINE LE GUERNEVÉ,<sup>#</sup> AND FLORINE CAVELIER<sup>⊥</sup>

<sup>†</sup>Interloire, 12 rue Etienne Pallu, B.P. 1921, 37019 Tours Cedex 01, France, <sup>§</sup>Institut Français de la Vigne et du Vin, at UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, INRA, 34060 Montpellier Cedex 01, France,

<sup>#</sup>UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, INRA, SupAgro, Université Montpellier I, 34060 Montpellier Cedex 01, France, and <sup>⊥</sup>IBMM, UMR-CNRS 5247, Universités Montpellier I et II, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France

Straightforward synthesis of labeled *S*-3-(hexan-1-ol)-glutathione and *S*-4-(4-methylpentan-2-one)-glutathione has been developed through a conjugate addition optimization study. Sauvignon blanc fermentation experiments with the [<sup>2</sup>H<sub>10</sub>] *S*-4-(4-methylpentan-2-one)-glutathione used as a tracer released the corresponding deuterated thiol, thus proving the direct relationship with the 4-mercapto-4-methylpentan-2-one under enological conditions. The conversion yield of such transformation was estimated to be close to 0.3%, opening an avenue for additional study on varietal thiol biogenesis.

**KEYWORDS:** Glutathione; precursor; grapes; wine

### INTRODUCTION

More than a thousand aroma compounds have been identified so far in grapes and wine, but only few of them contribute to the wine aroma (1). During the past 10 years, some varietal thiols, such as 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (1), 3-mercaptohexan-1-ol (2), and 3-mercaptohexylacetate (3), have been identified and mainly studied in wines of Sauvignon blanc (2, 3), Macabeo (4), Traminer (5, 6), Muscadet and Bacchus (7), Mueller-Thurgau and Kerner (8), Verdejo and Albarino (9), Gewurztraminer and Scheurebe (10), Petite Arvine (11), Cabernet Sauvignon, Cabernet franc, and Merlot (12, 13). These thiols are responsible for the wines' fruity notes (Figure 1). Compounds 2 and 3 are reminiscent of grape fruit, passion fruit, and box tree, especially for 3, whereas 1 exhibits broom, black currant bud, and box tree odors (14). These varietal thiols contribute positively to the fruity notes of young wines due to their very low perception thresholds: 0.8, 4.2, and 60 ng/L in hydroalcoholic solution for compounds 1, 3, and 2, respectively (14).

These varietal thiols are released during alcoholic fermentation from nonvolatile precursors identified as glutathione (15, 16) and cysteine conjugates (17–19) under the action of the yeast through its  $\beta$ -lyase enzymatic activity (19). The formal relationship between compounds 7 and 2 has been established in Sauvignon blanc (20), but this has never been investigated for 5; neither have the enological conditions.

To better understand the biogenesis of fruity notes in wines, the quantification of their natural precursors in must would enable the determination of the aromatic potential of grapes. Accurate quantification of such aroma precursors at trace levels in grapes (21) is

achieved by the stable isotope dilution assay (SIDA), which involves labeled analogues. Up to now, synthesis of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one precursors, *S*-4-(4-methylpentan-2-one)-L-cysteine (4) and *S*-4-(4-methylpentan-2-one)-glutathione (5), has been reported as natural and deuterated compounds (19, 22–24). Precursors of 3-mercaptohexan-1-ol, *S*-3-(hexan-1-ol)-cysteine (6) and *S*-3-(hexan-1-ol)-glutathione (7), were synthesized as a racemic mixture in natural and deuterated forms (16, 19, 20, 22, 25–28) and diastereomerically pure products (22, 29).

Direct synthesis of 7 and 5 was already described in the literature (22); unfortunately, we did not succeed in reproducing the protocol. Therefore, we developed a new, shorter *S*-glutathione conjugate synthesis, which is easily reproducible by nonchemist specialists.

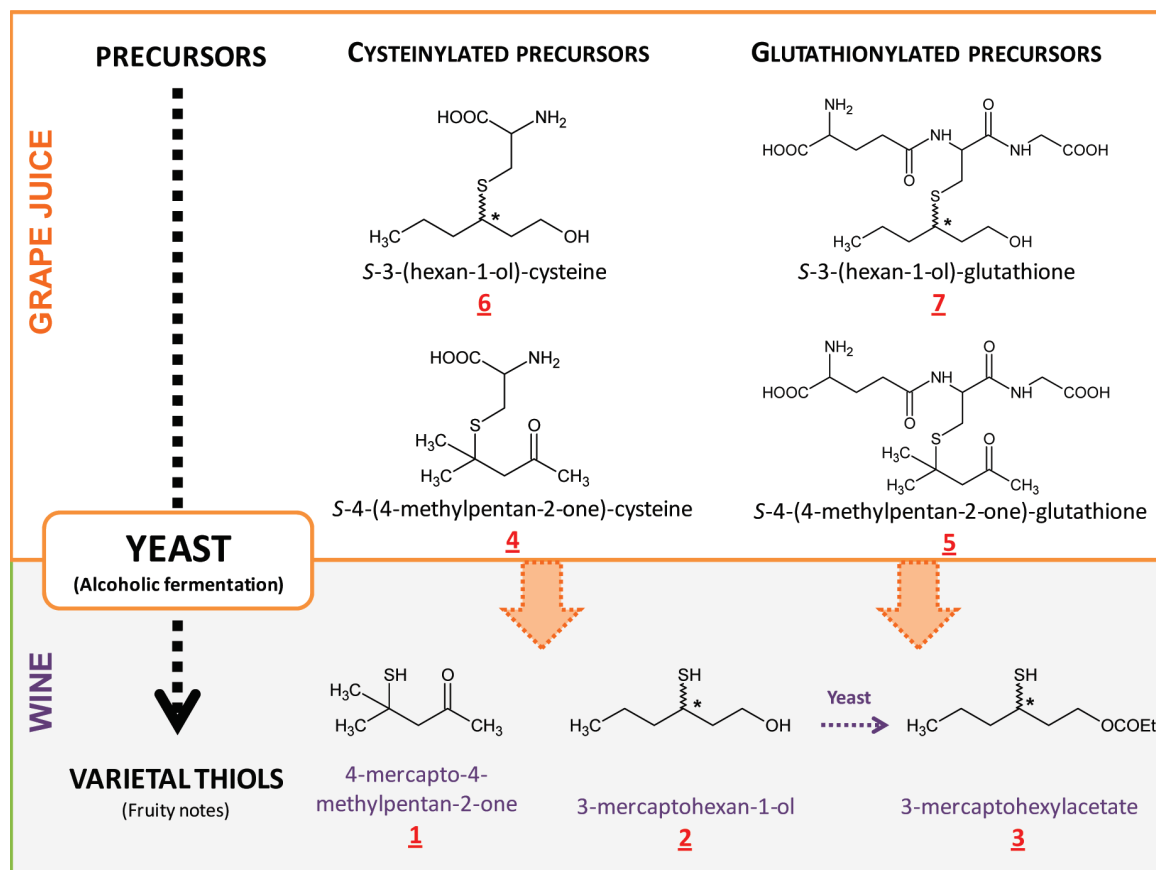
In this paper, we report a straightforward synthesis of 7 and compare it with the multistep synthetic strategies already described refs 20 and 22. Then, we adapted the optimized synthesis to obtain the deuterated analogues, that is, 7-*d*<sub>2</sub> and 5-*d*<sub>10</sub>, the latter being used as tracer to bring some insight into the biogenesis of aromatic thiols in wine.

### MATERIAL AND METHODS

**Chemicals.** Reduced glutathione, (*E*)-2-hexenal, hydrochloric acid, sodium dihydrogenphosphate, sodium monohydrogenphosphate, sodium borohydride, and [<sup>2</sup>H<sub>10</sub>]mesityl oxide were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin en Fallavier, France). Sodium sulfate was purchased from Merck (Darmstadt, Germany), and absolute ethanol and sodium hydroxide were from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Pyridine was supplied from Fluka (St Quentin en Fallavier, France) and dichloromethane from Riedel de Haën (St Quentin en Fallavier, France). All of the chemicals required to elaborate the synthetic must were supplied from Sigma-Aldrich.

**Analytical Procedures.** Electrospray ionization (ESI) mass spectra were recorded on a Micromass II quadrupole mass spectrometer fitted with an electrospray source coupled with a Waters HPLC. The injection

\*Address correspondence to this author at INRA - UMR "Sciences Pour l'œnologie", 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex, France (phone +33 4 99 61 22 28; e-mail roland@supagro.inra.fr).



**Figure 1.** Release of varietal thiols from S-conjugate glutathione and cysteine precursors.

volume was equal to  $2\ \mu\text{L}$ , and the column temperature was maintained at  $22\ ^\circ\text{C}$  during the analysis. Analytes were first separated on a reverse phase ONYX 18 monolithic column (Phenomenex,  $4.6\ \text{mm}$ ,  $2.5\ \text{cm}$ ,  $2\ \mu\text{m}$ ). The flow rate was maintained at  $3\ \text{mL}/\text{min}$ . A linear gradient was set from 0 to 100% of mobile phase B (acetonitrile with 0.1% of TFA) over a 2.5 min period and then 100% of B during 1 min before returning to the initial conditions (100% of mobile phase A, water with 0.1% of TFA). Detection was performed in positive ionization mode with the spray voltage and temperature source maintained at  $3\ \text{kV}$  and  $120\ ^\circ\text{C}$ , respectively.

Purifications were performed on preparative HPLC (Waters) using a reverse phase C18 (RP18,  $19 \times 100\ \text{mm}$ ,  $5\ \mu\text{m}$ ). Detection was carried out by UV at  $214\ \text{nm}$ , and the flow rate was maintained at  $50\ \text{mL}/\text{min}$ .

HRMS (Q-TOF) were recorded on a JEOL JMS-SX-102A spectrometer.

NMR spectra were recorded on a Varian Unity Inova 500 equipped with a  $3\ \text{mm}$  reverse probe, and chemical shifts were referenced to trimethylsilylpropionic acid. NMR acquisitions were performed using VNMRJ software.

Analysis of **1** and **1-d<sub>10</sub>** was carried out using a Shimadzu GC-MS QP5050 coupled to a quadrupole mass spectrometer detector operating in selected ion monitoring (SIM) mode. Detection was performed in negative chemical ionization mode with methane using  $m/z$  160 and 170 as quantifier ions and  $m/z$  301 and 309 as qualifier ions for **1** and **1-d<sub>10</sub>**, respectively. The compound **1-d<sub>10</sub>** was synthesized according to the method of Kotseridis et al. (30) with good yield and purity.

**Synthesis of S-3-(Hexan-1-ol)-glutathione (7).** (*E*)-2-Hexenal was added to a solution of glutathione ( $500\ \text{mg}$ ,  $1.64\ \text{mmol}$ ) in a phosphate buffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $1\ \text{M}$ ,  $\text{pH}\ 8$ ,  $10\ \text{mL}$ ) in three steps ( $3 \times 0.33\ \text{equiv}$ ), with a  $3\ \text{h}$  interval between each addition. The reaction was stirred for  $10\ \text{h}$  (total duration of the reaction) at room temperature. Then, sodium borohydride ( $177\ \text{mg}$ ,  $4.3\ \text{mmol}$ ) in water ( $4\ \text{mL}$ ) was added dropwise to the reaction mixture, which was left for  $2\ \text{h}$  at room temperature. The mixture was then concentrated under vacuum after the pH was adjusted to 3 with  $2\ \text{M}\ \text{HCl}$ . The resulting residue was dissolved in ethanol ( $10\ \text{mL}$ ), and a sodium hydroxide solution was added dropwise until a white precipitate was formed, which was filtered and purified on a

reverse phase C18 to give the pure expected product ( $70\ \text{mg}$ ,  $11\%$ ):  $\text{mp} = 154\ ^\circ\text{C}$ ; LC-MS,  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 408.3\ \text{Da}$ ,  $\text{rt} = 0.84\ \text{min}$ . HRMS (Q-TOF) calculated for  $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ ,  $408.1804\ \text{Da}$ ; found,  $408.1799\ \text{Da}$ .  $^1\text{H}\ \text{NMR}$  ( $500\ \text{MHz}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  0.89 ( $\text{CH}_3$ ,  $3\text{H}$ ,  $\text{m}$ ,  $J = 4.2\ \text{Hz}$ ),  $1.42$  ( $\text{CH}_2$ ,  $2\text{H}$ ,  $\text{m}$ ,  $J = 7.3\ \text{Hz}$ ),  $1.58$  ( $\text{CH}_2$ ,  $2\text{H}$ ,  $\text{m}$ ,  $J = 7.2\ \text{Hz}$ ),  $1.71$  and  $1.85$  ( $\text{CH}_2$ ,  $2\text{H}$ ,  $\text{m}$ ,  $J = 7.4\ \text{Hz}$ ),  $2.19$  ( $\text{CH}_2\beta\text{Glu}$ ,  $2\text{H}$ ,  $\text{m}$ ,  $J = 7.5\ \text{Hz}$ ),  $2.56$  ( $\text{CH}_2\gamma\text{Glu}$ ,  $2\text{H}$ ,  $\text{m}$ ,  $J = 5.5\ \text{Hz}$ ),  $2.84$  ( $\text{CH}$ ,  $1\text{H}$ ,  $\text{m}$ ,  $J = 7.2\ \text{Hz}$ ),  $2.87$  and  $3.07$  ( $\text{CH}_2\beta\text{Cys}$ ,  $2\text{H}$ ,  $\text{m}$ ,  $J = 4.8\ \text{Hz}$ ),  $3.71$  ( $\text{CH}_2$ ,  $2\text{H}$ ,  $\text{t}$ ,  $J = 6.7\ \text{Hz}$ ),  $3.91$  ( $\text{CH}_\alpha\text{Glu}$ ,  $1\text{H}$ ,  $\text{m}$ ,  $J = 5.7\ \text{Hz}$ ),  $4.00$  ( $\text{CH}_2\alpha\text{Gly}$ ,  $2\text{H}$ ,  $\text{s}$ ),  $4.56$  ( $\text{CH}_\alpha\text{Cys}$ ,  $1\text{H}$ ,  $\text{m}$ ,  $J = 2.7\ \text{Hz}$ );  $^{13}\text{C}\ \text{NMR}$  ( $500\ \text{MHz}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  177.52, 175.97, 175.73, 175.71, 62.22, 56.39, 56.18, 45.35, 44.33, 39.49, 39.40, 34.09, 33.98, 28.87, 22.24, 16.10.

**Synthesis of [ $^2\text{H}_2$ ]-S-3-(Hexan-1-ol)-glutathione (7-d<sub>2</sub>).** [ $2,3\text{-}^2\text{H}_2$ ]-(*Z*)-2-Hexenal ( $150\ \mu\text{L}$ ), synthesized according to the method of Roland et al. (20), was added to a solution of glutathione ( $1.11\ \text{g}$ ,  $3.8\ \text{mmol}$ ) in phosphate buffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $1\ \text{M}$ ,  $\text{pH}\ 8$ ,  $10\ \text{mL}$ ). [ $^2\text{H}_2$ ]-S-3-(Hexan-1-ol)-glutathione (7-d<sub>2</sub>) was synthesized as a natural analogue with good yield as previously described for **7**. LC-MS,  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 410.2\ \text{Da}$ ,  $\text{rt} = 0.83\ \text{min}$ . HRMS (Q-TOF) calculated for  $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_7\text{SD}_2$ ,  $410.1930\ \text{Da}$ ; found,  $410.1935\ \text{Da}$ . Spectral data were entirely consistent with those of the unlabeled compound **7** with the only difference being the absence of signals corresponding to the labeled position in the  $^1\text{H}\ \text{NMR}$  spectrum.

**Synthesis of [ $^2\text{H}_{10}$ ]-S-4-(4-Methylpentan-2-one)-glutathione (5-d<sub>10</sub>).** Pyridine ( $500\ \mu\text{L}$ ,  $6.2\ \text{mmol}$ ) and [ $^2\text{H}_{10}$ ]mesityl oxide ( $450\ \mu\text{L}$ ,  $3.6\ \text{mmol}$ ) were added sequentially to a solution of glutathione ( $1.11\ \text{g}$ ,  $3.6\ \text{mmol}$ ) in water ( $8\ \text{mL}$ ). Two additional portions of [ $^2\text{H}_{10}$ ]mesityl oxide ( $2 \times 150\ \mu\text{L}$ ) were added, the first after  $8\ \text{h}$  and the second after  $20\ \text{h}$ . The reaction mixture was stirred for  $36\ \text{h}$  at room temperature under nitrogen atmosphere and washed with dichloromethane ( $3 \times 20\ \text{mL}$ ), and the aqueous layer was concentrated to dryness under vacuum. The resulting yellow oil was dissolved in absolute ethanol ( $40\ \text{mL}$ ) to obtain the desired product as a white precipitate, which was removed by filtration ( $1.23\ \text{g}$ ,  $84\%$ ).  $\text{mp} = 135\ ^\circ\text{C}$ ; LC-MS,  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 416.3\ \text{Da}$ ,  $\text{rt} = 0.74\ \text{min}$ . HRMS (Q-TOF) calculated for  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_7\text{SD}_{10}$ ,  $416.2276\ \text{Da}$ ; found,  $416.2270\ \text{Da}$ .  $^1\text{H}\ \text{NMR}$  ( $500\ \text{MHz}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  2.81 ( $\text{CDH}$ ,  $1\text{H}$ ,  $\text{m}$ ),  $2.16$  ( $\text{CH}_2\beta\text{Glu}$ ,  $2\text{H}$ ,  $\text{m}$ ,

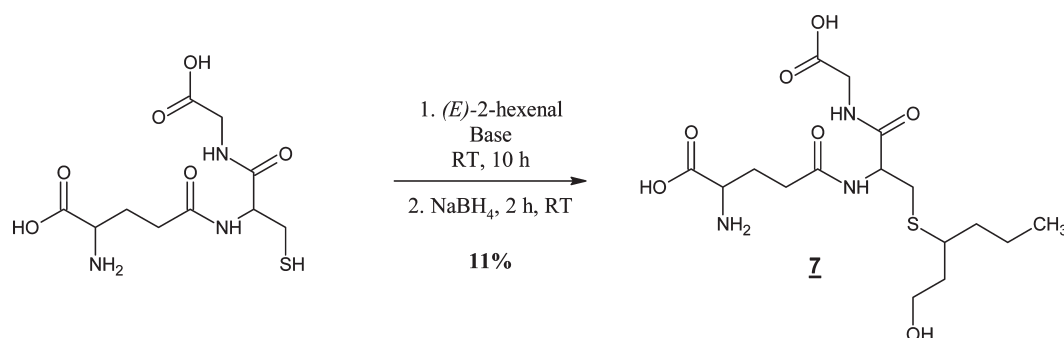


Figure 2. Direct synthesis of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione (7).

$J = 7.5$  Hz), 2.53 ( $\text{CH}_2\gamma\text{Glu}$ , 2H, m,  $J = 5.5$  Hz), 2.94 and 3.12 ( $\text{CH}_2\beta\text{Cys}$ , 2H, m,  $J = 4.8$  Hz), 3.77 ( $\text{CH}_\alpha\text{Glu}$ , 1H, m,  $J = 5.7$  Hz), 3.80 ( $\text{CH}_2\alpha\text{Gly}$ , 2H, s), 4.59 ( $\text{CH}_\alpha\text{Cys}$ , 1H, m,  $J = 2.7$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  216.62, 178.26, 177.70, 176.82, 174.87, 57.00, 56.43, 56.04, 34.57, 34.24, 32.26, 30.07, 29.09.

**Fermentations.** Fermentations were conducted at laboratory scale (1.5 L) under synthetic and natural conditions (Sauvignon blanc must from Touraine, sugar = 205 g/L, total acidity = 4.11 g/L, pH 3.31, assimilable nitrogen = 47 mg/L). The synthetic media simulating standard grape juice was composed of (per liter) (31) glucose (200 g), citric acid (6 g); DL-malic acid (6 ng); mineral salts ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 750 mg;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 500 mg;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 250 mg;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 155 mg; NaCl, 200 mg;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 4 mg;  $\text{ZnSO}_4$ , 4 mg;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg; KI, 1 mg;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.4 mg;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1 mg;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg); vitamins (myoinositol, 20 mg; nicotinic acid, 2 mg; calcium pantothenate, 1.5 mg; thiamin-HCl, 0.25 mg; pyridoxine-HCl, 0.25 mg; biotin, 0.003 mg); anaerobic growth factors (ergosterol, 15 mg; sodium oleate, 5 mg; Tween 80, 0.5 mL); nitrogen source, 300 mg of nitrogen as ammoniacal nitrogen (18.6%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ); and amino acids (L-proline, 20.5%; L-glutamine, 16.9%; L-arginine, 12.5%; L-tryptophan, 6%; L-alanine, 4.9%; L-glutamic acid, 4%; L-serine, 2.6%; L-threonine, 2.6%; L-leucine, 1.6%; L-aspartic acid, 1.5%; L-valine, 1.5%; L-phenylalanine, 1.3%; L-isoleucine, 1.1%; L-histidine, 1.1%; L-methionine, 1.1%; L-tyrosine, 0.6%; L-glycine, 0.6%; L-lysine, 0.6%; and L-cysteine, 0.4%).

Two experimental sets were performed as follows:

**Set 1.** Two fermenters using synthetic must, one for the control and one spiked with  $5\text{-}d_{10}$  at a concentration equal to 4.5 nmol/L, were inoculated with VIN13 as yeast strain at 10 g/hL. Fermentations were maintained at 20 °C.

