



LE DOSAGE DES THIOLS VOLATILS

Dans un marché très concurrentiel, la typicité aromatique des vins n'a jamais été autant d'actualité. Cela passe inévitablement par une meilleure connaissance des composés impliqués. Parmi les différents types d'arômes, les arômes variétaux revêtent d'une importance toute particulière car ils reflètent en grande partie les conséquences du terroir, des pratiques viticoles ainsi que les pratiques œnologiques. Dans cette famille, les thiols volatils ont été parmi les premiers à être identifiés. Ces arômes variétaux sont désormais des marqueurs importants pour qualifier la typicité de certains produits ou bien essayer de caractériser certaines nuances. Les thiols volatils contribuent aussi fortement aux caractères de fraîcheur et de fruités très appréciés actuellement par les consommateurs.

Si la révélation des thiols et l'obtention de concentrations significatives et stables dans les produits finis constituent un véritable défi pour le vinificateur, le dosage précis de ces composés au laboratoire n'en demeure pas moins tout aussi exigeant. Si les thiols volatils sont désormais passés dans le langage courant de l'œnologue, pour le technicien au laboratoire cela reste certainement l'une des analyses les plus sophistiquées tant la sensibilité et la stabilité de ces molécules sont atypiques.

Cette note bibliographique propose donc de reprendre les différents aspects liés à cette thématique tout en se focalisant principalement sur les aspects analytiques. En deuxième partie de document, des analyses réalisées sur un échantillon de 20 vins blancs d'origines différentes sont confrontées aux dégustations réalisées par une dizaine de dégustateurs entraînés laissant présager que de nombreux travaux restent encore à mener pour caractériser précisément certaines perceptions aromatiques.

LES COMPOSÉS IMPLIQUÉS

Les composés soufrés comme les sulfures ou les thiols font partie des molécules naturelles possédant un des plus forts pouvoirs odorants. Dans le vin, les travaux du laboratoire du professeur Denis Dubourdieu de l'Université de Bordeaux avec Philippe Darriet et Takatochi Tominaga dans les années 90, sont à l'origine de l'identification des principaux thiols variétaux du Sauvignon blanc. Il ressort de ces travaux que principalement trois thiols sont à l'origine de l'arôme caractéristique du Sauvignon, le 4MSP (4-sulfanyl-4-méthylpentan-2-one ; ou 4MMP), le 3SH (3-sulfanylhéxanol ; ou 3MH) et le 3SHA (3-sulfanylhéxylacétate ; ou A3MH). Ces trois molécules participent au profil aromatique avec des notes respectivement de bourgeon de cassis, buis, genêt, pamplemousse et fruit de la passion. Les seuils de perception en solution modèle sont parmi les plus faibles connus à ce jour avec 0.8 ng/L, 60 ng/L et 4 ng/L respectivement.

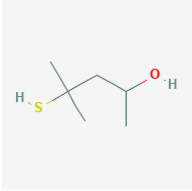
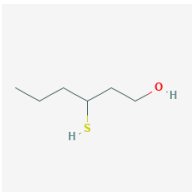
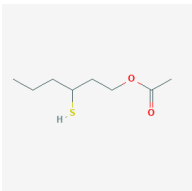
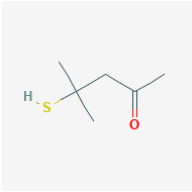
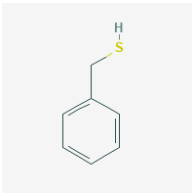
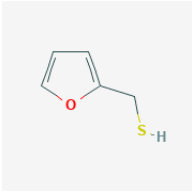


