Les arômes de cassis et le Fer Servadou : un mythe accessible ?

David RIBOUL[1], Vanessa COUDERC[2], Carole FEILHES[3], Jean-Noël BARRAU[4], Yolande PERES-LUCCHESE[1], Eric SERRANO[3], Philippe DESTRAC[1,2], Jean-François BLANCO[1], Marie MORERE[2]

[1]Laboratoire de Génie Chimique INP/ENSIACET TOULOUSE
[2]CRITT Génie des Procédés INP/ENSIACET TOULOUSE
[3]IFV Pôle Sud-Ouest, LISLE SUR TARN
[4]VINOVALIE, RABASTENS
Email: david.riboul@ensiacet.fr

Introduction

Le Fer Servadou est un cépage rouge d'implantation essentiellement midi-pyrénéenne. L'arôme de ses vins varie selon la maturité de la récolte, évoluant ainsi des odeurs végétales aux arômes de fruits rouges, et plus particulièrement de cassis. La connaissance approfondie de cet arôme est nécessaire pour comprendre et piloter les facteurs agronomiques, viticoles et vinicoles. L'objet de ce travail est donc d'identifier un marqueur positif conférant aux vins des notes de cassis. Les travaux déjà réalisés sur cet arôme, aussi bien sur les baies et bourgeons que sur les vins, n'ont pas permis d'aboutir à une identification moléculaire. Nous avions alors constaté un manque de résolution en chromatographie gazeuse monodimensionnelle.

Ces dernières années, la chromatographie en phase gazeuse a connu d'importants développements avec les systèmes multidimensionnels. Deux techniques de résolution croissante GC-GC (2D coupe à cœur) et GCxGC (2D totale) ont été commercialisées. Les apports de chaque technique ont été discutés et comparés en fonction des objectifs visés (Marriott et al., 2012). La 2D coupe à cœur couplée à l'olfactométrie (GC-GC-O) a permis d'aboutir à l'identification de plusieurs marqueurs aromatiques impliqués dans la perception des notes fruitées des vins rouges (Campo et al., 2006; Pons et al, 2008; Falcao et al., 2011). Avec la GC-GC, le pouvoir résolutif est effectivement augmenté mais la sensibilité reste inchangée (Eyres et al., 2007). Or, certains composés aromatiques actifs sont présents à l'état de traces dans le vin. Pour détecter ces composés, des méthodes d'analyse spécifiques sont requises (Mattivi et al., 2011; Rigou et al., 2014), mais le critère hautement spécifique de ces méthodes empêche un traitement des données à postériori sur des molécules non initialement ciblées et annihile toute approche de screening. La GCxGC élimine cette limitation tout en permettant d'atteindre les niveaux de sensibilité requis. Depuis ces dernières années, le nombre de publications sur cette technique est en nette augmentation (Marriott et al., 2012). Dans le domaine de l'agroalimentaire, quelques travaux ont montré l'impact décisif de la GCxGC pour la caractérisation détaillée de matrices complexes telles que les spiritueux (Zenilda et al, 2009), les vins (Robinson, et al., 2011; Weldegergis et al., 2011; Dugo et al., 2014) et les fruits (Schmarra et al., 2010; Risticivic et al., 2012). Cependant, à l'inverse de la GC-GC, le couplage direct de la GCxGC avec l'olfactométrie reste difficile (Zellner et al., 2007). Une alternative consiste donc à corréler les données issues de chaque technique (Rochat et al., 2009; Chin et al., 2011).

C'est la raison pour laquelle le travail présenté ici est basé sur le développement d'une stratégie analytique multi-méthodes pour l'identification du marqueur « cassis ». Cette approche allie techniques séparatives telles que la GCxGC-Spectrométrie de Masse et la GC-Olfactométrie, associées à différentes techniques d'extractions comme la Micro Extraction en Phase Solide (SPME) ou l'Extraction en Phase Solide (SPE).

Les techniques d'extraction

La méthode la plus courante pour extraire les composés volatils du vin est l'Extraction Liquide-Liquide (ELL). Deux solvants utilisés régulièrement pour extraire une large variété de composés d'arômes ont été testés : pentane et dichlorométhane. Cependant, étant donné la complexité des extraits obtenus, la technique de GC-Olfactométrie a souffert d'un manque de précision. C'est pourquoi, nous avons mis au point des méthodes combinant les extractions en espace de tête et les extractions en phase solide (HS-SPE et HS-SPME).

