

## TENEUR EN NORISOPRÉNOÏDES EN C<sub>13</sub> DES CÉPAGES PORTUGAIS *LOUREIRO* ET *ALVARINHO*

**José M. Oliveira**<sup>(1)</sup>; **M. Odete Maia**<sup>(1)</sup>; **Raymond L. Baumes**<sup>(2)</sup>; **Claude L. Bayonove**<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Centro de Engenharia Biológica - IBQF, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal, e-mail: jmoliveira@deb.uminho.pt

<sup>(2)</sup> Laboratoire des Arômes et Substances Naturelles, IPV-INRA, 2 Place P. Viala, 34060 Montpellier Cedex 01, France

### Résumé

Les cépages portugais *Loureiro* et *Alvarinho* sont importants pour l'économie de la Région portugaise des "Vinhos Verdes". Ces deux variétés de raisin sont à l'origine de vins blancs monovariétaux réputés, présentant des caractéristiques aromatiques intéressantes. Ce travail a pour objectif d'approfondir les connaissances sur l'une des composantes du potentiel aromatique de ces deux cépages, les norisoprénoïdes en C<sub>13</sub>, composés dérivés des caroténoïdes. Les essais ont été conduits sur des échantillons de raisins du millésime 1996, deux de *Loureiro* et deux d'*Alvarinho*, provenant de deux sub-régions des "Vinhos Verdes", les plus recommandées pour l'obtention de vin de qualité; un troisième échantillon d'*Alvarinho* provient d'un type de sol différent. Quatorze composés norisoprénoïdes en C<sub>13</sub> ont été identifiés et quantifiés dans la fraction glycosylée des deux variétés. Une analyse en composantes principales utilisant les teneurs en ces composés permet de distinguer nettement les deux cépages. L'*Alvarinho* est un peu plus riche que le *Loureiro*, notamment en ce qui concerne le 3-oxo-7,8-dihydro- $\alpha$ -ionol, le 3-hydroxy-7,8-déhydro- $\beta$ -ionol, le 3-oxo- $\alpha$ -ionol et la 3-hydroxy- $\beta$ -damascone. Par contre le *Loureiro* contient des teneurs plus élevées en 3-hydroxy-7,8-dihydro- $\beta$ -ionol.

### Abstract

Portuguese *Loureiro* and *Alvarinho* varieties are important for the economy of the "Vinhos Verdes" Region. They give rise to famous monovarietal white wines, with interesting aromatic characteristics. The aim of this work was to further progress in the knowledge of one important class of the aromatic potential of the grapes from these two varieties, C<sub>13</sub>-norisoprenoid compounds. Five grape samples from the 1996 vintage were analysed: two

*Loureiro* and two *Alvarinho* grape samples were grown in two sub-regions of the "Vinhos Verdes", recommended to obtain quality wines; a third sample of *Alvarinho* grapes was grown on a different soil. Fourteen C<sub>13</sub>-norisoprenoid compounds were identified and quantified in the glycosidic fraction of the two varieties. A principal component analysis using the levels in these compounds allowed to differentiate the two varieties. The *Alvarinho* cultivar was richer than the *Loureiro* cultivar mainly in 3-oxo-7,8-dihydro- $\alpha$ -ionol, 3-hydroxy-7,8-dehydro- $\beta$ -ionol, 3-oxo- $\alpha$ -ionol and 3-hydroxy- $\beta$ -damascone. On the other hand, *Loureiro* variety contained higher levels of 3-hydroxy-7,8-dihydro- $\beta$ -ionol.

**Mots-Clefs:** *Loureiro*; *Alvarinho*; norisoprénoïdes en C<sub>13</sub>; arôme variétal; raisin

## Introduction

La région des "Vinhos Verdes" du Nord-ouest du Portugal où sont produits les vins d'Appellation "Vinho Verde" est géographiquement divisée en six sub-régions: Monção, Lima, Braga, Basto, Amarante et Penafiel. Parmi les sept cépages blancs recommandés pour la région, ce sont l'*Alvarinho* et le *Loureiro* qui produisent les vins monovariétaux les meilleurs et les plus renommés. La variété *Alvarinho* est recommandée pour la sub-région de Monção et autorisée dans la sub-région de Lima. Le *Loureiro* est répandu dans toute la région, mais il n'est pas recommandé (bien qu'autorisé) pour les sub-régions de Basto et Amarante.