La détermination de l'origine de ces molécules dans le vin a fait l'objet de travaux plus récents (Thibon et al., 2010 ; Rolland et al., 2011). Pour la 4MSP et le 3SH, des précurseurs S-conjugués inodores liés à la cystéine et au glutathion ont été identifiés dans les baies de raisin. Une voie de biogénèse spécifique au 3SH a aussi été mise évidence impliquant des composés insaturés en C6 (comme l'hexénal). Durant la fermentation alcoolique, la levure via une activité β -Lyase clive ces précurseurs (présents dans le moût à des concentrations allant jusqu'à plusieurs dizaines de $\mu\text{g/L}$) en thiols odorants. La formation du 3SHA est plus singulière par rapport au deux thiols précédents car elle provient de l'acétylation du 3SH par la levure. Les interactions entre 3SHA et 3SH restent toutefois complexes, il a été démontré une conversion possible du 3SHA en 3SH par hydrolyse de la fonction acétate conjointement à l'oxydation des fonctions thiols lors de la conservation en bouteilles (Herbst-Johnstone et al 2011). L'identification de ces voies de biosynthèse a généré des travaux de sélection de souche de levures favorisant la révélation de ces arômes. Des paramètres physicochimiques comme la température, la concentration en nutriments azotés ou la turbidité ont été identifiés comme étant aussi des facteurs importants de la production des thiols aromatiques pendant la fermentation alcoolique.

Bien d'autres thiols d'intérêts dans le vin ont aussi fait l'objet d'étude comme le 3-sulfanylpentan-1-ol ou le 3-sulfanyl-3-méthylbutan-1-ol, mais les concentrations mesurées dans les vins pour ces composés sont inférieures à leurs seuils de perceptions respectifs. Toutefois, d'autres thiols odorants ont aussi été identifiés et corrélés à des notes aromatiques dans les vins. C'est le cas du 4-sulfanyl-4-méthylpentan-1-ol (4MSPOH ou 4MMPOH) un thiol variétal pouvant apporter des notes de zestes de citrons au vin quand il est présent en concentration supérieure à son seuil de perception (55 ng/L). Le benzène-méthane-thiol (BMT), dont la genèse n'a pas été clairement identifiée, participe au profil aromatique de certains vins avec des notes de pierre à fusil, fumé (seuil de perception olfactif très bas de 0.3 ng/L) certainement impliquées dans les phénomènes de perceptions de notes minérales. Pour le 2-furfurylméthane-thiol (2-FT) molécule possédant des arômes de café (seuil de perception de 0.4 ng/L), il a été démontré son impact aromatique dans des vins vinifiés au contact du bois de chêne, le furfural libéré par le fût étant réduit puis substitué en présence d' H_2S pour former le 2-FT.

Même si ces thiols variétaux sont potentiellement présents en concentrations importantes dans les vins (supérieures à leurs seuils de perceptions respectifs) et que dans certains cas le lien entre les perceptions olfactives et les concentrations en thiols sont évidentes (Lund et al 2009), dans d'autres cas, les interactions avec certains arômes (pyrazines...) ou l'état réductif ou oxydatif des vins, rendent l'évaluation olfactive prédictive difficile pour ces composés soufrés (King et al. 2011, Green et al. 2011).

TABLEAU 1 : LES THIOLS VOLATILS AYANT ÉTÉ IDENTIFIÉ DANS LE VIN

NOM	FORMULE	CAS	SEUIL DE PERCEPTION EN SOLUTION MODÈLE	ODEUR
4-sulfanyl-4-méthylpentan-2-one (4MSP)		[19872-52-7]	0.8 ng/L	Bourgeon de cassis, buis
3-sulfanylhexanol (3SH)		[51755-83-0]	60 ng/L	Pamplemousse
3-sulfanylhexylacetate (3SHA)		[136954-20-6]	4 ng/L	Fruit de la passion
4-sulfanyl-4-méthylpentan-2-ol (4MSPOH)		[31539-84-1]	55 ng/L	Zest de citron
Benzène méthanthiol (BMT)		[100-53-8]	0.3 ng/L	Pierre à fusil
2-Furfurylméthanthiol (2FT)		[98-02-2]	0.4 ng/L	Torréfié, Café

