

MISE EN ÉVIDENCE D'UN S-CONJUGUÉ DE LA CYSTÉINE, PRÉCURSEUR D'ARÔME DU SAUVIGNON

A S-CYSTEINE CONJUGATE, PRECURSOR OF AROMA OF WHITE SAUVIGNON

T. TOMINAGA, Isabelle MASNEUF* et D. DUBOURDIEU

Faculté d'Œnologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération, 33405 Talence (France)

Résumé : La 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one (4-MMP), composé responsable des nuances « buis » ou « genêt » dans l'arôme des vins de Sauvignon, peut être libérée *in vitro* à partir d'un extrait de moût de ce cépage par un broyat cellulaire bactérien d'*Eubacterium limosum* possédant une activité β -lyase des S-conjugués de la cystéine. La réaction se produit en présence de pyridoxal phosphate, cofacteur de désamination. Elle est inhibée par incubation préalable du substrat avec l'acétate de N-hydroxysuccimide, réactif qui se combine au groupement amine. Le même extrait bactérien est capable de libérer *in vitro* la 4-MMP à partir de la S-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine de synthèse. Par contre, la libération de la 4-MMP à partir de S-(4-méthylpentan-2-one)-D,L homocystéine ou du S-(4-méthylpentan-2-one)-glutathion est très faible. Ces expériences permettent de faire l'hypothèse que le précurseur de la 4-MMP dans le moût est la S-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine.

Abstract : 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4-MMP), a strongly odorous compound responsible for the « broom tree » or « broom plant » odour of the Sauvignon wines, can be enzymatically released *in vitro* from an odourless must extract. The enzyme source used is a cell-free extract of the gastrointestinal bacterium *Eubacterium limosum*. This crude preparation exhibits a cysteine β -lyase activity which requires the presence of pyridoxal phosphate. The release of 4-MMP is inhibited when the substrate is previously treated with N-hydroxysuccinimide acetate which reacts with a primary amine. The same bacterial extract is also able to release 4-MMP, pyruvic acid and ammonium, from S-(4-methylpentan-2-one)-L-cysteine. On the other hand, the cleavage of S-(4-methylpentan-2-one)-D,L-homocysteine and S-(4-methylpentan-2-one)-glutathione is very limited. These results suggest that the precursor of 4-MMP in Sauvignon must be a S-cysteine conjugate. Such an aroma precursor in grapes or in other fruits has never been found before.

Mots-clés : Sauvignon, arôme, précurseur d'arôme, 4-méthyl-4-mercaptopentane-2-one, S-conjugué de la cystéine, β -lyase.

Key-Words : White Sauvignon, aroma, aroma precursor, 4-methyl-4-mercaptopentane-2-one, cysteine-S-conjugate, β -lyase.

INTRODUCTION

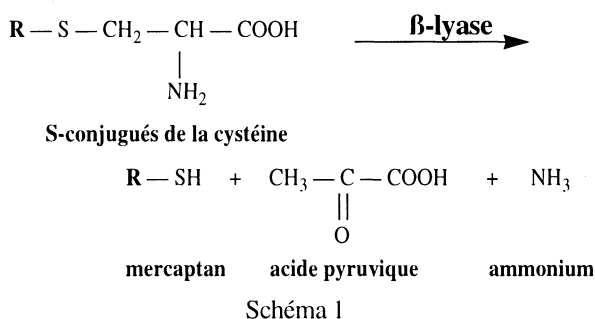
Un composé jouant un rôle déterminant dans l'arôme variétal des vins de Sauvignon, responsable des nuances « buis » ou « genêt », a été identifié : la 4-méthyl-4-mercaptopentane-2-one (4-MMP) (DARRIET, 1993; DARRIET *et al.*, 1995). Cette mercaptocétone, extrêmement odorante, apparaît dans le vin au cours de la fermentation alcoolique et provient d'un précurseur inodore du moût mis en évidence par DARRIET *et al.* (1993) et DUBOURDIEU et DARRIET (1993), mais dont la structure chimique demeure inconnue. Point capital pour le vinificateur, la transformation en arôme de ce précurseur s'effec-

tue de façon variable selon la souche de levure responsable de la fermentation alcoolique. Mais la compréhension de ce phénomène, ininterprété jusqu'ici, suppose de connaître la nature chimique du précurseur de la 4-MMP. Comme la concentration de ce composé dans les moûts est vraisemblablement très faible (quelques dizaines de ng/l), il n'est, *a priori*, pas aisé d'en purifier des quantités suffisantes pour accéder directement à sa structure par les méthodes physiques classiques. Nous avons donc essayé d'accéder directement à la structure du précurseur de la 4-MMP en utilisant une enzyme exogène capable de libérer l'arôme en espérant que la spécificité de cette enzyme nous renseigne sur la nature chimique du précurseur.

