



HAL
open science

Identification de nouveaux précurseurs de thiols variétaux dans les moûts et implication dans les mécanismes de révélation du potentiel aromatique.

Hugo Bonnaffoux

► **To cite this version:**

Hugo Bonnaffoux. Identification de nouveaux précurseurs de thiols variétaux dans les moûts et implication dans les mécanismes de révélation du potentiel aromatique.. Autre. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONT016 . tel-02305366

HAL Id: tel-02305366

<https://theses.hal.science/tel-02305366>

Submitted on 4 Oct 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Ingénierie Biomoléculaire

École doctorale Sciences Chimiques Balard

Unité de recherche UMR 5247

Identification de nouveaux précurseurs de thiols
variétaux dans les moûts et implication dans les
mécanismes de révélation du potentiel aromatique.

Présentée par Hugo BONNAFFOUX

Le 21 mars 2019

Sous la direction du Dr Florine CAVELIER

Devant le jury composé de

Gilles DE REVEL, Professeur, Université de Bordeaux, Bordeaux, France	Président
Carole CAMARASA, Directeur de Recherche, INRA, Montpellier, France	Rapporteur
Maurizio UGLIANO, Professore Associato, Università di Verona, Italie	Examineur
Maria NIKOLANTONAKI, Maître de conférences, Université de Bourgogne, Dijon, France	Examinatrice
Rémi SCHNEIDER, Directeur technique R&D, Oenobrand, Montpellier, France	Examineur
Florine CAVELIER, Directeur de Recherche CNRS, IBMM, Montpellier, France	Directrice de Thèse
Frédéric CHARRIER, Ingénieur Œnologue, IFV, Pôle Val de Loire, Vertou, France	Invité
Stéphane DELPECH, Ingénieur, Nyséos, Montpellier, France	Invité
André FUSTER, Œnologue, AEB, Bordeaux, France	Invité



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

REMERCIEMENTS

Ces travaux de recherches n'auraient jamais été aussi fructueux sans ces personnes qui m'ont entourées et aidées à leur manière au quotidien, et que j'aimerais remercier dans les lignes suivantes.

En premier lieu, ces remerciements s'adressent à **Florine Cavalier**, ma directrice de thèse, pour avoir dirigé ce travail avec rigueur. Un grand merci pour la patience dont tu as fait preuve et pour m'avoir soutenu sans faille au cours de ces trois années de thèse. Tu as été un pilier pour mon épanouissement tant professionnel que personnel. Merci beaucoup Florine !

J'adresse tous mes remerciements à **Rémi Schneider** pour son encadrement et ses conseils avisés. Merci d'avoir continué à m'aider tant sur le plan scientifique que rédactionnel. Je garderai en souvenir ce voyage en Australie très enrichissant.

Je remercie les membres du jury, Mme **Camarasa** et M. **De Revel** pour avoir accepté de rapporter ces travaux de thèse ainsi que pour leur participation à la soutenance. J'adresse également mes remerciements à Mme **Nikolantonaki** et M. **Ugliano** pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier **Stéphane** pour son aide plus que précieuse. Merci pour ton soutien, ta patience et ta bonne humeur !

Je remercie tout particulièrement **Laurent**, et le reste de l'équipe Nyséos : **Clément**, **Florence** et **Alex**. Merci de m'avoir accueilli et permis de me sentir chez moi dans votre labo ! J'ai passé de super moments avec vous ! Merci à tous !

J'adresse un remerciement à **Aurélié** pour son aide précieuse, et ses conseils. Tu as participé à la finalisation de ce travail à travers des idées brillantes, et je t'en remercie.

Je tiens également à remercier **Frédéric Charrier** et **Amélie Roy** pour leur énorme appui technique et leur aide lors de la mise en place des expérimentations. Vous m'avez transmis la passion pour l'œnologie, et je vous en serai toujours reconnaissant.

Je remercie **Emmanuelle Rémond**, pour m'avoir conseillé lors de la synthèse des molécules, pour avoir participé aux comités et à l'élaboration des articles.

Je n'oublie pas toutes les personnes de l'IFV Pech Rouge et Vertou : **Denis, Marie-Agnès, Nathalie, Virginie, Céline**, et tous les stagiaires qui m'ont aidé lors des vendanges et de mes expérimentations.

Ces trois années de thèse ont été ponctuées de plusieurs comités dont je voudrais remercier les participants pour leur contribution scientifique, technique ou administrative : **Coralie Pagani, Arnaud Delaherche, Dorothee Maurel, Vincent Farines, Ziya Gunata** et **Marie-Hélène Morel**.

Un grand merci à **Christian Picou** pour les fermentations, **Aurélien Lebrun** et **Karine Parra** pour la RMN, **Guillaume Cazals** pour la spectrométrie, **Pierre Sanchez** pour la LC-MS et **Pascal Verdié** pour la formation et l'aide à l'HPLC prep.

Je ne peux oublier **Mathieu** et tous mes camarades de thèse. Merci à vous tous d'avoir partagé avec moi ces années, parsemées de joies et de rires !

J'aimerais maintenant remercier mes amis d'enfance : **Nina** (alias Ninouille), **Laurie-May** (rpz Motige), **Thibault** (alias Poisson Pure) et **Paulin** (alias Lululecastor ; rpz team SNIP). Malgré la distance qui nous sépare parfois, vous faites partie intégrante de ma vie et de mon bonheur. Merci !!

Dans ces dernières lignes, j'aimerais remercier ma chérie qui partage ma vie au quotidien : **Marie**. Merci pour tout le bonheur que tu m'apportes. Tu es restée forte dans les

moments les plus difficiles de ta vie. Ta passion et ton combat pour l'écologie sont un exemple pour moi. Je t'admire pour ce que tu es, et suis impatient de vivre THE PROJET !

Je terminerai par remercier les membres de ma famille qui me sont très chers. Merci particulièrement à **ma mère, mon père, mon frère et ma sœur**. Oh oh, ce serait le bonheur !
Merci pour votre présence et votre soutien.

ABRÉVIATIONS

3MH	3-Mercaptohexan-1-ol
3MHAI	3-Mercaptohexanal
4MMP	4-Mercapto-4-méthylpentan-2-one
ACN	Acétonitrile
BOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(triméthylsilyl)trifluoroacetamide
DCM	Dichlorométhane
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DMF	Diméthylformamide
DMS	Diméthylsulfure
DTE	Dithioérythritol
FA	Fermentation alcoolique
FML	Fermentation malolactique
GC	Gas Chromatography - Chromatographie en phase gazeuse
HFBA	Anhydride heptafluorobutyrique
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography - Chromatographie en phase liquide haute résolution
MS	Mass Spectrometry - Spectrométrie de masse
MTBSTFA	<i>N</i> -(<i>tert</i> -Butyldiméthylsilyl)- <i>N</i> -méthyltrifluoroacétamide
PFOH	Pentafluoropentanol
SMM	<i>S</i> -Méthylméthionine
TA	Température ambiante
TBDMCM	<i>tert</i> -Butyldiméthylchlorosilane
TDN	1,1,6-Triméthyl-1,2-dihydronaphthalène
TES	Triéthylsilane
TFA	Acide trifluoroacétique
TIS	Triisopropylsilane
TMCS	Triméthylchlorosilane
TPB	(<i>E</i>)-1-(2,3,6-Triméthylphenyl)buta-1,3-diène

AVANT PROPOS

Cette thèse est le fruit d'une convention industrielle de formation par la recherche (CIFRE N° 2015/0690) associant l'Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV), Nyséos, AEB, et l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), sous tutelle de l'Université de Montpellier et du CNRS. La CIFRE est portée par l'IFV.



L'IFV est un organisme technique au service des acteurs de la filière vitivinicole. Il dispose de sites expérimentaux présents dans l'ensemble des régions viticoles. C'est notamment sur les sites de Pech Rouge (Languedoc) et Vertou (Val de Loire) que les expérimentations œnologiques ont été menées pendant les 3 années de thèse, avec l'aide de Denis Caboulet, Amélie Roy, Frédéric Charrier et du Dr Rémi Schneider.

Nyséos est une entreprise spécialisée dans l'analyse fine des arômes du vin. Les méthodes analytiques utilisent essentiellement des étalons internes spécifiques permettant de



faire de la quantification par dilution isotopique, méthode de choix pour assurer une haute fiabilité. Dans le cadre de la thèse, le développement de méthodes d'analyse et l'analyse de l'ensemble des échantillons a été effectuée à Nyséos avec l'aide de Stéphane Delpech et du Dr Aurélie Roland.



AEB est une entreprise proposant des produits œnologiques, notamment une vaste gamme de levures, de nutriments et d'enzymes, adaptés aux problématiques de la vinification. AEB a participé au financement de la thèse et a fourni les produits œnologiques permettant la réalisation des expérimentations techniques en cave.

Enfin, l'IBMM est un institut de recherche de dimension internationale. Ses activités de recherche sont centrées sur les biomolécules et un département est dédié aux acides aminés et peptides. C'est sous la direction du Dr Florine Cavelier, avec la participation du Dr Emmanuelle Rémond, que la synthèse des standards internes a été effectuée. La caractérisation de tous les composés de synthèse a été réalisée au Laboratoire de Mesures Physiques, à l'Université de Montpellier.



TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	5
ABRÉVIATIONS.....	9
AVANT PROPOS.....	11
CONTEXTE DU SUJET.....	17
1. LES AROMES DU VIN	18
1.1. GENERALITES.....	18
1.2. APPROCHE TECHNOLOGIQUE DE LA CLASSIFICATION DES AROMES	18
1.3. APPROCHE SYSTEMIQUE DE LA CLASSIFICATION DES AROMES	19
2. LES PRECURSEURS DE L'AROME VARIETAL	24
2.1. LES CAROTENOÏDES.....	24
2.2. LES PRECURSEURS GLYCOSIDIQUES	26
2.3. LES PRECURSEURS DU DMS	27
3. LES THIOLS VOLATILS ET LES MECANISMES DE LIBERATION	28
<i>REVIEW: SPOTLIGHT ON RELEASE MECHANISMS OF VOLATILE THIOLS IN BEVERAGES</i>	<i>29</i>
4. OBJECTIFS DE LA THESE ET ORGANISATION DE LA RECHERCHE.....	63
CHAPITRE 1 IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DU γGLUCYS-3MH, UN PRECURSEUR DE THIOL POTENTIEL	67
1. LES METHODES DE SYNTHESE DES PRECURSEURS DE THIOLS VARIETAUX.....	68
1.1. LES CYSTEINES S-CONJUGUEES.....	68
1.2. LES GLUTATHIONS S-CONJUGUES	69
1.3. LES DIPEPTIDES S-CONJUGUES	70
2. SYNTHESE DES DIPEPTIDES S-CONJUGUES AUX 3MH, 3MHAL OU 4MMP.....	72
2.1. SYNTHESE DES γ GLUCYS S-CONJUGUES.....	73
2.2. SYNTHESE DES CYSGLY S-CONJUGUES.....	78
3. TECHNIQUES ANALYTIQUES DE DOSAGE DES PRECURSEURS DE THIOLS.....	82

3.1. GENERALITES.....	82
3.2. ANALYSE DES PRECURSEURS PAR METHODES INDIRECTES.....	83
3.3. ANALYSE DES PRECURSEURS PAR METHODES DIRECTES.....	83
4. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'ANALYSE POUR L'IDENTIFICATION ET LA QUANTIFICATION DES PRECURSEURS DE THIOLS VARIETAUX.....	85
4.1. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE.....	86
4.2. DEVELOPPEMENT DE LA METHODE CHROMATOGRAPHIQUE	87
4.3. VALIDATION DE LA METHODE	89
5. ARTICLE 1 : FIRST IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF S-3-(HEXAN-1-OL)-γ-GLUTAMYL-CYSTEINE IN GRAPE MUST AS A POTENTIAL THIOL PRECURSOR, USING UPLC-MS/MS ANALYSIS AND STABLE ISOTOPE DILUTION ASSAY .	91
<u>CHAPITRE 2 MECANISMES D'INTER-CONVERSION DES PRECURSEURS AU COURS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE – ÉTUDE DE LA BIOGENESE DES THIOLS VARIETAUX EN CONDITIONS ŒNOLOGIQUES</u>	<u>103</u>
1. VOIES DE BIOGENESE DES THIOLS VARIETAUX DANS LES VINS	104
2. ARTICLE 2 : REVISITING THE EVALUATION STRATEGY OF VARIETAL THIOL BIOGENESIS.....	108
<u>CHAPITRE 3 EXPERIMENTATIONS ŒNOLOGIQUES : VALORISATION DU POTENTIEL THIOL.....</u>	<u>117</u>
1. MATERIEL ET METHODES	118
1.1. EXPERIMENTATIONS VITICOLES	118
1.2. EXPERIMENTATIONS ŒNOLOGIQUES.....	120
2. ARTICLE 3 : VALORISATION DU POTENTIEL AROMATIQUE DE TYPE THIOL DE LA VENDANGE AU TRAVERS DE PRATIQUES VITICOLES ET ŒNOLOGIQUES OPTIMISEES.....	123
<u>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....</u>	<u>141</u>
<u>LISTE DES FIGURES.....</u>	<u>145</u>
<u>LISTE DES SCHEMAS.....</u>	<u>146</u>
<u>LISTE DES TABLEAUX</u>	<u>147</u>
PUBLICATIONS	148
COMMUNICATIONS ORALES	148

POSTERS	149
FORMATION COMPLEMENTAIRE	149
<u>ANNEXES.....</u>	150
CHAPITRE 1 IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DU γGLUCYS-3MH, UN PRECURSEUR DE THIOL POTENTIEL	150
SUPPORTING INFORMATIONS OF ARTICLE 1: FIRST IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF S-3-(HEXAN-1-OL)- γ - GLUTAMYL-CYSTEINE IN GRAPE MUST AS A POTENTIAL THIOL PRECURSOR, USING UPLC-MS/MS ANALYSIS AND STABLE ISOTOPE DILUTION ASSAY.....	150
<u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	198

CONTEXTE DU SUJET

Cette partie introductive s'articule en quatre sections. La première présente deux approches descriptives de l'arôme du vin alors que la deuxième partie est dédiée à une présentation générale des précurseurs spécifiques à l'arôme variétal. La troisième se focalise sur les thiols volatils et les mécanismes de leur libération à partir des précurseurs, qui constituent le sujet central de la thèse, en élargissant le champ à d'autres boissons que le vin. Enfin, la dernière section tente de dresser un bilan quantitatif de l'origine des thiols dans les vins, et expose la problématique de la thèse qui en découle, ainsi que l'organisation de la recherche effectuée au cours de ces trois années.

1. Les arômes du vin

1.1. Généralités

Les arômes sont des composés volatils perceptibles olfactivement par voie directe (ortho-olfaction) et indirecte (rétro-olfaction). L'ensemble des sensations olfactives que procure un vin tout au long de la dégustation (le bouquet) résulte de la composition aromatique du vin. Elle est dépendante du cépage, du terroir, des pratiques culturelles et œnologiques (Antonelli, *et al.*, 1999; Styger, *et al.*, 2011). Une multitude d'interactions chimiques ainsi que des facteurs physiques (température, viscosité du mélange) jouent des rôles essentiels sur la qualité sensorielle du vin et sa perception. D'autres paramètres propres à chaque individu influencent cette sensation aromatique, comme l'alimentation, l'état physiologique, l'altération de l'odorat (anosmie) ou l'exposition aux polluants de l'air (Halpern, 1982). D'un point de vue cognitif, plusieurs études ont montré l'impact de la couleur du vin sur la perception olfactive d'un individu (Morrot, *et al.*, 2001; Österbauer, *et al.*, 2005). En somme, la perception aromatique d'un vin varie en fonction de facteurs physico-chimiques, dépendant du dégustateur et de biais cognitifs.

1.2. Approche technologique de la classification des arômes

Les composés d'arôme sont synthétisés ou biosynthétisés dans le raisin, pendant le processus de vinification et/ou durant l'élevage et le vieillissement des vins. Ainsi, de manière habituelle, ils sont classifiés selon une approche technologique comme suit (Drawert, 1974) :

- **les arômes variétaux** : ils sont présents dans les baies de raisin sous deux formes : soit libres, ils sont alors volatils et directement odorants, soit sous forme de précurseurs, non volatils et donc inodores. Dans ce dernier cas, les précurseurs peuvent libérer des composés d'arôme volatils au cours du processus de vinification (Bayonove, 1998) ;
- **les arômes pré-fermentaires** : ils sont formés au cours de processus intervenant de la vendange jusqu'au début de la fermentation alcoolique (FA) essentiellement par l'action de réactions enzymatiques qui se produisent dès que l'intégrité de la baie est rompue ;

- **les arômes fermentaires** : il s'agit de métabolites secondaires produits par les microorganismes (levures ou bactéries lactiques) impliqués dans la FA et la fermentation malolactique (FML). Certains de ces composés sont responsables des notes fruitées et des caractères vineux (ester éthyliques, alcools supérieurs ou les acides gras par exemple) du vin. D'autres sont associés à des défauts olfactifs comme les notes de réduction (H₂S, méthane-thiol ou éthane-thiol par exemple) ;
- **les arômes de vieillissement** : ils sont produits pendant le vieillissement du vin lors de transformations chimiques ou biochimiques de composés odorants et de précurseurs d'arômes présents dans les vins jeunes. Ils sont responsables de la complexité aromatique des vins de garde.

Cette première approche descriptive de l'arôme du vin a l'avantage de considérer les arômes en fonction de leur étape d'apparition tout au long de l'élaboration du vin. Cependant, elle ne tient pas compte des effets synergiques qui existent entre les différents composés du vin.

1.3. Approche systémique de la classification des arômes

Plus récemment, Ferreira *et al.* ont proposé une approche systémique de l'étude de l'arôme du vin (Ferreira, *et al.*, 2007). Cette approche a l'avantage d'être plus proche de la réalité olfactive lors de la dégustation d'un vin. Elle ne porte pas tant sur la structure et l'origine des composés considérés, mais sur la façon dont ils interagissent entre eux et avec d'autres composés de la matrice pour générer l'arôme perçu. Ainsi, cette approche distingue trois composantes :

- le tampon aromatique ;
- les composés odorants à contribution positive ;
- les exhausteurs ou les masques de l'arôme.

1.3.1. *Le tampon aromatique*

Le tampon aromatique est composé d'une trentaine de molécules appartenant à la famille des alcools (dont l'éthanol), des acides, des esters et des carbonyles, et issues de la FA (Ferreira, *et al.*, 2007). Ils permettent d'atténuer l'effet de l'addition ou de l'élimination d'une molécule odorante sur l'odeur d'un vin. Parmi eux, l'éthanol est le composé le plus abondant, qui influence aussi la solubilité et la volatilité des arômes (Aznar, *et al.*, 2004; Da Porto, *et al.*, 2002; Fischer, *et al.*, 1996).

L'odeur caractéristique de ce tampon a été qualifiée de vineuse : légèrement fruitée, piquante et alcoolisée (Ferreira, *et al.*, 2007).

1.3.2. *Les composés odorants à contribution positive*

Le tampon aromatique précédemment décrit peut être rompu par la présence de certaines molécules odorantes, permettant au vin d'acquérir des notes aromatiques plus spécifiques et diversifiées. L'impact de ces composés dépend de leur concentration, de leur seuil de perception et de leur environnement chimique. Ils peuvent être classés selon leur contribution dans le vin (Ferreira, *et al.*, 2007) :

- **les composés d'impact** : ils sont capables, individuellement, de transmettre efficacement une ou plusieurs notes aromatiques à un vin. Ils sont aussi appelés composés clés ;
- **les contributeurs majoritaires ou familles d'arômes** : elles se composent d'arômes ayant des structures similaires. Les composés d'une même famille peuvent contribuer, ensemble, à une note importante de l'arôme du vin, même s'ils n'ont pas d'effet individuellement ;
- **les contributeurs minoritaires** : Ils appartiennent à des familles structurales différentes, mais présentent des effets synergiques. En l'absence de composés appartenant à l'une des deux catégories précédentes, ils peuvent participer au développement de certaines caractéristiques génériques sensorielles (florale, fruité...).

Les composés d'impact

Dans la littérature, 17 composés ont été décrits comme composés d'impact (**Tableau 1**). Ils sont chacun responsables d'une ou de plusieurs notes aromatiques (Ferreira, *et al.*, 2007).

Tableau 1 | Composés d'impact identifié dans les vins *Vitis vinifera*.

Composé d'impact	Contribution aromatique	Origine
(E)-whiskylactone ^a	boisé	bois (élevage)
3-mercaptohexan-1-ol (3MH) ^b	pamplemousse	raisin (variétale non libre)
3-mercaptohexanal (3MHA) ^c	fruit de la passion	raisin (variétale non libre)
4-mercapto-4-méthylpentan-2-one (4MMP) ^d	buis, cassis	raisin (variétale non libre)
acétate d'isoamyle ^e	banane	FA
benzylmethanethiol ^f	toasté, fumé	évolution réductrice
diacétyl ^g	beurré	FA
DMS ^h	soufré, fruité, truffe	FA ou raisin (variétale non libre)
FFT ⁱ	café, fumé	évolution réductrice, FA
linalol ^j	floral, agrumes	raisin (variétale libre et liée)
l'oxyde de <i>cis</i> -Rose ^k	floral	raisin (variétale libre)
méthional ^l	rôle ambigu	évolution oxydative
phénylacétaldéhyde ^m	rose fanée, miel	évolution oxydative
rotundone ⁿ	épicé	raisin (variétale libre)
sotolon ^o	fenugrec, caramel	évolution oxydative
β-damascénone ^p	compote de pomme, floral, miel	précurseurs glycosidiques
β-ionone ^q	violette	précurseurs glycosidiques

Références : ^a(Boidron, *et al.*, 1988; Pollnitz, *et al.*, 2000) ; ^b(Bouchilloux, *et al.*, 1998; Tominaga, *et al.*, 2000) ; ^c(Tominaga, *et al.*, 1996) ; ^d(Darriet, *et al.*, 1995) ; ^e(Ferreira, *et al.*, 2000; Murat, *et al.*, 2001c; Van Wyk, *et al.*, 1979) ; ^f(Tominaga, *et al.*, 2003a, 2003b) ; (Bartowsky, *et al.*, 2002; Fornachon, *et al.*, 1965; Martineau, *et al.*, 1995) ; ^g(Escudero, *et al.*, 2007; Marais, 1979; S.K. Park, *et al.*, 1994; Petka, *et al.*, 2003; M. A. Ségurel, *et al.*, 2004) ; ^h(Blanchard, *et al.*, 2001) ; ⁱ(Arrhenius, *et al.*, 1996; Cordonnier, *et al.*, 1974; Lee, *et al.*, 2003; P. Ribéreau-Gayon, *et al.*, 1975) ; ^j(Guth, 1997) ; ^k(Escudero, *et al.*, 2000b; Ferreira, *et al.*, 2005) ; ^l(Culleré, *et al.*, 2007; A. C. S. Ferreira, *et al.*, 2002) ; ^m(Wood, *et al.*, 2008) ; ⁿ(Escudero, *et al.*, 2000a; Masuda, *et al.*, 1984) ; ^o(Murat, *et al.*, 2001c).

Tableau 2 | Familles d'arômes à contribution majoritaire dans les vins *Vitis vinifera* (adapté de Ferreira *et al.*, 2007 (Ferreira, *et al.*, 2007)).

Famille d'arômes	Molécules homologues
esters éthyliques d'acides gras	butyrate, hékanoate, octanoate et décanoate d'éthyle
acétates d'alcools supérieurs	acétate d'isoamyle, d'isobutyle, d'hexyle et de phényléthyle
esters éthyliques d'acides ramifiés	esters éthyliques des acide isobutyrique, 2-méthylbutyrique, isovalérique, 4-méthylpentanoïque et cyclohexanoïque
γ -lactones	γ -octa, γ -nona, γ -deca, γ -undeca, γ -dodécalactone
Isoaldéhydes	isobutyraldéhyde, 2-méthylpentanal, isovaléraldéhyde
aldéhydes aliphatiques	octanal, ,octanal, décanal
famille de la vanilline*	vanilline, vanillate d'éthyle, vanillate de méthyle, acétovanillone, syringaldéhyde
famille de sucre caramélisé*	furanéol, maltol, homofuranéol, sotolon
phénols volatils*	guaiacol, eugénol, isoeugénol, 2,6-diméthoxyphénol, 4-allyl-2 ,6-diméthoxyphénol
cinnamate d'éthyle et dihydrocinnamate*	-

* Familles mixtes dans lesquelles les structures chimiques présentent des similitudes, mais ne sont pas homologues.

Les contributeurs majoritaires ou familles d'arôme

Les familles d'arômes sont décrites comme des groupes de molécules homologues, ou présentant des structures chimiques similaires (**Tableau 2**). Dans la majorité des cas, ces molécules ne dépassent pas individuellement leur seuil de perception dans les vins. En revanche, la synergie de plusieurs molécules d'un même groupe permet de percevoir la note aromatique formée, agissant ainsi comme contributeurs majoritaires (Ferreira, *et al.*, 2007).

Les contributeurs minoritaires

Dans certains vins, aucun des composés précédemment définis ne possèdent une concentration suffisante pour impacter l'arôme. Dans ce cas, l'odeur du vin peut être due à la synergie de plusieurs composés de familles différentes qualifiés de contributeurs minoritaires. Par exemple dans certains vins blancs, les notes florales sont attribuées à l'action d'une vingtaine de molécules en concentration faible appartenant à la famille des terpènes, des γ -lactones, des norisoprénoides et de la vanilline (Escudero, *et al.*, 2004).

1.3.3. Les exhausteurs et les masques de l'arôme

Le phénomène exhausteur de l'arôme n'est pas bien documenté dans la littérature. Un exhausteur d'arôme est une molécule qui augmente l'intensité aromatique d'un mélange. Escudero *et al.* ont notamment observé une augmentation de l'intensité aromatique des notes fruitées, produite par la β -damascénone, le furanéol, l'homofuranéol et le DMS (Escudero, *et al.*, 2007; Marie Ségurel, 2005).

Enfin, certains composés peuvent masquer la typicité aromatique d'un vin. Par exemple, le 4-éthylphénol, à faible concentration, peut provoquer une diminution significative des notes fruitées, voire une perte aromatique totale (Pascal Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2017).

2. Les précurseurs de l'arôme variétal

Parmi les composés responsables de l'arôme, certains proviennent du raisin, et sont caractéristiques de la variété et de son expression (conditions pédoclimatiques par exemple). Ils sont ainsi qualifiés d'arômes variétaux, bien que chaque cépage ne possède pas des composés volatils spécifiques. Comme expliqué dans le sous-chapitre précédent, ces arômes peuvent être sous forme libre ou sous forme de précurseurs. Ces derniers sont des composés non volatils et donc inodores. Ils peuvent subir des réactions chimiques et/ou enzymatiques, générant des composés odorants. Quatre groupes de précurseurs spécifiques à l'arôme variétal représentant les plus impactant pour l'arôme des futurs vins seront abordés ici :

- les caroténoïdes ;
- les précurseurs glycosidiques ;
- les précurseurs du DMS ;
- les précurseurs de thiols.

Ce dernier groupe fait l'objet d'une revue scientifique présentée dans la partie 3.

2.1. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des tétraterpènes (C₄₀) qui rassemblent les familles des carotènes et des xanthophylles (Britton, 1982, 1995; Demmig-Adams, *et al.*, 1996; Goodwin, 1980; Moneger, 1968). Le β -carotène et la lutéine sont retrouvés majoritairement dans le raisin et représentent près de 85 % de la concentration totale en caroténoïdes (Marais, *et al.*, 1989; Razungles, *et al.*, 1987).

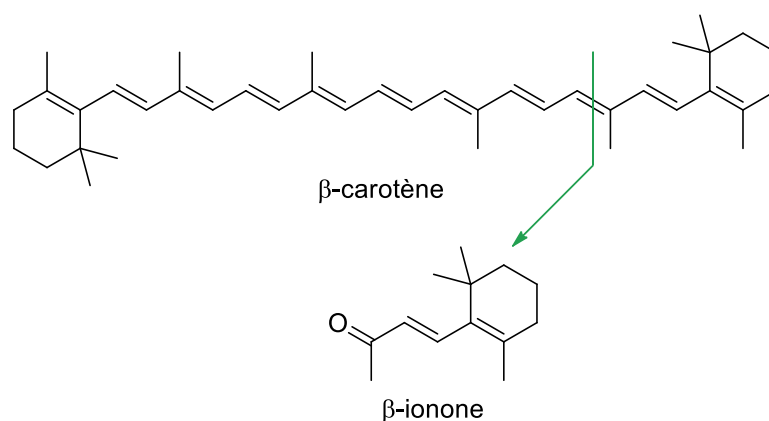


Figure 1 | Dégradation des caroténoïdes (ici le β -carotène), conduisant à la formation des C13-norisoprénoïdes (ici la β -ionone).

Dans la baie de raisin, les caroténoïdes sont majoritairement retrouvés dans la pellicule (Razungles, *et al.*, 1987). Ces composés sont absents du vin, à l'exception de certains vins mutés comme le porto (Guedes de Pinho, *et al.*, 2001). *In planta*, les caroténoïdes sont généralement décrits comme des pro-précurseurs des C13-norisoprénoïdes (Baumes, *et al.*, 2002; Enzell, 1985; Mathieu, *et al.*, 2005; Winterhalter, 1993). En effet, les dérivés C13-norisoprénoïdes odorants sont sous forme de traces à l'état libre dans le raisin, mais ils sont relativement abondants sous formes glycosylées (Marais, *et al.*, 1989; Winterhalter, 1993). Certains facteurs environnementaux, notamment l'ensoleillement, facilitent la biosynthèse des caroténoïdes du premier stade de développement de la baie jusqu'à la véraison, puis favorisent leur dégradation en C13-norisoprénoïdes glycosylés de la véraison à la maturité (Bureau, 1998). Par exemple, plusieurs dérivés C13-norisoprénoïdes oxygénés, peu ou non odorants, proviennent initialement de la dégradation oxydative de caroténoïdes par voie enzymatique dans le raisin. Puis, ces composés intermédiaires libèrent ensuite les C13-norisoprénoïdes odorants à travers des réactions chimiques en milieu acide au cours de la maturation et de la vinification. C'est le cas de la β -damascénone et la β -ionone par exemple. D'autres composés C13-norisoprénoïdes comme le TDN (1,1,6-Triméthyl-1,2-dihydronaphthalène), sont libérés à travers un ensemble de réactions similaires, mais avec des temps de réaction plus long (Pascal Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2017).

2.2. Les précurseurs glycosidiques

Les précurseurs glycosidiques possèdent une partie osidique composée d'un glucose et éventuellement un autre sucre (apiose, rhamnose ou arabinose), et une partie non osidique appelée aglycone (**Figure 2**). D'après la littérature, plus de 200 aglycones volatils (des arômes) ont été identifiés chez *Vitis vinifera* (Baumes, 2009; Liu, *et al.*, 2016), appartenant principalement à la famille des monoterpénoïdes, des C13-norisoprénoïdes, des phénols volatils, des composés en C6, des alcools aliphatiques et benzyliques (Baumes, 2009; Günata, 1984; Voirin, *et al.*, 1990; Williams, *et al.*, 1984).

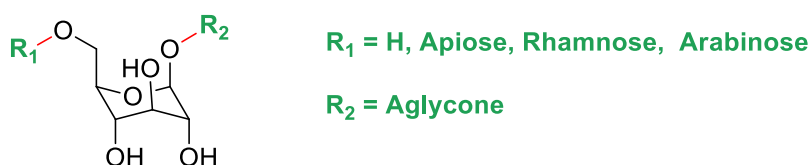


Figure 2 | Structure générale d'un précurseur glycosidique. En rouge les liaisons clivées au cours des hydrolyses permettant notamment la libération des aglycones (adapté de (Baumes, 2009)).

La biosynthèse des glycoconjugués se déroule au cours du développement du raisin. Leur teneur avant et après la véraison dépend du cépage considéré (Günata, 1984; Marais, 1987; S. K. Park, *et al.*, 1991; Williams, *et al.*, 1984; Wilson, *et al.*, 1984). Cependant, aucune relation stricte n'a été établie entre la concentration en glycoconjugués et les paramètres œnologiques classiquement utilisés (teneur en sucre et en acide, pH, ...) (Schneider, 2001).

Deux types de réactions permettent la libération des arômes :

- une hydrolyse enzymatique directe ou séquentielle, au cours de la FA (Baumes, 2009; Dugelay, *et al.*, 1992), notamment *via* des levures de type non-*Saccharomyces* ayant une activité glycosidasique, au cours de la FML ou par l'ajout d'enzymes exogènes appropriées (Ziya Gunata, *et al.*, 1988; Z. Gunata, *et al.*, 1993) ;
- une hydrolyse acido-catalysée au cours du vieillissement (De La Presa-Owens, *et al.*, 1997; Marais, 1983; Puglisi, *et al.*, 2005; Skouroumounis, *et al.*, 1992; Voirin, *et al.*, 1990; Winterhalter, 1993).

2.3. Les précurseurs du DMS

La S-méthylméthionine (SMM) a été identifiée comme étant le précurseur majoritaire du DMS (Loscos Deodad, *et al.*, 2008). Présente dans le raisin, la SMM est également retrouvée tout au long du processus de vinification. Ce n'est qu'une fois l'embouteillage effectué que le DMS se forme et s'accumule par une réaction d'élimination (dégradation d'Hoffmann) illustrée sur la **Figure 3** (M. Ségurel, *et al.*, 2005; M. A. Ségurel, *et al.*, 2004).

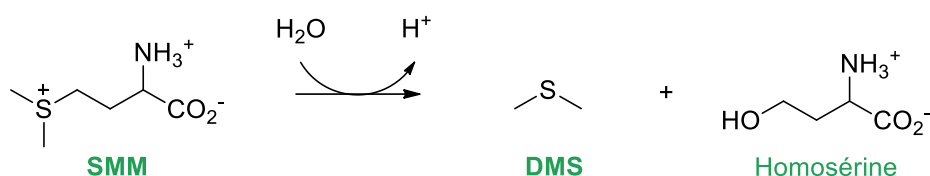


Figure 3 | Formation du DMS au cours du vieillissement par hydrolyse chimique.

Une autre voie de formation du DMS a cependant été mise en évidence au cours de la FA. En effet, la levure peut provoquer un clivage enzymatique qui libère le DMS (Schreier, *et al.*, 1976). En revanche, cette voie de formation a très peu d'impact sur l'odeur du vin, car le DMS libéré au cours de la FA est rapidement éliminé par stripping.

3. Les thiols volatils et les mécanismes de libération

Parmi les arômes retrouvés dans le vin, les thiols variétaux ont été particulièrement étudiés ces vingt-cinq dernières années et sont le sujet central de cette thèse. En effet, ils font partie des molécules odorantes les plus puissantes de certains vins, ce qui en fait des composés clés de l'arôme. Leur étude constitue ainsi un défi majeur pour la filière viticole.

Une recherche bibliographique plus large, sur les thiols volatils présents dans les boissons, ainsi que l'étude des mécanismes de libération de ces thiols à partir de précurseurs lors des procédés d'élaboration de produits transformés (vin, bière, café...), a été effectuée. L'ensemble des données rassemblées nous a semblé constituer une matière intéressante pour écrire une revue, et c'est la raison pour laquelle ce travail est présenté en anglais, en prélude à un article pour publication.

Review: Spotlight on release mechanisms of volatile thiols in beverages

Spotlight on release mechanisms of volatile thiols in beverages

Hugo BONNAFFOUX^a, Aurélie ROLAND^b, Rémi SCHNEIDER^a and Florine CAVELIER^{c*}

^a Institut Français de la Vigne et du Vin, UMT-Qualinnov, Domaine de Pech Rouge, 11430 Gruissan, France

^b Montpellier SupAgro, INRA-UMR-1083, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier, France

^c Institut des Biomolécules Max Mousseron, IBMM, UMR-5247, CNRS, Université Montpellier, ENSCM, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France

E-mail: florine.cavelier@umontpellier.fr

Contents

1. Generalities.....	30
2. Volatile thiols in beverages	30
2.1. Non-alcoholic beverages.....	30
2.1.1. Tropical fruit juices.....	30
Durian.....	32
Grapefruit	32
Guava	33
Passion fruit.....	33
Other fruits	33
2.1.2. Coffee	33
Roasted and brewed coffee.....	33
Variety and geographical influence on thiol contents in coffee	34
2.1.3. Tea	35
2.2. Alcoholic beverages.....	35
2.2.1. Wine.....	35
2.2.2. Beer.....	37
2.2.3. Sake	38
3. Release mechanisms from thiol precursors	39
3.1. Formation of thiols in coffee.....	40
3.1.1. Roasting	40
3.1.2. Brewing	40
3.2. Formation of thiols by microorganism during fermentation processes: Focus on 3MH and 4MMP	41
3.2.1. Grapes and wines.....	41
Precursors and mechanisms of transformation.....	41
Influence of viticultural and oenological processes on thiol contents.....	44

Oenological tannins.....	46
3.2.2. Hops and malts: mechanisms and precursors	46
3.2.3. Rices and Sake: mechanisms and precursors.....	48
3.3. Formation of thiols in non-fermented juice fruits	48
4. Conclusion.....	50
References	51

1. Generalities

Volatile thiols are very strong-smelling molecules that can impact the aroma of numerous foods, such as fruit, grilled meat and beverages. Several thiols and thiol precursors (or potential precursors) have already been reported in different plants used as raw material for beverage production, either fermented or not. We focus on those thiols in beverages and their release mechanisms from precursors during the different biotechnological steps of their processes. Volatile thiols in food can be classified in two different groups: low-molecular-weight volatile thiols, which impact the smell negatively, and volatile thiols with higher boiling points, which contribute positively to the aroma profile. The first part is devoted to volatile thiols without taking into account the highly malodorous small molecules as H₂S, methanethiol, ethanethiol, etc. The second part deals with precursors and the different release mechanisms induced by various processes such as extraction, roasting or fermentation, and the culture method that can influence the amount of thiol and their precursors.

2. Volatile thiols in beverages

2.1. Non-alcoholic beverages

2.1.1. Tropical fruit juices

Tropical fruits are significant sources of volatile thiol compounds (Table 1) as recently reviewed by Cannon and Ho (Cannon & Ho, 2018). The different tropical fruits containing thiol are listed by alphabetical order in the following paragraphs. By extrapolation, it is possible to deduce their presence in the corresponding fruit juices, although oxidation reaction during extraction could decrease their levels.

Table 1 – The volatile thiol compounds identified in different tropical fruits (adapted from (Cannon & Ho, 2018)). Odors not reported in the Robert *et al.* review's were referenced under the table.

Thiol compound	Fruits	Odor	Also present in
(Z)-but-2-ene-1-thiol	Durian	Skunky	
1-(ethylthio)-ethanethiol	Durian	Roasted onion	
1-(ethylthio)-propane-1-thiol	Durian	Roasted onion	
1-(methylthio)-ethanethiol	Durian	Roasted onion	
1-(methylthio)-propane-1-thiol	Durian	Roasted onion	
1-(propylthio)-ethanethiol	Durian	Roasted sesame	
1-[(1-(ethylthio)-ethyl)thio]-ethanethiol	Durian	Roasted onion	
1-[(1-(methylthio)-ethyl)thio]-ethanethiol	Durian	Roasted onion	
3-mercaptobutan-1-ol (3MB)	Durian	Onion, leek	Wine
3-methyl-but-2-ene-1-thiol (3MBT)	Durian, lemon and mango	Skunky	Beer and coffee
5-methyl-4-mercapto-2-hexanone	Durian	-	
ethane-1,1-dithiol	Durian	Sulfury, durian	
propane-1-thiol	Durian	Rotten, durian	
1- <i>p</i> -menthene-8-thiol	Grapefruit, guava, orange and pomelo	-	
2-methyl-3-furanthiol (2MFT)	Grapefruit, guava, orange and cashew apple	Boiled meat-like ^a , nuts ^b	Coffee and wine
3-mercaptohexan-1-ol (3MH)	Grapefruit, guava and passion fruit	Juicy, tropical fruits, grapefruit, black currant, guava ^c	Beer and wine
3-mercaptohexylacetate (3MHA)	Grapefruit, guava and passion fruit	Grapefruit, black currant, bucco, mango, passion fruit, guava ^c	Beer and wine
4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP)	Grapefruit, guava, mango and orange	Black currant-like	Beer, tea, sake and wine
4-mercapto-4-methylpentan-2-ol (4MMPOH)	Grapefruit and guava	Grapefruit, flowery	Beer and wine
6-mercaptohexanol	Guava	-	
3-mercapto-3,7-dimethyl-6-octenyl acetate	Lemon	Sulfurous	
(<i>E</i>)-but-2-ene-1-thiol	Mango	Sulfurous ^d	
1-phenylethanethiol	Orange	Sulfurous, resinous	
ethyl-3-mercaptopropionate (3MPE)	Papaya	-	Wine
3-mercapto-3-methylbutan-1-ol (3MMB)	Passion fruit	-	Beer, coffee and wine
3-mercapto-3-methylbutylacetate (3MMBA)	Passion fruit	-	Beer and coffee
3-mercaptohexyl butanoate	Passion fruit	Fruity, grapefruit, black currant, bucco, tropical fruits, mango ^c	

3-mercaptohexyl hexanoate	Passion fruit	Grapefruit, black currant, bucco, tropical fruits, passion fruits, guava ^c
3-mercaptohexyl pentanoate	Passion fruit	Tropical fruits, passion fruits, bucco ^c
ethyl 3-mercaptopbutyrate	Passion fruit	-

^a(Semmelroch, Laskawy, Blank, & Grosch, 1995)

^b(McGorin, 2011)

^c(P Werkhoff, Guntert, Krammer, Sommer, & Kaulen, 1998)

^d(Munafo, Didzbalis, Schnell, Schieberle, & Steinhaus, 2014)

Durian

Durian is a tropical fruit not very known in the western countries but is one of the most popular fruits for Asian peoples. It presents with strong sulfur aroma. The first thiol identified in durian was the propane-1-thiol, as well as other low molecular weight thiols in the early 1970s, by distillation of the pulp (Baldry, Dougan, & Howard, 1972). Another volatile thiol was discovered thirteen years later in Malaysian fruits, also by distillation of the pulp: the 1-(ethylthio)-ethanethiol (Wong & Tie, 1995). More than five years later, 5-methyl-4-mercapto-2-hexanone was identified in a dichloromethane-pentane extract of three Indonesian durian fruits (Weenen, Koolhaas, & Apriyantono, 1996). The other thiols mentioned in the Table 1 were identified more recently by Li *et al.* (Li, Schieberle, & Steinhaus, 2012) including 3MB present in wine and 3MBT present in beer and coffee.

Grapefruit

Grapefruit is a citrus fruit that contains a large number of volatile sulfur compounds. Among the various compounds identified, 1-*p*-menthene-8-thiol is one of the major contributors to the grapefruit juice aroma, present in other fruits as guava, orange and pomelo. In fact, this thiol has a very low odor threshold (0.1 ng/L) and a 200-fold higher concentration in the juice (Demole, Enggist, & Ohloff, 1982). The 4MMP, also found in different fruits (guava, mango and orange) and beverages (beer, tea and wine), was identified as a volatile compound in grapefruit juice using HRGC/MS (Andrea Buettner & Schieberle, 1999). Some results showed that 4MMP provides a more authentic aroma compared to 1-*p*-menthene-8-thiol (Andrea Buettner & Schieberle, 2001). The grapefruit peel also contains thiols in their oil with 4MMPOH, present in guava, beer and wine, but does not contain any trace of 1-*p*-menthene-8-thiol or 4MMP (Lin & Rouseff, 2001). The same team identified 3MH and 3MHA in grapefruit (Lin, Jella, & Rouseff, 2002), also reported in guava, passion fruit, beer and wine. Finally, Lin *et al.* elucidated the presence of 2MFT. This compound was also found in guava, orange, cashew apple, coffee and wine. Two different behaviours were highlighted during the evaporation process: decrease of all volatile thiols (except for 1-*p*-menthene-8-thiol), which suggests that there were evaporated; presence of 1-*p*-menthene-8-thiol, which can be explained through the reaction of increased concentrations of limonene and hydrogen sulfide (Lin, Rouseff, Barros, & Naim, 2002).

Guava

Guava has many thiols in common with grapefruit. The first thiol identified in white and pink guava was 6-mercaptohexanol by direct extraction of flesh juices with dichloromethane and analyzed by GC-MS (Shibamoto, Nishimura, Yamaguchi, & Mihara, 1989). It was present at higher proportion in fresh white guava (GC area peak: 3.1%) than in fresh pink guava (0.6%) and the authors hypothesized that the difference of flavor between these two types of guava might be partially due to the presence of this compound. Sixteen years later, Mahattanatawee *et al.* and Clery *et al.* identified three important thiols: 3MH, 3MHA and 4MMPOH, using headspace and solvent extraction techniques (Clery & Hammond, 2007; Mahattanatawee, Goodner, & Baldwin, 2005). More recently, three other thiols were identified (4MMP) or confirmed (1-*p*-menthene-8-thiol and 2MFT) in guava puree using GC-pulsed flame photometric detector (GC-PFPD, sulfur mode) (Plaza, Marshall, & Rouseff, 2015).

Passion fruit

With grapefruit, yellow passion fruit is one of the most studied tropical fruits, likely due to its very intense aroma. One of the chemical classes standing out in the yellow passion fruit is sulfur-containing compound and especially thiol. Four volatile thiols were firstly identified in the passion fruit and among them, 3MH and 3MHA highly contribute to passion fruit aroma (Engel & Tressl, 1991). Oenologists and winemakers compare the aromas of certain grape varieties, particularly Sauvignon blanc to that of passion fruit due to the presence of the 3MH and 3MHA in these grape varieties (Tominaga & Dubourdieu, 2000). Lund *et al.* confirmed the characteristic notes of tropical fruits from 3MH and 3MHA by sensory approach (Lund, et al., 2009). The enantiomeric distribution of 3MH and 3MHA was also studied and the *S* configuration is the major enantiomer (Sakaguchi, Sugimoto, Kasuga, & Yaguchi, 2015). Werkhoff *et al.* identified one more thiol with 3-mercaptohexylpentanoate (P. Werkhoff, Güntert, Krammer, Sommer, & Kaulen, 1998). Finally, 3MMB and 3MMBA, found also in beer, coffee and/or wine, were also identified in passion fruit (Tominaga & Dubourdieu, 2000).

Other fruits

Many authors reported thiols in other fruits than those presented above, for example in lemon (Cannon, et al., 2015), mango (Munafo, Didzbalis, Schnell, Schieberle, & Steinhaus, 2014), orange (Schieberle, Fischer, & Grab, 2008) and papaya (Schreier, Idstein, & Keller, 1985). There is no doubt that there are volatile thiols in other fruits than those listed above, and maybe in all vegetables at trace levels, still not highlighted.

2.1.2. Coffee

Roasted and brewed coffee

Coffee is an extensively consumed beverage in the world. The acceptability of coffee is due to many factors and one of the most contributory factors is aroma composition (Kumazawa & Masuda, 2003). In coffee, sulfur compounds such as thiols are among the most important contributors to its aroma despite their presence at relatively low concentration (Sunarharum, Williams, & Smyth, 2014). The major thiols present in coffee reported in the literature are

shown in Figure 1, as well as their characteristic odor (Dulsat-Serra, Quintanilla-Casas, & Vichi, 2016; Vichi, Jerí, Cortés-Francisco, Palacios, & Caixach, 2014). Dulsat-Serra *et al* also referenced the concentration of thiols in roasted and brewed coffee. Among them, five are present in wine or/and beer. 2-furanmethanethiol (2FMT) is reported as a key odorant compound responsible for the “coffee” odor with notes of roast and fresh coffee (Mayer, Czerny, & Grosch, 2000). Several factors (degree of roasting or coffee species for example) can impact the thiol content of coffee (Dulsat-Serra, Quintanilla-Casas, & Vichi, 2016). We can notice that there is a diminution of thiol concentration when passing from roasted to brewed coffee due to the low extraction rate of brewed coffee (Mayer, Czerny, & Grosch, 2000; Semmelroch & Grosch, 1996). For example, the concentration for 2FMT is up to 5080 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in roasted coffee and only up to 39 $\mu\text{g}/\text{L}$ in brewed coffee (Cheong, Tong, Ong, Liu, Curran, & Yu, 2013; Semmelroch & Grosch, 1996).

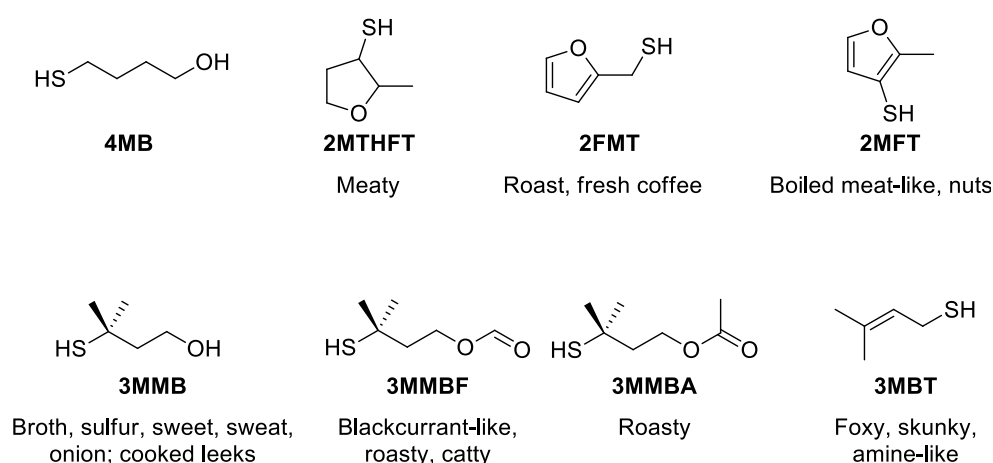


Figure 1 - Molecular structure of key odorant thiols identified in coffee: 4-mercapto-1-butanol (**4MB**); 2-methyl-3-tetrahydrofuranthiol (**2MTHFT**); 2-furanmethanethiol (**2FMT**); 2-methyl-3-furanthiol (**2MFT**); 3-mercapto-3-methylbutan-1-ol (**3MMB**); 3-mercapto-3-methylbutyl formate (**3MMBF**); 3-mercapto-3-methylbutylacetate (**3MMBA**); 3-methyl-but-2-ene-1-thiol (**3MBT**).

Variety and geographical influence on thiol contents in coffee

The variety and the geographical provenance have been shown to impact the thiol content in the coffee bean. In fact, 2FMT was reported at higher amounts and with a greater sensory impact in robusta (*Coffea canephora* var. *robusta*) than arabica (*Coffea arabica*), with a similar degree of roasting (Holscher & Steinhart, 1992; Semmelroch & Grosch, 1995; Semmelroch, Laskawy, Blank, & Grosch, 1995; Tressl & Silwar, 1981). This situation is not general to other thiols, since the 3MBT and 3MMBF levels were comparable in robusta and arabica (Semmelroch & Grosch, 1995; Semmelroch, Laskawy, Blank, & Grosch, 1995; Semmelroch & Grosch, 1996). However, the analysis of 2MFT by GC-O showed that the sensory impact seems to be higher in robusta than arabica coffee (Semmelroch & Grosch, 1995).

2.1.3. Tea

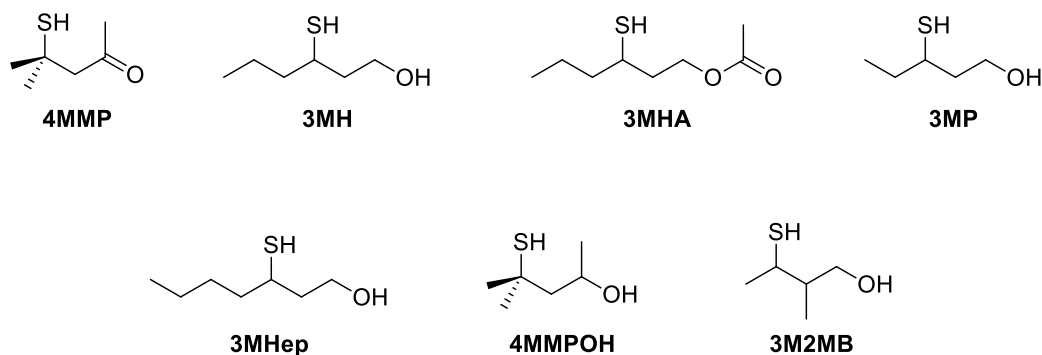
Tea aroma is an important factor affecting the character and quality of the product. There are many kinds of tea but only a very small number is known and consumed. Tea can be divided into three categories: green tea (unfermented), oolong tea (semi-fermented) and black tea (fermented). Traces of thiols were detected in Japanese green tea (Sen-cha) only, with 4MMP and 4-methoxy-2-methyl-2-butanethiol (4MMBT) exhibiting meaty notes (Kumazawa & Masuda, 1999). The authors suggested that these thiols were involved as key odorants of the Japanese green tea. However, 4MMP and 4MMBT have not been identified as volatile component of other kinds of tea (oolong and black tea).

2.2. Alcoholic beverages

2.2.1. Wine

Several studies highlighted the importance of varietal thiols in wine aroma and these sulfur-containing volatile compounds are considered for years now as key compounds (Roland, Schneider, & Cavelier, 2011). Among these compounds, the most studied are 4MMP responsible for box tree and blackcurrant buds notes (Darriet, Tominaga, Lavigne, Boidron, & Dubourdieu, 1995), the 3MH and its corresponding acetate (3MHA) reminiscent of grapefruit and passion fruit respectively (Tominaga, Darriet, & Dubourdieu, 1996; Tominaga, Furrer, Henry, & Dubourdieu, 1998). They contribute to the typical aroma of wines, such as Sauvignon blanc, Petite Arvine, Petit and Gros Manseng, Melon B., Bacchus, Sémillon, Verdajo, Scheurebe, Maccabeo, Gewürztraminer, Riesling, Muscat, Colombard and Tokay in white wine (Campo, Ferreira, Escudero, & Cacho, 2005; Darriet, Tominaga, Lavigne, Boidron, & Dubourdieu, 1995; Dubourdieu & Tominaga, 2009; Escudero, Gogorza, Melús, Ortín, Cacho, & Ferreira, 2004; Fretz, Luisier, Tominaga, & Amadò, 2005; Guth, 1997; Schneider, Kotseridis, Ray, Augier, & Baumes, 2003; Tominaga, Baltenweck-Guyot, Peyrot Des Gachons, & Dubourdieu, 2000); Provence in rosé wine (Masson & Schneider, 2009) Grenache, Cabernet Sauvignon and Merlot in red or rosé wines (Bouchilloux, Darriet, Henry, Lavigne-Cruège, & Dubourdieu, 1998; Ferreira, Ortín, Escudero, López, & Cacho, 2002; Murat, Tominaga, & Dubourdieu, 2001). Very recently, Capone *et al.* found varietal thiols in Chardonnay wine at high concentration (Capone, Barker, Williamson, & Francis, 2017). Interactions between these thiols lead to different aroma profiles depending on the amount of each thiol (Lund, et al., 2009) and the level of other molecules. Other non-varietal sulfur compounds can positively contribute to the wine aroma through coffee and meaty notes (Figure 2).