ANALYSE DES THIOLS

D'un point de vue analytique, les thiols sont des composés nécessitant des méthodologies complexes du fait de leurs réactivités et des niveaux de concentration extrêmement faibles qu'il est nécessaire d'atteindre pour être en mesure de doser ces molécules au niveau de leur seuils de perceptions. Depuis les travaux de Darriet et Tominaga en 1995 ayant permis d'isoler et quantifier ces thiols variétaux dans le vin, plusieurs approches ont été testées pour faciliter ce dosage. En effet, les travaux originaux nécessitaient un volume d'échantillon (1000 mL) et de solvants d'extraction (300mL éther/pentane) importants. De plus ils utilisaient un dérivé mercurique (p-HMB) très toxique et très polluant. L'extrait ainsi obtenu était analysé en chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à un photomètre de flamme (FPD) ou à un spectromètre de masse (MS). Outre le fait de permettre une quantification au niveau du ng/L du 4MSP, 3SH et 3SHA, l'avantage de ce type de méthodologie est de garder l'intégrité chimique de ces composés facilitant leur identification (spectrométrie de masse) et leur reconnaissance olfactive (chromatographie en phase gazeuse couplée à de l'olfactométrie GC-O). Cette méthodologie reste lourde et fastidieuse (très peu d'échantillons analysables dans une journée), les laboratoires de recherche ont tout d'abord essayé de réduire la prise d'échantillon et faciliter l'extraction en utilisant une immobilisation du p-HMB (p-Hydroxy-mercuribenzoate) sur support solide. Plus récemment encore, d'autres techniques d'extraction / concentration ont été utilisées pour encore faciliter l'isolation des ces composés (SPE à base d'Ag⁺, SPME, SBSE). La sensibilité requise étant toujours difficile à atteindre, différents agents de dérivatisation ont aussi été testés comme le PFBBR (pentafluorobenzylbromide), ETP (éthylpropiolate), NEM (N-éthylmaléimide), OPA (o-phthaldialdéhyde), Ebselen (2-Phenyl-1,2-benzoselenazol-3-one), DTDP (4,4'-Dithiodipyridine) pour améliorer l'analyse des thiols, avec la contrepartie de ne plus pouvoir utiliser la GC-O (et dans certains cas de ne pas permettre le dosage de toutes les molécules suivant la facilité de la réaction de dérivatisation en fonction de la nature chimique). La démocratisation des techniques de chromatographie et spectrométrie de masse en tandem (MSMS) de plus en plus performantes ont aussi permis de simplifier le dosage.

L'utilisation d'étalon interne deutéré, qui réagit de manière identique lors des étapes d'extraction et d'analyse que le composé d'intérêt ciblé, est une solution intéressante pour apporter de la fiabilité et de la robustesse dans le processus d'analyse de molécules aussi sensibles que les thiols dans une matrice complexe comme le vin. De nombreux travaux démontrent la difficulté de ce dosage dans des vins blancs ou rouges, possédant des niveaux d'oxydation différents par rapport au dosage dans un simulant vin (EtOH% 12%, acide tartrique 5g/l, pH = 3.7). Cet étalonnage interne à l'aide de molécule deutérée, même s'il permet d'appréhender certaines évolutions de la matrice ou des variabilités lors du processus d'extraction, reste toutefois sensible dans le cas de matrice oxydée (MATEO-VIVARACHO et al. 2008).

Après avoir longtemps utilisé la méthodologie améliorée de TOMINAGA et al. (1998), avoir testé quasiment toutes ces solutions analytiques présentées ci-dessus, au laboratoire EXCELL nous avons finalement choisi et adapté la méthode développée en Australie par Capone et al (2015) qui après une extraction rapide sur cartouche SPE C18 et une dérivatisation des thiols au 4,4'-Dithiodipyridine (DTDP), dose les dérivés obtenus en LC-MSMS (LC 1290 Agilent, MSMS 6460C Agilent ; colonne C18 ZORBAX Eclipse Plus 2,1x150mm ; 1,8µm ; Eluant A acide Formique 0.1% dans H₂O, Eluant B Acide Formique 0.1% dans MeOH ; débit 0.6 ml/min ; injection 5µl), avec une sensibilité inférieure ou au niveau du ng/L pour tous les thiols ciblés (utilisation des étalons internes 4-chlorobenzenemethanethiol et 3SHd5). Cette évolution nous a permis de passer de 6 échantillons analysables par jour à 24 et de cibler le 4MSP, 3SH, 3SHA, 4MSPOH, BMT, FT. Pour compléter les thiols analysables avec cette méthodologie, nous travaillons actuellement à rajouter les thiopyrroles pour contribuer à la compréhension des arômes des grands vins de Chardonnay.