*Chargée de recherches SARCO, détachée à la Faculté d'Œnologie

Les expériences de DARRIET (1993) ont clairement montré que la 4-MMP ne peut être libérée de son précurseur par les glycosidases capables d'hydrolyser les hétérosides, précurseurs des monoterpénols et de certains dérivés norisoprénoïdes intervenant dans l'arôme des cépages muscatés, catégorie de précurseurs d'arômes aujourd'hui bien connue grâce aux nombreux travaux de CORDONNIER et BAYONOVE (1974), WILLIAMS *et al.* (1982), GUNATA *et al.* (1988, 1990), STRAUSS *et al.* (1988). Le précurseur de la mercaptopentanone n'est donc vraisemblablement pas un hétéroside.

Parmi les activités enzymatiques capables d'assurer la rupture d'une liaison carbone-soufre en libérant un thiol, la β -lyase des S-conjugués de la cystéine (EC4.4.1.13) a retenu notre attention. Cette enzyme, produite par une bactérie intestinale *Eubacterium limosum* (LARSEN, 1985 ; LARSEN et STEVENS, 1986) catalyse, en présence d'un cofacteur de désamination, le phosphate de pyridoxal, la coupure de la liaison thioéther de nombreux conjugués (S-alkyl- et S-aryl-) de la L-cystéine, en libérant, selon le schéma 1, outre le mercaptan, de l'ammonium et de l'acide pyruvique.



Une application industrielle, dans le domaine des arômes, de l'activité β -lyase est déjà connue. Il s'agit de la synthèse de p-mentha-8-thiol-3-one, à partir de la pulégone (KERKENAAR *et al.*, 1988).

Dans cet article, nous montrons que la 4-MMP peut être libérée *in vitro* d'un extrait non volatil de moût de Sauvignon, par action d'un broyat bactérien d'*Eubacterium limosum* contenant l'activité β -lyase des S-conjugués de la cystéine. De l'étroite spécificité de cette réaction, nous déduisons que le précurseur de la 4-MMP dans le moût de Sauvignon est un S-conjugué de la cystéine.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I — PRÉPARATION DU BROYAT BACTÉRIEN

La bactérie (souche : ATCC 10829) est fournie lyophilisée par la société Biovalley (F94381 Bonneuil/

Marne). Elle est cultivée dans les conditions décrites par KERKENAAR *et al.* (1988). A la fin de la phase exponentielle de croissance, la biomasse est recueillie par centrifugation (5.000 r.p.m., 10 min), lavée 2 fois dans l'eau et remise en suspension dans un volume d'eau suffisant pour obtenir une concentration cellulaire correspondant à une densité optique à 600 nm d'environ 0,5. Les bactéries sont ensuite broyées par 4 sonications de 15 sec à 35 KHz, chacune de ces opérations étant suivie de la congélation puis de la décongélation de la préparation.

II — EXTRACTION ET PURIFICATION PARTIELLE DU PRÉCURSEUR DE LA 4-MMP À PARTIR DU MOÛT DE SAUVIGNON

Un extrait partiellement purifié de précurseurs d'arômes de Sauvignon (PAS) est préparé par chromatographie sur colonne de silice greffée C18 d'un moût de Sauvignon selon la méthode décrite par DARRIET *et al.* (1993).

III — RÉVÉLATION DE LA 4-MMP À PARTIR DES PAS

Les PAS extraits de 5 l de moût sont incubés pendant 1 heure à 30°C avec 25 μ l du broyat bactérien dans 1 ml de milieu réactionnel constitué de tampon de phosphate de potassium (50 mM, pH 8,0) contenant 1 mM d'EDTA et 0,1 mM de phosphate de pyridoxal. La réaction se déroule dans un tube bouché de 5 ml. Un témoin sans broyat bactérien est incubé de la même façon. Après 1 heure, la réaction est arrêtée par extraction au solvant organique des substances volatiles formées ; on utilise 200 μ l de dichlorométhane contenant 5 μ l d'isothiocyanate de méthyl à 20 mg/l (étalon interne).