**Set 2.** The same protocol as for set 1 was followed using a Sauvignon blanc must from the Touraine region.

Fermentation progress was followed by fermenter weighing (total time approximately 12 days): the amount of  $\text{CO}_2$  released was determined by automatic measurement of fermenter weight loss every 20 min (32). The resulting synthetic and Sauvignon blanc wines were clarified (3000 rpm, 15 min, 4 °C), and 100 mL of each sample was aliquoted. Wine samples were then analyzed according to the Rodriguez-Bencomo et al. method (33).

**Estimation of Conversion Yields from  $5\text{-}d_{10}$  to  $1\text{-}d_{10}$  Using a Standard Addition Method.** Sauvignon blanc wines obtained from experiment set 2 underwent four standard additions of  $1\text{-}d_{10}$  (2, 4, 6, and 8 ng/L) to estimate the amount of  $1\text{-}d_{10}$  naturally released by the yeast. The absolute value of the  $x$ -intercept for the relationship  $\text{area}_{1\text{-}d_{10}} = f(\text{conc } 1\text{-}d_{10})$  corresponds to the amount of  $1\text{-}d_{10}$  released by the yeast.

## RESULTS AND DISCUSSION

This study intended to provide small amounts of deuterated analogues of glutathione conjugates occurring in grapes. Falck et al. reported one method for deuterated analogue synthesis, which was based on acid labile protecting groups of  $N\text{-}t\text{-Boc}$  L-glutathione dimethyl and di-*tert*-butyl esters (34). According to our experience, it was very difficult to obtain S-(hexan-1-ol)-glutathione (7). Even after some improvements, the synthesis required lengthy (seven steps) and tedious efforts to obtain the desired product with a very moderate yield (20). Indeed, the three first steps represented a total yield of below 14%. Moreover, the

esterification of glutathione conjugate led to two byproducts. The first byproduct came from the oxidation of free thiol and the second from the cleavage of the thioester bond by dimethylamine. Moreover, the final addition of glutathione conjugate on (*E*)-2-hexenal did not reach completion, and after a reduction step with sodium borohydride, a mixture of the desired product with glutathione was obtained. Recent investigations reported the direct synthesis of 7 and  $7\text{-}d_6$  using a conjugate addition on (*E*)-2-hexenal with pyridine giving pure products in satisfactory yields equal to 34 and 44%, respectively (22). Unfortunately, we did not succeed in reproducing the Grant-Preece synthesis. Therefore, we developed a new strategy for the synthesis of the compound 7 in racemic form as well as for the synthesis of  $5\text{-}d_{10}$ . Interestingly, this method can also be used as a powerful tracer in fermentation experiments that involve  $5\text{-}d_{10}$ .

The free thiol of glutathione could be a good candidate for a nucleophilic addition on (*E*)-2-hexenal. Many references in the literature describe the addition of glutathione on unsaturated esters such as dimethyl fumarate (35), polyethylene glycol (36), conjugate ketones (37, 38), and quinones (39, 40). The basic idea was to use this chemistry to our benefit and design a more efficient and straightforward method for the synthesis of 7 (with a reduced number of steps and a satisfactory yield).

**Direct Synthesis of S-3-(Hexan-1-ol)-glutathione (7).** Conjugate addition of glutathione on (*E*)-2-hexenal led to 7 after a reduction step with sodium borohydride (Figure 2). The conjugate addition was the only limiting step (incomplete, generation of byproduct), whereas the reduction facilitated the production of the expected compound 7 in good yield and purity as already reported (20, 22). To improve the global reaction yield and the purity of the desired product, investigations were necessary to optimize the conjugate addition.

First attempts with pyridine, triethylamine, or 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) as bases raised problems during the purification procedure. Consequently, only mineral bases were selected for further conjugate addition. To have a complete conjugate addition, an excess of (*E*)-2-hexenal was added in the reaction according to several procedures (1.2, 2.4, 3.0, 4.0, or 10.0 equiv). During several efforts with various amounts of (*E*)-2-hexenal a side-product was constantly formed (LC-MS  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 1590.8$  Da), which could not be eliminated but only minimized by the triple addition of the electrophile ( $3 \times 0.3$  equiv). Its removal from the reaction mixture was achieved by a purification procedure on a reverse phase C18 to give the expected product 7 as a pure white solid. To simultaneously generate the thiolate ion on glutathione, promote the conjugate addition, and prevent the oxidation of free thiol, the pH had to be adjusted carefully. The stability of each product was studied in a range of pH (pH 8.0–9.5). We observed that the first byproduct was formed (LC-MS  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 1590.8$  Da) at pH >8.5. When the pH

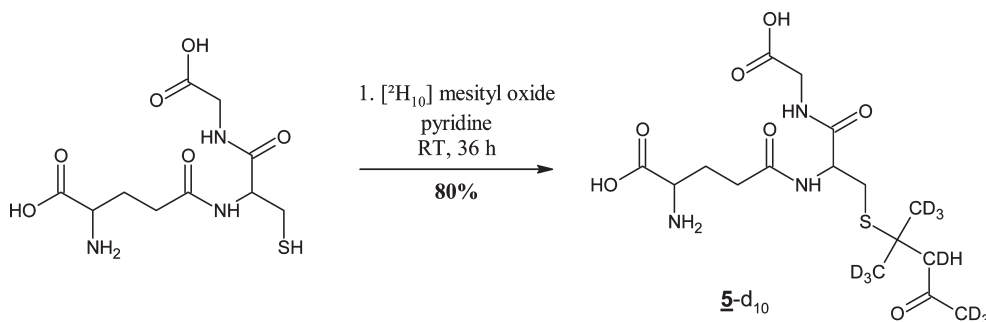


Figure 3. Direct synthesis of  $[^2\text{H}_{10}]$ -S-4-(4-methylpentan-2-one)-glutathione (**5-d<sub>10</sub>**).

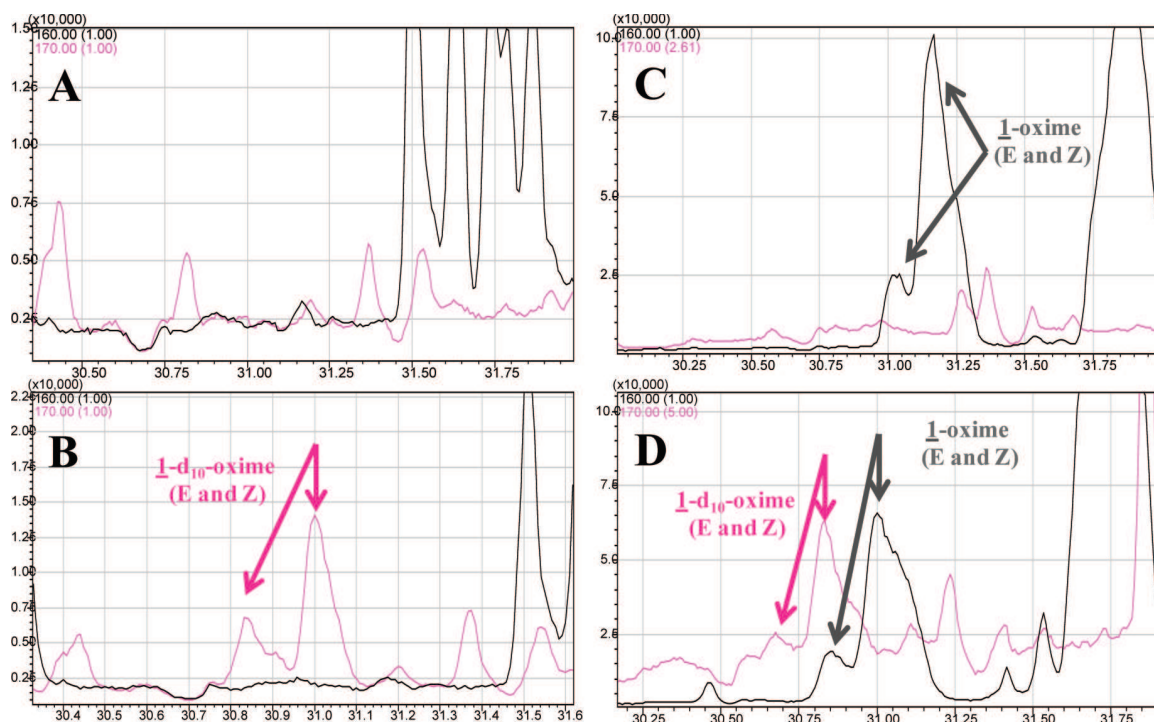


Figure 4. Identification of  $1\text{-d}_{10}$  released in synthetic (**A,B**) and Sauvignon blanc (**C,D**) wines after alcoholic fermentation. **B** and **A** correspond to synthetic must with and without spiking of **5-d<sub>10</sub>** at 4.5 nmol/L, respectively. **D** and **C** correspond to Sauvignon blanc must with and without spiking of **5-d<sub>10</sub>** at 4.5 nmol/L. (The analysis of  $1\text{-d}_{10}$  according to the Rodriguez-Bencomo et al. method (33) requires a methoximation of the ketone function involving two position isomers. The label “1-oxime (E and Z)” or “ $1\text{-d}_{10}$ -oxime (E and Z)” represents each produced isomer.)

was  $>9.0$ , an additional byproduct was observed (LC-MS  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 794$  Da). The best results were obtained at a pH close to 8.0. Furthermore, the conjugate addition was studied at 25 and 50 °C, and at the latter temperature, additional byproducts were formed, which presented problems in subsequent purification steps. In parallel, we studied the optimum reaction time (3 days, 2 days, 1 day, 10 h) and observed that the impurities increased along with the duration of the reaction.

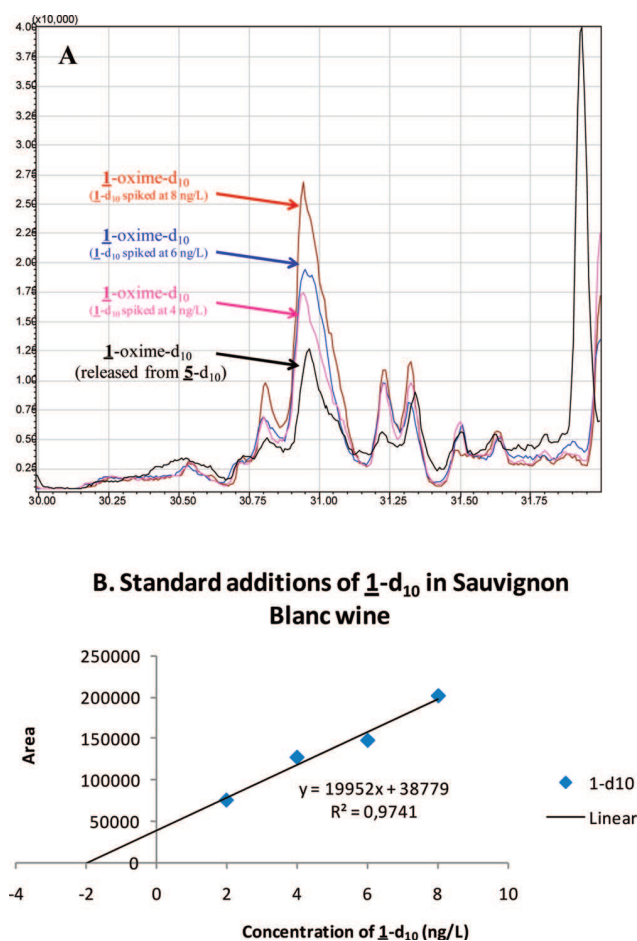
Consequently, the optimal conditions for the conjugate addition of glutathione on (*E*)-2-hexenal were room temperature, slow addition of (*E*)-2-hexenal in three portions, pH 8 (phosphate buffer), and stirring for 10 h. Then, the same conditions, including an additional reduction step with sodium borohydride, were applied to the formation of **7-d<sub>2</sub>** with (*E*)-2,3- $[^2\text{H}_2]$ -2-hexenal as starting material (20).

**Direct Synthesis of  $[^2\text{H}_{10}]$ -S-4-(4-Methylpentan-2-one)-glutathione (**5-d<sub>10</sub>**).** Following the same pathway, a different deuterated glutathione conjugate was synthesized:  $[^2\text{H}_{10}]$ -S-4-(4-methylpentan-2-one)-glutathione (**5-d<sub>10</sub>**) (see Figure 3). The natural compound was first identified in Sauvignon blanc grape juice by

Fedrizzi et al. (15), whereas the labeled analogue was synthesized for the first time by Grant-Preece et al. (22). Our synthesis strategy was slightly modified to reduce the reaction time to 36 h instead of 48 h. Under our conditions no byproduct was observed. The reaction time of conjugate addition between glutathione and  $[^2\text{H}_{10}]$ mesityl oxide was longer (36 h) than for **7** synthesis, but no byproduct was observed. The direct synthesis of **5-d<sub>10</sub>** was inexpensive and effective (yield close to 80%). This established protocol was optimized, and it can be easily carried out by nonspecialists.

**Study of the Relationship between S-4-(4-Methylpentan-2-one)-glutathione (**5**) and 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one (**1**).** Glutathione conjugates (**7** and **5**) were recently identified in different grape varieties such as Sauvignon blanc (15, 16), Melon B., Riesling, Gewürztraminer (21), Pinot Grigio, and Chardonnay (41) and brought new insight into the biogenesis of varietal thiols in wine.

Compound **7** was first reported as a pro-precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (**2**) (42), and then its direct relationship with **2** was demonstrated in Sauvignon blanc with a conversion yield



**Figure 5.** (A) Standard additions of  $1-d_{10}$  in Sauvignon blanc wine and (B) calculation of conversion yields. (Standard additions of  $1-d_{10}$  were performed in completely fermented Sauvignon blanc samples.)

close to 4.5% (20). Additional investigations showed that a modified yeast strain (overexpression of *Escherichia coli* gene *tna A*) compared to the conventional VIN13 was more efficacious to generate **2** from **7** under model conditions (22).

Compound **5** was first identified in Sauvignon blanc must (15), but its relationship with the corresponding thiol was never investigated. For the first time, we established the direct connection between the two compounds under enological conditions using synthetic and natural musts (Sauvignon blanc in the latter case). For this purpose, a synthetic must and a Sauvignon blanc must were spiked with  $5-d_{10}$  at 4.5 nmol/L and were compared with their corresponding control experiments. The monitoring of  $1-d_{10}$  release in wine was performed to study the direct relationship with the corresponding glutathionylated precursor.

Wines from synthetic and Sauvignon blanc musts were extracted and analyzed according to a well-optimized and published method (33). The formal identification of  $1-d_{10}$  in both synthetic and Sauvignon blanc wines (same retention time and ion ratios as reference compound  $1-d_{10}$ ) proved the direct relationship between compound **5** and the corresponding varietal thiol under enological conditions (Figure 4).

Standard additions of  $1-d_{10}$  were performed in completely fermented Sauvignon blanc samples to estimate the conversion yield of  $5-d_{10}$  into the corresponding varietal thiol (Figure 5A). The initial amount of  $1-d_{10}$  released by the yeast during the alcoholic fermentation corresponded to the absolute value of the  $x$ -intercept for the following relationship:  $\text{area}_{1-d_{10}} = f(\text{conc}_{1-d_{10}})$

with  $\text{area}_{1-d_{10}}$ , which was measured on chromatograms and  $\text{conc}_{1-d_{10}}$ , the concentration of  $1-d_{10}$  spiked in completely fermented samples (Figure 5B). Under our conditions, the conversion yield of  $5-d_{10}$  into the corresponding thiol was close to 0.3%. This value was similar to those reported by Subileau et al. (43) for the conversion yield of the cysteinylated precursor into **1** under equivalent conditions. The use of deuterated precursor probably induced some kinetic isotope effects during the enzymatic conversion of  $5-d_{10}$  into  $1-d_{10}$ . However, compound **5** occurs in grapes at a mean level of about 1  $\mu\text{g/L}$ , whereas **4** is present at 4  $\mu\text{g/L}$  (21). Thus, the conversion of **5** into thiol by yeast could explain about 20% of the total **1** generated in Sauvignon blanc wines. Compound **5** constitutes the second major precursor of **1** in grapes.

#### ABBREVIATIONS USED

ESI, electrospray ionization; NMR, nuclear magnetic resonance; HRMS, high-resolution mass spectrometry; GC-MS, gas chromatography–mass spectrometry; SIM, selected ion monitoring; TFA, trifluoroacetic acid; SIDA, stable isotope dilution assay; rt, retention time; mp, melting point.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank Loïc Licenziato for technical support in organic synthesis and Christian Picou for fermentation experiments. Interloire, IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin), and Sicavac are acknowledged for technical support.

#### LITERATURE CITED

- (1) Cheynier, V.; Schneider, R.; Salmon, J.-M.; Fulcrand, H. Chemistry of wine. In *Comprehensive Natural Products II, Chemistry and Biology*; Mander, L., Lui, H.-W., Eds.; Elsevier: Oxford, U.K., 2010; Vol. 3, pp 1119–1172.
- (2) Darriet, P.; Tominaga, T.; Lavigne, V.; Boidron, J. N.; Dubourdieu, D. Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour Fragrance J.* **1995**, *10*, 385–392.
- (3) Tominaga, T.; Darriet, P.; Dubourdieu, D. Identification of 3-mercaptohexanol acetate, compound having a powerful odor reminiscent of box-tree, involved in the aroma of Sauvignon wines. *Vitis* **1996**, *35*, 207–210.
- (4) Escudero, A.; Gogorza, B.; Melus, M. A.; Ortin, N.; Cacho, J.; Ferreira, V. Characterization of the aroma of a wine from maccabeo. Key role played by compounds with low odor activity values. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (11), 3516–3524.
- (5) Fedrizzi, B.; Versini, G.; Lavagnini, I.; Badocco, D.; Nicolini, G.; Magno, F. Hyphenated gas chromatography–mass spectrometry analysis of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in wine: comparison with results of other sampling procedures via a robust regression. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *621* (1), 38–43.
- (6) Fedrizzi, B.; Versini, G.; Lavagnini, I.; Nicolini, G.; Magno, F. Gas chromatography–mass spectrometry determination of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in wine: a comparison of headspace solid phase microextraction and solid phase extraction methods. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *596* (2), 291–297.
- (7) Schneider, R.; Kotseridis, Y.; Ray, J. L.; Augier, C.; Baumes, R. Quantitative determination of sulfur-containing wine odorants at sub parts per billion levels. 2. Development and application of a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (11), 3243–3248.
- (8) Rapp, A.; Pretorius, P. J. Foreign and undesirable flavours in wine. In *Developments in Food Science. Flavours and Off Flavours*; Charmalambous, G., Ed.; Elsevier Sciences: Amsterdam, The Netherlands, 1990; pp 1–21.
- (9) Mateo-Vivaracho, L.; Cacho, J.; Ferreira, V. Quantitative determination of wine polyfunctional mercaptans at nanogram per liter level by gas chromatography–negative ion mass spectrometric analysis of their pentafluorobenzyl derivatives. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1146* (2), 242–250.