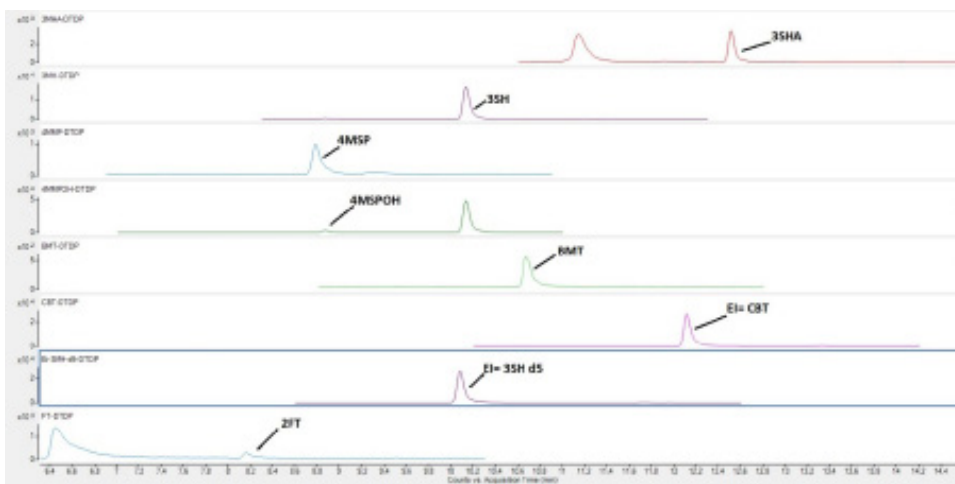


FIGURE 1 :
CHROMATOGRAMME
D'UN STANDARD DE
THIOLS OBTENU
EN LC-MSMS

TABLEAU 2 : SPÉCIFICITÉS DE LA MÉTHODE DTDP LC-MSMS

THIOLS	TRANSITION MSMS	LQ (ng/L)	GAMME DYNAMIQUE	INCERTITUDES
A3MH	286.4 → 111	0,4	0,4 - 1000 ng/L	25%
3MH	244.1 → 144	3.0	3,0 - 15000 ng/L	
4MMP	242.2 → 143.9	0,3	0,3 - 1200 ng/L	
4MMPOH	244.1 → 143.9	2.0	2,0 - 1100 ng/L	
BMT	234.3 → 143	0,4	0,4 - 1200 ng/L	
FT	224.3 → 142.9	6,6	6.6 - 1400 ng/L	

TABLEAU 3 : SYNTHÈSE DES MÉTHODES P-HMB ET DTDP PRATIQUÉES

	MÉTHODE p-HMB	MÉTHODE DTDP	AVANTAGES / INCONVÉNIENTS
Temps de préparation	8 heures / 6 échantillons	8h / 24 échantillons	Rapidité de la méthode DTDP
Volume d'échantillon requis	50 mL	20 mL	Volume réduit pour la méthode DTDP
Traitement de l'échantillon	SPE avec immobilisation du p-HMB, élution cystéine	SPE C18	Simplicité de la méthode DTDP
Coût matériel	GC-MS	LC-MSMS	Coût inférieur du couplage GC-MS (~3 fois moins)
Sensibilité (LQ = limite de quantification)	LQ 3SH= 35 ng/L	LQ 3SH = 3.0 ng/L	Sensibilité de la méthode DTDP

COMPLEXITÉ DE LA DÉGUSTATION ET DU DOSAGE DES COMPOSÉS AROMATIQUES DES VINS BLANCS

Pour illustrer la complexité du dosage des thiols volatils et la dégustation de ces composés, nous avons réalisé au printemps 2020 la dégustation d'une vingtaine de vins blancs issus de différentes appellations et différents millésimes par un dizaine de personnes, œnologues et dégustateurs avertis. En complément, des dosages de thiols (méthode DTDP-LCMSMS) et esters (méthode SPME GCMS) ont été réalisés sur ces différents vins.