La phase organique est recueillie par centrifugation à (13.000 r.p.m., 3 min) et concentrée à 25 μ l. 2 à 4 μ l d'échantillon sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à la photométrie de flamme (FPD) ou à la spectrométrie de masse (MS) d'après la méthode décrite par CHATONNET *et al.* (1992) modifiée comme suit : chromatographe HP 5890-II ; colonne BP20 (SGE) ; spectromètre de masse HP5972.

Le dosage de la 4MMP est obtenu par comparaison avec une courbe standard.

IV — SPÉCIFICITÉ POUR LE SUBSTRAT DE LA β -LYASE DU BROYAT BACTÉRIEN

L'aptitude du broyat bactérien à couper la liaison C-S de différents substrats, en libérant de l' H_2S ou du méthanthiol, est étudiée sur les composés suivants fournis par Sigma-Aldrich Chimie (F-38297 Saint Quentin Fallavier) : L-cystéine HCl, D-cystéine HCl,

L-cystéine éthyl ester, L-cystéine méthyl ester, S-méthyl-L-cystéine, N-acétyl-L-cystéine, cystéamine, L-β-β-diméthylcystéine (ou L-penicillamine), D-L-homocystéine, cystéinyl-glycine, glutathion, S-méthyl-glutathion, L-méthionine. Au terme de l'incubation, réalisée dans des conditions identiques à celles précédemment décrites pour les PAS, 500 µl du volume gazeux de l'espace de tête sont prélevés avec une seringue et analysés par CPG-FPD selon la méthode de dosage des composés soufrés volatils légers décrite par LAVIGNE et al. (1993).

Les quantités d'H₂S et de méthane-thiol libérées dans le milieu réactionnel sont exprimées en unités arbitraires de signal du détecteur à photométrie de flamme. Les variations de ce signal sont proportionnelles aux concentrations en H₂S et méthane-thiol du milieu réactionnel. Pour chaque substrat, un témoin sans broyat bactérien est incubé et analysé dans les conditions précédemment décrites (Matériel et Méthodes, III).

L'aptitude du broyat bactérien à couper la liaison C-S de différents substrats pouvant être des formes liées de la 4-MMP est également étudiée. Dans ce but nous avons synthétisé différents composés : S-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine, S-(4-méthylpentan-2-one)-D-cystéine, S-(4-méthylpentan-2-one)-D,L-homocystéine, S-(4-méthylpentan-2-one)-cystéinylglycine, S-(4-méthylpentan-2-one)-glutathion. La S-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine est obtenue de la façon suivante. Une solution de 100 mg de L-cystéine dans 20 ml d'eau est d'abord abondamment balayée à l'azote pendant 15 min pour en éliminer les composés soufrés légers. 2 ml d'oxyde de mésityl sont ensuite ajoutés; la réaction avec la L-cystéine se déroule sous agitation, à température ambiante pendant 15h. Ensuite, la solution est évaporée à sec sous vide à 35°C et le résidu est repris dans 5 ml d'eau.

La S-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine est enfin purifiée par chromatographie sur colonne de C18 (2 x 6 cm), éluée successivement par 50 ml d'eau, puis 50 ml d'une solution aqueuse contenant 1 p. cent d'éthanol ; la S-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine, contenue dans l'éluat par 1 p. cent d'éthanol, est évaporée à sec sous vide et reprise dans 2 ml d'eau. Les autres substrats sont préparés, selon le même procédé, à partir des acides aminés ou des peptides correspondants. Les quantités obtenues sont déterminées par la méthode à la ninhydrine (ROSEN, 1957) en prenant la S-méthyl-L-cystéine comme standard. L'incubation de ces substrats (0,2 µM) avec le broyat bactérien ainsi que le dosage de la 4-MMP éventuellement libérée sont réalisés dans les conditions précisées ci-dessus (Matériel et Méthodes, III).

V — INHIBITION DE L'ACTIVITÉ β-LYASE DU BROYAT BACTÉRIEN PAR N-ACÉTYLATION DU SUBSTRAT PAR L'ACÉTATE DE N-HYDROXY-SUCCINIMIDE (NHSA)

L'action du NHSA (fournis par PIERCE) sur les PAS est conduite dans les conditions suivantes. Les PAS correspondant à 2 l de moût sont repris dans 500 µl d'eau. On ajoute 50 µl de tampon phosphate de potassium 1 M à pH 8,0 et 0,1 ou 1 µmol de NHSA. La réaction dure 2 heures à la température ambiante.