D'autre part, les variétés de *Vitis vinifera* sont classifiées en trois groupes selon leurs caractéristiques odorantes: variétés muscatées, variétés aromatiques et variétés neutres (Strauss *et al.*, 1986). Les caractéristiques aromatiques sont attribuées à la présence de certains constituants d'origine variétale, comme les composés terpéniques, les méthoxypyrazines, les norisoprénoïdes en C<sub>13</sub>, les dérivés shikimiques, les composés à fonction thiol (Darriet, 1993; Rapp *et al.*, 1978; Rapp, 1994; Strauss *et al.*, 1987). On sait aussi, depuis longtemps, que ces composés d'origine variétale se trouvent sous une forme odorante mais surtout majoritairement ou exclusivement sous forme de précurseurs inodores (Bayonove *et al.*, 1993, 1998; Cordonnier et Bayonove, 1978; Strauss *et al.*, 1986; Tominaga *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1989).

Dans les raisins, les composés norisoprénoïdes en C<sub>13</sub> proviennent de la dégradation des caroténoïdes et on les trouve essentiellement sous forme glycosylée (Bayonove *et al.*, 1998;

Razungles *et al.*, 1993; Sefton *et al.*, 1993; Winterhalter, 1992, 1996). L'hydrolyse de ces glycosides libère de nombreux aglycones en C<sub>13</sub>, peu odorants, mais qui peuvent agir à leur tour comme précurseurs d'autres composés beaucoup plus odorants (Bayonove *et al.*, 1998; Winterhalter, 1992, 1996; Winterhalter *et al.*, 1990). Ces derniers se révèlent donc surtout pendant la conservation et le vieillissement du vin (Bayonove *et al.*, 1998; Simpson et Miller, 1983; Williams et Francis, 1996; Winterhalter, 1993).

Les vins monovarietaux des cépages *Alvarinho* et *Loureiro* présentent des caractéristiques très intéressantes sur le plan olfactif (Cerdeira *et al.*, 1998; Guedes de Pinho *et al.*, 1998), mais la caractérisation fine de leur potentiel aromatique sur terroir portugais n'est pas connue. Ce travail décrit donc les composés norisoprénoïdiques en C<sub>13</sub> de la fraction glycosylée de l'arôme des raisins de ces deux variétés dans des terroirs portugais différents.

## Matériels et Méthodes

Échantillons de Raisin: Pour cette étude, des raisins des cépages *Loureiro* et *Alvarinho* du millésime 1996 ont été récoltés dans trois sub-régions ayant des sols d'origine granitique. La sub-région réputée la plus favorable à l'obtention d'un vin monovarietal de qualité et une autre de moindre importance ont été choisies. Pour le cépage *Alvarinho*, un troisième terroir correspondant à un type de sol différent, graveleux, a été sélectionné. Les codes attribués aux échantillons sont indiqués sur le tableau 1. Pour chaque échantillon, trois pieds de vigne ont été choisis et les raisins, sélectionnés manuellement à partir de la grappe, ont été congelés à l'azote liquide et conservés à -20 °C.

Tab. 1- Codes attribués aux échantillons des cépages *Loureiro* et *Alvarinho*

	<i>Code</i>	<i>Terroir</i>	<i>Sub-région</i>
<i>Alvarinho</i>	A <sub>SS</sub>	<i>Solar de Serrade</i>	<i>Monção</i>
	A <sub>CR</sub>	<i>Lagoa Verde (Calhau Rolado – cailloux)</i>	<i>Monção</i>
	A <sub>AV</sub>	<i>Estação Vitivinícola Amândio Galhano</i>	<i>Lima</i>
<i>Loureiro</i>	L <sub>AV</sub>	<i>Estação Vitivinícola Amândio Galhano</i>	<i>Lima</i>
	L <sub>CT</sub>	<i>Casa da Tapada</i>	<i>Braga</i>

Analyse des composés norisoprénoïdiques glycosylés: ces composés ont été quantifiés à partir de 100 mL de jus de raisin obtenu par broyage (*turmix*, *Sofraca*), centrifugation (6000 tpm, 25 min, 4 °C) et filtration. Les composés glycosylés ont été adsorbés sur résine XAD-2 (20-50 mesh, Fluka) selon la méthode de Gunata *et al.* (1985), puis récupérés par élution avec