TABLEAU 4 : LISTE DES VINS DÉGUSTÉS ET ANALYSÉS

	VIN	MILLÉSIME	OBTURATEUR	CÉPAGES
1	VdU		Conservation en BIB	
2	Entre deux Mers	2017	Diam 1	Sauvignon 70% Sémillon 25% Muscadelle 5%
3	VdF 1	2019	Capsules à vis	Chardonnay
4	VdFb2	2018	Nomacorc Classic Green	Sauvignon
5	Nouvelle Zélande 1	2017	Capsules à vis et plastique	Sauvignon
6	VdP	2018	Syntek	Colombard Sauvignon
7	Pessac-Léognan	2017	Liège Naturel	Sauvignon, Sémillon
8	VdF A	2019	Capsules à vis	Sauvignon
9	Côtes de Gascogne 1	2017	Diam 1	Gros Manseng, Sauvignon
10	Bourgogne Aligoté	2018	Diam 5	Aligoté
11	Bordeaux AOP	2019	Syntek	Sauvignon
12	VdF B	2019	Capsules à vis	Sauvignon
13	Australie	2019	Capsules à vis	Colombard Chardonnay
14	Côtes de Gascogne 2	2018	Nomacorc	Colombard Ugni blanc
15	VdF C	2019	Capsules à vis	Sauvignon
16	Bordeaux AOC	2018	Diam3	Sauvignon 80% Sémillon 20%
17	Nouvelle Zélande 2	2017	Capsule à vis	Sauvignon 100%
18	VdF	2018	Diam5	50% Colombard, Ugni blanc 20%, Muscadelle 10%, petit Courbut 10%, Sauvignon gris 10%
19	Vin de Pays d'OC	2018	Bouchon Verre	Sauvignon 100%
20	Riesling Allemand	2018	Nomacorc	Riesling

Pour la fiche de dégustation, une notation de 0 à 5 a été proposée (0 = pas de perception 5 = très intense) avec les critères suivants (Intensité aromatique globale ; Note pamplemousse ; Note fruit de la passion ; Note Buis/genêt ; Note citronnée ; Note minérale ; Note fermentaire (banane, rose, bonbon anglais...) ; Note résineuse ; Perception soufré ; Niveau Red/Ox (1=réduit, 5=oxydé) ; Complexité).



Pour les données analytiques, nous avons dosé les esters (éthyle propionate, éthyle isobutyrate, isobutyle acétate, butyrate d'éthyle, éthyle 2-méthylbutyrate, isovalérate d'éthyle, acétate d'isoamyle, hexanoate d'éthyle, acétate d'héxyle, octanoate d'éthyle, décanoate d'éthyle, salicylate d'éthyle, salicylate de méthyle, acétate de phényl éthyle, 2-phényléthanol) au $\mu\text{g/L}$ et les thiols (4MSP, 3SH, A3SH, FT, 4MSPOH, BMT) au ng/L . Pour simplifier l'interprétation des concentrations mesurées pour les esters pour chaque vin, chaque concentration en ester a été divisée par son seuil de perception.

Par exemple, pour le décanoate d'éthyle qui est caractérisé par des saveurs florales avec un seuil de perception indicatif de $200\mu\text{g/l}$, chaque concentration mesurée est divisée par 200. Finalement, la somme de tous ces ratios est réalisée pour définir le paramètre Esters/seuil ($= \sum \text{Conc./Seuil de perception}$).