HS-SPE : La SPE est une technique d'extraction basée sur la sélectivité du partage d'un ou plusieurs composés entre deux phases, l'une solide (phase de la cartouche d'extraction) et l'autre gazeuse dans notre cas (molécules volatiles du vin). Lors de l'extraction, les molécules d'intérêt sont retenues sur la phase stationnaire puis décrochées dans un second temps par un solvant. Les extractions ont été réalisées selon un protocole optimisé par Ferreira et son équipe (San-Juan et al., 2010).

HS-SPME : La Micro-Extraction sur Phase Solide se fait au moyen d'une fibre de silice fondue recouverte d'un polymère plus ou moins polaire. Lors de cette étude, quatre types de fibres ont été testées :

- polydiméthylsiloxane (PDMS),
- polydiméthylsiloxane-divinyl benzene (PDMS-DVB)
- carboxen polydiméthylsiloxane-divinyl benzene (CAR PDMS-DVB)
- polyacrylate (PA).

Nous avons transposé la méthodologie de l'approche métabolomique aux résultats des analyses par HS-SPME-GC-MS de nos vins. En effet, ces analyses génèrent des données volumineuses et complexes pour l'analyse desquelles l'utilisation d'outils chimiométriques est pertinente (Jonsson, 2004). Une analyse métabolomique peut être décomposée en trois volets principaux : le traitement de l'échantillon, le traitement des données et l'étape d'identification (Pereira, 2010). Dans notre cas, la première étape correspond à la micro-extraction suivie de l'analyse par GC-MS. Le traitement des données s'effectue grâce à des logiciels permettant l'extraction et l'alignement d'ions afin de transformer les profils chromatographiques en une matrice de données (figure 1) exploitables par les outils d'analyses statistiques (figure 2). Enfin, l'étape d'identification fait appel à des bases de données du type National Institute of Standards and Technology (NIST) ou Flavour and Fragrance Natural and Synthetic Compounds (FFNSC).

La phase triple, de part sa nature propre, est la moins discriminante. Nos résultats montrent aussi que c'est la fibre la plus adaptée à l'extraction des composés soufrés. Etant donné que l'arôme cassis

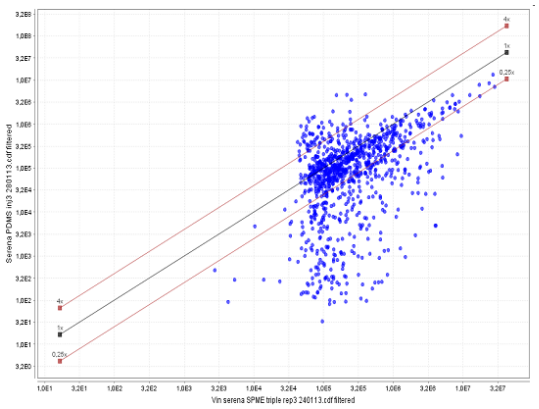


Figure 1 : Comparaison visuelle de 2 matrices (PDMS et CAR-PDMS-DVB). A chaque point correspond l'intensité et le temps de rétention d'un ion de rapport m/z donné

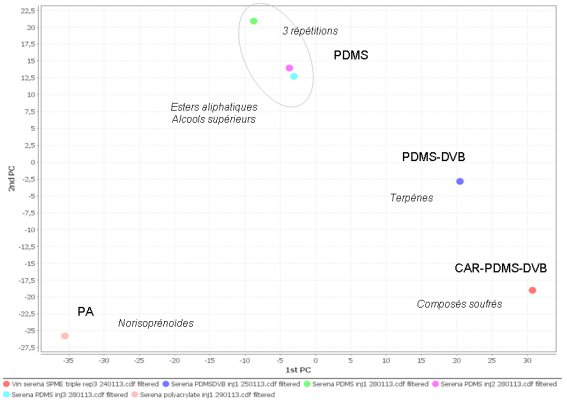


Figure 2 : Analyse en Composante Principale des résultats obtenus pour les 4 types de fibres SPME étudiées sur un même vin.

a souvent été associé à cette famille de composés, la phase triple (CAR-PDMS-DVB) a été retenue pour la suite des expériences.