50 mL d'acétate d'éthyle. Cette fraction glycosidique a été séchée à 40 °C sur évaporateur rotatif puis reprise avec de l'acétate d'éthyle. L'extrait a été additionné de tampon phosphate-citrate pH 5,0 (0,1 mol/L) et les traces possibles de composés volatils ont été éliminées par extraction liquide-liquide à l'azéotrope pentane-dichlorométhane (2:1, v/v). L'hydrolyse des aglycones a été faite à 40 °C pendant 14 heures après addition de 70,3 mg/mL de solution d'enzyme AR2000 (Gist-Brocades). Les composés norisoprénoïdiques en C<sub>13</sub> ont été récupérés par extraction liquide-liquide à l'azéotrope pentane-dichlorométhane (2:1, v/v). 5 µL de solution de *4-nonanol* à 3,22 mg/L ont été ajoutés. Les extraits ont été concentrés par distillation sur colonne Dufton jusqu'à 200 µL. L'identification a été faite par CPG/SM (chromatographe HP 5890 II; spectromètre de masse quadropole HP 5989A) et la quantification par CPG (appareil Varian 3400; détecteur à ionisation de flamme) sur une colonne capillaire DB-Wax (30m x 0,32 mm x 0,5 µm; J&W). L'injection a été réalisée "on column" (20 °C à 250 °C, 180 °C/min) ; la température du four de 60 °C (3 min) initialement a été programmée à 3 °C/min jusqu'à 245 °C (20 min); la température du détecteur était 250 °C. Trois répétitions d'analyse ont été faites pour chaque échantillon.

Analyse en Composantes Principales: le logiciel SPSS 8,0 a été utilisé.

## Résultats et Discussion

14 composés norisoprénoïdes en C<sub>13</sub> ont été identifiés et quantifiés dans la fraction glycosylée de l'arôme des cinq échantillons des deux variétés. De plus un autre composé inconnu, appelé *inconnu I*, dont le spectre de masse est caractéristique des norisoprénoïdes en C<sub>13</sub>, a été aussi quantifié (tableau 2). Toutes les concentrations ont été déterminées en équivalent de *4-nonanol*.

On a pu constater que la variété *Alvarinho* est plus riche que le *Loureiro* en norisoprénoïdes en C<sub>13</sub>, particulièrement en *3-oxo-α-ionol*, *3-oxo-7,8-dihydro-α-ionol*, *3-hydroxy-7,8-déhydro-β-ionol*, *3-hydroxy-β-damascone* et composé *inconnu I*. Par contre, les échantillons de *Loureiro* possèdent des teneurs supérieures en *3-hydroxy-7,8-dihydro-β-ionol*.

Les teneurs trouvées, 107,9-123,7 µg/kg pour le *Loureiro* et 130,4-173,6 µg/kg pour l'*Alvarinho*, sont inférieures à celles qui sont rapportées par Sefton *et al.* (1993) pour le cépage *Chardonnay*, variété qui dépend de ces composés, mais supérieures à celles qui sont mentionnées pour des vins de *Muscat Ottonel*, de *Gewürztraminer* et d'*Emir* (Bayonove *et al.*

1995; Caraboglu *et al.*, 1997) et pour des raisins de *Moscatel Rosada* (Belancic *et al.*, 1997). Elles sont semblables aux teneurs citées pour des raisins de *Muscat d'Alexandrie* (Belancic *et al.*, 1997), bien que la *3-hydroxy- $\beta$ -damascone* présente des teneurs comparativement plus basses (Aubert *et al.*, 1997; Caraboglu *et al.*, 1997; Bayonove *et al.*, 1995).

Tab. 2- Concentrations moyennes (n=3) en C<sub>13</sub> norisoprénoïdes glycosylés de chaque échantillon des deux variétés ( $\mu\text{g}$  par kg de raisin)