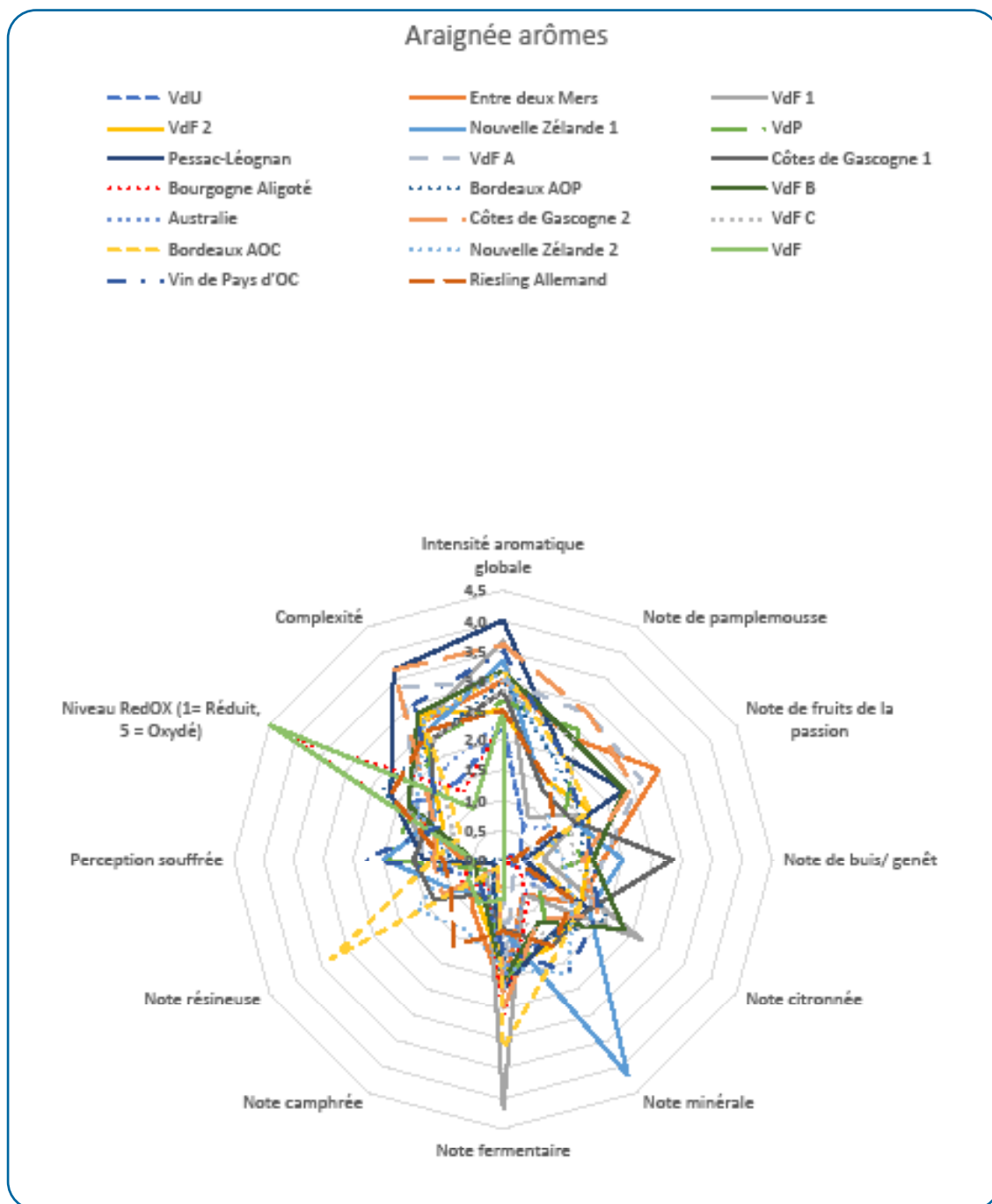
Pour tous les vins, les moyennes des notes de dégustation ont été placées dans le diagramme araignée (figure 2). Par comparaison avec les concentrations mesurées on peut essayer de lier les descripteurs aux niveaux de concentration mesurés :