- (10) Guth, H. Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45* (8), 3022–3026.
- (11) Fretz, C. B.; Luisier, J.-L.; Tominaga, T.; Amado, R. 3-Mercaptohexanol: an aroma impact compound of Petite Arvine wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2005**, *56* (4), 407–410.
- (12) Blanchard, L.; Darriet, P.; Dubourdieu, D. Reactivity of 3-Mercaptohexanol in Red Wine: Impact of Oxygen, Phenolic Fractions, and Sulfur Dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* **2004**, *55* (2), 115–120.
- (13) Murat, M. L.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D. Impact of some components on Bordeaux rosé and clarets. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **2001**, *35*, 99–105.
- (14) Tominaga, T.; Baltenweck-Guyot, R.; Gachons, C. P. D.; Dubourdieu, D. Contribution of volatile thiols to the aromas of white wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51* (2), 178–181.
- (15) Fedrizzi, B.; Pardon, K. H.; Sefton, M. A.; Elsey, G. M.; Jeffery, D. W. First identification of 4-*S*-glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a potential precursor of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon blanc juice. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (3), 991–995.
- (16) Peyrot des Gachons, C.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D. Sulfur aroma precursor present in *S*-glutathione conjugate form: identification of *S*-3-(hexan-1-ol)-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4076–4079.
- (17) Darriet, P.; Tominaga, T.; Lavigne, V.; Boidron, J. N.; Dubourdieu, D. Mise en évidence dans le raisin de *Vitis vinifera* J. (var. Sauvignon) d'un précurseur de la 4-méthyl-4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *C. R. Acad. Sci. Paris* **1993**, *316*, 1332–1335.
- (18) Tominaga, T.; Masneuf, I.; Dubourdieu, D. Mise en évidence d'un *S*-conjugué de la cystéine, précurseurs d'arôme du Sauvignon. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **1995**, *29*, 227–232.
- (19) Tominaga, T.; Peyrot des Gachons, C.; Dubourdieu, D. A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc: *S*-cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 5215–5219.
- (20) Roland, A.; Schneider, R.; Le Guernevé, C.; Razungles, A.; Cavelier, F. Identification and quantification by LC-MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chem.* **2010**, *121*, 847–855.
- (21) Roland, A.; Vialaret, J.; Moniatte, M.; Rigou, P.; Razungles, A.; Schneider, R. Validation of a nano liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the identification and the accurate quantification by isotopic dilution of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in white grape juices. *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 1626–1635.
- (22) Grant-Preece, P. A.; Pardon, K. H.; Capone, D. L.; Cordente, A. G.; Sefton, M. A.; Jeffery, D. W.; Elsey, G. M. Synthesis of wine thiol conjugates and labeled analogues: fermentation of the glutathione conjugate of 3-mercaptohexan-1-ol yields the corresponding cysteine conjugate and free thiol. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (3), 1383–1389.
- (23) Hebditch, K. R.; Nicolau, L.; Brimble, M. A. Synthesis of isotopically labelled thiol volatiles and cysteine conjugates for quantification of Sauvignon blanc wine. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2007**, *50*, 237–243.
- (24) Shinkaruk, S.; Thibon, C.; Schmitter, J. M.; Babin, P.; Tominaga, T.; Degueil, M.; Desbat, B.; Jussier, C.; Bennetau, B.; Dubourdieu, D.; Bennetau-Pelissero, C. Surprising structural lability of a cysteine-*S*-conjugate precursor of 4-methyl-4-sulfanylpentan-2-one, a varietal aroma in wine of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *Chem. Biodivers.* **2008**, *5* (5), 793–810.
- (25) Dagan, L. Potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. cv. Petit Manseng et Gros Manseng. Contribution à l'arôme des vins de pays Côtes de Gascogne. Ph.D., Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 2006; p 238.
- (26) Luisier, J.-L.; Buettner, H.; Iker, S.; Rausis, T.; Frey, U. Quantification of cysteine *S*-conjugate of 3-sulfanylhexan-1-ol in must and wine of Petite Arvine vine by stable isotope dilution analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (9), 2883–2887.
- (27) Luisier, J.-L.; Veyrand, J.; Piantini, U. Characterisation and simple synthesis of *S*-[3-hydroxy-1-propylpropyl]-L-cysteine. *Chimia* **2007**, *61* (7), 533–535.
- (28) Subileau, M.; Schneider, R.; Salmon, J.-M.; Degryse, E. New insights on 3-mercaptohexanol (3MH) biogenesis in Sauvignon blanc wines: Cys-3MH and (*E*)-hexen-2-al are not the major precursors. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (19), 9230–9235.
- (29) Pardon, K. H.; Graney, S. D.; Capone, D. L.; Swiegers, J. H.; Sefton, M. A.; Elsey, G. M. Synthesis of the individual diastereomers of the cysteine conjugate of 3-mercaptohexanol (3-MH). *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (10), 3758–3763.
- (30) Kotsieridis, Y.; Ray, J. L.; Augier, C.; Baumes, R. Quantitative determination of sulfur containing wine odorants at sub-ppb levels. 1. Synthesis of the deuterated analogues. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (12), 5819–5823.
- (31) Salmon, J. M.; Barre, P. Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics in enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64* (10), 3831–3837.
- (32) Sablayrolles, J. M.; Barre, P.; Grenier, P. Design of a laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal enological conditions. *Biotechnol. Tech.* **1987**, *1*, 181–184.
- (33) Rodríguez-Bencomo, J. J.; Schneider, R.; Lepoutre, J. P.; Rigou, P. Improved method to quantitatively determine powerful odorant volatile thiols in wine by headspace solid-phase microextraction after derivatization. *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216* (30), 5640–5646.
- (34) Falck, J. R.; Sangras, B.; Capdevila, J. H. Preparation of *N*-<sup>t</sup>Boc L-glutathione dimethyl and di-*tert*-butyl esters: versatile synthetic building blocks. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1062–1066.
- (35) Schmidt, T. J.; Ak, M.; Mrowietz, U. Reactivity of dimethyl fumarate and methylhydrogen fumarate towards glutathione and *N*-acetyl-L-cysteine. Preparation of *S*-substituted thiosuccinic acid esters. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (1), 333–342.
- (36) Williams, S. R.; Lepene, B. S.; Thatcher, C. D.; Long, T. E. Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol)glutathione conjugate self-assembled nanoparticles for antioxidant delivery. *Biomacromolecules* **2008**, *10* (1), 155–161.
- (37) Lo, W.-J.; Chiou, Y.-C.; Hsu, Y.-T.; Lam, W. S.; Chang, M.-Y.; Jao, S.-C.; Li, W.-S. Enzymatic and nonenzymatic synthesis of glutathione conjugates: application to the understanding of a parasite's defense system and alternative to the discovery of potent glutathione *S*-transferase inhibitors. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *18* (1), 109–120.
- (38) Schmidt, T. J.; Lyss, G.; Pahl, H. L.; Merfort, I. Helenanolid type sesquiterpene lactones. Part 5: The role of glutathione addition under physiological conditions. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7* (12), 2849–2855.
- (39) Modica, E.; Zanaletti, R.; Freccero, M.; Mella, M. Alkylation of amino acids and glutathione in water by *o*-quinone methide. Reactivity and selectivity. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (1), 41–52.
- (40) Nishizawa, C.; Takeshita, K.; Ueda, J.; Nakanishi, I.; Suzuki, K. T.; Ozawa, T. Reaction of para-hydroxybenzoic acid esters with singlet oxygen in the presence of glutathione produces glutathione conjugates of hydroquinone, potent inducers of oxidative stress. *Free Radical Res.* **2006**, *40* (3), 233–240.
- (41) Capone, D. L.; Sefton, M. A.; Hayasaka, Y.; Jeffery, D. W. Analysis of precursors to wine odorant 3-mercaptohexan-1-ol using HPLC-MS/MS: resolution and quantitation of diastereomers of 3-*S*-cysteinylhexan-1-ol and 3-*S*-glutathionylhexan-1-ol. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (3), 1390–1395.
- (42) Peyrot des Gachons, C.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D. Localisation of *S*-cysteine conjugates in the berry: effect of skin contact on aromatic potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc must. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53* (2), 144–146.
- (43) Subileau, M. Paramètres influants sur la libération des thiols variétaux par la levure *Saccharomyces cerevisiae*: d'un milieu synthétique à la complexité d'un moût de Sauvignon blanc. Ph.D., Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier, 2008; p 156.

Received for review May 25, 2010. Revised manuscript received August 17, 2010. Accepted August 28, 2010. Interloire, IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin), and Sicovac are acknowledged for financial support (CIFRE fellowship).



# Varietal thiols in wine: Discovery, Synthesis and Applications

Aurélie Roland<sup>1,2</sup>, Rémi Schneider<sup>3\*</sup>, Alain Razungles<sup>2</sup> and Florine Cavelier<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Interloire, 12 rue Etienne Pallu, BP 1921, 37019 Tours Cedex 01, France

<sup>2</sup>UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, INRA, SupAgro, Université Montpellier I, 34060 Montpellier Cedex 01, France

<sup>3</sup>Institut Français de la Vigne et du Vin, at UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, INRA, 34060 Montpellier Cedex 01, France

<sup>4</sup>IBMM, UMR-CNRS 5247, Universités Montpellier I et II, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France

(\*Corresponding authors)

## Contents

### 1. Introduction

### 2. Discovery and occurrence

#### 2.1. Most relevant varietal thiols

#### 2.2. Other qualitative sulfur compounds

#### 2.3. Biogenesis

#### 2.4. Sensory contribution

### 3. Chemical synthesis and analysis

#### 3.1. Thiols synthesis

##### 3.1.1 Chemical strategies

##### 3.1.2 Quantification

#### 3.2. Precursors synthesis

##### 3.2.1. Chemical strategies

##### 3.2.2. Labeled precursors as tools to study relationship with varietal thiols

##### 3.2.3. Quantification

### 4. Applicative aspects of thiols formation in wines

#### 4.1. Viticulture

1 4.2. *Enology*

2 4.2.1. Elaboration of must

3 4.2.2. Yeast and fermentative conditions influence thiol release

4 4.2.3. Ageing

5 **5. Conclusion**

6 **6. Acknowledgments**

7

8 **1. Introduction**

9 Aroma compounds are produced in grapes and/or throughout the wine making process. For a  
10 better understanding, they are classified according to their formation period:

- 11 • Varietal aroma compounds, present in grapes, are themselves subdivided into two  
12 classes, those that are found in a free form, which means volatile and directly  
13 perceptible by the olfactory receptors, or those that are formed during the  
14 biotechnological process of wine making, from specific precursors present in grapes  
15 after one or two cleavages <sup>1</sup>. They are responsible for the varietal specificity of wine  
16 aroma.
- 17 • Pre-fermentation aromas appear between harvest and alcoholic fermentation like C6  
18 compounds, throughout enzymatic reactions occurring when berries are crushed.
- 19 • Fermentation aromas are secondary products of micro-organism metabolism (yeast or  
20 lactic acid bacteria), as ethyl esters and fusel alcohols, and are responsible for the  
21 vinous and fruity olfactive characteristics of the product.
- 22 • Post-fermentation aroma: they are formed during wines ageing and involved chemical  
23 or biochemical conversion of volatile compounds. They are responsible for the  
24 complexity of the bouquet of old wines.

1 Among these compounds, the 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one (4MMP, 1), the 3-  
2 mercaptohexylacetate (3MHA, 2) and the 3-mercaptohexan-1-ol (3MH, 3) have been  
3 identified as key molecules of young wines elaborated with many varieties. These compounds  
4 belong to varietal aroma class since they resulted from the cleavage of odorless precursors in  
5 grapes or musts by yeast during the alcoholic fermentation. The positive contribution of  
6 varietal thiols was firstly pointed out by Du Plessis and Augustyn<sup>2</sup> who demonstrated that the  
7 guava aroma found in South African Sauvignon Blanc wines was mainly due to the  
8 occurrence of 4MMP. In contrast with light sulfur compounds such as carbon sulfide,  
9 ethanethiol, methanethiol and hydrogen sulfide (bp<90°C), which are mostly produced during  
10 the alcoholic fermentation, held to be responsible for olfactory defects and often present at  
11 high concentrations, varietal thiols occurred at very low levels in some *Vitis Vinifera* wines  
12 and exhibited pleasant odors such as blackcurrant bud, passion fruit and grapefruit (Table 1).  
13 Others non-varietal sulfur compounds can positively contribute to the wine aroma through  
14 coffee and meaty notes (Table 1).

15 For twenty years ago, the interest for varietal thiols involvement in young wines has  
16 considerably grown, especially for wine industry. Most literature dealing with varietal thiols  
17 in wine are focused on the aforementioned compounds and demonstrate the central role  
18 played by the different branches of chemistry in the understanding and control of  
19 biotechnological processes responsible for the release of these powerful odoriferous  
20 compounds. This review will intend to describe the synthetic routes and their contribution to  
21 the biochemical transformation studies occurring during winemaking and their regulation. The  
22 analytical procedures developed in several papers will be also discussed as they contribute to  
23 the general knowledge of the enological and viticultural aspects impacting thiols levels in  
24 wines.

1 In accordance with new rules for the international nomenclature of chemical compounds, the  
2 prefix “sulfanyl” must normally replace the prefix “mercapto” but, it was not changed in this  
3 review to conserve the more familiar nomenclature of the varietal thiols.

## 4 **2. Discovery, occurrence, biogenesis and sensory role**

5 Volatile varietal thiols such as 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one (4MMP), 3-mercaptohexan-  
6 1-ol (3MH) and its acetate (3MHA) contribute positively to the fruity notes of young wines at  
7 very low concentrations close to ppt levels. Their biogenesis during wine making involved  
8 lots of investigations in the past twenty years to better understand and manage the quality of  
9 wine by developing several analytical tools and chemical synthesis strategies.

### 10 **2.1 Most relevant varietal thiols**

11 The importance of sulfur compounds in wine aroma was highlighted by Du Plessis and  
12 Augustyn (1981). Indeed, they demonstrated the similarity between a neutral wine fortified  
13 with synthetic 4MMP and Chenin Blanc or Colombard wines exhibiting a strong guava like  
14 aroma <sup>2</sup>. In addition, wine treatment with copper sulfate decreased this guava aroma in  
15 aromatic wines, which enhanced the presumption of the contribution of this thiol compound  
16 to the specific aroma of such wines.

17 The 4MMP was formally identified in Sauvignon Blanc <sup>3</sup>, and further in Scheurebe <sup>4</sup>,  
18 Maccabeo <sup>5</sup>, Gewürztraminer, Riesling, Muscat, Colombard, Petit Manseng and Tokay wines  
19 <sup>6</sup>.

20 The 3MH and the 3MHA are more ubiquitous than 4MMP since they were identified in a  
21 wide range of varietal wines such as Sauvignon Blanc <sup>7</sup>, Petite Arvine <sup>8</sup>, Petit and Gros  
22 Manseng <sup>6b,9</sup>, Melon B. and Bacchus <sup>10</sup>, Semillon <sup>6b</sup>, Verdejo <sup>11</sup>, Koshu <sup>12</sup> but also in red

1 grapes such as Grenache <sup>13</sup>, Merlot and Cabernet Sauvignon <sup>14</sup> and Rosé wines from Provence  
2 <sup>15</sup>.

## 3 **2.2 Other qualitative sulfur compounds**

4 Others sulfur compounds contribute qualitatively to the aroma of wine. The 2-  
5 mercaptoethylacetate (**8**) and the 3-mercaptopropylacetate (**9**), reminiscent of toasted and  
6 roasted meat-like nuances, have been identified in white wines such as Semillon and  
7 Sauvignon Blanc <sup>16</sup>. In the same time, the 3-mercapto-2-methylpropanol (**10**), identified in red  
8 Bordeaux wines made from Cabernet Sauvignon and Merlot, give broth and sweat odors for  
9 concentrations ranging from 25 to 10000 ng/L in wine <sup>14b</sup>. Furanthiol derivatives such as the  
10 2-furanmethanethiol (**11**) brings a strong roast coffee aroma to Petit Manseng and red  
11 Bordeaux wines made from Merlot, Cabernet Franc and Cabernet Sauvignon <sup>17</sup> when those  
12 are fermented or aged in oak barrels, as furfural extracted from oak is required for their  
13 biogenesis <sup>18</sup>. Other mercaptans such as the ethyl-3-mercaptopropionate (**12**) and the  
14 benzenemethanethiol (**13**) have been identified in aged Champagne wines and seem to be  
15 responsible for empyreumatic notes with very low perception thresholds <sup>19</sup>. The biogenesis  
16 formation of this latter compound has never been formally established but an addition of  
17 hydrogen sulfide on benzaldehyde could be supposed <sup>19b</sup>, as the mechanism of  
18 furanmethanethiol formation from furfural <sup>18</sup>.

## 19 **2.3 Biogenesis**

20 The 4MMP, 3MH and 3MHA are powerful odoriferous thiols and constitute varietal aroma  
21 since they are released during the alcoholic fermentation from odorless precursors occurring  
22 in grapes and musts <sup>20</sup> (Figure 1).

1 Three biogenesis pathways are commonly accepted to explain the release of 4MMP, 3MH and  
2 3MHA in wine. The first one involves the cysteinylated precursors which were initially  
3 identified in Sauvignon Blanc grapes <sup>21</sup>, then in Merlot and Cabernet Sauvignon <sup>14a</sup>, in  
4 Semillon <sup>22</sup>, in Petit and Gros Manseng <sup>9</sup>, in Riesling, Melon B. and Gewürztraminer <sup>23</sup> and  
5 Koshu <sup>12</sup> especially for the Cys3MH. These *S*-cysteine conjugates are cleaved by the yeast,  
6 through its beta-lyase activity <sup>21b</sup>, during the alcoholic fermentation. The *S*-3-(hexan-1-ol)-  
7 cysteine (Cys3MH) is more ubiquitous and abundant in grapes than the *S*-3-(4-mercapto-4-  
8 methylpentan-2-one)-cysteine (Cys4MMP) <sup>14a,24</sup>. Those *S*-cysteinylated precursors occur  
9 widely in plants, as reported by Starkenmann <sup>25</sup> and could constitute a powerful source of  
10 aroma for industry.

11 The distribution of Cys3MH diastereomers is significantly different according to the grape  
12 variety but the (*S*)-Cys3MH is always the most abundant compound <sup>26</sup>. Diastereomeric  
13 distribution of the Cys3MH ranged from 44/56 % to 48/52 % and from 29/71 % to 35/65%  
14 for (*RR*)-Cys3MH and (*RS*)-Cys3MH diastereomers in healthy and botrytized Semillon and  
15 Sauvignon Blanc musts respectively <sup>27</sup>. The differences in the enantiomeric distribution  
16 observed in wines from healthy or botrytized grapes could have an importance in a sensorial  
17 aspect, especially for 3MHA (see 2.4).

18 The second pathway concerns the glutathionylated precursors: the *S*-3-(hexan-1-ol)-  
19 glutathione (G3MH) identified in grapes of Sauvignon Blanc <sup>28</sup>, Melon B. <sup>24a</sup>, Riesling <sup>23</sup>,  
20 Gewürztraminer <sup>23</sup>, Chardonnay <sup>26</sup>, Pinot Grigio <sup>29</sup> and Koshu <sup>12</sup> then the *S*-3-(4-mercapto-4-  
21 methylpentan-2-one)-glutathione (G4MMP), occurring in Sauvignon Blanc <sup>30</sup>, Riesling <sup>24a</sup>  
22 and Gewürztraminer <sup>24a</sup>. The mechanism of thiol release from glutathionylated precursors was  
23 only investigated for the G3MH. Indeed, the percolation of a Sauvignon Blanc or a Gros  
24 Manseng must through an immobilized  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase column resulted in the  
25 increase of the Cys3MH, suggesting that the G3MH could be a pro-precursor <sup>28</sup>. Recently,

1 model <sup>12,31</sup> or Sauvignon Blanc <sup>23</sup> musts were spiked with synthetic G3MH and then  
2 fermented with VIN13 or VL3 as yeast strains. The release of the 3MH in the resulting wine  
3 demonstrated that G3MH constituted another precursor of the 3MH. Similar outcome was  
4 observed for G4MMP in experiments on Sauvignon Blanc must <sup>32</sup>.

5 Glutathionylated precursors occurred at lower levels in grapes than cysteinylated precursors  
6 <sup>24a</sup> except for Australian grape juices <sup>29</sup>. G3MH is more abundant than G4MMP in grapes,  
7 which is coherent with similar abundance of the corresponding thiols in wines. G3MH  
8 concentration ranged from 0.2 to 7.3 µg/L in several grapes varieties from France such as  
9 Sauvignon Blanc, Melon B., Riesling and Gewürztraminer <sup>24a</sup> whereas the concentration  
10 reached 1250 to 2770 µg/L for Sauvignon Blanc, Chardonnay, Riesling and Pinot Grigio from  
11 Australia <sup>29</sup>. This difference of precursor concentration between Australian and French grapes  
12 is surprising since the grapes belong to the same *Vitis vinifera* variety.

13 G4MMP levels were considerably lower in Sauvignon Blanc, Riesling and Gewürztraminer  
14 grapes ranging from 0.03 to 4.3 µg/L.

15 Diastereomers distribution of G3MH is different according to the grape variety but the most  
16 abundant compound is always the (S)-G3MH, referring to the absolute configuration of  
17 asymmetric carbon bounded with cysteine residue <sup>29</sup>.

18 The enzymatic cleavage of the Cys3MH does not seem stereoselective since the enantiomeric  
19 distribution of 3MH, which is close to a racemic mixture in wine made from healthy grapes, is  
20 in coherence with the diastereomer proportion of precursor in berries. Nevertheless, this  
21 observation have to take into account the fact that the diastereomer distribution of G3MH is  
22 highly in favor of the (S)-G3MH, which can modulate the enantiomeric proportion of thiols in  
23 wine.

1 Finally, the third biogenesis pathway involved the C<sub>6</sub> unsaturated compounds as (E)-2-  
2 hexenal which undergo a sulfur addition during the alcoholic fermentation<sup>33</sup>. Up to now, the  
3 sulfur donor has never been identified but it could be H<sub>2</sub>S, cysteine, glutathione or other  
4 molecules having an available free thiol function in must.

## 5 **2.4 Sensory contribution**

6 Varietal thiols, such as the 4MMP, the 3MH and the 3MHA, contribute to the typicality of  
7 young white wines as Sauvignon Blanc. Their perception thresholds are often very low in the  
8 range of ng/L<sup>6b</sup>. Although they occurred at traces level, their concentrations are always  
9 superior to their perception thresholds, bringing much appreciated fruity notes in wines.

10 The 4MMP, reminiscent of box tree and blackcurrant bud<sup>3</sup> exhibits concentrations often  
11 inferior to 70 ng/L, except for Scheurebe wines with concentrations close to 400 µg/L<sup>4</sup> for a  
12 perception threshold equal to 0.8 ng/L in hydroalcoholic solution<sup>6b</sup>. The level of 400 µg/L for  
13 the 4MMP in Scheurebe seems particularly high. The levels reported for the other compounds  
14 in the same wine lead us to think that the real concentration of 4MMP is 400 ng/L as  
15 mentioned in several books dealing with enology<sup>6a,20</sup>. The 3MH and 3MHA, more abundant  
16 than 4MMP, give the so researched fruity notes in white or rosé wines as passion fruit and  
17 grapefruit<sup>6b,13,34</sup> for perception thresholds close to 60 and 4.2 ng/L respectively<sup>6b</sup>. It can be  
18 noticed that the 3MH is responsible for blackcurrant odors in red wines<sup>35</sup>.

19 Each enantiomeric form of 3MH and 3MHA exhibited different abundance in wines,  
20 perception thresholds and olfactory perceptions. For healthy Sauvignon Blanc and Semillon  
21 grapes, 3MH occurred as a racemic mixture whereas the R/S ratio was close to 30/70 for  
22 3MHA<sup>36</sup>. In case of botrytized grapes, enantiomeric ratio for 3MH varied from 50/50 to  
23 30/70 for R/S forms respectively<sup>6a,36</sup>. During alcoholic fermentation, only the enantiomeric  
24 ratio of 3MH varied from 40/60 for (R)/(S) forms at the beginning of the process to 50/50 in



1 finished wines. Each enantiomer of 3MH and 3MHA exhibited different perception thresholds  
2 and smelling. Indeed, the R and S form of 3MH are reminiscent of grapefruit and passion fruit  
3 for very similar perception thresholds: 50 and 60 ng/L in hydroalcoholic solution respectively.  
4 The R form of 3MHA smells passion fruit whereas the S form is more herbaceous with a  
5 characteristic odor of boxwood for perception thresholds ranging from 9 to 2.5 ng/L in  
6 hydroalcoholic medium <sup>36</sup>.