Les techniques d'analyse

GC-Olfactométrie : L'originalité du couplage GC-O repose sur l'alliance entre le pouvoir de séparation d'une colonne capillaire et la sensibilité de l'odorat chez l'homme. Six personnes ont participé à l'étude. Parmi elles, deux experts de l'IFV et de Vinovalie. A partir de vins sélectionnés par l'IFV, de nombreuses zones odorantes (ZO) fruitées ont été mises en évidence et des indices de rétention ont été calculés pour chacune d'entre elles. La comparaison de la fréquence de citation associée à chaque vin pour chacune de ces zones a permis d'extraire une zone commune marquée « cassis » (tableau I).

Tableau I : Zoom sur la zone « cassis » des aromagrammes obtenus à partir de différents extraits de vins rouges sélectionnés par l'IFV et Vinovalie (la fréquence de citations est indiquée entre parenthèses).

Indice	Gaillac H13 ELL Dichloro	Indice	El Grano HS-SPE	Indice	Tarapaca HS-SPE
991	Grenadine	992	Fraise	996	Fruits rouges
997	**Cassis (50%)**	**998**	**Cassis (66%)**	**1002**	**Cassis (50%)**
1001	Caoutchouc	1009	Foin	1039	Réglisse

GCxGC-Spectrométrie de Masse : La GCxGC (figure 3) est fondée sur deux dimensions orthogonales que forme l'association de deux colonnes chromatographiques de polarités différentes. Notre configuration est la suivante, une colonne apolaire type 5% phenyl polysilphenylene-siloxane (30m x 0,25mm 0,25µm) et une seconde type 50% phenyl polysilphenylene-siloxane (1,5m x 0,15 mm 0,15 µm). Un cryo-modulateur (figure 4) situé entre les deux dimensions échantillonne l'effluent de la première colonne sous forme d'impulsions et les transfèrent continuellement vers la seconde dimension. Le signal enregistré est une séquence de séparations réalisées dans la deuxième colonne (figure 5b). En rassemblant ces chromatogrammes, le signal est reconstruit dans un plan de rétention à deux dimensions (figure 5c). L'intensité des pics est codée par l'intensité des pixels. Grâce à la détection par spectrométrie de masse, un pixel donne accès au spectre de masse.

Figure 3 : Système GCxGC-MS (Shimadzu)

Le tableau II présente quelques unes des matrices cartographiées au cours du projet Vinneo (Financement FUI, 2009-2012).

GC-O / GCxGC-MS : Afin de pouvoir comparer les chromatogrammes obtenus par GC-O avec ceux de la GCxGC, il nous a fallu repérer les composés par leurs indices de rétention. La méthode dite de Kovats consiste à déterminer les indices en encadrant chacune des molécules à repérer par deux hydrocarbures successifs. Pour cela, un mélange d'alcanes de C8 à C40 est analysé dans les mêmes conditions que les extraits. Nous avons pu ainsi transposer les temps de rétention d'un système à une dimension vers un système bidimensionnel. La figure 6 témoigne de l'excellente corrélation obtenue. Ainsi, la projection de la zone olfactive « cassis » sur le plan de rétention à 2 dimensions de la GCxGC (figure 7) permettra d'identifier les composés coélués en GC-O.

Identification des molecules

Pour prendre en compte la variabilité interindividuelle de la perception des odeurs (Aubry, 2009), nous avons établi l'intervalle de confiance [990-1010] autour de l'indice cassis. Dans cette fenêtre, nous avons identifié les molécules co-éluées ou séparées que partiellement en GC-O et séparées totalement en GCxGC-MS. Ces molécules présentes dans plusieurs des matrices étudiées (tableau 2) possèdent des propriétés organoleptiques variées (tableau III).

Parmi ces molécules, la 6-methylhept-5-en-2-one a particulièrement retenu notre attention car peu de publications mettent cette molécule en évidence dans les vins. Elle a été identifiée dans des eaux de vie (Ledauphin et al., 2006) et dans le jus des baies de cassis (Varming et al., 2004). Elle a été reconnue comme sentant le cassis, le fruit mûr (Varming et al., 2004). Dans notre étude, elle a été détectée dans 9 matrices (tableau 2). Afin d'étudier son prétendu rôle dans l'arôme cassis des vins, nous avons mis au point une méthode de dosage par HS-SPME-GCxGC-MS. Ne sont présentés ici que les résultats d'étalonnage (figure 8). Le tableau 4 présente les résultats de dosages dans 2 échantillons de vins. Des experts de Vinovalie ont observé que l'ajout dans le vin de cette molécule permettait d'augmenter les notes végétales et florales mais pas les notes cassis. Le seuil de perception olfactive a été évalué à 2µg/L. la molécule est donc présente à des concentrations légèrement inférieures à son seuil de perception dans les deux vins analysés.