- Le vin ayant reçu la note la plus élevée pour « minérale » (Nouvelle Zélande 1) présente aussi la concentration en BMT la plus haute, loin devant les autres vins, ce qui est parfaitement mis en évidence par tous les dégustateurs ;
- Le vin ayant reçu la note la plus élevée pour « fermentaire » (VdF 1) est un vin du dernier millésime (2019) présentant aussi le ratio le plus haut en Esters/Seuil corrélant là aussi la dégustation ;
- Le vin ayant la note la plus élevée pour « pamplemousse » (3ème pour « fruit de la passion ») se détache nettement des autres vins par des concentrations les plus élevées en 3SH et A3SH (Entre deux Mers) ;
- Les deux vins ayant eu la note globale la plus haute pour « oxydé » (VdF et Bourgogne Aligoté) ont au contraire les notes les plus faibles pour toutes les caractéristiques associées au thiols (pamplemousse, buis, fruit de la passion, citronné) et esters, avec une bonne corrélation par rapport au données analytiques, les deux vins présentant les concentrations les plus faibles en thiols (Bourgogne aligoté) et en esters (VdF).

Au contraire, certaines notes de dégustation ne sont pas aisément corrélées avec des paramètres analytiques :

- La perception buis/genêt n'est pas liée avec les concentrations mesurées en 4MSP comme attendu ;
- Le vin ayant les notes les plus élevées en « intensité aromatique globale » et « complexité » (Pessac-Léognan) ne présente aucune valeur haute pour les différents descripteurs aromatiques retenus, très certainement car pour le vin en question l'élevage en fûts neufs avait contribué à accorder la complexité et l'intensité aromatique.

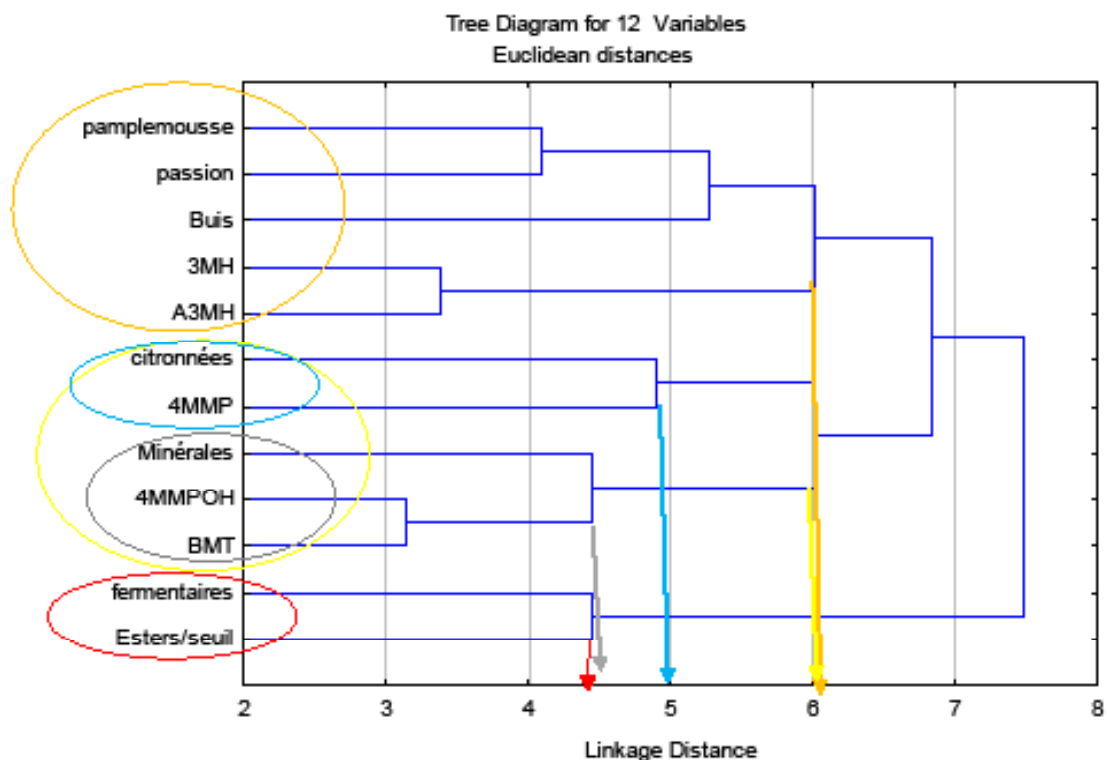
FIGURE 2 : MOYENNES DES NOTES AROMATIQUES DES DÉGUSTATEURS



Une étude statistique des données de dégustation et des dosages a été réalisée à l'aide du logiciel STATISTICA 7.0, les données ont été préalablement centrées réduites pour pouvoir les exprimer sur la même échelle et étudier les variations en CAH (Classification Ascendante Hiérarchique).