7 Gas-Chromatography hyphenated with Olfactometry (GC-O) constitutes the best way to  
8 screen the odor active molecules in the wine aroma. This technique uses the human nose as  
9 detector for compounds eluting out of the GC column. First experiments conducted on  
10 Sauvignon Blanc extracts analyzed by GC-O revealed a specific odor zone on chromatogram,  
11 reminiscent of blackcurrant bud <sup>3a</sup> which was later identified as the 4MMP contribution.  
12 However, olfactometry does not take into account the antagonist and synergic effects between  
13 volatiles in a complex matrix such as wine (aroma enhancers or depressors).

14 In parallel to olfactometry measurements, the comparison between the concentration of a  
15 specific volatile and its perception thresholds can help to the determination of most active  
16 odorants in wine. Using the Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA), the 4MMP was  
17 identified as the major olfactory contributor to Scheurebe wines <sup>37</sup>. Based on the same  
18 approach, Sauterne wines exhibited very strong bacon-petroleum odor due to the 3-methyl-3-  
19 mercaptobutanal and 2-methylfuran-3-thiol and others polyfunctionnal thiols such as the 3-  
20 methylbut-2-ene-1-thiol, the 3-mercaptopropyl acetate, the 3-mercaptohexan-1-ol, and the 3-  
21 mercaptoheptanal contributing to the global aroma <sup>38</sup>. In support of qualitative determination,  
22 quantitative aspects as the calculation of Odor Active Values (OAV defined by the  
23 concentration to perception threshold ratio) were applied for the identification of impact  
24 odorants in Spanish wines <sup>5,39</sup>. Both 4MMP, 3MH and 3MHA most influenced the global

1 aroma of aged red wines <sup>39a</sup> whereas the 3MHA constituted the only most active odorant in  
2 the Marmajuelo and Verdello wines <sup>39b</sup>.

3 Finally, odor reconstitution experiments represent the best approach to measure quantitatively  
4 the contribution of the matrix to the wine aroma. A global strategy composed by qualitative  
5 and quantitative determination of impact odorants followed by omission tests with synthetic  
6 aroma models demonstrated that the 3MH was the most important odorant in Grenache rosé  
7 wines <sup>13</sup>. Sensorial analyses and quantitative chemical analysis are often carried out in parallel  
8 to characterize odoriferous molecules in wines. Recently, sensorial analysis of Sauvignon  
9 Blanc from New-Zealand showed that 3MH and 3MHA can be used to predict the tropical  
10 character of wines with good correlation with their respective sensory attributes <sup>40</sup>. Ferreira et  
11 al. (2002) and Masson and Schneider (2009) used reconstitution of dearomatized wines to  
12 estimate the contribution of 15 volatiles on perception and in particular the implication of  
13 varietal thiols such as the 3MH and its acetate as the key aromas in Rosé wines <sup>15</sup>.

### 14 **3. Chemical synthesis and analysis**

15 Varietal thiols and their precursors occurred at traces level in complex matrices as wine or  
16 grape must and required the use of very sensitive and accurate analytical methods to be  
17 quantified such as Stable Isotope Dilution Assay (SIDA). In addition, relationship studies to  
18 elucidate the biogenesis of these odoriferous molecules involved labeled molecules to be used  
19 as powerful tracers during alcoholic fermentation. Consequently, several chemical syntheses  
20 of thiols and their precursors either in natural or deuterated forms have been developed for  
21 the past twenty years.

#### 22 **3.1. Thiols synthesis**

23 Retro-synthetic routes for varietal thiols can be easily summarized by a Michael addition of a  
24 sulfur donor on  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones, aldehydes or esters. The 3MH and the 4MMP can be

1 synthesized by the addition of a sulfur nucleophile on (*E*)-2-hexenal or mesityl oxide (Figure  
2 2). Deuteration of such molecules requires the introduction of deuterium atom in a non-  
3 enolisable position to get stable compounds under acidic or basic conditions. This condition  
4 warrants the reliability of quantification methods by mass spectrometry using these molecules  
5 as internal standards. Labeling can be performed either by using deuterated starting material  
6 such as commercially available [<sup>2</sup>H<sub>10</sub>]-mesityl oxide or by introducing deuterium atoms  
7 through a chemical reaction as reduction.

### 8 **3.1.1. Chemical strategies**

9 Syntheses of natural and deuterated analogues of 4MMP, 3MH and 3MHA were initially  
10 reported in the literature<sup>41</sup> to develop a quantification method by SIDA-GC-ITMS/MS<sup>10</sup>. To  
11 be efficiently separated by mass spectrometry, such labeled molecule required at least a shift  
12 of the mass equal to 2 Da in their molecular weight otherwise, the contribution of <sup>13</sup>C could  
13 interfere in the results. Kotseridis and co-workers (2000) obtained in good yields and purities  
14 the [<sup>2</sup>H<sub>10</sub>]-4MMP (Figure 3), the [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3MH (Figure 4) and the [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-3MHA (Figure 4) using  
15 Michael addition of triphenylsilanethiol on either [<sup>2</sup>H<sub>10</sub>]-mesityl oxide or (*E*)-hex-2-enoate.

16 Other syntheses have been developed to afford these thiols by improving original strategies.  
17 Vermeulen and co-workers (2000) reported combinatorial synthesis to obtain easily  
18 polyfunctionnal thiols including 3MHA (Figure 5). Based on a Michael addition of thioacetic  
19 acid on  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones or aldehydes then reduction by aluminium hydride and  
20 methyl-esterification using acetyl chloride, they synthesized 21 different mercapto esters<sup>42</sup>.  
21 This strategy seems to be powerful to asses an important number of mercaptans in a single  
22 experiment. Nevertheless, the separation of each molecule from the global mixture, to be used  
23 as internal standards or biosynthetic markers, remains problematical. Those authors reported  
24 also the synthesis of 4MMP using piperidine and hydrogen sulfide<sup>43</sup>.

1 More recently, deuterated versions of 3MH and 3MHA have been synthesized using a Wittig  
2 olefination of butyraldehyde then a Michael addition of thioacetic acid on the resulting  $\alpha,\beta$ -  
3 unsaturated ester followed by a reduction step with aluminium deuteride to introduce two  
4 deuterium atoms<sup>44</sup>. The methyl-esterification with acetyl chloride of the [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3MH afforded  
5 the corresponding [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3MHA. Hebditch and co-workers also synthesized the [<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-  
6 4MMPOH. Such labeling did not provide a sufficient molecular weight shift in mass  
7 spectrometry to be separated efficiently preventing this molecule to be used as internal  
8 standard for the quantification of the natural compound in wine.

9 The first enantioselective synthesis of 3MH was performed by an asymmetric epoxydation of  
10 (*E*)-2-hexenol under Sharpless conditions using diethyl L-(+) and D-(-)-tartrate and following  
11 the procedure of Pickenhagen and Brönner-Schindler<sup>45</sup>. Treatment of epoxydes with thiourea  
12 gave the corresponding thiiranes with inversion of the absolute configuration. Reduction with  
13 Vitride<sup>®</sup> (sodium bis(2-methoxyethoxy)aluminium hydride) in THF afforded both  
14 enantiomers of 3MH (Figure 6). An alternative synthetic approach was developed to obtain  
15 the (R)-3MH (3b)<sup>46</sup> in better yield than Pickenhagen's synthesis (8.5% for the total  
16 enantioselective synthesis). For this purpose, the (*E*)-2-hexenal underwent an asymmetric  
17 conjugated addition of benzylthiol in presence of substituted pyrrolidine as organocatalyst,  
18 then a cleavage of the sulfide moiety afforded the expected pure product with a high  
19 enantiomeric excess (84%) and better yield (32%) (Figure 7).

20 Each enantiomer of 3MH and 3MHA has been synthesized in its natural form following an  
21 enantiopure strategy<sup>47</sup> inspired from the enantioselective synthesis of the 1-methoxyhexane-  
22 3-thiol<sup>48</sup>. Indeed, the ethyl-3-oxo-hexenoate was selectively reduced by the Baker's yeast to  
23 afford the corresponding alcohol in its (R) absolute configuration, which underwent  
24 Mitsunobu reactions to give both enantiomers of 3MH and 3MHA (Figure 8). These

1 enantiomerically pure molecules can be used as powerful internal standards for analytical  
2 methods.

### 3 **3.1.2. Quantification**

4 Quantification of varietal thiols at traces level in wine required optimized sample preparation  
5 and sensitive analytical methods. Several analytical approaches combining either selective  
6 isolation or pre-concentration steps allowed reaching sub-ppb concentration sensitivity. In  
7 addition, such molecules presenting a free thiol function are highly reactive and can be  
8 oxidized into their corresponding disulfides at the pH of wine or can react with polyphenols  
9 <sup>49</sup>. Consequently, analytical methods should overcome these difficulties by using labeled  
10 internal standards.

11 Tominaga and co-workers reported the first sample preparation allowing the selective  
12 extraction of thiols from a dichloromethane extract of wine using a reversible interaction  
13 between SH function and *p*-hydroxymercuribenzoate <sup>50</sup>. Analysis of these extracts by GC-MS  
14 enabled the quantification of 3MH, 3MHA, 4MMP, 4MMPOH (**4**) and the 3-mercapto-3-  
15 methylbutan-1-ol in Sauvignon Blanc wines from Bordeaux and Sancerre with a good  
16 repeatability (CV<10% for all compounds). However, This methodology present two major  
17 drawbacks: the detection and quantification of the 4MMP is based only on one fragment  
18 which might not provide a satisfactory specificity, and the basic conditions used for the  
19 extraction of *p*-HMB complexes on the cationic resin could degrade the 3MHA into 3MH.

20 A similar method, based on a liquid-liquid extraction then on a specific trapping of thiols on  
21 Affigel 501 (a cross-linked agarose gel with phenylmercuric gel) enabled the quantification of  
22 4MMP, 3MH and 3MHA by GC-MS with limits of detection below their respective  
23 perception thresholds <sup>10</sup>. For the first time, the use of labeled 3MH, 3MHA and 4MMP as  
24 internal standards overcame oxidation problems due to the similar reactivity of thiol function

1 from natural and labeled molecules in wine <sup>10</sup>. Recently, the removing of fatty acids and  
2 divers interfering compounds by mean of bed packed with LichrolutEN Resins improved the  
3 selectivity and the sensitivity of mercaptans (2-furanmethanthiol, 4MMP, 3MH and 3MHA)  
4 analysis based on a *p*-hydroxymercuribenzoate extraction <sup>51</sup>. In addition, the possibility of  
5 fixing some organo-mercury salt using SPE material has considerably simplified the thiol  
6 extraction from wine especially for 3MH and its acetate <sup>52</sup>.

7 Other sample preparation approaches focused on pre-concentration steps in order to limit the  
8 use of huge quantity of organic solvents and to minimize the volume of wine (up to now close  
9 to 500 mL). A direct quantification method by purge and trap then GC-EIMS allowed the  
10 quantification of 3MH and 3MHA in wines with limits of detection in the vicinity of their  
11 perception thresholds <sup>53</sup>. This technique constitutes an improvement of previously reported  
12 methods by eradicating the liquid-liquid extraction step.

13 In order to enhance the detection and the stability of thiols, derivatisation procedures can be  
14 envisaged as powerful methods. Several derivatisating reagents such as the  
15 pentafluorobenzylbromide (PFBBBr) provided the total conversion of 3MHA and 2-methyl-  
16 furanthiol into the corresponding derivatives <sup>54</sup>, warranting their quantification with  
17 satisfactory repeatability by SPME-GC-NCI-MS. The “on-fibre derivatisation” procedure was  
18 highly innovative and allowed the total automation of the method. Several improvements of  
19 the original method <sup>54</sup> have been performed to apply this derivatisation procedure to others  
20 polyfunctional thiols occurring in wine with limits of detection highly inferior to the  
21 perception thresholds: optimization of derivatisation reaction conditions <sup>55</sup>, development of  
22 *in-situ* SPE derivatisation procedure <sup>56</sup> and decrease of matrix effect using SIDA <sup>57</sup>.

1 Using established chromatographic conditions <sup>50</sup>, the enantiomeric ratio of 3MH and 3MHA  
2 has been measured in wine. For this purpose, each enantiomer was separated on a Lipodex  
3 chiral column composed of heptakis-(2,3,6-tri-O-pentyl)- $\alpha$ -cyclodextrines.

### 4 **3.2. Precursors synthesis**

5 As for the thiols synthesis, cysteinylated and glutathionylated precursors have been obtained  
6 in their natural or deuterated forms by mean of Michael addition of cysteine or free  
7 glutathione on  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones, aldehydes or esters such as mesityl oxide or (*E*)-2-  
8 hexenal derivatives. Synthesis of such labeled molecules provided very useful analytical  
9 standards for the development of quantitative method based on SIDA.

10 In addition, to be used as powerful tracers for relationship studies, the labeling of these  
11 molecules should be introduced on aroma moiety of the precursor. Indeed, the yeast is able to  
12 cleave these aroma precursors to release the corresponding labeled thiols in wine. The formal  
13 identification of these labeled thiols in wine proved the relationships with theirs precursors  
14 unequivocally.

#### 15 **3.2.1. Chemical strategies**

16 The first reported syntheses of thiol precursors concerned the Cys3MH, the Cys4MMP and  
17 the Cys4MMPOH. They were based on the Michael addition of L-cysteine hydrochloride on  
18 either (*E*)-2-hexenal or mesityl oxide to afford the pure precursors after reduction with sodium  
19 borohydride for Cys3MH and Cys4MMPOH <sup>21b</sup>.

20 The Cys3MH formation via Michael addition of cysteine chloride on (*E*)-2-hexenal was pH  
21 dependant <sup>58</sup>. Indeed, major differences between acidic and basic conditions were observed  
22 after the reduction step with sodium borohydride: at pH 1, two compounds were isolated  
23 (mono and double adduct) whereas at pH 8, only the thiazepane was formed (Figure 9). The

1 influence of pH was not measured in Tominaga's synthesis for cysteinylated precursors,  
2 which could involve the production of by-products.

3 The [1,1'-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Cys4MMP was synthesized using a similar strategy as previously described  
4 with the [<sup>2</sup>H<sub>10</sub>]-mesityl oxide as pure starting material <sup>44</sup>. Different labeling strategies were  
5 reported for the synthesis of Cys3MH. Indeed, the number of deuterium atom introduced on  
6 (*E*)-2-hexenal can be easily modified from 2 to 8 as already reported in the literature <sup>23,33,59</sup>.  
7 The deuteration of hexyn-1-ol provided the [2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-(*Z*)-2-hexenol selectively, which  
8 afforded the [2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-2-hexenal after oxidation with manganese dioxide <sup>23</sup>. Another approach  
9 allowed the obtention of [<sup>2</sup>H<sub>8</sub>]-2-hexenal from the [<sup>2</sup>H<sub>10</sub>]-butanol, which was firstly oxidized  
10 through a Dess-Martin reaction and then elongated *via* a Wittig reaction <sup>33</sup>. These molecules  
11 of 2-hexenal-d<sub>2</sub> or d<sub>8</sub> are useful for the synthesis of deuterated Cys3MH.

12 One strategy adapted from Luisier *et al.* synthesis <sup>60</sup>, referred to the labeling of cysteine residu  
13 instead of aroma moiety in the Cys3MH molecule using [3,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-DL-cysteine as starting  
14 material <sup>61</sup>. If this compounds can be used as internal standard for Cys3MH quantification, its  
15 use in biogenesis experiments is not convenient as it may no doubt that yeast will use cysteine  
16 moiety as nitrogen source.

17 Most syntheses of Cys3MH are reported as racemic mixtures since both diastereomers of this  
18 precursor occur in grapes and musts. However, the separation of each Cys3MH diastereomer  
19 on silica gel from a racemic mixture was reported in the literature in order to investigate the  
20 diastereoselectivity of yeast cleavage responsible for the thiols release <sup>62</sup>.

21 Syntheses of glutathionylated precursors have been reported more recently in the literature.  
22 Indeed, the G3MH was firstly synthesized in natural form by adding reduced glutathione on  
23 (*E*)-2-hexenal to obtain the racemic expected product in mixture with glutathione <sup>28</sup>. Several  
24 improvements of this original synthesis have contributed to decrease the amount of free



1 glutathione in the final mixture with G3MH<sup>23,31</sup>. These approaches are based on the strategy  
2 proposed by Falck *et al.*, giving synthetic building blocks of glutathione<sup>63</sup>. Natural and  
3 labeled G3MH were synthesized using an acid-labile protecting groups strategy and  
4 deuterated [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-(*E*)-2-hexenal<sup>23</sup> (Figure 10). The (R) diastereomer of G3MH was separated  
5 from the racemic mixture of the same synthesis (Figure 11), providing pure analytical  
6 standards used for relationship studies<sup>31</sup> and analytical development<sup>26</sup>.

7 The G4MMP synthesis required the Michael addition of glutathione on mesityl oxide to give  
8 the natural compound<sup>30</sup>. A similar synthesis with deuterated mesityl oxide as starting material  
9 afforded the deuterated analogue<sup>31</sup>. Easier to perform than the G3MH synthesis, the obtention  
10 of G4MMP can be carried out by non-specialist chemists.

### 11 **3.2.2. Relationship studies using labeled precursors**

12 Up to now, only 10-15% of the total 3MH in wine has been proved to result from both  
13 cysteinylated precursor and hexenal pathway. Depending on the must composition and on the  
14 wine making, this range can drastically vary.

15 Because varietal thiols resulted from different biogenetic pathways, the measurement of  
16 conversion yields from each precursor can only be based on deuterated markers. This  
17 technique present another advantage since experiments can be performed in real grape must,  
18 and then take into account the impact of must composition on yeast ability to convert  
19 precursors into thiols (see 4.2.2).

20 The first pathways elucidated with this technique was the hexenal pathway, contributing to  
21 the production of 3MH, formally proved by adding [<sup>2</sup>H<sub>8</sub>]-hexenal to a Melon B. must<sup>33</sup>. The  
22 release of [<sup>2</sup>H<sub>8</sub>]-3MH in the corresponding wine demonstrated that (*E*)-2-hexenal constituted  
23 an additional pathway for the 3MH production. This pathway contributed to 10% of the total  
24 3MH released in the Melon B. wine. The same technique was also used to establish the

1 4MMP formation from mesityl oxide (using [ $^2\text{H}_{10}$ ]-mesityl oxide), but as mentioned by the  
2 authors, this eventual precursors has not be yet identified in grapes or musts.

3 Subileau and co-workers (2008) measured the conversion yield of [ $^2\text{H}_8$ ]-Cys3MH into [ $^2\text{H}_8$ ]-  
4 3MH in a Sauvignon Blanc must from two different origins (Gers and Languedoc) using two  
5 different yeast strains. Whatever the must origin and the kind of yeast, molar conversion yield  
6 were always below 1% (Table 2), explaining only between 3 and 7% of the total 3MH in  
7 resulting wines.

8 Using the same strategy, the [ $^2\text{H}_{2,3}$ ]-G3MH was added to a Sauvignon Blanc must to  
9 investigate other biogenesis origins that could explain the total production of 3MH in wine <sup>23</sup>.

10 The identification of [ $^2\text{H}_{2,3}$ ]-3MH in the resulting Sauvignon Blanc wine showed the direct  
11 connection between G3MH and 3MH under enological conditions. The conversion rate of  
12 G3MH into 3MH was estimated close to 4.5%, whatever the initial amount of [ $^2\text{H}_{2,3}$ ]-G3MH  
13 spiked in the must (Table 2). Similar experiments demonstrated the direct relationship  
14 between G4MMP and 4MMP using a Sauvignon Blanc must initially spiked with [ $^2\text{H}_{10}$ ]-  
15 G4MMP <sup>32</sup>. The conversion yield equal to 0.3% explained 20% of the total 4MMP release.

16 The levels of the three different precursors reported in the literature and the mean conversion  
17 yields experimentally determined cannot explain the total amount of thiols present in wines.  
18 This observation points out the eventual presence in must of other precursors, especially  
19 derivatives of the precursors already identified (aldehyde or cyclic forms). But, modulation of  
20 the conversion yield by the nitrogen composition cannot be excluded (see 4.2).

### 21 **3.2.3. Quantification**

22 The very low quantities (ppb levels) in grapes of cysteinylated and glutathionylated  
23 precursors required not only appropriate sample preparation (extraction and purification) but  
24 also sensitive analytical methods. The development of quantification methods were initially

1 based on indirect procedures such as the cleavage of the precursors into their corresponding  
2 thiols or the derivatisation of these molecules.

3 The first quantification method for cysteinylated precursors was based on the specific  
4 cleavage of *S*-conjugate molecules into the corresponding thiols by percolating grape musts  
5 through a column containing an immobilized tryptophanase enzyme (EC 4.1.99.1) <sup>24b</sup>. The  
6 released volatile thiols were quantified by isotopic dilution using the separation and the  
7 detection methods previously described by Tominaga and co-workers <sup>50</sup>. Satisfactory  
8 sensitivity and repeatability were reported in spite of using internal standards containing only  
9 one deuterium atom on exchangeable position.