VARIETAL THIOLS



NON-VARIETAL THIOLS

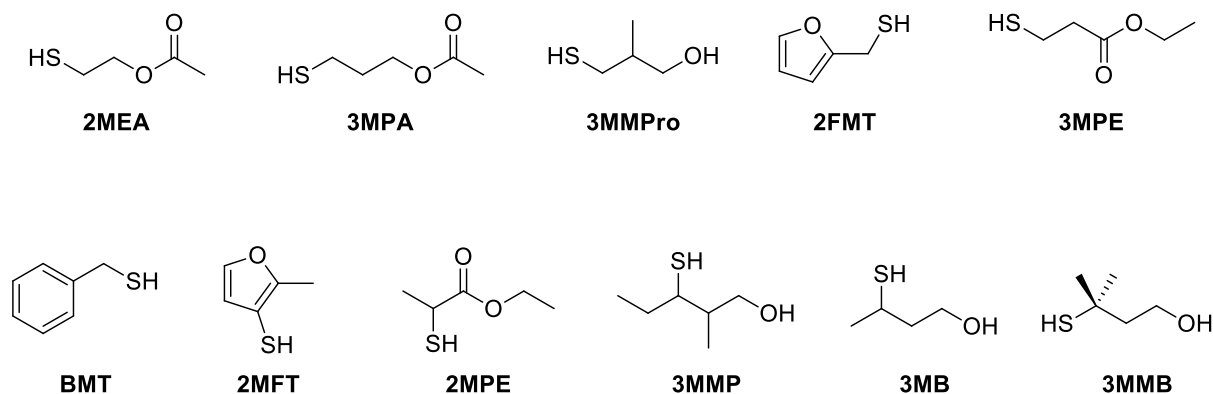


Figure 2 - Molecular structures of volatile thiols identified in *Vitis vinifera* Wine (Roland, Schneider, & Cavelier, 2011). 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (**4MMP**); 3-mercaptohexan-1-ol (**3MH**); 3-mercaptohexylacetate (**3MHA**); 3-mercaptopentan-1-ol (**3MP**); 3-mercaptoheptan-1-ol (**3MHep**); 4-mercapto-4-methylpentan-2-ol (**4MMPOH**); 3-mercapto-2-methylbutan-1-ol (**3M2MB**); 2-mercaptoethylacetate (**2MEA**); 3-mercaptopropylacetate (**3MPA**); 3-mercapto-2-methyl-propan-1-ol (**3MMPPro**); 2-furanmethanethiol (**2FMT**); Ethyl-3-mercaptopropionate (**3MPE**); Benzenemethanethiol (**BMT**); 2-methyl-3-furanthiol (**2MFT**); Ethyl-2-mercaptopropionate (**2MPE**); 3-mercapto-2-methylpentan-1-ol (**3MMP**); 3-mercaptobutan-1-ol (**3MB**); 3-mercapto-3-methylbutan-1-ol (**3MMB**).

Roland *et al.* summarized numerous data on thiols reported in the literature in terms of concentration in wine, aroma descriptors and sensory threshold in model solution. These data are shown in Table 2. Since this review, new data were published concerning other wines (Benkwitz, Tominaga, Wohlers, Lund, Kilmartin, & Nicolau, 2012; Lv, et al., 2017), but the concentrations reported were included in the concentration range already determined by Roland *et al.* (Roland, Schneider, & Cavelier, 2011).

Table 2 - Volatile thiols identified in *Vitis vinifera* wine (Roland, Schneider, & Cavelier, 2011).

Thiols	Concentration (ng.L ⁻¹)	Aroma description	Sensory threshold in model solution (ng.L ⁻¹)
4MMP	until 400	Box-tree, blackcurrant bud	0.8
3MH	until 19000	Grapefruit, passion fruit	60
3MHA	until 2500	Box-tree	4.2 (racemic mixture)
3MP	90-300	Grape fruit	950
3MHep	25-75	Grapefruit	35
4MMPOH	until 90	Citrus zest	66
3M2MB	80-150	Raw onion	nr ^b
2MEA	na ^a	Meaty	nr
3MPA	na	Meaty	nr
3MMPro	25-10000	Broth, sweat	3000 (in water)
2FMT	0.4-62	Coffee	0.4
3MPE	40-12000	Meaty	200
BMT	10-40	Smoky	0.3
2MFT	> 100	Meaty	0.4-1.0 (in water)
2MPE	na	Fruity	500
3MMP	na	Raw onion	nr
3MB	na	Onion, leek	nr
3MMB	na	Cooked leek	1500

^anot available.

^bnot reported.

Beyond the varietal effect on thiol amounts in wine, the vine production area seems to have an impact on thiols concentration. A study comparing the amount of varietal thiols (3MH, 3MHA and 4MMP) in Sauvignon blanc in different regions of New Zealand and countries (Australia, South Africa, France and USA) was published one year later (Benkowitz, Tominaga, Wohlers, Lund, Kilmartin, & Nicolau, 2012). Concerning 3MHA and 3MH, the concentrations were much higher in Marlborough than in all the other regions (Hawkes Bay and Wairarapa) and countries studied in 2003 and 2004 vintages. The amount of 4MMP was found higher in the Wairarapa region. Wines of New Zealand seems to be much concentrated in these three thiols than those of other countries studied for these vintages. Viticultural and oenological practices influence the thiols concentration in wine and will be developed in the second part of this review.

2.2.2. Beer

The importance of sulfur compounds as thiols in brewing has been pointed out more than a century ago (Garza-Ulloa, 1980). Forty-one thiols were evidenced in hops (mainly β -sulfanylalkyl acetates, alcohols and carbonyls) and most of them were found in beer (Figure 3) (Gros, Peeters, & Collin, 2012). Among them, 3-mercapto-4-methylpentan-1-ol was identified as a key contributor to the “Sauvignon-like” notes in beer produced with the Nelson Sauvin (NS) hop variety (Takoi, et al., 2009). Gros et al. studied five hop cultivars (Tomahawk, NS,

Nugget, Cascade and Saaz). Tomahawk appeared particularly rich in 3-mercapto-2-ethylpropanal. Tomahawk and NS seems were found to contain higher levels of 3-mercapto-2-ethylpropyl acetate and 3-mercaptooctanal. NS proved to contain higher amounts of β -sulfanylalkyl alcohols. Finally, 3MH was found in all cultivars, with high values for Cascade (Gros, Nizet, & Collin, 2011).

3MBT was usually described as an unpleasant flavor, the so-called skunky aroma. This flavor is caused by ultraviolet light (Hill & Smith, 2000). In fact, the transmission of light to the beer through the bottle increases 3MBT formation and using green or dark bottle is advisable to limit this phenomenon (Sakuma, Rikimaru, Kobayashi, & Kowaka, 1991).

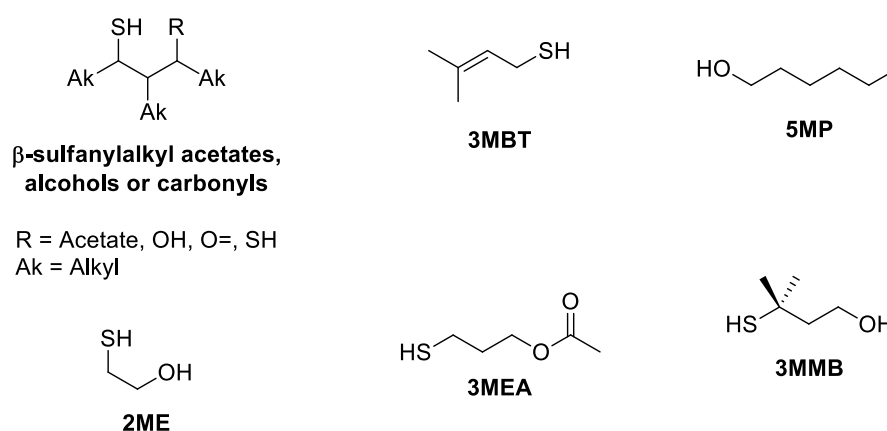


Figure 3 - Molecular structures of thiols evidenced in hop. Thirty-six β -sulfanylalkyl acetates, alcohols and carbonyls; **3MBT**; 5-mercaptopentanol (**5MP**); 2-mercaptoethanol (**2ME**); **3MEA**; **3MMB**.

A recent study highlights the content of 3MH, 3MHA and 4MMP in different categories of beer (Pale ale, Belgium origin, Pils and experimental beers). According to the data, there is no obvious link between the category of beer and the concentration of these three thiols, with an important variability in the same category: up to 1200 ng.L⁻¹ for 3MH; up to 100 ng.L⁻¹ for 3MHA; up to 300 ng.L⁻¹ for 4MMP. 3MHA was present only in experimental beers and one Pale ale and the levels were higher than those of 3MH, which is very different to the reported concentrations often close to 10% of free 3MH in wine (Roland, et al., 2016).

2.2.3. Sake

4MMP is also present in Sake, the traditional Japanese alcoholic beverage brewed by fermenting rice that has been polished to remove the bran. In fact, steamed rice is saccharified by glucoamylase of koji mold (a filamentous fungus) and the glucose formed from starch is then fermented into ethanol using a specific strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Furukawa, Tanaka, Masumura, Kiyokawa, & Wakai, 2006). The typically pleasant smelling grassy notes has been very recently attributed to 4MMP in different Sake (Iizuka-Furukawa, Isogai, Kusaka, Fujii, & Wakai, 2017). The authors reported that this thiol is the characteristic aroma of sake

made from low-glutelin rice. In the same way as in wine, 4MMP is released during AF from precursors. Iizuka-Furukawa *et al.* determined the perception threshold of 4MMP in sake at 1.2 ng/L, similar range as reported in wine and beer (Darriet, Tominaga, Lavigne, Boidron, & Dubourdiou, 1995; Toru Kishimoto, Kobayashi, Yako, Iida, & Wanikawa, 2008). There is no data on the plant variety, the rice production area or the fermentation conditions on 4MMP concentration.

In conclusion, for this part, it is interesting to highlight the frequency of appearance of thiols in beverages reviewed here. Eight thiols appear in at least 4 different beverages (Figure 4). It is interesting to notice that among these eight thiols, six of them have been identified in wine and beer, which are the most extensively studied beverages. The correlation between the number of thiol occurrence and the beverage studied seems to show that the research on thiols doesn't reach the same development level between the different beverages.

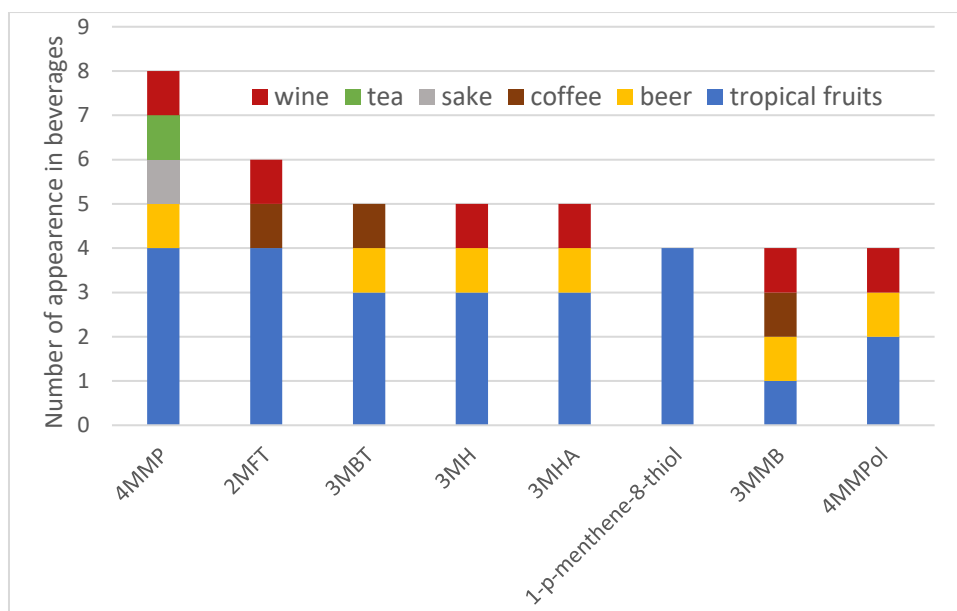


Figure 4 - Number of thiol occurrence at least equal to 4 in beverages.

3. Release mechanisms from thiol precursors

The mechanisms of thiols release from their precursors are complex and depend on:

- the plant variety (already discuss in the first part)
- the growing method
- the process (roasting for coffee, fermentation for beer, sake or wine and more simply the extraction by pressing or grinding)

3.1. Formation of thiols in coffee

3.1.1. Roasting

Roasting coffee impacts the chemical and physical properties of the initial green coffee beans. Roasting consists in rapidly brought the green beans to very high temperature (approximately 200 to 250°C), which is then quickly lowered to stop the process. The formation of thiols during this process is not completely elucidated. However, it is admitted that *S*-containing amino acids are important precursors and sulfur source for reactions with other compounds (for example sugar) that occur during coffee bean roasting (Dulsat-Serra, Quintanilla-Casas, & Vichi, 2016).

The Maillard-type reaction plays a key role in the thiol formation in roasted coffee. Indeed, many authors reported the formation of 2FMT and 2MFT from the reaction between aldose and cysteine in a model system (Cerny, 2008; Dulsat-Serra, Quintanilla-Casas, & Vichi, 2016; Hofmann & Schieberle, 1997). However, this Maillard-type reaction was dismissed by Poisson *et al.* by biomimetic in-bean experiments (Poisson, Schmalzried, Davidek, Blank, & Kerler, 2009). Another important pathway involves H₂S liberated from cysteine or methionine may react with prenyl alcohol (3-methyl-2-buten-1-ol) to obtain 3MMB (Holscher, Vitzthum, & Steinhart, 1992; Tressl, Holzer, & Kamperschroer, 1983). Holscher *et al.* published that prenyl alcohol was also identified as precursor of 3MBT (Figure 5).

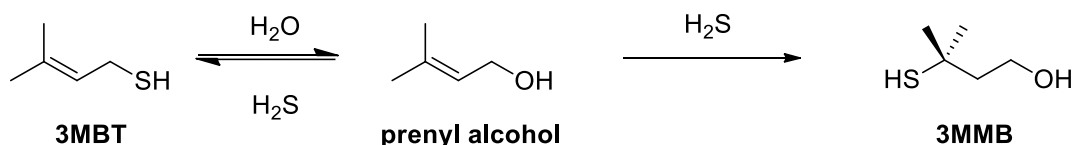


Figure 5 – Possible genesis of 3MMB and 3MBT from prenyl alcohol under roasting conditions (scheme proposed by Tressl *et al.* and adapted by Holscher *et al.* (Holscher, Vitzthum, & Steinhart, 1992; Tressl, Holzer, & Kamperschroer, 1983).

The general observation is that not only roasty, but sulfury, earthy and smoky notes improved during roasting (Grosch, 1998). Mayer *et al.* proved that 2FMT and 3MBT increased more and more with the roasting time (Mayer, Czerny, & Grosch, 1999). Roasting temperature also influences the volatile thiols formation (Baggenstoss, Poisson, Kaegi, Perren, & Escher, 2008). Different kinetics have been reported in the literature, by comparing the evolution of 3MMB and the two corresponding esters during roasting: 3MMB and 3MMBF increase linearly with the temperature of roasting, whereas 3MMBA increases only at higher degrees (Kumazawa & Masuda, 2003). Thus, 2FMT and 3MBT/3MMBF have different behaviour: 2FMT is favoured by a long-time process at low-temperature in contrast to 3MBT and 3MMBF (Baggenstoss, Poisson, Kaegi, Perren, & Escher, 2008; Schenker, Heinemann, Huber, Pompizzi, Perren, & Escher, 2002).

3.1.2. Brewing

Once the coffee has been roasted, the amount of thiols in the brewed coffee is not proportional to the initial level in roasted coffee. In fact, the efficiency of the extraction (solid-liquid) during

the brewing process is impacted by physical parameters (water temperature, pressure, time of extraction and water/coffee ratio) (Mayer, Czerny, & Grosch, 2000; Semmelroch & Grosch, 1996). However, data on the content of thiols under different coffee brewing conditions are extremely scarce and only methanethiol evolution is documented (Andueza, Maetzu, Pascual, Ibañez, de la Peña, & Cid, 2003). Methanethiol is more abundant in espresso coffee than in other types of brewed coffee, due to the extraction pressure and the higher ratio between coffee and water. In this type of brewed coffee, the water temperature is important for the extraction efficiency of methanethiol (Andueza, Maetzu, Pascual, Ibañez, de la Peña, & Cid, 2003). Although it might be possible to extrapolate methanethiol tendency on other thiols, supplementary data are needed to highlight the impact parameters of brewing process without going beyond assumptions.

3.2. Formation of thiols by microorganism during fermentation processes: Focus on 3MH and 4MMP

Prefermentative steps can influence the thiol levels. As an example, prefermentative operations in grapes as skin maceration could lead to an increase of 3MH and 4MMP in white wine. Must conservation on lees, another prefermentative process, increases the amount of 3MH and 3MHA in wine, without increasing the amount of precursors during this process (Roland, Schneider, Charrier, Cavelier, Rossignol, & Razungles, 2011).

During winemaking or beer brewing, AF is an essential step for the sugar conversion into alcohol by yeast, but it also impacts other compounds at lower concentration such as polyphenols and aromas such as varietal thiols. 3MH and 4MMP are produced during AF by the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) using a β -lyase activity (Cordente, Capone, & Curtin, 2015; Tominaga, Peyrot des Gachons, & Dubourdieu, 1998) from odorless *S*-conjugate precursors.

3.2.1. Grapes and wines

Precursors and mechanisms of transformation

Several precursor families have been identified in grapes and musts and have been widely studied. They are listed below by chronological order of identification:

- cysteine *S*-conjugates to 3MH and 4MMP (Cys-3MH and Cys-4MMP) (Tominaga, Peyrot des Gachons, & Dubourdieu, 1998);
- glutathione *S*-conjugates to 3MH and 4MMP (G-3MH and G-4MMP) (Fedrizzi, Pardon, Sefton, Eley, & Jeffery, 2009; Peyrot des Gachons, Tominaga, & Dubourdieu, 2002b);
- cysteinyl-glycine *S*-conjugates to 3MH (CysGly-3MH) (Bonnaffoux, Delpech, Rémond, Schneider, Roland, & Cavelier, 2018; Capone, Pardon, Cordente, & Jeffery, 2011);

- *S*-(3-hexan-1-yl)-glutathione (G-3MHA) and its bisulfite adduct (Thibon, Böcker, Shinkaruk, Moine, Darriet, & Dubourdieu, 2016);
- γ -glutamyl-cysteine *S*-conjugate to 3MH (γ GluCys-3MH) (Bonnaffoux, Roland, Rémond, Delpech, Schneider, & Cavelier, 2017; Bonnaffoux, Delpech, Rémond, Schneider, Roland, & Cavelier, 2018).

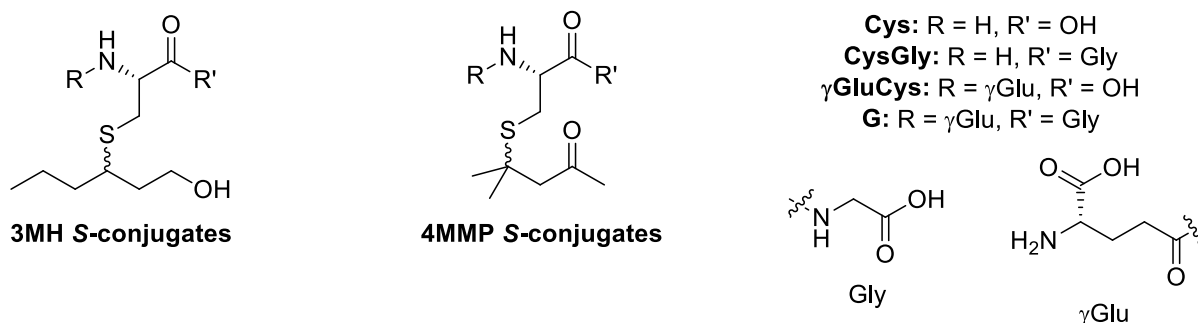


Figure 6 – Chemical structures of 3MH and 4MMP *S*-conjugates.

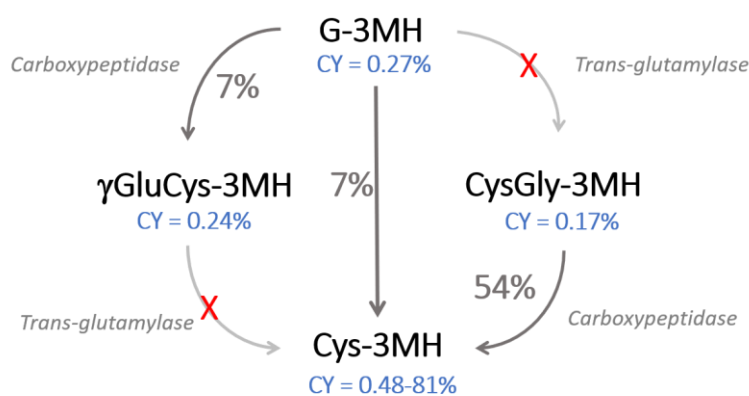
Another pathway was also evidenced: 3MH can result of the addition of a sulfhydryl donor group to the (*E*)-2-hexenal during alcoholic fermentation (AF) (Schneider, Charrier, Razungles, & Baumes, 2006). It has been suggested that H₂S could be one of the sulfur donor (Harsch, Benkwitz, Frost, Colonna-Ceccaldi, Gardner, & Salmon, 2013). Then, sulfonic acids were hypothesized on structural basis but not identified yet (Duhamel, Piano, Davidson, Larcher, Fedrizzi, & Barker, 2015). Finally, cysteinyl-glycine *S*-conjugates to 4MMP (CysGly-4MMP) and γ -glutamyl-cysteine *S*-conjugate to 4MMP (γ GluCys-4MMP) were not identified yet. A signal by UPLC-MS/MS using stable isotope dilution assay confirmed the presence of CysGly-4MMP and γ GluCys-4MMP but the intensity of the signal was below the recommended values for formal identification (Bonnaffoux, Roland, Rémond, Delpech, Schneider, & Cavelier, 2017). Cys-3MH, G-3MH, CysGly-3MH, γ GluCys-3MH, Cys-4MMP and G-4MMP were quantified in different varieties of grape (Table 3) and Sauvignon blanc presented the higher concentration of 3MH precursors (Peña-Gallego, Hernández-Orte, Cacho, & Ferreira, 2012).

Inter-conversions between *S*-conjugates under defined oenological conditions were highlighted. Firstly, all precursors were partially metabolised during AF (Bonnaffoux, Delpech, Rémond, Schneider, Roland, & Cavelier, 2018; Concejero, Hernandez-Orte, Astrain, Lacau, Baron, & Ferreira, 2016), whereas it was commonly accepted by scientific community that conversion was complete. During fermentation, monitoring of thiol precursor levels in the fermentation medium showed that G-3MH could be partially cleaved (7%) in γ GluCys-3MH, contrarily to G-4MMP which was practically not metabolised. Regarding dipeptides, 54% of CysGly-3MH (respectively 6% of CysGly-4MMP) was cleaved into cysteinyl *S*-conjugates, while γ GluCys *S*-conjugates were not metabolised (Figure 7) (Bonnaffoux, Delpech, Rémond, Schneider, Roland, & Cavelier, 2018). For precursors metabolised by the yeast, only a little part are cleaved by the yeast to give varietal thiols. Indeed, conversion yields of all cysteinyl *S*-conjugates precursors into their respective varietal thiols (3MH or 4MMP) were found to be between 0.17 and 1% (Bonnaffoux, Delpech, Rémond, Schneider, Roland, & Cavelier, 2018; Jeffery, 2016). The other part of metabolised precursors is still unknown. Different cleavages could generate some amino acids or sulfur peptides. Finally, the conversion of precursors to thiols is an epiphenomenon in quantitative terms, but still important to give the aromatic notes to wine.

Table 3 - Concentration of varietal thiol precursors derived from the cysteine S-conjugate in musts

Grape variety	Range of concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$)					
	Cys-3MH	G-3MH	CysGly-3MH	$\gamma\text{GluCys-3MH}$	Cys-4MMP	G-4MMP
Sauvignon blanc	0.035-15859	0.82-642	5.8-28.5	3.3-36.1	0.03-8.7	0.03-4.3
Semillon	3.6-686	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Chardonnay	7-38	111-517	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Riesling	10-30.8	0.7-275	N.A.	N.A.	<1.9	0.6-1.8
Pinot Grigio	23-27	338-467	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Melon B.	0.4-1.05	0.08-0.2	N.A.	N.A.	1.77	n.d.
Gewurztraminer	52.9-65.2	5.6-7.1	N.A.	N.A.	0.5-0.8	0.1-0.2
Petite Arvine	18-85	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Cabernet Sauvignon	2.1-2.2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Merlot	1.66-3.5	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Koshu	2.2-11	4.1-40.7	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

Black value: (Peña-Gallego, Hernández-Orte, Cacho, & Ferreira, 2012)
Blue value: (Bonnaïfoux, Roland, Rémond, Delpèch, Schneider, & Cavelier, 2017; Capone, Pardon, Cordente, & Jeffery, 2011)



CY : Conversion yield of the precursor into 3MH

Figure 7 - Relationship between precursors derived from cysteinyl S-conjugates to 3MH during AF (adapted from (Bonnaïfoux, Delpèch, Rémond, Schneider, Roland, & Cavelier, 2018)).

Another study found different conversion yields, especially for G-3MH. For example, Roland *et al.* calculated a conversion yield for G-3MH of 3% (Roland, Schneider, Le Guernevé,

Razungles, & Cavelier, 2010). Therefore, this difference could be attributable to the assimilable nitrogen, which might be different from one must to another. Although numerous precursors of varietal thiols have been elucidated, the correlation between the concentration of thiols in wines and the amount of precursors found in musts is not verified (Pinu, Jouanneau, Nicolau, Gardner, & Villas-Boas, 2012). That means, other parameters drive thiol release from precursors. Furthermore, the low conversion yields remain problematic.

Influence of viticultural and oenological processes on thiol contents

The evolution of the aromatic potential, responsible for the release of varietal thiols, was studied in order to better understand the biogenesis of these precursors in berries during maturation. A study on the evolution of cysteinyl precursors in bunches of Sauvignon blanc one month before the grape harvest showed a great variability in the precursor content, which would probably depend on the chemical composition of the berry (assimilable nitrogen for example) (Peyrot des Gachons, Tominaga, & Dubourdieu, 2000). The combination of sulfur and nitrogen foliar supply in Sauvignon blanc vines increases the varietal thiol contents in the resulting wines, but the authors didn't report an enhance of precursors (Lacroux, et al., 2008). However, ammonium fertilization increases cysteine *S*-conjugates to 3MH, 4MMP and 4MMPOH. The maturation directly affects the concentration of certain precursors in Sauvignon blanc (Cys-3MH, G-3MH and G-4MMP) by increasing their initial amount in berries (Roland, Vialaret, Razungles, Rigou, & Schneider, 2010). The water deficit impacts the concentration of cysteinyl precursors in Sauvignon blanc grapes. The amount of Cys-3MH increase with a moderate water deficit, in contrary to Cys-4MMP (cases in Bordeaux conditions with a moderate water deficit) (Choné, 2001). Others pedoclimatic conditions play an important role on thiol content. Indeed, high temperatures seem to promote the presence of 3MH and 3MHA in Colombard wines. Overall, the aromatic contents obtained on clay-limestone soils are slightly higher than those on acidic sandy-clay soils (Dufourcq, 2003).

Cysteinylated and glutathionylated precursors of 3MH and 4MMP are mainly located in the skin (Sauvignon blanc and Melon B.) (Peyrot des Gachons, Tominaga, & Dubourdieu, 2002a). Recently, Jeffery reports data on 3MH precursor concentration for Sauvignon blanc grapes undergoing different treatments (Jeffery, 2016). It appears that hand-harvesting yielded lower precursor concentrations than machine harvest due to the limiting berry damage, precursor extraction and the enzymatic mechanisms generated. Similarly, precursors increased during transport or storage of grapes, for the same reason as previously. The precursors of thiols subjected to increasing doses of SO₂ added at harvest decreases proportionally, maybe due to an inhibition of enzymatic reactions (Capone & Jeffery, 2011; Capone, Sefton, & Jeffery, 2012). Some studies showed that Cys-3MH increases in rosé musts of Merlot and Cabernet Sauvignon as a result of prolonged skin maceration (Murat, Tominaga, & Dubourdieu, 2001). A prefermentative pressing cycle in the wine cellar increased varietal thiol precursors. Prefermentative cold storage of the must on their lees did not influence the concentration of Cys-3MH and G-3MH in Sauvignon blanc must. However, the content of 3MH and 3MHA in resulting wines increased significantly and proportionally to the duration of on-lees must cold storage. This increase could be due to the formation of other thiol precursors, during prefermentative operations (Roland, Schneider, Charrier, Cavelier, Rossignol, & Razungles, 2011).

During AF, varietal thiols are released by *Saccharomyces Cerevisiae* yeast through its beta-lyase activity. Some of them have demonstrated their ability to release varietal thiols under oenological conditions (Dubourdieu, Tominaga, Masneuf, Peyrot des Gachons, & Murat, 2006; Howell, et al., 2004; Murat, Masneuf, Darriet, Lavigne, Tominaga, & Dubourdieu, 2001; Swiegers, Francis, Herderich, & Pretorius, 2006). Furthermore, a cofermentation with a non *S. cerevisiae* yeast (*Pichia kluyveri*) can generate more 3MH and 3MHA in Sauvignon blanc wine (Anfang, Brajkovich, & Goddard, 2009) and similarly, an interspecific hybrid (*S. cerevisiae* X *S. bayanus*) was found to enhance the 4MMP concentration compared to its parent *S. cerevisiae*. Other parameters can influence the release of varietal thiols, especially the fermentation temperature. Indeed, AF conducted at 20°C instead of 13°C was found to increase 3MH, 3MHA and 4MMP concentrations in wine (Masneuf-Pomarède, Mansour, Murat, Tominaga, & Dubourdieu, 2006) and warmer conditions (around 28°C) result in larger content of 4MMP. In this latter case, the results seem to be dependent on the yeast strain used (Howell, et al., 2004). A few studies highlight precursors transport in the yeast cell required for their cleavage. In *S. cerevisiae*, the main transporter of G-3MH and G-4MMP inside the cell is *OPT1*, while *GEX1* expels these precursors out of the cell (Cordente, Capone, & Curtin, 2015; Dhaouia, et al., 2011). In the same way, only *YBT1* seems to play a role in the transport of G-3MH into the vacuole. Different degradations of glutathione S-conjugates involved into the vacuole or the cytosol through aminopeptidase to obtain γ GluCys, CysGly and cysteine S-conjugates (Cordente, Capone, & Curtin, 2015). Finally, release of 3MH and 4MMP from their corresponding cysteine precursors is mediated by *STR3* and *IRC7* (Holt, et al., 2011; Roncoroni, et al., 2011; Thibon, Marullo, Claisse, Cullin, Dubourdieu, & Tominaga, 2008).

Very recently, Takase *et al.* study the bioconversion of 3MH precursors into 3MH by lactic acid bacteria. Among species tested, *Lactobacillus plantarum* is able to metabolise Cys-3MH and CysGly-3MH to produce 3MH (Takase, Sasaki, Kiyomichi, Kobayashi, Matsuo, & Takata, 2018). However, those results were obtained either in culture medium or on a must, without the interference of AF. Thus oenological conditions need to be tested to confirm this observation since few lactic acid bacteria (except *Oenococcus oeni*) are resistant to these particular conditions.

During aging, the wine will undergo structural and aromatic modifications, while some wines increase their value and quality as they age, others might deteriorate over time, especially wines susceptible to oxidation. Thiols are chemically unstable because they are easily oxidable in disulfide, even under mild oxidative conditions (Hofmann, Schieberle, & Grosch, 1996; Roland, Delpech, Dagan, Ducasse, Cavelier, & Schneider, 2016; Sarrazin, Shinkaruk, Pons, Thibon, Bennetau, & Darriet, 2010). Possible mechanisms of thiol trapping were involved in the presence of oxygen (Nikolantonaki, Chichuc, Teissedre, & Darriet, 2010), through the Fenton reaction (Danilewicz, 2003; Waterhouse & Laurie, 2006). The oxygen transfer rate during the storage is dependent of the type of stopper (synthetic, cork). In fact, synthetic stoppers are known for their oxygen barrier properties (Lopes, Saucier, & Glories, 2005; Lopes, Saucier, Teissedre, & Glories, 2006). Nevertheless, the use of cork could cause an absorption of certain volatile compounds into the stopper that is called scalping. This phenomenon could be responsible for the loss of aroma in Sauvignon blanc by trapping 3MH and 3MHA (Brajkovich, et al., 2005). However, it must be kept in mind that the total absence of oxygen, especially in white wines, results in the production of reduced dominant odors. A compromise

must be made to protect the aromas of white wines from oxidation without the formation of reduced compounds. The aging on lees before bottling could be a solution, similarly as natural glutathione or SO₂ adding which have a protecting effect against the loss of fruity notes in wines (Blanchard, Darriet, & Dubourdieu, 2004; Brajkovich, et al., 2005).

Oenological tannins

Oenological tannin formulations are used in winemaking for the different contribution they can give to the wine (colour stability for example).

Cys-3MH and G-3MH were identified for the first time in those formulations, from different biological sources (Grapes, tea, trees, etc ...). Very high contents were found in grape skin tannins (Larcher, Tonidandel, Nicolini, & Fedrizzi, 2013), that could be considered as residue from tannins extraction:

- Cys-3MH (between around 0.3 and 200 mg.kg⁻¹, median = 9.1 mg.kg⁻¹)
- G-3MH (between around 0.2 and 138 mg.kg⁻¹, median = 10.1 mg.kg⁻¹)

These technological processing aids or additives can be used as a potential aroma of passion fruit and grape fruit for wine. Oenological tannins could be added before or during AF to allow the yeast to release 3MH in wine. However, oenological tannin addition must be carry on carefully since they can negatively impact on wine sensory character even if those authors didn't observe detrimental effect at the dosage used (Harbertson, Parpinello, Heymann, & Downeyd, 2012; Larcher, Tonidandel, Nicolini, & Fedrizzi, 2013).

3.2.2. Hops and malts: mechanisms and precursors

Occurrence of thiol precursors in both malts and hops was firstly hypothesized in 2008 (Toru Kishimoto, Morimoto, Kobayashi, Yako, & Wanikawa, 2008) and few years later, Cys-3MH was identified in hop (Gros, Peeters, & Collin, 2012). Cys-3MH was considered as precursor of 3MH thanks to an enzymatic degradation promoted by the yeast during bottle re-fermentation or during Belgian beer ageing (Nizet, Gros, Peeters, Chaumont, Robiette, & Collin, 2013; Tran, Cibaka, & Collin, 2015). The first quantification of Cys-3MH revealed that Cys-3MH might be present until 1641 ppb as 3MH equivalent in Cascade hop variety (Gros, Tran, & Collin, 2013). In addition to Cys-3MH, three others precursors of 3MH and 4MMP were identified and quantified into several hop varieties (Chinook, Saaz, Barbe Rouge, Cascade, Mistral, Aramis Alsace, Strisselspat and Mandarina) using direct LC-MS/MS analysis and SIDA (Stable isotope dilution assay) (Roland, et al., 2016):

- Cys-3MH: between around 0.130 (Mandarina) and 1.1 mg.kg⁻¹ (Barbe Rouge)
- G-3MH: between around 1.3 (Barbe Rouge) and 19 mg.kg⁻¹ (Cascade)
- Cys-4MMP: between around 0.005 (Saaz) and 0.04 mg.kg⁻¹ (Strisselspat)
- G-4MMP: quantified only in Chinook at 0.01 mg.kg⁻¹

In this study, the distribution of thiol precursors in different hop varieties seems to be very different. Thiol precursors in those variety are mainly 3MH precursors and G-3MH represented more than 80 % of the total amount of thiol precursors, except for Barbe Rouge hops where the

levels of Cys-3MH and G3MH are quite similar. Furthermore, the total amount of thiol precursors is highly dependent of the hop varieties.

We have to point out that, contrary to grapes, hops are also rich in free thiols. The proportion of free/bounded thiols (i.e. as thiol precursor) depends on the thiols considered (3MH or 4MMP and in a lesser extent on the hop variety): less than 1% for 3MH free/bounded fraction in Chinook and Barbe Rouge; up to 23% or 95% for 4MMP free/bounded fraction of Chinook or Saaz hops respectively (Roland, et al., 2016). Similar experiments on 3MH revealed that free/bounded fraction ratios are closed to 2% for Citra, 4% for Tomahawk and 7% for Cascade (Cibaka, Gros, Nizet, & Collin, 2015). Roland *et al.* also tried to build some hypotheses about thiol origins from different categories of beer (Pale ale, Belgium origin, IPA, Pils and experimental beers). They observed an important variability of thiol contents in the same category of beers. The authors were surprised to observe that 3MHA occurred practically only in experimental beers with a level higher than those of 3MH. It can be explained by the specific yeasts or fermentation conditions used during the elaboration of the experimental beers. Another counter-intuitive fact is that IPA beer, with intensive hopping, contains relatively low levels of 3MH (less than 180 ng.L^{-1}). Thereby, hops might not be the only source of thiol and thiol precursors for beers. Malts was hypothesized as another source (T. Kishimoto, Wanikawa, Kono, & Shibata, 2006). Other precursors need to be investigated and other precursors should be identified, based on those identified in the grape must: CysGly-3MH, γ GluCys-3MH, G-3MH-Al and its bisulfite.

Other mechanisms of thiol formation have been highlighted more than 60 years ago. Indeed, a formal mechanism was described for the 3MBT formation which involved isohumulones (Kuroiwa & Hashimoto, 1961). In fact, these compounds absorbed light to give a radical reaction and release a carbonyl radical. Then, a decarbonylation to a dimethyl allyl radical, followed by a reaction including a thiol radical from a sulfur source generates 3MBT (Figure 8). More recently, this mechanism was fully detailed and comprehensively described (De Keukeleire, Heyerick, Huvaere, Skibsted, & Andersen, 2008).

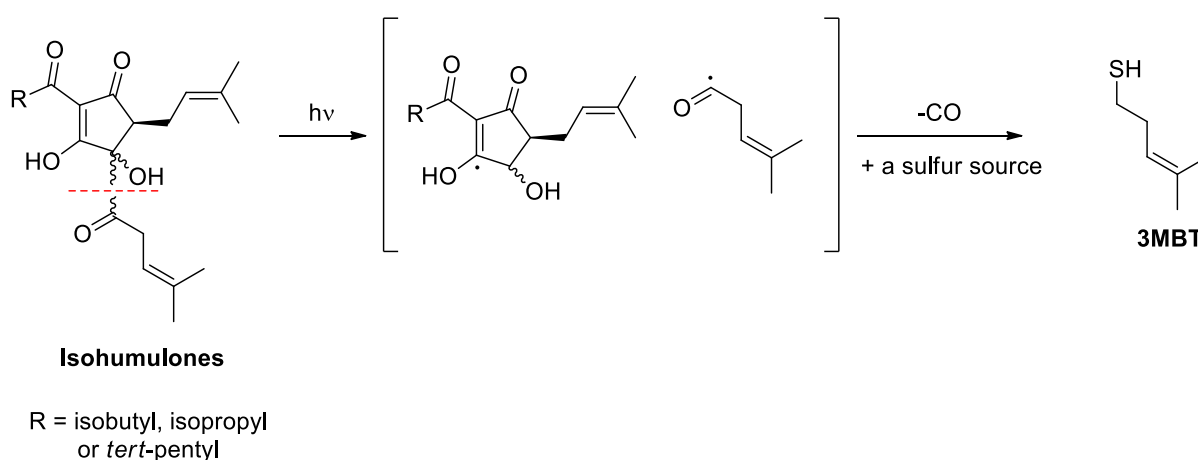


Figure 8 - UV light degradation of 3MBT from isohumulones degradation

3.2.3. Rices and Sake: mechanisms and precursors

Up to now, only one publication pointed out the contribution of 4MMP to the aroma of sake and the putative mechanisms for its genesis (Iizuka-Furukawa, Isogai, Kusaka, Fujii, & Wakai, 2017). However, G-4MMP was identified in two different sake (*Mizuhonoka sake* and *Gin-ohmi sake*) and in two different rices (*Mizuhonoka rice* and *Gin-ohmi rice*) and in koji. In contrast, Cys-4MMP was not detected in sake, rice of Mizuhonoka and Gin-ohmi and koji, probably due to the limits of detection of Cys-4MMP (23 $\mu\text{g/L}$). The authors highlight the release of 4MMP during AF from a model medium with addition of synthesized Cys-4MMP and G-4MMP in the absence and presence of sake yeast (Figure 9). The authors concluded that 4MMP was released from both Cys-4MMP and G-4MMP by sake yeast. However, the relationship between G-4MMP or Cys-4MMP and their corresponding thiol have not been formally certified because no filiation in the sake has been made yet.

Considering the lack of data available for the sake production context, further studies have to be performed in order to investigate the rice-growing condition impact (cultivars, water status, nitrogen fertilization) or the process impact (rice drying and storage, fermentation conditions, final product bottling and storage, ...) to better understand the release mechanisms during sake production.

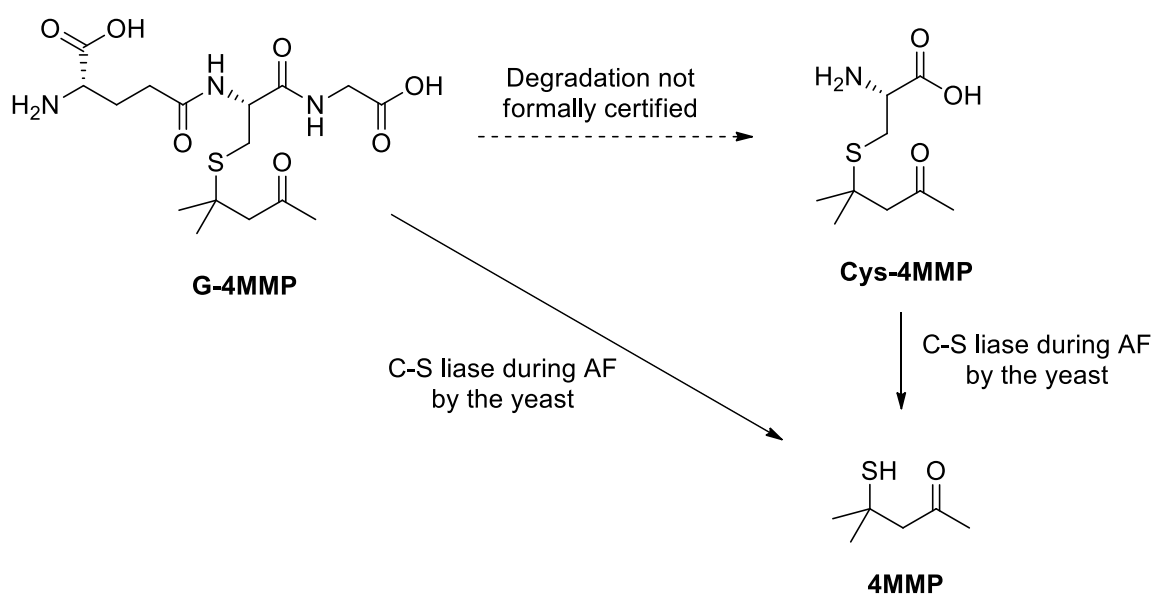


Figure 9 – Release of **4MMP** from synthesized **G-4MMP** and **Cys-4MMP** during AF using sake yeast from a model medium.

3.3. Formation of thiols in non-fermented juice fruits

Different exotic fruit has been investigated. For durian, few references in literature discuss the precursors and mechanisms of thiols in durian. Bacteria in the arils (fleshy envelope developed

around the seed) of the fruit could be part of the mechanism release of thiol (Suhandono & Utari, 2014). In fact, these bacteria could catalyse the enzymatic release of hydrogen sulphide and methanethiol from cysteine or methionine respectively (Cannon & Ho, 2018), which can be extended to all thiols in durian presented in Table 1.

For guava, the concentrations of 3MH and 3MHA evolve differently during maturation according to the variety of the guava. Concerning pink guava, these thiols increase from green to overripe, which is the opposite for white guava (Sinuco, Steinhaus, Schieberle, & Osorio, 2010). The authors attempted to isolate and treat precursors with β -lyase, but without produce 3MH. Instead, they hypothesized that unsaturated carbonyls, especially (*E*)-2-hexenal could be the pathway to the 3MH formation.

Passion fruit is the most documented fruit concerning release mechanisms of thiols. The first 3MH precursor identified in a passion fruit juice from La Réunion was Cys-3MH. It was identified using trimethylsilylation and then GC-MS analysis (Tominaga & Dubourdiou, 2000). More recently, three other *S*-conjugates precursors (G-3MH, CysGly-3MH and γ GluCys-3MH) were identified (Fedrizzi, et al., 2012).

These precursors were identified by LC-MS comparing the retention time of the compounds naturally present in the passion fruit and those synthesized.

With the identification of these compounds, the authors proposed a hypothetical pathway for the biogenesis of 3MH (Figure 7; *in planta* and without yeast). Indeed, G-3MH could be degraded with the cleavage either of the glutamate moiety by a γ -glutamyl transferase (Grzam, Martin, Hell, & Meyer, 2007) or with the removal of the glycine residue by a carboxypeptidase (Wolf, Dietz, & Schröder, 1996) to give the CysGly-3MH and γ GluCys-3MH respectively. Then, CysGly-3MH (or γ GluCys-3MH) could be degraded by a carboxypeptidase (or γ glutamyl transferase) to obtain the Cys-3MH.

Others hypotheses were discussed for the formation of 3MHA through the esterification of 3MH with the corresponding acid (Tressl & Albrecht, 1986). More recently, it was discovered enzymes in the passionfruit located in the mesocarp, that could hydrolyse thioesters to their respective thiols (Edwards, Tapp, Cummins, & Brassington, 2008). This could also explain the formation of 3MH and 3MHA.

4. Conclusion

Thiols and their precursors are widely studied in beverages and food industry and a lot of release mechanisms were elucidated. It is interesting to note that several precursors, especially glutathione *S*-conjugate derivatives were identified in different plant raw materials, such as grape (and must), tannin, fruits, hop, malt and rice. Except for the passion fruit, all these plants after AF of must, rice or hop and malt can release varietal thiols according to the same

mechanism: a β -lyase induced by a fermentative yeast. However, and except for grape and wine, there is a lack of knowledge about the hypothetical inter-conversion between these glutathione *S*-conjugates derivatives. In grape and wine, release mechanisms are widely studied, contrary in rice and sake.

Concerning thiols, several compounds, such as 3MMB, are present in different beverages (wine, beer and coffee). The mechanisms during roasting coffee such as the genesis of 3MMB and 3MBT from prenyl alcohol, could be extended to beer and red wine during high temperatures process (such as thermovinification heats process for example). However, it is important to notice that the roasting process is done by dry way while the vinification by wet way, which involved different mechanisms. Maillard reaction formations exist in wine (Marchand, de Revel, Vercauteren, & Bertrand, 2002), but they occurred mainly during storage over a very long period.

References

- Andueza, S., Maetzu, L., Pascual, L., Ibañez, C., de la Peña, M. P., & Cid, C. (2003). Influence of extraction temperature on the final quality of espresso coffee. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *83*, 240-248.
- Anfang, N., Brajkovich, M., & Goddard, M. R. (2009). Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *15*(1), 1-8.
- Baggenstoss, J., Poisson, L., Kaegi, R., Perren, R., & Escher, F. (2008). Coffee Roasting and Aroma Formation: Application of Different Time-Temperature Conditions. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *56*, 5836-5846.
- Baldry, J., Dougan, J., & Howard, G. E. (1972). Volatile flavouring constituents of durian. *Phytochemistry*, *11*, 2081-2084.
- Benkwitz, F., Tominaga, T., Wohlers, M., Lund, C., Kilmartin, P. A., & Nicolau, L. (2012). Identifying the Chemical Composition Related to the Distinct Aroma Characteristics of New Zealand Sauvignon blanc Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, *63*, 62-72.
- Blanchard, L., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2004). Reactivity of 3-Mercaptohexanol in Red Wine: Impact of Oxygen, Phenolic Fractions, and Sulfur Dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture*, *55*, 115-120.
- Bonnafox, H., Roland, A., Rémond, E., Delpech, S., Schneider, R., & Cavelier, F. (2017). First identification and quantification of *S*-3-(hexan-1-ol)- γ -glutamyl-cysteine in grape must as a potential thiol precursor, using UPLC-MS/MS analysis and stable isotope dilution assay. *Food Chemistry*, *237*, 877-886.
- Bonnafox, H., Delpech, S., Rémond, E., Schneider, R., Roland, A., & Cavelier, F. (2018). Revisiting the evaluation strategy of varietal thiol biogenesis. *Food Chemistry*, *268*, 126-133.
- Bouchilloux, P., Darriet, P., Henry, R., Lavigne-Cruège, V., & Dubourdieu, D. (1998). Identification of Volatile and Powerful Odorous Thiols in Bordeaux Red Wine Varieties. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *46*, 3095-3099.
- Brajkovich, M., Tibbits, N., Peron, G., Lund, C. M., Dykes, S. I., Kilmartin, P. A., & Nicolau, L. (2005). Effect of Screwcap and Cork Closures on SO₂ Levels and Aromas in a Sauvignon Blanc Wine. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *53*, 10006-10011.
- Buettner, A., & Schieberle, P. (1999). Characterization of the Most Odor-Active Volatiles in Fresh, Hand-Squeezed Juice of Grapefruit (*Citrus paradisi* Macfayden). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *47*, 5189-5193.
- Buettner, A., & Schieberle, P. (2001). Evaluation of key aroma compounds in hand-squeezed grapefruit juice (*Citrus paradisi* Macfayden) by

- quantitation and flavor reconstitution experiments. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 1358-1363.
- Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., & Cacho, J. (2005). Prediction of the Wine Sensory Properties Related to Grape Variety from Dynamic-Headspace Gas Chromatography–Olfactometry Data. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 5682–5690.
- Cannon, R. J., Kazimierski, A., Curto, N. L., Li, J., Trinnaman, L., Janczuk, A. J., Agyemang, D., Da Costa, N. C., & Chen, M. Z. (2015). Identification, synthesis, and characterization of novel sulfur-containing volatile compounds from the in-depth analysis of Lisbon lemon peels (*Citrus limon* L. Burm f. cv. Lisbon). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 63, 1915-1931.
- Cannon, R. J., & Ho, C.-T. (2018). Volatile sulfur compounds in tropical fruits. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, 445-468.
- Capone, D. L., & Jeffery, D. W. (2011). Effects of transporting and processing Sauvignon blanc grapes on 3-mercaptohexan-1-ol precursor concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4659-4667.
- Capone, D. L., Pardon, K. H., Cordente, A. G., & Jeffery, D. W. (2011). Identification and Quantitation of 3-S-Cysteinyglycinehexan-1-ol (Cysgly-3-MH) in Sauvignon blanc Grape Juice by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 11204-11210.
- Capone, D. L., Sefton, M. A., & Jeffery, D. W. (2012). Analytical Investigations of Wine Odorant 3-Mercaptohexan-1-ol and Its Precursors. In M. C. Qian & T. H. Shellhammer (Eds.), *Flavor Chemistry of Wine and Other Alcoholic Beverages*, (pp. 15-35). Washington, DC: American Chemical Society.
- Capone, D. L., Barker, A., Williamson, P., & Francis, I. (2017). The role of potent thiols in Chardonnay wine aroma. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 24, 38-50.
- Cerny, C. (2008). The Aroma Side of the Maillard Reaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1126, 66-71.
- Cheong, M. W., Tong, K. H., Ong, J. J. M., Liu, S. Q., Curran, P., & Yu, B. (2013). Volatile composition and antioxidant capacity of Arabica coffee. *Food Research International*, 51, 388–396.
- Choné, X. (2001). Contribution à l'étude des terroirs de Bordeaux : étude des déficits hydriques modérés, de l'alimentation en azote et de leurs effets sur le potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. Thèse de Doctorat (p. 188): Université de Bordeaux.
- Cibaka, M.-L. K., Gros, J., Nizet, S., & Collin, S. (2015). Quantitation of Selected Terpenoids and Mercaptans in the Dual-Purpose Hop Varieties Amarillo, Citra, Hallertau Blanc, Mosaic, and Sorachi Ace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 3022–3030.