Pour N-acétyler la S-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine, on fait réagir 0,2 µmol de ce composé avec le NHSA (1 mmol) dans un tampon phosphate de potassium 0,1 M à pH 8,0 pendant 2 heures à la température ambiante. Dans ces conditions, le rendement de l'acétylation dépasse 95 p. cent.

L'incubation du broyat bactérien avec les dérivés N-acétylés de la S-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine ou des PAS, ainsi que les dosages de 4-MMP libérée sont réalisés comme décrit ci-dessus (Matériels et Méthodes, III)

VI — DÉTERMINATION DU RAPPORT MOLAI-RE DES PRODUITS FORMÉS PAR ACTION DU BROYAT BACTÉRIEN SUR LA S-(4-METHYLPENTAN-2-ONE)-L-CYSTÉINE

0,3 µmol de S-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine sont incubés pendant 4 heures dans 1 ml du milieu avec le broyat bactérien décrit au dessus. Trois échantillons sont préparés pour doser les 3 produits différents.

La 4MMP est dosée par CPG-FPD selon la méthode donnée plus haut (Matériels et Méthodes, III). La teneur en ammonium est mesurée avec le réactif Nessler (TATEISHI, 1978). L'acide pyruvique est dosé par spectrophotométrie de son dérivé avec la 3-méthyl-2-benzothiazolone hydrazone d'après la méthode de SODA (1967). Comme la S-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine et la 4-MMP sont aussi dérivées à cause de leur fonction cétone et peuvent interférer avec le dosage de l'acide pyruvique, on se place à 350 nm pour minimiser cette interaction.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I — LIBÉRATION DE 4-MMP A PARTIR DES PAS PAR ACTION ENZYMATIQUE D'UN BROYAT BACTÉRIEN (*EUBACTERIUM LIMOSUM*)

Un extrait parfaitement inodore de précurseurs d'arôme de Sauvignon (PAS) partiellement purifié de 5 l de moût est incubé avec le broyat bactérien dans

les conditions précisées ci-dessus (voir Matériels et Méthodes).

A la fin de l'incubation une forte odeur rappelant les arômes de Sauvignon se dégage du milieu réactionnel. Les composés volatils libérés sont ensuite extraits et dosés par chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection soit par photométrie de flamme, soit par spectrométrie de masse.

L'analyse par CPG-FPD (figure 1) montre un pic important de 4-MMP, indiscutablement identifié par spectrométrie de masse. Évidemment, ce pic est absent des incubations de PAS sans extrait bactérien ou avec extrait bactérien thermoinactivé.

Le broyat bactérien utilisé n'est pas une source enzymatique pure. Pour interpréter l'expérience précédente, il est indispensable de vérifier d'une part, qu'il contient l'activité β -lyase strictement spécifique des S-conjugués de la cystéine, et d'autre part qu'une inhibition caractéristique de cette activité limite l'aptitude du broyat bactérien à révéler la 4-MMP à partir des PAS.

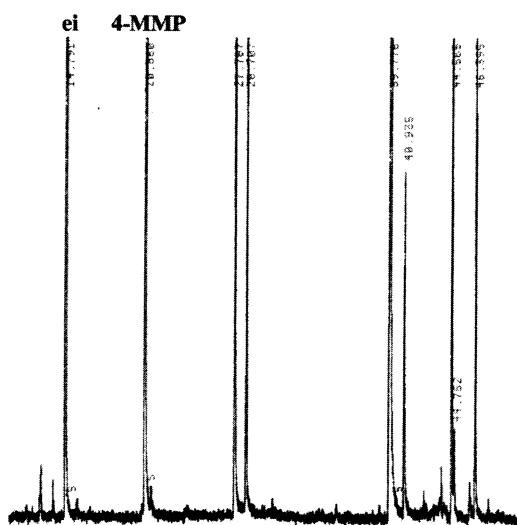


TABLEAU I

Produits formés par action du broyat cellulaire d'*Eubacterium limosum* sur la S-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine

Produit	Acide pyruvique	Ammonium	4-MMP
nmol/ml	246,2	186,7	201,9
Ratio	1,22	0,92	1,0