10 Several derivatisation procedures have been developed to enhance the volatility and to  
11 decrease the thermal degradation of cysteinylated precursors, so that they can be analyzed by  
12 gas-chromatography. Trimethylsilation of Cys3MH, Cys4MMP and Cys4MMPOH using a  
13 mix of bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA), trimethylchlorosilane (TMCS) and  
14 pyridine (3/1/3) afforded stable derivatives (Figure 12), easily analyzable by GC-MS <sup>21b</sup>. For  
15 the Cys3MH, this procedure was improved to measure its influence on the aromatic potential  
16 of Merlot and Cabernet-Sauvignon <sup>14a</sup>. In the original method, the Cys3MH was derivatized  
17 from purified samples of CESFP (crude extracts containing sulfur flavor precursors) <sup>21b</sup>.  
18 Presently, the Cys3MH was purified, from a very small volume of must (500  $\mu$ L), by affinity  
19 chromatography (Chelating Sepharose 4B column) and then derivatized using a mix of  
20 BSTFA/TMCS/pyridine <sup>14a</sup>. The use of [<sup>15</sup>N]-Cys3MH as internal standard warranted more  
21 reliability of the quantification results <sup>14a</sup>.

22 An other approach was reported for the derivatisation of the Cys3MH and the Cys4MMP  
23 using ethylchloroformate (ECF) and pyridine <sup>9</sup>, adapted from an original method allowing the  
24 derivatisation of aminoacids derivatives <sup>64</sup>. The trimethylsilylated derivatives of Cys4MMP  
25 are subjected to cyclization in the corresponding enamine under basic conditions. The

1 derivatisation with ECF provided the cyclic and stable derivative of Cys4MMP, bringing  
2 more repeatability for its quantification (Figure 13).

3 More recently, the derivatisation of the Cys3MH through a perfluoro-acylation reaction  
4 allowed the separation of both diastereomers on a BPX35 capillary column and their  
5 quantitative analysis by GC-ITMS/MS<sup>27</sup>. The derivatisation used a mix of heptafluorobutyric  
6 anhydride (HFBA) and heptafluorobutanol (HFOH) (Figure 14).

7 Direct analytical methods have been later developed for the quantification of the Cys3MH<sup>61</sup>  
8 and then both cysteinylated and glutathionylated precursors<sup>24a,26</sup>. Presently, these methods  
9 used liquid-chromatography instead of gas-chromatography, which is more suitable for these  
10 non-volatile molecules.

11 The Cys3MH was quantified in Petite Arvine must and wine by SIDA-HLPC-MS<sup>61</sup>. The  
12 cysteinylated precursor was extracted from must or wine using SPE (Supelclean Envi-18) and  
13 then separated on a reverse phase Nucleosil column and detected in negative ionization mode  
14 (APCI) by mass spectrometry. With limits of detection close to 3 µg/L, this analytical method  
15 is very convenient to quantify the Cys3MH at traces level in must and wine.

16 Both cysteinylated and glutathionylated precursors of 3MH and 4MMP have been firstly  
17 quantified in Sauvignon Blanc, Melon B., Gewürztraminer and Riesling musts by SIDA-LC-  
18 MS/MS<sup>24a</sup>. Using a minimal volume of must, precursors were extracted using cation-  
19 exchange resin (DOWEX) and then purified by SPE (Sep-Pak) on a reverse phase C18. The  
20 detection was performed in Multiple Reaction Monitoring mode (MRM), providing high  
21 sensitivity and specificity. Using a similar method, diastereomers of Cys3MH and G3MH  
22 were quantified for the first time in several musts by SIDA-LS-MS/MS with detection in  
23 MRM mode<sup>26</sup>. This method used a shorter sample preparation since must or wine samples  
24 were only purified by SPE using a reverse phase C18 (Strata SDB-L).

## 1 **4. Applicative aspects of thiols formation in wines**

### 2 **4.1. Viticulture**

3 The evolution of aromatic potential responsible for the releasing of varietal thiols was  
4 attentively studied in order to better understand the biogenesis of such molecules in the  
5 berries during ripening.

6 For the first time, Peyrot des Gachons and co-workers (2000) measured the evolution of  
7 cysteinylated precursors (Cys3MH, Cys4MMP and Cys4MMPOH) in Sauvignon Blanc  
8 grapes from Bordeaux, for one month close to harvest date and for two consecutive vintages  
9 <sup>24b</sup>. The comparison between vintages demonstrated a huge difference in precursors contents  
10 probably depending on the must composition (assimilable nitrogen for example). Ripening  
11 affected directly the concentration of precursors by increasing their total initial amount in the  
12 berry. Similar study was conducted on Sauvignon Blanc and Melon B. musts for both  
13 glutathionylated and cysteinylated precursors of 3MH and 4MMP <sup>65</sup>. For Sauvignon Blanc  
14 grapes from two French vineyards (Sancerre and Tours), concentration of Cys3MH, G3MH  
15 and G4MMP increased during ripening considerably (Figure 15). The Cys4MMP evolution  
16 was different according to the considered location (Sancerre vs. Tours). For Melon B. grapes,  
17 no variation in precursor contents was measured during ripening.

18 Cysteinylated precursors concentrations are modulated in the Sauvignon Blanc grapes by  
19 water deficit <sup>66</sup>. Indeed, the more the water deficit is important, the more the Cys3MH amount  
20 is increased. On the contrary, a slightly water deficit contribute to the increase of Cys4MMP  
21 concentration. These observations have to be correlated with the production of polyphenol  
22 and hydroxycinnamic acids in the Sauvignon Blanc grapes under mild water deficit, which are  
23 involved in negative aspects. For cysteinylated and glutathionlated precursor of 3MH, it has

1 been recently reported that elevation and soil composition can influence the amount of such  
2 molecule in Koshu grapes <sup>12</sup>.

3 The concentration of Cys3MH is also influenced by the *Botrytis cinerea* infestation of grapes  
4 <sup>27,61,67</sup>. Indeed, Cys3MH amounts were considerably higher in botrytised Sauvignon Blanc and  
5 Semillon musts than in non-affected grapes <sup>27</sup>. In Sauvignon Blanc grapes affected by *Botrytis*  
6 *cinerea*, the increase of Cys3MH content, which is more important than the concentration  
7 effect berries, occurred during the beginning of botrytisation process that is to say between the  
8 stages of healthy grapes and “pourri plein” (entirely botrytised but not dessicated) <sup>67</sup>. The  
9 influence of over ripening on Cys3MH concentration was lower than those observed for the  
10 botrytisation: a 10 and 100-fold increase respectively. Similar observations were noticed in  
11 Petite Arvine must affected by rot, which exhibited higher level of Cys3MH than healthy  
12 grapes <sup>61</sup>.

13 The influence of *Botrytis cinerea* on finished wines was also pointed out <sup>47</sup>. Indeed,  
14 Sauvignon Blanc and Semillon wines affected by the Noble rot contained higher  
15 concentrations of 3MH than wines obtained from healthy grapes.

16 Concentration of thiol precursors seemed to be linked with must composition such as the  
17 assimilable nitrogen depending on the vineyard managing. Indeed, a moderate water deficit  
18 resulted in higher Cys3MH concentration in Sauvignon Blanc grapes <sup>66</sup>. In addition, vine  
19 nitrogen status influenced the concentration of the cysteinylated precursors (Cys3MH,  
20 Cys4MMP and Cys4MMPOH), the glutathione and the polyphenol compounds in the  
21 Sauvignon Blanc grapes <sup>68</sup>. The more the nitrogen supply was important, the more the  
22 cysteinylated precursors and glutathione content increased. Similar outcome was observed for  
23 the combination of nitrogen and sulfur foliar supply to the Sauvignon Blanc vine, which  
24 enhanced the concentration of varietal thiols (4MMP, 3MH and 3MHA) in the resulting wines

1 <sup>69</sup>. The foliar nitrogen and sulfur addition to the Sauvignon Blanc vine before veraison  
2 improved the aromatic expression of wines without increasing the vigor and *Botrytis cinerea*.  
3 The increase of varietal thiols concentrations in wine from foliar pulverization experiments is  
4 probably due to the enhancement of assimilable nitrogen, which modulates the conversion  
5 yield of the yeast.

## 6 **4.2. Enology**

### 7 **4.2.1. Elaboration of must**

8 The elaboration of musts constitutes a key step in wine making process (white wines) due to  
9 the oxidation reactions. Indeed, crushing of berries involves the release of *trans*-caftaric acid,  
10 which is oxidized in *o*-quinones by the polyphenoloxidase, in presence of oxygen. Until  
11 glutathione is present in the medium, quinones undergo a Michael addition of glutathione to  
12 form the so-called grape reaction product (GRP) <sup>70</sup> and then, condense with others  
13 polyphenolic substrates such as flavonoids. The GRP is not subject to a further oxidation by  
14 the polyphenoloxidase and does not contribute to the must browning. Nevertheless, in case of  
15 infestation by *Botrytis cinerea*, the laccase can oxidize the GRP in the corresponding quinone  
16 of GRP, which in presence of glutathione can produce the double adduct (the GRP2) or turn  
17 to brown polymers. As long as glutathione is available, the quinones are trapped and cannot  
18 participate in coupled reactions leading to an irreversible browning of the must.

19 At this step of wine making, cysteinylated and glutathionylated precursors of 3MH and  
20 4MMP are not oxidizable due to the chemical stability of thioether bond under oxidative  
21 conditions. In coherence with this observation, Roland and co-workers <sup>65</sup> reported that during  
22 a controlled oxidation of musts of Melon B. and Sauvignon Blanc, cysteinylated precursors  
23 and G4MMP present no degradation, whereas G3MH levels increase. These authors  
24 hypothesized the reaction between glutathione and (*E*)-2-hexenal, which is formed by the

1 lipoygenase action on the linolenic acid during the pressing <sup>71</sup>. This reaction could explain  
2 the production of G3MH during the pre-fermentations operations <sup>65</sup>.

3 Some wine making processes such as the skin contact or the pressing influence the extraction  
4 of aroma precursors susceptible to induce modifications in the finished wines. The  
5 localization of these molecules in the berry (skin and/or pulp) modulates their extraction  
6 during wine making. Indeed, the Cys3MH was mostly localized in skin whereas the  
7 Cys4MMP occurred similarly both in the skin and the pulp of the Sauvignon Blanc grapes <sup>72</sup>.  
8 Due to its preferential localization in skin (60%), the Cys3MH concentrations increased in  
9 Merlot and Cabernet Sauvignon grape juices with a prolonged skin contact and higher  
10 maceration temperatures (25°C) <sup>14a</sup>. Moreover, the Cys3MH was also influenced by winery  
11 pressing since its concentration increased significantly in must for 32h of skin contact and 2  
12 atm pressure <sup>73</sup>. More recently, the distribution of Cys3MH, G3MH and G4MMP was  
13 measured both in Sauvignon Blanc and Melon B. grapes <sup>74</sup>. For both grape varieties,  
14 precursors were in major part detected in the skin except for the G3MH in the Melon B.  
15 berries. As for the Cys3MH <sup>73</sup>, the G3MH was more extracted at the end of pressing for the  
16 elaboration of Sauvignon Blanc grape juices <sup>74</sup>. Additional investigations performed on Koshu  
17 grapes showed that Cys3MH and G3MH were preferentially located in leaves, skin and juice  
18 of such grape variety <sup>12</sup>.

19 Nevertheless, the use of such practice must be moderate since it involves also a better  
20 extraction of polyphenolic compounds, which are prejudicial for the global white wine  
21 quality. In addition, such compounds are substrate of oxidation reaction in bottled wines  
22 susceptible to affect the thiols stability during wine storage (see 4.2.3).

#### 23 **4.2.2. Yeast and fermentative conditions influence on thiol release**



1 Varietal thiols are released during the alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*  
2 yeasts through its beta-lyase activity. Indeed, a cell-free enzyme extract of *Eubacterium*  
3 *limosum* (containing carbon-sulfur lyase enzymes) or purified Tryptophanase from  
4 *Escherichia Coli* could release 4MMP and 3MH respectively from their odorless *S*-cysteine  
5 conjugate precursors <sup>21b,75</sup>. The mechanism of release of such molecule has been firstly  
6 investigated for the 4MMP by deleting genes encoding putative *S. cerevisiae* yeast carbon-  
7 sulfur lyases <sup>76</sup>. According to Howell and co-workers <sup>76</sup>, four genes, BNA3, CYS3, GLO1 and  
8 IRC7 seemed to be implicated in 4MMP release whereas Thibon *et al.*, <sup>77</sup> demonstrated that  
9 only the putative cystathionine beta-lyase Irc7p was able to achieve the conversion of Cys-  
10 4MMP into 4MMP <sup>77</sup>. IRC7 is regulated by Ure2p/Gln3p proteins <sup>77</sup>.

11 The conversion of Cys-3MH appears to be more complex, and IRC7 is not the only gene  
12 involved. Due to the probable additive effect, the identification of the others enzymes will be  
13 a very hard work. In addition, the enantiomeric distribution of 3MH may be influenced by the  
14 stereoselectivity of IRC7p <sup>77</sup>. This result is not consistent with the observation of the same  
15 author <sup>27</sup> who hypothesized the non-stereoselectivity of the enzyme responsible for the  
16 cleavage since the enantiomeric distribution of 3MH and its cysteinylated precursor is similar  
17 both in must and wine. It could be noted that those studies concerned only cysteinylated  
18 precursors and no data are available on the genetic determinism of glutathionylated precursors  
19 conversion. In addition, 3MH is also released via the hexenal pathway, but as the sulfur donor  
20 is not yet identified, no investigation on a possible genetic determinism could be achieved.

21 The 3MHA resulted from the acetylation of this latter by yeast ester-forming alcohol  
22 acetyltransferase, encoded by the ATF1 gene <sup>78</sup>. The overexpression of ATF1 gene in the  
23 VIN13 yeast strain implicated a significant increase of 3MHA whereas the overexpression of  
24 IAH1 gene, encoding for ester degrading enzyme, resulted in lower 3MHA contents <sup>78a</sup>. The

1 selection of yeast strain represents a crucial step in wine making to modulate varietal thiols  
2 release and aromatic quality of wines.

3  
4 Few studies were performed on precursors transportation yeast cells. In synthetic media,  
5 GAP1p (general Amino-acid Permease) constituted at least one transporter of Cys3MH,  
6 whose activity is the regulation of thiol production <sup>79</sup>. Thus, the production of varietal thiols  
7 by yeast, in such medium, is modulated *via* the nitrogen catabolite repression mechanism, like  
8 the uptake of poor-nitrogen sources. Indeed, the substitution of diammonium phosphate  
9 (DAP) by urea as the sole source of nitrogen involved an increase of 3MH in synthetic  
10 medium <sup>79</sup>. On grape must, even if GAP1p has not be confirmed as precursor transporter,  
11 addition of DAP, eventually prolonging NCR, have been shown to decrease thiol release.

12  
13 According to Thibon and co-workers, NCR throughout the Ure2p, did not influence the  
14 precursors uptake, but only the kinetics of their absorption: derepressed strains exhibited a  
15 higher intake of precursors at the beginning of the fermentation. This observation could be  
16 however of technological interest if the enzymes responsible for the cleavage are only active  
17 at this time of the process.

18  
19 Some commercial yeast strains have demonstrated their ability in releasing varietal thiols  
20 under enological conditions as VL3c, EG8, VIN13 and VIN7 <sup>80</sup>. 4MMP and 3MH formation  
21 in wine can be modulated by yeast strains. Indeed, VIN7 and VIN13 yeast strains exhibited  
22 better conversion yield in cleaving S-cysteine conjugates for 4MMP and 3MH respectively  
23 <sup>80c</sup>. Combination of *S. cerevisiae* yeasts as VIN7 and QA23 involved an overproduction of  
24 3MH and 3MHA in Sauvignon Blanc up to 200 and 20 ng/L respectively compared to parent  
25 yeast separately <sup>81</sup>. Recent investigations have demonstrated that co-fermentation with *Pichia*

1 *kluyveri* (non *S. cerevisiae* yeast) generated more 3MH and 3MHA in Sauvignon Blanc wines  
2 <sup>82</sup>. In addition, interspecific hybrid *S. cerevisiae* x *S. bayanus* var. *uvarum* were tested to  
3 enhance the production of 4MMP from its S-cysteine precursor compared to its parent *S.*  
4 *cerevisiae* <sup>80d,83</sup>. Even if yeast strains can modulate the release of varietal thiols during  
5 alcoholic fermentation, conversion yields are always below to 10 % for both classes of  
6 precursors (Table 2), giving no explanation for the total biogenesis of such molecules in wine.

7 Temperature fermentation influenced the release of varietal thiols but reported data appeared  
8 quite variable. Indeed, fermentation conducted at 20°C instead of 13°C resulted in more  
9 4MMP, 3MH and its acetate in model medium and wines, whatever the yeast strain used <sup>84</sup>.  
10 On the contrary, warmer conditions (28°C instead of 18°C) resulted in better 4MMP amount  
11 release although this observation seemed to be highly strain-dependant <sup>80a</sup>.

12 The yeast diastereoselectivity cleavage for the Cys3MH was investigated to explain the  
13 enantiomeric ratios of 3MH released in wine <sup>62</sup>. For this purpose, the (R)-Cys3MH and the  
14 (S)-Cys3MH were treated with Apotryptophanase enzyme; the absolute configuration  
15 referring to the asymmetric carbon bounded with cysteine. The (R)-Cys3MH gave only the  
16 corresponding (R)-3MH with the yield close to 82%. Similar outcome was observed for the  
17 (S)-Cys3MH cleavage, which resulted in (S)-3MH (43%) with traces of (R)-3MH. Equivalent  
18 results were observed for *Saccharomyces cerevisiae* AWRI 1655 instead of Apotryptophanase  
19 enzyme. Similar investigations have been performed for the cleavage of G3MH during  
20 fermentation, under synthetic conditions <sup>31</sup>. The fermentation of the single (R)-G3MH  
21 diastereomer with the VIN13 yeast strain released both the (R)-3MH and the (R)-Cys3MH,  
22 with a conversion yield close to 3% for the thiol production.

### 23 **4.2.3. Ageing**

1 Thiols are chemically unstable since they are easily oxidizable in disulfide under mild  
2 oxidative conditions <sup>85</sup>.

3 At bottling, oxygen enters in the headspace of bottle in lower quantities (1-2 mg/L) than  
4 during storage over a period of 24 months (1-10 mg/L) <sup>86</sup> and can induce some oxidation  
5 reactions responsible for aroma loss. The oxygen transfer rate (OTR) during storage is stopper  
6 dependant since some synthetic stoppers allow the entrance of oxygen into bottle at a  
7 relatively high rate whereas screw cap and technical corks are well-known for their oxygen  
8 barrier <sup>9,87</sup>. Nevertheless, the use of cork can cause in several cases a specific absorption of  
9 volatile compounds into the stopper. This phenomenon called scalping could be responsible  
10 for the loss of fruity aroma in Sauvignon Blanc wines by trapping the 3MH and the 3MHA  
11 into cork <sup>88</sup>.

12 According to the kind of wine, oxygen can be beneficial or detrimental for the aroma. Indeed,  
13 oxygen participates in red wine maturation by enhancing the color and decreasing the global  
14 astringency of wine <sup>89</sup>. In contrast for white wines, oxygen is highly prejudicial since it  
15 involves the loss of fruity aromas, the development of oxidized notes and induces a browning  
16 of the color <sup>90</sup>. Indeed, varietal thiols can react with electrophilic molecules in wine to form  
17 some specific adducts with polyphenolic compounds <sup>49b</sup>. The presence of (+)-catechin and (-)-  
18 epicatechin in presence of Fe(III) catalyzing their oxidation into quinones, which favored the  
19 disappearance of such thiols (Figure 16).

20 Nevertheless, the absence of oxygen in white wines at bottling and during the storage is  
21 described as producing reduced dominant odors in such products. Consequently, a  
22 compromise has to be achieved for the white wine storage to preserve aroma from oxidation  
23 reactions. One solution constitutes the ageing on lees (before bottling) and the presence of  
24 sulfur dioxide, natural glutathione and anthocyanins (in red and rosé wines) such as the

1 malvidin-3-glucoside, which have a protecting effect against the loss of fruity notes in wine  
2 <sup>49a,88,91</sup>. Others techniques such as the addition of glutathione as anti-oxidant (trapping of  
3 quinones) are discussed by the International Organisation of Vine and Wine (OIV) to preserve  
4 the aroma of white wine during storage and to counterbalance the oxidation reactions.

## 5 **5. Conclusion**

6 Wine aroma is hugely influenced by viticultural and enological practices. The so-researched  
7 fruity notes in young wines are one of the most difficult aspects to be managed, as many  
8 compounds contribute positively or negatively to them. Some of them are represented by  
9 varietal thiols, whose presence contributes to the wine aroma quality. The occurrence of such  
10 molecules in wine is the result of many factors affecting the concentration of their precursors  
11 in grapes and their extraction, their release during fermentation and finally their conservation  
12 at a convenient level until the wine is consumed.

13 Precursors presence in grapes depends on several viticultural factors, such as nitrogen and  
14 water nutrition, vine management and maturity. Those aspects are nowadays well known,  
15 even if the mechanisms implicated are not totally elucidated.

16 Extraction of those precursors from grapes required attention even if, in this form, they are not  
17 directly affected by the oxidation reactions occurring during musts elaboration.

18 During fermentation, the conversion of those precursors into thiols remains the key step, and  
19 of course it is the topics of most of the research studies in the field. The studies performed by  
20 research teams all around the world allowed to identify many precursors and to determine  
21 their conversion, which depends on the grape composition (assimilable nitrogen,  
22 concentration and localisation of precursors in berries) but also on the yeast genetic, and on  
23 the fermentation conditions. In most of these studies, organic chemistry appears to be helpful,

1 either for identification and quantification of thiols and their precursors, or to better  
2 understand, in synthetic and real medium, the impact of yeast and its physiology. As the  
3 discovery of some precursors is very recent, many aspects remain not investigated in this  
4 field.

