

ÉTUDE DE L'ORIGINE DU CITRONELLOL DANS LES VINS

I. DUGELAY, Z. GUNATA, J.C. SAPIS, R. BAUMES et C. BAYONOVE

I.N.R.A, Institut des produits de la vigne,
Laboratoire des Arômes et des Substances Naturelles,
2, place Viala, 34060 Montpellier cedex 1 (France)

Résumé : *La formation du citronellol à partir du géraniol et du nérol au cours de la fermentation de moûts synthétiques et naturels de raisin par différentes souches de levures a été étudiée. Le géraniol et le nérol sont transformés en citronellol par la levure, ceci de façon plus marquée avec le géraniol. La quantité de citronellol formé dépend de la souche de levure utilisée. D'autres monoterpènes, comme les acétates de géranyle et de néryle et l' α -terpinéol, sont aussi formés au cours de la fermentation. La préparation enzymatique utilisée n'a pas montré d'activités réductases vis-à-vis du géraniol et du nérol pour former du citronellol.*

INTRODUCTION

Des travaux récents ont montré qu'après la fermentation alcoolique la teneur des vins en citronellol, terpénoïde qui a une note odorante de citron vert, était supérieure à la teneur des moûts correspondants, notamment dans les vins issus de moûts de raisin additionnés d'enzymes exogènes à activités glycosidasiques (GUNATA *et al.*, 1990). Or, à ce jour, malgré la présence de faibles teneurs en citronellol lié (GUNATA *et al.*, 1985; 1986), aucun précurseur de nature glycosidique n'a été identifié (VOIRIN *et al.*, 1992). Compte tenu de l'intérêt olfactif de ce composé, il était intéressant de chercher à déterminer sa provenance.

Diverses hypothèses, à cet égard, ont été avancées. Une augmentation de la teneur en citronellol a été notée après action prolongée d'enzymes sur des extraits glycosidiques de raisin (WILSON *et al.*, 1984). D'autres auteurs ont suggéré une intervention de la levure, susceptible de transformer, au cours de la fermentation, le géraniol en citronellol (OHTA *et al.*, 1991; DI STEFANO *et al.*, 1992) selon le schéma proposé par DRAWERT et BARTON (1978).

Dans ce travail, nous avons tout d'abord testé, *in vitro*, en solutions modèles, l'incidence éventuelle d'une préparation enzymatique utilisée lors des vinifications (GUNATA *et al.*, 1990) sur la formation du citronellol; en effet, des préparations enzymatiques peuvent présenter des activités vis-à-vis des 3-hydroxymégastigmanes, dérivés apparentés aux terpénoïdes (SEFTON et WILLIAMS, 1991).

Par la suite, nous avons également étudié, au cours de la fermentation alcoolique de milieux synthétiques de moût et de moûts naturels de raisin, le rôle possible de la levure sur la formation de quelques terpénols dont le citronellol.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I — INCIDENCE DE LA PRÉPARATION ENZYMATIQUE SUR LA FORMATION DU CITRONELLOL

1) Dans deux solutions de tampon phosphate-citrate 100 mM, l'une à pH 3,2, pH moyen du moût, l'autre à pH 5,5, pH optimum des glycosidases exogènes d'origine fongique, *Aspergillus niger* (ARYAN et al., 1987; CORDONNIER et al., 1989), nous ajoutons 1,6 mg/l de β -D-glucoside de géranyle (VOIRIN et al., 1992) et 1 p. cent (v/v) de la préparation enzymatique utilisée lors des vinifications précédentes (GUNATA et al., 1990). Ces deux solutions sont placées à 40°C pendant 30 h.

2) Dans une solution modèle de vin (éthanol: 120 g/l, acide tartrique : 4 g/l, acide malique: 3 g/l, $MgSO_4$: 0,025 g/l, K_2SO_4 : 0,1 g/l, pH 3,2), nous ajoutons soit du géraniol, soit du nérol (200 μ g/l pour chaque terpénol) et 1 p. cent (v/v) de la même préparation enzymatique que précédemment. Une partie aliquote est placée à 20°C pendant 72 h, une autre à 40°C pendant la même durée.