	L <sub>CT</sub>		L <sub>AV</sub>		A <sub>SS</sub>		A <sub>CR</sub>		A <sub>AV</sub>	
	C ( $\mu\text{g/Kg}$ )	C.V. (%)	C ( $\mu\text{g/Kg}$ )	C.V. (%)	C ( $\mu\text{g/Kg}$ )	C.V. (%)	C ( $\mu\text{g/Kg}$ )	C.V. (%)	C ( $\mu\text{g/Kg}$ )	C.V. (%)
. 3,4-dihydro-3-oxo-actinidol I	2,1	19,2	1,6	46,2	2,2	8,0	1,6	23,2	4,0	35,4
. 3,4-dihydro-3-oxo-actinidol II + III	3,5	46,1	2,9	34,3	5,4	7,6	4,7	7,2	4,8	16,9
. 3-hydroxy- $\beta$ -damascone + 3,4-dihydro-3-oxo-actinidol IV (traces)	8,8	1,0	8,7	18,0	19,2	5,6	13,3	5,7	14,6	3,2
. 3-hydroxy-7,8-dihydro- $\beta$ -ionone	1,2	8,3	2,8	7,9	2,0	21,6	1,4	40,4	1,6	17,0
. inconnu I	3,5	10,8	6,0	0,2	11,6	11,9	7,5	25,8	18,1	4,7
. 3-oxo- $\alpha$ -ionol	25,1	3,0	20,8	2,5	42,9	2,3	35,4	8,1	33,6	8,2
. 3-hydroxy-7,8-dihydro- $\beta$ -ionol	13,1	3,4	11,2	12,5	4,5	4,8	5,8	9,8	5,0	21,8
. 4-oxo-7,8-dihydro- $\beta$ -ionol + 3-hydroxy- $\beta$ -ionone (traces)	7,5	26,9	4,4	45,6	3,5	33,8	1,6	29,5	3,7	2,5
. 3-oxo-7,8-dihydro- $\alpha$ -ionol	10,6	29,3	6,2	20,9	23,6	3,0	20,2	30,9	20,1	26,0
. 3-oxo- $\alpha$ -retroionol	1,3	57,3	1,0	26,3	0,5	9,4	1,0	37,4	1,5	20,8
. 3-hydroxy-7,8-déhydro- $\beta$ -ionol	10,1	9,8	8,9	7,0	26,7	1,7	9,9	17,7	23,0	13,0
. vomifoliol	36,9	19,0	33,4	20,8	31,5	5,1	28,0	5,6	29,2	15,5
<b>total C<sub>13</sub> norisoprénoïdes</b>	<b>123,7</b>		<b>107,9</b>		<b>173,6</b>		<b>130,4</b>		<b>159,2</b>	

Pendant la conservation et le vieillissement des vins correspondants, les norisoprénoïdes en C<sub>13</sub> identifiés sont susceptibles de former d'autres composés beaucoup plus odorants tels que la  *$\beta$ -damascénone*, les *vitispiranes*, le *1,1,6-triméthyl-1,2-dihydronaphtalène*, les *3-oxo-mégastigma-4,6,8-triènes* ... expliquant ainsi leur intérêt pour l'arôme de ces vins (Winterhalter et Schreier, 1994; Winterhalter et Skouroumounis, 1997).

En recourant à une analyse en composantes principales prenant en compte les quinze composés quantifiés, il a été possible de discriminer les deux cépages. La figure 1 représente la distribution des échantillons des deux variétés selon les trois premières composantes principales qui cumulent 79,6 % de la variance. Ce sont les composés mentionnés antérieurement qui contribuent de façon la plus significative à cette différenciation.

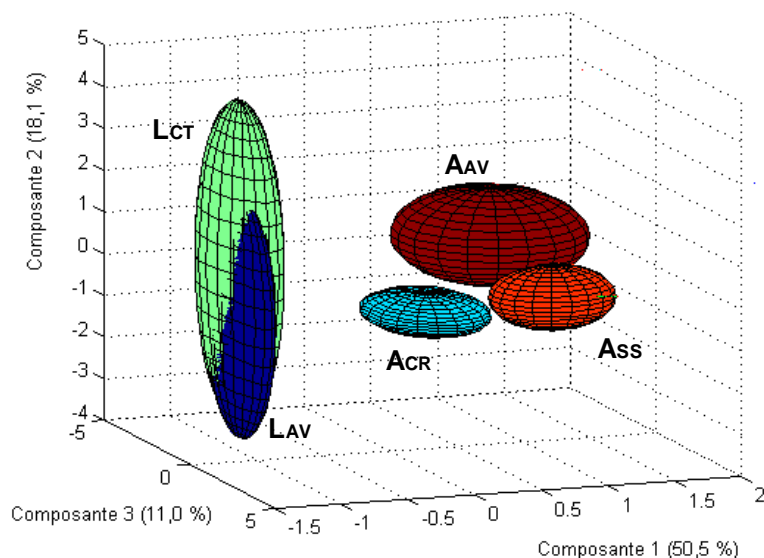


Fig. 1- Différentiation des échantillons des deux variétés basée sur 15 norisoprénoides en C<sub>13</sub> glycosylés. Les ellipsoïdes représentent les limites de confiance à 95% (n=3) du même échantillon