5 After alcoholic fermentation, when thiols have been released, all the technology employed  
6 must be focused against oxidation reaction. Consequently, chemistry and biochemistry remain  
7 again helpful as it is the only tool to understand the various mechanisms (oxidation or  
8 nucleophilic addition) and thus propose means to avoid the aroma loss due to the  
9 disappearance of those compounds.

10 Many researches should be performed in the future to better understand the interactions  
11 between thiols and other volatile or non-volatiles compounds, which are the keys to explain  
12 olfactive sensations, and thus the wine aroma quality. This new perspective will require  
13 numerous competences from chemistry to human neurophysiology.

## 14 **6. Acknowledgments**

15 We thank Jean-Michel Salmon for helpful discussions. Interloire, IFV (Institut Français de la  
16 Vigne et du Vin) and Sicavac are also acknowledged for technical and financial supports  
17 (CIFRE fellowship).

18

- 1
- 2 (1) Cheynier, V.; Schneider, R.; Salmon, J.-M.; Fulcrand, H. In *Comprehensive Natural*  
3 *Products II, Chemistry and Biology*; Mander, L., Lui, H.-W., Eds.; Elsevier: Oxford,  
4 2010; Vol. 3.
- 5 (2) Du Plessis, C. S.; Augustyn, O. P. H. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1981**, *2*, 101.
- 6 (3) (a) Darriet, P.; Lavigne, V.; Boidron, J. N.; Dubourdieu, D. *J. Int. Sci. Vigne Vin.*  
7 **1991**, *25*, 167(b) Darriet, P.; Tominaga, T.; Lavigne, V.; Boidron, J. N.; Dubourdieu,  
8 *D. C. R. Acad. Sci. Paris* **1993**, *316*, 1332(c) Darriet, P.; Tominaga, T.; Lavigne, V.;  
9 Boidron, J. N.; Dubourdieu, D. *Flavor Fragrance J.* **1995**, *10*, 385.
- 10 (4) Guth, H. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3027.
- 11 (5) Escudero, A.; Gogorza, B.; Melus, M. A.; Ortin, N.; Cacho, J.; Ferreira, V. *J. Agric.*  
12 *Food Chem.* **2004**, *52*, 3516.
- 13 (6) (a) Dubourdieu, D.; Tominaga, T. In *Wine chemistry and biochemistry*; Moreno-  
14 Arribas, V., Polo, C., Eds.; Springer, 2009(b) Tominaga, T.; Baltenweck-Guyot, R.;  
15 Gachons, C. P. D.; Dubourdieu, D. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51*, 178.
- 16 (7) (a) Tominaga, T.; Darriet, P.; Dubourdieu, D. *Vitis* **1996**, *35*, 207(b) Tominaga, T.;  
17 Furrer, A.; Henry, R.; Dubourdieu, D. *Flavour Fragrance J.* **1998**, *13*, 159.
- 18 (8) Fretz, C. B.; Luisier, J.-L.; Tominaga, T.; Amado, R. *Am. J. Enol. Vitic.* **2005**, *56*, 407.
- 19 (9) Lopes, P.; Saucier, C.; Glories, Y. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6967.
- 20 (10) Schneider, R.; Kotseridis, Y.; Ray, J. L.; Augier, C.; Baumes, R. *J. Agric. Food Chem.*  
21 **2003**, *51*, 3243.
- 22 (11) Campo, E.; Ferreira, V.; Escudero, A.; Cacho, J. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5682.
- 23 (12) Kobayashi, H.; Takase, H.; Kaneko, K.; Tanzawa, F.; Takata, R.; Suzuki, S.; Konno,  
24 T. *Am. J. Enol. Vitic.* **2010**, *61*, 176.

- 1 (13) Ferreira, V.; Ortin, N.; Escudero, A.; Lopez, R.; Cacho, J. *J. Agric. Food Chem.* **2002**,  
2 50, 4048.
- 3 (14) (a) Murat, M.-L.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49,  
4 5412(b) Bouchilloux, P.; Darriet, P.; Henry, R.; Lavigne-Cruege, V.; Dubourdieu, D.  
5 *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 3095.
- 6 (15) Masson, G.; Schneider, R. *Am. J. Enol. Vitic.* **2009**, 60, 116.
- 7 (16) Lavigne, V.; Henry, R.; Dubourdieu, D. *Sci. Aliments* **1998**, 18, 175.
- 8 (17) Tominaga, T.; Blanchard, L.; Darriet, P.; Dubourdieu, D. *J. Agric. Food Chem.* **2000**,  
9 48, 1799.
- 10 (18) Blanchard, L.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 4833.
- 11 (19) (a) Tominaga, T.; Guimberteau, G.; Dubourdieu, D. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51,  
12 1016(b) Tominaga, T.; Guimberteau, G.; Dubourdieu, D. *J. Agric. Food Chem.* **2003**,  
13 51, 1373.
- 14 (20) Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. In *Handbook of*  
15 *Enology*; John Wiley & Sons, Ltd, 2006; Vol. 2.
- 16 (21) (a) Tominaga, T.; Masneuf, I.; Dubourdieu, D. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **1995**, 29, 227(b)  
17 Tominaga, T.; Peyrot des Gachons, C.; Dubourdieu, D. *J. Agric. Food Chem.* **1998**,  
18 46, 5215.
- 19 (22) Thibon, C.; Dubourdieu, D.; Darriet, P.; Tominaga, T. *Food Chemistry* **2009**, 114,  
20 1359.
- 21 (23) Roland, A.; Schneider, R.; Le Guernevé, C.; Razungles, A.; Cavelier, F. *Food Chem.*  
22 **2010**, 121, 847.
- 23 (24) (a) Roland, A.; Vialaret, J.; Moniatte, M.; Rigou, P.; Razungles, A.; Schneider, R. *J.*  
24 *Chromatogr. A* **2010**, 1217, 1626(b) Peyrot des Gachons, C.; Tominaga, T.;  
25 Dubourdieu, D. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 3387.



- 1 (25) Starckenmann, C.; Troccaz, M.; Howell, K. *Flavor Fragrance J.* **2008**, *23*, 369.
- 2 (26) Capone, D. L.; Sefton, M. A.; Hayasaka, Y.; Jeffery, D. W. *J. Agric. Food Chem.*  
3 **2010**, *58*, 1390.
- 4 (27) Thibon, C.; Shinkaruk, S.; Tominaga, T.; Bennetau, B.; Dubourdieu, D. *J.*  
5 *Chromatogr. A* **2008**, *1183*, 150.
- 6 (28) Peyrot des Gachons, C.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D. *J. Agric. Food Chem.* **2002**,  
7 *50*, 4076.
- 8 (29) Capone, D. L.; Sefton, M. A.; Hayasaka, Y.; Jeffery, D. W. *Journal of Agricultural*  
9 *and Food Chemistry* **2010**, *58*, 1390.
- 10 (30) Fedrizzi, B.; Pardon, K. H.; Sefton, M. A.; Elsey, G. M.; Jeffery, D. W. *J. Agric. Food*  
11 *Chem.* **2009**, *57*, 991.
- 12 (31) Grant-Preece, P. A.; Pardon, K. H.; Capone, D. L.; Cordente, A. G.; Sefton, M. A.;  
13 Jeffery, D. W.; Elsey, G. M. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1383.
- 14 (32) Roland, A.; Schneider, R.; Razungles, A.; Le Guernevé, C.; Cavelier, F. *J. Agric.*  
15 *Food Chem.* **2010**, *58*, 10684.
- 16 (33) Schneider, R.; Charrier, F.; Razungles, A.; Baumes, R. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*,  
17 58.
- 18 (34) Murat, M. L.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **2001**, *35*, 99.
- 19 (35) Blanchard, L. Recherche sur la contribution de certains thiols volatils à l'arôme des  
20 vins rouges. Etude de leur genèse et de leur stabilité. PhD thesis, Université Victor  
21 Segalen, Bordeaux, 2000.
- 22 (36) Tominaga, T.; Niclass, Y.; Frérot, E.; Dubourdieu, D. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*,  
23 7251.
- 24 (37) Guth, H. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3022.

- 1 (38) Bailly, S.; Jerkovic, V.; Marchand-Brynaert, J.; Collin, S. *J. Agric. Food Chem.* **2006**,  
2 *54*, 7227.
- 3 (39) (a) Cullere, L.; Escudero, A.; Cacho, J.; Ferreira, V. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*,  
4 1653(b) Lopez, R.; Ortin, N.; Perez-Trujillo, J. P.; Cacho, J.; Ferreira, V. *J. Agric.*  
5 *Food Chem.* **2003**, *51*, 3419.
- 6 (40) Lund, C. M.; Thompson, M. K.; Benkwitz, F.; Wohler, M. W.; Triggs, C. M.;  
7 Gardner, R.; Heymann, H.; Nicolau, L. *Am. J. Enol. Vitic.* **2009**, *60*, 1.
- 8 (41) Kotseridis, Y.; Ray, J. L.; Augier, C.; Baumes, R. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*,  
9 5819.
- 10 (42) Vermeulen, C.; Collin, S. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3618.
- 11 (43) Vermeulen, C.; Pellaud, J.; Gijs, L.; Collin, S. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5445.
- 12 (44) Hebditch, K. R.; Nicolau, L.; Brimble, M. A. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2007**,  
13 *50*, 237.
- 14 (45) (a) Pickenhagen, W.; Brönner-Schindler, H. *Helv. Chim. Acta* **1984**, *67*, 947(b)  
15 Weckerle, B.; Schreier, P.; Humpf, H.-U. *J. Org. Chem* **2001**, *66*, 8160.
- 16 (46) Scafato, P.; Colangelo, A.; Rosini, C. *Chirality* **2009**, *21*, 176.
- 17 (47) Tominaga, T.; Niclass, Y.; Frérot, E.; Dubourdieu, D. *J. Agric. Food Chem.* **2006**.
- 18 (48) Van de Waal, M.; Niclass, Y.; Snowden, R. L.; Bernardinelli, G.; Escher, S. *Helv.*  
19 *Chim. Acta* **2002**, *85*, 1246.
- 20 (49) (a) Blanchard, L.; Darriet, P.; Dubourdieu, D. *Am. J. Enol. Vitic.* **2004**, *55*, 115(b)  
21 Nikolantonaki, M.; Chichuc, I.; Teissedre, P.-L.; Darriet, P. *Anal. Chim. Acta* **2009**,  
22 *660*, 102.
- 23 (50) Tominaga, T.; Murat, M.-L.; Dubourdieu, D. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1044.
- 24 (51) Ferreira, V.; Ortin, N.; Cacho, J. F. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1143*, 190.
- 25 (52) Mateo-Vivaracho, L.; Cacho, J.; Ferreira, V. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 3845.

- 1 (53) Fedrizzi, B.; Versini, G.; Lavagnini, I.; Badocco, D.; Nicolini, G.; Magno, F. *Anal.*  
2 *Chim. Acta* **2008**, *621*, 38.
- 3 (54) Mateo-Vivaracho, L.; Ferreira, V.; Cacho, J. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1121*, 1.
- 4 (55) Mateo-Vivaracho, L.; Cacho, J.; Ferreira, V. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1146*, 242.
- 5 (56) Mateo-Vivaracho, L.; Cacho, J.; Ferreira, V. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1185*, 9.
- 6 (57) Rodríguez-Bencomo, J. J.; Schneider, R.; Lepoutre, J. P.; Rigou, P. *J. Chromatogr. A*  
7 **2009**, *1216*, 5640.
- 8 (58) Starckenmann, C. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7146.
- 9 (59) Subileau, M.; Schneider, R.; Salmon, J.-M.; Degryse, E. *J. Agric. Food Chem.* **2008**,  
10 *56*, 9230.
- 11 (60) Luisier, J.-L.; Veyrand, J.; Piantini, U. *Chimia* **2007**, *61*, 533.
- 12 (61) Luisier, J.-L.; Buettner, H.; Iker, S.; Rausis, T.; Frey, U. *J. Agric. Food Chem.* **2008**,  
13 *56*, 2883.
- 14 (62) Pardon, K. H.; Graney, S. D.; Capone, D. L.; Swiegers, J. H.; Sefton, M. A.; Elsey, G.  
15 *M. J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3758.
- 16 (63) Falck, J. R.; Sangras, B.; Capdevila, J. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1062.
- 17 (64) Kubec, R.; Svobodova, M.; Velisek, J. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 428.
- 18 (65) Roland, A.; Vialaret, J.; Razungles, A.; Rigou, P.; Schneider, R. *J. Agric. Food Chem.*  
19 **2010**, *58*, 4406.
- 20 (66) Choné, X. Contribution à l'étude des terroirs de Bordeaux : étude des déficits  
21 hydriques modérés, de l'alimentation en azote et de leurs effets sur le potentiel  
22 aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. PhD Thesis,  
23 University Victor Segalen, Bordeaux, 2001.
- 24 (67) Thibon, C.; Dubourdieu, D.; Darriet, P.; Tominaga, T. *Food Chem.* **2009**, *114*, 1359.

- 1 (68) Choné, X.; Lavigne-Cruège, V.; Tominaga, T.; Leeuwen, C. V.; Castagnède, C.;  
2 Saucier, C.; Dubourdieu, D. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **2006**, *40*, 1.
- 3 (69) Lacroux, F.; Tregoat, O.; Leeuwen, C. V.; Pons, A.; Tominaga, T.; Lavigne-Cruège,  
4 V.; Dubourdieu, D. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **2008**, *42*, 125.
- 5 (70) (a) Cheynier, V. F.; Trousdale, E. K.; Singleton, V. L.; Salgues, M. J.; Wylde, R. J.  
6 *Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 217(b) Singleton, V. L.; Salgues, M.; Zaya, J.;  
7 Trousdale, E. *Am. J. Enol. Vitic.* **1985**, *36*, 50.
- 8 (71) Crouzet, J. *Rev. Fran. Oenol.* **1986**, *102*, 42.
- 9 (72) Peyrot des Gachons, C.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*  
10 144.
- 11 (73) Maggu, M.; Winz, R.; Kilmartin, P. A.; Trought, M. C. T.; Nicolau, L. *J. Agric. Food*  
12 *Chem.* **2007**, *55*, 10281.
- 13 (74) Roland, A.; Schneider, R.; Charrier, F.; Cavelier, F.; Rossignol, M.; Razungles, A.  
14 *Food Chem.* **2010**, *125*, 139.
- 15 (75) Wakabayashi, H.; Wakabayashi, M.; Eisenreich, W.; Engel, K.-H. *J. Agric. Food*  
16 *Chem.* **2004**, *52*, 110.
- 17 (76) Howell, K. S.; Klein, M.; Swiegers, J. H.; Hayasaka, Y.; Elsey, G. M.; Fleet, G. H.;  
18 Hoj, P. B.; Pretorius, I. S.; de Barros Lopes, M. A. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**,  
19 *71*, 5420.
- 20 (77) Thibon, C.; Marullo, P.; Claisse, O.; Cullin, C.; Dubourdieu, D.; Tominaga, T. *FEMS*  
21 *Yeast Res.* **2008**, *8*, 1076.
- 22 (78) (a) Swiegers, J.; Pretorius, I. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *74*, 954(b) Swiegers, J.  
23 H.; Willmott, R.; Hill-Ling, A.; Capone, D. L.; Pardon, K. H.; Elsey, G. M.; Howell,  
24 K. S.; de Barros Lopes, M. A.; Sefton, M. A.; Lilly, M.; Pretorius, I. S. In *"Flavour*

- 1 *science - recent advances and trends*“; Elsevier: Amsterdam, 2006; Vol. 43 of  
2 Development in Food science.
- 3 (79) Subileau, M.; Schneider, R.; Salmon, J.-M.; Degryse, E. *FEMS Yeast Res.* **2008**, *8*,  
4 771.
- 5 (80) (a) Howell, K. S.; Swiegers, J. H.; Elsey, G. M.; Siebert, T. E.; Bartowsky, E. J.; Fleet,  
6 G. H.; Pretorius, I. S.; de Barros Lopes, M. A. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *240*,  
7 125(b) Murat, M.-L.; Masneuf, I.; Darriet, P.; Lavigne, V.; Tominaga, T.; Dubourdieu,  
8 D. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 136(c) Swiegers, J. H.; Francis, I. L.; Herderich, M. J.;  
9 Pretorius, I. S. *Austral. NZ Wine Ind.* **2006**, *21*, 34(d) Dubourdieu, D.; Tominaga, T.;  
10 Masneuf, I.; Peyrot des Gachons, C.; Murat, M. L. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 81.
- 11 (81) King, E. S.; Swiegers, J. H.; Travis, B.; Francis, I. L.; Bastian, S. E.; Pretorius, I. S. *J.*  
12 *Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10829.
- 13 (82) Anfang, N.; Brajkovich, M.; Goddard, M. R. *Australian Journal of Grape and Wine*  
14 *Research* **2009**, *15*, 1.
- 15 (83) Masneuf, I.; Murat, M. L.; Naumov, G. I.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D. *J. Int. Sci.*  
16 *Vigne Vin.* **2002**, *36*, 205.
- 17 (84) Masneuf-Pomarede, I.; Mansour, C.; Murat, M. L.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D.  
18 *International Journal of Food Microbiology* **2006**, *108*, 385.
- 19 (85) Hofmann, T.; Schieberle, P.; Grosch, W. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 251.
- 20 (86) Lopes, P.; Silva, M. A.; Pons, A.; Tominaga, T.; Lavigne, V.; Saucier, C.; Darriet, P.;  
21 Teissedre, P.-L.; Dubourdieu, D. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10261.
- 22 (87) Lopes, P.; Saucier, C. d.; Teissedre, P.-L.; Glories, Y. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*,  
23 6741.
- 24 (88) Brajkovich, M.; Tibbits, N.; Peron, G.; Lund, C. M.; Dykes, S. I.; Kilmartin, P. A.;  
25 Nicolau, L. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 10006.

- 1 (89) Atanasova, V.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M. *Anal. Chim. Acta* **2002**,  
2 458, 15.
- 3 (90) Skouroumounis, G. K.; Kwiatkowski, M. J.; Francis, I. L.; Oakey, H.; Capone, D. L.;  
4 Duncan, B.; Sefton, M. A.; Waters, E. J. *Australian Journal of Grape and Wine*  
5 *Research* **2005**, *11*, 369.
- 6 (91) Murat, M.-L.; Tominaga, T.; Saucier, C.; Glories, Y.; Dubourdieu, D. *Am. J. Enol.*  
7 *Vitic.* **2003**, *54*, 135.
- 8 (92) Tominaga, T.; Furrer, A.; Henry, R.; Dubourdieu, D. *Flavor Fragrance J.* **1998**, *13*,  
9 159.
- 10 (93) Sarrazin, E.; Shinkaruk, S.; Tominaga, T.; Bennetau, B.; Frérot, E.; Dubourdieu, D. *J.*  
11 *Agric. Food Chem.* **2007**, *55* 1437.
- 12 (94) Kolor, M. G. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 1125.
- 13 (95) (a) Bouchilloux, P.; Darriet, P.; Dubourdieu, D. *Vitis* **1998**, *37*, 177(b) Tominaga, T.;  
14 Dubourdieu, D. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 29.
- 15 (96) Subileau, M. Paramètres influants sur la libération des thiols variétaux par la levure  
16 *saccharomyces cerevisiae* : d'un milieu synthétique à la complexité d'un moût de  
17 Sauvignon blanc. PhD Thesis, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de  
18 Montpellier, Montpellier, 2008.
- 19  
20  
21

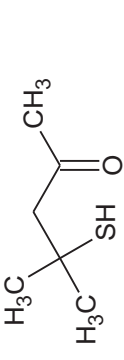
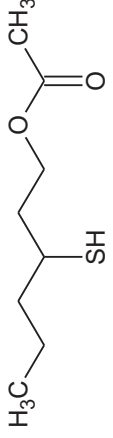
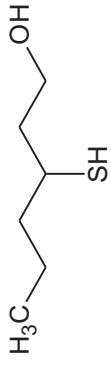
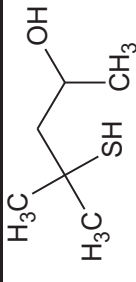
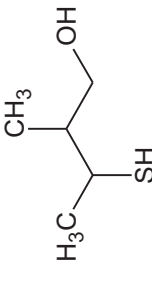
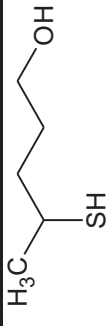
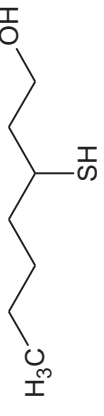
1 **Figure captions:**