- Clery, R. A., & Hammond, C. J. (2007). New sulfur components of pink guava fruit (*Psidium guajava* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 20, 315-317.
- Concejero, B., Hernandez-Orte, P., Astrain, J., Lacau, B., Baron, C., & Ferreira, V. (2016). Evolution of polyfunctional mercaptans and their precursors during Merlot alcoholic fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 770-776.
- Cordente, A. G., Capone, D. L., & Curtin, C. D. (2015). Unravelling glutathione conjugate catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glutathione/dipeptide transporters and vacuolar function in the release of volatile sulfur compounds 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 9709–9722.
- Danilewicz, J. C. (2003). Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 73–85.
- Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J. N., & 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 Journal*, 10, 385-392.
- De Keukeleire, D., Heyerick, A., Huvaere, K., Skibsted, L. H., & Andersen, M. L. (2008). Beer lightstruck flavor: The full story. *Cerevisia*, 33, 133-144.
- Demole, E., Enggist, P., & Ohloff, G. (1982). 1-*p*-Menthene-8-thiol: A powerful flavor impact constituent of grapefruit juice (*Citrus paradisi* MACFAYDEN). *Helvetica Chimica Acta*, 65, 1785-1794.
- Dhaouia, M., Auchère, F., Blaiseau, P.-L., Lesuisse, E., Landoulsi, A., Camadro, J.-M., Haguenaer-Tsapis, R., & Belgareh-Touzé, N. (2011). Gex1 is a yeast glutathione exchanger that interferes with pH and redox homeostasis. *Molecular Biology of the Cell*, 22, 2054-2067.
- Dubourdieu, D., Tominaga, T., Masneuf, I., Peyrot des Gachons, C., & Murat, M. L. (2006). The Role of Yeasts in Grape Flavor Development during Fermentation: The Example of Sauvignon blanc. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(1), 81.
- Dubourdieu, D., & Tominaga, T. (2009). *Polyfunctionnal Thiol Compounds. In Wine chemistry and biochemistry*: Springer, New York, NY.
- Dufourcq, T. (2003). Incidences de facteurs viticoles sur le potentiel aromatique du cépage Colombard en Gascogne. *Station régionale ITV Midi-Pyrénées, Journée technique régionale*, 12-17.
- Duhamel, N., Piano, F., Davidson, S. J., Larcher, R., Fedrizzi, B., & Barker, D. (2015). Synthesis of alkyl sulfonic acid aldehydes and alcohols, putative precursors to important wine aroma thiols. *Tetrahedron Letters*, 56(13), 1728-1731.

- Dulsat-Serra, N., Quintanilla-Casas, B., & Vichi, S. (2016). Volatile thiols in coffee: A review on their formation, degradation, assessment and influence on coffee sensory quality. *Food Research International*, 89, 982-988.
- Edwards, R., Tapp, E. J., Cummins, I., & Brassington, D. (2008). Determination and isolation of a thioesterase from passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) that hydrolyzes volatile thioesters. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56, 6623-6630.
- Engel, K. H., & Tressl, R. (1991). Identification of new sulfur-containing volatiles in yellow passion fruits (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(12), 2249-2252.
- Escudero, A., Gogorza, B., Melús, M. A., Ortín, N., Cacho, J., & Ferreira, V. (2004). Characterization of the aroma of a wine from maccabeo. Key role played by compounds with low odor activity values. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 3516-3524.
- Fedrizzi, B., Pardon, K. H., Sefton, M. A., Elsey, G. M., & Jeffery, D. W. (2009). First Identification of 4-S-Glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a Potential Precursor of 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon Blanc Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 991-995.
- Fedrizzi, B., Guella, G., Perenzoni, D., Gasperotti, M., Masuero, D., Vrhovsek, U., & Mattivi, F. (2012). Identification of intermediates involved in the biosynthetic pathway of 3-mercaptohexan-1-ol conjugates in yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Phytochemistry*, 77, 287-293.
- Ferreira, V., Ortín, N., Escudero, A., López, R., & Cacho, J. (2002). Chemical Characterization of the Aroma of Grenache Rose´ Wines: Aroma Extract Dilution Analysis, Quantitative Determination, and Sensory Reconstitution Studies. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 4048-4054.
- Fretz, C. B., Luisier, J.-L., Tominaga, T., & Amadò, R. (2005). 3-Mercaptohexanol: An Aroma Impact Compound of Petite Arvine Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 407-410.
- Furukawa, S., Tanaka, K., Masumura, T., Kiyokawa, Y., & Wakai, Y. (2006). Influence of Rice Proteins on Eating Quality of Cooked Rice and on Aroma and Flavor of Sake. *Cereal Chemistry*, 83, 439-446.
- Garza-Ulloa, H. (1980). Analytical Control of Sulfur Compounds in Beer: A Review. *Brewers Digest*, 20-26.
- Gros, J., Nizet, S., & Collin, S. (2011). Occurrence of Odorant Polyfunctional Thiols in the Super Alpha Tomahawk Hop Cultivar. Comparison with the Thiol-rich Nelson Sauvignon Bitter Variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(16), 8853-8865.
- Gros, J., Peeters, F., & Collin, S. (2012). Occurrence of Odorant Polyfunctional Thiols in Beers Hopped with Different Cultivars. First Evidence of an S-Cysteine Conjugate in Hop (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 7805-7816.

- Gros, J., Tran, T. T. H., & Collin, S. (2013). Enzymatic release of odourant polyfunctional thiols from cysteine conjugates in hop. *Journal of the Institute of Brewing*, *119*, 221–227.
- Grosch, W. (1998). Flavour of coffee. A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, *42*, 344–350.
- Grzam, A., Martin, M., Hell, R., & Meyer, A. (2007). γ -Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in Arabidopsis. *Letters*, *581*, 3131–3138.
- Guth, H. (1997). Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *45*, 3027–3032.
- Harbertson, J. F., Parpinello, G. P., Heymann, H., & Downey, M. O. (2012). Impact of exogenous tannin additions on wine chemistry and wine sensory character. *Food Chemistry*, *131*, 999–1008.
- Harsch, M. J., Benkwitz, F., Frost, A., Colonna-Ceccaldi, B., Gardner, R. C., & Salmon, J.-M. (2013). New precursor of 3-mercaptohexan-1-ol in grape juice: thiol-forming potential and kinetics during early stages of must fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(15), 3703–3713.
- Hill, P. G., & Smith, R. M. (2000). Determination of sulphur compounds in beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis with pulsed flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, *872*, 203–213.
- Hofmann, T., Schieberle, P., & Grosch, W. (1996). Model Studies on the Oxidative Stability of Odor-Active Thiols Occurring in Food Flavors. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *44*, 251–255.
- Hofmann, T., & Schieberle, P. (1997). Identification of Potent Aroma Compounds in Thermally Treated Mixtures of Glucose/Cysteine and Rhamnose/Cysteine Using Aroma Extract Dilution Techniques. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *45*, 898–906.
- Holscher, W., & Steinhart, H. (1992). Investigation of roasted coffee freshness with an improved headspace technique. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, *195*, 33–38.
- Holscher, W., Vitzthum, O. G., & Steinhart, H. (1992). Prenyl Alcohol-Source for Odorants in Roasted Coffee. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *40*, 655–658.
- Holt, S., Cordente, A. G., Williams, S. J., Capone, D. L., Jitjaroen, W., Menz, I. R., Curtin, C., & Anderson, P. A. (2011). Engineering *Saccharomyces cerevisiae* To Release 3-Mercaptohexan-1-ol during Fermentation through Overexpression of an *S. cerevisiae* Gene, STR3, for Improvement of Wine Aroma. *American Society for Microbiology*, *77*, 3626–3632.
- Howell, K. S., Swiegers, J. H., Elsey, G. M., Siebert, T. E., Bartowsky, E. J., Fleet, G. H., Pretorius, I. S., & de, M. A. (2004). Variation in 4-mercapto-4-

- methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. *FEMS Microbiology Letters*, 240(2), 125-129.
- Iizuka-Furukawa, S., Isogai, A., Kusaka, K., Fujii, T., & Wakai, Y. (2017). Identification of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one as the characteristic aroma of sake made from low-glutelin rice. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123 209-215.
- Jeffery, D. W. (2016). Spotlight on Varietal Thiols and Precursors in Grapes and Wines. *Australian Journal of Chemistry*, 69, 1323–1330.
- Kishimoto, T., Wanikawa, A., Kono, K., & Shibata, K. (2006). Comparison of the odor-active compounds in unhopped beer and beers hopped with different hop varieties. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54, 8855-8861.
- Kishimoto, T., Kobayashi, M., Yako, N., Iida, A., & Wanikawa, A. (2008). Comparison of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one contents in hop cultivars from different growing regions. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56, 1051-1057.
- Kishimoto, T., Morimoto, M., Kobayashi, M., Yako, N., & Wanikawa, A. (2008). Behaviors of 3-Mercaptohexan-1-ol and 3-Mercaptohexyl Acetate During Brewing Processes. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 66, 192.
- Kumazawa, K., & Masuda, H. (1999). Identification of Potent Odorants in Japanese Green Tea (Sen-cha). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 5169–5172.
- Kumazawa, K., & Masuda, H. (2003). Identification of Odor-Active 3-Mercapto-3-methylbutyl Acetate in Volatile Fraction of Roasted Coffee Brew Isolated by Steam Distillation under Reduced Pressure. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51, 3079–3082.
- Kuroiwa, Y., & Hashimoto, H. (1961). Studies on hops with reference to their role in the evolution of sunstruck flavor of beer. *Rep. Res. Lab. Kirin Brew. Co. Ltd*, 4, 35-40.
- Lacroux, F., Tregoat, O., Van Leeuwen, C., Pons, A., Tominaga, T., Lavigne-Cruège, V., & Dubourdiou, D. (2008). Effect of foliar nitrogen and sulphur application on aromatic expression of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *Journal international des sciences de la vigne et du vin*, 42, 1-8.
- Larcher, R., Tonidandel, L., Nicolini, G., & Fedrizzi, B. (2013). First evidence of the presence of *S*-cysteinylated and *S*-glutathionylated precursors in tannins. *Food Chemistry*, 141, 1196-1202.
- Li, J.-X., Schieberle, P., & Steinhaus, M. (2012). Characterization of the major odor-active compounds in Thai durian (*Durio zibethinus* L. 'Monthong') by aroma extract dilution analysis and headspace gas chromatography-olfactometry. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 60, 11253-11262.
- Lin, J., & Rouseff, R. L. (2001). Characterization of aroma-impact compounds in cold-pressed grapefruit oil using time-intensity gc-olfactometry and gc-ms. *Flavour and Fragrance Journal*, 16, 457-463.

- Lin, J., Jella, P., & Rouseff, R. L. (2002). *Gas chromatography-olfactometry and chemiluminescence characterization of grapefruit juice volatile sulfur compounds*. Washington DC: ACS Symposium Series.
- Lin, J., Rouseff, R. L., Barros, S., & Naim, M. (2002). Aroma composition changes in early season grapefruit juice produced from thermal concentration. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 813-819.
- Lopes, P., Saucier, C., & Glories, Y. (2005). Nondestructive Colorimetric Method To Determine the Oxygen Diffusion Rate through Closures Used in Winemaking. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 6967-6973.
- Lopes, P., Saucier, C., Teissedre, P.-L., & Glories, Y. (2006). Impact of Storage Position on Oxygen Ingress through Different Closures into Wine Bottles. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54, 6741-6746.
- Lund, C. M., Thompson, M. K., Benkwitz, F., Wohler, M. W., Triggs, C. M., Gardner, R., Heymann, H., & Nicolau, L. (2009). New Zealand Sauvignon blanc Distinct Flavor Characteristics: Sensory, Chemical, and Consumer Aspects. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60, 1-12.
- Lv, Z., You, J., Lu, S., Sun, W., Ji, Z., Sun, Z., Song, C., Chen, G., Li, G., Hu, N., Zhou, W., & Suo, Y. (2017). Sensitive determination of thiols in wine samples by a stableisotope-coded derivatization reagentd⁰/d⁴-acridone-10-ethyl-N-maleimide coupled withhigh-performance liquid chromatography-electrosprayionization-tandem mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, 1491, 98-107.
- Mahattanatawee, K., Goodner, K. L., & Baldwin, E. A. (2005). Volatile constituents and character impact compounds of selected Florida's tropical fruit. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 8, 414-418.
- Marchand, S., de Revel, G., Vercauteren, J., & Bertrand, A. (2002). Possible Mechanism for Involvement of Cysteine in Aroma Production in Wine. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 6160–6164.
- Masneuf-Pomarède, I., Mansour, C., Murat, M.-L., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2006). Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines. *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), 385-390.
- Masson, G., & Schneider, R. (2009). Key Compounds of Provence Rosé Wine Flavor. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60, 116-122.
- Mayer, F., Czerny, M., & Grosch, W. (1999). Influence of provenance and roast degree on the composition of potent odorants in Arabica coffees. *European Food Research and Technology*, 209, 242–250.
- Mayer, F., Czerny, M., & Grosch, W. (2000). Sensory study of the character impact aroma compounds of a coffee beverage. *European Food Research and Technology*, 211, 272-276.
- McGorrin, R. J. (2011). The significance of volatile sulfur compounds in food flavors. In: Volatile sulfur compounds in food. In M. Qian (Ed.), ACS

- symposium series*, (pp. 3-31). Washington DC: American Chemical Society.
- Munafò, J. P., Didzbalis, J., Schnell, R. J., Schieberle, P., & Steinhaus, M. (2014). Characterization of the major aroma-active compounds in mango (*Mangifera indica* L.) cultivars Haden, White Alfonso, Praya Sowoy, Royal Special, and Malindi by application of a comparative aroma extract dilution analysis. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *62*, 4544-4551.
- Murat, M.-L., Masneuf, I., Darriet, P., Lavigne, V., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2001). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strains on the Liberation of Volatile Thiols in Sauvignon blanc Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, *52*, 136-139.
- Murat, M.-L., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2001). Assessing the Aromatic Potential of Cabernet Sauvignon and Merlot Musts Used to Produce Rose Wine by Assaying the Cysteinylated Precursor of 3-Mercaptohexan-1-ol. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *49*, 5412-5417.
- Nikolantonaki, M., Chichuc, I., Teissedre, P.-L., & Darriet, P. (2010). Reactivity of volatile thiols with polyphenols in a wine-model medium: Impact of oxygen, iron, and sulfur dioxide. *Analytica Chimica Acta*, *660*, 102-109.
- Nizet, S., Gros, J., Peeters, F., Chaumont, S., Robiette, R., & Collin, S. (2013). First Evidence of the Production of Odorant Polyfunctional Thiols by Bottle Refermentation *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *71*(1), 15-22.
- Peña-Gallego, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2012). S-Cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors in grapes. A review. *Food Chemistry*, *131*, 1-13.
- Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2000). Measuring the aromatic potential of *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon blanc grapes by assaying S-cysteine conjugates, precursors of the volatile thiols responsible for their varietal aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(8), 3387-3391.
- Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2002a). Localization of S-Cysteine Conjugates in the Berry: Effect of Skin Contact on Aromatic Potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc Must. *American Journal of Enology and Viticulture*, *53*, 144-146.
- Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2002b). Sulfur Aroma Precursor Present in S-glutathione Conjugate Form: Identification of S-3-(Hexan-1-ol)-glutathione in Must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 4076-4079.
- Pinu, F., Jouanneau, S., Nicolau, L., Gardner, R. C., & Villas-Boas, S. G. (2012). Concentrations of the Volatile Thiol 3-Mercaptohexanol in Sauvignon blanc Wines: No Correlation with Juice Precursors. *American Journal of Enology and Viticulture*, *63*, 407-412.

- Plaza, M. L., Marshall, M. R., & Rouseff, R. L. (2015). Volatile composition and aroma activity of guava puree before and after thermal and dense phase carbon dioxide treatments. *Journal of Food Science*, 218-227.
- Poisson, L., Schmalzried, F., Davidek, T., Blank, I., & Kerler, J. (2009). Study on the Role of Precursors in Coffee Flavor Formation Using In-Bean Experiments. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57, 9923–9931.
- Roland, A., Schneider, R., Le Guernevé, C., Razungles, A., & Cavelier, F. (2010). Identification and quantification by LC–MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: Elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chemistry*, 121(3), 847-855.
- Roland, A., Vialaret, J., Razungles, A., Rigou, P., & Schneider, R. (2010). Evolution of *S*-cysteinylated and *S*-glutathionylated thiol precursors during oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4406-4413.
- Roland, A., Schneider, R., & Cavelier, F. (2011). Varietal Thiols in Wine: Discovery, Analysis and Applications. *Chemical Reviews*, 111, 7355-7376.
- Roland, A., Schneider, R., Charrier, F., Cavelier, F., Rossignol, M., & Razungles, A. (2011). Distribution of varietal thiol precursors in the skin and the pulp of Melon B. and Sauvignon Blanc grapes. *Food Chemistry*, 125(1), 139-144.
- Roland, A., Delpech, S., Dagan, L., Ducasse, M.-A., Cavelier, F., & Schneider, R. (2016). Innovative analysis of 3-mercaptohexan-1-ol, 3-mercaptohexylacetate and their corresponding disulfides in wine by Stable Isotope Dilution Assay and nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1468, 154-163.
- Roland, A., Viel, C., Reillon, F., Delpech, S., Boivin, P., Schneider, R., & Dagan, L. (2016). First identification and quantification of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one in hops (*Humulus lupulus*). *Flavour and Fragrance Journal*, 31, 455-463.
- Roncoroni, M., Santiago, M., Hooks, D. O., Moroney, S., Harsch, M. J., Lee, S. A., Richards, K. D., Nicolau, L., & Gardner, R. C. (2011). The yeast IRC7 gene encodes a β -lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. *Food Microbiology*, 28, 926-935.
- Sakaguchi, K., Sugimoto, D., Kasuga, H., & Yaguchi, Y. (2015). Development of a method for purification of thiols and identification of sulfur-containing volatiles in purple passion fruit. In A. J. Taylor & D. S. Mottram (Eds.), *Flavour science: proceedings of the XIV Weurman flavour research symposium*, (pp. 37-42). Leicestershire:: Context.
- Sakuma, S., Rikimaru, Y., Kobayashi, K., & Kowaka, M. (1991). Sunstruck Flavor Formation in Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 49, 162-165.

- Sarrazin, E., Shinkaruk, S., Pons, M., Thibon, C., Bennetau, B., & Darriet, P. (2010). Elucidation of the 1,3-Sulfanylalcohol Oxidation Mechanism: An Unusual Identification of the Disulfide of 3-Sulfanylhexanol in Sauternes Botrytized Wines. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *58*, 10606-10613.
- Schenker, S., Heinemann, C., Huber, M., Pompizzi, R., Perren, R., & Escher, F. (2002). Impact of Roasting Conditions on the Formation of Aroma Compounds in Coffee Beans. *Journal of Food Science*, *67*, 60-66.
- Schieberle, P., Fischer, A., & Grab, W. (2008). Characterization of the most odour-active compounds in a peel oil extract from Pontianak oranges (*Citrus nobilis* var. Lour. microcarpa Hassk.). *European Food Research and Technology*, *227*, 735-744.
- Schneider, R., Kotseridis, Y., Ray, J.-L., Augier, C., & Baumes, R. (2003). Quantitative Determination of Sulfur-Containing Wine Odorants at Sub Parts per Billion Levels. 2. Development and Application of a Stable Isotope Dilution Assay. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *51*, 3243-3248.
- Schneider, R., Charrier, F., Razungles, A., & Baumes, R. (2006). Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wines. *Analytica Chimica Acta*, *563*, 58-64.
- Schreier, P., Idstein, H., & Keller, T. (1985). Volatile constituents of mountain papaya (*Carica candamarcensis*, syn. *C. pubescens* Lenne et Koch) fruit. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *33*, 663-666.
- Semmelroch, P., & Grosch, W. (1995). Analysis of roasted coffee powders and brews by gas chromatography-olfactometry of headspace samples. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, *28*, 310-313.
- Semmelroch, P., Laskawy, G., Blank, I., & Grosch, W. (1995). Determination of potent odourants in roasted coffee by stable isotope dilution assays. *Flavour and Fragrance Journal*, *10*, 1-7.
- Semmelroch, P., & Grosch, W. (1996). Studies on Character Impact Odorants of Coffee Brews. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *44*, 537-543.
- Shibamoto, T., Nishimura, O., Yamaguchi, K., & Mihara, S. (1989). Volatile constituents of guava fruits (*Psidium guajava*, L.) and canned puree. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *37*, 139-142.
- Sinuco, D. C., Steinhaus, M., Schieberle, P., & Osorio, C. (2010). Changes in odour-active compounds of two varieties of Colombian guava (*Psidium guajava* L.) during ripening. *European Food Research and Technology*, *230*, 859-864.
- Suhandono, S., & Utari, I. B. (2014). Isolation and Molecular Identification of Endophytic Bacteria from the Arils of Durian (*Durio zibethinus* Murr.) var. Matahari. *Microbiology Indonesia*, *8*, 161-169.

- Sunarharum, W. B., Williams, D. J., & Smyth, H. E. (2014). Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. *Food Research International*, *62*, 315-325.
- Swiegers, J. H., Francis, I. L., Herderich, M. J., & Pretorius, I. S. (2006). Meeting consumer expectations through management in vineyard and winery. The choice of yeast for fermentation offers great potential to adjust the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, *21*, 34.
- Takase, H., Sasaki, K., Kiyomichi, D., Kobayashi, H., Matsuo, H., & Takata, R. (2018). Impact of *Lactobacillus plantarum* on thiol precursor biotransformation leading to production of 3-sulfanylhexan-1-ol. *Food Chemistry*, *259*, 99-104.
- Takoi, K., Degueil, M., Shinkaruk, S., Thibon, C., Maeda, K., Ito, K., Bennetau, B., Dubourdieu, D., & Tominaga, T. (2009). Identification and Characteristics of New Volatile Thiols Derived from the Hop (*Humulus lupulus* L.) Cultivar Nelson Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(6), 2493-2502.
- Thibon, C., Marullo, P., Claisse, O., Cullin, C., Dubourdieu, D., & Tominaga, T. (2008). Nitrogen catabolic repression controls the release of volatile thiols by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *FEMS Yeast Research*, *8*, 1076-1086.
- Thibon, C., Böcker, C., Shinkaruk, S., Moine, V., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2016). Identification of S-3-(hexanal)-glutathione and its bisulfite adduct in grape juice from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc as new potential precursors of 3SH. *Food Chemistry*, *199*, 711-719.
- Tominaga, T., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (1996). Identification of 3-mercaptohexyl acetate in Sauvignon wine, a powerful aromatic compound exhibiting box-tree odor. *Vitis*, *35*, 207-210.
- Tominaga, T., Furrer, A., Henry, R., & Dubourdieu, D. (1998). Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour and Fragrance Journal*, *13*(3), 159-162.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 5215-5219.
- Tominaga, T., Baltenweck-Guyot, R., Peyrot Des Gachons, C., & Dubourdieu, D. (2000). Contribution of Volatile Thiols to the Aromas of White Wines Made From Several *Vitis vinifera* Grape Varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, *51*, 178-181.
- Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2000). Identification of Cysteinylated Aroma Precursors of Certain Volatile Thiols in Passion Fruit Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 2874-2876.

- Tran, T. T. H., Cibaka, M.-L. K., & Collin, S. (2015). Polyfunctional Thiols in Fresh and Aged Belgian Special Beers: Fate of Hop S-Cysteine Conjugates. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 73(1), 61-70.
- Tressl, R., & Silwar, R. J. (1981). Investigation of sulfur-containing components in roasted coffee. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 29, 1078-1982.
- Tressl, R., Holzer, M., & Kamperschroer, H. (1983)ASIC (Ed.), *Dixième colloque scientifique internationale sur le café*, vol. 10 (pp. 279-292). Paris.
- Tressl, R., & Albrecht, W. (1986). Biogenesis of aroma compounds through acyl pathways. In T. H. Parliament & R. Croteau (Eds.), *Biogeneration of aromas*, (pp. 114-133). Washington DC:: American Chemical Society.
- Vichi, S., Jerí, Y., Cortés-Francisco, N., Palacios, O., & Caixach, J. (2014). Determination of volatile thiols in roasted coffee by derivatization and liquid chromatography–high resolution mass spectrometric analysis. *Food Research International*, 64, 610–617.
- Waterhouse, A. L., & Laurie, V. F. (2006). Oxidation of wine phenolics: a critical evaluation and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 306-313.
- Weenen, H., Koolhaas, W. E., & Apriyantono, A. (1996). Sulfur-containing volatiles of durian fruits (*Durio zibethinus* Murr.). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 44, 3291-3293.
- Werkhoff, P., Guntert, M., Krammer, G., Sommer, H., & Kaulen, J. (1998). Vacuum headspace method in aroma research: flavor chemistry of yellow passion fruits. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46, 1076-1093.
- Werkhoff, P., Guntert, M., Krammer, G., Sommer, H., & Kaulen, J. (1998). Vacuum Headspace Method in Aroma Research: Flavor Chemistry of Yellow Passion Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1076-1093.
- Wolf, A., Dietz, K.-J., & Schröder, P. (1996). Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *Letters*, 384, 31-34.
- Wong, K. C., & Tie, D. Y. (1995). Volatile constituents of durian (*Durio zibethinus* Murr.). *Flavour and Fragrance Journal*, 10, 79-83.

4. Objectifs de la thèse et organisation de la recherche

Plusieurs familles de précurseurs ont été identifiées dans le raisin et le moût. Elles sont listées dans la revue présentée dans la partie précédente. Ainsi, plusieurs voies de biogenèse des thiols variétaux dans les vins ont été élucidées, impliquant les cystéines S-conjugués (Cys-3MH et Cys-4MMP), les glutathions S-conjugués (G-3MH, G-3MH-AI, G-3MH-SO₃ et G-4MMP), et l'(E)-hex-2-énal. En s'intéressant à l'origine du 3MH dans le vin, seuls les travaux de Subileau *et al.* ont permis, avec précision et en milieu naturel, de donner un rendement de conversion du Cys-3MH, et ainsi d'estimer que seulement 3 à 7 % du 3MH produit provient de ce précurseur (Subileau, *et al.*, 2008). En ce qui concerne les S-conjugués au glutathion, Roland *et al.* ont montré que le G-3MH était responsable de 3 % du 3MH total produit (Roland, *et al.*, 2010a). La contribution de son analogue aldéhyde et son adduit bisulfite, identifiés récemment, est estimée à environ 1 % (Thibon, *et al.*, 2016). Enfin, environ 10 % de l'origine du 3MH peut être expliquée par l'(E)-hex-2-énal (Schneider, *et al.*, 2006). Ainsi, au total, seulement 17 à 21 % de l'origine du 3MH est expliquée dans le vin. En vue d'étudier et de mieux comprendre l'origine des thiols variétaux, d'autres pistes de précurseurs doivent être explorées.

Parmi les composés susceptibles d'être précurseurs de thiols variétaux, les formes dipeptidiques S-conjuguées complémentaires du glutathion S-conjugués peuvent être des candidats de choix (**Figure 4**).

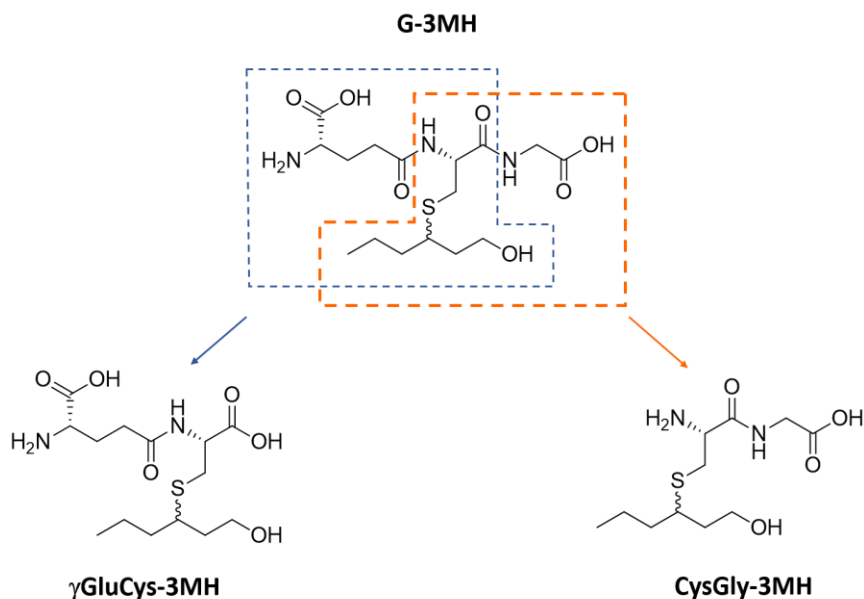


Figure 4 | Les formes dipeptidiques S-conjugués au 3MH.

Parmi ces dipeptides S-conjugués, seul le CysGly-3MH a déjà été identifié dans un moût de Sauvignon blanc provenant de baies ayant subies un transport de longue durée (12 heures) ; ce transport pouvant impacter l'extraction des précurseurs (Capone, *et al.*, 2011a). Son rôle de précurseur n'a cependant jamais été élucidé. C'est pourquoi, dans notre recherche de nouveaux précurseurs, les dipeptides S-conjugués au 3MH (CysGly-3MH et γ GluCys-3MH), au 3MHAI (CysGly-3MHAI et γ GluCys-3MHAI), ou à la 4MMP (CysGly-4MMP et γ GluCys-4MMP) sont particulièrement étudiés. De plus, ces composés pourraient être de possibles intermédiaires entre les glutathionylés et les cystéinylés S-conjugués. En effet, l'hypothèse d'inter-conversions entre ces différents précurseurs a déjà été formulée (Fedrizzi, *et al.*, 2012; Peyrot des Gachons, *et al.*, 2002). Des suivis de leur évolution dans les moûts et en fermentation ont donc été menés pour élucider d'éventuelles inter-conversions.

Les objectifs de mon travail de thèse ont donc été :

- d'identifier de nouvelles formes de précurseurs pour contribuer à une meilleure connaissance du potentiel aromatique de type thiols des raisins. J'introduirai mon travail en commençant par un premier chapitre sur l'identification et la quantification d'un nouveau composé susceptible d'être un précurseur d'un thiol variétal, faisant intervenir la

synthèse organique pour l'obtention de standards internes, et l'analyse pour l'identification et la quantification de ces composés dans le moût ;

- d'établir d'éventuelles réactions d'inter-conversions entre les précurseurs au cours de la FA, qui constituera mon deuxième chapitre. J'exposerai donc les différentes inter-conversions possibles entre les précurseurs, leur rendement de conversion ainsi que leur contribution à l'origine des thiols variétaux dans le vin, grâce à une expérimentation sur des moûts enrichis en composés marqués ;
- de fournir des pistes permettant, aux étapes pré-fermentaire et fermentaire, une meilleure exploitation de ce potentiel. Je présenterai les résultats, obtenus à travers des expérimentations techniques en cave pilote dans mon troisième chapitre.

Ce travail s'inscrit ainsi dans un registre pluridisciplinaire, faisant intervenir la synthèse organique, le développement analytique, et la mise en place d'expérimentations œnologiques en cave à l'échelle pilote.

CHAPITRE 1 | Identification et quantification du γ GluCys-3MH, un précurseur de thiol potentiel

Ce premier chapitre est structuré en cinq sections. La première présente les différentes méthodes de synthèse des précurseurs de thiols variétaux dérivés de la cystéine S-conjuguée. La deuxième section se focalise sur deux méthodes de synthèse développées au cours de la thèse, afin d'obtenir les dipeptides S-conjugués au 3MH, au 3MHAI, à la 4MMP, et leurs analogues deutérés. Puis, la troisième section décrit les techniques analytiques utilisées pour doser les précurseurs de thiols, à travers des méthodes indirectes par GC-MS, ou directes par HPLC-MS. La quatrième section est dédiée au développement d'une méthode d'analyse pour identifier et quantifier les dipeptides S-conjugués synthétisés. Enfin, la cinquième section présente l'article 1, qui résulte de l'ensemble des résultats de ce chapitre.

1. Les méthodes de synthèse des précurseurs de thiols variétaux

1.1. Les cystéines S-conjuguées

Les premières synthèses des cystéinylés S-conjugués ont été développées par Tominaga *et al.* en 1998 (Tominaga, *et al.*, 1998b). Ces précurseurs ont été obtenus *via* une addition de Michael de la L-cystéine chlorhydrate sur l'oxyde de mésityle (pour la Cys-4MMP) ou sur l'(*E*)-hex-2-èneal, suivie d'une réduction avec NaBH₄ (pour le Cys-3MH) (**Schéma 1**). Cependant, ni les produits intermédiaires ni les produits finaux n'ont été caractérisés par RMN dans cette étude et aucun rendement n'est mentionné.

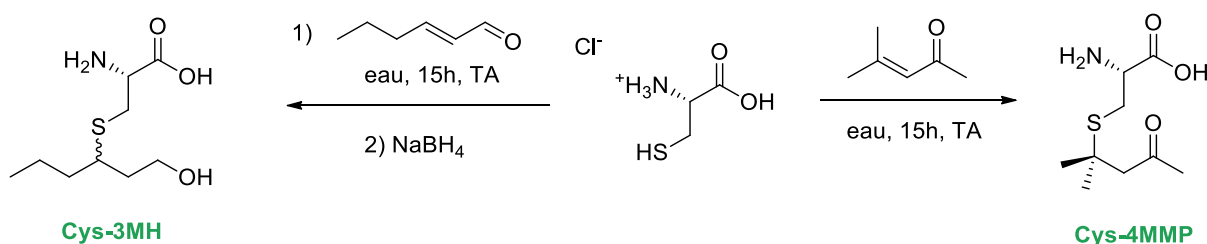


Schéma 1 | Synthèse du Cys-3MH et de la Cys-4MMP selon Tominaga *et al.*

Différents travaux ont montré que la formation du Cys-3MH est fortement corrélée à la réactivité de la fonction amine conditionnée par le milieu réactionnel, notamment par son pH. Le même constat a pu être observé concernant la Cys-4MMP (Starkenmann, 2003; Wakabayashi, *et al.*, 2004). Pour éliminer la réactivité de l'amine lors de l'addition de Michael, une méthode de synthèse a été développée faisant intervenir une Boc-L-cystéine (Dagan, 2006; Starkenmann, 2003). Ensuite, une étape de déprotection a permis d'obtenir les cystéinylés S-conjugués au 3MH ou à la 4MMP avec un rendement de 57 %.

Suite à ces études, une méthode de synthèse diastérosélective a été développée afin d'obtenir séparément les formes 3*R* et 3*S* du Cys-3MH (**Figure 5**), avec une grande pureté isomérique (>98 %). En effet, après l'addition de Michael entre la cystéine protégée et l'(*E*)-hex-2-èneal, la séparation des diastéréoisomères a été réalisée sur silice en utilisant un éluant ternaire (Pardon, *et al.*, 2008).

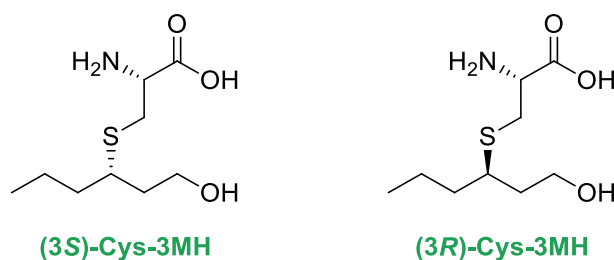


Figure 5 | Les formes diastéréoisomériques **3S** et **3R** du Cys-3MH.

1.2. Les glutathions *S*-conjugués

Le G-3MH a été synthétisé pour la première fois à partir du glutathion et de l'*(E)*-hex-2-énal via une addition de Michael, en utilisant la méthode décrite par Tominaga *et al.* pour l'équivalent cystéinylé (Peyrot des Gachons, *et al.*, 2002). Cette méthode de synthèse permet d'obtenir un produit avec une pureté de 98,5 % sans mentionner de rendement. Quelques années plus tard, Roland *et al.* ont adopté une stratégie différente impliquant des groupements protecteurs, qui permettent d'augmenter la solubilité des composés intermédiaires dans les solvants organiques et ainsi d'améliorer le rendement des différentes étapes (**Schéma 2**) (Roland, *et al.*, 2010a).

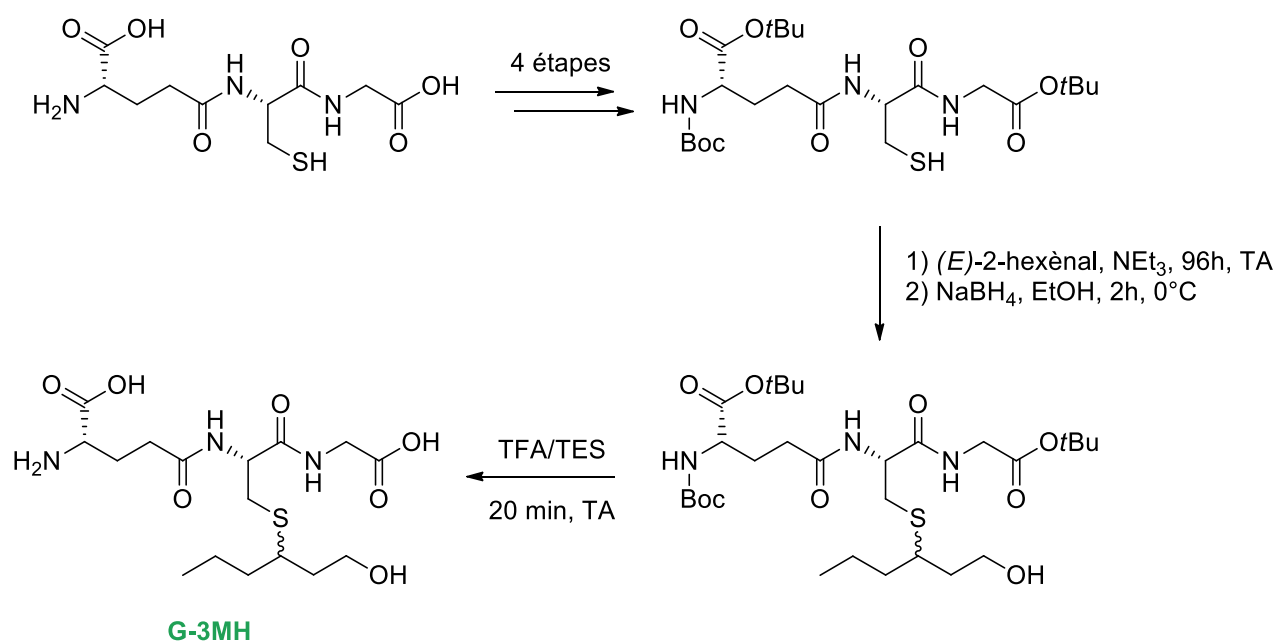


Schéma 2 | Synthèse du G-3MH selon Roland *et al.*

La G-4MMP a été obtenue pour la première fois *via* une addition de Michael entre le glutathion et l'oxyde de mésityle avec un rendement de 79 %. Le produit a été caractérisé par RMN sans indication de pureté (Fedrizzi, *et al.*, 2009).

Enfin, le G-3MHAI et le G-3MH-SO₃ ont été synthétisés très récemment (Thibon, *et al.*, 2016). En effet, le G-3MHAI a pu être obtenu *via* une addition de Michael classique entre le glutathion et l'(*E*)-hex-2-èneal sans étape de réduction. Puis, le G-3MH-SO₃ a été obtenu à partir du G-3MH-AI en présence de métabisulfite de sodium (**Schéma 3**).

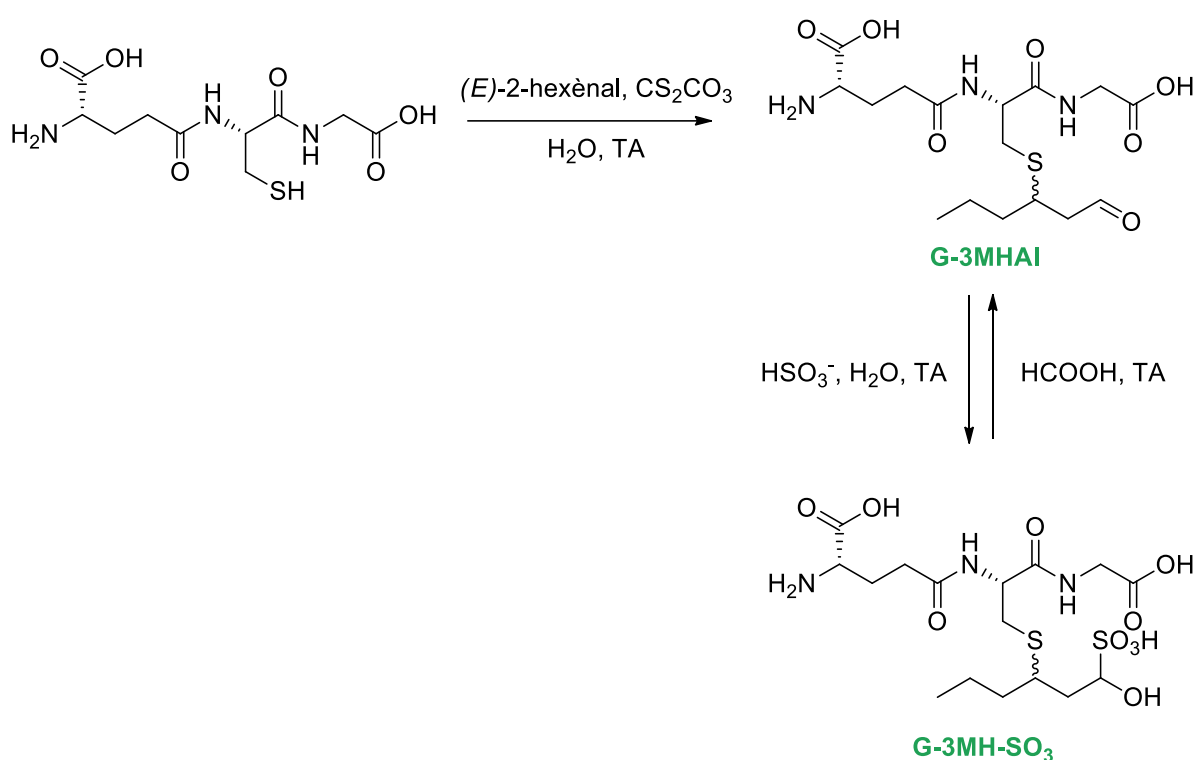


Schéma 3 | Synthèse du G-3MHAI et du G-3MH-SO₃ selon Thibon *et al.*

1.3. Les dipeptides S-conjugués

La méthode de synthèse des dipeptides S-conjugués au 3MH a été développée dans le cadre de l'identification des intermédiaires impliqués dans la voie de biosynthèse du 3MH dans le fruit de la passion (Fedrizzi, *et al.*, 2012). Elle s'apparente aux synthèses des S-conjugués de la cystéine ou du glutathion *via* l'addition de Michael (**Schéma 4**).

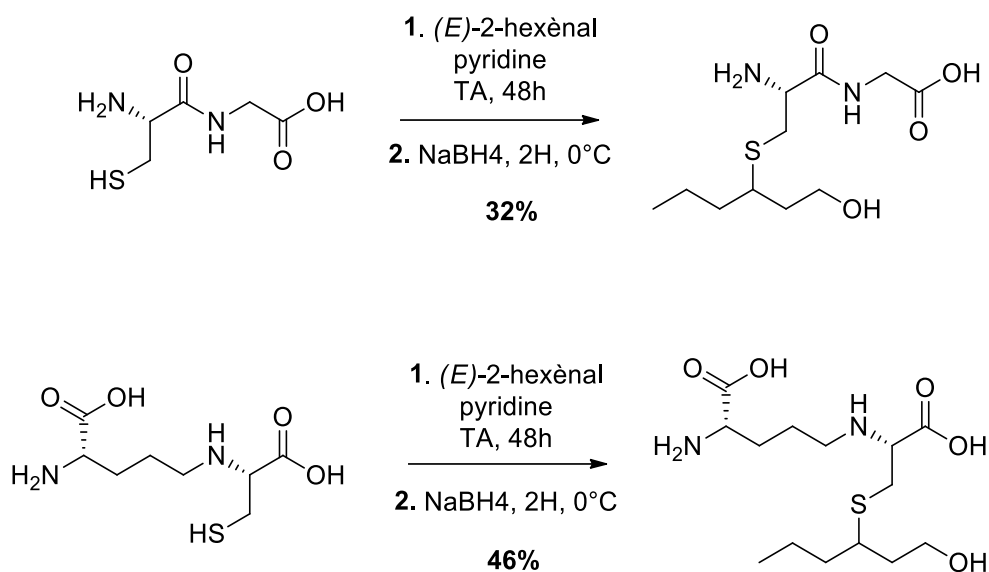


Schéma 4 | Synthèse du CysGly-3MH et du γ GluCys-3MH selon Fedrizzi *et al.*

Aujourd'hui, en dehors de nos travaux, aucune méthode de synthèse n'a été développée pour préparer les dipeptides S-conjugués au 3MHA1 et à la 4MMP.

2. Synthèse des dipeptides S-conjugués aux 3MH, 3MHAI ou 4MMP

Dans l'optique d'identifier et quantifier de nouveaux précurseurs de thiols variétaux, utilisant une méthode analytique performante, il est important d'obtenir des standards fiables. En effet, l'utilisation de standards internes marqués isotopiquement permet la quantification de composés avec une haute précision (Roland, *et al.*, 2010b). C'est pourquoi nous avons développé une méthode de synthèse de six précurseurs potentiels et de leurs analogues marqués (**Figure 6**).

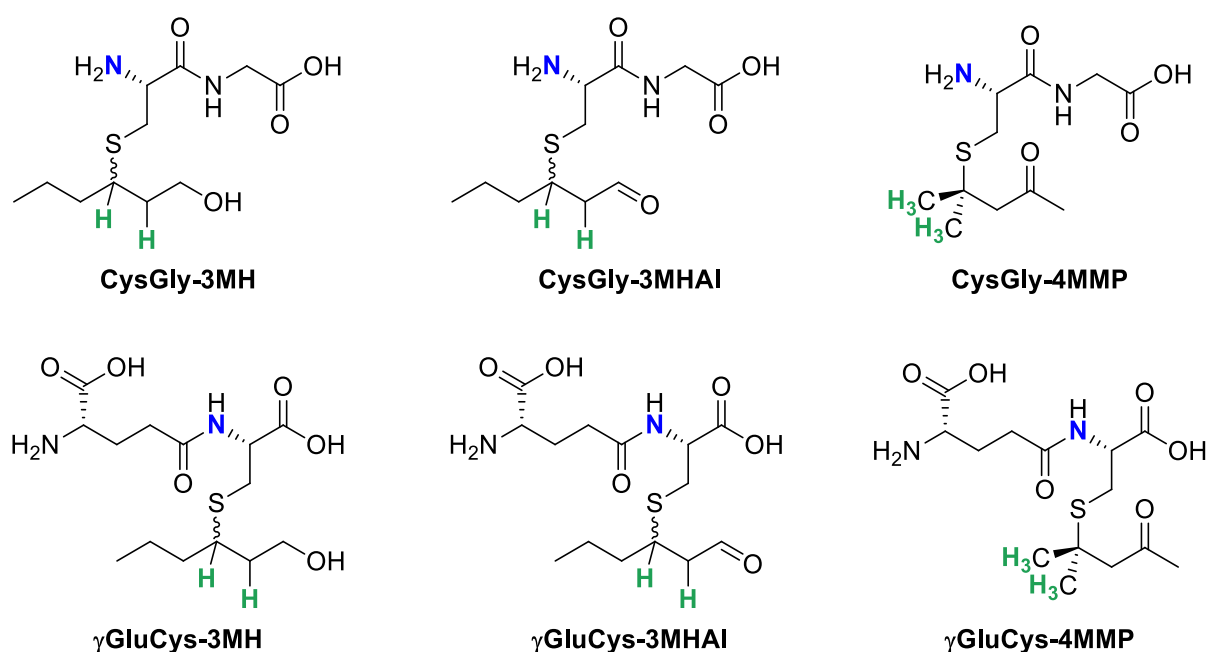


Figure 6 | Structure des dipeptides S-conjugués au 3MH, 3MHAI et 4MMP. Les protons en vert correspondent aux positions deutérées lors de la synthèse des molécules marquées. Les azotes en bleus correspondent aux positions de marquages possibles (^{15}N) dans l'optique d'étudier le devenir de la cystéine après clivage par la levure pendant la FA.

Notre choix s'est porté sur une méthode de synthèse multi-étapes. La synthèse des dipeptides S-conjugués au 3MH a déjà été développée *via* une addition de Michael de (*E*)-hex-2-énal sur le dipeptide CysGly ou γ GluCys en une seule étape (Fedrizzi, *et al.*, 2012). Cependant, cette méthode de synthèse ne permet pas de marquer la partie cystéine de la molécule. En effet, il n'existe pas de dipeptides (CysGly ou γ GluCys) marqués sur la cystéine dans le commerce. Le

marquage de cette partie permettrait de suivre le devenir de la cystéine après clivage par la levure pendant la FA (**Figure 6**), et ainsi, de mieux comprendre les raisons des faibles rendements de conversion des précurseurs de thiols variétaux, inférieurs à quelques pourcents (Roland, *et al.*, 2010a; Roland, *et al.*, 2010b; Subileau, 2008; Subileau, *et al.*, 2008). Si l'étude du devenir de la cystéine n'a pas été développée pendant la thèse, elle fait partie des perspectives possibles du projet dans la compréhension des mécanismes enzymatiques au sein de la levure.

2.1. Synthèse des γ GluCys S-conjugués

Une stratégie de synthèse a été établie pour les composés γ GluCys S-conjugués (**Schéma 5**) :

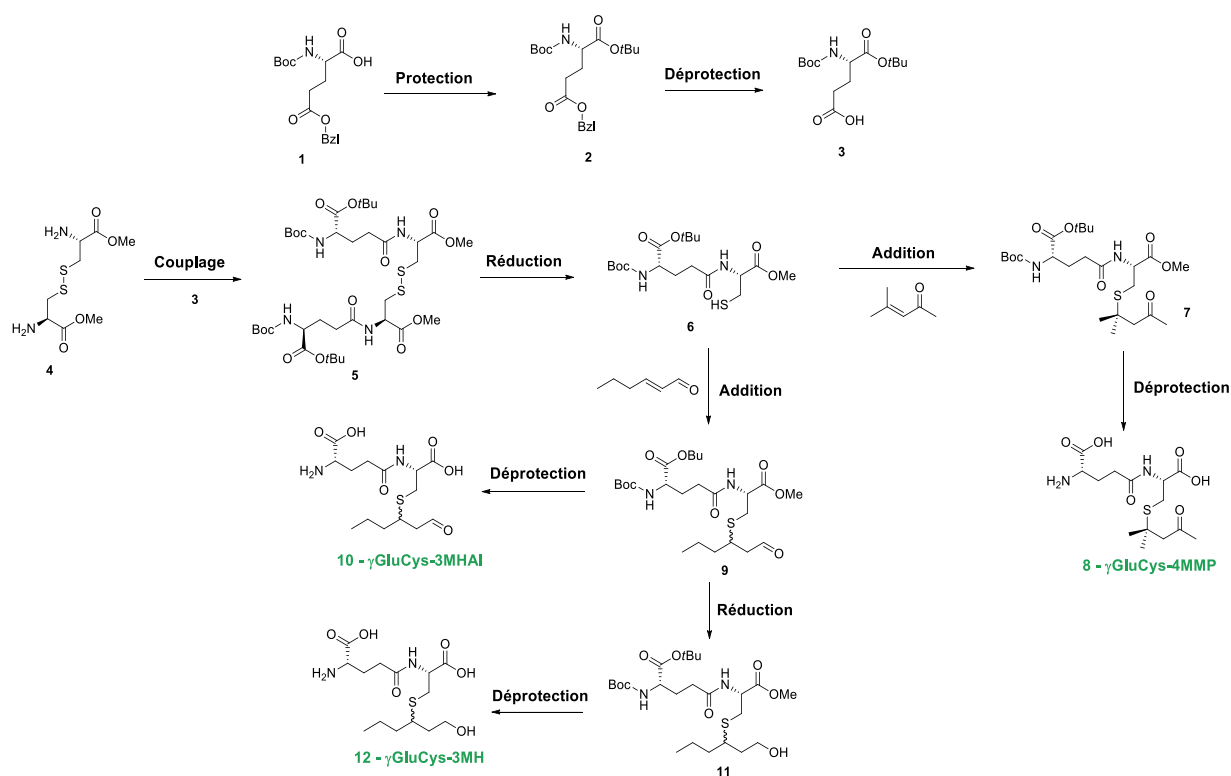
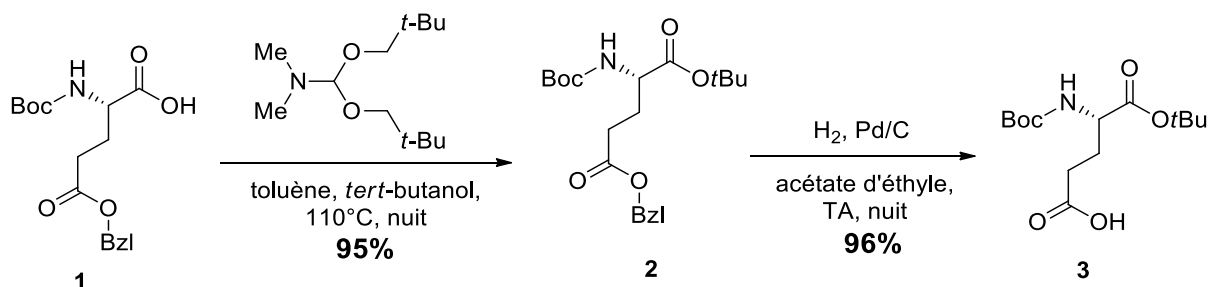


Schéma 5 | Stratégie de synthèse des composés γ GluCys S-conjugués.