II — INCIDENCE DES LEVURES SUR LA FORMATION DE CITRONELLOL AU COURS DE LA FERMENTATION

1) Solution synthétique

Nous préparons une solution modèle de moût (SABLAYROLLES et BARRE, 1986), filtrée sur membrane 0,45 μ m, additionnée soit de géraniol, soit de nérol (200 μ g/l pour chaque terpénol). Chaque solution estensemencée par *Saccharomyces cerevisiae* à raison de 10⁶ cellules/ml. Trois souches différentes sont utilisées: K1 (origine ICV, Montpellier), EG8 (origine INRA Colmar), Fermiblanco (origine Gist-Brocades, Seclin). La fermentation se déroule à 22°C pendant 10 jours jusqu'à complète disparition des sucres.

Une partie aliquote de la solution synthétique additionnée des mêmes terpénols mais sans levure est placée dans les mêmes conditions, à titre de témoin.

2) Moût de raisin

Un moût obtenu par pressurage des baies d'Ugni blanc, variété de raisin pauvre en terpénols (GUNATA et al., 1985), filtré sur membrane 0,45 μ m après centrifugation, est additionné soit de géraniol, soit de nérol à la concentration de 1.000 μ g/l. Chaque échantillon,ensemencé par *Saccharomyces cerevisiae* souches K1 et Fermiblanco, est fermenté dans les mêmes conditions que précédemment.

Dans tous les cas, l'analyse des échantillons et du témoin (sans levure) est faite immédiatement après la fin de la fermentation.

III — ANALYSES

Les milieux sont extraits sur Amberlite XAD-2 en présence de 4-nonanol comme étalon interne (GUNATA *et al.*, 1985). Les terpénols sont élués par un mélange azéotrope, pentane/dichlorométhane (2/1, v/v). L'extrait organique, après concentration, est analysé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur une colonne capillaire en silice fondue greffée DBWAX (L : 30m; d.i : 0.32mm; épaisseur du film : 0,5 µm).

Les conditions chromatographiques sont les suivantes : débit du gaz vecteur (H₂) 1,65 ml/min; température de l'injecteur (injection « on-column ») programmée de 20 à 250°C à raison de 180°C/min; température du four programmée en isotherme à 60°C pendant 3 minutes, puis de 60 à 220°C à raison de 2°C/min, puis de 220 à 245°C à raison de 3°C/min et laissée à 245°C pendant 20 minutes. La température du détecteur à ionisation de flamme est réglée à 250°C.

Les pics sont identifiés par couplage CPG-SM (Ion Trap Detector, Finnigan) et comparaison avec des composés de référence (VOIRIN *et al.*, 1992).

Le calcul des concentrations des composés dosés est fait sur la base de facteurs de réponse globaux par rapport à l'étalon interne égaux à 1.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I — ACTION DE LA PRÉPARATION ENZYMATIQUE SUR LES TERPÉNOLS

Ni dans les milieux tamponnés contenant le glucoside de géranyle, ni dans les vins synthétiques renfermant le géraniol et le nérol, nous ne constatons, à la suite de l'incubation avec la préparation enzymatique, une formation de citronellol. Ceci montre que les augmentations des teneurs en citronellol précédemment observées (GUNATA *et al.*, 1990) ne sont pas dues aux activités enzymatiques exogènes sur le géraniol et le nérol.

II — ACTION DES LEVURES SUR LES TERPÉNOLS AU COURS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

1) Sur le milieu synthétique

Comme le montrent les résultats du tableau I, en l'absence de levures les terpénols rajoutés n'ont pas évolué mis à part la formation de l' α -terpinéol dans les milieux contenant initialement du nérol.

Par contre, après la fermentation, il y a une formation de citronellol. Celle-ci est plus importante dans les échantillons supplémentés en géraniol qu'en nérol. Parallèlement, les teneurs initiales en géraniol et en nérol diminuent.