## Conclusion

Les résultats obtenus sur ces deux importantes variétés portugaises peu étudiées jusque-là, montrent que ces deux cépages contiennent des teneurs en norisoprénoides en C<sub>13</sub> glycosylés non négligeables bien qu'ils soient inodores, car ces composés sont précurseurs d'autres composés très intéressants sur le plan olfactif, qui se révèlent pendant la conservation et le vieillissement du vin. Ces indications devront être confirmés pour d'autres millésimes (travail en cours).

**Remerciements:** Les auteurs remercient pour leur support financier, l'IBQF, l'Ambassade de France au Portugal et la JNICT. Ils remercient aussi la *Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes (EVAG)*, *Adega C.R. Monção*, *Casa da Tapada* et *Solar de Serrade* pour le don de raisins.

## Bibliographie

- Aubert C, Baumes R.L., Gunata Y.Z., Lepoutre J.P., Cooper J.F., Bayonove C.L., 1997. Effects of fluzilazole, a sterol biosynthesis inhibitor fungicide, on the free and bound aroma fraction of Muscat of Alexandria wines, *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 31 (2), 57-64
- Bayonove C.L.; Baumes R.L., Crouzet J., Gunata Y.Z., 1998. Arômes, In "Œnologie: Fondements Scientifiques et Technologiques", C. Flanzy (Coordonnateur), Cap. n° 5, Lavoisier Tec & Doc (Eds.), Paris, 163-235

- Bayonove C.L., Caraboglu T., Dufour C., Razungles A., Sapis J.C., Baumes R.L., Gunata Y.Z., 1995. Influence du collage sur le potentiel aromatique varietal du vin, XXI Congresso Mundial de la Viña y el Vino, 75ª Asamblea General de la O.I.V., Uruguay, 27 Noviembre-4 Diciembre, pp. 150-161
- Bayonove C.L., Gunata Y.Z., Dugelay I., Baumes R.L., Razungles A., Sapis J.C., 1993. Le potentiel aromatique du raisin et son évolution dans le vin: quelques exemples caractéristiques, In: "Connaissance Aromatique des Cépages et Qualité des Vins". Bayonove C.L., Crouzet J., Flanzky C., Martin, Sapis J.C. (Eds.). Actes du Symposium International, Lattes, Montpellier, 9-10 Février, Revue Française d'Enologie, pp. 2-11
- Belancic A., Agosin E., Ibache A., Bordeu E., Baumes R.L., Razungles A., Bayonove C.L., 1997. Influence of sun exposure on the aromatic composition of chilean muscat grape cultivars Moscatel de Alejandria and Moscatel Rosada, Am. J. Enol. Vitic., 48 (2), 181-186
- Caraboglu T., Canbas A., Baumes R.L., Bayonove C.L., Lepoutre J.P., Gunata Y.Z., 1997. Aroma Composition of a white wine of *Vitis vinifera* L. cv. Emir as affected by skin contact, Journal of Food Science, 62 (4), 680-683
- Cerdeira A.L., Cabral M., Monteiro F.F., 1998. Contribuição para a caracterização organoléptica de vinhos brancos de casta da Região Demarcada dos Vinhos Verdes, 4º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo, Évora, 20-22 Maio, pp. 105-111
- Cordonnier R.E., Bayonove C.L., 1978. Les composants variétales et préfermentaires de l'arôme des vins, Parfums, Cosmétiques, Arômes, 24, 67-77
- Darriet P., 1993. Recherches sur l'arôme et les précurseurs d'arôme du Sauvignon. Thèse Doctorat, Université de Bordeaux II
- Guedes de Pinho, P., Santos, C., Vasconcelos I., Silva M.C., Hogg T., Cabral L., Vieira M., Pessanha M., Soares Franco J.M., 1998. Defining the uniqueness of monovarietal wines from native portuguese varieties of *Vitis vinifera*, 23<sup>ème</sup> Congrès Mondial de la Vigne et du Vin, Lisboa, 22-27 Juin, pp. 83-88
- Gunata Y.Z., Bayonove C.L., Baumes R.L., Cordonnier R.E., 1985. The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some aroma components, Journal of chromatography, 331, 83-90
- Rapp A., 1994. Possibilities of characterizing wine varieties by means of volatile flavor compounds. In: "Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence", G. Charalambous (Ed.) - 8<sup>th</sup> International Flavor Conference, Cos, Greece, 6-8 July, pp. 1703-1722
- Rapp A., Hastrich H., Engel L., Knipser W., 1978. Possibilities of characterizing wine quality and vine varieties by means of capillary chromatography, In: "Flavor of Foods and Beverages", Charalambous G. (Ed.). Academic Press, New York, pp. 391-417
- Razungles A., Gunata Y.Z., Pinatel S., Baumes R.L., Bayonove C.L., 1993. Étude quantitative de composés terpéniques, norisoprenoides et de leurs précurseurs dans diverses variétés de raisins. Sciences des Aliments, 13, 59-72
- Sefton M.A., Francis I.L., Williams P.J., 1993. The volatile composition of Chardonnay juices: A study by flavor precursor analysis, Am. J. Enol. Vitic., 44 (4), 359-369
- Simpson R.F., Miller G.C., 1983. Aroma composition of aged Riesling wine, Vitis, 22, 51-63
- Strauss C.R., Wilson B., Gooley P.R., Williams P.J., 1986. Role of monoterpenes in grape and wine flavor, In: "Biogenesis of Aromas", T. H. Parliment, R. Croteau (Eds.), ACS Symposium Series 317, American Chemical Society, Washington, pp. 222-242
- Strauss C.R., Wilson B., Williams P.J., 1987. Flavour of non-muscat varieties, In: Proceedings of the six<sup>th</sup> Australian Wine Industry Technical Conference, Adelaide, pp. 117-120
- 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