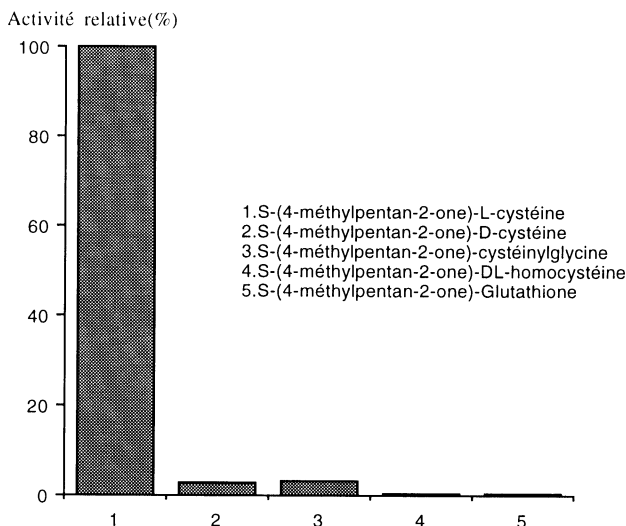


Fig. 3 - Spécificité de la C-S lyase du broyat bactérien vis-à-vis de différents S-conjugués

agir sur le substrat N-acétylé, avec pour conséquence une inhibition de l'activité β-lyase.

Ce mécanisme explique et conforte les résultats obtenus au paragraphe précédent sur la spécificité de l'activité β-lyase du broyat bactérien (figures 2 et 3). L'absence de groupement amine libre dans certains substrats empêche l'activité β-lyase. Ainsi, le broyat bactérien n'agit pas sur la N-acétyl-L-cystéine dont le groupement amine est acétylé, ni sur le glutathion et le S-méthylglutathion, composés dont le groupement amine porté par le résidu cystéine est engagé dans une liaison peptidique.

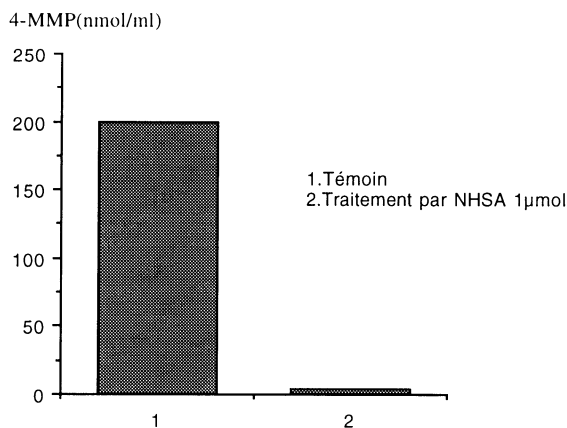


Fig. 5 — Inhibition de la libération enzymatique de la 4-MMP à partir de la S-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine traitée par le NHSA

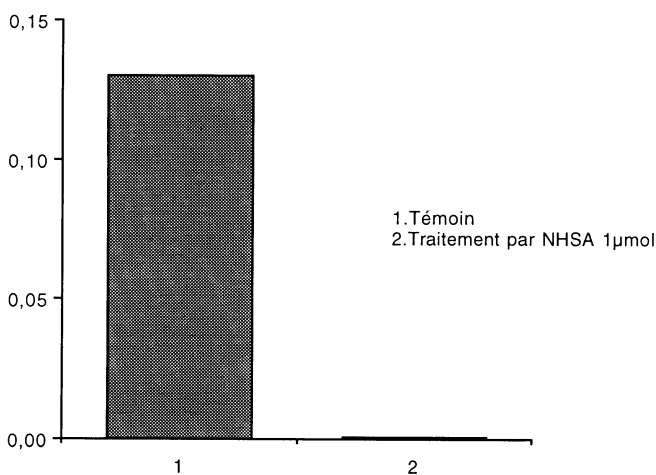


Fig. 4 — Inhibition de la libération enzymatique de 4-MMP à partir des PAS traités par le NHSA

La libération enzymatique de la 4-MMP, par action du broyat bactérien sur les PAS ou la S-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine, est inhibée par traitement préalable des substrats avec le NHSA (figures 4 et 5). Ce réactif se combine au groupement amine du substrat pour donner un dérivé N-acétylé. Dans ces conditions, le phosphate de pyridoxal, coenzyme de désamination indispensable à la réaction d'α,β-élimination, ne peut

CONCLUSION

La 4-MMP, composé très odorant intervenant dans l'arôme variétal des vins de Sauvignon, peut être libérée d'un extrait inodore du moût de ce cépage par une préparation enzymatique bactérienne possédant une activité β-lyase des S-conjugués de la cystéine (EC4.4.1.13). Le fait que cette révélation aromatique soit inhibée par les mêmes mécanismes moléculaires que la β-lyase (N-acétylation du substrat), rend très probable l'intervention de cette enzyme dans la libération de la 4-MMP à partir de son précurseur. Compte tenu de la spécificité extrêmement étroite de la β-lyase utilisée, le précurseur de la 4-MMP est très vraisemblablement un S-conjugué de la cystéine. L'existence de ce type de précurseur d'arôme n'avait jamais été envisagée jusqu'ici dans le raisin.