Conclusion

Dans cette étude, afin de pallier au manque de sélectivité des méthodes usuelles d'analyse des composés volatils du vin, nous avons développé une méthodologie multi-techniques fondée sur le couplage de la GC-O et de la GCxGC-MS. L'intérêt d'un tel couplage

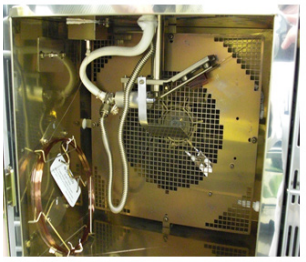


Figure 4 : Cryo-modulateur (Zoex)

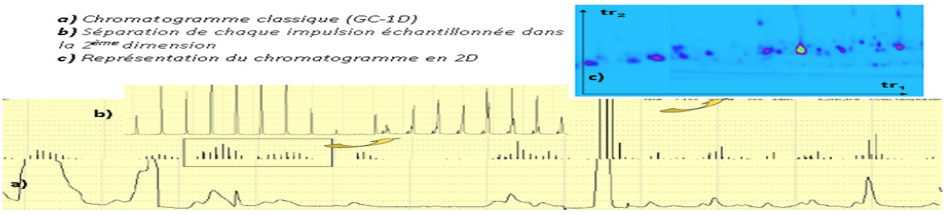
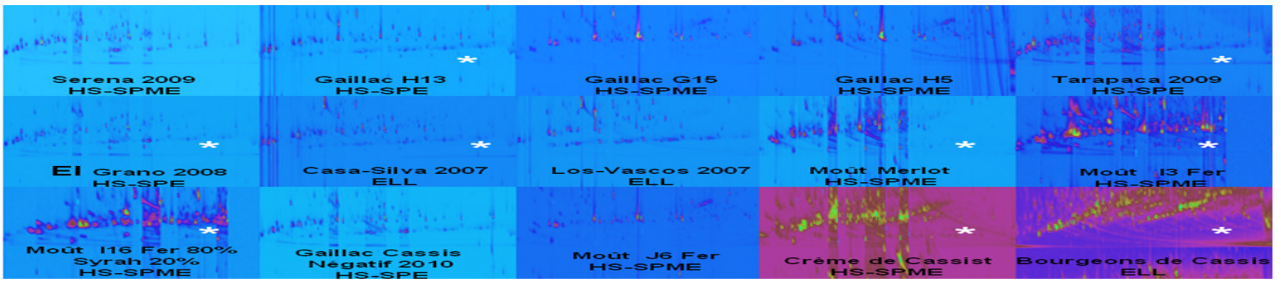


Figure 5 : Chromatogrammes du même extrait obtenus avec la GC et la GCxGC

Tableau II : Matrices cartographiées ; * 6-methylhept-5-en-2-one détectée.