- 2 Table 1: Volatile thiols identified in *Vitis Vinifera* wines (nr: not reported)
- 3 Table 2: Influence of yeast strains on varietal thiol release under enological conditions
- 4 Figure 1: Different biogenesis pathways for the 4MMP (**1**), 3MH (**3**) and 3MHA (**2**) involved  
5 during the alcoholic fermentation.
- 6 Figure 2: Retro-synthetic routes for 3MH (**3**) and 4MMP (**1**)
- 7 Figure 3: Synthesis of 4MMP (**1**) according to Kotseridis *et al.* method. The [<sup>2</sup>H<sub>10</sub>]-4MMP (**1**-  
8 d<sub>10</sub>) was obtained under same conditions using pure [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-acetone as starting material.
- 9 Figure 4: Synthesis of [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3MH (**3**-d<sub>2</sub>) and [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-3MHA (**2**-d<sub>5</sub>) according to Kosteridis *et al.*  
10 method <sup>41</sup>
- 11 Figure 5: Vermeulen *et al.* synthesis of natural 3MHA (**2**) <sup>42</sup>
- 12 Figure 6: Weckerle's enantioselective synthesis of 3MH (**3**) <sup>45b</sup>
- 13 Figure 7: Scafato's enantioselective synthesis of (R)-3MH (**3b**) <sup>46</sup>
- 14 Figure 8: Enantioselective synthesis of 3MH (**3a** and **3b**) and 3MHA (**2a** and **2b**) according to  
15 Tominaga *et al.* method <sup>36</sup>
- 16 Figure 9: Influence of pH on Cys3MH synthesis <sup>58</sup>
- 17 Figure 10: Roland's synthesis of natural and deuterated (R/S)-G3MH <sup>23</sup>
- 18 Figure 11: Grant-Preece's synthesis of (R)-G3MH <sup>31</sup>
- 19 Figure 12: Tominaga's derivatisation procedure to afford trimethylsilylated derivatives of  
20 Cys3MH (A) and Cys4MMP (B) <sup>21b</sup>
- 21 Figure 13: Dagan's derivatisation procedure based on ECF/pyridine for the Cys3MH (A) and  
22 the Cys4MMP (B) <sup>9</sup>
- 23 Figure 14: Thibon's derivatisation procedure for the separation of both diastereomers of the  
24 Cys3MH <sup>27</sup>
- 25 Figure 15: Influence of ripening on cysteinylated and glutathionylated precursors of 3MH and  
26 4MMP for Sauvignon Blanc grapes from Sancerre and Tours. From Roland *et al.*, 2010 <sup>65</sup>.
- 27 Figure 16: Possible mechanisms involved in the thiols trapping in presence of oxygen  
28 according to Nikolantonaki *et al.* <sup>49b</sup>

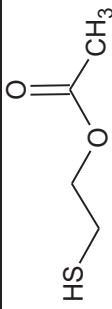
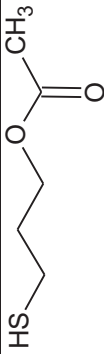
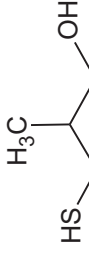
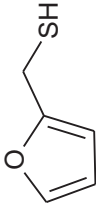
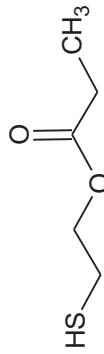
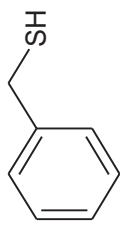
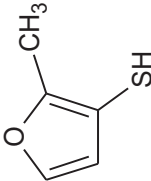
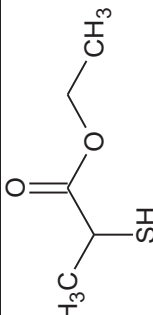
29

30

Table 1: Volatile thiols identified in *Vitis Vinifera* wines (nr: not reported)

ORIGINS	NUMBERS	MOLECULES	NAMES	ODORS	PERCEPTION THRESHOLDS IN MODEL SOLUTION (ng/L)	REFERENCES	CONCENTRATION RANGE REPORTED IN LITERATURE (ng/L)
	<u>1</u>		4-methyl-4-mercaptopentan-2-one <b>(4MMP)</b>	Box-tree, blackcurrant bud	0.8	2,3,c,6b	until 400
	<u>2</u>		3-mercaptohexylacetate <b>(3MHA)</b>	Box-tree	4.2 in racemic mixture	6b,7a	until 2500
	<u>3</u>		3-mercaptohexan-1-ol <b>(3MH)</b>	Grape fruit, passion fruit	60 in racemic mixture	6b,92	until 19000
<b>VARIETAL THIOLS</b>							
	<u>4</u>		4-methyl-4-mercaptopentan-2-ol <b>(4MMPOH)</b>	Citrus zest	55	6b,92	until 90
	<u>5</u>		2-methyl-3-mercaptobutan-1-ol	Raw onion	nr	93	80-150
	<u>6</u>		3-mercaptopentan-1-ol	Grape fruit	950	93	90-300
	<u>7</u>		3-mercaptoheptan-1-ol	Grape fruit	35	93	25-75



<b>8</b>		2-mercapto-ethylacetate	Meaty	nr	16	nr
<b>9</b>		3-mercaptopropylacetate	Meaty	nr	16	nr
<b>10</b>		3-mercapto-2-methylpropan-1-ol	Broth, sweat	3000 (in water)	14b	25-10000
<b>11</b>		2-furanmethanethiol	Coffee	0.4	17	0.4-62
<b>12</b>		Ethyl-3-mercaptopropionate	Meaty	200	19a,94	40-12000 (in sparkling wines)
<b>13</b>		Benzenemethanethiol	Smoky	0.3	19b	10-40
<b>14</b>		2-methyl-3-furanthiol	Meaty	0.4-1.0 (in water)	95	> 100
<b>15</b>		2-ethyl-2-mercaptopropionate	Fruity	500	19a	nr

**NON-VARIETAL THIOLS**

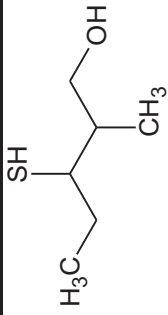
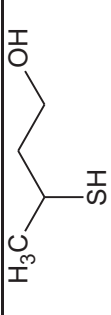
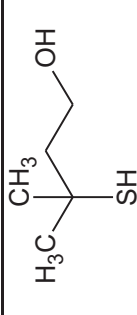
<b><u>16</u></b>		2-methyl-3-mercaptobutan-1-ol	Raw onion	nr	6a	nr
<b><u>17</u></b>		3-mercaptobutan-1-ol	Onion, leek	nr	6a	nr
<b><u>18</u></b>		3-methyl-3-mercaptobutan-1-ol	Cooked leek	1500	6b,92	nr

Table 2: Influence of yeast strains on varietal thiol release under enological conditions

Conversion yields under enological conditions (%)					
Yeast type	Strains	Cys4MMP→4MMP	Cys3MH→3MH	G3MH→3MH	G4MMP→4MMP
<u><i>Saccharomyces yeasts</i></u>					
<i>S. cerevisiae</i>	VL3c	0.06 <sup>a</sup> - 0.8 <sup>b</sup>	0.31 <sup>b</sup>		
	EG8	0.5 <sup>a</sup> - 0.7 <sup>b</sup>	0.41 <sup>b</sup>		
	VL1	0.2 <sup>a</sup>			
	522d	0.06 <sup>a</sup>			
	VIN13	0.6 <sup>b</sup>	0.39 <sup>b</sup>	4.5 <sup>c</sup>	0.3 <sup>d</sup>
	VIN7	1.3 <sup>b</sup>	0.30 <sup>b</sup>		
	QA23	1.3 <sup>b</sup>	0.23 <sup>b</sup>		
	NT116	0.5 <sup>b</sup>	0.29 <sup>b</sup>		
	ES1		0.48 – 0.81 <sup>f</sup>		
	<i>S. bayanus</i>	P3			
TBC28					
<b>Interspecific hybrids (<i>S.c. x bayanus</i>)</b>	H1 to H9	3.5-10.9 <sup>g</sup>			

<sup>a</sup> from <sup>80</sup>, <sup>b</sup> from <sup>96</sup>, <sup>c</sup> from <sup>23</sup>, <sup>d</sup> from <sup>32</sup>, <sup>e</sup> from <sup>59</sup>, <sup>f</sup> from <sup>83</sup> model or **natural** medium.

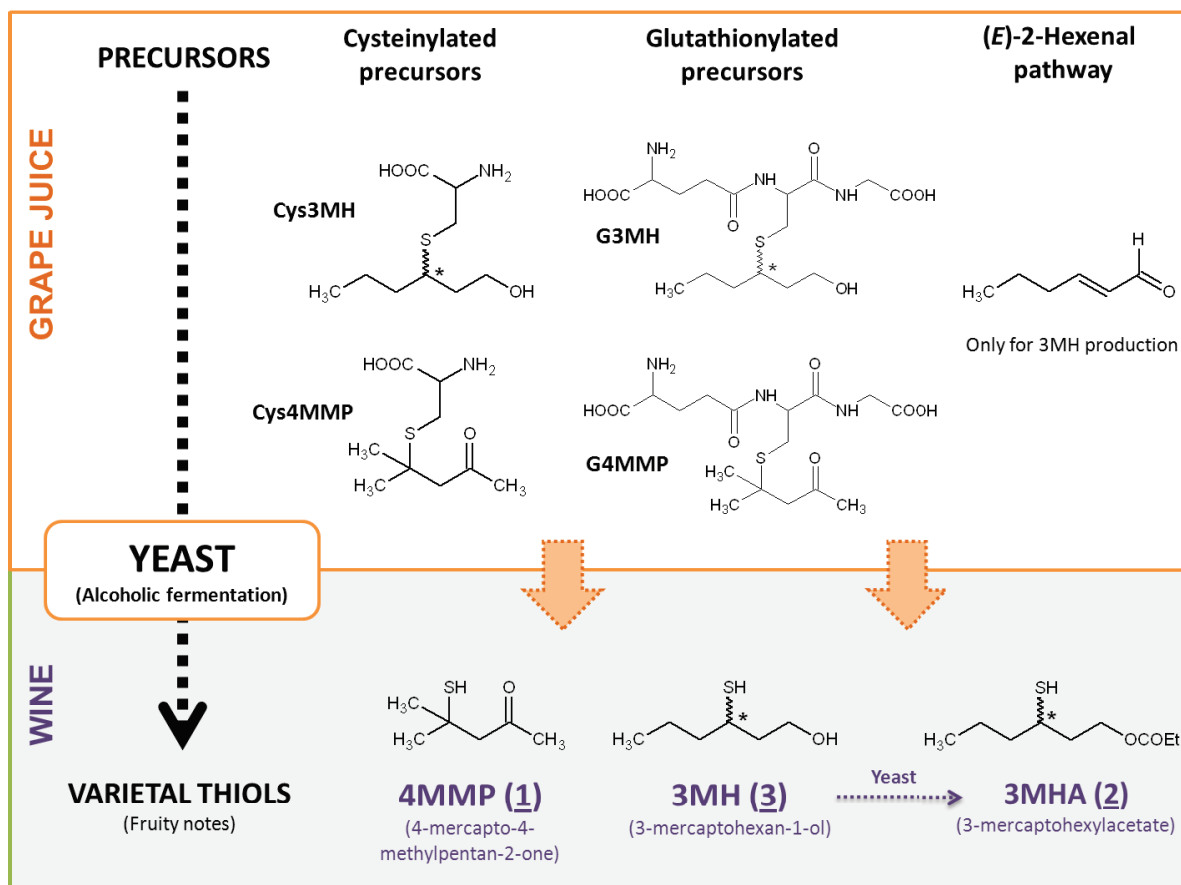


Figure 1: Different biogenesis pathways for the 4MMP (1), 3MH (3) and 3MHA (2) involved during the alcoholic fermentation.

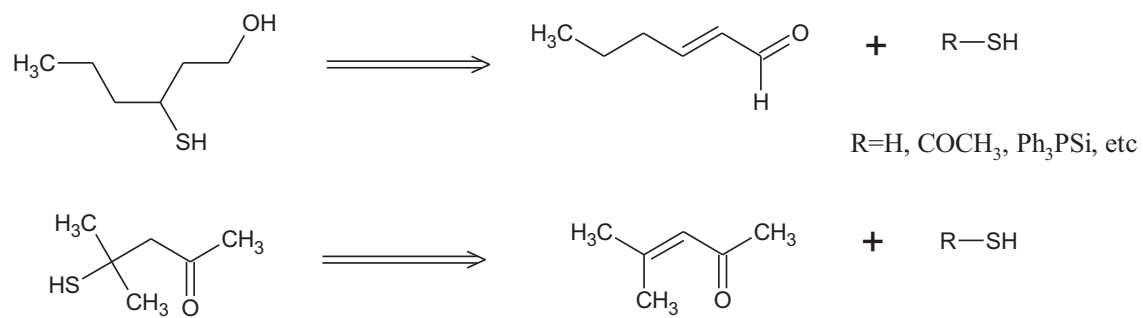


Figure 2: Retro-synthetic routes for 3MH (**3**) and 4MMP (**1**)

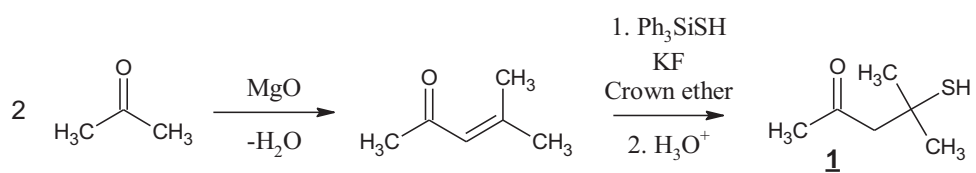


Figure 3: Synthesis of 4MMP (**1**) according to Kotseridis *et al.* method. The [<sup>2</sup>H<sub>10</sub>]-4MMP (**1**-d<sub>10</sub>) was obtained under same conditions using pure [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-acetone as starting material.

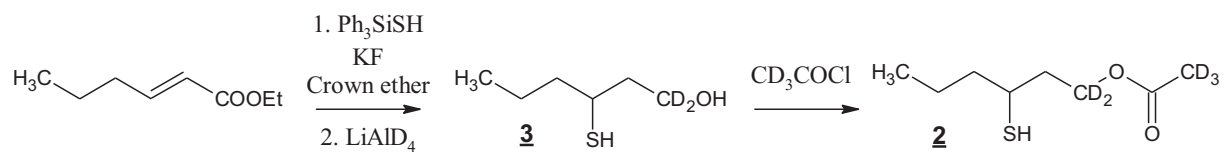


Figure 4: Synthesis of [ $^2\text{H}_2$ ]-3MH ( $\mathbf{3-d_2}$ ) and [ $^2\text{H}_5$ ]-3MHA ( $\mathbf{2-d_5}$ ) according to Kosteridis *et al.* method

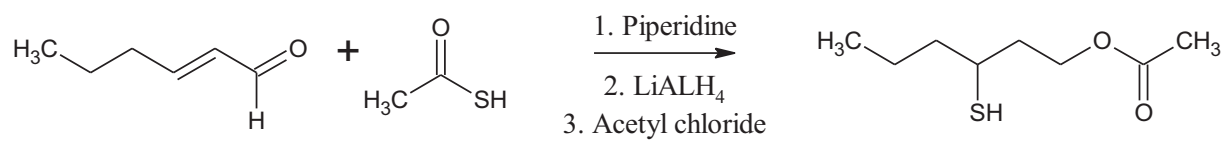


Figure 5: Vermeulen *et al.* synthesis of natural 3MHA



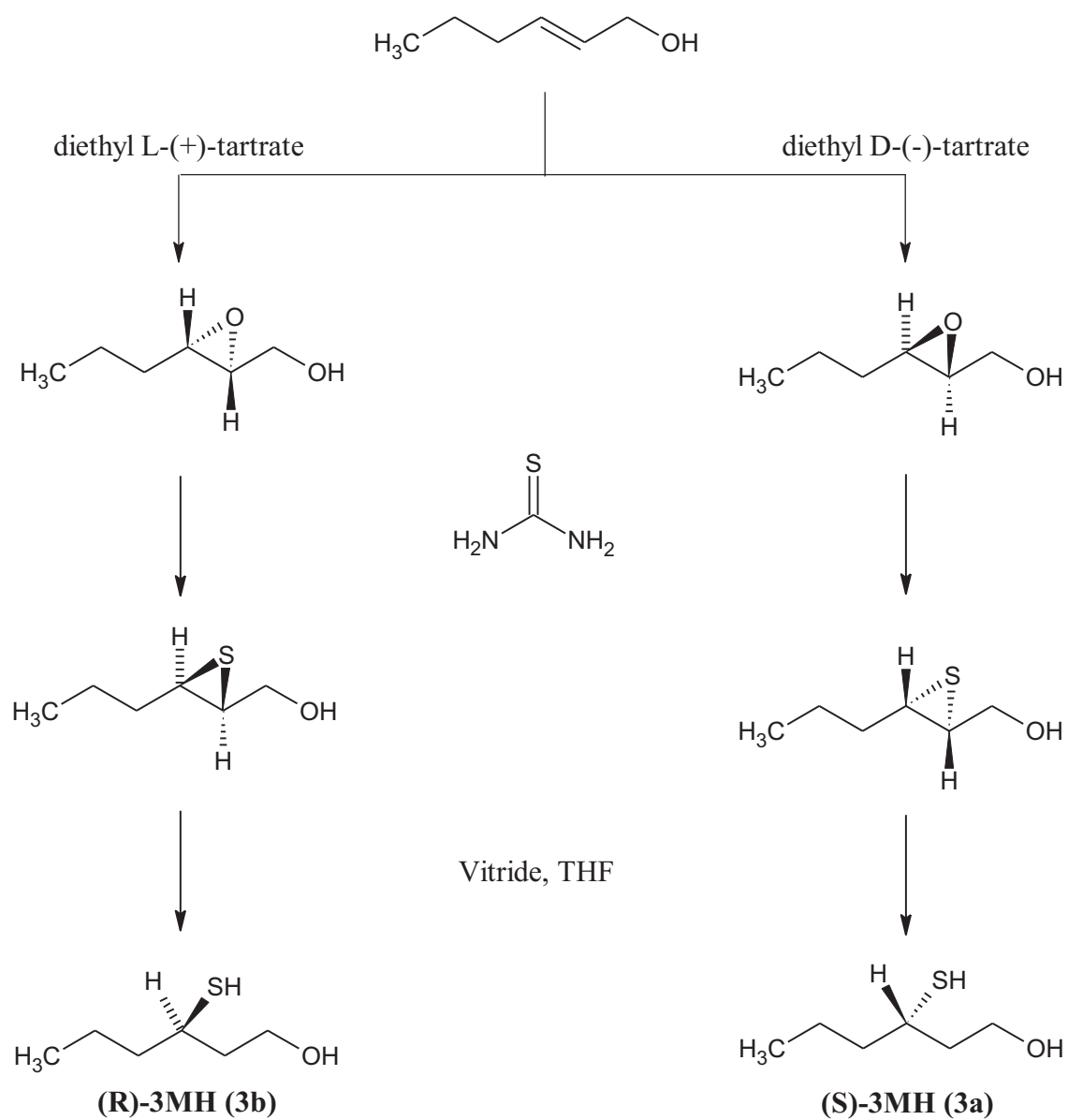


Figure 6: Weckerle's enantioselective synthesis of 3MH (3)

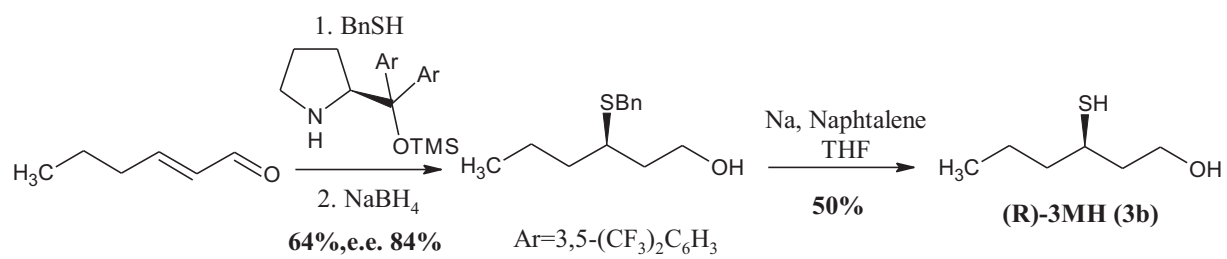


Figure 7: Scafato's enantioselective synthesis of (R)-3MH (**3b**)

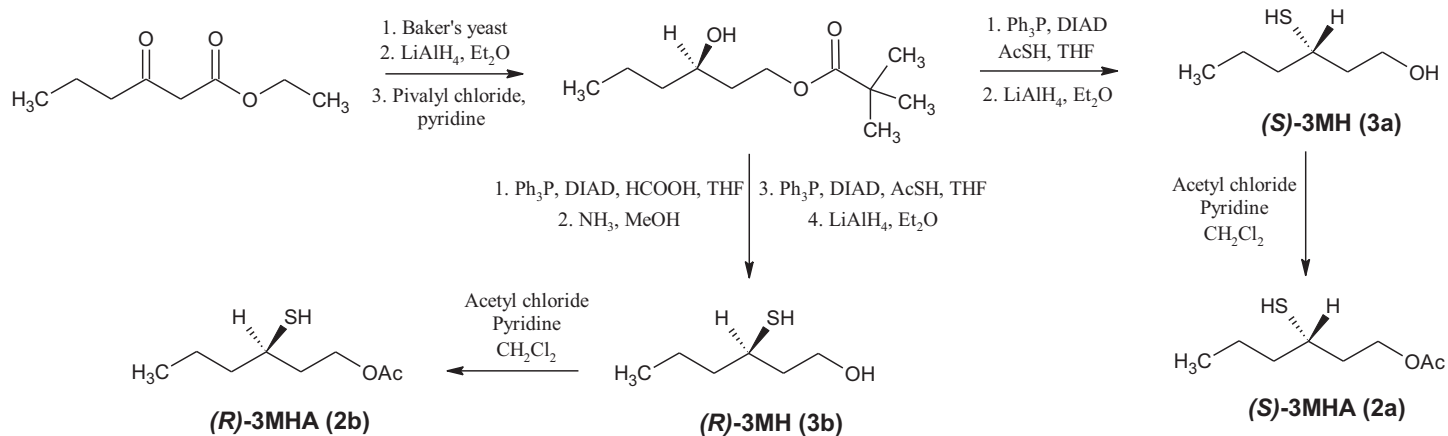


Figure 8: Enantioselective synthesis of 3MH (**3a** and **3b**) and 3MHA (**2a** and **2b**) according to Tominaga *et al.* method