TABEAU I

Teneurs en terpénoles d'un moût synthétique additionné de géranol ou de nérol et fermenté par différentes souches de levures

Levure utilisée	Terpénole ajoutée	Terpénoles µg/l									
		Citronellol	Nérol	Géranol	α-terpinéol	Linalol	Acétate de géranyle	Acétate de néryle	Somme des monoterpènes		
Témoins* sans levure	Géranol	0	0	220	0	0	0	0	0	0	220
	Nérol	0	205	0	27	<1	0	0	0	0	232
K1	Géranol	107	0	122	0	0	0	0	0	0	229
	Nérol	35	135	0	59	0	0	0	0	16	245
Fermiblanco	Géranol	51	0	185	0	<1	13	0	0	0	249
	Nérol	39	150	0	61	<1	0	24	0	0	274
EG8	Géranol	151	0	30	0	0	0	0	0	0	181
	Nérol	24	175	0	41	<1	0	25	0	0	265

*témoins sans levure laissés dans les mêmes conditions que celles de la fermentation (10 jours à 22°C)

De plus, dans le cas où le milieu est additionné de nérol, la teneur en α -terpinéol est plus élevée dans les milieux fermentés par rapport aux milieux non fermentés, ce qui implique l'intervention de la levure. Nous rejoignons en cela la voie de biosynthèse générale des terpénols cycliques.

DI STEFANO et al. (1992) n'ont pas observé la formation d' α -terpinéol à partir du nérol par la levure. Cela peut être expliqué par la différence de souche de levure utilisée.

2) Sur moût de raisin

Le moût d'Ugni blanc renferme de faibles quantités de nérol et de géraniol (tableau II). Comme en solution synthétique, en l'absence de levures il n'y a aucune formation de citronellol. Par contre après fermentation, nous enregistrons une forte augmentation de la teneur en citronellol, en particulier dans le moût supplémenté en géraniol. D'après GRAMMATICA et al. (1982), *Saccharomyces cerevisiae* forme spécifiquement du R-(+)-citronellol à partir du géraniol.

Nous notons également une formation de citronellol dans le moût initialement additionné de nérol, mais en quantités plus faibles.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que la souche de levure a une incidence importante sur la quantité de citronellol formé : la réduction du géraniol en citronellol reste seulement partielle et varie dans de larges limites selon les levures utilisées. Par exemple, la souche K1 produit deux fois plus de citronellol que la souche Fermiblanco à la fois lors de la fermentation du moût synthétique et du moût d'Ugni blanc supplémentés en géraniol.

Comme dans le cas du moût synthétique, l' α -terpinéol est toujours en concentration plus élevée dans les moûts fermentés par rapport au moût non fermenté en présence de nérol.

Le linalol a été relevé en quantité non négligeable dans le moût témoin de raisin avec géraniol et le moût de raisin fermenté par Fermiblanco en présence de géraniol.

Nous constatons aussi qu'une part des terpénols rajoutés se retrouve sous forme d'acétates dans les milieux fermentés. L'acétate de néryle est présent chaque fois dans les milieux supplémentés en nérol. Par contre, l'acétate de géranyle n'est pas formé systématiquement dans les milieux additionnés de géraniol. Il est absent dans les échantillons fermentés par la souche K1.

En outre, si nous examinons le bilan en monoterpènes après la fermentation des milieux synthétiques additionnés de nérol et de géraniol, la totalité de la teneur initiale en terpénols est retrouvée. Par contre, dans le moût naturel, malgré des quantités beaucoup plus importantes de terpénols rajoutés, le bilan est déficitaire et notamment quand le moût est fermenté avec la souche K1 en présence de géraniol. Il est possible que ce terpénole soit métabolisé par la levure à d'autres fins et peut-être pour la synthèse des stéroïdes. Ces résultats sont en accord avec des observations précédentes concernant la forte diminution en géraniol lors de la fermentation du moût de raisin (DIAZ-CERVANTES, 1979; GUNATA et al., 1986).

TABLEAU II

Teneurs en terpénoles d'un moût de raisin (Ugni blanc) additionné de géranol ou de nérol et fermenté par différentes souches de levures

		Terpénoles µg/l							
		Citronellol	Nérol	Géranol	α-terpinéol	Linalol	Acétate de géranyle	Acétate de néryle	Somme des monoterpènes
	Moût de départ	0	3	18	0	0	0	0	0
Levure utilisée	Terpénoles ajoutés								
Témoins* sans levure	Géranol	0	17	962	0	39	0	0	1.018
	Nérol	0	790	19	39	< 1	0	0	848
K1	Géranol	203	0	40	0	< 1	0	0	243
	Nérol	80	625	0	57	< 1	0	28	790
Fermiblanco	Géranol	86	0	512	0	29	24	0	651
	Nérol	35	543	0	45	< 1	0	20	643

*témoins sans levure laissés dans les mêmes conditions que celles de la fermentation (10 jours à 22°C)

CONCLUSION

Nous n'avons pas mis en évidence d'activités réductases vis-à-vis du géraniol et du nérol dans la préparation enzymatique utilisée lors des vinifications (GUNATA et al., 1990).