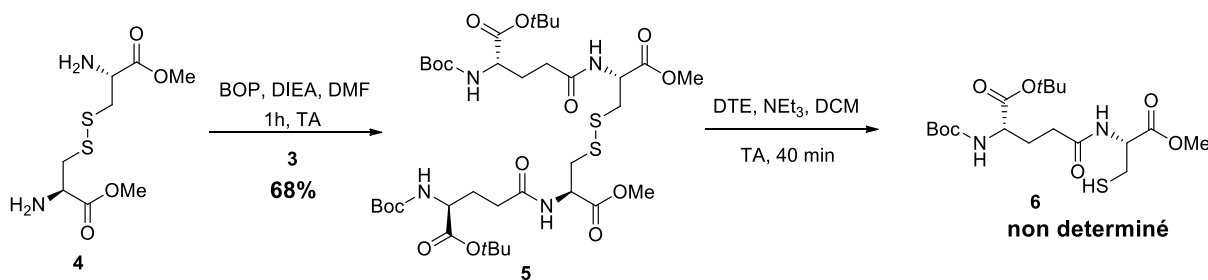
Ainsi, le composé Boc-Glu(OtBu) **3** a été obtenu à partir du Boc-Glu(OBzl)-OH **1** commercial, en protégeant l'acide en ester, puis en déprotégeant l'acide de la chaîne latérale. Le couplage peptidique avec la L-cystéine diméthyl ester **4** a permis d'obtenir, après réduction, le dipeptide γ GluCys **6** protégé. Enfin, une addition de Michael sur le composé **6** avec l'oxyde de

mésityle ou l'(*E*)-hex-2-énal a permis d'obtenir certains des γ GluCys *S*-conjugués ciblés, après déprotection pour la γ GluCys-4MMP, ou après réduction et déprotection pour le γ GluCys-3MH. L'obtention de ces composés est issue d'un travail de développement et d'optimisation conséquent. Plusieurs essais infructueux ont été effectués avant d'établir la synthèse permettant d'obtenir les dipeptides *S*-conjugués. Ces synthèses ont été conduites plusieurs fois afin d'éprouver leur reproductibilité et d'obtenir plusieurs lots de dipeptides *S*-conjugués. Les réactions mises en jeu sont détaillées ci-dessous.

Boc-Glu(OBzl)-OH **1** a été estérifié pour donner Boc-Glu(OBzl)-OtBu **2** avec un rendement de 95 % et une excellente pureté. Puis, le composé **2** a été hydrogéné pour cliver sélectivement la fonction benzyl et obtenir le Boc-Glu-OtBu **3** avec un rendement de 96 % (**Schéma 6**).

Schéma 6 | Synthèse de Boc-Glu-OtBu **3**.

Ensuite, un couplage peptidique dans des conditions classiques entre le Boc-Glu-OtBu **3** et la L-cystine diméthyl ester **4** a permis d'obtenir le composé **5** avec un rendement de 68 % et une excellente pureté. La réduction du pont disulfure génère le composé **6** qui est utilisé dans l'étape suivante sans purification à cause de l'oxydation rapide de la fonction thiol (**Schéma 7**) :

Schéma 7 | Synthèse du dipeptide γ GluCys **6**.

L'addition de Michael du composé **6** sur l'oxyde de mésityle a permis de préparer la γ GluCys-4MMP protégé **7** (**Schéma 8**) :

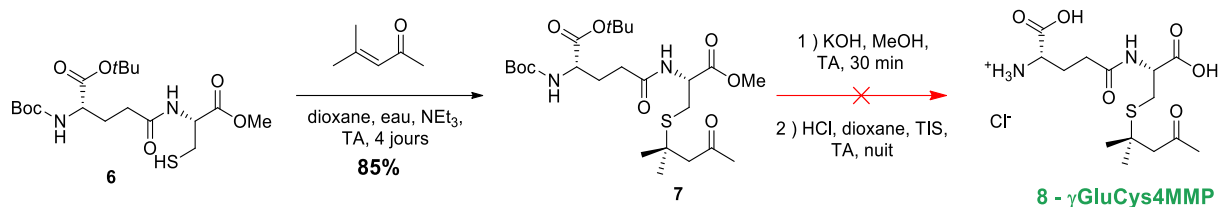


Schéma 8 | Synthèse de la γ Glu-Cys-4MMP protégée **7**.

Cependant, la saponification de l'ester méthylique entraîne une dégradation du produit et n'a pas permis d'obtenir l'acide libre. De la même façon, la synthèse du γ GluCys-3MH n'a pas abouti.

Afin d'éviter l'étape de saponification, nous avons utilisé un autre substrat de départ faisant intervenir des esters *tert*-butyliques à la place des esters méthyliques (**Schéma 9**).

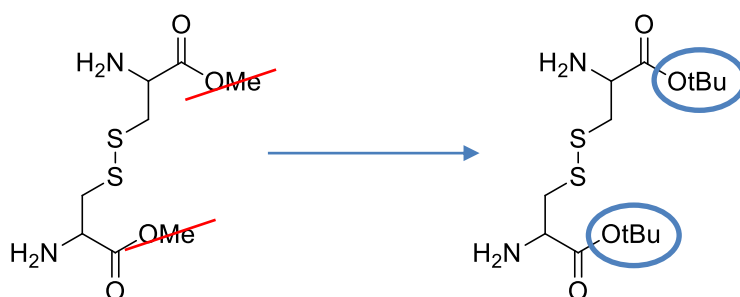


Schéma 9 | Changement du groupement de protection de l'acide de la L-cystine.

En partant de la cystine di-*tert*-butylée et suivant les mêmes étapes de synthèse détaillées précédemment (couplage peptidique, réduction et addition de Michael), il a été possible de déprotéger simultanément en milieu acide les esters *tert*-butyliques et le groupement Boc afin d'obtenir la γ GluCys-4MMP (**Schéma 10**).

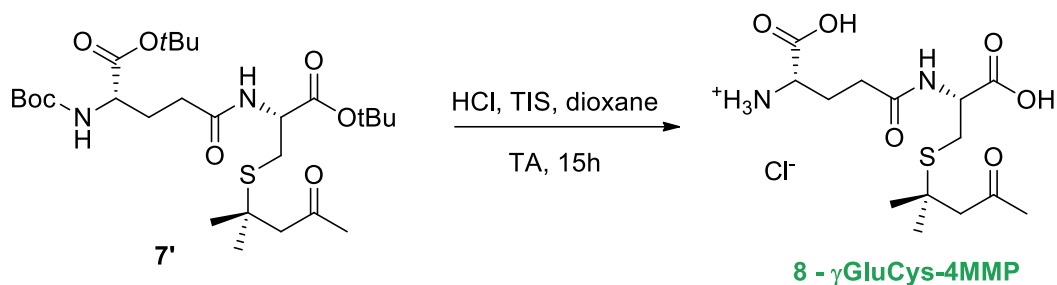


Schéma 10 | Déprotection en milieu acide des groupements protecteurs. Exemple avec la γ GluCys-4MMP.

Finalement, nous avons synthétisé les composés γ GluCys-3MH et γ GluCys-4MMP (avec 90% et 62% de pureté respectivement), ainsi que leurs analogues deutérés γ GluCys-3MH- d_2 et γ GluCys-4MMP- d_{7-10} (avec 67% et 92% de pureté respectivement). Ces derniers ont été obtenus selon la même méthode de synthèse, en utilisant l'(*E*)-hex-2-ène- d_2 et l'oxyde de mésityle- d_{10} . Cette méthode de synthèse a fait l'objet d'une publication dans le journal *Food Chemistry* présentée à la fin de ce chapitre.

Concernant la synthèse du γ GluCys-3MHAI, l'addition de Michael sur (*E*)-hex-2-ène n'a pas permis d'obtenir le dipeptide **9** en quantité suffisante (**Schéma 11**) :

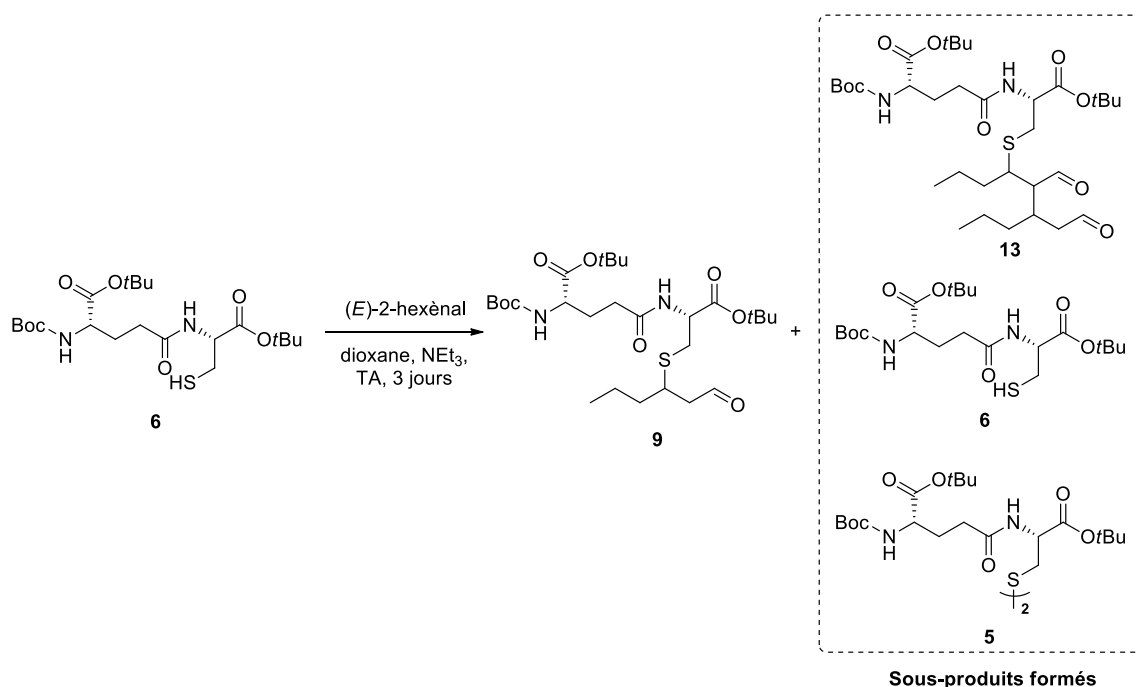


Schéma 11 | Synthèse de **9** et des sous-produits.

Après 3 jours d'agitation, le produit **9** a pu être formé dans le mélange réactionnel, avec la consommation totale du substrat de départ **6**. Cependant, après lavage et concentration du mélange réactionnel, l'analyse par HPLC-MS a révélé l'aldolisation du dipeptide **9** protégé. De plus, le substrat de départ **6** a été reformé, ainsi que sa forme oxydée **5**.

Pour éviter la dégradation du produit, notamment l'aldolisation du composé **9**, nous avons développé une méthode de synthèse alternative faisant réagir le dipeptide protégé **6** avec l'amide de Weinreb. En effet, l'amide de Weinreb est régulièrement utilisée comme méthode fiable de synthèse des cétones ou des aldéhydes (Nahm, *et al.*, 1981). Dans notre cas, le principal avantage de cette méthode est qu'elle évite l'aldolisation de l'(*E*)-hex-2-énal sur le composé **9**, en supprimant la réactivité de la fonction aldéhyde.

Ainsi, il a été possible de faire réagir l'amide de Weinreb synthétisé **14** (rendement de 75 %) et le composé **6** afin d'obtenir le dipeptide pur **9'** avec un rendement de 64 % (Schéma 12).

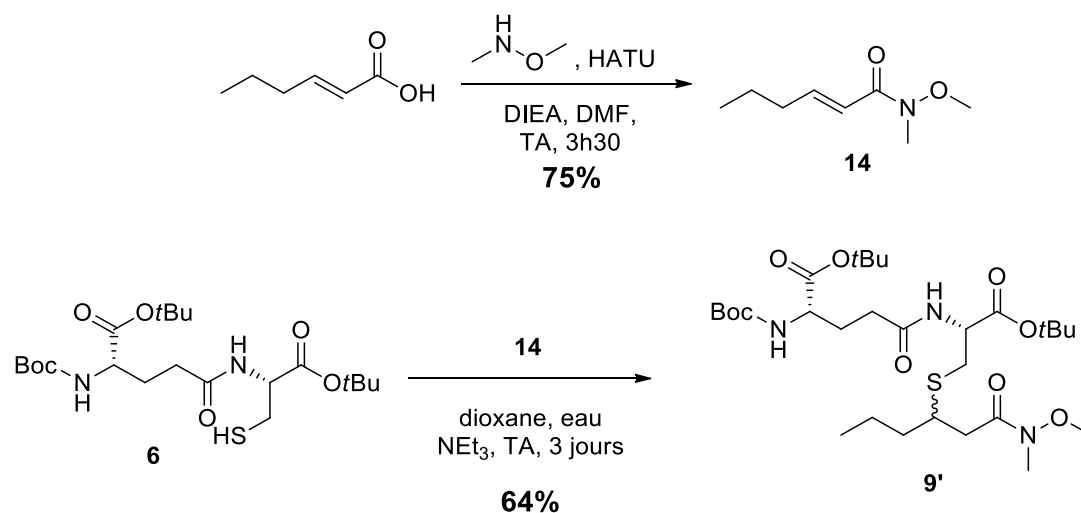


Schéma 12 | Synthèse de l'amide de Weinreb **14** à partir de l'acide hexénoïque et synthèse du dipeptide **9'**.

Malheureusement, après réduction de l'amide de Weinreb en présence de LiAlH_4 , l'aldolisation de l'aldéhyde n'a pas permis d'isoler le dipeptide **9**. C'est pourquoi la synthèse du γ GluCys-3MHA1 et du CysGly-3MHA1 a été abandonnée. En revanche, le développement d'une

méthode alternative permettant de quantifier ces dipeptides S-conjugués indirectement est en cours. Cette méthode fait intervenir ces dipeptides S-conjugués au 3MH avec leur adduit bisulfite (CysGly-3MH-SO₃ et γ GluCys-3MH-SO₃) ainsi que leurs analogues deutérés. Ces composés ont été synthétisés en une seule étape à travers une addition de Michael. Les conditions sont basées sur la synthèse du G-3MH-SO₃ (Thibon, *et al.*, 2016).

Ainsi, l'addition de Michael du γ GluCys **15** sur l'(*E*)-hex-2-énal a permis d'obtenir le γ GluCys-3MH-SO₃ **16** non purifié (64% de pureté par titration RMN ¹H) (**Schéma 13**). Selon le même protocole, le γ GluCys-3MH-SO₃-d₃ a été synthétisé en utilisant l'(*E*)-hex-2-énal-d₂ et du D₂O (61% de pureté par titration RMN ¹H).

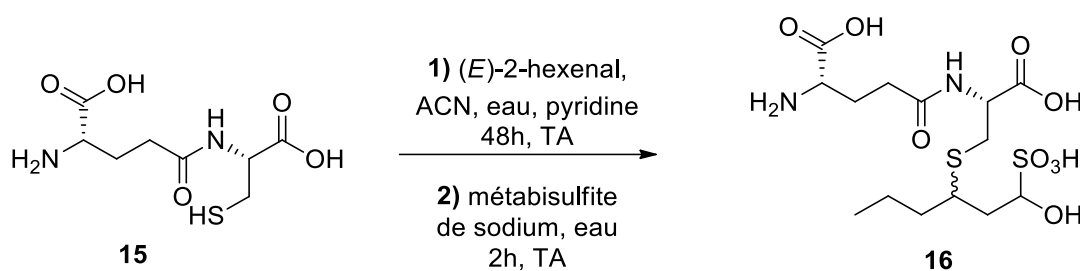


Schéma 13 | Synthèse du γ GluCys-3MH-SO₃ **16**.

2.2. Synthèse des CysGly S-conjugués

Une méthode de synthèse a été développée pour les composés CysGly S-conjugués au 3MH ou à la 4MMP (**Schéma 14**), inspirée de la méthode de synthèse des γ GluCys S-conjugués.

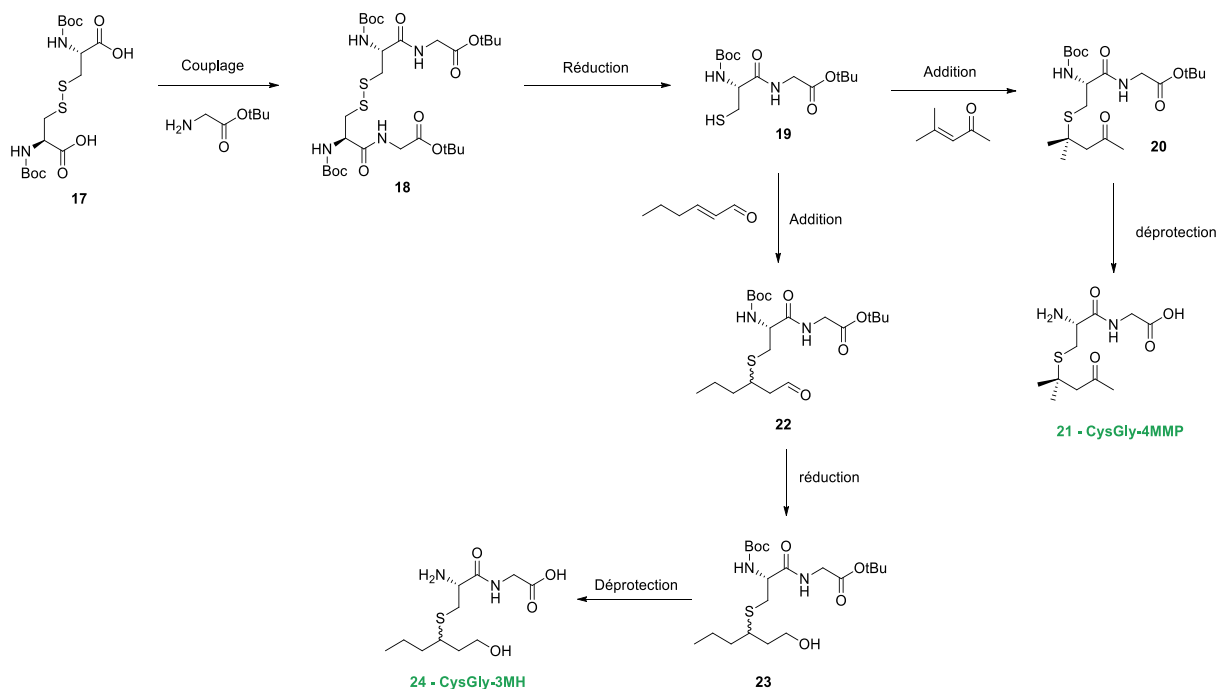


Schéma 14 | Synthèse des composés CysGly S-conjugués au 3MH ou à la 4MMP.

La première étape est un couplage peptidique dans des conditions classiques entre H-Gly-OtBu et la di-Boc-L-cystine **17** (tous les deux commerciaux), conduisant de façon surprenante à un mélange de dipeptides polysulfurés. En effet, l'analyse LC-HRMS a montré une incorporation multiple d'atomes de soufre (**Figure 7**).

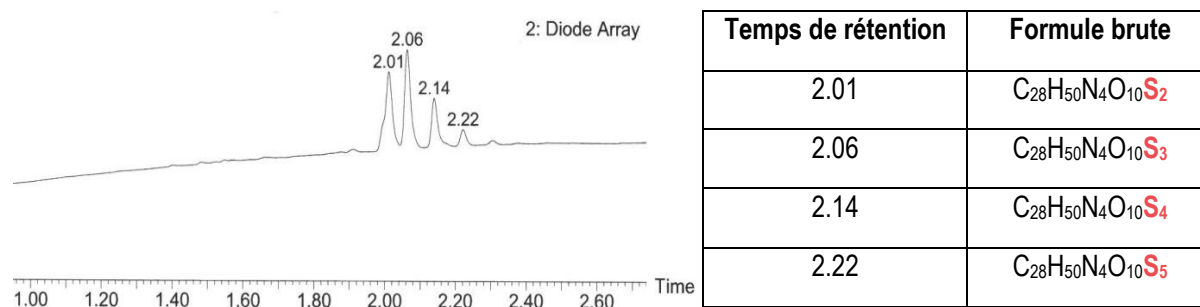


Figure 7 | Chromatogramme avec détection UV (214 nm) obtenu par HPLC avec les 4 dipeptides polysulfurés (à gauche). Corrélation entre le temps de rétention et la formule brute obtenue par LC-HRMS (à droite).

L'identification des produits par HRMS ne laisse aucun doute, mais nous n'avons trouvé aucun précédent dans la littérature et ne pouvons pas proposer à ce stade d'explication satisfaisante. Cependant, ce phénomène n'a pas perturbé l'étape suivante, puisque tous les

polysulfures ont été réduits en thiols libres, permettant d'obtenir le dipeptide CysGly **17** (Schéma 15).

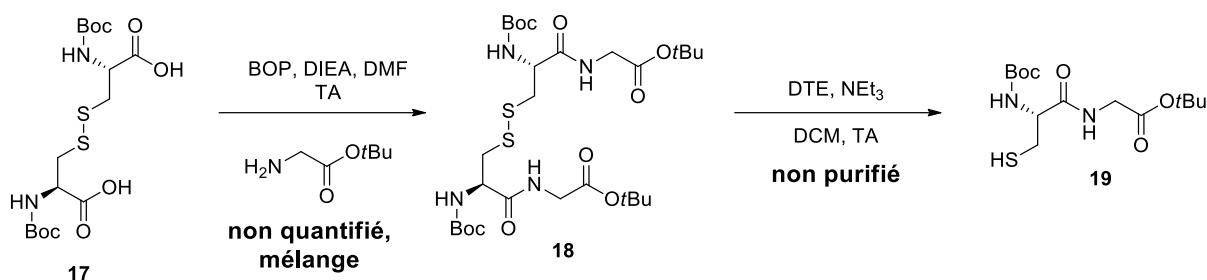


Schéma 15 | Synthèse du dipeptide Boc-CysGly-OtBu **19**.

Dans le but d'obtenir le composé CysGly-4MMP, l'addition de Michael du composé **19** sur l'oxyde de mésityle a permis de préparer le CysGly-4MMP toujours protégé **20**, avec un rendement sur 3 étapes de 23 %. Enfin, une dernière étape de déprotection en milieu acide a permis la formation du composé CysGly-4MMP **21** (Schéma 16).

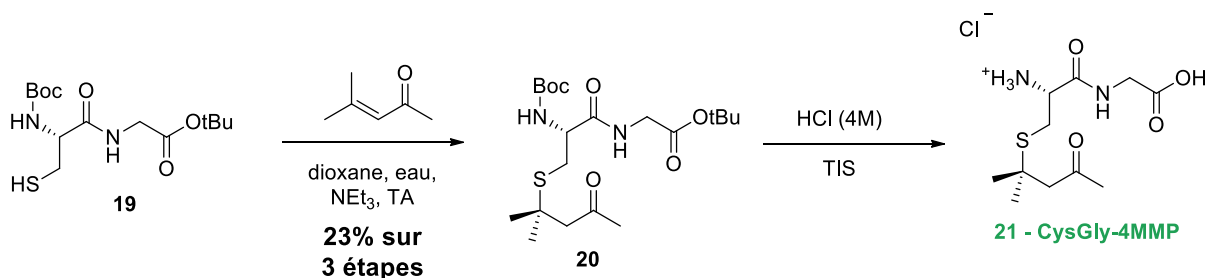


Schéma 16 | Synthèse du CysGly-4MMP

Il a ainsi été possible de synthétiser les composés CysGly-3MH et CysGly-4MMP ainsi que leurs analogues deutérés. Leur méthode de synthèse a fait l'objet d'une publication dans le journal *Food Chemistry* présentée à la fin de ce chapitre.

Comme expliqué dans la section 2.1., nous avons abandonné la synthèse du CysGly-3MHA. Toutefois, une alternative a été trouvée *via* les dipeptides S-conjugués au 3MH-SO₃.

Ainsi, l'addition de Michael du CysGly **25** sur l'(*E*)-hex-2-énal a permis d'obtenir le CysGly-3MH-SO₃ **26** non purifié (10% de pureté par titration RMN) (**Schéma 17**). Selon le même protocole, le γ GluCys-3MH-SO₃-d₃ a été synthétisé en utilisant l'(*E*)-hex-2-énal-d₂ et du D₂O (21% de pureté par titration RMN).

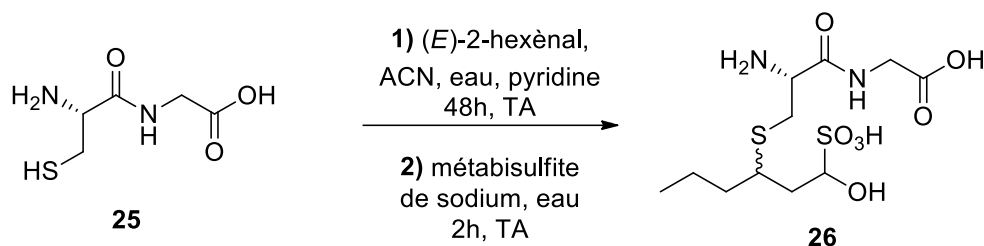


Schéma 17 | Synthèse du γ GluCys-3MH-SO₃ **26**.

Pour finir, les dipeptides S-conjugués au 3MH-SO₃ synthétisés peuvent être utilisés comme traceurs pour identifier et quantifier les dipeptides S-conjugués au 3MHAl. En effet, dans les moûts, les dérivés cystéinylés S-conjugués au 3MHAl sont en équilibre avec les formes 3MH-SO₃. Cet équilibre dépend notamment de la concentration en SO₂ présent dans le moût. Ainsi, dans un moût fortement concentré en SO₂ (4,5 mg/mL), l'équilibre est très fortement déplacé vers les formes bisulfites. Dans ces conditions, il est ainsi possible de doser les dérivés cystéinylés S-conjugués au 3MHAl, notamment le CysGly-3MH-SO₃ et le γ GluCys-3MH-SO₃. Le développement de la méthode est en cours, l'identification et la quantification de ces nouveaux composés font parties des perspectives envisagées dans le projet, afin d'étendre le panorama des précurseurs de thiols variétaux.

3. Techniques analytiques de dosage des précurseurs de thiols

3.1. Généralités

Il existe deux stratégies analytiques qui permettent l'identification et la quantification des précurseurs de thiols : les techniques directes et indirectes.

Historiquement, les premières études ont été réalisées avec des techniques indirectes. Pour ce faire, une hydrolyse enzymatique des précurseurs est d'abord nécessaire pour libérer les arômes, qui sont ensuite analysés en utilisant la GC-MS. Une revue récente décrit précisément les méthodes d'analyses dédiées aux précurseurs de thiol (Peña-Gallego, *et al.*, 2012). Cette section s'intéresse plus particulièrement à la description de ces techniques analytiques de dosage.

Les techniques directes d'analyse des précurseurs de thiols requièrent une étape d'extraction, de purification, puis d'analyse des extraits par GC-MS ou HPLC-MS. Selon la technique, la préparation d'échantillons varie :

- soit ils subissent une dérivatisation pour les transformer en composés volatilisables, permettant ainsi leur quantification par GC ;
- soit ils sont directement quantifiés par HPLC-MS. Il est cependant possible de dériveriser des composés afin de modifier leurs propriétés chimiques. C'est par exemple le cas du glutathion qui peut être dérivatisé avec la N-ethylmaleimide (NEM) afin d'augmenter sa lipophilie (Roland, *et al.*, 2015). Ce dernier cas ne sera pas développé car il ne concerne pas l'analyse de précurseurs de thiols variétaux.

3.2. Analyse des précurseurs par méthodes indirectes

Les premiers précurseurs du 3MH et de la 4MMP identifiés sont les S-conjugués à la cystéine à travers une méthode analytique indirecte. Les précurseurs ont été percolés à travers une colonne contenant une enzyme de type tryptophanase, à activité secondaire C-S-lyase, pour provoquer un clivage enzymatique spécifique, libérant les thiols correspondants. Ils sont ensuite quantifiés par dilution isotopique selon une méthode précédemment décrite (Peyrot des Gachons, *et al.*, 2000; Tominaga, *et al.*, 1998a). Les auteurs rapportent une bonne sensibilité et reproductibilité de la méthode d'analyse, malgré l'utilisation d'étalons internes ne contenant qu'un seul atome marqué isotopiquement sur une position échangeable.

3.3. Analyse des précurseurs par méthodes directes

3.3.1. Méthodes directes par GC-MS

Dans les années 2000, l'analyse des précurseurs de thiols se faisait en grande majorité par GC-MS pour des raisons de coût, bien que ce type de substrat ne soit pas naturellement adapté à cette technique. Plus tard, l'accès aux systèmes de type HPLC-MS/MS dans les laboratoires de recherche a relancé les développements analytiques comme en témoigne la revue de Pena Gallego *et al.*, 2012.

Afin d'analyser les précurseurs de thiols par GC-MS, il est nécessaire d'obtenir préalablement les dérivés volatils avant injection. Par exemple, la dérivation par silylation permet de réduire la polarité des composés, de les rendre plus volatils par substitution des hydrogènes acides et plus stables thermiquement. En 2008, Shinkaruk *et al.* ont utilisé cette méthode en dérivatisant la Cys-4MMP avec la *N,O*-bis(triméthylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) et la triméthylchlorosilane (TMCS) (Shinkaruk, *et al.*, 2008). La même année, cette équipe a testé différents agents de dérivation et montré que l'anhydride heptafluorobutyrique (HFBA) et HFOH donnent les meilleurs résultats de rendement de réaction de dérivation (Thibon, *et al.*, 2008; Thibon, *et al.*, 2010). Enfin, deux années plus tard, Thibon *et al.* ont développé une nouvelle méthode d'analyse utilisant comme agent de dérivation le *N*-(*tert*-butyldiméthylsilyl)-*N*-

méthyltrifluoroacétamide (MTBSTFA) avec le (*tert*-butyldiméthylchlorosilane) TBDMCM (Figure 8) (Thibon, *et al.*, 2010).

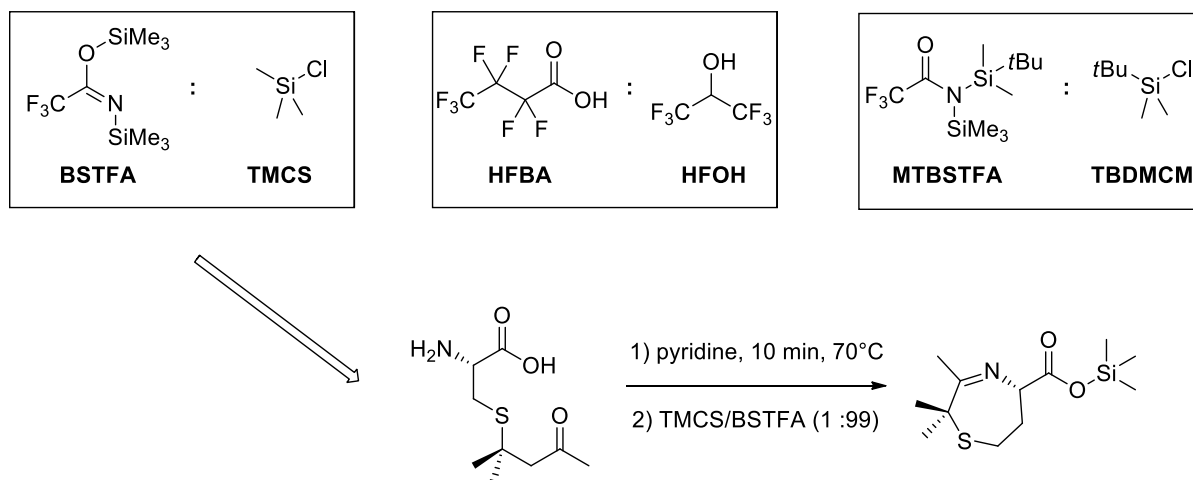


Figure 8 | Quelques agents de dérivation utilisés pour quantifier les précurseurs par GC-MS et exemple de dérivation de la Cys-4MMP en présence de pyridine et d'un mélange TMCS/BSTFA (Shinkaruk, *et al.*, 2008).

3.3.2. Méthodes directes par HPLC-MS

Les méthodes directes par HPLC-MS sont aujourd'hui les techniques d'analyse les plus couramment utilisées pour identifier et quantifier les précurseurs. En effet, leur fiabilité et leur rapidité (pas de réaction de dérivation) ont permis de démocratiser cette technique employée par la plupart des équipes de recherche travaillant sur les précurseurs de thiols (Bonnaffoux, *et al.*, 2017; Capone, *et al.*, 2012; Jeffery, 2016; Roland, *et al.*, 2016b; Thibon, *et al.*, 2016).

4. Développement d'une méthode d'analyse pour l'identification et la quantification des précurseurs de thiols variétaux

Dans le cadre de l'identification de nouveaux précurseurs de thiol, nous avons développé une méthode d'analyse par UPLC-MS/MS en utilisant la dilution isotopique comme technique de dosage. Cette technique analytique est classée comme une méthode d'étalonnage interne, car le standard utilisé est directement ajouté dans l'échantillon. L'étalonnage interne s'appuie sur la mesure du rapport des signaux entre le composé à doser, et l'étalon ajouté. En ce qui concerne la dilution isotopique, l'étalon ajouté est un analogue de l'analyte à doser, marqué isotopiquement. La similarité de propriétés physico-chimiques entre l'analyte et son analogue marqué permet notamment de s'affranchir des erreurs inhérentes à la préparation d'échantillon et par ailleurs assure d'avoir des facteurs réponses semblables en chromatographie. C'est pour ces raisons que cette méthode est considérée comme l'une des plus fiables aujourd'hui.

À partir d'une méthode d'analyse existante par nanoLC-MS/MS dédiée aux précurseurs cystéinylés et glutathionylés (Cys-3MH, Cys-4MMP, G-3MH et G-4MMP) (Roland, *et al.*, 2010c), nous avons inclus dans cette méthode les 8 nouveaux analytes (CysGly-3MH, CysGly-4MMP, γ GluCys-3MH, γ GluCys-4MMP et leurs analogues deutérés) préalablement synthétisés. La transposition analytique d'un système nanoLC-MS/MS (triple quadripôle Agilent) vers un appareillage de type UPLC-MS/MS (triple quadripôle Thermo) a nécessité d'optimiser les conditions de séparation et de détection chronologiquement en 3 étapes :

- optimisation des conditions de détection par spectrométrie de masse en infusant des analytes dans le spectromètre de masse ;
- optimisation de la méthode chromatographique permettant la séparation de tous les analytes ;
- validation analytique de la méthode sur moût blanc, selon les recommandations de l'OIV.

4.1. Optimisation des conditions de détection par spectrométrie de masse

Le développement de la méthode a tout d'abord consisté à optimiser les paramètres du triple quadripôle pour l'analyse des échantillons en mode MRM. Cette étape nécessite la détection de l'ion parent et des ions fils caractéristiques des précurseurs de thiols variétaux ciblés. Un logiciel a permis l'optimisation automatique des conditions de détections. Ainsi, l'optimisation des conditions de fragmentation se fait en 3 étapes distinctes (**Figure 9**) :

- sélection de l'ion parent en fonction de sa masse et de son état de charge dans le quadripôle 1 (Q1) pour éjecter les ions ayant une masse différente ;
- fragmentation de l'ion parent dans le Q2 en utilisant diverses énergies de collision ;
- détection des ions fils dans le Q3.

En fonction de l'abondance et de la spécificité des fragmentations, 4 transitions sont retenues par analyte, l'une dédiée à la quantification et les 3 autres servant à l'identification en matrice réelle : c'est ce que l'on appelle communément le mode MRM (multiple reaction monitoring) ou SRM (Selected Reaction Monitoring) selon les constructeurs.

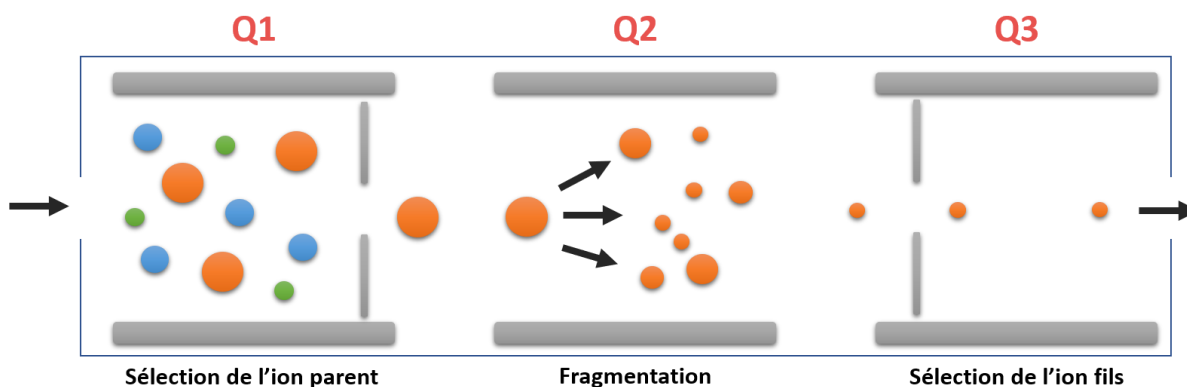


Figure 9 | Principe de la MRM dans un triple quadripôle. Q1 et Q3 sont des quadripôles pour scanner des ions et Q2 est une cellule de collision.

Après cette étape d'infusion, nous avons pu déterminer et sélectionner les ions fils, correspondant à la signature propre des dipeptides S-conjugués et de leurs analogues deutérés (**Figure 10**).

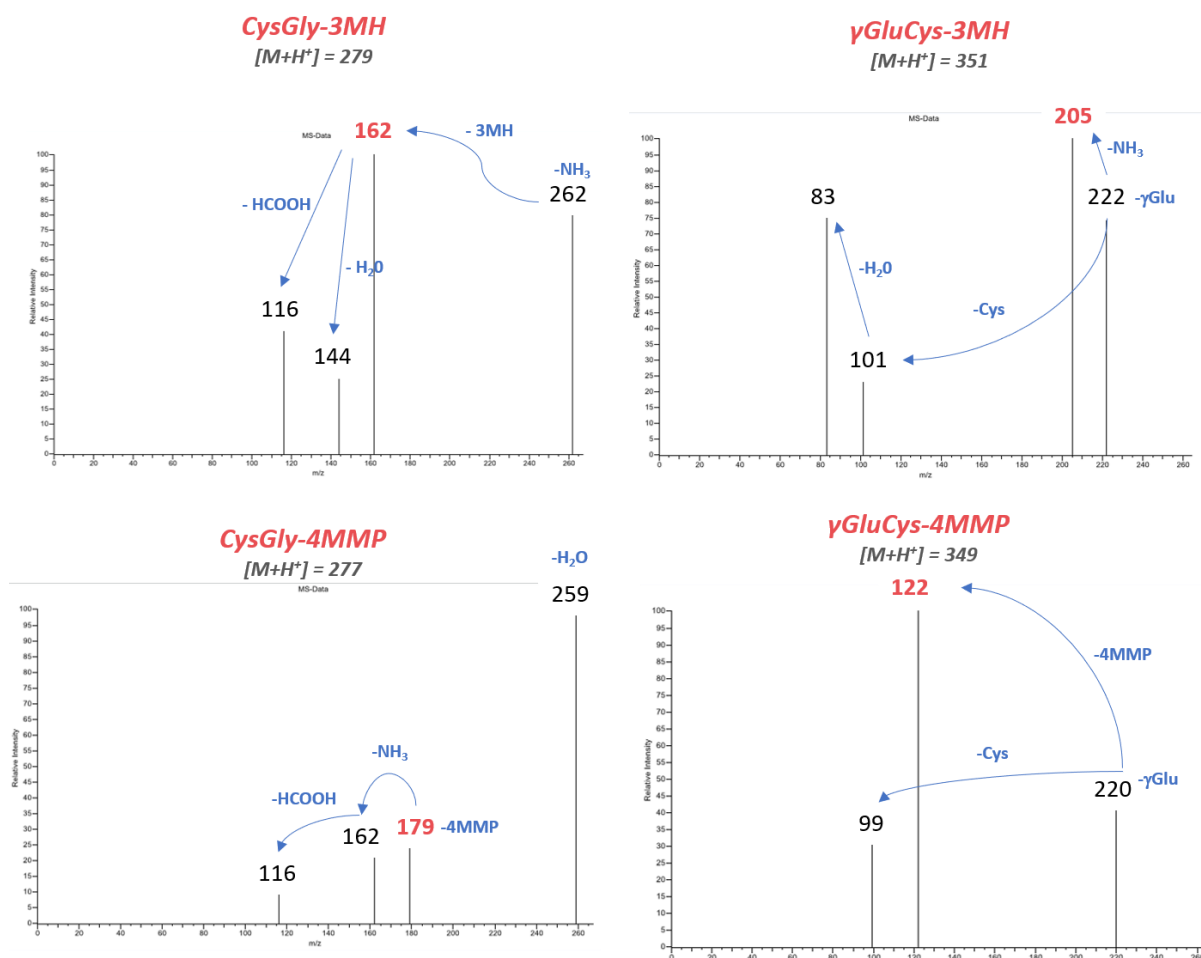


Figure 10 | Spectre de masse de second ordre des dipeptides S-conjugués. En rouge, la masse de l'ion de quantification, et en noir, les masses des ions de qualification (en Da).

4.2. Développement de la méthode chromatographique

Le développement de la méthode d'analyse permet d'optimiser la séparation des différents précurseurs, tout en minimisant le temps d'analyse. Nous avons utilisé une colonne *Hypersil gold AQ* avec un diamètre de particule de 1,9 μm , une longueur de 100 mm et un diamètre de 2,1 mm.

Les conditions utilisées initialement sont (Figure 11) :

- gradient Acétonitrile (ACN)/H₂O :
 - 0 % ACN pendant 0,5 min ;
 - 0 % -> 2 % pendant 0,1 min ;

- 2 % -> 11 % pendant 8,4 min.

Le conditionnement de la colonne a duré 7 min pour une durée d'acquisition totale de 16 min.

- la température du four est de 40 °C.
- débit de 0,5 mL.min⁻¹.

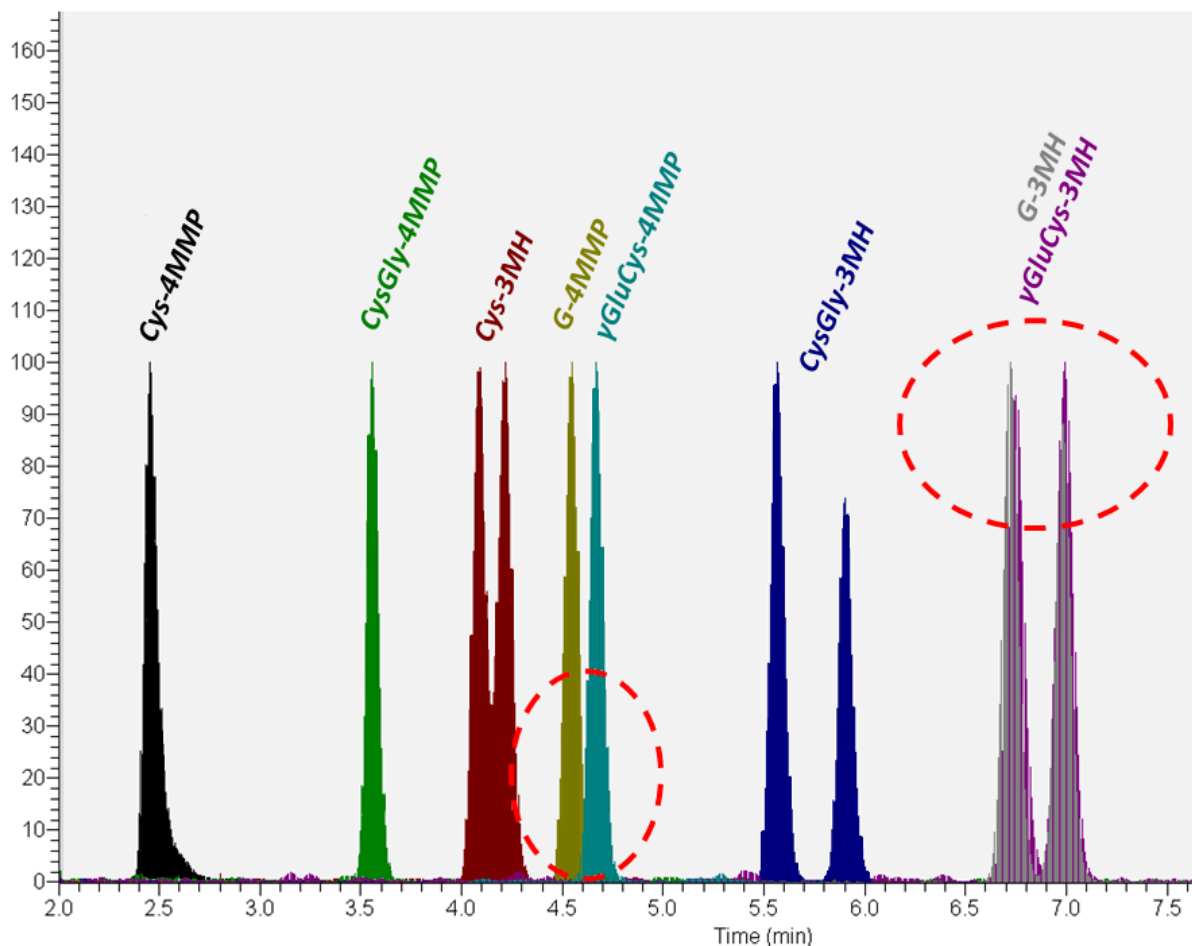


Figure 11 | Chromatogramme UPLC des précurseurs cystéinylés, glutathionylés et dipeptidiques avant l'optimisation.

Ce chromatogramme montre une co-élution entre la G-4MMP et la γ GluCys-4MMP, ainsi que la superposition du G-3MH et du γ GluCys-3MH. Il a donc été nécessaire d'optimiser les conditions de séparation, en ajustant le gradient, la température du four et le débit. Ainsi, la diminution du gradient, l'augmentation de la température et du débit ont permis d'obtenir les conditions finales, décrites dans l'**article 1** de la section 6 de ce chapitre. Le travail d'optimisation étant confidentiel, le détail ne peut être divulgué dans ce manuscrit, étant par contrat la propriété exclusive de Nyséos.

4.3. Validation de la méthode

Pour évaluer les performances analytiques de la méthode, une validation analytique menée selon les recommandations de l'OIV a été réalisée. Différents paramètres ont été testés et mesurés dans des conditions définies :

- l'effet matrice ou la spécificité : influence de l'environnement chimique des composés à analyser. ;
- la linéarité : capacité dans un intervalle donné d'obtenir des résultats de dosage proportionnels à la concentration de l'analyte dans l'échantillon (modèle de régression avec un test de Lack-Of-Fit) ;
- l'exactitude : étroitesse d'accord entre la valeur trouvée et la valeur de référence ;
- la fidélité : ensemble des caractéristiques de dispersion comprenant la répétabilité, évaluée dans des conditions opératoires identiques, et la reproductibilité intermédiaire, évaluée dans des conditions de répétabilité dans un intervalle de temps plus long ;
- la limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ) : fonctions du rapport signal sur bruit.

L'effet matrice

Afin de mesurer l'effet matrice, on effectue des ajouts dosés sur différentes matrices, dans notre cas un moût modèle et un moût de Sauvignon blanc. Trois réplicas ont été effectués. Ainsi, on mesure l'écart réduit entre les différentes matrices. Si cet écart réduit est inférieur à 2, cela signifie qu'il n'y a pas d'effet matrice et la méthode est donc spécifique.

La linéarité

Plusieurs méthodes sont possibles afin de mesurer la linéarité de la méthode. Nous avons choisi d'effectuer le test de Lack-Of-Fit. Afin de mesurer la linéarité de la méthode, trois réplicas d'une gamme étalon de 10 points ont été effectués, couvrant l'amplitude des concentrations de précurseurs que l'on attend dans un moût naturel de Sauvignon blanc. De cette façon, il est possible de déterminer si la courbe de calibration est linéaire ou non linéaire (par exemple quadratique).

L'exactitude

Afin de mesurer l'exactitude de la méthode, trois ajouts dosés à différents niveaux de concentrations ont été effectués (dont le point zéro). La méthode est considérée comme exacte si le taux de recouvrement est compris entre 80% et 120%.

La fidélité (répétabilité et reproductibilité intermédiaire)

La répétabilité a été estimée sur des échantillons de moûts de Sauvignon blanc par le calcul du coefficient de variation sur 3 réplicas d'un même échantillon à différents niveaux de concentration. La méthode est jugée répétable si le coefficient de variation ne dépasse pas 20%.

Dans le cas de la reproductibilité intermédiaire, le même mode opératoire que pour tester la répétabilité a été effectué 6 jours plus tard. La méthode est considérée comme reproductible si le coefficient de variation entre les valeurs à $t = 0$ et $t = 6$ jours ne dépasse pas 20%.

LOD et LOQ

Les limites de détection et de quantification sont déterminées par le calcul du rapport signal/bruit en chromatographie. La LOD est la concentration dont le signal sur bruit est égale à 3 (10 pour la LOQ).

Il est important de noter que les excellentes performances de cette méthode d'identification et de quantification des cystéinylés, des glutathionylés et des dipeptides S-conjugués au 3MH ou à la 4MMP permettent des analyses sans préparation d'échantillon et donc une approche haut-débit. Les résultats de la validation de la méthode paraissent dans l'**article 1** de la section 5 de ce chapitre.

5. Article 1 : *First identification and quantification of S-3-(hexan-1-ol)- γ -glutamyl-cysteine in grape must as a potential thiol precursor, using UPLC-MS/MS analysis and stable isotope dilution assay*

Une fois la méthode d'analyse validée, nous avons analysé des moûts de Sauvignon blanc qui proviennent des régions du Languedoc et du Val de Loire. Ainsi, nous avons identifié et quantifié le γ GluCys-3MH dans un moût de raisin pour la première fois. L'ensemble des résultats de ce chapitre, notamment l'optimisation de la méthode d'analyse et les quantifications qui en découlent, a fait l'objet d'une publication parue dans *Food Chemistry* en 2017 : *First identification and quantification of S-3-(hexan-1-ol)- γ -glutamyl-cysteine in grape must as a potential thiol precursor, using UPLC-MS/MS analysis and stable isotope dilution assay*.

Différentes expérimentations ont été menées à échelle pilote au cours de la thèse pour étudier les variations de la teneur en composés S-conjugués inclus dans la méthode d'analyse précédemment décrite. La mise en place et les résultats de ces expérimentations sont détaillés dans le chapitre 3.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

First identification and quantification of S-3-(hexan-1-ol)- γ -glutamyl-cysteine in grape must as a potential thiol precursor, using UPLC-MS/MS analysis and stable isotope dilution assay



Hugo Bonnaffoux^a, Aurélie Roland^b, Emmanuelle Rémond^c, Stéphane Delpech^b, Rémi Schneider^{a,1}, Florine Cavelier^{c,*}

^a Institut Français de la Vigne et du Vin, INRA-UMR-SPO, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier cedex 1, France

^b NYSEOS, 53 rue Claude François, Parc 2000, 34080 Montpellier, France

^c Institut des Biomolécules Max Mousseron, IBMM, UMR-5247, CNRS, Université Montpellier, ENSCM, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 January 2017

Received in revised form 22 May 2017

Accepted 22 May 2017

Available online 30 May 2017

Keywords:

Varietal thiols

Precursors

3MH

UPLC-MS/MS

SIDA method

ABSTRACT

Varietal thiols are key aroma compounds in wine issued from multiple and complex origins. Several precursor families have been identified in grapes and must and have been widely studied. But a large part of thiol origin still remains unknown. Thus, we only have an incomplete picture of thiol precursors and there is a lack of knowledge on pre-fermentative mechanisms that can impact their levels. Our study focused on the formal identification and the quantification of new varietal thiol precursors in must. First of all, we synthesized natural and labeled standards using an original multi-step strategy, then we developed and validated a UPLC-MS/MS method that allowed us to identify and quantify for the first time a dipeptide S-conjugate to 3MH, the γ -GluCys-3MH, in Sauvignon B. We observed the S-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-L-cysteinyl-glycine (CysGly-4MMP) and S-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-N-(L- γ -glutamyl)-L-cysteine (γ -GluCys-4MMP) but at too low concentration to be quantified.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Several studies, for years, highlighted the importance of varietal thiols in wine aroma, and these sulfur-containing volatile compounds are now considered as key compounds (Roland, Schneider, & Cavelier, 2011; Roland et al., 2016). Among them, the most studied are the 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP) responsible for box tree and blackcurrant buds notes (Tominaga & Dubourdieu, 1997), the 3-mercapto-hexan-1-ol (3MH) and its corresponding acetate responsible for grapefruit and passion fruit aroma respectively (Tominaga, Darriet, & Dubourdieu, 1996). They highly contribute to the typical aroma of wines, such as Sauvignon B. (Darriet, Tominaga, Lavigne, Boidron, & Dubourdieu, 1995). These varietal thiols are not present in grape or must and are only produced by *Saccharomyces cerevisiae* during the alcoholic fermentation from odorless precursors (Kobayashi et al., 2010; Pinu, Jouanneau, Nicolau, Gardner, & Villas-Boas, 2012; Roland, Cavelier, & Schneider, 2012; Roland,

Schneider, Guernevé, Razungles, & Cavelier, 2010a; Tominaga, Peyrot des Gachons, & Dubourdieu, 1998). Several precursor families have already been reported:

- Cysteine S-conjugates (Cys-3MH and Cys-4MMP) (Tominaga et al., 1998).
- Glutathione S-conjugates (G-3MH and G-4MMP) (Fedrizzi, Pardon, Sefton, Elsey, & Jeffery, 2009; Peyrot Des Gachons, Tominaga, & Dubourdieu, 2002).
- Cysteinyl-glycine S-conjugate to 3MH (CysGly-3MH), hypothesized as an intermediate between the two formers precursors (Capone, Pardon, Cordente, & Jeffery, 2011).
- Sulfonic acids recently hypothesized on structural basis but not identified (Duhamel et al., 2015).
- Glutathione S-conjugate to 3MHAI (G-3MHAI) and its bisulfite adduct, although no evidence of their precursor's role is available (Thibon et al., 2016).

In addition, another pathway from a volatile precursor was also evidenced, since 3MH can result from the addition of a sulfhydryl group to the (E)-2-hexenal during the alcoholic fermentation, but the sulfur donor has not been identified yet (Schneider, Charrier, Razungles, & Baumes, 2006). It has been suggested that H₂S could

* Corresponding author.

E-mail addresses: remi.schneider@vignevin.com (R. Schneider), florine.cavelier@umontpellier.fr (F. Cavelier).

¹ These authors contributed equally to directing this study.

be one of the sulfur donor but no formal proof was given by using labeled H_2S (Harsch et al., 2013).

However, the three biosynthesis pathways formally identified (Cysteine *S*-conjugates, Glutathione *S*-conjugates, and hexenal pathway) cannot explain the entire thiol formation in wines. Indeed, the theoretical amount of thiols formed by these pathways, calculated from the precursor levels, is much lower than the amount of thiols actually found in the corresponding wines (Pinu et al., 2012; Roland, Schneider, Razungles, Le Guerneve, & Cavelier, 2010b).