Remerciements : Les auteurs remercient le Docteur E. DEMOLE (Ferminich S.A., Genève) pour ses précieux conseils et le Conseil Interprofessionnel des Vins de Bordeaux pour le support financier déterminant qu'il a apporté à cette étude.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CHATONNET P., LAVIGNE V., BOIDRON J.-N. et DUBOURDIEU D., 1992. Identification et dosage de sulfures volatils lourds dans les vins par chromatographie en phase gazeuse et photométrie de flamme. *Sci. Aliments*, **12**, 513-532.
- CORDONIER R. et BAYONOVE C., 1974. Mise en évidence dans la baie de raisin, variété Muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzymes du fruit. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 278, D, 3387-3390.
- DARRIET Ph., TOMINAGA T., LAVIGNE V., BOIDRON J.-N. et DUBOURDIEU D., 1995. Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines : 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour and Fragrance J.* (à paraître).
- DARRIET Ph., TOMINAGA T., DEMOL E. et DUBOURDIEU D., 1993. Mise en évidence dans le raisin de *Vitis vinifera* (var. Sauvignon) d'un précurseur de la 4-mercapto-4-méthyl pentan-2-one. *C.R. Acad. Sci. Paris, Biologie et Pathologie Végétale*, 316, 1332-5.
- DARRIET Ph., 1993. Recherches sur l'arôme et les précurseurs d'arôme du Sauvignon. *Thèse Doctorat*, Université de Bordeaux II.
- DUBOURDIEU D. et DARRIET Ph., 1993. Recherches sur l'arôme variétal du cépage Sauvignon. Mise en évidence dans les vins de composés soufrés à fort pouvoir odorant, formés au cours de la fermentation alcoolique à partir de précurseurs non volatils du moût. *Connaissance Aromatique des Cépages et Qualité des Vins, Actes du Symp. Intern. Montpellier, Février 1993*.
- GÜNATA Z., BITTEUR S., BRIOULLET J.-M., BAYONOVE C. et CORDONNIER R., 1988. Sequential enzymatic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carb. Research*, 184, 139-149.
- GÜNATA Z., DUGELAY I., SAPIJ J.-C., BAUMES R., BAYONOVE C., 1990. Action des glycosidases exogènes au cours de la vinification : libération de l'arôme à partir de précurseurs glycosidiques. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **24**, n°3, 133-144.
- KERKENAAR A., SCHMEDDING D.J.M. et BERG J., 1988, European Patent Application, 0 277 688 A2.
- LARSEN G.-L., 1985. Distribution of cysteine conjugate β -lyase in gastrointestinal bacteria and in the environment. *Xenobiotica*, **15**, n°3, 199-209.
- LARSEN G.-L. et STEVENS J.-L., 1986. Cysteine conjugate β -lyase in the gastrointestinal bacterium *Eubacterium limosum*. *Mol. Pharmacol.*, **29**, 97-103.
- LAVIGNE V., BOIDRON J.-N. et DUBOURDIEU D., 1993. Dosage des composés soufrés volatils légers dans les vins par chromatographie en phase gazeuse et photométrie de flamme. *J. Intern. Sci. Vigne Vin*, **27**, n°1, 1-12.
- ROSEN H., 1957. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **67**, 10-15.
- SODA K., 1967. A spectrophotometric microdetermination of keto acids with 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone. *Agr. Biol. Chem.*, 31, n°9, 1054-1060.
- STRAUSS C.-R., WILSON B. et WILLIAMS P.-J., 1988. Novel monoterpene diols and diol glycosides in *Vitis vinifera* grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 569-573.
- TATEISHI M., SUZUKI S. et SHIMIZU H., 1978. Cysteine conjugate β -lyase in rat liver. *J. Biol. Chem.*, **253**, 8854-8859.
- WILLIAMS P.-J., STRAUSS C.-R., WILSON B. et MASSY-WESTROPP R.-A., 1982. Novel monoterpenes disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry*, **21**, n°8, 2013-2020.

Manuscrit reçu le 6 octobre 1995 ;
accepté pour publication le 11 décembre 1995