Par contre, ce travail a permis de montrer que les levures peuvent former du citronellol au cours de la fermentation du moût de raisin et ceci de façon plus ou moins marquée suivant la souche utilisée.

La quantité de citronellol formé dépend de la richesse en géraniol et nérol du milieu. Cela explique la forte augmentation de la teneur en citronellol dans les vins obtenus à partir de moûts initialement enzymés: en effet, dans ce cas là, l'hydrolyse des précurseurs glycosidiques permet d'enrichir le moût en géraniol et en nérol.

Manuscrit reçu le 19 mars 1992; accepté pour publication le 27 juillet 1992

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARYAN A.P., WILSON B., STRAUSS C.R. et WILLIAMS P.J., 1987. The properties of glycosidases of *Vitis vinifera* and a comparison of their β -glucosidase activity with that of exogenous enzymes. An assessment of possible applications in enology. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 3, 182-188.
- CORDONNIER R.E., GUNATA Y.Z., BAUMES R.L. et BAYONOVE C.L., 1989. Recherche d'un matériel enzymatique adapté à l'hydrolyse des précurseurs d'arôme de nature glycosidique du raisin. *Connaissance Vigne Vin*, **23**, 1, 7-23.
- DIAZ-CERVANTES M.I., 1979. Contribution à l'étude des substances volatiles des raisins et des vins. *Thèse Université de BORDEAUX II*.
- DI STEFANO R., MAGIOROTTO G. et GIANOTTI S., 1992. Trasformazioni di nerolo e geraniolo indotte dai lieviti. *Riv. Vitic. Enol.*, **1**, 43-49.
- DRAWERT F. et BARTON H., 1978. Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. 3- Production of monoterpenes by the yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 3, 765-766.
- GRAMMATICA P., MANITTO P., RANZI B., DELBIANCO A. et FRANCAVILLA M., 1982. Stereospecific reduction of geraniol to (R)-(+)-citronellol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Experientia*, **38**, 775-776.
- GUNATA Y.Z., BAYONOVE C.L., BAUMES R.L. et, CORDONNIER R.E., 1985. The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fractions of grape aroma components cv Muscat during first development and maturation. *J. Sci. Food Agric.*, **36**, 857-862.

- GUNATA Y.Z., BAYONOVE C.L., BAUMES R.L., CORDONNIER R.E., 1986. Stability of free and bound fractions of some aroma components of grapes cv Muscat during the wine processing: preliminary results. *Am. J. Enol. Vitic.*, **37**, 112-114.
- GUNATA Y.Z., DUGELAY I., SAPIS J.C., BAUMES R.L. et BAYONOVE C.L., 1990. Action des glycosidases exogènes au cours de la vinification : libération de l'arôme à partir des précurseurs glycosidiques. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **24**, 1, 133-144.
- OHTA T., OMORI T., SHIMOJO H., HASHIMOTO K., SAMUTA T. et OHBA T., 1991. Identification of monoterpene alcohol β -glucosides in sweet potatoes and purification of a *Shiro-koji* β -glucosidase. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 7, 1811-1816.
- SABLAYROLLES J.M. et BARRE P., 1986. Evaluation des besoins en oxygène de fermentations alcooliques en conditions œnologiques simulées. *Sci. Aliments*, **6**, 373-383.
- SEFTON M.A. et WILLIAMS P.J., 1991. Generation of oxidation artifacts during the hydrolysis of norisoprenoid glycosides by fungal enzyme preparations. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1994-1997.
- VOIRIN S., BAUMES R.L., SAPIS J.C. et BAYONOVE C.L., 1992. Analytical methods for monoterpene glycosides in grape and wine. II- Qualitative and quantitative determination of monoterpene glycosides in grape. *J. Chromatogr.*, **595**, 269-281.
- WILSON B., STRAUSS C.R., WILLIAMS P.J., 1984. Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing Muscat grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 919-924.