For this reason, we looked for other precursors based on the glutathione moiety, especially the dipeptide forms:

- Cysteinyglycine *S*-conjugate to 3MH and 4MMP (CysGly-3MH and CysGly-4MMP)
- γ Glutamyl-cysteine *S*-conjugate to 3MH and 4MMP (γ GluCys-3MH and γ GluCys-4MMP).

Our study was based on synthetic labeled precursors as analytical standards, beginning with the dipeptide forms and their deuterated analogues (Roland et al., 2010b). Then, we developed an analytical method adapted from Roland et al. (2010c), to identify and quantify the γ GluCys-3MH in grape must.

2. Material and methods

2.1. Generalities

N,N-Diisopropylethylamine (99.5%), *N,N*-dimethylformamide dioneopentyl acetal (99%), 1,4-dithioerythritol ($\geq 99\%$), dichloromethane (anhydrous, $\geq 99.8\%$), *trans*-2-hexenal (99%), triethylamine ($\geq 99\%$), mesityl oxide (90% technical grade), mesityl oxide- d_{10} (98 atom% D), toluene (anhydrous, 99.8%), ethyl acetate ($\geq 99.5\%$), Boc-Glu(OBzl)-OH (98%), ethan(ol-*d*) (99 atom% D), trisopropylsilane (99%), hydrogen chloride solution, *t*-butanol and lithium aluminium hydride were purchased from Sigma-Aldrich. Dimethylformamide and 1,4-dioxane (analysis reagent grade) were purchased from Carlo Erba Reagents. *N,N'*-di-Boc-*L*-cystine-*di-tert*-butyl ester and lindlar catalyst were purchased from Fluka. H-Gly-OtBu and BOP were purchased from Iris Biotech. *L*-Cystine *di-tert*-butyl ester dihydrochloride was purchased from Bachem. For analysis: cyclohexane ($\geq 99.8\%$) was purchased from Sigma-Aldrich. Ethyl acetate was purchased from Carlo Erba. All reactions involving air-sensitive reagents were performed under nitrogen or argon.

Proton nuclear magnetic resonance 1H NMR spectras were recorded by the "Laboratoire de Mesures Physiques" of Montpellier University on a Bruker spectrometer at 300 MHz, 400 MHz or 500 MHz. Chemical shifts (δ) are reported with the solvent resonance as internal standard. Data are reported as follows: chemical shift (δ in ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, br = broad, m = multiplet), integration, coupling constants (*J* in Hz) and assignment. Purifications were performed on bench flash chromatography column using silica gel (Merck 60, 230–400 mesh) or with a Biotage instrument Isolera 4 using SNAP KP-SIL flash cartridges. LC/MS system consisted of a Waters Alliance 2690 HPLC, coupled to a ZQ spectrometer (Manchester, UK) fitted with an electrospray source operated in the positive ionization mode (ESI+). All the analyses were carried out using a C18 Chromolith Flash 25 \times 4.6 mm column operated at a flow rate of 3 ml/min. A gradient of 0–100% in solvent B was developed over 3 min. Positive-ion electrospray mass spectras were acquired at a solvent flow rate of 100–200 μ L/min. Nitrogen was used for both the nebulizing and drying gas. The data were obtained in a scan mode ranging from 200 to 1700 *m/z* in 0.1 s intervals. A total of

10 scans were summed up to get the final spectrum. High resolution mass spectra (HRMS) were performed by the "Laboratoire de Mesures Physiques" of Montpellier University on a Micromass Q-ToF spectrometer equipped with electrospray source ionization (ESI), using phosphoric acid as an internal standard.

2.2. Synthesis of γ GluCys precursors

2.2.1. Synthesis of *N*-Boc-*L*-glutamic acid γ -benzyl ester α -*tert*-butyl ester **1**

To a solution of *N*-Boc-*L*-glutamic acid γ -benzyl ester (1.51 g, 4.5 mmol) in toluene (20 ml), *tert*-butanol (7.5 ml) was added and the reaction mixture was warmed up to reflux. A solution of dimethylformamide dioneopentyl acetal (7.5 ml, 27 mmol, 6 eq) in toluene (9 ml), and *tert*-butanol (4 ml) was then added with a syringe pump over 1.5 h. The reaction mixture was stirred for 2 h at reflux under argon atmosphere. After cooling down at room temperature, a saturated $NaHCO_3$ solution (15 ml) was added and the desired compound was extracted with dichloromethane (30 mL), dried over Na_2SO_4 , and concentrated under vacuum to afford 1.99 g of a yellow oil, which was purified by flash chromatography on silica gel (cyclohexane/ethyl acetate = 8/2, 7/3, then ethyl acetate) to give **1** as a white solid in an excellent yield (1.72 g, 98%). LC-ESI-MS: [M+H]⁺ 394.0 Da; [M+Na]⁺ 416.1 Da; [M–Boc]⁺ 294.1 Da; [M–Boc–*t*Bu]⁺ 237.8 Da, [M–Boc–*t*Bu– H_2O]⁺ 220.1 Da, [M–Boc–*t*Bu–Bzl]⁺ 148.2 Da, [M–Boc–*t*Bu–Bzl– H_2O]⁺ 130.0 Da. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 1.43 (s, 9H, *t*Bu), 1.46 (s, 9H, *t*Bu), 1.84–1.99 (m, 1H, $CH_{\beta}H_{\beta}$), 2.09–2.25 (m, 1H, $CH_{\beta}H_{\beta}$), 2.32–2.56 (m, 2H, $CH_{2\gamma}$), 4.15–4.28 (m, 1H, CH_{α}), 5.03–5.10 (m, 1H, NH), 5.12 (s, 2H, CH_2Bzl), 7.21–7.48 (m, 5H, CHarom).

2.2.2. Synthesis of *N*-Boc-*L*-glutamic acid α -*tert*-butyl ester **2**

To a solution of *N*-Boc-*L*-glutamic acid γ -benzyl ester α -*tert*-butyl ester **1** (1.72 g, 4.4 mmol) in ethyl acetate (37 ml), was added a Lindlar catalyst (257 mg). The reaction mixture was stirred overnight under dihydrogen atmosphere at room temperature, then filtered on celite and concentrated under vacuum to afford **2** as a white solid in quantitative yield (1.31 g, >99%). LC-ESI-MS: [M+H]⁺ 304.2 Da; [M+Na]⁺ 326.1 Da; [M–Boc–*t*Bu]⁺ 147.8 Da; [M–Boc–*t*Bu– H_2O]⁺ 129.7 Da. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 1.43 (s, 9H, *t*Bu), 1.46 (s, 9H, *t*Bu), 1.81–1.99 (m, 1H, $CH_{\beta}H_{\beta}$), 2.07–2.24 (m, 1H, $CH_{\beta}H_{\beta}$), 2.27–2.56 (m, 2H, $CH_{2\gamma}$), 4.14–4.29 (m, 1H, CH_{α}), 5.16 (broad d, *J* = 7.6 Hz 1H, NH).

2.2.3. Synthesis of *N*-(*N*-Boc-*L*- γ -glutamyl)-*L*-cystine *di-tert*-butyl ester **3**

To a solution of *N*-Boc-*L*-glutamic acid α -*tert*-butyl ester **2** (2.12 g, 7.0 mmol) in DMF (78 ml), BOP (3.40 g, 7.7 mmol, 1.1 eq) then DIEA (4.3 ml, 24 mmol, 3.5 eq) were added. The reaction mixture was stirred for 10 min at room temperature, then *L*-cystine *di-tert*-butyl ester dihydrochloride (1.64 g, 3.8 mmol, 0.55 eq) was added (pH = 8). The reaction was stirred overnight at room temperature, then concentrated under vacuum and ethyl acetate was added (150 mL). The organic solution was washed with a solution of $KHSO_4$ 1 M (3 \times 100 ml), a saturated NaCl solution (100 ml), a saturated $NaHCO_3$ solution (3 \times 100 ml) and then a saturated NaCl solution (100 ml). It was dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum to obtain a crude (3.56 g), which was purified by flash chromatography on silica gel (cyclohexane/ethyl acetate = 5/5, 4/6, 3/7, then 2/8) to give **3** as a white non-pure product (2.45 g). LC-ESI-MS: [M+H]⁺ 923.5 Da; [M+Na]⁺ 945.4 Da; [M–*t*Bu]⁺ 867.4 Da; [M–Boc]⁺ 823.4 Da; [M–Boc–*t*Bu]⁺ 767.3 Da; [M–Boc–2*t*Bu]⁺ 711.3 Da.

2.2.4. Synthesis of *N*-(*N*-Boc-*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine tert-butyl ester **4**

To a solution of *N*-(*N*-Boc-*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine di-*tert*-butyl ester crude **3** (856 mg) in DCM (35 ml), triethylamine (0.39 ml, 2.8 mmol, 3 eq) and dithioerythritol (215 mg, 1.4 mmol, 1.5 eq) were added under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 40 minutes, and the reaction was quenched with an aqueous citric acid 5% solution (30 ml). The organic phase was washed with citric acid 5% (2 \times 25 ml), and NaCl_(sat) (25 ml), dried over Na₂SO₄, and concentrated under vacuum to afford 975 mg of **4** as a crude product. LC-ESI-MS: [M+H]⁺ 463.2 Da; [M+Na]⁺ 485.2 Da; [M-*t*Bu]⁺ 407.2 Da; [M-Boc]⁺ 363.2 Da; [M-2*t*Bu]⁺ 351.1 Da; [M-Boc-*t*Bu]⁺ 307.1 Da; [M-3*t*Bu]⁺ 295.1 Da; [M-Boc-2*t*Bu]⁺ 251.0 Da; [M-Boc-2*t*Bu-NH₃]⁺ 234.1 Da.

2.2.5. Synthesis of natural *S*-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-*N*-(*N*-Boc-*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine tert-butyl ester **5**

To a solution of *N*-(*N*-Boc-*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine tert-butyl ester crude **4** (975 mg) in dioxane (40 ml), triethylamine (0.52 ml, 3.7 mmol, 2 eq), H₂O (13 ml) and mesityl oxide (1.04 ml, 9.1 mmol, 4.3 eq) were added under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 3 days at room temperature. After removal of dioxane, ethyl acetate (100 ml) was added. The mixture was washed with an aqueous citric acid 5% solution (3 \times 75 ml), and a saturated NaCl solution, dried over Na₂SO₄, and concentrated under vacuum to obtain a crude (1.08 g) which was purified by flash column chromatography to give the product **5** (1.00 g, 1.78 mmol, yield of 72% over 3 steps). LC-ESI-MS: [M+H]⁺ 561.2 Da; [M+Na]⁺ 583.2 Da; [M-*t*Bu]⁺ 505.1 Da; [M-Boc]⁺ 461.1 Da; [M-Boc-*t*Bu]⁺ 405.0 Da; [M-Boc-2*t*Bu]⁺ 349.1 Da. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.40–1.48 (33H, 2 \times CH₃ and 3 \times *t*Bu), 1.92 (m, 1H, CH _{β} H _{β} Glu), 2.14 (m, 1H, CH _{β} H _{β} Glu), 2.17 (s, 3H, CH₃CO), 2.32 (m, 2H, CH_{2 γ}), 2.67 (s, 2H, CH₂CO), 3.00 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH_{2 β} Cys), 4.19 (m, 1H, CH₂Glu), 4.70 (m, 1H, CH₂-Cys), 5.20 (broad d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NHGlu), 6.56 (broad d, *J* = 6.7 Hz, 1H, NHCys).

2.2.6. Synthesis of deuterated *S*-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-*N*-(*N*-Boc-*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine tert-butyl ester **5-d₇₋₁₀**

Conditions for the synthesis of deuterated (d₇₋₁₀) *S*-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-*N*-(*N*-Boc-*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine tert-butyl ester were the same as **5** using mesityl oxide-d₁₀ as electrophile without purification. LC-ESI-MS: [M+H]⁺ 568.2 Da (d₇); [M+H]⁺ 569.2 Da (d₈); [M+H]⁺ 570.2 Da (d₉); [M+H]⁺ 571.3 Da (d₁₀); [M-*t*Bu]⁺ 514.2 Da (d₉); [M-Boc]⁺ 470.2 Da (d₁₀).

2.2.7. Synthesis of natural *S*-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-*N*-(*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine chloride **6**

To a solution of *S*-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-*N*-(*N*-Boc-*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine tert-butyl ester **5** (334 mg, 0.60 mmol) with TIS (0.7 ml), 4 N HCl in dioxane (2.9 ml) was added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, then concentrated under vacuum to obtain 210 mg of **6** as a crude product (62% of purity by NMR titration). LC-ESI-MS: [M+H]⁺ 349.1 Da, *rt* = 0.72. HRMS (Q-TOF) calculated for C₁₄H₂₅N₂O₆S, 349.1433 Da; found 349.1428 Da. ¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ (ppm) 1.41 (s, 6H, 2 \times CH₃), 2.14–2.29 (m, 2H, CH_{2 β} Glu), 2.25 (s, 1H, CH₃CO), 2.51–2.61 (m, 2H, CH_{2 γ} Glu), 2.86 (s, 2H, CH₂CO), 3.03 (dd, *J* = 13.1, 7.9 Hz, 1H, CH _{β} H _{β} Cys), 3.15 (dd, *J* = 13.1, 4.8 Hz, 1H, CH _{β} H _{β} Cys), 4.00 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, CH₂Glu), 4.63 (dd, *J* = 7.9, 4.8 Hz, 1H, CH₂Cys). ¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ (ppm) 213.4, 174.3, 173.7, 172.4, 53.5, 52.9, 52.8, 43.9, 31.7, 31.0, 29.0, 28.0, 28.0, 25.8.

2.2.8. Synthesis of deuterated *S*-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-*N*-(*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine chloride **6-d₆₋₁₀**

Conditions for the synthesis of deuterated (d₆) *S*-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-*N*-(*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine chloride were the same as **6**. (92% of purity by NMR titration). LC-ESI-MS: [M+H]⁺ 354.16 Da (d₅); [M+H]⁺ 355.1 Da (d₆), *rt* = 0.72. HRMS (Q-TOF) calculated for C₁₄H₁₉D₆N₂O₆S, 355.1810 Da (d₆); found 355.1813 Da. Spectral data were entirely consistent with those of the unlabeled compound **6**, the only difference being the absence of signals corresponding to the labeled position in the ¹H NMR. ¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ (ppm) 213.4, 174.3, 173.7, 172.4, 53.5, 52.9, 52.8, 43.9, 31.7, 31.0, 29.0, 28.0, 28.0, 25.8.

2.2.9. Synthesis of natural *S*-3-(hexan-1-ol)-*N*-(*N*-Boc-*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine tert-butyl ester **7**

To a solution of *N*-(*N*-Boc-*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine tert-butyl ester **4** (656 mg, 1.4 mmol) in dioxane (20 ml) and water (20 ml), was added Cs₂CO₃ (277 mg). Then 2-hexen-1-ol (0.2 ml, 1.7 mmol, 1.2 eq) in dioxane (10 ml) was added drop wise for 10 h. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. Then NaBH₄ (141 mg, 3.7 mmol, 2.6 eq) in water (3 ml) was added. After 2 hours, the reaction mixture was acidified (pH 4) using a 2 N HCl solution, then concentrated under vacuum to obtain a crude, which was purified by flash chromatography to give **7** as a non-pure diastereoisomeric product (433 mg). LC-ESI MS: [M+H]⁺ 563.3 Da; [M+Na]⁺ 585.3 Da; [M-*t*Bu]⁺ 507.3 Da; [M-Boc]⁺ 463.1 Da; [M-Boc-*t*Bu]⁺ 407.2 Da; [M-Boc-2*t*Bu]⁺ 351.1 Da; [M- γ Glu]⁺ 222.1 Da. [M- γ Glu-NH₃]⁺ 205.1 Da.

2.2.10. Synthesis of deuterated *S*-3-(hexan-1-ol)-*N*-(*N*-Boc-*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine di-*tert*-butyl ester **7-d₂**

Conditions of deuterated (d₂) *S*-3-(hexan-1-ol)-*N*-(*N*-Boc-*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine tert-butyl ester were the same as for **7** using [2,3-²H₂]-2-hexen-1-ol as electrophile without purification. LC-ESI MS: [M+H]⁺ 565.3 Da; [M+Na]⁺ 587.3 Da; [M-Boc]⁺ 465.3 Da; [M-Boc-*t*Bu]⁺ 409.2 Da; [M-Boc-2*t*Bu]⁺ 353.1 Da; [M- γ Glu]⁺ 224.2 Da. [M- γ Glu-NH₃]⁺ 207.1 Da.

2.2.11. Synthesis of natural *S*-3-(hexan-1-ol)-*N*-(*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine chloride **8**

To a solution of *S*-3-(hexan-1-ol)-*N*-(*N*-Boc-*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine tert-butyl ester (301 mg, 0.53 mmol) with TIS (0.63 ml), HCl 4 N in dioxane (2.6 ml) was added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, then concentrated under vacuum to obtain **8** as a crude product (90% of purity by NMR titration). LC-ESI MS: [M+H]⁺ 351.1 Da, *rt* = 0.83. HRMS (Q-TOF) calculated for C₁₄H₂₇N₂O₆S, 351.1590 Da; found 351.1594 Da. ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ (ppm) 0.79–0.82 (m, 3H, CH₃), 1.26–1.39 (m, 2H, CH₂), 1.41–1.56 (m, 2H, CH₂), 1.59–1.72 (m, 1H, CHH'), 1.73–1.83 (m, 1H, CHH'), 2.06–2.22 (m, 2H, CH₂), 2.49 (m, 2H, CH₂), 2.72–2.81 (m, 1H, CH), 2.84–2.88 (m, 1H, CH _{β} H _{β} Cys), 3.01–3.03 (m, 1H, CH _{β} H _{β} Cys), 3.59–3.68 (m, 2H, CH₂OH), 3.92 (dd, *J* = 6.5 Hz, 1H, CH₂Cys) 4.46–4.56 (m, 1H, CH₂Glu). ¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ (ppm) 174.3, 174.0, 173.9, 172.3, 59.2, 59.2, 52.9, 52.8, 42.4, 36.5, 36.4, 36.3, 36.2, 31.0, 30.6, 30.6, 25.8, 19.3, 19.2, 13.1.

2.2.12. Synthesis of deuterated *S*-3-(hexan-1-ol)-*N*-(*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine chloride **8-d₂**

Conditions of deuterated (d₂) *S*-3-(hexan-1-ol)-*N*-(*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine chloride were the same as **8**. (67% of purity by NMR titration). LC-ESI MS: [M+H]⁺ 353.2 Da, *rt* = 0.83. HRMS (Q-TOF) calculated for C₁₄H₂₅D₂N₂O₆S, 353.1715 Da; found 353.1712 Da. Spectral data were entirely consistent with those of the unlabeled compound **6**, the only difference was the absence

of signals corresponding to the labeled position in the ^1H NMR. ^{13}C NMR (126 MHz, D_2O) δ (ppm) 174.3, 174.0, 173.9, 172.3, 59.2, 59.2, 52.9, 52.8, 42.4, 36.5, 36.4, 36.3, 36.2, 31.0, 30.6, 30.6, 25.8, 19.3, 19.2, 13.1.

2.3. Synthesis of CysGly precursors

2.3.1. Synthesis of *N,N'*-di-Boc-L-cystinyl-glycine tert-butyl ester **9**

To a solution of *N,N'*-di-Boc-L-cystine (5.02 g, 11.4 mmol) in DMF (160 ml), BOP (11.04 g, 25 mmol, 2.2 eq) then DIEA (13.85 ml, 80 mmol, 7.0 eq) were added. The reaction mixture was stirred for 10 min at room temperature, then Glycine tert-butyl ester hydrochloride (3.81 g, 22.7 mmol, 2.0 eq) was added (pH = 9). The reaction was stirred overnight at room temperature, then concentrated under vacuum and ethyl acetate was added (150 mL). The dipeptide compound was washed with a solution of KHSO_4 1 M (3×100 ml), a saturated NaCl solution (100 ml), a saturated NaHCO_3 solution (3×100 ml) then a saturated NaCl solution (100 ml). It was dried over Na_2SO_4 , and concentrated under vacuum to obtain a crude (8.267 g), which was purified by column flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate = 8/2, 7/3, 5/5, then ethyl acetate) to give **9** as a non-pure orange powder (5.00 g). LC-ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 667.1 Da; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 689.1 Da; $[\text{M}-t\text{Bu}]^+$ 611.2 Da; $[\text{M}-\text{Boc}]^+$ 567.1 Da; $[\text{M}-\text{Boc}-t\text{Bu}]^+$ 511.0 Da; $[\text{M}-2\text{Boc}]^+$ 467.1 Da.

2.3.2. Synthesis of *N*-Boc-L-cysteinyl-glycine tert-butyl ester **10**

To a solution of *N,N'*-di-Boc-L-cystinyl-glycine tert-butyl ester crude **9** (298 mg, 0.45 mmol) in DCM (5 ml), triethylamine (0.19 ml, 1.3 mmol) and dithioerythritol (104 mg, 0.67 mmol) were added under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 40 minutes, and the reaction was quenched with an aqueous citric acid 5% solution (10 ml). The organic phase was washed with citric acid 5% (2×10 ml), and a saturated NaCl solution (10 ml). It was dried over Na_2SO_4 , and concentrated under vacuum to give **10** as a white solid (282 mg). LC-ESI-MS: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 357.0 Da; $[\text{M}-t\text{Bu}]^+$ 279.1 Da; $[\text{M}-\text{Boc}-t\text{Bu}]^+$ 179.2 Da; $[\text{M}-\text{Boc}-t\text{Bu}-\text{NH}_3]^+$ 162.2 Da; $[\text{M}-\text{Boc}-t\text{Bu}-\text{NH}_3-\text{H}_2\text{O}]^+$ 144.1 Da.

2.3.3. Synthesis of natural *S*-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-*N*-Boc-L-cysteinyl-glycine tert-butyl ester **11**

To a solution of *N,N'*-di-Boc-L-cysteinyl-glycine tert-butyl ester **10** (1.29 g, 3.9 mmol) in 70 mL of a mixture dioxane/ H_2O (2.5/1), triethylamine (1.1 ml, 7.7 mmol, 2 eq) and mesityl oxide (1.77 ml, 15.5 mmol, 4 eq) were added under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 4 days at room temperature. After removal of dioxane, ethyl acetate (100 ml) was added. The mixture was washed with an aqueous citric acid 5% solution (3×75 ml), and a saturated NaCl solution, dried over Na_2SO_4 , and concentrated under vacuum to obtain a crude, which was purified by flash column chromatography to afford **11** as a non-pure product (662 mg). LC-ESI-MS: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 455.2 Da; $[\text{M}-\text{Boc}]^+$ 333.2 Da; $[\text{M}-\text{Boc}-t\text{Bu}]^+$ 277.2 Da; $[\text{M}-\text{Boc}-t\text{Bu}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 258.9 Da; $[\text{M}-\text{Boc}-t\text{Bu}-\text{mesityl oxide}]^+$ 178.9 Da; $[\text{M}-\text{Boc}-t\text{Bu}-\text{mesityl oxide}-\text{NH}_3]^+$ 162.1 Da.

2.3.4. Synthesis of deuterated *S*-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-*N*-Boc-L-cysteinyl-glycine tert-butyl ester **11-d₆₋₁₀**

Conditions for the preparation and purification of the deuterated (d_7) *S*-*N,N'*-di-Boc-L-cysteinyl-glycine tert-butyl ester were the same as **11** using mesityl oxide- d_{10} as electrophile. LC-ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 440.2 Da (d_7); $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 462.2 Da (d_7).

2.3.5. Synthesis of natural *S*-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-*L*-cysteinyl-glycine chloride **12**

To a solution of natural *S*-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-*N*-Boc-L-cysteinyl-glycine tert-butyl ester **11** as used as a crude (650 mg) with TIS (1.35 ml), HCl 4 N in dioxane (6 ml) was added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, then concentrated under vacuum to obtain a crude, which was purified by preparative mass spectroscopy (100% of purity by NMR titration). LC-ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 277.1 Da, $\text{rt} = 0.71$ min. HRMS (Q-TOF) calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, 277.1222 Da; found 277.1221 Da. ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 1.45 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 2.27 (s, 3H, CH_3CO), 2.89 (s, 2H, CH_2CO), 3.12 (dd, $J = 13.7, 7.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_\beta\text{H}_\beta\text{Cys}$), 3.22 (dd, $J = 5.9, 13.7$ Hz, 1H, $\text{CH}_\beta\text{H}_\beta\text{Cys}$), 4.01–4.17 (m, 2H, $\text{CH}_2\alpha\text{Gly}$), 4.28 (dd, $J = 5.9, 7.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_\alpha\text{Cys}$). ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ (ppm) 213.3, 172.8, 168.6, 53.5, 52.6, 44.5, 41.3, 31.7, 28.5, 27.9.

2.3.6. Synthesis of deuterated *S*-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-*L*-cysteinyl-glycine chloride **12-d₆**

Conditions for the preparation of the deuterated (d_6) *S*-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-*L*-cysteinyl-glycine chloride were the same as **12** (37% of purity by NMR titration). LC-ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 283.3 Da (d_6), $\text{rt} = 0.66$ min. HRMS (Q-TOF) calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{D}_6\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, 283.1599 Da; found 283.1592 Da. Spectral data were entirely consistent with those of the unlabeled compound **6** with the only difference being the absence of signals corresponding to the labeled position in the ^1H NMR.

2.3.7. Synthesis of natural *S*-3-(hexan-1-ol)-*N*-Boc-L-cysteinyl-glycine tert-butyl ester **13**

To a solution of *N*-Boc-L-cysteinyl-glycine tert-butyl ester (1.07 g, 3.20 mmol) in dioxane (20 ml) and water (30 ml), was added Cs_2CO_3 (623 mg). Then 2-hexen-1-ol (0.45 ml, 3.8 mmol, 1.2 eq) in dioxane (30 ml) was added drop wise for 10 hour. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. Then NaBH_4 (317 mg, 8.4 mmol, 2.6 eq) in water (7 ml) was added. After 2 hours, the reaction mixture was acidified (pH 4) using a 2 N HCl solution, then concentrated under vacuum to obtain **13** as a pure diastereoisomeric product (433 mg, 31%). LC-ESI MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 435.1 Da; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 457.1 Da; $[\text{M}-t\text{Bu}]^+$ 379.1 Da; $[\text{M}-\text{Boc}]^+$ 335.2 Da; $[\text{M}-2t\text{Bu}]^+$ 323.0 Da; $[\text{M}-\text{Boc}-t\text{Bu}]^+$ 279.0 Da; $[\text{M}-\text{Boc}-t\text{Bu}-\text{NH}_3]^+$ 262.2 Da; $[\text{M}-\text{Boc}-t\text{Bu}-\text{NH}_3-\text{hexanol}]^+$ 162.0 Da.

2.3.8. Synthesis of deuterated *S*-3-(hexan-1-ol)-*N*-Boc-L-cysteinyl-glycine tert-butyl ester **13-d₂**

Conditions for the synthesis of deuterated (d_2) *S*-3-(hexan-1-ol)-*N*-Boc-L-cysteinyl-glycine tert-butyl ester were the same as **13** using $[\text{2,3-}^2\text{H}_2]$ -2-hexen-1-ol as electrophile without purification (951 mg). LC-ESI MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 437.2 Da; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 459.2 Da; $[\text{M}-t\text{Bu}]^+$ 381.2 Da; $[\text{M}-\text{Boc}]^+$ 337.3 Da; $[\text{M}-\text{Boc}-t\text{Bu}]^+$ 281.1 Da; $[\text{M}-\text{Boc}-t\text{Bu}-\text{NH}_3]^+$ 264.2 Da.

2.3.9. Synthesis of natural *S*-3-(hexan-1-ol)-*L*-cysteinyl-glycine chloride **14**

To a solution of natural *S*-3-(hexan-1-ol)-*N*-Boc-L-cysteinyl-glycine tert-butyl ester **13** (433 mg, 0.99 mmol) with TIS (0.90 ml), HCl 4 N in dioxane (3.7 ml) was added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, then concentrated under vacuum to obtain a crude (92% of purity by NMR titration). LC-ESI MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 279.1 Da, $\text{rt} = 0.76$ min. HRMS (Q-TOF) calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, 279.1379 Da; found 279.1379 Da. ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ (ppm), 0.90 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.36–1.49 (m, 2H, CH_2), 1.52–1.67 (m, 2H, CH_2), 1.69–1.79 (m, 1H, CHH'), 1.83–1.93 (m, 1H, CHH'), 2.85–2.94 (m, 1H, CH), 3.07 (dd, $J = 14.3, 6.8$ Hz, 1H, $\text{CH}_\beta\text{H}_\beta\text{Cys}$), 3.12–3.20 (m, 1H, $\text{CH}_\beta\text{H}_\beta\text{Cys}$),

3.69–3.78 (m, 2H, CH₂OH), 3.99–4.14 (m, 2H, CH₂Gly), 4.22–4.29 (m, 1H, CH₂Cys). ¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ (ppm) 172.9, 168.7, 59.0, 59.0, 52.7, 52.6, 42.8, 41.3, 36.3, 36.0, 36.0, 30.3, 30.3, 19.2, 19.2, 13.1.

2.3.10. Synthesis of deuterated *S*-3-(hexan-1-ol)-*L*-cysteinyl-glycine chloride **14-d₂**

Conditions for the synthesis of deuterated (d₂) *S*-3-(hexan-1-ol)-*L*-cysteinyl-glycine chloride were the same as **14** (70% of purity by NMR titration). LC-ESI MS: [M+H]⁺ 281.1 Da, rt = 0.76 min. HRMS (Q-TOF) calculated for C₁₁H₂₁D₂N₂O₄S, 281.1504 Da; found 281.1491 Da. Spectral data were entirely consistent with those of the unlabeled compound **6**, the only difference was the absence of signals corresponding to the labeled position in the ¹H NMR.

2.4. Synthesis of [2,3-²H₂]-2-hexen-1-ol

The synthesis of experimental protocol of [2,3-²H₂]-2-hexen-1-ol was achieved following the procedure described by Roland et al. (2010a).

2.5. Method development

With the natural and labeled dipeptide *S*-conjugate synthesis, we were able to include to the cysteinylated and glutathionylated precursors analysis (Cys-3MH, Cys-4MMP, G-3MH and G-4MMP) method (Roland et al., 2010c), our eight new targets without must purification: CysGly-3MH, CysGly-4MMP, γ GluCys-3MH, γ GluCys-4MMP and their deuterated analogues.

2.5.1. MS parameters determination

Calibrant solutions of our eight targets were infused into the mass spectrometer to determine their fragmentation pattern by collision induced dissociation (CID), and to evaluate the optimal collision energy leading the better sensitivity. Those parameters allowed us to perform selected reaction monitoring (SRM) experiments (Table 1).

2.5.2. Chromatographic separation development

Analysis of Sauvignon B. musts were performed in direct injection (injection volume was 5 μ L with a sample volume of 1 mL) using a UPLC chromatography system hyphenated to a triple quadrupole mass spectrometer (Thermo TSQ Quantiva). The separation of the analytes was carried out on Hypersil gold AQ (1.9 μ m, 100 \times 2.1 mm). The mobile phase was composed of (A) water with 0.1% of formic acid and (B) acetonitrile with 0.1% of formic acid. The gradient of solvent began with 0% B for 7 min, increased to 1.4% for 12.5 min, then 5 min of column conditioning before return to initial conditions. The flow rate was equivalent to 0.6 mL.min⁻¹, and the temperature was set at 50 °C temperature (Fig. 2).

2.5.3. Method validation

Matrix effects were evaluated in the same matrix as our must samples using the Z-test procedure. According to this test, a value lower than 2, indicates the absence of matrix effect.

Calibration for each compound was performed using Tracefinder software (Thermo). The calibration curves for the different compounds were obtained by plotting the peak area ratio of quantifier ion (A_{analyte}/A_{standard}) multiplied by the internal standards concentration with 1/X weighting. Linearity of these curves was assessed by a lack-of-fit test.

Concerning accuracy, cysteinyl-glycine and γ glutamyl-cysteine *S*-conjugates were spiked at two concentrations: 17 and 140 μ g.L⁻¹ for 3MH conjugates, and 5 and 24 μ g.L⁻¹ for 4MMP conjugates.

Repeatability was calculated using a Sauvignon B. must spiked with known amounts of all the analytes (at the same concentration as the one used for accuracy tests).

Samples were all analyzed the same day in triplicate. Intermediate reproducibility was determined seven days after on an extract from the same must sample (storage at -20 °C), analyzed by the same analyst and on the same apparatus.

According to the International Conference on Harmonization recommendations, we calculated limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) using a signal to noise (S/N) ratio equal to 3 and 10 respectively.

2.6. Grape must samples

The quantifications were realized on various Sauvignon B. musts from experiments that took place in Muscadet and Languedoc vineyards (Western and Southern France, respectively) during the vintage 2015. They were stabilized at -20 °C with an addition of benzenesulfonic acid sodium salt (1 mg.mL⁻¹ of must) and sodium metabisulfite (4.5 mg.mL⁻¹ of must).

The first pre-fermentative experiment consisted in testing different durations of grape skin contact before crushing. This experiment was reproduced in triplicate and musts were sampled for 24 h maceration (155 samples). The second pre-fermentative experiment consisted in raw must conservation before starting the alcoholic fermentation (NTU at about 800–1000), in triplicate with sampling must for 2 weeks.

Quantification of cysteine, cysteinyl-glycine and γ glutamyl-cysteine and glutathione *S*-conjugates of 3MH, and cysteinylated precursor of 4MMP was performed by stable isotope dilution assay previously described.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis of cysteinyl-glycine and γ glutamyl-cysteine *S*-conjugate precursors

Some mechanisms were hypothesized, linking the glutathione *S*-conjugates to the cysteine *S*-conjugates, based mainly on structure similarities and the well-known metabolism of glutathione in plants or micro-organisms. In fact, from precursors already identified in the must (see in introduction), and the common structure between the glutathione and the cysteine, the cysteinyl-glycine and γ glutamyl-cysteine could be intermediates a same pathway (Grzam, Martin, Hell, & Meyer, 2007; Wolf, Dietz, & Schrödes, 1996). This observation is supported by the already assessed presence of the CysGly *S*-conjugate of 3MH in very particular prefermentative conditions (long-time harvest transportation) (Capone et al., 2011). That's why we investigated the presence of both CysGly and γ GluCys *S*-conjugates to 3MH and 4MMP, under various prefermentative conditions.

Synthesis of natural and deuterated glutathione and cysteine conjugates to 3MH and 4MMP have been already reported (Roland et al., 2010a). For the analysis by stable isotope dilution assay, we needed to obtain the various natural and labeled γ GluCys and CysGly *S*-conjugates using organic synthesis.

The Boc-Glu-OtBu **2** was obtained from Boc-Glu(OBzl)-OH with a *tert*-butylation and a hydrogenation with a quantitative yield (98% on 2 steps).

Then, peptide coupling between **2** and the commercially available H-cystine-OtBu was performed under classical conditions using BOP as coupling reagent to afford the cystine dipeptide **3**, which was reduced to cysteine dipeptide **4**, bearing a free thiol for the subsequent electrophilic addition. The Michael addition

Table 1
MS/MS parameters (Quantifier ion in bold (relative intensities)) obtained by infusing solution of standards at 5 mg.L⁻¹ (mixture composed by 50% ACN and 50% Water) into mass spectrometer in manual tune mode (triple quadrupole, Thermo TSQ Quantiva).

Parent ions in Da	Daughter ions in Da	Collision energy in V	RF-lens in V	Retention time in min	Compounds
277.1	116.0 (11)	24	44	4.2	CysGly-4MMP
	162.0 (22)	16			
	179.1 (26)	10			
	259.1 (100)	10			
283.2	115.9 (9)	24	47	4.2	CysGly-4MMP-d ₆
	162.0 (18)	16			
	179.1 (23)	10			
	265.2 (100)	10			
279.2	116.1 (42)	22	48	10.5 and 11.9	CysGly-3MH
	144.1 (26)	18			
	161.9 (100)	13			
	262.1 (81)	10			
281.1	116.0 (43)	22	50	10.5 and 11.9	CysGly-3MH-d ₂
	144.0 (27)	18			
	162.0 (100)	14			
	264.1 (81)	10			
349.1	99.2 (30)	19	61	7.2	γ GluCys-4MMP
	122.1 (100)	17			
	220.0 (42)	12			
355.2	105.1 (33)	20	61	7.2	γ GluCys-4MMP-d ₆
	122.0 (100)	17			
	226.2 (42)	10			
351.2	83.2 (77)	23	62	16.4	γ GluCys-3MH
	101.2 (23)	19			
	205.1 (100)	16			
	222.2 (70)	12			
353.1	85.2 (49)	23	64	16.4	γ GluCys-3MH-d ₂
	103.1 (20)	20			
	207.1 (100)	16			
	224.1 (63)	13			

was directly performed to avoid of the oxidation of the cysteine **4** to cystine **3**.

A Michael addition between the cysteine **4** and either hexenal or mesityl oxide was performed to obtain **7** (used as a crude in the subsequent deprotection) or **5** (72% on 3 steps) respectively. Finally, after an acidic deprotection, the γ GluCys-3MH **8** and γ GluCys-4MMP **6** were obtained, without purification and used directly as tracer in our experimental musts (Scheme 1).

The same strategy was also used for the synthesis of CysGly precursors (Scheme 2) starting from the commercially available *N,N'*-di-Boc-L-Cystine.

Peptide coupling between *N,N'*-di-Boc-L-Cystine and H-Gly-OtBu allowed us to obtain the cystinyl-glycine **9** as a non-pure compound. Polysulfurised dipeptide was observed in LC-HRMS. To our knowledge this observation had not been already reported. Fortunately, this phenomenon didn't disturb the following step, since all the polysulfides were reduced to free thiol, and this step afforded us the dipeptide Cys-Gly **10** as for the γ glutamyl-cysteinylated precursors synthesis.

The Michael addition between the cysteine dipeptide **10** and either hexenal or mesityl oxide afforded, after subsequent deprotection, the corresponding CysGly-3MH **14** and γ GluCys-4MMP **12** respectively.

Another synthesis of γ GluCys-3MH **8** and CysGly-3MH **14** might be possible. This alternative was used to identify the intermediates involved in the biosynthetic pathway of 3MH conjugates in yellow passion fruit (Fedrizzi et al., 2009). The procedure allowed Fedrizzi et al. to obtain the γ GluCys-3MH and CysGly-3MH using Michael addition in only one step.

This synthesis is faster, cheaper and gives a better yield than the multi-step synthesis we developed. However, this is not compatible with the cysteine part labeled with deuterium.

3.2. Chromatographic separation development

As we obtained unsatisfactory separations with superposition of γ GluCys-3MH and G-3MH, and of G-4MMP and γ GluCys-4MMP using the Roland *et al.* method (Roland et al., 2010c), we decided to optimize it as follow:

- lowering the gradient to improve the separation between the different precursors but for a longer run time.
- increasing the temperature for a better solubility in the mobile phase
- increasing the flow rate

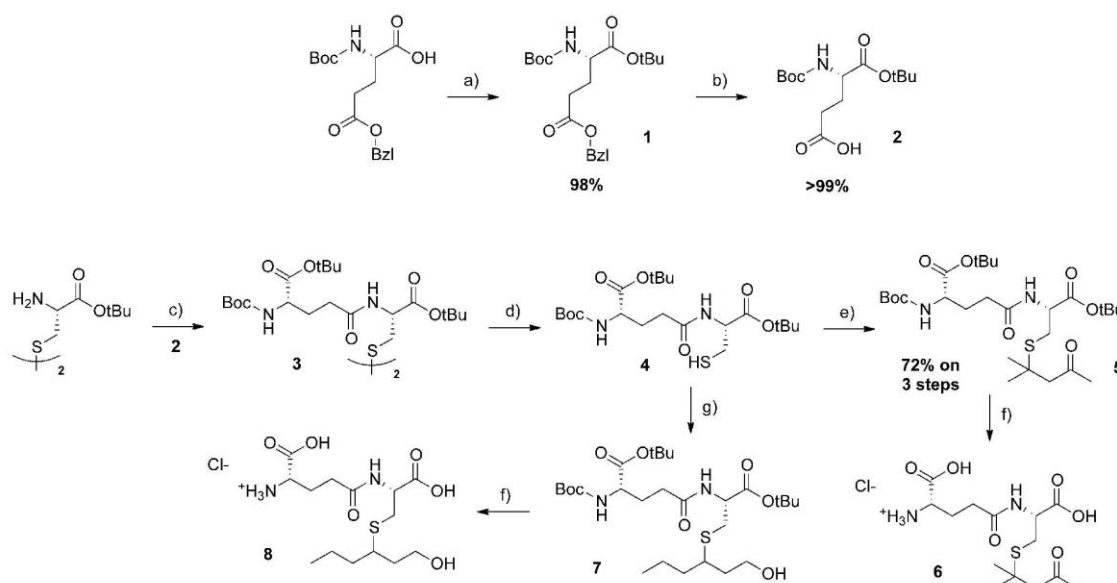
Individually, none of those parameter changes were satisfactory, but a combination of these variations was beneficial for the separation development (Fig. 2 presented in Section 3 part). Under our conditions, we observed a good resolution of all of our targets and even a separation, even partial, of the 3MH conjugates diastereoisomers.

3.3. Method validation results

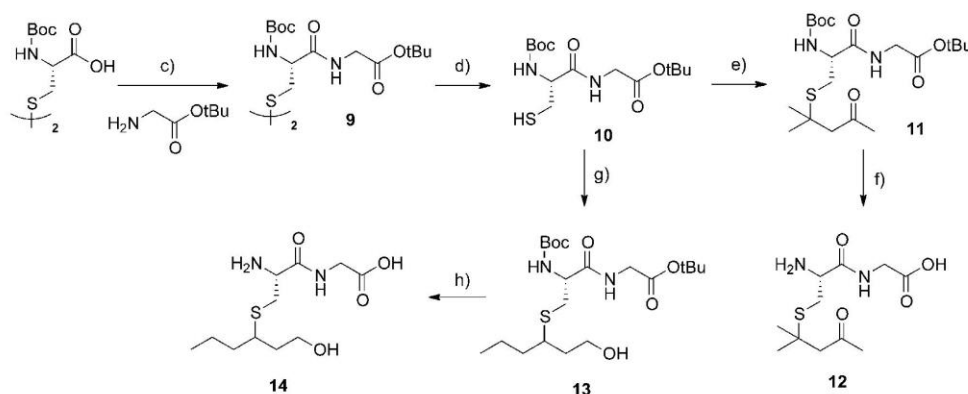
In theory, matrix effects do not affect compounds quantified by stable isotope dilution assay, since they are assumed to be similar for natural and labeled analytes. In our case, Z-score was less than 1.11, indicating the absence of matrix effect, which is consistent with the theory.

For calibration, the linear model appeared to be adequate for CysGly-3MH (up to 286.2 μ g.L⁻¹), CysGly-4MMP (up to 50.9 μ g.L⁻¹), γ GluCys-3MH (up to 202.6 μ g.L⁻¹) and γ GluCys-4MMP (up to 52.3 μ g.L⁻¹).

The recovery (TR%) was near to 100 with adding of:



Scheme 1. Synthesis of γ GluCys-3MH **8** and γ GluCys-4MMP **6**. a) dieneopentyl acetal, *t*-butanol, toluene, 2 h at reflux; b) H_2 , Pd/C, ethyl acetate, overnight at 25 °C; c) BOP, DIEA, DMF, overnight at 25 °C; d) DTE, NEt_3 , DCM, 40 min at 25 °C; e) mesityl oxide, dioxane, water, NEt_3 , 3 days at 25 °C; f) HCl 4 M, TIS, overnight at 25 °C; g) hexenal, C_5O_3 , dioxane, water, overnight at 25 °C then $NaBH_4$, 2 h at 25 °C.



Scheme 2. Synthesis of CysGly-3MH **14** and CysGly-4MMP **12**.

- 18 and 143 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of CysGly-3MH
- 3 and 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of CysGly-4MMP
- 17 and 135 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of γ GluCys-3MH
- 6 and 23 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of γ GluCys-4MMP

Concerning repeatability, the CV% was under 5% for all analytes. The intermediate reproducibility was lower than 4% (CV%), similar to the repeatability value, which proves the robustness of the method.

The LOD was between 0.01 and 0.18 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (0.04 and 0.61 $\mu\text{g.L}^{-1}$ concerning LOQ) for the four precursors, which is lower than the levels reported in the literature (Capone et al., 2011; Fedrizzi et al., 2009; Roland et al., 2010a).

Our validation results demonstrated the precision, sensitivity and accuracy of the method. This method was therefore convenient to identify and quantify our target compounds, in trace level in musts. Currently, it is the only available method, integrating all

the precursors, with the shortest run time and the most effective accuracy. However, we observed a signal confirming the presence of CysGly-4MMP, γ GluCys-4MMP and G-4MMP but the intensity of the signal is below the recommended values for formal identification. We have to stress out that CysGly-4MMP, γ GluCys-4MMP and G-4MMP were at low levels to be quantify (S/N between 3 and 10). Musts naturally richer in 4MMP had to be used, or a supplementary purification step had to be added before the analytical procedure.

3.4. Identification of γ GluCys-3MH in Sauvignon B. musts from Val de Loire and Languedoc

Identification of γ GluCys-3MH was performed by comparing the measured ion ratios between real samples and standard solution. The similarity of the retention time (16.2 and 16.5 minutes)

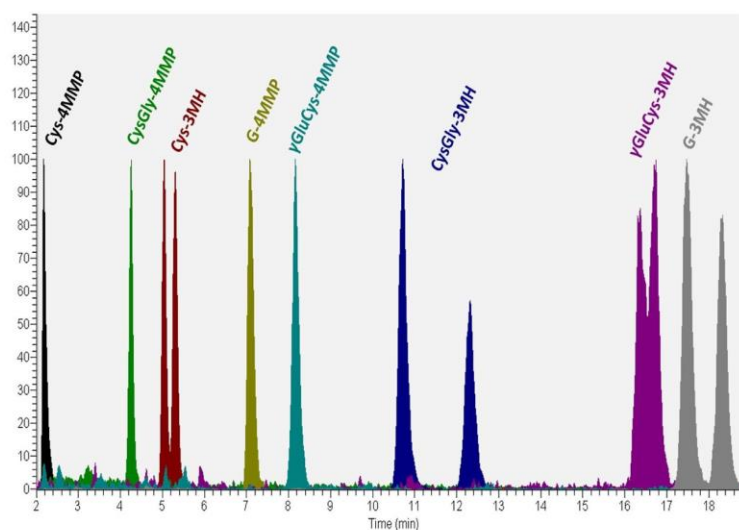


Fig. 1. Identification of γ GluCys-3MH in Sauvignon B.

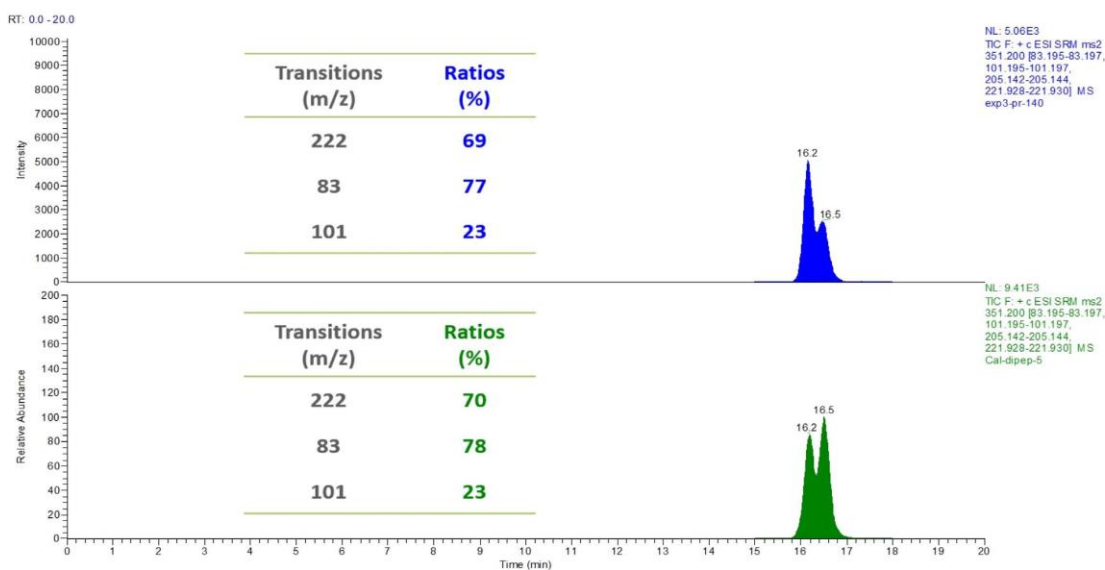


Fig. 2. Chromatogram of the 8 tracers for musts analysis.

Table 2
Quantification of Cys-4MMP, Cys-3MH, CysGly-3MH, γ GluCys-3MH and G-3MH into Sauvignon B. must.

Concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		Cys-4MMP	Cys-3MH	CysGly-3MH	γ GluCys-3MH	G-3MH
Grape skin contact experiment (155 samples)	Mean	0.6	52.0	11.9	8.0	127.9
	Min	0.03	32.4	5.8	3.3	63.8
	Max	1.7	106.9	28.3	36.1	245.7
Raw must conservation experiment (58 samples)	Mean	0.8	41.5	16.7	7.1	183.5
	Min	0.2	24.7	14.0	3.5	108.7
	Max	1.8	59.3	19.6	11.3	262.2
Enzyme and yeast effect experiment (20 samples)	Mean	0.7	35.7	10.6	18.4	104.6
	Min	0.6	34.0	8.1	5.5	91.4
	Max	0.8	36.8	17.2	23.8	131.4

and the ion ratios in our analysis allowed us to formally identify the γ GluCys-3MH into Sauvignon B. (Fig. 1).

In addition, we could notice different diastereoisomeric ratios between the natural and the synthesized dipeptide. The synthesized γ GluCys-3MH is racemic (a 50/50 ratio) whereas the natural compound detected in the various musts we analyzed exhibited a different ratio, close to 70/30. This difference could indicate the occurrence of enzymatic mechanisms involved either in the formation or the degradation pathways, with a diastereoisomeric specificity.

3.5. Quantification by stable isotope dilution assay of cysteinylated, cysteinyl-glycine, γ glutamyl-cysteine and glutathionylated precursors of 3MH, and cysteinylated precursor of 4MMP

The results obtained on the 213 samples of Sauvignon B. issued from Muscadet and Languedoc vineyards analyzed are shown in Table 2. Concerning Cys-3MH and G-3MH concentrations, results were consistent with those already reported (Thibon et al., 2016), as well as for CysGly-3MH (Capone et al., 2011). However, the relative concentration of these two compounds is reversed between our study and previous work (Roland, Schneider, Charrier et al., 2011). This difference might come from musts preparation. In fact, in our cases, we used an industrial crushing. Roland et al. study was conducted at laboratory scale with berry grinding. Therefore, the precursors extraction rate might be higher using a grinder than during the industrial press system.

CysGly-3MH and γ GluCys-3MH concentrations were similar in the grape skin contact experiments ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ approximately, combining the two vineyards), and we noticed that CysGly-3MH was more abundant than γ GluCys-3MH in raw must conservation experiments (17 and $7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectively, combining the two vineyards).

For the difference between vineyards, we observed that there is more Cys-4MMP in Muscadet than in Languedoc on the two different experiments. The opposite observation can be formulated for Cys-3MH on grape skin experiment, and γ GluCys-3MH and G-3MH on both experiments. CysGly-3MH concentration was similar in the two vineyards.

4. Conclusion

The synthesis and the analytical method we developed allowed us to formally identify the γ GluCys-3MH in grape must for the first time. The cysteine, cysteinyl-glycine, γ glutamyl-cysteine and glutathione S-conjugates of 3MH were quantified by stable isotope dilution assay in various natural musts by UPLC-MS/MS using a multiple reaction monitoring mode. The levels of these compounds were very different depending on the must origin and the prefermentative experiments, but consistent with the literature data available.

Further studies are needed in order:

- to formally assess the precursor's role of the dipeptide S-conjugates
- to investigate the mechanism of their formation during the prefermentative processes
- to study the emergence of these dipeptides by glutathione degradation, thanks to a double labelling on both the peptide and the conjugated moieties
- and, finally, to confirm the presence of the dipeptide S-conjugates to 4MMP in must.

Acknowledgements

We thank IFV for the scientific and technical support (Amélie Roy, Denis Caboulet, Céline Cartier and Frédéric Charrier). We also thank AEB for the financial support (Dr Arnaud Delaherche and Dr Dorothée Maurel). This study was financially supported by a state grant (HB) from ANRT (CIFRE N° 2015/0690).