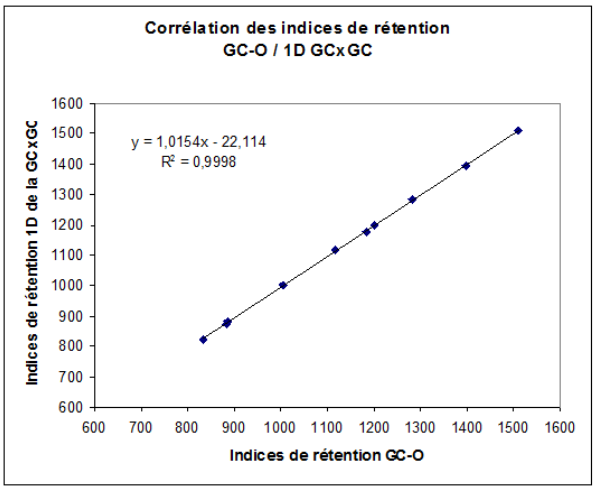


Figure 6 : Corrélation des indices de rétention

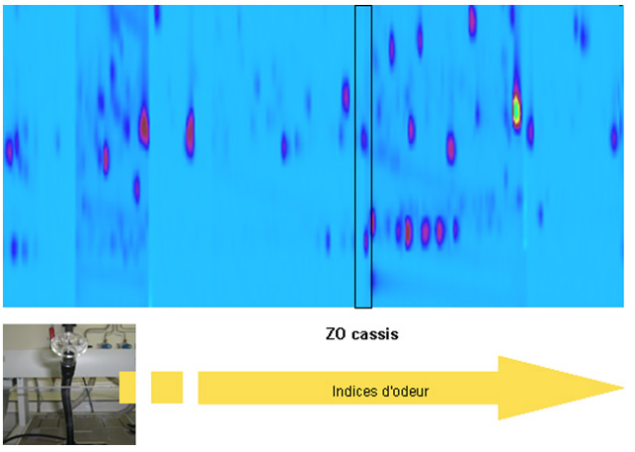


Figure 7 : Association des données issues des 2 techniques

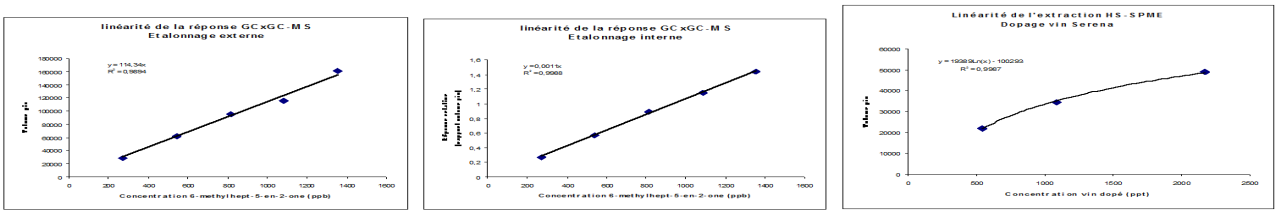


Figure 8 : Linéarité de la réponse GCxGC-MS et linéarité de l'extraction HS-SPME.

pour la recherche et l'identification de composés inconnus à l'état de traces est montré. Notre approche a permis de mettre en évidence la 6-methylhept-5-en-2-one. Elle est susceptible d'avoir un impact olfactif dans le vin. Ces premiers résultats montrent le grand potentiel de cette méthodologie analytique pour le criblage non limitatif de nouveaux marqueurs aromatiques dans des matrices complexes.

Références bibliographiques

Aubry Victoire 1999. Contribution à la connaissance aromatique des vins de pinot noir de Bourgogne par des méthodes instrumentales et sensorielles. Thèse de doctorat de l'université de bourgogne

Campo E., J. Cacho, V. Ferreira 2006. Multidimensional chromatographic approach applied to the identification of novel aroma compounds in wineldentification of ethyl cyclohexanoate, ethyl 2-hydroxy-3-methylbutyrate and ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate. Journal of Chromatography A, 1137, 223–230.

Tableau III : Propriétés aromatiques des molécules identifiées dans la zone [990-1010]. 1 www.thegoodscentscompany.com ; 2 www.pherobase.com

Nom	Propriétés organoleptiques
Hexanoate ethyl	Doux, fruité, ananas[1]
Thiophen-3-one-dihydro-2 methyl	Baie fruitée, soufrée[1]
Hexyl acetate	Fruité, pomme verte[1]
3-Hexenoic acid ethyl ester	Doux, fruité, ananas frais[1]
Propanol 3-methyl mercapto	Soufré, soupe d'oignon[1]
6-methylhept-5-en-2-one	**Cassis, terreux[2]**

Tableau IV : Exemples des teneurs en 6-methylhept-5-en-2-one rencontrées dans deux vins

Tarapaca 2009	0,4µg/L
El Grano 2008	0,5µg/L

Chin Sung-Tong, Graham T. Eyres, Philip J. Marriott 2011. Identification of potent odourants in wine and brewed coffee using gas chromatography-olfactometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography. Journal of Chromatography A, 1218, 7487-7498.

Dugo Giacomo, Flavio A. Franchina, Maria R. Scandinaro, Ivana Bonaccorsi, Nicola Cicero, Peter Q. Tranchida, Luigi Mondello 2014. Elucidation of the volatile composition of Marsala wines by using comprehensive two-dimensional gas chromatography. Food Chemistry 142, 262–268.

Eyres Graham, Philip J. Marriott, Jean-Pierre Dufour 2007. The combination of gas chromatography–olfactometry and multidimensional gas chromatography for the characterisation of essential oils. Journal of Chromatography A, 1150, 70–77.

Falcao L. D., G. Lytra, et al. 2011. Identification of ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate in red wines, a compound involved in blackberry aroma. Food Chemistry 132 (1), 230-236.

Jonsson, P. r., J. Gullberg, et al. 2004. A Strategy for Identifying Differences in Large Series of Metabolomic Samples Analyzed by GC/MS. Analytical Chemistry 76(6): 1738-1745.