Le dendrogramme obtenu pour cette dégustation de vins blancs permet de fournir des informations sur les rapprochements que fait le dégustateur entre les descripteurs d'arômes et les résultats analytiques. Les paramètres sont rapprochés en ordonnés en fonction de leur corrélation, plus ils sont proches et plus les paramètres sont liés. Pour mesurer ce rapprochement, la distance de liaison (DL) en abscisse donne une valeur calculée statistiquement permettant d'évaluer cette affinité. Un exemple de classification obtenue est proposé en figure 3 en travaillant sur 12 variables liées aux notes et mesures des thiols et esters.

FIGURE 3 : DENDROGRAMME OBTENU POUR UN DÉGUSTATEUR SUR LA SÉRIE DES 20 VINS BLANCS DÉGUSTÉS ET ANALYSÉS



Le dendrogramme obtenu pour ce dégustateur permet de lier :

- La note fermentaire et la mesure des esters avec une distance de liaison de 4,4 (en rouge). Ce rapprochement est fait par tout les dégustateurs plus ou moins aisément, les distances de liaison variant de 3,8 à 5,2. Ce dégustateur dissocie complètement la note fermentaire de toutes les autres notes associées aux descripteurs des thiols (liaison la plus éloigné DL=7.5) ;
- La note minérale est liée à la concentration en BMT (elle-même liée analytiquement sur cette série au 4MSPOH) avec une distance de liaison de 4,5 (en gris). Les autres dégustateurs lient la note minérale au BMT (DL = 4,4 à 6.0) hormis pour le dernier dégustateur cette relation n'étant pas évidente, le rapprochement intercalant aussi les autres composés thiolés 3SH et A3SH avec une DL de 6,4 ;
- Ce dégustateur rapproche la note citronnée avec le 4MSP (en bleu) avec une DL de 4,8, on s'attendrait plutôt à un rapprochement de cette note avec le 4MSPOH ayant le descripteur olfactif « zeste de citron » (en jaune, DL=6) ;
- Les notes pamplemousse, passion et buis sont regroupées (en orange) avec les paramètres 3SH et A3SH (DL = 6) et ce rapprochement est aussi réalisé par un autre dégustateur (DL=6,2). Globalement les dégustateurs ont rapproché de manière globale, les notes pamplemousse, buis avec en plus citronnée ou passion avec le 3SH et l'A3SH (DL = 6 à 6,7).

CONCLUSION

Les dernières évolutions de nos méthodes de dosage des thiols volatils nous permettent maintenant de quantifier un nombre élargi de composés (3SH, A3SH, 4MSP, 4MSPOH, BMT, FT) au niveau des seuils respectifs des ces molécules en solution modèle pour caractériser les principales notes aromatiques des principaux cépages blancs.

La dégustation illustré ici a permis de mettre en évidence la complexité des perceptions aromatiques ainsi que la complexité du champ lexical pouvant être associé à certains arômes potentiellement en fonction du niveau de concentration ou de la synergie de certaines molécules. Cette liaison apparait comme correctement faite par les dégustateurs de cette étude pour la note « fermentaire », les dosages des esters réalisés expliquant assez fidèlement la perception des dégustateurs. De même, cette liaison entre le caractère minérale, pierre à fusil est correctement réalisée pour la grande majorité des dégustateurs.

Plus d'informations

Stéphane BOUTOU : sboutou@labexcell.com - 07 85 04 19 66

Cécile BERGIA : cbergia@labexcell.com - 06 07 38 21 26

Vincent RENOUF : vrenouf@labexcell.com - 07 89 63 65 54