References

- Capone, D. L., Pardon, K. H., Cordente, A. G., & Jeffery, D. W. (2011). Identification and quantitation of 3-S-cysteinylglycinehexan-1-ol (Cysgly-3-MH) in Sauvignon Blanc grape juice by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 11204–11210.
- Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J. N., & 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 Journal*, 10, 385–392.
- Duhamel, N., Piano, F., Davidson, S. J., Larcher, R., Fedrizzi, B., & Barker, D. (2015). Synthesis of alkyl sulfonic acid aldehydes and alcohols, putative precursors to important wine aroma thiols. *Tetrahedron Letters*, 56(13), 1728–1731.
- Fedrizzi, B., Guella, G., Perenzoni, D., Gasperotti, M., Masuero, D., Vrhovsek, U., et al. (2012). Identification of intermediates involved in the biosynthetic pathway of 3-mercaptohexan-1-ol conjugates in yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Phytochemistry*, 77, 287–293.
- Fedrizzi, B., Pardon, K. H., Sefton, M. A., Elsey, G. M., & Jeffery, D. W. (2009). First identification of 4-S-glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a potential precursor of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon Blanc juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 991–995.
- Grzaniak, A., Martin, M. N., Hell, R., & Meyer, A. J. (2007). γ -Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in Arabidopsis. *Letters*, 581, 3131–3138.
- Harsch, M. J., Benkowitz, F., Frost, A., Colonna-Ceccaldi, B., Gardner, R. C., & Salmon, J. M. (2013). New precursor of 3-mercaptohexan-1-ol in grape juice: thiol-forming potential and kinetics during early stages of must fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(15), 3703–3713.
- Kobayashi, H., Takase, H., Kaneki, K., Tanzawa, F., Takata, R., Suzuki, S., & Konno, K. (2010). Analysis of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione and S-3-(Hexan-1-ol)-l-cysteine in *Vitis vinifera* L. cv. Koshu for aromatic wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61, 176–185.
- Peyrot Des Gachons, C., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2002). Sulfur Aroma Precursor Present in S-glutathione Conjugate Form: Identification of S-3-(Hexan-1-ol)-glutathione in Must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 14, 4076–4079.
- Pinu, F. R., Jouanneau, S., Nicolau, L., Gardner, R. C., & Villas-Boas, S. G. (2012). Concentrations of the volatile thiol 3-mercaptohexan-1-ol in Sauvignon Blanc wines: no correlation with juice precursors. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63, 407–412.
- Roland, A., Cavelier, F., & Schneider, R. (2012). How organic and analytical chemistry contribute to knowledge of the biogenesis of varietal thiols in wine. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27, 266–272.
- Roland, A., Deplech, S., Dagan, L., Ducasse, M.-A., Cavelier, F., & Schneider, R. (2016). Innovative analysis of 3-mercaptohexan-1-ol, 3-mercaptohexylacetate and their corresponding disulfides in wine by Stable Isotope Dilution Assay and nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1468, 154–163.
- Roland, A., Schneider, R., & Cavelier, F. (2011a). Varietal thiols in wine: discovery, analysis and applications. *Chemical Reviews*, 111, 7355–7376.
- Roland, A., Schneider, R., Charrier, F., Cavelier, F., Rossignol, M., & Razungles, A. (2011b). Distribution of varietal thiol precursors in the skin and the pulp of Melon B. and Sauvignon Blanc grapes. *Food Chemistry*, 125(1), 139–144.
- Roland, A., Schneider, R., Guernevé, C., Razungles, A., & Cavelier, F. (2010a). Identification and quantification by LC-MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chemistry*, 121(3), 847–855.
- Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Le Guerneve, C., & Cavelier, F. (2010b). Straightforward synthesis of deuterated precursors to demonstrate the biogenesis of aromatic thiols in wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58(19), 10684–10689.
- Roland, A., Vialaret, J., Moniatte, M., Rigou, P., Razungles, A., & Schneider, R. (2010c). Validation of a nanoliquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the identification and the accurate quantification by isotopic dilution of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in white grape juices. *Journal of Chromatography A*, 1217(10), 1626–1635.
- Schneider, R., Charrier, F., Razungles, A., & Baumes, R. (2006). Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wines. *Analytica Chimica Acta*, 563, 58.
- Thibon, C., Bocker, C., Shinkaruk, S., Moine, V., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2016). Identification of S-3-(hexanal)-glutathione and its bisulfite adduct in grape

- juice from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc as new potential precursors of 3SH. *Food Chemistry*, 199, 711–719.
- Tominaga, T., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (1996). Identification of 3-mercaptohexyl acetate in Sauvignon wine, a powerful aromatic compound exhibiting box-tree odor. *Vitis*, 35, 207–210.
- Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (1997). Identification of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one from the box tree (*Buxus sempervirens* L.) and broom (*Sarothamnus scoparius* (L.) Koch). *Flavour and Fragrance Journal*, 12, 373.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5215–5219.
- Wolf, A. E., Dietz, K. J., & Schrödes, P. (1996). Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *Letters*, 384, 31–34.

CHAPITRE 2 | Mécanismes d'inter-conversion des précurseurs au cours de la fermentation alcoolique – Étude de la biogenèse des thiols variétaux en conditions œnologiques

Ce deuxième chapitre s'intéresse aux mécanismes d'inter-conversion des précurseurs S-conjugués dérivés de la cystéine, et de façon plus générale, à la biogenèse des thiols variétaux en conditions œnologiques. Parmi les voies de biogenèse du 3MH ou de la 4MMP déjà identifiées, une grande partie de l'origine de ces thiols variétaux reste inexpliquée. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux formes dipeptidiques potentiellement issues du glutathion S-conjugués. À travers une expérimentation de filiation sur moût, nous avons montré la libération des thiols variétaux à partir de 4 nouveaux précurseurs. De plus, nous avons mis en évidence les inter-conversions entre les différentes formes de précurseurs dans des conditions œnologiques définies.

1. Voies de biogénèse des thiols variétaux dans les vins

Plusieurs voies de biogénèse sont impliquées dans la formation du 3MH. Ils impliquent des précurseurs de 3MH comme le Cys-3MH, le G-3MH et le G-3MHAI (V. Ferreira, *et al.*, 2002; Murat, *et al.*, 2001b; Thibon, *et al.*, 2016), ou l'(E)-hex-2-èneal (Schneider, *et al.*, 2006). D'après la littérature, les rendements de conversion pour les précurseurs glutathionylés et cystéinylés sont du même ordre de grandeur (rendement molaire compris entre 0,06 et 0,8 %) dans des moûts synthétiques, mais peuvent atteindre 4,4 % dans un moût de Sauvignon blanc (Masneuf, *et al.*, 2002; Murat, *et al.*, 2001a; Roland, 2011). Les levures hybrides semblent capables de révéler les thiols de manière plus efficace que la plupart des *Saccharomyces cerevisiae* non croisées (3,9 à 10,9 %) (Masneuf, *et al.*, 2002). À ce jour, la formation du 3MH dans les vins résulte de diverses voies de biogénèse listées ci-dessous par ordre chronologique d'identification, qui contribuent à expliquer entre 17 et 21% de l'origine du 3MH :

- l'(E)-hex-2-èneal : 10 % (Schneider, *et al.*, 2006) ;
- le Cys-3MH : 3-7 % (Subileau, *et al.*, 2008) ;
- le G-3MH : 3 % (Roland, *et al.*, 2010b) ;
- le G-3MHAI et le G-3MH-SO₃ : 1 % (Thibon, *et al.*, 2016).

Deux précurseurs de la 4MMP ont été identifiés dans le moût. Le premier est le Cys-4MMP, avec un rendement de conversion estimé à 0,46 % dans le Sauvignon blanc (Subileau, 2008; Tominaga, *et al.*, 1998b). Ensuite, le G-4MMP a été identifié comme précurseur avec un rendement de conversion de 0,3 %. Ainsi, le G-4MMP pourrait expliquer environ 20% de l'origine de la 4MMP quantifiée dans un vin de Sauvignon blanc (Fedrizzi, *et al.*, 2009; Roland, *et al.*, 2010b). Cependant, on observe que les différentes voies de biosynthèse du 3MH et de la 4MMP identifiées ne permettent d'expliquer qu'une partie, de l'ordre de 20 %, de l'origine de ces thiols variétaux. En outre, il a été récemment prouvé que des précurseurs résiduels pouvaient persister après la FA du Merlot, du Sauvignon blanc, du Chardonnay, du Pinot Gris et du Riesling (Capone, *et al.*, 2011b; Concejero, *et al.*, 2016; Grant-Preece, *et al.*, 2010; Jeffery, 2016). Les rendements de conversion calculés dans la littérature ne prennent pas en compte ces précurseurs résiduels, se basant uniquement sur les précurseurs initiaux en début de FA.

En vue d'étudier et de mieux expliquer l'origine des thiols variétaux, les objectifs sont :

- d'identifier de nouveaux précurseurs, en particulier les formes dipeptidiques S-conjuguées au 3MH (CysGly-3MH et γ GluCys-3MH) ou à la 4MMP (CysGly-4MMP et γ GluCys-4MMP), et d'établir d'éventuelles inter-conversions entre les différents précurseurs.
- de déterminer la cinétique de métabolisation des précurseurs lors de la FA et de quantifier les précurseurs résiduels pour prendre en compte cette donnée dans le calcul des rendements de conversion, habituellement basés sur la teneur des précurseurs avant la FA, sans tenir compte de la quantité de précurseurs résiduels.

Pour répondre à ces objectifs, une expérimentation de filiation sur moût a été mise en place (**Figure 12**). Le principe est d'enrichir un moût avec des composés marqués isotopiquement afin de les distinguer de ceux qui sont naturellement présents dans le moût. Pour bien différencier l'origine des thiols variétaux et établir les mécanismes de dégradation des différents précurseurs, nous avons séparé le moût en 3 modalités de 3 réplicats, avec l'ajout des :

- 1) γ GluCys S-conjugués marqués ;
- 2) CysGly S-conjugués marqués ;
- 3) glutathionylés S-conjugués marqués.

Les deux premières modalités permettent d'établir l'éventuel rôle de précurseur des dipeptides, direct, ou indirect, par leur dégradation en conjugués de la cystéine. La dernière modalité nous permet notamment de savoir si les dipeptides S-conjugués peuvent provenir des glutathionylés S-conjugués. Ensuite, nous avons suivi la cinétique de formation et de disparition des composés marqués dans des réacteurs d'un litre au cours de la FA. Les composés marqués sont dosés avec la méthode d'analyse développée pendant la thèse. Les thiols variétaux marqués et leurs formes oxydées sont dosés suivant une méthode d'analyse précédemment développée au sein du même laboratoire (Roland, *et al.*, 2016a).

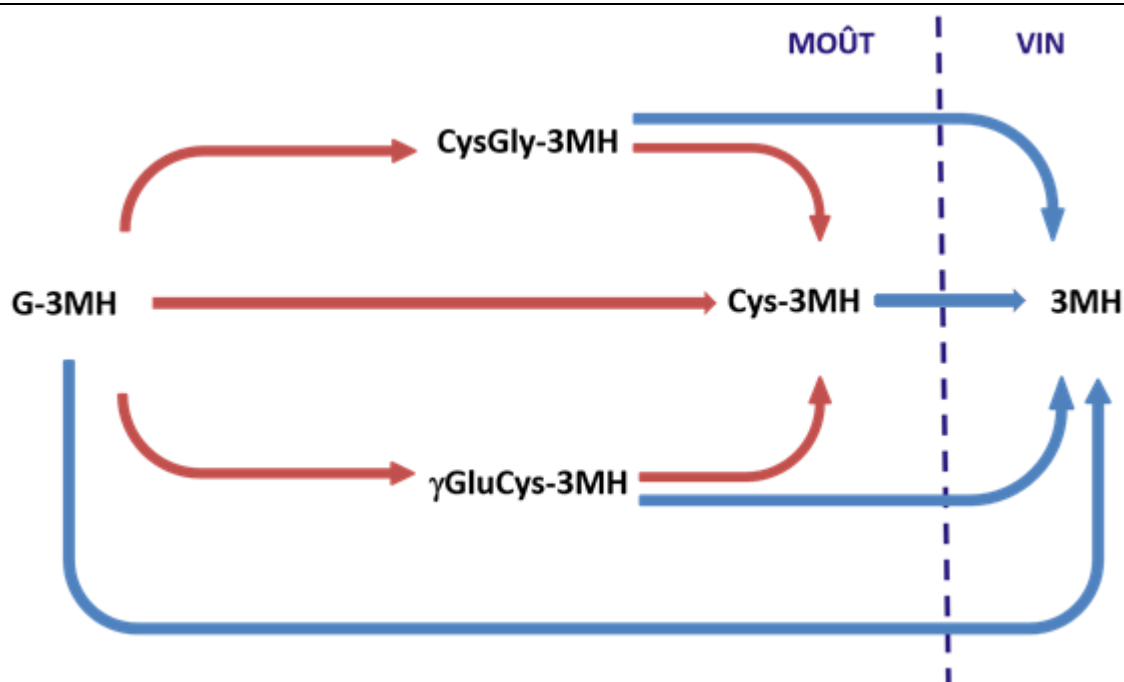


Figure 12 | Etude des mécanismes d'(inter)conversion des précurseurs du 3MH. Les flèches rouges représentent les mécanismes de dégradation. Les flèches bleues représentent les mécanismes de libération du 3MH.

Nous avons également testé deux levures *Saccharomyces cerevisiae* différentes à travers une deuxième expérimentation de filiation sur moût afin d'évaluer l'influence de la levure sur la libération de thiols variétaux dans le vin.

Les résultats sont résumés dans le paragraphe suivant.

L'expérimentation de filiation sur moût nous a permis de mettre en évidence fois 2 nouveaux précurseurs formellement identifiés : les dipeptides S-conjugués au 3MH. En ce qui concerne les dipeptides S-conjugués à la 4MMP, leur rôle de précurseur a bien été démontré dans cette expérimentation, mais leur identification dans un moût de Sauvignon blanc reste à l'étude. Ensuite, à travers les différentes inter-conversions des précurseurs analysés (G-3MH- d_i , G-4MMP- d_i , γ GluCys-3MH- d_i , γ GluCys-4MMP- d_i , CysGly-3MH- d_i , CysGly-4MMP- d_i , Cys-3MH- d_i et Cys-4MMP- d_i), nous avons mis en évidence que :

- les CysGly S-conjugués au 3MH- d_i et 4MMP- d_i peuvent être dégradés en leur cystéinylé S-conjugué correspondant en tant qu'intermédiaire ;
- le γ GluCys-3MH- d_i est un précurseur direct du 3MH- d_i ;
- le γ GluCys-4MMP- d_i est probablement dégradé en métabolites non identifiés, libérant la 4MMP- d_i par la suite au cours de la FA ;

- le G-3MH-d_i peut être dégradé en γ GluCy-3MH-d_i, et dans une moindre mesure en Cys-3MH-d_i.

Pour finir, une deuxième expérimentation de filiation sur moût, nous a permis de montrer qu'il n'existe aucune influence significative entre deux souches de levure commerciales (VIN13 et Esperide), quant au rendement de conversion du G-3MH-d_i et de la G-4MMP-d_i. En complément, il serait intéressant de suivre d'autres composés présents dans le moût (lipides, acides aminés, peptides, ...) qui pourraient également influencer les rendements de conversion des précurseurs et favoriser la révélation des thiols variétaux.

L'ensemble des résultats de ce chapitre a fait l'objet d'une publication parue dans *Food Chemistry* en 2018 intitulée : *Revisiting the evaluation strategy of varietal thiol biogenesis*.

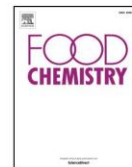
2. Article 2 : *Revisiting the evaluation strategy of varietal thiol biogenesis*



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Revisiting the evaluation strategy of varietal thiol biogenesis

Hugo Bonnaffoux^a, Stéphane Delpech^b, Emmanuelle Rémond^c, Rémi Schneider^{a,1}, Aurélie Roland^{b,1}, Florine Cavelier^{c,*}

^a Institut Français de la Vigne et du Vin, INRA-UMR-SPO, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

^b NYSEOS, 53 rue Claude François, ZA Parc 2000, 34080 Montpellier, France

^c Institut des Biomolécules Max Mousseron, IBMM, UMR 5247, CNRS, Université Montpellier, ENSCM, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France



ARTICLE INFO

Keywords:

Varietal thiols
Precursors
3MH
4MMP
Alcoholic fermentation

ABSTRACT

The varietal thiols 3-mercaptohexan-1-ol (3MH), 3-mercaptohexyl acetate (3MHA), and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP) are key aroma compounds in wine due to the tropical notes they impart. They are released by yeast during alcoholic fermentation from different precursors. However, a large part of 3MH origin remains unknown. In this study, we focused on dipeptide forms arising from glutathione *S*-conjugates to 3MH and 4MMP. Using labelled tracers, we showed in spiked must the release of varietal thiols from 4 different compounds. We highlighted the interconversion between different forms of precursors under defined enological conditions. Cysteinyl-glycine *S*-conjugates are partially degraded into cysteine *S*-conjugates, contrary to γ -glutamyl-cysteine *S*-conjugates. Glutathione *S*-conjugate to 3MH can be partially degraded to γ -glutamyl-cysteine *S*-conjugate to 3MH. For the first time, all these labeled forms of precursors were found to release 3MH or 4MMP between 0.17 and 1% molar conversion yield. Two different yeasts were compared without any significant difference.

1. Introduction

Several polyfunctional thiols contribute to wine aroma but three of them, also called varietal thiols, have been especially studied since their contribution to the characteristic notes of Sauvignon blanc are of great interest (Roland, Schneider, & Cavelier, 2011). 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP) exhibits box tree and blackcurrant buds notes and 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) and its corresponding acetate are responsible for grapefruit and passion fruit aroma respectively (Roland et al., 2011). These thiols are mainly released by yeast during alcoholic fermentation (AF) from flavorless precursors (Peña-Gallego, Hernández-Orte, Cacho, & Ferreira, 2012; Roland et al., 2011) but could also be present at very low levels in Australian Sauvignon blanc grapes as recently shown by Capone and co-workers (Capone, Sefton, & Jeffery, 2012). Two types of precursors can be differentiated: compounds whose role as precursor has been demonstrated, and compounds that have been identified in must as potential varietal thiol precursors without relationship evidence.

1.1. Compounds with proven roles as precursors

1.1.1. 3MH precursors

Only Subileau's work using a labeled analogue of Cys-3MH (Fig. 1)

makes it possible to accurately estimate the molar conversion yield of 3MH (0.48–0.81%) under natural conditions with Sauvignon blanc must (Subileau, Schneider, Salmon, & Degryse, 2008). According to these values, only 5 to 7% of 3MH produced in Sauvignon blanc wines come from Cys-3MH. The glutathione *S*-conjugate conversion to 3MH (G-3MH) (Fig. 1) was also studied under natural and synthetic conditions. In a Sauvignon blanc must spiked with G-3MH-d_{2,3}, the conversion yield reaches 4.4% (Roland, Schneider, Razungles, Le Guernevé, & Cavelier, 2010), corresponding to 3.3% of the total 3MH produced. Under synthetic conditions, different results have been obtained ranging from 0.6 to 3% (Grant-Preece et al., 2010; Roland, Schneider, Le Guernevé, Razungles, & Cavelier, 2010). In contrast, the (*E*)-2-hexenal pathway measured with a deuterated tracer ((*E*)-2-hexenal-d₈) can account for up to 10% of total production of 3MH in the case of Melon blanc (Schneider, Charrier, Razungles, & Baumes, 2006). (*E*)-2-hexenol could acts as thiol precursor first being converted to (*E*)-2-hexenal by yeast under particular conditions (using sodium hydrosulfide as nucleophilic reagent), distant from usual enological practices (Harsch et al., 2013). Glutathione *S*-conjugate to 3-mercaptohexanal (G-3MHAL) and its bisulfite adduct (G-3MH-SO₃) were also considered as precursors with a conversion yield between 0.4 and 0.8% starting from G-3MHAL under synthetic conditions (Thibon et al., 2016).

* Corresponding author.

E-mail address: florine.cavelier@umontpellier.fr (F. Cavelier).

¹ These authors contributed equally to this study.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.061>

Received 13 December 2017; Received in revised form 1 June 2018; Accepted 12 June 2018

Available online 15 June 2018

0308-8146/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1

Initial concentration of natural precursors, spiking levels in the must before AF, and standard additions levels of deuterated precursor concentrations added in samples for measuring the quantity of deuterated precursors by standard additions method.

	Initial concentrations in natural precursors (nmol.L ⁻¹)	yGluCys trial (nmol.L ⁻¹)			CysGlytrial (nmol.L ⁻¹)			Glutathionyl trial (nmol.L ⁻¹)		
		Spiking	Standard addition 1	Standard addition 2	Spiking	Standard addition 1	Standard addition 2	Spiking	Standard addition 1	Standard addition 2
Cys-3MH-d _i	0	0	67.4	134.8	0	67.8	135.6	0	112.4	224.8
Cys-3MH	465	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cys-4MMP-d _i	0	0	68.4	136.8	0	68.8	137.6	0	112.7	225.4
Cys-4MMP	1.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CysGly-3MH-d _i	0	0	22.1	44.2	1865	317.7	635.4	0	126.5	253.0
CysGly-3MH	57	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CysGly-4MMP-d _i	0	0	22	0	1571	315.7	631.4	0	125.7	251.4
CysGly-4MMP	N.D. ¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0
yGluCys-3MH-d _i	0	1418	257.5	515.0	0	15.5	31.0	0	115.9	231.8
yGluCys-3MH	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
yGluCys-4MMP-d _i	0	1850	256.2	512.4	0	15.4	30.8	0	117.8	235.6
yGluCys-4MMP	N.D.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-3MH-d _i	0	0	17.1	34.2	0	17.2	34.4	1429	244.3	488.5
G-3MH	1053	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-4MMP-d _i	0	0	17	34	0	17.1	34.2	1010	243.1	486.2
G-4MMP	N.D.	0	0	0	0	0	0	0	0	0

The **bold** values correspond to the concentration of the *S*-conjugate labeled compounds added in the must before AF. Quantification of all *S*-conjugate precursors was carried out by standard additions method. Samples were spiked with a solution of a deuterated precursor mixed in water (Standard addition 1 and 2).

¹ N.D.: Not Detected.

1.1.2. 4MMP precursors

Two 4MMP precursors were formally identified in must. The first one is Cys-4MMP (Fig. 1) with a molar conversion yield of 4MMP estimated at 0.46% under natural conditions with Sauvignon blanc grape variety (Subileau, 2008; Tominaga, Peyrot des Gachons, & Dubourdiu, 1998). The second one is G-4MMP (Fig. 1) with a molar conversion yield of 4MMP estimated at 0.3% under laboratory conditions using a Sauvignon blanc grape juice (Fedrizzi, Pardon, Sefton, Elsey, & Jeffery, 2009; Roland et al., 2010). Thus, the conversion of G-4MMP into thiol by yeast could explain about 20% of 4MMP quantified in Sauvignon blanc wines.

1.2. Compounds identified in must without evidenced precursor role

Cysteinyl-glycine *S*-conjugate to 3MH (CysGly-3MH) was identified for the first time in Australian Sauvignon blanc must (Capone, Pardon, Cordente, & Jeffery, 2011) and γ -glutamyl-cysteine *S*-conjugate to 3MH (γ GluCys-3MH) was identified in different pre-fermentative and fermentative experiments (Bonnefoux et al., 2017). These two compounds were hypothesized as intermediates between the two former precursors, in the degradation pathway from G-3MH to Cys-3MH.

However, the three biosynthesis pathways formally identified (cysteine *S*-conjugates, glutathione *S*-conjugates, and hexenal pathway) cannot explain the entire thiol (3MH and 4MMP) formation in wines. Indeed, the theoretical amount of thiols formed by these pathways, calculated from the precursor levels, is much lower than the amount of thiols actually found in the corresponding wines (Pinu, Jouanneau, Nicolau, Gardner, & Villas-Boas, 2012; Roland et al., 2010). In addition, it has been recently proven that residual precursors (RP) could persist after Merlot, Sauvignon blanc, Chardonnay, Pinot Gris and Riesling AF (Capone, Sefton, & Jeffery, 2011; Concejero et al., 2016; Grant-Preece et al., 2010; Jeffery, 2016). The conversion yields of varietal thiol precursors calculated for Sauvignon blanc musts do not taken into account RP. For these reasons, we revisited the evaluation strategy for

biogenesis of varietal thiols by:

- suspecting other compounds based on the glutathione moiety to be involved in thiol formation and especially dipeptide forms we previously identified in must: cysteinyl-glycine *S*-conjugate to 3MH and 4MMP (CysGly-3MH and CysGly-4MMP) and γ -glutamyl-cysteine *S*-conjugate to 3MH and 4MMP (γ GluCys-3MH and γ GluCys-4MMP).
- establishing kinetics of precursors during AF and quantifying amount of RP to highlight different conversion yields since they are underestimated by neglecting this data. Usually, conversion yields are based on the initial precursors, without taking into account the RP of AF. We will distinguish between these two types of conversion yields: initial precursors and consumed precursors.

In this study, we used deuterated cysteinyl-glycine *S*-conjugates and γ -glutamyl-cysteine *S*-conjugates to 3MH and 4MMP, as well as glutathione *S*-conjugates to 3MH and 4MMP in must filtration experiments to investigate interconversion between precursors. We also tested two different *Saccharomyces cerevisiae* yeasts during AF to evaluate the influence of yeast on the release of varietal thiols in wine.

2. Material and methods

2.1. Synthesis of labelled thiol precursors

Glutathione *S*-conjugates to 3MH and 4MMP (G-3MH and G-4MMP), cysteinyl-glycine *S*-conjugates to 3MH and 4MMP (CysGly-3MH and CysGly-4MMP) and γ -glutamyl-cysteine *S*-conjugates to 3MH and 4MMP and their deuterated analogues were already synthesized following the procedures described (Bonnefoux et al., 2017; Roland et al., 2010).

2.2. Precursor relationships experiment in wine

Fermentations were conducted at laboratory scale in 1 L reactors under enological conditions using a Sauvignon blanc must from Languedoc vineyard, which had the following composition: yeast assimilable nitrogen (YAN): 240 mg·L⁻¹, sugar: 202 g·L⁻¹, turbidity: 100 NTU. Temperature was maintained at precisely 20 °C.

Two experimental sets were performed as follows:

Set 1. The initial must was divided into three experimental batches (Table 1).

Each batch, was inoculated with Esperide as yeast strain at 20 g·hL⁻¹. Fermentation was monitored by the amount of CO₂ released. Nine samples were collected all along AF to analyze thiols and their precursors. AF progress (%) and duration (h) are listed below: S1 = 0%, 0 h (h); S2 = 8%, 15 h; S3 = 12%, 23 h; S4 = 22%, 42 h; S5 = 26%, 48 h; S6 = 37%, 69 h; S7 = 49%, 92 h; S8 = 75%, 140 h; S9 = 100%, 187 h.

Set 2. A supplementary must filtration experiment was conducted under the same fermentation conditions as Set 1 but, in this case, the initial must was split in two batches, inoculated with two different yeasts (Esperide and VIN13) to compare their conversion abilities. Each experiment was performed in triplicate and spiked with G-3MH-d_{1,2} (1423 nmol·L⁻¹) and G-4MMP-d_{6,9} (1692 nmol·L⁻¹).

Samples were collected at the starting point to analyze thiol precursors and at the end of fermentation to analyze thiol precursors and varietal thiols as follow:

- For precursors analysis, samples were stored at -20 °C with an addition of benzenesulfonic acid sodium salt (1 mg·mL⁻¹ of wine) and sodium metabisulfite (4.5 mg·mL⁻¹ of wine).
- For varietal thiols analysis, samples were stabilized at -20 °C with an addition of sodium metabisulfite (0.1 mg·mL⁻¹ of wine).

2.3. Analysis by UPLC-MS/MS

The presence of deuterium on enolizable positions (Fig. 1) forces us to take into account all isotopomers for 4MMP precursors (d_{6,9}). In fact, we observed that in our mix of deuterated S-conjugates, there is no presence of d₁₀. For clarity and visibility, we will substitute d_{6,9} by d_i, with “i” relating to the population of all deuterated isotopomers. Concerning 3MH precursors, the presence of a stable mixture of d₁ and d₂ does not cause any problems of quantification. In fact, the last step of the 3MH S-conjugates synthesis is a reduction of the aldehyde into alcohol. Protons are still exchangeable in the aldehyde form and stable in the alcohol form. For the same reason, we will substitute d_{1,2} by d_i.

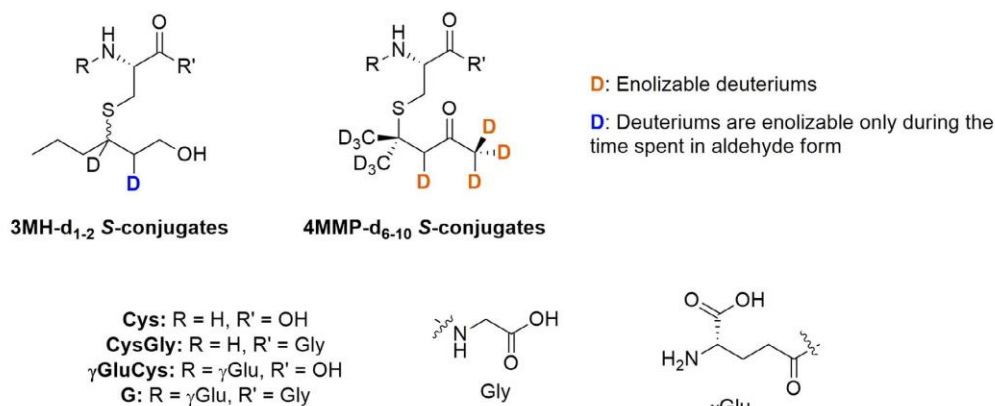


Fig. 1. Chemical structures of 3MH-d_{1,2} and 4MMP-d_{6,10} S-conjugates.

2.3.1. Thiol precursors analysis

The fermentative degradation kinetics of varietal thiol precursors were carried out by UPLC-MS/MS according to the method already published (Bonnaffoux et al., 2017). Quantification was carried out by standard additions method as detailed in Table 1.

2.3.2. Varietal thiols analysis

- Analysis of 3MH-d_i, 3MHA-d_i and their corresponding sulfur compounds (called hidden 3MH) such as disulfides that can be reduced to free thiol were analyzed according to a published method (Roland et al., 2016), using 3MHA-d₅ as unique internal standard for both 3MH-d_i and 3MHA-d_i analysis. Analysis of 4MMP-d_i was performed according to a published method (Capone, Ristic, Pardon, & Jeffery, 2015) and 4MMP-d₁₀ was used as internal standard for 4MMP-d_i analysis. Total 3MH, corresponding to free 3MH and hidden 3MH, was analyzed only at the end of AF. Since the conversion yields were calculated at the end of AF, it was not necessary to compare the difference between free 3MH and total 3MH during all AF. In fact, our interest for this study was to use the total 3MH data for conversion yields elucidation only.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of Sauvignon blanc must and wine used for precursor relationship experiments

Sauvignon blanc must used for relationship experiments was analyzed using our analytical method and results are presented in Table 1. All thiol precursor concentrations are consistent with literature with levels ranging from dozens of μg·L⁻¹ for most of precursors to few hundreds of μg·L⁻¹ for G-3MH especially (Bonnaffoux et al., 2017; Peña-Gallego, Hernández-Orte, Cacho, & Ferreira, 2012).

To quantify all deuterated isotopomers of each tracer, a standard additions strategy was the best way to avoid all analytical bias and matrix effect. To be significant, we spiked our samples with synthetic thiol precursors at higher levels than natural ones to be able to detect the formation of intermediates even at low concentration. Standard additions of precursors allowed us to know the initial concentration value corresponding to the x-axis, when y = 0.

Concerning the obtained experimental Sauvignon blanc wines, we quantified the amount of natural 3MH and hidden 3MH (11.16 nmol·L⁻¹) and 4MMP (0.06 nmol·L⁻¹) using the same internal standard as their deuterated analogues (3MHA-d₅ and 4MMP-d₁₀ respectively). The hidden 3MH can represent until 73% (data c1 on Fig. 2) of total 3MH (hidden 3MH + free 3MH), depending on the trial

considered (CysGly-3MH, γ GluCys-3MH or G-3MH), which highlighted the importance of considering the hidden 3MH populations for the conversion yield calculation, especially in small volumes experiments where oxidation management remains an issue. For 4MMP, no operational method has been published to have access to this crucial information and should be of interest for enological field.

3.2. Study of the relationship experiments in wine

The principle of the relationship experiment is to trace the evolution of compounds during fermentation to quantify them (here glutathione *S*-conjugates, cysteinyl-glycine *S*-conjugates or γ -glutamyl-cysteine *S*-conjugates transformed into 3MH or 4MMP), and their suspected intermediates resulting from degradation. Such experiments have demonstrated the relationship between precursors and varietal thiols in wine. They also allowed identification of varietal thiols release mechanisms and degradation mechanisms under enological standard conditions (Fig. 2).

In order to take into account the presence of RP and all possible forms of 3MH at the end of AF, we decided to calculate the conversion yield based on both the consumed precursors and the hidden 3MH. Thereby, those conversion yields constitute an alternative approach than what have been presented in the past. In fact, Roland *et al.* developed a method to analyze the total amount of 3MH, including its disulfide forms (Roland *et al.*, 2016), but other forms of 3MH (trisulfanes or higher order *S-S* compounds for examples) could be released after treatment with *tris*(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP). In fact, up to now, there is no evidence that only disulfide forms are reduced with TCEP. In addition, various sulfur compounds such as H₂S or methanethiol are releasable not only from disulfide forms (Chen, Jastrzebski, & Sacks, 2017; Jastrzebski, Allison, Friedberg, & Sacks, 2017; Kreitman, Danilewicz, Jeffery, & Elias, 2017; Starkenmann, Chappuis, Niclass, & Deneulin, 2016). In Sections 3.3.1–3.4.4, we will differentiate yield of conversion with and without RP to illustrate our statement. It is interesting to note the increased concentration of G-3MH was observed in one trial only during AF of Merlot (Concejero *et al.*, 2016), and in three commercial musts during AF of Sauvignon blanc or Riesling (Capone *et al.*, 2011). In these cases, it is important to use residual precursors to determine conversion yields. This increase of G-3MH could come from G-3MHAl and G-3MH-SO₃. In fact, during AF, G-3MHAl are reduced in G-3MH, and it exists an equilibrium between G-3MH and its bisulfite adduct (Thibon *et al.*, 2016). This “formation” of precursors would not be accounted using isotopic tracers of precursors themselves but might be involved in thiol biogenesis and might be accounted using labelled of G-3MHAl and G-3MH-SO₃ as tracers in the must. However, Concejero *et al.* and Capone *et al.* observed these increases in only few cases. In our experiment, we observed a decrease of G-3MH during AF (Fig. 2). This observation should not be a limit for our study of the precursor relationship experiments.

3.3. 3MH biogenesis

3.3.1. CysGly trial

The objective of this trial was to highlight CysGly *S*-conjugate degradations into cysteine *S*-conjugates and the release of varietal thiols. For this purpose, we spiked the Sauvignon blanc must with CysGly-3MH-d₁ and CysGly-4MMP-d₁ and we inoculated the must with Esperide. During the AF, we aliquoted samples for precursors and varietal thiols analyses.

3.3.1.1. 3MH-d₁ precursors analysis. During AF, CysGly-3MH-d₁ was quickly consumed during the exponential phase and 52% of CysGly-3MH-d₁ was degraded into Cys-3MH-d₁ (54% yield considering CysGly-3MH-d₁ consumed only), since 963 nmol·L⁻¹ of Cys-3MH-d₁ was observed starting from 1865 nmol·L⁻¹ of CysGly-3MH-d₁.

3.3.1.2. 3MH-d₁ and its hidden forms analysis. Presence of 3MH-d₁ and its hidden forms was observed in resulting wines with 0.17% of conversion yield starting from CysGly-3MH-d₁ (same yield considering CysGly-3MH-d₁ consumed only). Concerning 3MH hidden forms, we performed two thiol analyses per sample: first we measured 3MH directly present in wine. In the second analysis, we measured thiols again after a reduction procedure allowing the release of 3MH from its hidden forms. Quantities of analyzed 3MH were the same before and after the reduction procedure, attesting the absence of production of 3MH from hidden forms.

3.3.2. γ GluCys trial

3.3.2.1. 3MH-d₁ precursors analysis. The consumption of γ GluCys-3MH-d₁ was late and slow in contrast with CysGly *S*-conjugates consumption. Furthermore, no Cys-3MH-d₁ was observed.

3.3.2.2. 3MH-d₁ and its hidden forms analysis. The presence of 3MH-d₁ in wine and its corresponding hidden forms was observed with 0.07% yield starting from γ GluCys-3MH-d₁ (0.24% considering γ GluCys-3MH-d₁ consumed only). The presence of labelled 3MH in resulting wines formally demonstrated that γ GluCys-3MH-d₁ was a direct precursor of 3MH, although the conversion yield remained particularly low.

3.3.3. Glutathione modality

3.3.3.1. 3MH-d₁ precursors analysis. For the last assay, we noticed that during AF, 68.3% of the initial G-3MH-d₁ was consumed, including 5%, which was degraded into GluCys-3MH-d₁ (7% yield considering G-3MH-d₁ consumed only) and 7% into Cys-3MH-d₁ (9% yield considering G-3MH-d₁ consumed only).

3.3.3.2. 3MH-d₁ and its hidden forms analysis. The presence of 3MH-d₁ in wine and its corresponding hidden forms was observed with 0.19% yield of conversion starting from G-3MH-d₁ (0.27% yield considering G-3MH-d₁ consumed only), which is lower than Roland *et al.* with VIN13 yeast (Roland *et al.*, 2010).

3.3.4. 3MH precursors overview

The degradation of CysGly *S*-conjugates and G-3MH-d₁ suggests that the yeast could cleave the amide bond between the cysteine and the glycine residues more easily than the bond between the glutamic acid and the cysteine residues. This might be due to the particular peptide bond, which involves the γ -carboxyl function of the glutamic acid (Frackenhohl, Arvidsson, Schreiber, & Seebach, 2001). From the conversion yield of 3MH precursors and their relative amounts found in Sauvignon blanc musts (Bonnefoux *et al.*, 2017), CysGly-3MH and γ GluCys-3MH can each explain 1% of the origin of 3MH, which is a very minor part of 3MH formed. Precursors already identified represent the following contributions towards 3MH without taking into account RP:

- 3% concerning G-3MH (Roland *et al.*, 2010), and under our conditions, taking into account RP up to 25%.
- 3–7% concerning Cys-3MH (Subileau *et al.*, 2008).
- 10% concerning (*E*)-2-hexenal (Schneider *et al.*, 2006).
- Around 1% concerning G-3MHAl and its bisulfite adduct but only under synthetic conditions (Thibon *et al.*, 2016).

Taking into account RP, the 3MH origin is explained up to 27% under our conditions for G-3MH (25%), CysGly-3MH (1%) and γ GluCys-3MH (1%), and at least 45% including Cys-3MH (7%), (*E*)-2-hexenal (10%) and G-3MHAl and its bisulfite adduct (around 1%) even if in these cases we do not have access to the yield calculated taking account of RP. However, proportions could be different under different experimental conditions (type of must, fermentation condition, yeast). The advantage of using labeled precursors is that they do not occur in natural musts, but they have the same properties (ionization behavior, retention time, etc.) as the natural precursors and can be distinguished

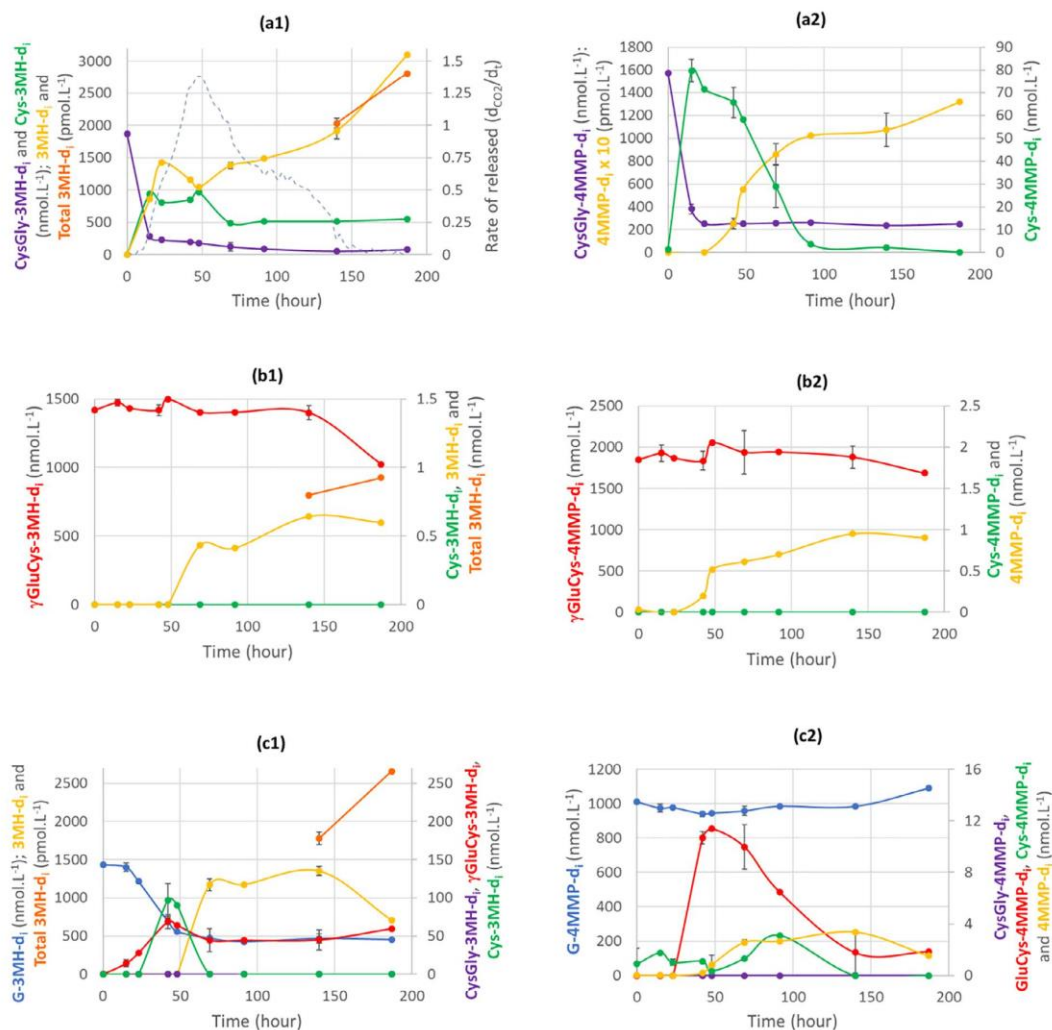


Fig. 2. (a1) Kinetics of CysGly-3MH- d_1 consumption, release of Cys-3MH- d_1 and release of 3MH- d_1 and its hidden forms during AF; (a2) kinetics of CysGly-4MMP- d_1 consumption, release of Cys-4MMP- d_1 and release of 4MMP- d_1 during AF; (b1) kinetics of γ GluCys-3MH- d_1 consumption and release of 3MH- d_1 and its hidden forms during AF; (b2) kinetics of γ GluCys-4MMP- d_1 consumption and release of 4MMP- d_1 during AF; (c1) kinetics of G-3MH- d_1 consumption and release of 3MH- d_1 and its hidden forms during AF; (c2) Kinetics of G-4MMP- d_1 consumption and release of 4MMP- d_1 during AF.

Table 2

Conversion yields of 3MH and 4MMP precursors in Sauvignon Blanc at 20 °C using Esperide as strain yeast.

Precursors	Conversion yield % (RP account)
CysGly-3MH	0.17 (0.17)
γ GluCys-3MH	0.07 (0.24)
G-3MH	0.19 (0.27)
CysGly-4MMP	0.84 (1.00)
γ GluCys-4MMP	0.05 (-)
G-4MMP	0.33 (-)

by the characteristic mass shift (Roland, Cavelier, & Schneider, 2012). It is interesting to consider the two approaches for the calculation of the conversion yields (Table 2):

- The first one based on the initial quantity of precursors is more convenient for a technological approach.

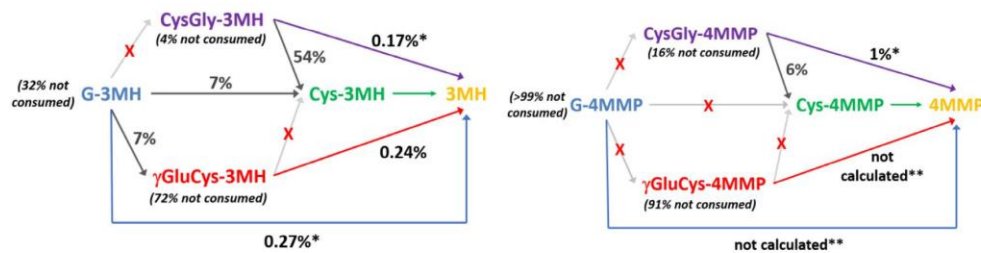
- The second one, based on the consumed precursors only, is more related to a biogenesis by yeast and related to its metabolism.

3.4. 4MMP biogenesis

3.4.1. CysGly trial

3.4.1.1. 4MMP- d_1 precursors analysis. The same remarks can be applied for CysGly-4MMP- d_1 , which was quickly consumed during the exponential phase and released about 5% of Cys-4MMP- d_1 (6% yield considering CysGly-4MMP- d_1 consumed only). Indeed, 80 nmolL⁻¹ of Cys-4MMP- d_1 was observed starting from 1571 nmolL⁻¹ of CysGly-4MMP- d_1 .

3.4.1.2. 4MMP- d_1 analysis. We observed that 0.84% of CysGly-4MMP- d_1 released 4MMP- d_1 in wine (1% considering CysGly-4MMP- d_1 consumed only). It is interesting to notice that after 23 h of AF, CysGly-4MMP- d_1 was no longer consumed, which corresponds to 16% of the initial CysGly-4MMP- d_1 .



*Conversion yields including direct and indirect release of varietal thiols.

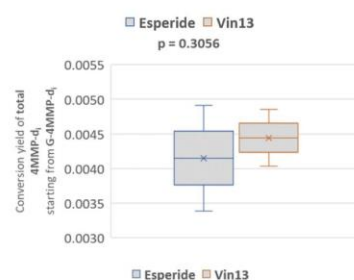
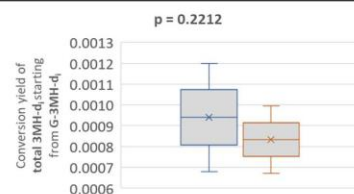
**Not calculated due to the low consumption rate.

Scheme 1. Relationship between precursors derived from cysteinyl *S*-conjugates to 3MH or 4MMP. Conversion yields exhibited include consumed precursors only, that is to say RP are taken into account.

Table 3

Conversion yields of glutathionylated precursors of 3MH and 4MMP in Sauvignon Blanc at 20 °C using VIN13 or Esperide as strain yeasts and from different experiment. RP were not taken into account to be compared with the literature. Box plots exhibits the average, the average \pm standard error and the average \pm standard error*1.96 (1.96 is the *t* value using $\alpha = 0.05$).

Precursor	Yeast	Conversion yield (%)	Experiment
G-3MH	Esperide	0.09 (0.19)	Set 2 (Set 1)
	VIN13	0.08	Set 2
	VIN13	4.4 ^a	
G-4MMP	Esperide	0.41 (0.33)	Set 2 (Set 1)
	VIN13	0.44	Set 2
	VIN13	0.3 ^a	



^a Roland et al. (2010).

3.4.2. γ GluCys trial

3.4.2.1. 4MMP-*d*₁ precursors analysis. Similarly, γ GluCys-4MMP-*d*₁ was consumed slowly and belatedly, and no Cys-4MMP-*d*₁ was observed. Considering the consumption kinetics and the analytical error, it is difficult to demonstrate a consistent degradation of γ GluCys-4MMP-*d*₁ during AF. However, we can assume that this biogenesis pathway is direct, as shown for 3MH.

3.4.2.2. 4MMP-*d*₁ analysis. Finally, 0.05% of γ GluCys-4MMP-*d*₁ released 4MMP-*d*₁ in wine. The consumption of those precursors by the yeast is very low, so it seems not convenient to calculate the yield on consumed amounts, which will be artificially over-evaluated. The formal identification of labelled 4MMP in wines demonstrated that γ GluCys-4MMP-*d*₁ could lead to the corresponding thiol, but at very low amounts. This observation suggested that γ GluCys-4MMP-*d*₁ was probably degraded into unknown metabolites, which opened the avenue for further investigations into such aspects.

3.4.3. Glutathione modality

3.4.3.1. 4MMP-*d*₁ precursors analysis. Unlike dipeptide *S*-conjugates to

3MH-*d*₁ or 4MMP-*d*₁, the consumption of G-4MMP-*d*₁ was different from G-3MH-*d*₁. Almost no consumption of G-4MMP-*d*₁ and no other precursor was observed.

3.4.3.2. 4MMP-*d*₁ analysis. Finally, 0.33% of G-4MMP-*d*₁ released 4MMP-*d*₁ in wine, which is consistent with literature (Roland et al., 2010). The consumption of this compounds by the yeast is very low, so it seems not convenient to calculate the yield on consumed amounts, which will be artificially over-evaluated.

3.4.4. 4MMP precursors overview

Concerning 4MMP precursors, only the kinetics of CysGly-4MMP have the same tendency as 3MH precursors. Up to now, no method allows us to quantify the 4MMP hidden forms (such as disulfides), leading to less accurate data. Concerning literature data, G-4MMP represent 20% of the 4MMP origin generated in Sauvignon blanc wines (Roland et al., 2010). Under our condition, we have to notice that G-4MMP and γ GluCys-4MMP were essentially unconsumed. This fact has never been reported in literature up to now, and remains to be investigated in the future. Under these conditions, calculating the yield

from the very low amounts consumed could lead to confusion and we prefer not to do it, even if 4MMP originated from those few amounts of consumed precursors cannot be considered as artifacts, due to the identical labeling position. In a previous work (Bonnaïffoux et al., 2017), we were not able to detect CysGly-4MMP, γ GluCys-4MMP or G-4MMP in our musts (Sauvignon blanc, Melon blanc and Sancerre). However, the 4MMP dipeptide forms could have a very short lifetime and these ephemerals could not be analyzable in real time (Roland et al., 2012) (Table 2).

3.5. Experiment overview

This must filiation experiment allowed us to prove for the first time that (Scheme 1):

- CysGly S-conjugates to 3MH and 4MMP are precursors and could be degraded into the corresponding cysteinylated S-conjugate as intermediates,
- γ GluCys-3MH is a direct precursor of 3MH,
- γ GluCys-4MMP is probably degraded into unidentified metabolites that lead to 4MMP during AF
- glutathione S-conjugates to 3MH-d₃ could be degraded into γ GluCys-3MH-d₃ and to a lesser extend into Cys-3MH-d₃.

3.5.1. Influence of yeast strains on thiol precursor cleavage during AF (Set 2)

In this second relationship experiment in wine (namely Set 2), we would like to highlight the influence of two different yeasts on thiol precursor cleavage under the same conditions as in Set 1. In this case, the initial must was spiked with G-3MH-d₃ and G-4MMP-d₃, split in two batches and inoculated with Esperide or VIN13. This second experiment allowed us to conclude that there was no significant difference ($p = 0.2212$ for 3MH-d₃ and $p = 0.3056$ for 4MMP-d₃) between the two considered yeasts (Table 3), which is probably due to the similar results (transport of the glutathionylated precursors into the cell and the enzymatic cleavage) for these 2 yeasts tested under similar conditions. There was the same order of magnitude between these results and those presented in Section 3.1, which comforts the reliability of our results. However, there is a difference of the conversion yield of G-3MH between these results and those presented by Roland et al. using the same yeast (Table 3). Therefore, this could be attributable not to yeast but to assimilable nitrogen, which may be different from one must to other. This difference was not observed for the conversion yield of G-4MMP.

4. Conclusion

The must filiation experiment allowed us to elucidate the existence of four new varietal thiol precursors: CysGly-3MH, CysGly-4MMP, γ GluCys-3MH and γ GluCys-4MMP. The yield of conversion depends on enological conditions (YAN, turbidity or temperature for example), especially on the YAN available in the must used for the experiments. Almost half of the 3MH origin could be explicable with these results, versus around 20% previously. We highlight new degradation pathways of precursors derived from cysteine. G-4MMP and γ GluCys-4MMP were almost not consumed, even if this low consumption undoubtedly leads to 4MMP release. In addition, although 4MMP dipeptide forms are not naturally identifiable in Melon Blanc and Sauvignon Blanc musts (Bonnaïffoux et al., 2017), these precursors might be ephemeral intermediates generating 4MMP during AF. Finally, the presence of precursors at the end of fermentation (except for CysGly-3MH, which was completely consumed) might suggest that post-fermentation cleavages could be possible, during aging of wine for example. However, it might be important to consider the amount of initial nitrogen available for the yeast, which could greatly influence the consumption of these newly described precursors, known as a secondary source of nitrogen.

Acknowledgements

We thank INRA for the scientific and technical support (Christian Picou). We also thank AEB, France for the financial support (Coralie Pagani). This study was financially supported by a state grant (HB) from ANRT (CIFRE N° 2015/0690 supported by IFV).