Ledauphin, J. r. m., B. t. Basset, et al. 2006. Identification of trace volatile compounds in freshly distilled Calvados and Cognac: Carbonyl and sulphur compounds. Journal of Food Composition and Analysis 19(1): 28-40.

Marriott Philip J, Sung-Tong Chin, Bussayarat Maikhunthod, Hans-Georg Schmarr, Stefan Bieri 2012. Multidimensional gas Chromatography. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 34.

Mattivi F., L. Caputi, S. Carlin, T. Lanza, M. Minozzi, D. Nanni, L. Valenti and U. Vrhovsek 2011. Effective analysis of rotundone at below-threshold levels in red and white wines using solid-phase microextraction gas chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom., 25, 483–488.

Pereira Hélène 2010. Développement de l'approche métabolomique par couplage chromatographie liquide / spectrométrie de masse : application à la nutrition, Sciences du vivant/Alimentation et nutrition. Thèse de doctorat de l'université de Clermont-Ferrand.

Pons Alexandre, Valérie Lavigne, Frerot Eric, Philippe Darriet and Denis Dubourdieu 2008. Identification of Volatile Compounds Responsible for Prune Aroma in Prematurely Aged Red Wines. J. Agric. Food Chem., 56, 5285–5290.

Rigou Peggy, Aurélie Triay, Alain Razungles 2014. Influence of volatile thiols in the development of blackcurrant aroma
in red wine. Food Chemistry 142, 242–248.

Risticevic Sanja, Jennifer R., Janusz Pawliszyna 2012. Solid phase microextraction coupled with comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry for high-resolution metabolite profiling in apples: Implementation of structured separations for optimization of sample preparation procedure in complex samples. Journal of Chromatography A, 1251, 208– 218.

Robinson Anthony L., Paul K. Boss, Hildegarde Heymann, Peter S. Solomon, Robert D. Trengove 2011. Development of a sensitive non-targeted method for characterizing the wine volatile profile using headspace solid-phase microextraction comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1218, 504–517.

Rochat S., J. Egger, A. Chaintreau 2009. Strategy for the identification of key odorants: Application to shrimp aroma. Journal of Chromatography A, 1216, 6424–6432.

San-Juan Felipe, Ján Pet'ka, Juan Cacho, Vicente Ferreira, Ana Escudero 2010. Producing headspace extracts for the gas chromatography–olfactometric evaluation of wine aroma. Food Chemistry 123, 188–195.

Schmarra Hans-Georg, Jörg Bernhardt 2010. Profiling analysis of volatile compounds from fruits using comprehensive
two-dimensional gas chromatography and image processing techniques. Journal of Chromatography A, 1217, 565–574.

Varming, C., M. A. Petersen, et al. 2004. Comparison of Isolation Methods for the Determination of Important Aroma Compounds in Black Currant (Ribes nigrum L.) Juice, Using Nasal Impact Frequency Profiling. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(6): 1647-1652.

Weldegergis BT, Crouch AM, Górecki T, de Villiers A. 2011. Solid phase extraction in combination with comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for the detailed investigation of volatiles in South African red wines. Anal Chim Acta. Sep 2; 701(1):98-111.

Zellner Barbara d'Acampora, Alessandro Casilli, Paola Dugo, Giovanni Dugo, Luigi Mondello 2007. Odour fingerprint acquisition by means of comprehensive two-dimensional gas chromatography-olfactometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1141, 279–286.

Zenilda L., Cardeal a., Philip J. Marriott 2009. Comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry analysis and comparison of volatile organic compounds in Brazilian cachaça and selected spirits. Food Chemistry 112, 747–755.

Flavy FX

La filtration tangentielle Bourbes et Vins

La solution **"2 en 1"** pour filtrer toute l'année.

Fort de son expertise en filtration des vins, Bucher Vaslin développe la technique de filtration tangentielle pour le traitement des bourbes pendant les vendanges. Bourbes et Vins sont ainsi traités avec le même filtre, pour un fonctionnement toute l'année.
Cette nouvelle solution **"2 en 1"** présente plusieurs atouts : une valorisation du produit fini, un gain économique indéniable et une réelle valeur ajoutée pour la cave.

BUCHER vaslin

Bucher Vaslin
49290 Chalonnes sur Loire
Dominique Limorté – Responsable régional Filtration
Tél. 06 07 65 54 05 - dominique.limorte@buchervaslin.com

www.buchervaslin.com
Votre réussite est notre priorité