- Williams P.J., Francis I.L., 1996. Sensory analysis and quantitative determination of grape glycosides, In: "Biotechnology for Improved Foods and Flavours: Some Recent Advances". Takeoka, G.; Teranishi, R.; Williams, P.J. (Eds.), Am. Chem. Soc., Washington, pp. 124-132
- Williams P.J., Sefton M.A., Wilson B., 1989. Nonvolatile conjugates of secondary metabolites as precursors of varietal grape flavor components, In: "Flavor Chemistry: Trends and Developments", R. Teranishi, R. E. Buttery and F. Schahidi (Eds.), ACS Symposium Series 388, American Chemical Society, pp. 35-48
- Winterhalter P., 1992. Oxygenated C<sub>13</sub>-norisoprenoids: important flavor precursors, In: "Flavor Precursors: Thermal and Enzymatic Conversions", R. Teranishi, G.R. Takeoka, M. Güntert (Eds.), ACS Symposium Series 490, American Chemical Society, pp. 98-115
- Winterhalter P., 1993. The generation of C<sub>13</sub>-norisoprenoid volatiles in Riesling wine, In: "Connaissance romatique des Cépages et Qualité des Vins", Bayonove, Crouzet, Flanzky, Martin, Sapis (Eds.), Rev. Franc. Œnol., Lattes, France, pp. 65-73
- Winterhalter P., 1996. Carotenoid-derived aroma compounds: biogenetic and biotechnological aspects, In: "Biotechnology for Improved Foods and Flavors". G.R. Takeoka, R. Teranishi, P.J. Williams, A. Kobayashi (Eds.), ACS Symposium Series 637, American Chemical Society, pp. 295-308
- Winterhalter P., Schreier P., 1994. C<sub>13</sub>-norisoprenoid glycosides in plant tissues: an overview on their occurrence, composition and role as flavour precursors, Flavour and Fragrance Journal, 9, 281-287
- Winterhalter P., Sefton M.A., Williams P.J., 1990. Volatile C<sub>13</sub>-norisoprenoid compounds in Riesling wine generated from multiple precursors, Am. J. Enol. Vitic., 41 (4), 277-283
- Winterhalter P., Skouroumounis G.K., 1997. Glycoconjugated aroma compounds: occurrence, role and biotechnological transformation, In: "Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology of Aromas", Berger R.G. (Ed.), Springer Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, vol. 55, pp. 73-105