References

- Bonnaïffoux, H., Roland, A., Rémond, E., Delpech, S., Schneider, R., & Cavelier, F. (2017). First identification and quantification of S-3-(hexan-1-ol)- γ -glutamyl-cysteine in grape must as a potential thiol precursor, using UPLC-MS/MS analysis and stable isotope dilution assay. *Food Chemistry*, 237, 877–886.
- Capone, D. L., Pardon, K. H., Cordente, A. G., & Jeffery, D. W. (2011). Identification and Quantitation of 3-S-Cysteinylglycinehexan-1-ol (Cysgly-3-MH) in Sauvignon blanc Grape Juice by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 11204–11210.
- Capone, D. L., Sefton, M. A., & Jeffery, D. W. (2011). Application of a modified method for 3-mercaptohexan-1-ol determination to investigate the relationship between free thiol and related conjugates in grape juice and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4649–4658.
- Capone, D. L., Sefton, M. A., & Jeffery, D. W. (2012). Analytical investigations of wine odorant 3-mercaptohexan-1-ol and its precursors. In M. C. Qian, & T. H. Shellhammer (Eds.). *Flavor Chemistry of Wine and Other Alcoholic Beverages* (pp. 15–35). Washington, DC: American Chemical Society.
- Capone, D. L., Ristic, R., Pardon, K. H., & Jeffery, D. W. (2015). Simple quantitative determination of potent thiols at ultratrace levels in wine by derivatization and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) analysis. *Analytical Chemistry*, 87, 1226–1231.
- Chen, Y., Jastrzembki, J. A., & Sacks, G. L. (2017). Copper-complexed hydrogen sulfide in wine: Measurement by gas detection tubes and comparison of release approaches. *American Journal of Enology and Viticulture*, 68, 91–99.
- Concejero, B., Hernandez-Orte, P., Astrain, J., Lacau, B., Baron, C., & Ferreira, V. (2016). Evolution of polyfunctional mercaptans and their precursors during Merlot alcoholic fermentation. *LWT – Food Science and Technology*, 65, 770–776.
- Fedrizzi, B., Pardon, K. H., Sefton, M. A., Eley, G. M., & Jeffery, D. W. (2009). First Identification of 4-S-Glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a potential precursor of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, in sauvignon blanc juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 991–995.
- Frackenhohl, J., Arvidsson, P. I., Schreiber, J. V., & Seebach, D. (2001). The outstanding biological stability of beta- and gamma-peptides toward proteolytic enzymes: An in vitro investigation with fifteen peptidases. *ChemBioChem*, 2, 445–455.
- Grant-Preece, P. A., Pardon, K. H., Capone, D. L., Cordente, A. G., Sefton, M. A., Jeffery, D. W., & Eley, G. M. (2010). Synthesis of wine thiol conjugates and labeled analogues: Fermentation of the glutathione conjugate of 3-mercaptohexan-1-ol yields the corresponding cysteine conjugate and free thiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1383–1389.
- Harsch, M. J., Benkwitz, F., Frost, A., Colonna-Ceccaldi, B., Gardner, R. C., & Salmon, J.-M. (2013). New precursor of 3-mercaptohexan-1-ol in grape juice: Thiol-forming potential and kinetics during early stages of must fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(15), 3703–3713.
- Jastrzembki, J. A., Allison, R. B., Friedberg, E., & Sacks, G. L. (2017). The role of elemental sulfur in forming latent precursors of HS in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 10542–10549.
- Jeffery, D. W. (2016). Spotlight on varietal thiols and precursors in grapes and wines. *Australian Journal of Chemistry*, 69, 1323–1330.
- Peña-Gallego, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2012). S-Cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors in grapes. A review. *Food Chemistry*, 131, 1–13.
- Kreitman, G. Y., Danilewicz, J. C., Jeffery, D. W., & Elias, R. J. (2017). Copper(II) mediated hydrogen sulfide and thiol oxidation to disulfides and organic polysulfanes, and their reductive cleavage in wine: Mechanistic elucidation and potential applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 2564–2571.
- Pinu, F., Jouanneau, S., Nicolau, L., Gardner, R. C., & Villas-Boas, S. G. (2012). Concentrations of the volatile thiol 3-mercaptohexanol in sauvignon blanc wines: No correlation with juice precursors. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63, 407–412.
- Roland, A., Schneider, R., Le Guernevé, C., Razungles, A., & Cavelier, F. (2010). Identification and quantification by LC-MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: Elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chemistry*, 121(3), 847–855.
- Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Le Guernevé, C., & Cavelier, F. (2010). Straightforward synthesis of deuterated precursors to demonstrate the biogenesis of aromatic thiols in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10684–10689.
- Roland, A., Schneider, R., & Cavelier, F. (2011). Varietal thiols in wine: Discovery, analysis and applications. *Chemical Reviews*, 111, 7355–7376.
- Roland, A., Cavelier, F., & Schneider, R. (2012). How organic and analytical chemistry contribute to knowledge of the biogenesis of varietal thiols in wine. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27, 266–272.
- Roland, A., Delpech, S., Dagan, L., Ducasse, M.-A., Cavelier, F., & Schneider, R. (2016). Innovative analysis of 3-mercaptohexan-1-ol, 3-mercaptohexylacetate and their corresponding disulfides in wine by Stable Isotope Dilution Assay and nano-liquid

- chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1468, 154–163.
- Schneider, R., Charrier, F., Razungles, A., & Baumes, R. (2006). Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wines. *Analytica Chimica Acta*, 563, 58.
- Starkenmann, C., Chappuis, C. J.-F., Niclass, Y., & Deneulin, P. (2016). Identification of hydrogen disulfanes and hydrogen trisulfanes in H₂S bottle, in flint and in dry mineral white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 9033–9040.
- Subileau, M. (2008). *Paramètres influant sur la libération des thiols variétaux par la levure Saccharomyces cerevisiae: d'un milieu synthétique à la complexité d'un moût de Sauvignon blanc*. Sciences des Procédés, Sciences des Aliments (Ph.D. thesis) (p. 156)Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier.
- Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J.-M., & Degryse, E. (2008). New insights on 3-mercaptohexanol (3MH) biogenesis in sauvignon blanc wines: Cys-3MH and (E)-Hexen-2-al are not the major precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9230–9235.
- Thibon, C., Böcker, C., Shinkaruk, S., Moine, V., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2016). Identification of S-3-(hexanal)-glutathione and its bisulfite adduct in grape juice from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc as new potential precursors of 3SH. *Food Chemistry*, 199, 711–719.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5215–5219.

CHAPITRE 3 | Expérimentations œnologiques : valorisation du potentiel thiol

Afin de valoriser et révéler le potentiel aromatique de type thiol des raisins, des expérimentations œnologiques à l'échelle pilote ont été menées dans deux régions viticoles Françaises (Val de Loire et Languedoc) au cours de la thèse. Il a ainsi été possible de mettre en place des expérimentations de tris densimétriques et topographiques permettant d'étudier la composition en précurseurs de type thiol en fonction de la densité d'une baie de raisin, ou de sa situation géographique au sein d'un pied de vigne. Ensuite, des opérations pré-fermentaires, tel que des macérations pelliculaires et des stabulations sur bourbes ont été mises en place. La première partie s'attache au matériel et aux méthodes utilisés. L'ensemble des résultats de ce chapitre a été rédigé sous la forme d'une publication technique destinée à la revue des œnologues. Après discussion avec l'éditeur, cette publication paraîtra en deux parties dans deux numéros distincts, un pour la partie viticole, l'autre pour la partie œnologique. L'article est ici reproduit tel qu'il sera soumis, ce qui explique les redites au début de la seconde partie, demandées par l'éditeur pour bien replacer cette partie dans l'ensemble de l'étude.

1. Matériel et Méthodes

1.1. Expérimentations viticoles

Les expérimentations viticoles ont été mises en place sur le domaine expérimental de Pech Rouge en Languedoc pendant l'année 2015. L'étude est basée sur deux cépages connus pour être riches en thiols variétaux : le Sauvignon blanc et le Colombard. La récolte des grappes a été effectuée sur l'ensemble de la parcelle et les grappes ont été divisées en baies individuelles.

1.1.1. Tri densimétrique

L'expérimentation de tri densimétrique a consisté à séparer 1000 baies de raisin en fonction de leur densité, déterminée par flottaison dans différents bains d'eau salée à des concentrations croissantes. Les baies des différentes classes de maturité ont été pesées (**Tableau 3**), comptées, broyées puis centrifugées. Les jus obtenus ont ensuite été échantillonnés afin d'analyser les paramètres œnologiques classiques, mais aussi les teneurs en précurseurs de thiols variétaux.

Ces tris densimétriques ont été réalisés à plusieurs dates de prélèvement au cours de la maturation du raisin jusqu'à surmaturation pour évaluer l'évolution de l'hétérogénéité de la teneur en précurseurs au sein de la grappe.

Tableau 3 | Nombre de grappes prélevées et masse totale pour 1000 baies en fonction de la date de prélèvement.

Date de prélèvement (2015)	Sauvignon blanc			Colombard	
	18/8	28/8	2/9	19/8	3/9
Nombre de grappes prélevées	39	27	32	40	38
Masse des 1000 baies (g)	1703	1803	1844	1901	2256

1.1.2. Tris en fonction de la position de la grappe sur le cep

Le but est d'étudier l'impact de la position de la grappe sur la souche et de considérer une possible hétérogénéité de la teneur en précurseurs entre les grappes au sein d'un pied de vigne. Ainsi, trois groupes ont été constitués sur des vignes conduites en Guyot simple (**Schéma 18**) :

- les grappes en position 1 sur les rameaux issus de la baguette : B1 ;
- les grappes en position 2 sur les rameaux issus de la baguette : B2 ;
- les grappes sur les rameaux issus du courson de rappel : C1.

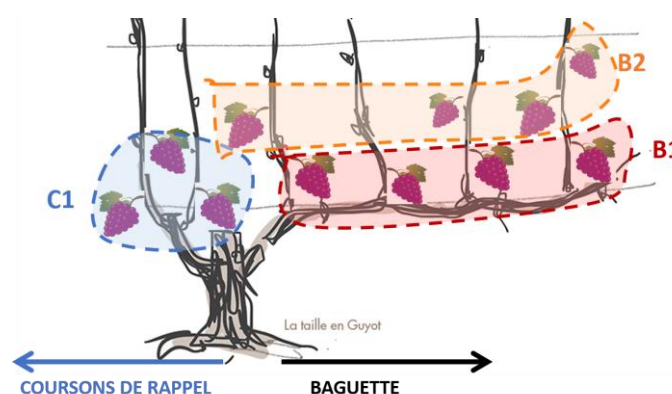


Schéma 18 | Représentation schématique d'un pied de vigne conduit en Guyot.

Chaque groupe de grappes a été pesé, compté (**Tableau 4**), broyé puis centrifugé. Le jus obtenu a ensuite été échantillonné pour analyser les précurseurs de thiols variétaux et les paramètres œnologiques.

Tableau 4 | Nombre de grappes, masse totale et masse moyenne par grappe en fonction de la position de la grappe sur le pied de vigne.

Date de prélèvement (2015)	Position de la grappe sur le pied de vigne	Nombre de grappes	Masse totale (g)	Masse moyenne par grappe (g)
19/8	C1	17	3208	189
	B1	40	8140	204
	B2	21	4286	204
24/8	C1	25	4920	197
	B1	22	4586	208
	B2	9	1530	170
28/8	C1	21	3566	170
	B1	35	8114	232
	B2	19	4198	221
2/9	C1	18	3932	218
	B1	37	7854	212
	B2	26	6588	253

1.2. Expérimentations œnologiques

1.2.1. Macération pelliculaire

Les expérimentations de macération pelliculaire ont été menées dans le Val de Loire et le Languedoc, sur le cépage Sauvignon blanc. Deux millésimes ont été étudiés (2015 et 2016). Ces expérimentations pré-fermentaires ont permis de tester diverses :

- durées de macération pelliculaire : 30 min, 6 h, 24 h (jusqu'à 72 h pour l'année 2016) ;
- températures de macération (10 et 20 °C) ;
- doses de sulfitage : avec (2 g/hL) ou sans.

Cette expérimentation a été mise en place à partir de 300 kg de vendange, éraflée et foulée à échelle pilote. Dans le but d'avoir des lots homogènes, le jus est dans un premier temps séparé de la vendange, puis réassemblé afin d'obtenir des lots avec des proportions de phases liquide/solide identiques. Enfin, les lots ont été séparés en 4 modalités (75 kg de vendange/modalité), chacune étant réalisée en triplicat :

- Modalité n°1 : 20°C avec SO₂ ;
- Modalité n°2 : 20°C sans SO₂ (seulement pour l'année 2015) ;

- Modalité n°3 : 10°C avec SO₂ ;
- Modalité n°4 : 10°C sans SO₂ (seulement pour l'année 2015).

La mise en température s'est faite dans des chambres climatisées.

À la fin de la durée de macération, chaque modalité a subi un pressurage standardisé à petite échelle (6,5 kg/pressurage). Les volumes des jus de goutte ($2,28 \pm 0,20$ L) et de presse ($1,14 \pm 0,10$ L) ont été mesurés. Les différents jus ont été échantillonnés pour analyser les précurseurs de thiols. Les précurseurs du 3MH (Cys-3MH, CysGly-3MH, γ GluCys-3MH et G-3MH) ont été analysés. Les précurseurs de la 4MMP (Cys-4MMP, CysGly-4MMP, γ GluCys-4MMP et G-4MMP) n'ont pas été quantifiés à cause de leur teneur trop faible dans ces moûts pour les deux millésimes étudiés.

1.2.2. Stabulation sur bourbes

1.2.2.1. Essai 1

La stabulation sur bourbes a été menée sur Sauvignon blanc en Languedoc et Val de Loire pendant les années 2015 et 2016. Dans chacun des essais menés, un moût de Sauvignon blanc a été partiellement clarifié jusqu'à obtenir une turbidité d'environ 800 NTU (débouillage pendant 24h à 10°C avec une enzyme de débouillage à 2 mL.hL⁻¹). Le moût a été ensuite séparé en 2 modalités :

- Modalité n°1 : témoin non stabulé (5 g.hL⁻¹ de SO₂ du raisin au moût) ;
- Modalité n°2 : stabulation sur bourbes (idem).

Chaque modalité a été alors divisée en triplicats. Les lots « témoin » ont subi un débouillage pendant 24h à 10°C avec une enzyme de débouillage (2mL.hL⁻¹), jusqu'à environ 150 NTU. Les lots « stabulation sur bourbes » ont été conservés dans des cuves de 50 L fermées à 4°C pendant 3 semaines, avec une remise en suspension des bourbes tous les jours. L'échantillonnage a été effectué pendant la stabulation sur bourbes afin d'analyser les précurseurs de thiols :

- Pour le millésime 2015 : prélèvement tous les 2 jours pendant 18 jours.

- Pour le millésime 2016, les prélèvements ont été affinés au début de la stabulation au vu des résultats obtenus pour le millésime 2015 : prélèvement à 6h, 12h, 24h, puis tous les 2 jours pendant 18 jours.

Après chaque échantillonnage, chaque fût a été rempli avec un moût de la même modalité afin d'éviter la formation d'un espace de tête au fil des prélèvements.

À la fin de la stabulation, les lots ont subi un débouillage jusqu'à obtenir une turbidité d'environ 150 NTU. Conditionné à 17°C, l'ensemble des lots a ensuite été inoculé avec une souche de levure sèche active (LSA) préalablement réhydratée (Esperide, 20 g.hL⁻¹). La FA est considérée comme terminée lorsque la quantité de sucres résiduels est inférieure à 0,5 g.L⁻¹, soit une durée de FA comprise entre 12 et 18 jours en fonction de la modalité considérée. En fin de FA, le vin est mis au froid à 10°C sur lies. Le soutirage est ensuite effectué au 50^{ème} jour après la fin de la FA à l'abri de l'oxygène et avec un réajustement du SO₂ à 30 mg.L⁻¹. Le vin à nouveau réajusté à 30 mg.L⁻¹ de SO₂ est mis en bouteille au 90^{ème} jour après la fin de la FA. La teneur en oxygène des vins après embouteillage est inférieure à 0,5 g.L⁻¹. Les vins sont stockés à 12°C avant leur analyse par UPLC-MS/MS afin de déterminer leur teneur en thiols variétaux libres et oxydés.

1.2.2.2. Essai 2

Un deuxième essai a été mis en place en Val de Loire pendant l'année 2017, similaire à ceux des années précédentes (Essai 1), à l'exception des échantillonnages. En effet, pour chaque prélèvement pour l'analyse de précurseurs pendant la stabulation sur bourbes, 1 L de moût a aussi été prélevé. Ce moût a ensuite été immédiatement inoculé avec une souche de LSA préalablement réhydratée (Esperide, 20 g.hL⁻¹).

2. Article 3 : Valorisation du potentiel aromatique de type thiol de la vendange au travers de pratiques viticoles et œnologiques optimisées

Valorisation du potentiel aromatique de type thiol de la vendange au travers des pratiques viticoles et œnologiques optimisées

Hugo BONNAFFOUX^a, Frédéric CHARRIER^b, Amélie ROY^a, Stéphane DELPECH^c, Aurélie ROLAND^d, Florine CAVELIER^{e,*} et Rémi SCHNEIDER^a

^a Institut Français de la Vigne et du Vin, UMT-Qualinnov, Domaine de Pech Rouge, 11430 Gruissan, France

^b Institut Français de la Vigne et du Vin, Château de la Frémoire, 44120 Vertou, France

^c NYSEOS, 53 rue Claude François, ZA Parc 2000, 34080 Montpellier, France

^d Montpellier SupAgro, INRA-UMR-1083, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier, France

^e Institut des Biomolécules Max Mousseron, IBMM, UMR-5247, CNRS, Université Montpellier, ENSCM, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France

* Correspondant.

Adresse e-mail : florine.cavelier@umontpellier.fr (F. Cavelier).

Mots-clés : Thiols variétaux, précurseurs, 3MH, 4MMP

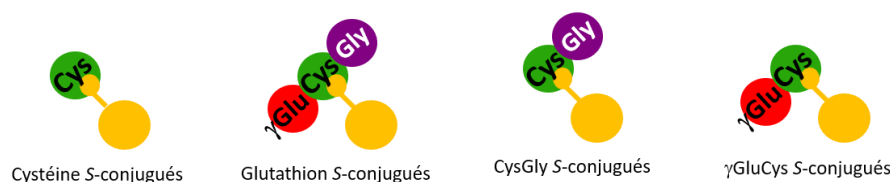
PARTIE 1

Introduction

Plusieurs thiols contribuent à l'arôme du vin dont trois d'entre eux, appelés thiols variétaux, ont été particulièrement étudiés compte tenu de leur fort impact aromatique. Ils présentent des notes caractéristiques de pamplemousse (3-mercapto-hexan-1-ol ; 3MH), de fruit de la passion (acétate de 3-mercaptohexyle ; 3MHA) et de buis ou de bourgeon de cassis (4-mercapto-4-méthylpentan-2-one ; 4MMP) (Darriet, Tominaga, Lavigne, Boidron, & Dubourdiou, 1995; Roland, Schneider, & Cavelier, 2011; Tominaga, Darriet, & Dubourdiou, 1996). Ces thiols sont principalement libérés par l'action de mécanismes enzymatiques au sein de la levure à partir de précurseurs S-conjugués pendant la fermentation alcoolique (FA) (Kobayashi, et al., 2010; Pinu, Jouanneau, Nicolau, Gardner, & Villas-Boas, 2012; Roland, Schneider, Le Guernevé, Razungles, & Cavelier, 2010; Tominaga, Peyrot des Gachons, & Dubourdiou, 1998). Plusieurs précurseurs du 3MH ou de la 4MMP ont déjà été identifiés dans le moût (Figure 1) :

- La cystéine *S*-conjuguée au 3MH (Cys-3MH) ou à la 4MMP (Cys-4MMP) (Subileau, 2008; Subileau, Schneider, Salmon, & Degryse, 2008; Tominaga, Peyrot des Gachons, & Dubourdiou, 1998).
- Le glutathion *S*-conjugué au 3MH (G-3MH), à la 4MMP (G-4MMP), ou au 3-mercaptohexanal (G-3MHA1) et son adduit bisulfite (G-3MH-SO₃) en conditions synthétiques pour ces deux derniers (Roland, Schneider, Le Guernevé, Razungles, & Cavelier, 2010; Roland, Schneider, Razungles, Le Guernevé, & Cavelier, 2010; Thibon, Böcker, Shinkaruk, Moine, Darriet, & Dubourdiou, 2016).
- Les dipeptides (cystéinyl-glycine et γ -glutamyl-cystéine) *S*-conjugués au 3MH (CysGly-3MH et γ GluCys-3MH) (Bonnaffoux, Roland, Rémond, Delpech, Schneider, & Cavelier, 2017; Bonnaffoux, Delpech, Rémond, Schneider, Roland, & Cavelier, 2018; Capone, Pardon, Cordente, & Jeffery, 2011).

Figure 1 : Représentation simplifiée des précurseurs *S*-conjugués avec : la cystéine en vert, l'acide glutamique en rouge, la glycine en violet, et la partie aromatique en orange (3MH ou 4MMP).



La concentration de ces précurseurs est très variable en fonction du cépage. Dans le Sauvignon blanc, cépage qui en est le plus riche, elle est comprise entre quelques $\mu\text{g/L}$ et quelques mg/L pour les variétés les plus riches. (Bonnaffoux, Roland, Rémond, Delpech, Schneider, & Cavelier, 2017; Capone, Pardon, Cordente, & Jeffery, 2011; Peña-Gallego, Hernández-Orte, Cacho, & Ferreira, 2012). Ce cépage a ainsi été l'objet de nombreuses études sur le potentiel aromatique de type thiol.

L'évolution de ce potentiel aromatique, à l'origine de la libération de thiols variétaux, a été étudiée afin de mieux comprendre la biogenèse de ces précurseurs dans les baies au cours de la maturation. Plusieurs facteurs influent sur la quantité de précurseurs présents dans la baie. Une étude sur l'évolution des précurseurs cystéinylés dans des grappes de Sauvignon blanc, un mois avant les vendanges, a montré une grande variabilité de la concentration en précurseurs. Cette teneur dépendrait notamment de l'abondance en azote assimilable (Peyrot des Gachons, Tominaga, & Dubourdiou, 2000). De même, le stade de développement de la baie impacte directement la concentration de certains précurseurs (Cys-3MH, G-3MH et G-4MMP). Ainsi, sous climat océanique, il a été observé que leur teneur augmente considérablement dans les baies au cours de la maturation dans le Sauvignon blanc (Roland, Vialaret, Razungles, Rigou, & Schneider, 2010). Le déficit hydrique joue aussi un rôle important dans la variation de la concentration des précurseurs cystéinylés dans les raisins. En effet, les teneurs en précurseurs sont optimales dans les raisins ayant subi un déficit hydrique modéré (Choné, 2001; Peyrot des Gachons, Van Leeuwen, Tominaga, Soyer, Gaudillère, & Dubourdiou, 2005). Enfin, les conditions thermiques jouent aussi un rôle important positif sur le potentiel aromatique

(Dufourcq, 2003). Les études rapportées ici ne sont pas exhaustives et d'autres résultats peuvent paraître contradictoires. Cela souligne l'importance des conditions pédoclimatiques sur l'accumulation des précurseurs de thiols dans les baies de raisins, et l'absence de règle générale en l'état des connaissances, applicable à toutes les situations viticoles.

Par ailleurs, certains procédés pré-fermentaires, comme la macération pelliculaire, affectent l'extraction des précurseurs de thiols et par conséquent, la teneur en thiols dans les vins. Des études ont montré la présence préférentielle dans la pellicule de raisin des cystéinylés et glutathionylés *S*-conjugués au 3MH ou à la 4MMP (Peyrot des Gachons, Tominaga, & Dubourdiou, 2002; Roland, Schneider, Charrier, Cavelier, Rossignol, & Razungles, 2011). De la même manière, certains travaux ont montré que la concentration en Cys-3MH augmente dans des moûts rosés de Merlot et de Cabernet Sauvignon à la suite de macérations pelliculaires prolongées (Murat, Tominaga, & Dubourdiou, 2001). Une autre opération pré-fermentaire, la stabulation sur bourbes, est bien connue pour augmenter les teneurs en 3MH et en 3MHA dans les vins. Cependant, il semble que les concentrations en précurseurs n'évoluent pas au cours de la stabulation (Roland, Schneider, Charrier, Cavelier, Rossignol, & Razungles, 2011), et de ce fait, l'explication de l'augmentation en thiols dans les vins constatée reste pour le moment incertaine.

Dans le cadre d'une thèse de doctorat, portant sur l'identification de nouveaux précurseurs de thiols, nous avons mené des expérimentations viticoles et œnologiques à l'échelle pilote dans deux régions françaises (Val de Loire et Languedoc) sur plusieurs années consécutives. Ces expérimentations seront présentées et discutées en deux parties.

La première partie s'attachera aux aspects viticoles, à travers l'étude de l'hétérogénéité de la teneur en précurseurs au sein de la grappe et au sein du cep grâce à la mise en place d'expérimentations de tris densimétriques et en fonction de la position de la grappe sur le cep.

La deuxième partie s'intéressera plus particulièrement à deux opérations pré-fermentaires : la macération pelliculaire et la stabulation sur bourbes.

Les précurseurs de thiols et les thiols ont été quantifiés dans les moûts et vins correspondants (Bonnaïfoux, Roland, Rémond, Delpech, Schneider, & Cavelier, 2017; Capone, Ristic, Pardon, & Jeffery, 2015; Roland, Vialaret, Moniatte, Rigou, Razungles, & Schneider, 2010; Roland, et al., 2016; Thibon, Böcker, Shinkaruk, Moine, Darriet, & Dubourdiou, 2016). L'optimisation des conditions analytiques ont permis d'élargir le nombre de précurseurs dosés et ainsi de compléter les données déjà rapportées dans la littérature.

Étude de l'hétérogénéité de répartition des précurseurs au sein de la grappe et au sein du cep.

Différents paramètres influencent la teneur en précurseurs de thiols dans le raisin (la maturité du raisin, le stress hydrique, la typicité du sol et le climat). En revanche, aucune étude, à notre connaissance, ne s'est encore intéressée à l'hétérogénéité des teneurs en précurseurs de thiol au sein des baies d'une même grappe. Il est en effet connu que les baies d'une même grappe ne sont pas toutes au même niveau de maturité. Cette hétérogénéité a déjà été décrite pour les paramètres œnologiques simples (sucre, acidité, composition phénolique) (Rolle, et al., 2011; Shahood, Rienth, Torregrosa, & Romieu, 2015). Ainsi, Rolle *et al.* ont observé une diminution de l'hétérogénéité des baies au cours de la maturation pour ces paramètres. Notre étude s'intéressera plus particulièrement à l'hétérogénéité du potentiel aromatique de type thiol.

Résultats et discussion

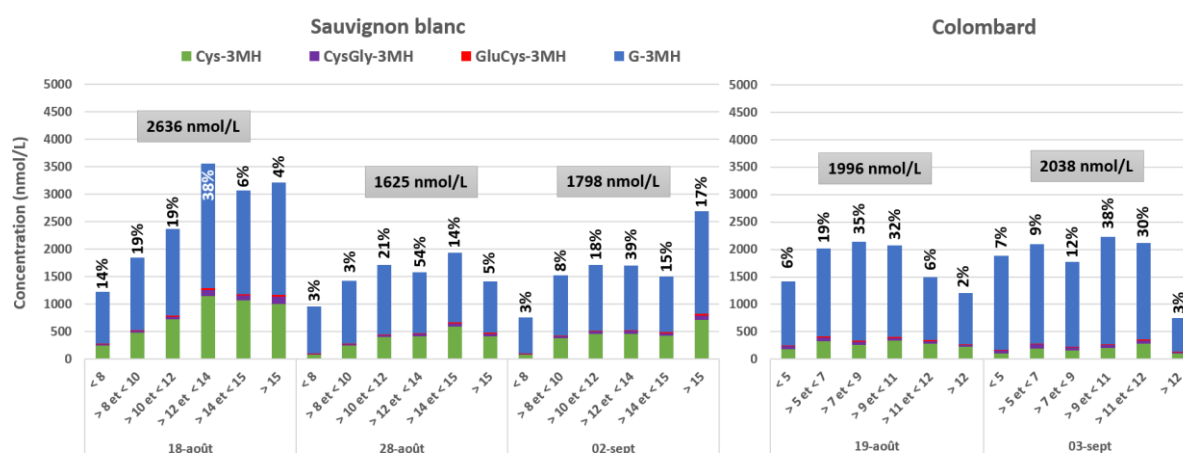
Hétérogénéité au sein de la grappe

Les analyses œnologiques (sucres, pH, acidité totale et azote assimilable) ont permis de comparer les différentes classes de maturité (Tableau 1). On observe une augmentation d'homogénéité des teneurs en sucre, de l'acidité totale et de l'azote assimilable dans les baies au cours de la maturité du raisin pour le Sauvignon blanc. Ce constat a déjà été observé pour le sucre et l'acide malique, à partir de 10 jours après véraison jusqu'à maturité du raisin (Shahood, Rienth, Torregrosa, & Romieu, 2015). Cependant, on constate le phénomène inverse pour le Colombar (hétérogénéité des teneurs en sucre, du pH et de l'acidité totale dans les baies au cours de la maturité du raisin).

Tableau 1 : Analyses œnologiques sur les lots de raisons issus du tri densimétrique

Date de prélèvement (2015)	TRIS DENSIMÉTRIQUES															
	Sauvignon blanc									Colombard						
	18/8				28/8			2/9		19/8			3/9			
Classe de maturité (TAP)	<8	>8 et <10	>10 et <12	>12 et <14	>10 et <12	>12 et <14	>14 et <15	>10 et <12	>12 et <14	>14 et <15	> 5 et < 7	> 7 et < 9	> 9 et < 11	<5	>9 et <11	>11 et <12
Sucres (g/L)	140	174	187	206	185	211	233	190	216	236	109	140	166	82	175	192
pH	3,15	3,19	3,19	3,26	3,37	3,44	3,53	3,50	3,58	3,63	2,81	2,85	2,88	2,97	3,09	3,14
Acidité totale (g/L H ₂ SO ₄)	5,75	5,24	5,13	5,11	4,43	4,18	3,95	3,40	3,35	3,40	9,60	8,50	7,70	8,50	6,60	6,10
Azote assimilable (mg/L)	157	163	160	183	192	181	181	-	-	-	299	312	295	-	-	-

Figure 2 : Evolution de l'hétérogénéité des teneurs en précurseurs de 3MH des baies selon la date de prélèvement (G-3MH, γ GluCys-3MH, CysGly-3MH et Cys-3MH). Cépages étudiés : Sauvignon blanc (à gauche) et Colombard (à droite). La fréquence massique des baies parmi les différentes classes de baies est exprimée en %. Les valeurs encadrées correspondent à la concentration totale par date de prélèvement, pondérée par la fréquence massique.



Concentration moyenne en précurseurs par date de prélèvement

En se focalisant sur la concentration totale par date de prélèvement, pondérée par la fréquence massique (correspondant à la concentration moyenne), on constate qu'il y a une diminution globale de la concentration en précurseurs au cours de la maturation du Sauvignon blanc (Figure 2). Dans la littérature, on observe un comportement inverse, pouvant être expliqué par des conditions pédoclimatiques très différentes (Val de Loire) (Roland, Vialaret, Razungles, Rigou, & Schneider, 2010). Pour le Colombard, cette diminution globale de la concentration au cours de la maturation du raisin ne semble pas être observable.

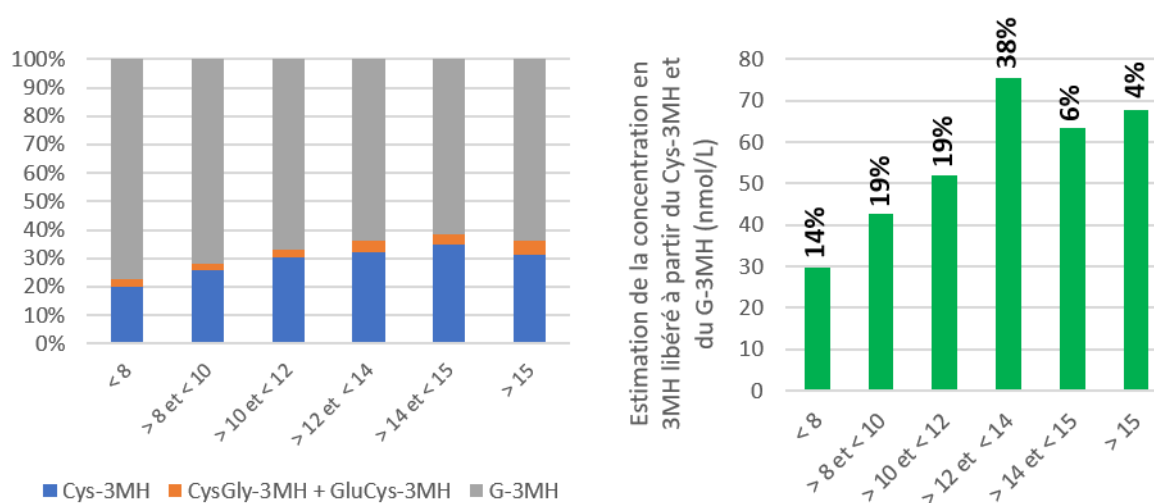
Concentration en précurseurs entre les classes de maturité des baies

En termes d'hétérogénéité, on constate qu'il y a une diminution globale de l'hétérogénéité des teneurs en précurseurs des baies au cours de la première partie de la maturation dans le cas du Sauvignon blanc. L'écart de 2000 nmol/L entre les classes de maturité les plus extrêmes au 18 Août se réduit à 500 le 28 Août. Cependant il augmente de nouveau après cette date pour atteindre de 2000 nmol/L. Il convient de relativiser cette observation, car la teneur en précurseurs pour la classe de maturité >15 en TAP au 2 septembre semble incohérente au vu des autres teneurs en précurseurs pour les autres classes de maturité à la même date de prélèvement.

Si on entre dans le détail des classes de maturité (Figure 2), il apparaît de manière surprenante que les baies les plus riches en sucre sont plus concentrées en précurseurs de 3MH. Cependant, les classes de baies les plus mûres sont minoritaires en masse et leur impact dans l'évolution globale est donc faible. L'évolution de la teneur en précurseurs de 3MH dans la classe prépondérante (>12 et <14) est bien en accord avec l'évolution globale des précurseurs au cours de la maturité. Concernant le Colombard, la distribution de la concentration en précurseurs entre les différentes classes de maturité reste homogène.

Quant à la proportion des précurseurs, en moyenne, le G-3MH représente 72% (83%) de la concentration totale en précurseurs pour le Sauvignon blanc (respectivement pour le Colombard), le Cys-3MH 24% (13%), le CysGly-3MH 3% (idem) et le γ GluCys-3MH 1% (idem). On peut noter que les proportions changent en fonction de la maturité, aussi bien pour le Sauvignon blanc que pour le Colombard. Plus la maturité est forte, et plus la proportion en G-3MH diminue, au profit des autres précurseurs dans le Sauvignon blanc à toutes les dates de prélèvements (Figure 3). Les précurseurs de thiols sont différemment assimilés par la levure ; ce qui se traduit par des rendements de conversion variables. En effet, le Cys-3MH et le G-3MH, dans des conditions œnologiques définies présentent des taux de conversion de l'ordre de 0,7 et 3% respectivement (Roland, Schneider, Razungles, Le Guernevé, & Cavelier, 2010; Subileau, Schneider, Salmon, & Degryse, 2008). Par hypothèse, la diminution de la proportion de G-3MH au profit des autres formes pourrait impacter les teneurs en 3MH dans les vins correspondants.

Figure 3 : Proportion des différents précurseurs du 3MH en fonction de la maturité. Exemple avec le Sauvignon blanc, prélevé le 18/09 (à gauche). Estimation de libération du 3MH à partir des rendements de conversions du Cys-3MH et G-3MH de la littérature (Roland, Schneider, Razungles, Le Guernevé, & Cavelier, 2010; Subileau, Schneider, Salmon, & Degryse, 2008). La fréquence massique des baies parmi les différentes classes de baies est exprimée en % (à droite).

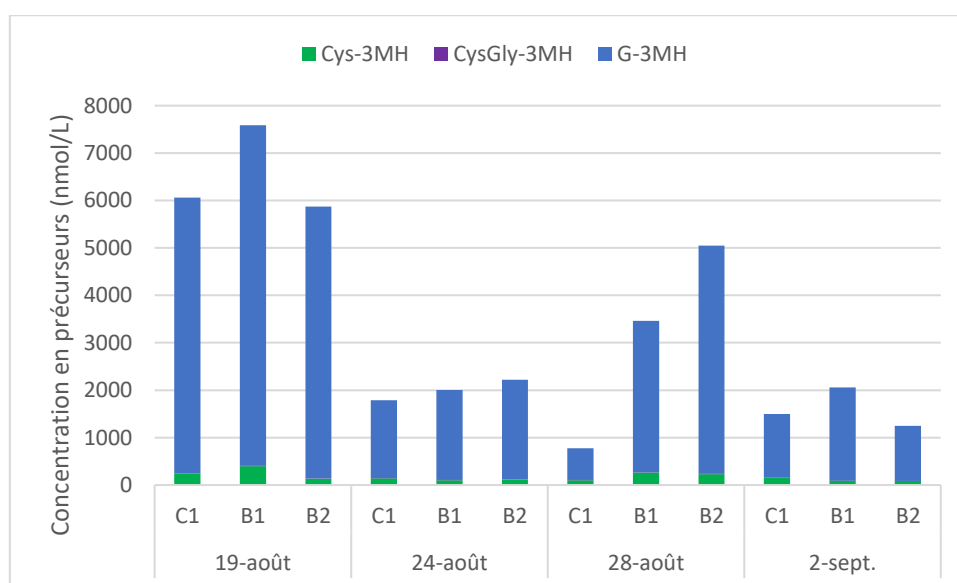


Impact de la position de la grappe sur le cep

Les grappes C1 présentent une maturité plus importante que les grappes B2 (Tableau 2). Le pH semble en revanche assez stable entre les différentes classes de tri, mais cela peut provenir de la méthode d'extraction des jus par broyage qui maximise les teneurs en potassium et peut biaiser la mesure.

Tableau 2 : Analyses œnologiques sur les lots de raisins issus du tri de la position de la grappe sur la souche

Date de prélèvement (2015)	TRIS de la position de la grappe sur la souche											
	19/08			24/08			28/08			02/09		
Position sur le pied de vigne	C1	B1	B2	C1	B1	B2	C1	B1	B2	C1	B1	B2
Sucres (g/L)	201	169	145	222	199	190	229	203	197	213	165	154
pH	3,2	3,2	3,1	3,4	3,4	3,3	3,5	3,4	3,4	3,4	3,4	3,2
Acidité totale (g/L H2SO4)	5,0	5,2	5,5	4,3	4,0	4,2	3,7	3,8	3,9	3,9	4,2	4,1
Azote assimilable (mg/L)	166	-	178	-	-	-	169	173	186	-	-	-

Figure 4 : Impact de la position de la grappe sur la souche de la grappe de raisin et de la date de prélèvement sur la concentration en Cys-3MH, CysGly-3MH et G-3MH (Sauvignon blanc).


De manière générale, les grappes B1 et/ou B2 présentent des teneurs plus importantes en précurseurs du 3MH que les grappes C1 (Figure 4). Au 19/08, la concentration en précurseurs est la plus importante, avec un maximum pour les grappes B1. Au 28/08, l'hétérogénéité des précurseurs est maximale (environ 4000 nmol/L de différence entre les grappes C1 et B2). Sur l'ensemble des souches, le poids des grappes C1 représente environ 20% du poids total des grappes récupérées parmi les 3 groupes.

Nous observons que la proportion des précurseurs est globalement constante au sein de chaque classe. Nous pouvons cependant noter une légère augmentation de la proportion du Cys-3MH et du CysGly-3MH par rapport au G-3MH visible dans les prélèvements plus tardifs.

Conclusion

Cette étude décrit pour la première fois la répartition des teneurs en précurseurs de thiol au sein d'une grappe ou selon la position de la grappe sur le cep. Il semble y avoir un effet variétal sur l'hétérogénéité de la teneur en précurseurs des baies au sein d'une grappe. L'évolution des proportions entre les précurseurs du 3MH au cours de la maturation des baies, laisse à penser qu'il existe *in planta* des mécanismes d'inter-conversion de nature enzymatique. De manière générale la maturité a une influence sur la teneur en précurseurs : les grappes issues de la 1^{ère} date de récolte sont les plus riches en précurseurs ce qui rejoint les résultats des tris densimétriques. Cela peut paraître contradictoire avec certains résultats de la littérature, mais il faut considérer qu'ils ont été obtenus sur des vignobles du Val de Loire, avec des conditions pédoclimatiques différentes (Roland, Vialaret, Razungles, Rigou, & Schneider, 2010). Nous constatons aussi une concentration plus importante des précurseurs du 3MH dans les grappes sur les rameaux issus de la baguette par rapport aux grappes sur les rameaux issus du courson de rappel. Enfin, l'hétérogénéité des précurseurs semble plus importante au sein d'un cep (environ 4000 nmol/L) qu'au sein d'une grappe (environ 2000 nmol/L). Ce résultat peut infléchir les méthodes de prélèvement dans la vigne en termes de représentativité des échantillons pour l'analyse des précurseurs.

PARTIE 2 : Impact des opérations pré-fermentaires

Pendant les opérations pré-fermentaires, certains procédés, comme la macération pelliculaire, peuvent affecter l'extraction des précurseurs de thiols. En effet, des études ont montré la présence préférentielle dans la pellicule des cystéinylés et glutathionylés *S*-conjugués au 3MH ou à la 4MMP (Peyrot des Gachons, Tominaga, & Dubourdieu, 2002; Roland, Schneider, Charrier, Cavelier, Rossignol, & Razungles, 2011). D'autres opérations pré-fermentaires peuvent accroître la teneur en thiols variétaux dans les vins : la stabulation sur bourbes (*Introduction Partie 1*). Les expérimentations portent sur ces deux procédés pré-fermentaires, qui ont été « revisités » en étudiant notamment les précurseurs de type dipeptides pour la première fois.

Macération pelliculaire

La macération pelliculaire est une opération pré-fermentaire destinée à favoriser l'extraction des arômes et des précurseurs d'arôme du raisin. À travers cette expérimentation, l'objectif est d'étudier les cinétiques d'extraction des différents précurseurs et leurs inter-conversions. Après macération, la séparation des jus d'égouttage et des jus de presse nous permet également de considérer ce qui relève d'un mécanisme de diffusion dans le jus (jus d'égouttage) et de ce qui relève d'une meilleure extractibilité (jus de presse).

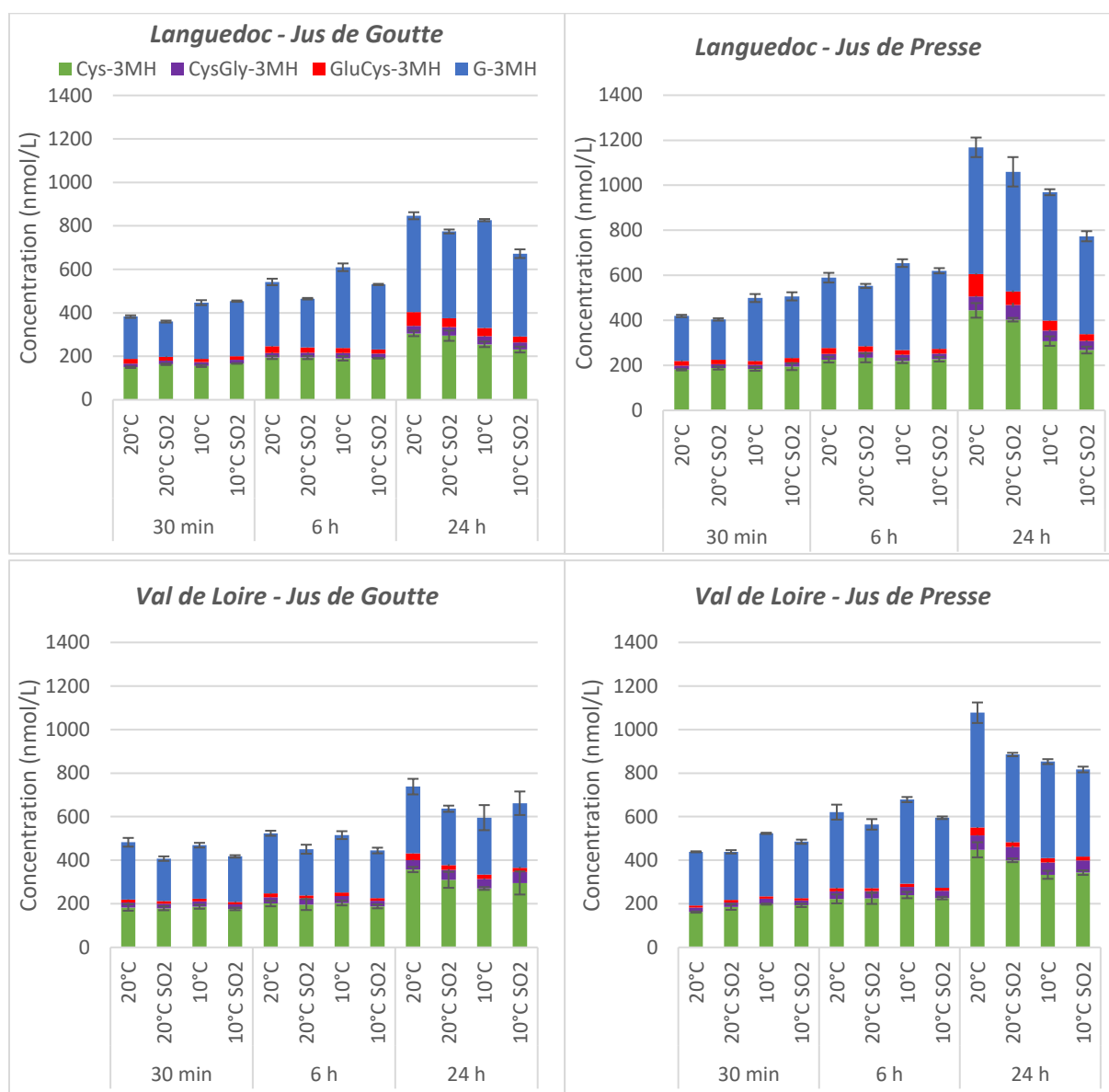
Résultats et discussion

Dans nos expérimentations sur les millésimes 2015 (Figure 5), et comme attendu (Peyrot des Gachons, Tominaga, & Dubourdieu, 2002; Roland, Schneider, Charrier, Cavelier, Rossignol, & Razungles, 2011), la macération pelliculaire favorise grandement l'extraction des précurseurs du 3MH, pouvant multiplier par deux ou par trois en fonction des modalités leur teneur dans les différents moûts.

A 20°C, les teneurs en précurseurs doublent entre 30 min et 24h de macération pelliculaire dans les jus de goutte du Languedoc. Cela correspond à une extraction passive des pellicules. Les teneurs dans les jus de presses correspondants sont triplées suggérant un bénéfice certain du pressurage. Pour les essais menés en Val de Loire, des tendances similaires sont observées.

En termes de répartition, le G-3MH et le Cys-3MH représentent entre 80 et 90% du total des précurseurs. On constate également que la proportion des dipeptides *S*-conjugués est plus importante en Languedoc qu'en Val de Loire. Ceci pourrait être expliqué par les conditions de température plus chaudes en zone méridionale. En effet, il est possible que les mécanismes enzymatiques de dégradation soient plus actifs avec des températures plus élevées.

Figure 5 : Impact du temps de macération pelliculaire sur l'extraction de 4 précurseurs du 3MH (G-3MH, γ GluCys-3MH, CysGly-3MH et Cys-3MH). Influence du type de jus, de la température et du SO₂ sur l'extraction de ces précurseurs. Millésime 2015. Sauvignon blanc.

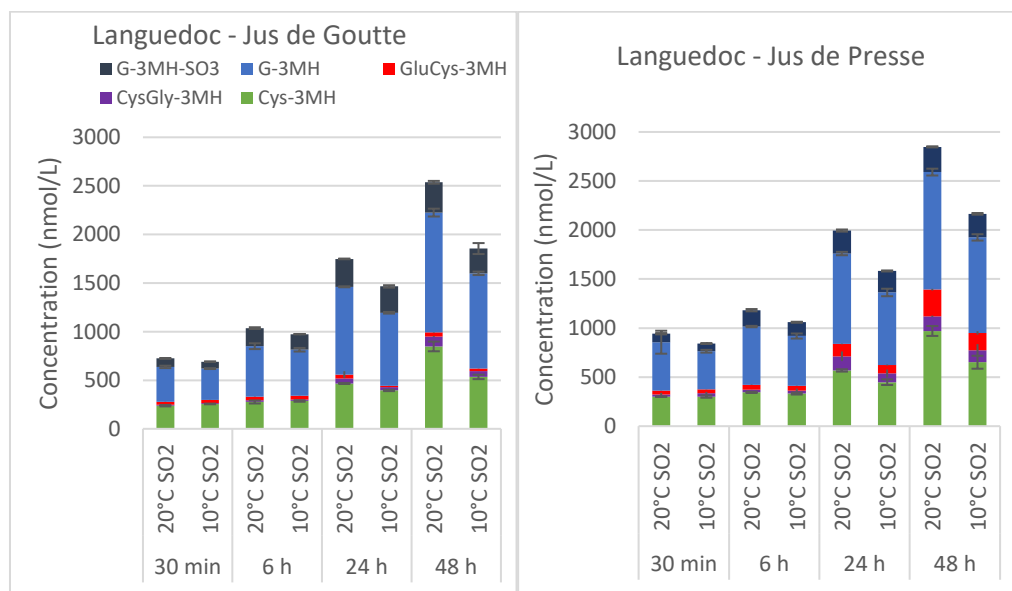


Pour le millésime 2016 (Figure 6), on observe aussi cette augmentation des teneurs en précurseurs du 3MH (G-3MH-SO₃ compris), jusqu'à 48h de macération pelliculaire. La différence des teneurs entre jus de presse et de goutte semble moins prononcée dans ce millésime. Cette différence met en lumière la variabilité de l'extractibilité d'un millésime à l'autre, vraisemblablement due à des différences de résistance des parois des cellules de la pellicule, comme cela est habituellement observé pour l'extraction des polyphénols.

La température a un effet bénéfique sur l'extraction de ces précurseurs (Peyrot des Gachons, Tominaga, & Dubourdiou, 2002). Les faibles doses de SO₂ (2g/hL) dans les modalités avec SO₂ peuvent éviter le développement de la flore microbienne indigène. En absence de SO₂, ce développement microbien peut se produire et conduire à des activités pectolytiques qui favorisent la libération des précurseurs. Par contre, l'absence de SO₂ représente un risque

oxydatif pour le moût. La durée de la macération pelliculaire reste le facteur le plus important dans la gestion de l'extraction des précurseurs de thiols. Il l'est aussi cependant pour les polyphénols et une durée de macération trop longue peut ainsi induire un risque oxydatif important (Lagarde Pascal, Bernard, Gros, Grelier, & Fargeton, 2013).

Figure 6 : Impact de la macération pelliculaire sur l'extraction de 5 précurseurs du 3MH (G-3MH-SO₃, G-3MH, γ GluCys-3MH, CysGly-3MH et Cys-3MH). Influence de la température sur l'extraction de ces précurseurs. Millésime 2016. Sauvignon blanc.



Nous pouvons noter des disparités entre les jus de presse et de goutte, notamment en ce qui concerne le γ GluCys-3MH. En effet, la proportion de ce précurseur augmente au cours de la macération pelliculaire dans le jus de presse. En l'état des connaissances, il est difficile d'apporter une explication à ce phénomène. Il est possible que ce précurseur soit en proportion plus importante dans la pellicule que les autres précurseurs.

La macération pelliculaire permet ainsi d'augmenter la quantité de précurseurs essentiellement dans les jus de première pressée par rapport au jus de goutte. Un fractionnement des jus peut être intéressant dans le but d'augmenter le potentiel aromatique de type thiol, bien que dans notre cas, le jus de presse ne représente qu'environ 35% du volume total récolté.

Stabulation sur bourbes

La stabulation à froid sur bourbes est une technique pré-fermentaire utilisée pour favoriser la présence de thiols dans le vin, en complément ou en alternative à la macération pelliculaire. L'objectif est d'étudier l'évolution des différents précurseurs de thiols au cours du procédé et d'identifier d'éventuelles inter-conversions. La méthode d'analyse utilisée pour doser les thiols nous permet de doser les formes libres et oxydées (disulfures, etc...) du 3MH

dans le vin. La teneur de ces formes oxydées nous informe notamment sur l'état d'oxydation du vin.

Résultats et discussion

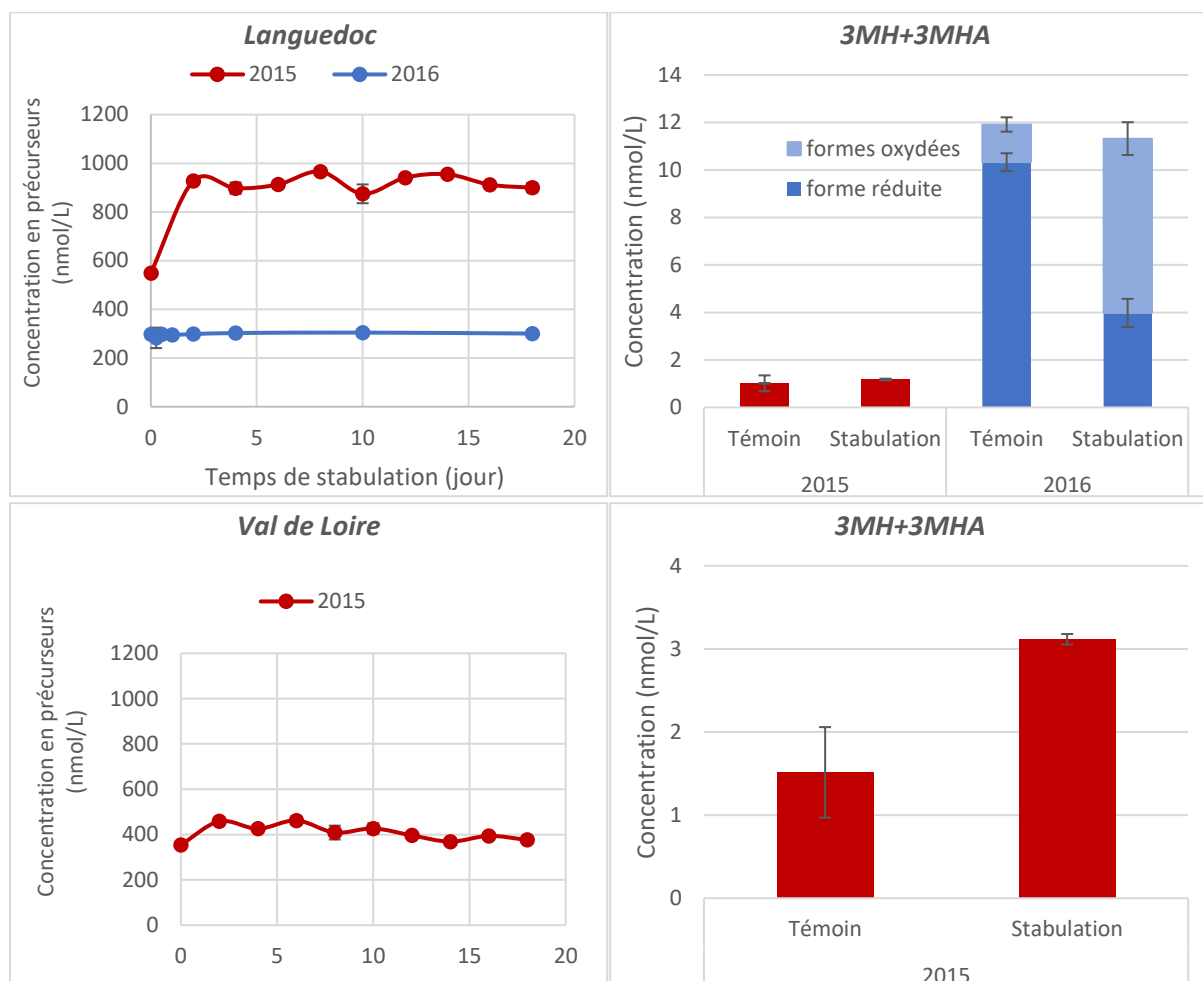
Languedoc

Millésime 2015 et 2016 (Figure 7) – Essai 1

Sur les deux années consécutives, la stabulation sur bourbes semble n'avoir eu aucun effet sur la révélation des thiols dans le vin. Malgré des teneurs en précurseurs parfois importantes (millésime 2015, environ 1000 nmol/L), les teneurs en thiols (3MH+3MHA) restent faibles. Comme reporté dans la littérature, les teneurs en précurseurs de thiols ne sont pas directement corrélées aux thiols (Pinu, Jouanneau, Nicolau, Gardner, & Villas-Boas, 2012). Des phénomènes au cours de la stabulation sur bourbes, en fermentation ou post-fermentation, semblent influencer la révélation des thiols variétaux. Il est possible que les thiols variétaux soient piégés par des composés électrophiles polyphénoliques, *a priori* en teneurs plus élevées dans ces vignobles, *via* la formation de quinones (Nikolantonaki, Chichuc, Teissedre, & Darriet, 2010).