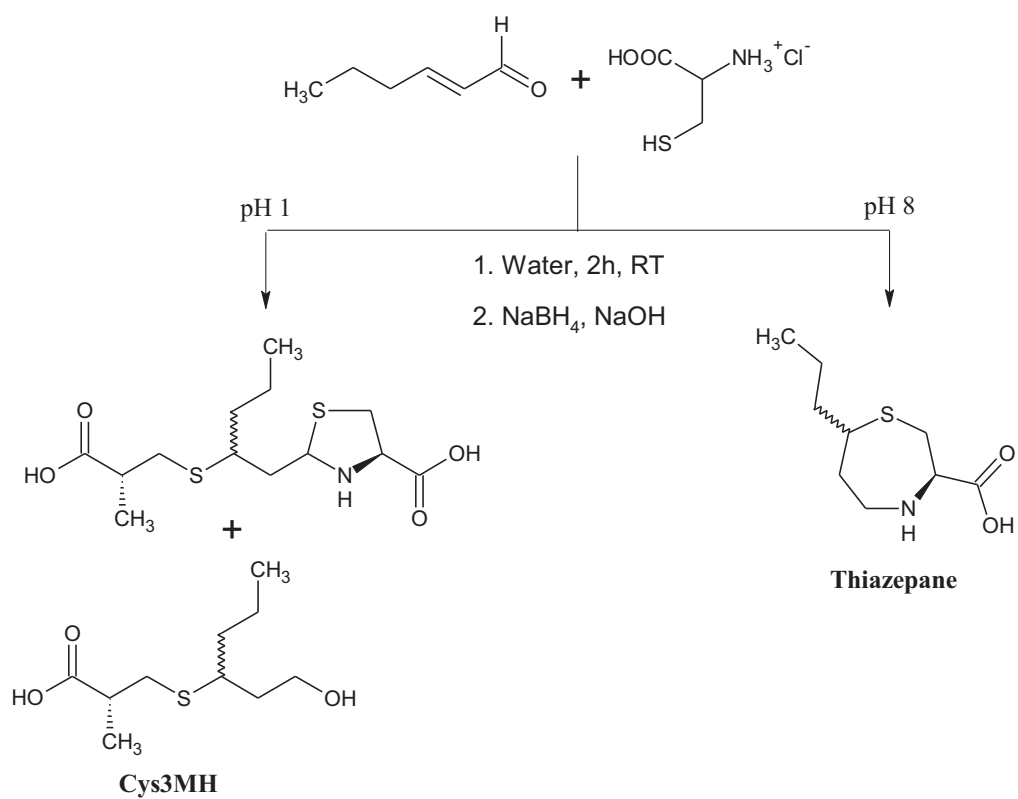


Figure 9: Influence of pH on Cys3MH synthesis

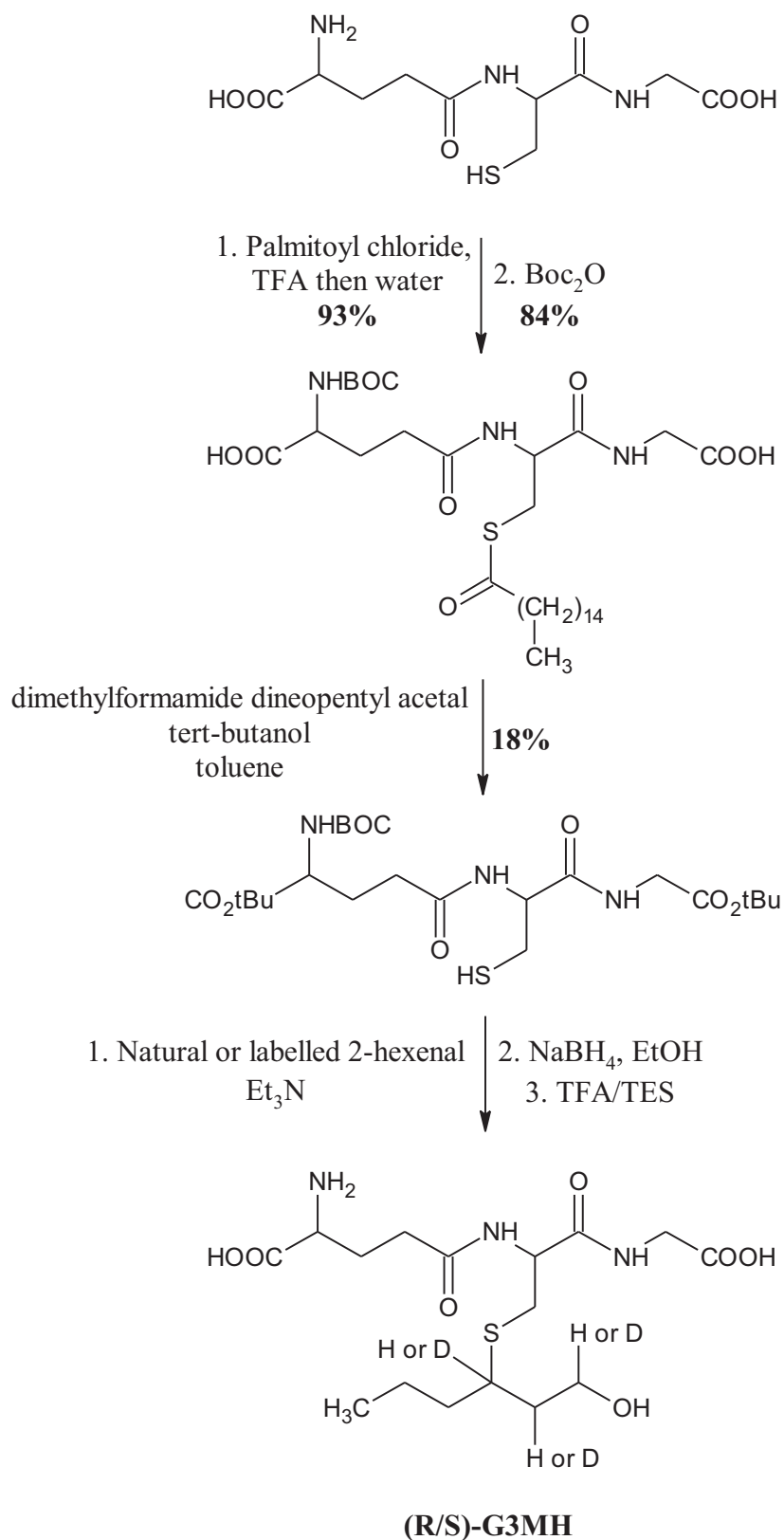


Figure 10: Roland's synthesis of natural and deuterated (R/S)-G3MH

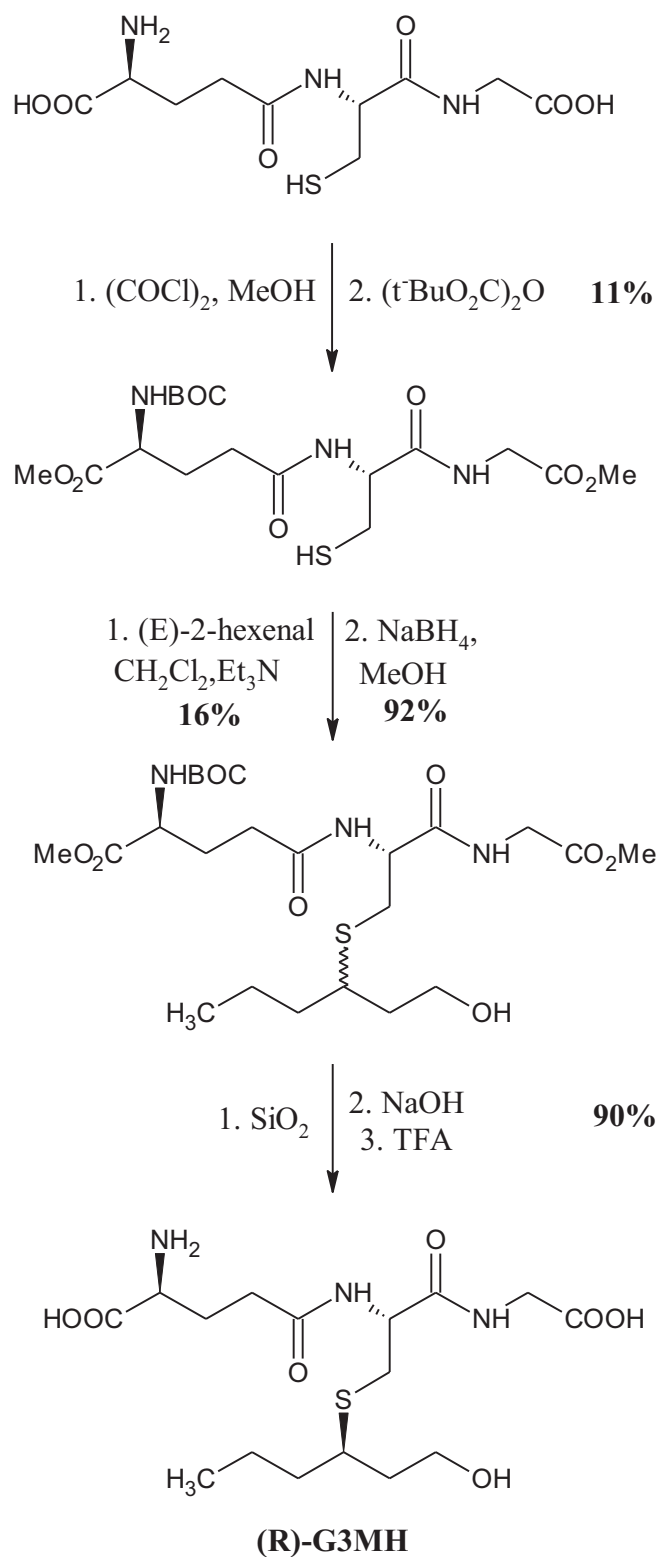


Figure 11: Grant-Preece's synthesis of (R)-G3MH

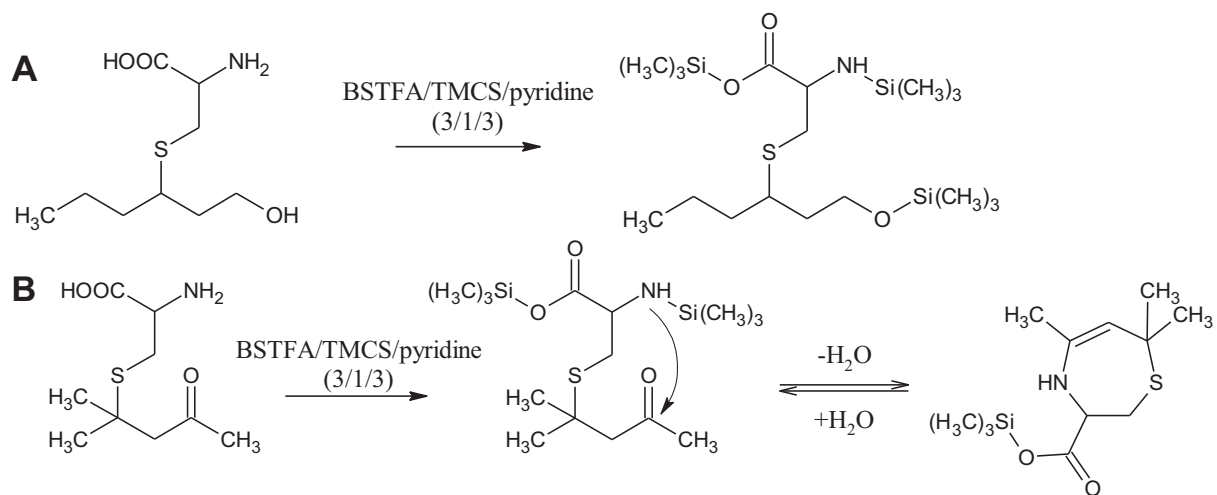


Figure 12: Tominaga's derivatisation procedure to afford trimethylsilylated derivatives of Cys3MH (A) and Cys4MMP (B)

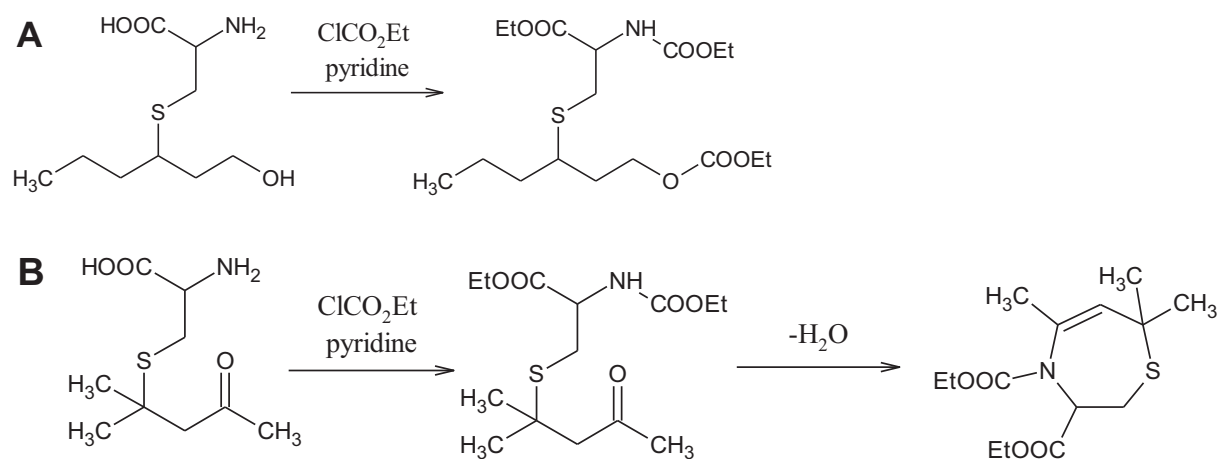


Figure 13: Dagan's derivatisation procedure based on ECF/pyridine for the Cys3MH (A) and the Cys4MMP (B)



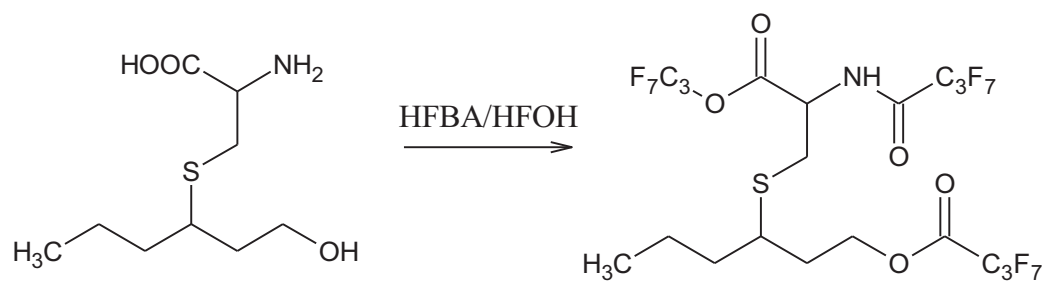


Figure 14: Thibon's derivatisation procedure for the separation of both diastereomers of the Cys3MH

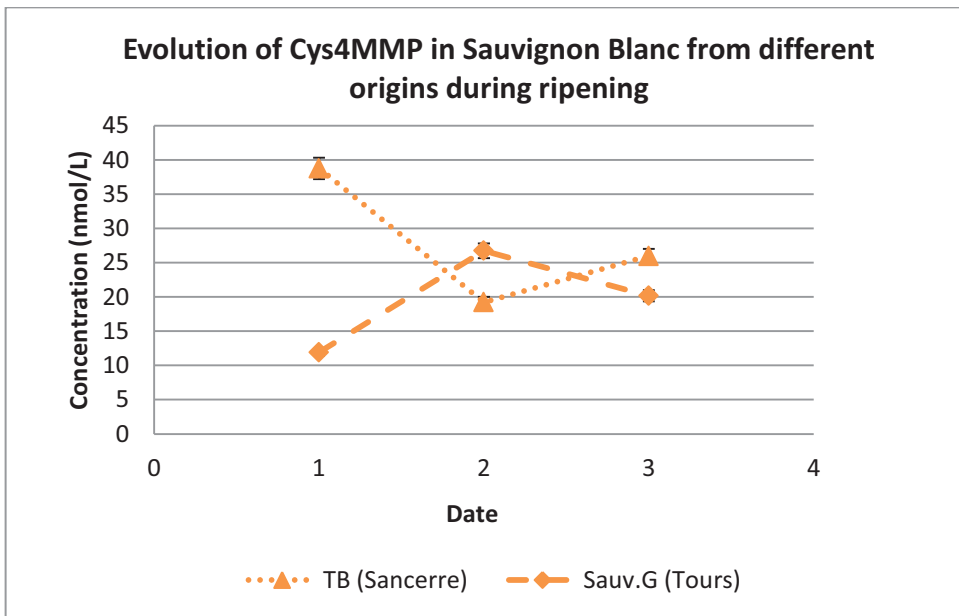
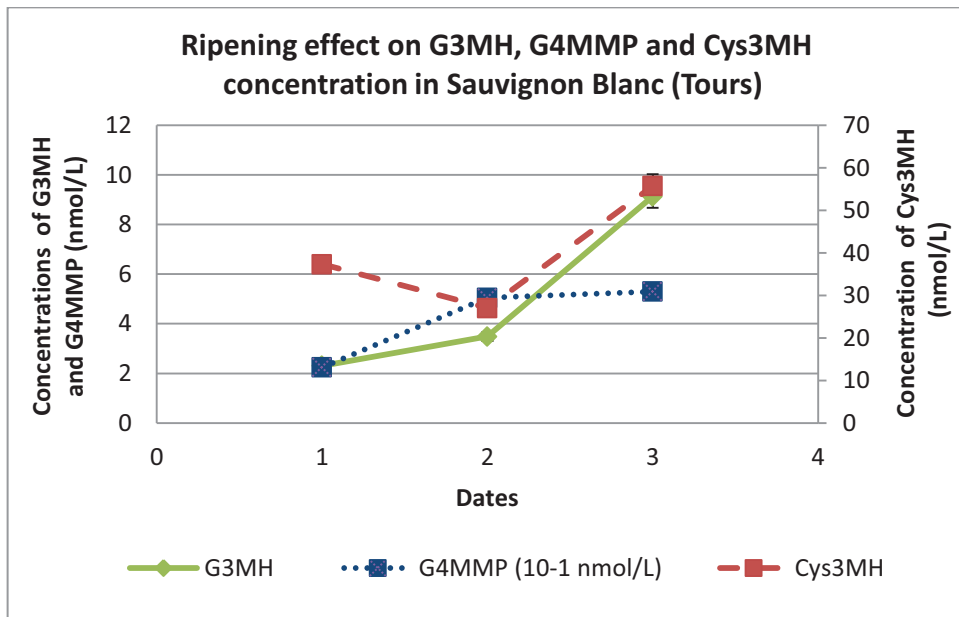


Figure 15: Influence of ripening on cysteinylated and glutathionylated precursors of 3MH and 4MMP for Sauvignon Blanc grapes from Sancerre and Tours. From Roland et al., 2010<sup>65</sup>.

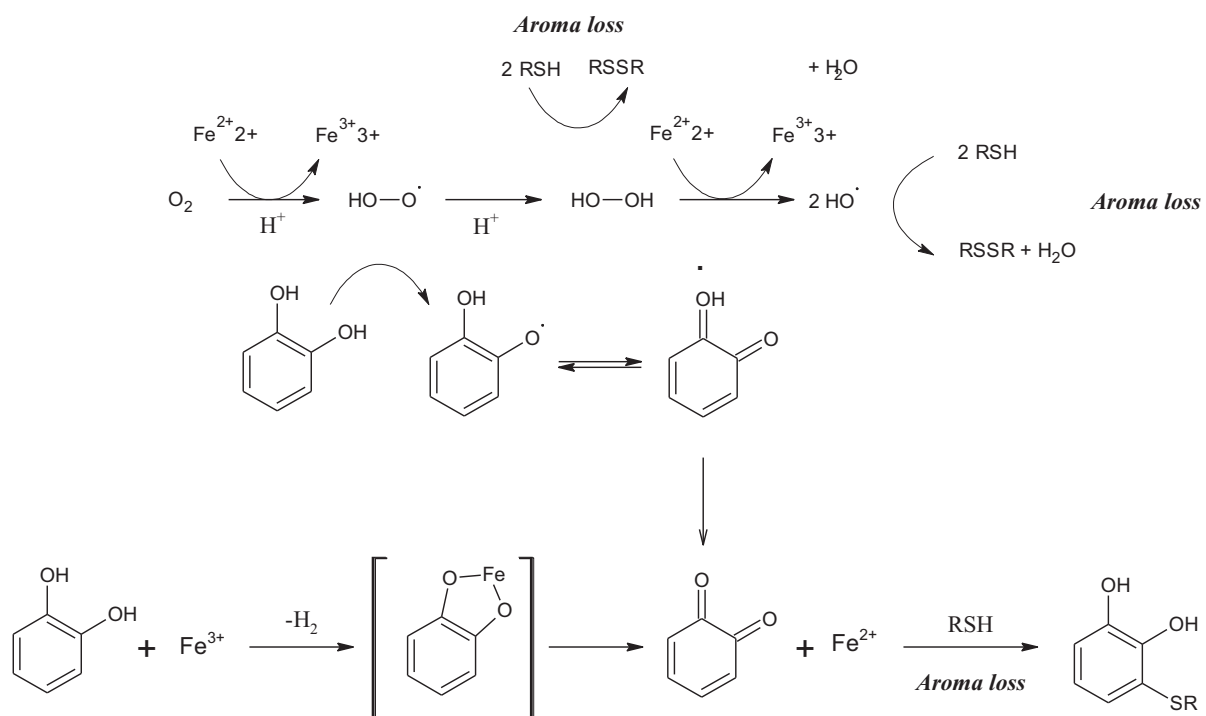


Figure 16: Possible mechanisms involved in the thiols trapping in presence of oxygen according to Nikolantonaki *et al.*