En 2015, seules les formes réduites des thiols ont été considérées. Leurs concentrations sont très faibles au regard des teneurs en précurseurs, et nous avons donc pris en compte les formes oxydées pour les millésimes successifs. En 2016, on observe une proportion importante des formes oxydées dans les vins ayant subi une stabulation. Ne pas les prendre en compte conduirait à une fausse interprétation, mais en les considérant, on observe que la stabulation n'a pas d'impact sur la teneur totale en thiols.

Figure 7 : Evolution des précurseurs du 3MH (G-3MH-SO₃ (millésime 2016 uniquement), G-3MH, γGluCys-3MH, CysGly-3MH et Cys-3MH) au cours de la stabulation sur bourbes à gauche ; teneur en 3MH et 3MHA dans les vins en fin de stabulation à droite.



Val de Loire

Millésime 2015 (Figure 7) – Essai 1

La stabulation sur bourbes menée en Val de Loire en 2015 a permis d'augmenter la teneur en thiols comme stipulé par les travaux de Roland *et al.* (Roland, Schneider, Charrier, Cavelier, Rossignol, & Razungles, 2011). En effet, il y a 2 fois plus de 3MH+3MHA dans les vins stabulés par rapport au témoin n'ayant subi aucune stabulation. En revanche, la teneur en précurseurs au cours de l'expérimentation reste inchangée. Deux hypothèses semblent se dégager :

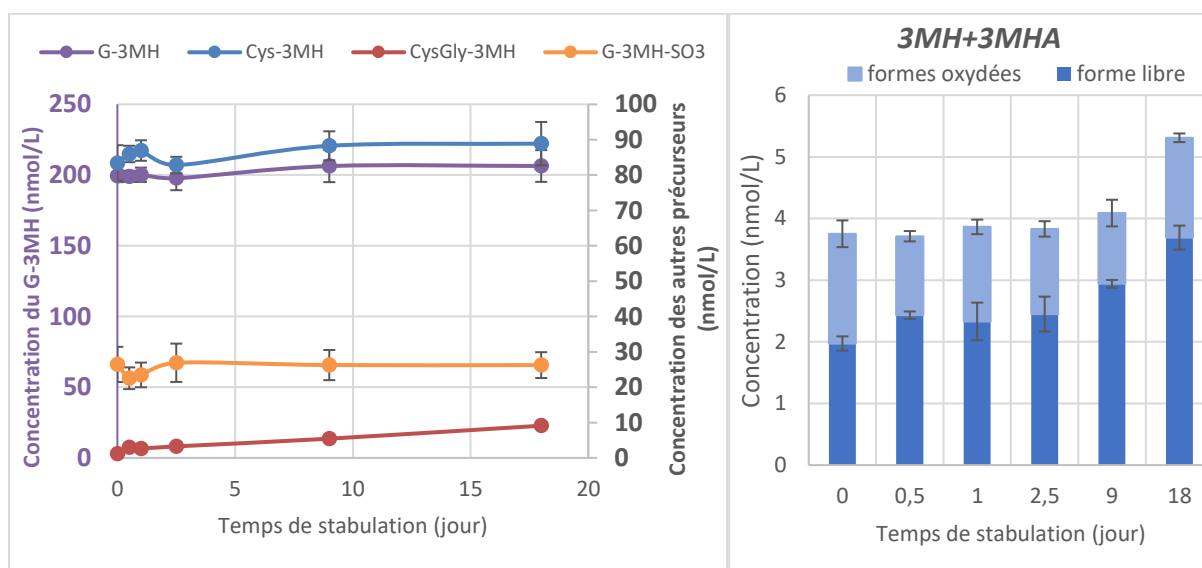
- les thiols proviennent de précurseurs que l'on ne dose pas ;
- le rendement de conversion de la levure pour ces précurseurs augmente avec la stabulation sur bourbes.

Millésime 2017 (Figure 8) – Essai 2

L'expérimentation de stabulation sur bourbes, essai 2, mise en place en Val de Loire uniquement, a fait l'objet de plusieurs FA en décalé au cours de la stabulation (mise en fermentation après prélèvement de moût ayant subi entre 0 et 18 jours de stabulation). On constate que la teneur en 3MH et 3MHA augmente avec la durée de la stabulation (+18% après 1 jour et +87% après 18 jours). La concentration des formes oxydées ne semble pas évoluer dans les vins avec la durée de la stabulation.

De la même manière qu'en Val de Loire en 2015, on observe que la concentration de certains précurseurs du 3MH (G-3MH-SO₃, G-3MH, Cys-3MH) reste inchangée au cours de la stabulation. Seul le CysGly-3MH augmente de façon significative, sa concentration étant multipliée par 8 à la fin de la stabulation par rapport au témoin (le γ GluCys-3MH n'a pas été détecté dans ce moût). Cette augmentation a aussi été observé pour le millésime 2015 (données non montrées).

Figure 8 : Evolution des précurseurs du 3MH (G-3MH-SO₃, G-3MH, CysGly-3MH et Cys-3MH) au cours de la stabulation sur bourbes à gauche ; teneur en 3MH+3MHA (formes libres et oxydées) dans les vins en fonction de la durée de stabulation subie par le moût avant fermentation à droite.



Conclusion

À travers l'expérimentation de macération pelliculaire, l'analyse d'un plus grand nombre de précurseurs, comprenant les dipeptides S-conjugués, permet la compréhension plus complète de la biogenèse des thiols. Nous avons ensuite mis en évidence l'importance de la température pour maximiser le potentiel aromatique de type thiol. De même, le SO₂ semble avoir un rôle important dans l'extraction de ces précurseurs. Enfin, nous avons mis en évidence l'impact supérieur de la macération pelliculaire sur l'extractibilité des précurseurs que sur leur simple diffusion dans le moût

Notre travail d'expérimentation de stabulation sur bourbes a été conduit en suivant un plus grand nombre de précurseurs récemment identifiés (les dipeptides *S*-conjugués et le G-3MH-SO₃) mais ne permet pas de lever les interrogations sur la genèse des thiols puisqu'aucun des précurseurs ne voit sa concentration augmenter au cours de la stabulation.

Pour quantifier la teneur en thiols, nous avons montré l'importance du dosage des formes oxydées, les résultats des expérimentations de 2015 sont donc incomplets et à exclure pour l'interprétation. En ne considérant que les résultats 2016 et 2017, la stabulation sur bourbes n'a pas d'impact en Languedoc alors qu'elle permet une augmentation des teneurs en thiols en Val de Loire après le 9^{ème} jour, confirmant les résultats des études précédentes rapportés dans la littérature. En l'état des connaissances, cette différence est difficilement explicable mais elle montre que l'effet positif de la stabulation n'est pas systématique.

Dans la continuité de ces études, d'autres formes de précurseurs pourraient être envisagées pour expliquer l'augmentation des thiols dans les vins. D'autre part, il serait intéressant de suivre l'évolution au cours de la stabulation d'autres composés présents dans le moût (lipides, acides aminés, peptides, ...) qui pourraient influencer les rendements de conversion des précurseurs et favoriser la révélation des thiols variétaux.

Remerciements

Nous remercions le personnel technique des caves pour avoir aidé à mettre en place les différentes expérimentations à l'IFV de Pech Rouge (D. Caboulet, M.-A. Ducasse et N. Imbern) et de Vertou (C. Cartier). Nous remercions également AEB et NYSEOS pour le soutien financier. Cette étude est financée par une subvention de l'État de l'ANRT (CIFRE N° 2015/0690).

Références

- Bonnaffoux, H., Roland, A., Rémond, E., Delpech, S., Schneider, R., & Cavelier, F. (2017). First identification and quantification of *S*-3-(hexan-1-ol)- γ -glutamyl-cysteine in grape must as a potential thiol precursor, using UPLC-MS/MS analysis and stable isotope dilution assay. *Food Chemistry*, *237*, 877–886.
- Bonnaffoux, H., Delpech, S., Rémond, E., Schneider, R., Roland, A., & Cavelier, F. (2018). Revisiting the evaluation strategy of varietal thiol biogenesis. *Food Chemistry*, *268*, 126–133.
- Capone, D. L., Pardon, K. H., Cordente, A. G., & Jeffery, D. W. (2011). Identification and Quantitation of 3-*S*-Cysteinylglycinehexan-1-ol (Cysgly-3-MH) in Sauvignon blanc Grape Juice by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(20), 11204-11210.
- Capone, D. L., Ristic, R., Pardon, K. H., & Jeffery, D. W. (2015). Simple Quantitative Determination of Potent Thiols at Ultratrace Levels in Wine by Derivatization and High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS) Analysis. *Analytical Chemistry*, *87*, 1226-1231.
- Choné, X. (2001). Contribution à l'étude des terroirs de Bordeaux : étude des déficits hydriques modérés, de l'alimentation en azote et de leurs effets sur le potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. Thèse de Doctorat (p. 188): Université de Bordeaux.
- Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J. N., & Dubourdiou, D. (1995). Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines: 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour and Fragrance Journal*, *10*, 385-392.
- Dufourcq, T. (2003). Incidences de facteurs viticoles sur le potentiel aromatique du cépage Colombard en Gascogne. *Station régionale ITV Midi-Pyrénées, Journée technique régionale*, 12-17.
- Kobayashi, H., Takase, H., Kaneki, K., Tanzawa, F., Takata, R., Suzuki, S., & Konno, K. (2010). Analysis of *S*-3-(Hexan-1-ol)-Glutathione and *S*-3-(Hexan-1-ol)-l-Cysteine in *Vitis vinifera* L. cv. Kosu for Aromatic Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, *61*, 176-185.
- Lagarde Pascal, C., Bernard, N., Gros, S., Grelier, S., & Fargeton, L. (2013). Pilotage de l'élaboration de vins blancs de profil aromatique thiol de la vigne à la mise en bouteille. *Revue des Oenologues*, *Novembre*, 1-3.
- Murat, M.-L., Tominaga, T., & Dubourdiou, D. (2001). Assessing the Aromatic Potential of Cabernet Sauvignon and Merlot Musts Used to Produce Rose Wine by Assaying the Cysteinylated Precursor of 3-Mercaptohexan-1-ol. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *49*, 5412–5417.

- Nikolantonaki, M., Chichuc, I., Teissedre, P.-L., & Darriet, P. (2010). Reactivity of volatile thiols with polyphenols in a wine-model medium: Impact of oxygen, iron, and sulfur dioxide. *Analytica Chimica Acta*, 660, 102-109.
- Peña-Gallego, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2012). S-Cysteinylation and S-glutathionylation thiol precursors in grapes. A review. *Food Chemistry*, 131, 1-13.
- Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2000). Measuring the aromatic potential of *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon blanc grapes by assaying S-cysteine conjugates, precursors of the volatile thiols responsible for their varietal aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3387-3391.
- Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2002). Localization of S-Cysteine Conjugates in the Berry: Effect of Skin Contact on Aromatic Potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc Must. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 144-146.
- Peyrot des Gachons, C., Van Leeuwen, C., Tominaga, T., Soyer, J.-P., Gaudillère, J.-P., & Dubourdieu, D. (2005). Influence of water and nitrogen deficit on fruit ripening and aroma potential of *Vitis vinifera* L cv Sauvignon blanc in field conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 73–85.
- Pinu, F., Jouanneau, S., Nicolau, L., Gardner, R. C., & Villas-Boas, S. G. (2012). Concentrations of the Volatile Thiol 3-Mercaptohexanol in Sauvignon blanc Wines: No Correlation with Juice Precursors. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63, 407-412.
- Roland, A., Schneider, R., Le Guernevé, C., Razungles, A., & Cavelier, F. (2010). Identification and quantification by LC–MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: Elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chemistry*, 121(3), 847-855.
- Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Le Guernevé, C., & Cavelier, F. (2010). Straightforward synthesis of deuterated precursors to demonstrate the biogenesis of aromatic thiols in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10684-10689.
- Roland, A., Vialaret, J., Moniatte, M., Rigou, P., Razungles, A., & Schneider, R. (2010). Validation of a nanoliquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the identification and the accurate quantification by isotopic dilution of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in white grape juices. *Journal of Chromatography A*, 1217(10), 1626-1635.
- Roland, A., Vialaret, J., Razungles, A., Rigou, P., & Schneider, R. (2010). Evolution of S-cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors during oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4406-4413.

- Roland, A., Schneider, R., & Cavelier, F. (2011). Varietal Thiols in Wine: Discovery, Analysis and Applications. *Chemical Reviews*, *111*, 7355-7376.
- Roland, A., Schneider, R., Charrier, F., Cavelier, F., Rossignol, M., & Razungles, A. (2011). Distribution of varietal thiol precursors in the skin and the pulp of Melon B. and Sauvignon Blanc grapes. *Food Chemistry*, *125*(1), 139-144.
- Roland, A., Viel, C., Reillon, F., Delpech, S., Boivin, P., Schneider, R., & Dagan, L. (2016). First identification and quantification of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one in hops (*Humulus lupulus*). *Flavour and Fragrance Journal*, *31*, 455-463.
- Rolle, L., Río Segade, S., Torchio, F., Giacosa, S., Cagnasso, E., Marengo, F., & Gerbi, V. (2011). Influence of Grape Density and Harvest Date on Changes in Phenolic Composition, Phenol Extractability Indices, and Instrumental Texture Properties during Ripening. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *59*, 8796–8805.
- Shahood, R., Rienth, M., Torregrosa, L., & Romieu, C. (2015). Evolution of grapevin (*Vitis Vinifera* L.) Berry heterogeneity during ripening. In *Journée Internationale de Viticulture GIESCO*, (pp. 564-568). Gruissan, France.
- Subileau, M. (2008). Paramètres influant sur la libération des thiols variétaux par la levure *Saccharomyces cerevisiae* : d'un milieu synthétique à la complexité d'un moût de Sauvignon blanc. Thèse de Doctorat (p. 156): Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier.
- Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J.-M., & Degryse, E. (2008). New Insights on 3-Mercaptohexanol (3MH) Biogenesis in Sauvignon Blanc Wines: Cys-3MH and (*E*)-Hexen-2-al Are Not the Major Precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(19), 9230–9235.
- Thibon, C., Böcker, C., Shinkaruk, S., Moine, V., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2016). Identification of *S*-3-(hexanal)-glutathione and its bisulfite adduct in grape juice from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc as new potential precursors of 3SH. *Food Chemistry*, *199*, 711-719.
- Tominaga, T., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (1996). Identification of 3-mercaptohexyl acetate in Sauvignon wine, a powerful aromatic compound exhibiting box-tree odor. *Vitis*, *35*, 207-210.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 5215-5219.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Au terme de ce manuscrit, un bilan général sur les résultats peut être dégagé. Tout d'abord, une étude bibliographique préliminaire, à travers notamment une revue scientifique relative aux mécanismes de libération des thiols variétaux dans les boissons, a permis de dresser un bilan sur l'état des connaissances et les enjeux de recherche sur le potentiel aromatique de type thiol. Les objectifs de mon travail étaient d'élucider de nouveaux précurseurs du 3MH et de la 4MMP, de déterminer les mécanismes d'inter-conversion des précurseurs au cours de la vinification, et de mettre en place des expérimentations viticoles et œnologiques à l'échelle pilote, afin de faire ressortir des pistes technologiques pour mieux valoriser le potentiel aromatique thiol.

Dans l'optique d'identifier et de quantifier de nouveaux précurseurs, une méthode de synthèse a été développée permettant d'obtenir les dipeptides S-conjugués au 3MH, à la 4MMP et au 3MH-SO₃. Ensuite, une méthode d'analyse par UPLC-MS/MS en utilisant la dilution isotopique comme technique de dosage a été développée. Elle a permis l'identification et la quantification de 6 précurseurs, à travers d'excellentes performances analytiques et dans une approche haut débit. Enfin, l'analyse de moûts de Sauvignon blanc nous a permis d'identifier pour la première fois dans cette matrice le γ GluCys-3MH.

Afin de déterminer les mécanismes d'inter-conversion des précurseurs du 3MH et de la 4MMP au cours de la FA, l'expérimentation de filiation des moûts mise en place a permis d'élucider deux nouveaux précurseurs : le CysGly-3MH et le γ GluCys-3MH. Le rôle de précurseur des dipeptides S-conjugués à la 4MMP a été démontré, mais leur identification dans un moût reste à l'étude. Ensuite, les différentes inter-conversions entre les dérivés cystéinylés S-conjugués au 3MH et à la 4MMP ont été mises en évidence. Enfin, nous avons montré qu'il n'existe aucune influence significative entre deux souches de levure commerciale quant au rendement de conversion des glutathions S-conjugués.

Finalement, nous avons mené des expérimentations viticoles et œnologiques à l'échelle pilote dans deux régions françaises (Val de Loire et Languedoc) sur trois années consécutives. Les expérimentations viticoles nous ont permis d'étudier pour la première fois l'hétérogénéité de la teneur en précurseurs au sein de la grappe et au sein du cep. Quant aux expérimentations œnologiques (macération pelliculaire et stabulation sur bourbes à froid), elles ont permis de

fournir des pistes de maîtrise technologique de ces opérations, permettant une meilleure valorisation du potentiel thiol.

En finalité des travaux abordés durant ces trois années, différentes perspectives peuvent être envisagées.

Les précurseurs de thiols qui sont aujourd'hui identifiés, comprenant les dipeptides S-conjugués, ne représentent qu'une faible partie de l'origine du 3MH ou de la 4MMP. C'est pourquoi, et dans la continuité des objectifs fixés, l'identification de nouveaux précurseurs permettrait de compléter l'origine des thiols manquants. Pour ce faire, une approche non ciblée permettant une étude plus exploratoire pourrait être envisagée. Une démarche adéquate serait tout d'abord de procéder à une purification et un fractionnement d'un moût de raisin par HPLC préparative. La mise en FA et/ou l'ajout d'enzymes β -lyasiques sur les différentes fractions obtenues permettrait, après analyse des thiols, de connaître les fractions les plus riches en thiols variétaux. Ensuite, il serait possible à travers des analyses par UPLC-MS/MS, de rechercher dans les fractions riches en thiols, les composés susceptibles d'être précurseurs. Enfin, nous pourrions synthétiser ces composés, puis effectuer une expérimentation de filiation sur moût similaire à celle mise en place pendant la thèse, pour confirmer le rôle de précurseur de ces composés.

Pour mieux expliquer les faibles rendements de conversions des précurseurs (inférieurs à quelques pourcents), il serait intéressant de marquer la partie cystéine de la molécule, ce qui permettrait de suivre le devenir de la cystéine après clivage par la levure pendant la FA (**Figure 13**). En complément avec les résultats obtenus par l'expérimentation de filiation sur moût, l'obtention des différentes molécules marquées sur la cystéine permettrait d'établir un bilan plus complet du devenir de la partie acide aminé après clivage par la levure. Au-delà de la connaissance de ces voies métabolites et de la quantification de ces composés marqués (^{15}N -Glutathion, ^{15}N - γ GluAlaGly, ^{15}N - γ GluCys, ^{15}N -CysGly, ^{15}N -Cystéine, ^{15}N - γ GluAla, ^{15}N -AlaGly et ^{15}N -Alanine), il est possible à travers des expérimentations de FA faisant intervenir différentes levures d'influencer, voire de favoriser les voies métabolites permettant d'obtenir les thiols variétaux.

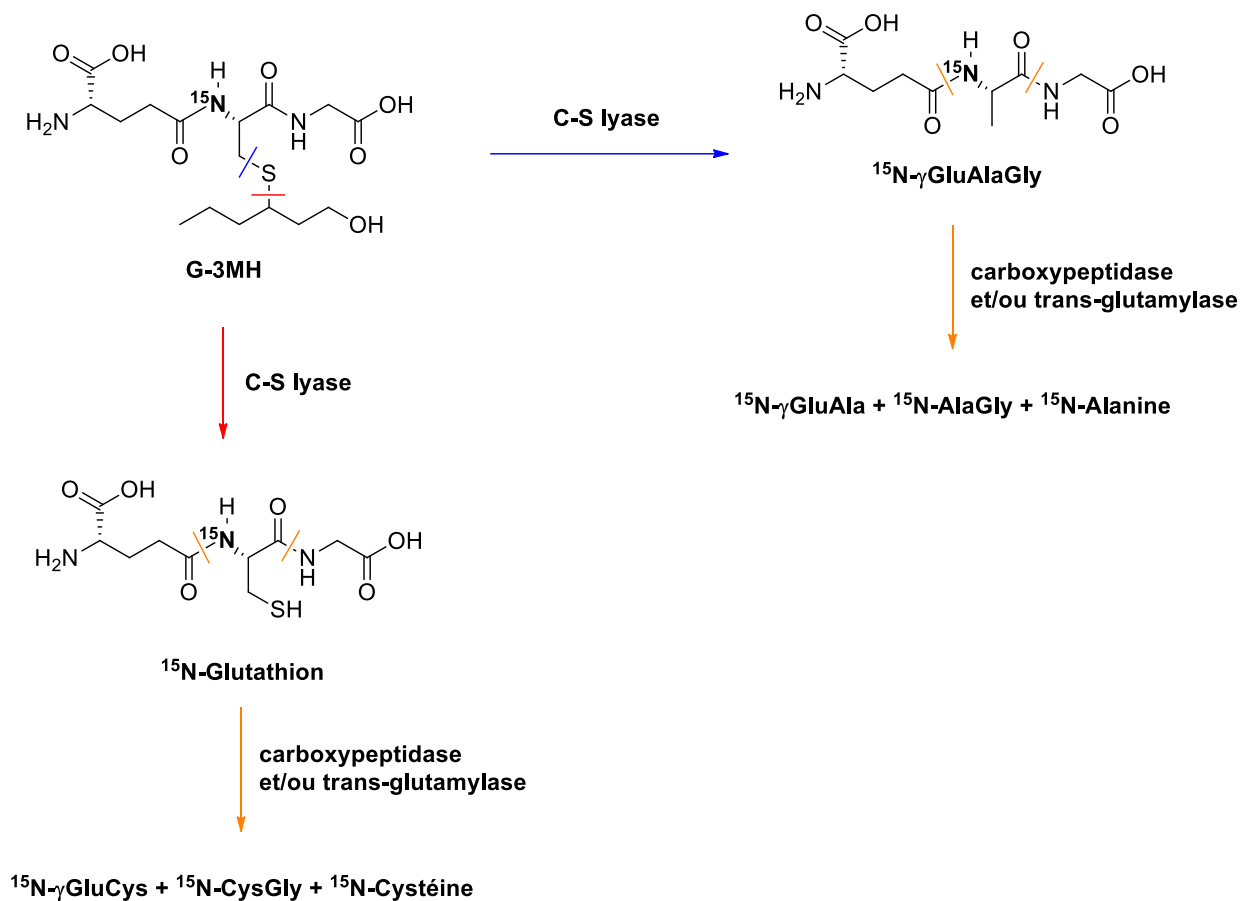


Figure 13 | Différents clivages possibles dans la levure au cours de la FA. Exemple avec le G-3MH.

En prenant l'exemple du G-3MH, il serait tout d'abord nécessaire de faire la synthèse du G-3MH marqué et de tous les composés susceptibles de se former après clivage par la levure (**Figure 13**). Ensuite, une filiation sur moût avec l'ajout du G-3MH marqué permettrait de suivre la cinétique de formation et de disparition des composés ciblés au cours de la FA. Le ratio $^{15}\text{N-Glutathion}/^{15}\text{N-}\gamma\text{GluAlaGly}$ permettrait de donner des éléments de réponses sur les clivages C-S préférentiels de la levure (flèche bleu ou rouge sur la **Figure 12**), et ainsi d'expliquer les faibles rendements de conversions. Cependant, et dans le but d'obtenir un bilan du devenir de la partie acide aminé après clivage par la levure, il est nécessaire de suivre la cinétique de formation et de disparition des composés marqués aussi dans la levure. En effet, les peptides sont des nutriments pour la levure et une partie de ces composés peuvent être biotransformés dans la levure sans être transportés à l'extérieur de la cellule.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Dégradation des caroténoïdes (ici le β -carotène), conduisant à la formation des C13-norisoprénoïdes (ici la β -ionone).....	25
Figure 2 Structure générale d'un précurseur glycosidique. En rouge les liaisons clivées au cours des hydrolyses permettant notamment la libération des aglycones (adapté de (Baumes, 2009)).	26
Figure 3 Formation du DMS au cours du vieillissement par hydrolyse chimique.	27
Figure 4 Les formes dipeptidiques S-conjugués au 3MH.	64
Figure 5 Les formes diastéréoisomériques 3S et 3R du Cys-3MH.	69
Figure 6 Structure des dipeptides S-conjugués au 3MH, 3MHAI et 4MMP. Les protons en vert correspondent aux positions deutérées lors de la synthèse des molécules marquées. Les azotes en bleus correspondent aux positions de marquages possibles (^{15}N) dans l'optique d'étudier le devenir de la cystéine après clivage par la levure pendant la FA.	72
Figure 7 Chromatogramme avec détection UV (214 nm) obtenu par HPLC avec les 4 dipeptides polysulfurés (à gauche). Corrélation entre le temps de rétention et la formule brute obtenue par LC-HRMS (à droite).....	79
Figure 8 Quelques agents de dérivation utilisés pour quantifier les précurseurs par GC-MS et exemple de dérivation de la Cys-4MMP en présence de pyridine et d'un mélange TMCS/BSTFA (Shinkaruk, <i>et al.</i> , 2008).	84
Figure 9 Principe de la MRM dans un triple quadripôle. Q1 et Q3 sont des quadripôles pour scanner des ions et Q2 est une cellule de collision.	86
Figure 10 Spectre de masse de second ordre des dipeptides S-conjugués. En rouge, la masse de l'ion de quantification, et en noir, les masses des ions de qualification (en Da).....	87
Figure 11 Chromatogramme UPLC des précurseurs cystéinylés, glutathionylés et dipeptidiques avant l'optimisation.	88
Figure 12 Etude des mécanismes d'(inter)conversion des précurseurs du 3MH. Les flèches rouges représentent les mécanismes de dégradation. Les flèches bleues représentent les mécanismes de libération du 3MH.	106
Figure 13 Différents clivages possibles dans la levure au cours de la FA. Exemple avec le G-3MH.	144

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1 Synthèse du Cys-3MH et de la Cys-4MMP selon Tominaga <i>et al.</i>	68
Schéma 2 Synthèse du G-3MH selon Roland <i>et al.</i>	69
Schéma 3 Synthèse du G-3MHA1 et du G-3MH-SO ₃ selon Thibon <i>et al.</i>	70
Schéma 4 Synthèse du CysGly-3MH et du γ GluCys-3MH selon Fedrizzi <i>et al.</i>	71
Schéma 5 Stratégie de synthèse des composés γ GluCys S-conjugués.	73
Schéma 6 Synthèse de Boc-Glu-OtBu 3	74
Schéma 7 Synthèse du dipeptide γ GluCys 6	74
Schéma 8 Synthèse de la γ Glu-Cys-4MMP protégée 7	75
Schéma 9 Changement du groupement de protection de l'acide de la L-cystine.....	75
Schéma 10 Déprotection en milieu acide des groupements protecteurs. Exemple avec la γ GluCys-4MMP.	76
Schéma 11 Synthèse de 9 et des sous-produits.....	76
Schéma 12 Synthèse de l'amide de Weinreb 14 à partir de l'acide hexénoïque et synthèse du dipeptide 9'	77
Schéma 13 Synthèse du γ GluCys-3MH-SO ₃ 16	78
Schéma 14 Synthèse des composés CysGly S-conjugués au 3MH ou à la 4MMP.	79
Schéma 15 Synthèse du dipeptide Boc-CysGly-OtBu 19	80
Schéma 16 Synthèse du CysGly-4MMP.....	80
Schéma 17 Synthèse du γ GluCys-3MH-SO ₃ 26	81
Schéma 18 Représentation schématique d'un pied de vigne conduite en Guyot.....	119

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Composés d'impact identifié dans les vins <i>Vitis vinifera</i>	21
Tableau 2 Familles d'arômes à contribution majoritaire dans les vins <i>Vitis vinifera</i> (adapté de Ferreira <i>et al.</i> , 2007 (Ferreira, <i>et al.</i> , 2007)).	22
Tableau 3 Nombre de grappes prélevées et masse totale pour 1000 baies en fonction de la date de prélèvement.	118
Tableau 4 Nombre de grappes, masse totale et masse moyenne par grappe en fonction de la position de la grappe sur le pied de vigne.	120

TITRES ET TRAVAUX

Publications

H. Bonnaffoux, A. Roland, E. Rémond, S. Delpech, R. Schneider and F. Cavelier, *First identification and quantification of S-3-(hexan-1-ol)- γ -glutamyl-cysteine in grape must as a potential thiol precursor, using UPLC-MS/MS analysis and stable isotope dilution assay*, Food Chemistry, 237, **2017**

H. Bonnaffoux, S. Delpech, E. Rémond, A. Roland, R. Schneider and F. Cavelier, *Revisiting the evaluation strategy of varietal thiol biogenesis*, Food Chemistry, 268, **2018**

Communications orales

H. Bonnaffoux, A. Roland, E. Rémond, S. Delpech, R. Schneider and F. Cavelier, *Varietal thiols in wines and their precursors*, Workshop, University of Adelaide, Australia, **2016**

H. Bonnaffoux, A. Roland, E. Rémond, S. Delpech, R. Schneider and F. Cavelier, *Identification of a new precursor for wine aroma*, Journée de l'Ecole doctorale Sciences Chimiques Balard, ENSCM, Montpellier, **2016**

H. Bonnaffoux, R. Schneider, *Varietal thiols in wines: a review on their aromatic contribution and their liberation mechanisms from their precursors*, ICCWS, Brighton, England, **2016**

H. Bonnaffoux, S. Delpech, E. Rémond, A. Roland, R. Schneider and F. Cavelier, *S-Cysteinyglycine and γ -Glutamylcysteine Conjugates to 3-Mercaptohexan-1-ol and 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one: Four New Varietal Thiols Precursors*, In *Vino Analytica Scientia*, Salamanca, Spain, **2017**

H. Bonnaffoux, S. Delpech, E. Rémond, A. Roland, R. Schneider and F. Cavelier, *S-Cysteinylglycine and γ Glutamylcysteine conjugates to 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one: New varietal thiols precursors*, Journée du Département des Aminoacides, Peptides et Protéines, Université de Montpellier, **2018**

Posters

H. Bonnaffoux, A. Roland, S. Delpech, F. Cavelier, R. Schneider, *First identification and quantification of γ GluCys-3MH in grape must, a potential thiol precursor*, 4th conference on Wine Active Compounds, Beaune, **2017**

S. Delpech, H. Bonnaffoux, F. Cavelier, Laurent Dagan, *Identification of New Odourless Thiol Precursors in Hop and Malt*, Brewing Summit, San Diego, United States, **2018**

Formation complémentaire

Diplôme National d'Œnologie (en cours)

ANNEXES

Chapitre 1 | Identification et quantification du γ GluCys-3MH, un précurseur de thiol potentiel

Supporting Informations of Article 1: First identification and quantification of S-3-(hexan-1-ol)- γ -glutamyl-cysteine in grape must as a potential thiol precursor, using UPLC-MS/MS analysis and stable isotope dilution assay

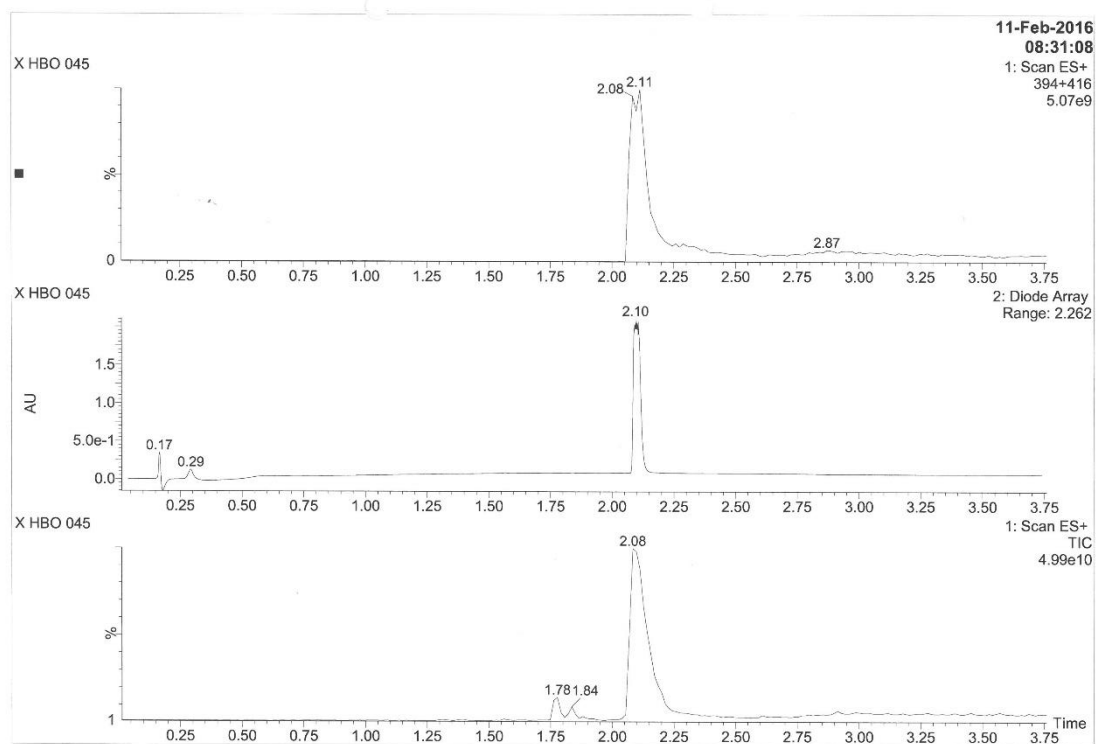
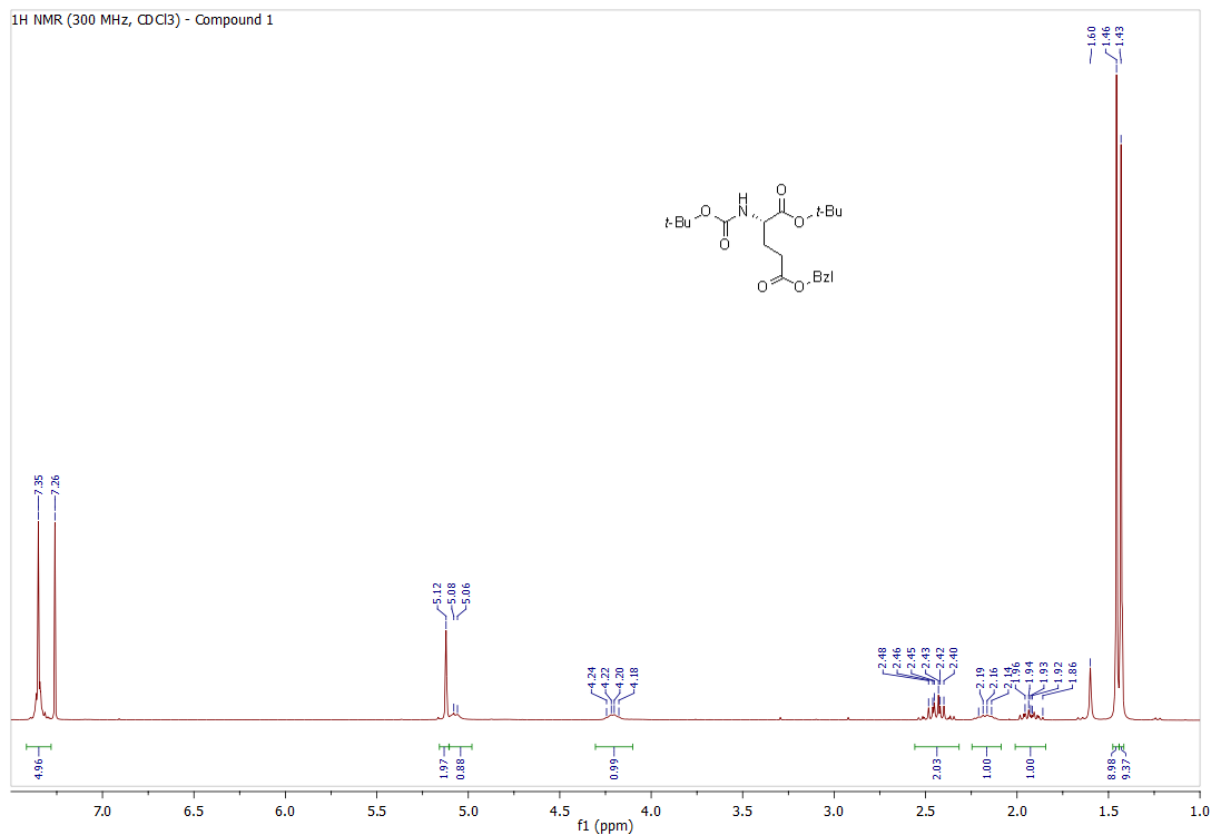
Proton nuclear magnetic resonance ^1H NMR spectras were recorded by the “Laboratoire de Mesures Physiques” of Montpellier University on a Bruker spectrometer at 300 MHz, 400 MHz or 500 MHz. Chemicals shifts (δ) are reported with the solvent resonance as internal standard. Data are reported as follows: chemical shift (δ in ppm), multiplicity (s=singlet, d=doublet, t=triplet, q=quartet, br=broad, m=multiplet), integration, coupling constants (J in Hz) and assignment. Purifications were performed on bench flash chromatography column using silica gel (Merck 60, 230–400 mesh) or with a Biotage instrument Isolera 4 using SNAP KP-SIL flash cartridges. LC/MS system consisted of a Waters Alliance 2690 HPLC, coupled to a ZQ spectrometer (Manchester, UK) fitted with an electrospray source operated in the positive ionization mode (ESI+). All the analyses were carried out using a C18 Chromolith Flash 25 x 4.6 mm column operated at a flow rate of 3 ml/min. A gradient of 0 to 100 % in solvent B was developed over 3 min. Positive-ion electrospray mass spectras were acquired at a solvent flow rate of 100-200 $\mu\text{L}/\text{min}$. Nitrogen was used for both the nebulizing and drying gas. The data were obtained in a scan mode ranging from 200 to 1700 m/z in 0.1 s intervals. A total of 10 scans were summed up to get the final spectrum. High resolution mass spectra (HRMS) were performed by the “Laboratoire de Mesures Physiques” of Montpellier University on a Micromass Q-ToF spectrometer equipped with electrospray source ionization (ESI), using phosphoric acid as an internal standard.

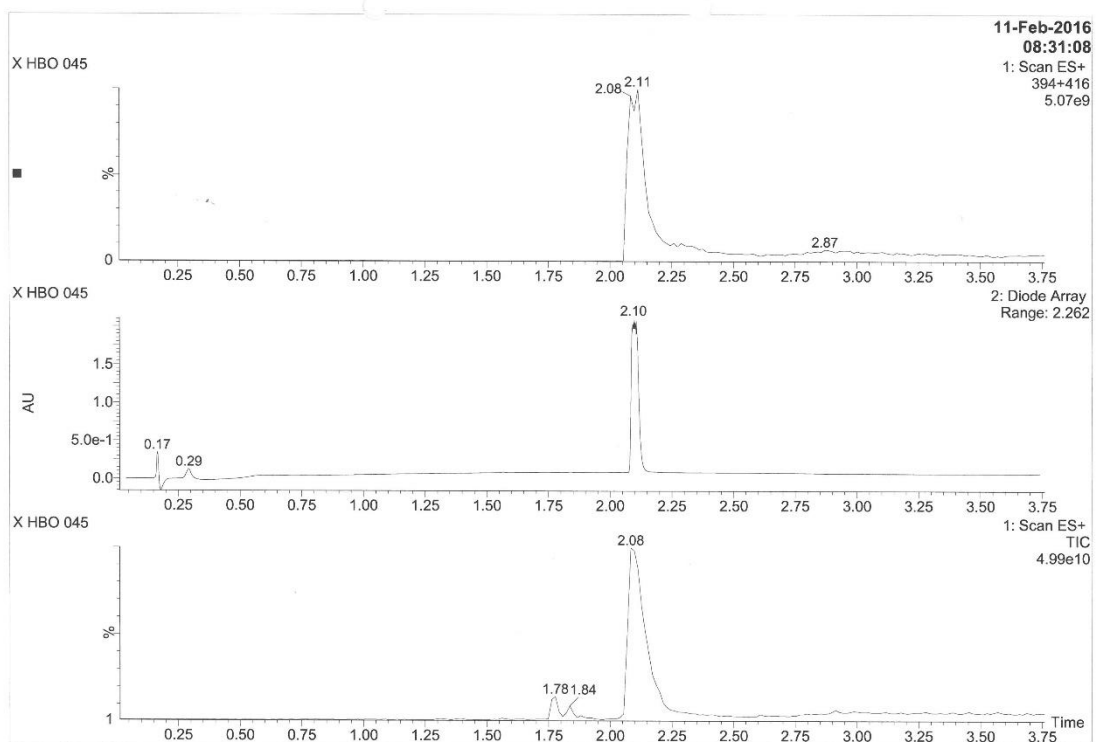
	CysGly-3MH	CysGly-4MMP	γ GluCys-3MH	γ GluCys-4MMP
Matrix effect	0.99	0.52	0.96	1.11
Linearity	Linear	Linear	Linear from C ₀ to C ₈	Linear
Recovery	Adding ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	18 143	3 25	17 135
	TR %	91 101	92 98	101 102
Repeatability (CV %)	5	4	4	4
Interm. Reproduc. (CV %)	4	3	3	3
LODs ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.06	0.03	0.18	0.01
LOQs ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.21	0.09	0.61	0.04

Table SI-1 - Validation of an analytical method and quantification of CysGly-3MH, CysGly-4MMP, γ GluCys-3MH, γ GluCys-4MMP into Sauvignon blanc

γ GluCys precursors identification

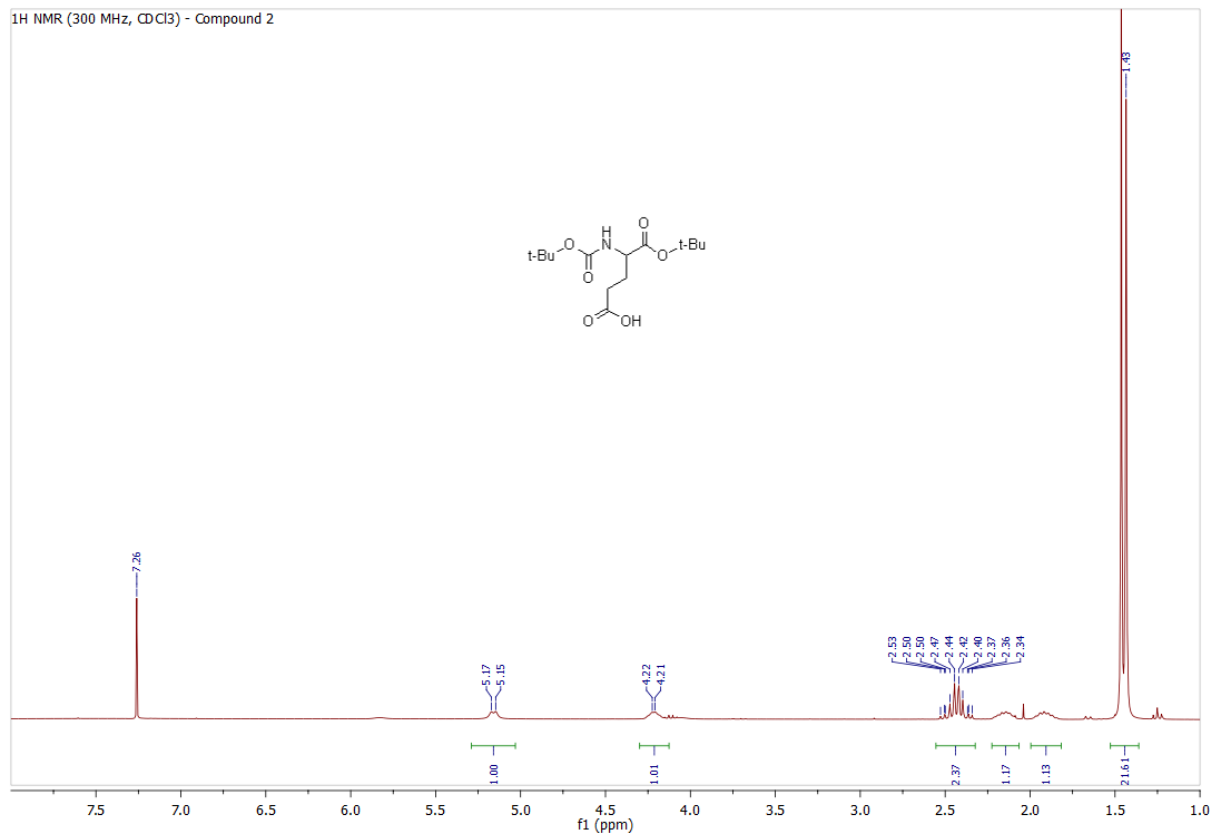
N-Boc-L-glutamic acid γ -benzyl ester α -tert-butyl ester **1**





N-Boc-L-glutamic acid α -tert-butyl ester **2**

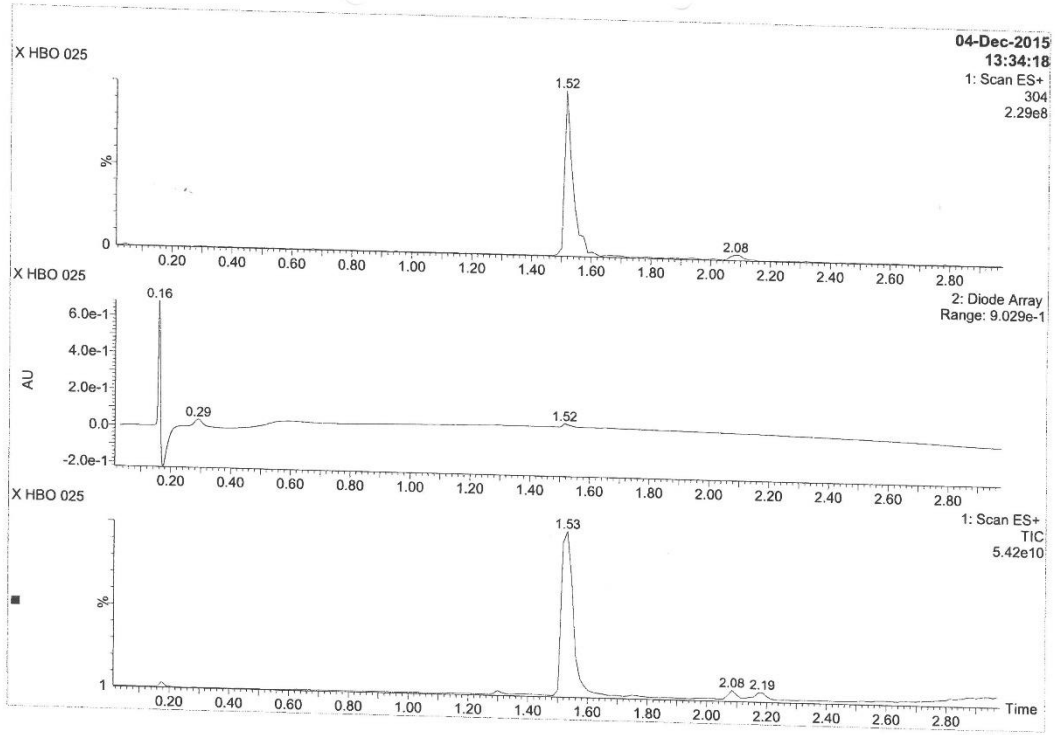
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) - Compound 2



04/12/2015 13:44 #281 P.001/004

To: 00487144866

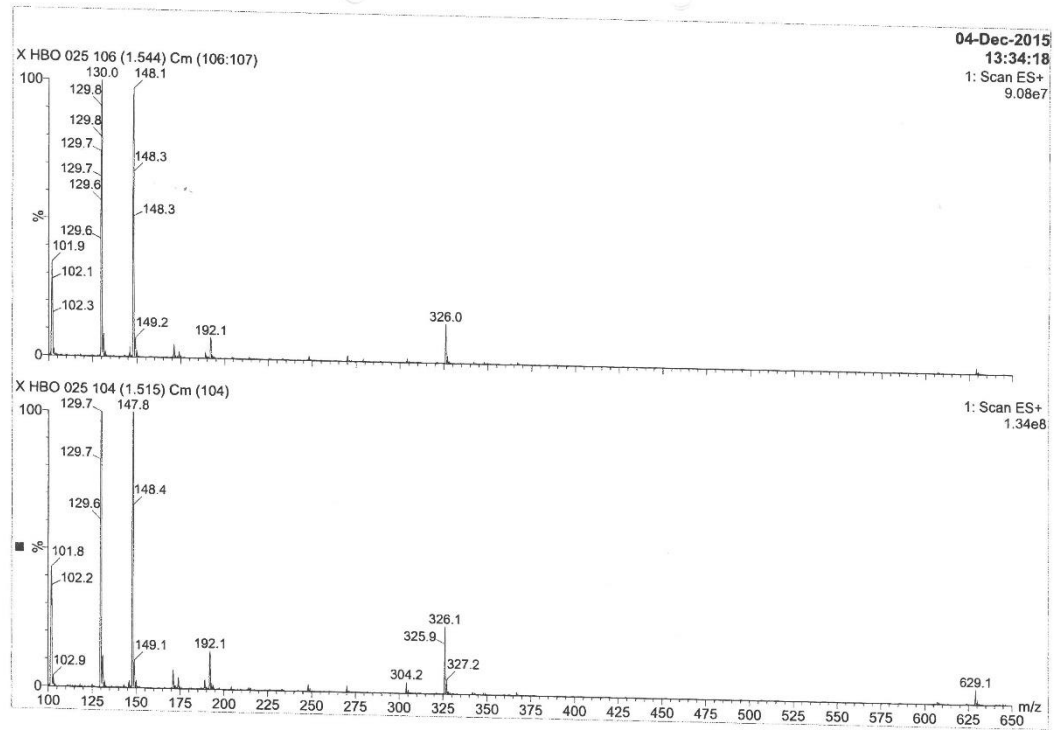
From: I BMN-UMR5247



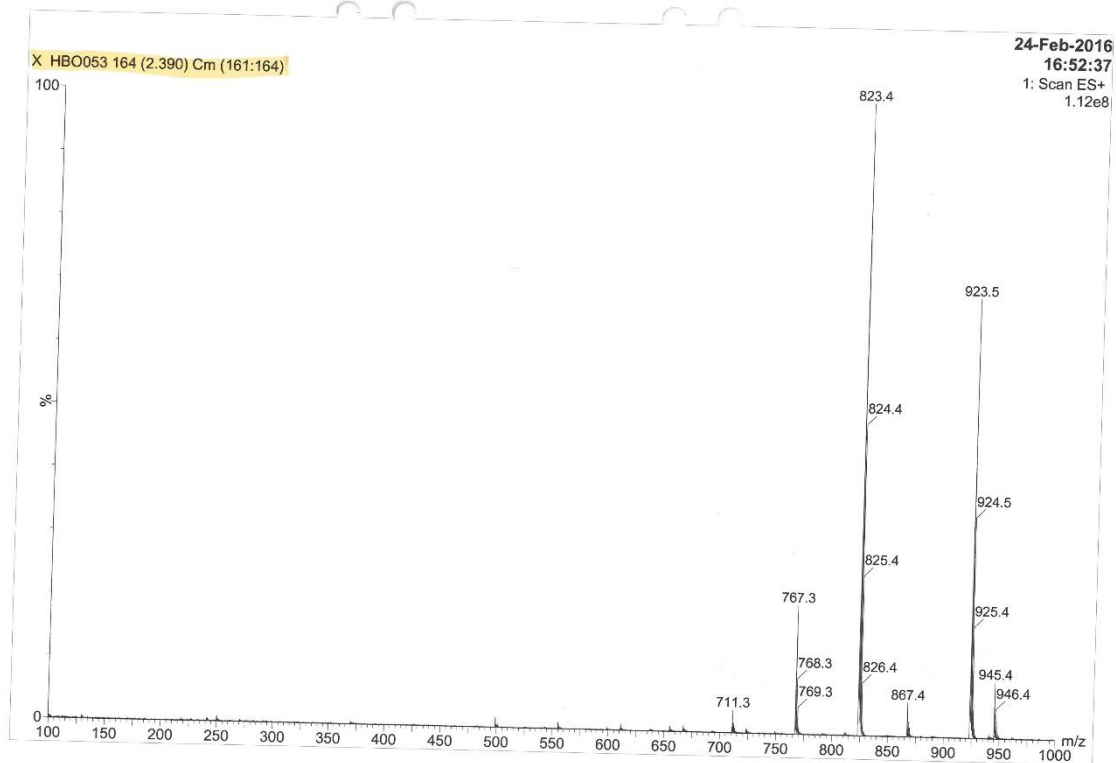
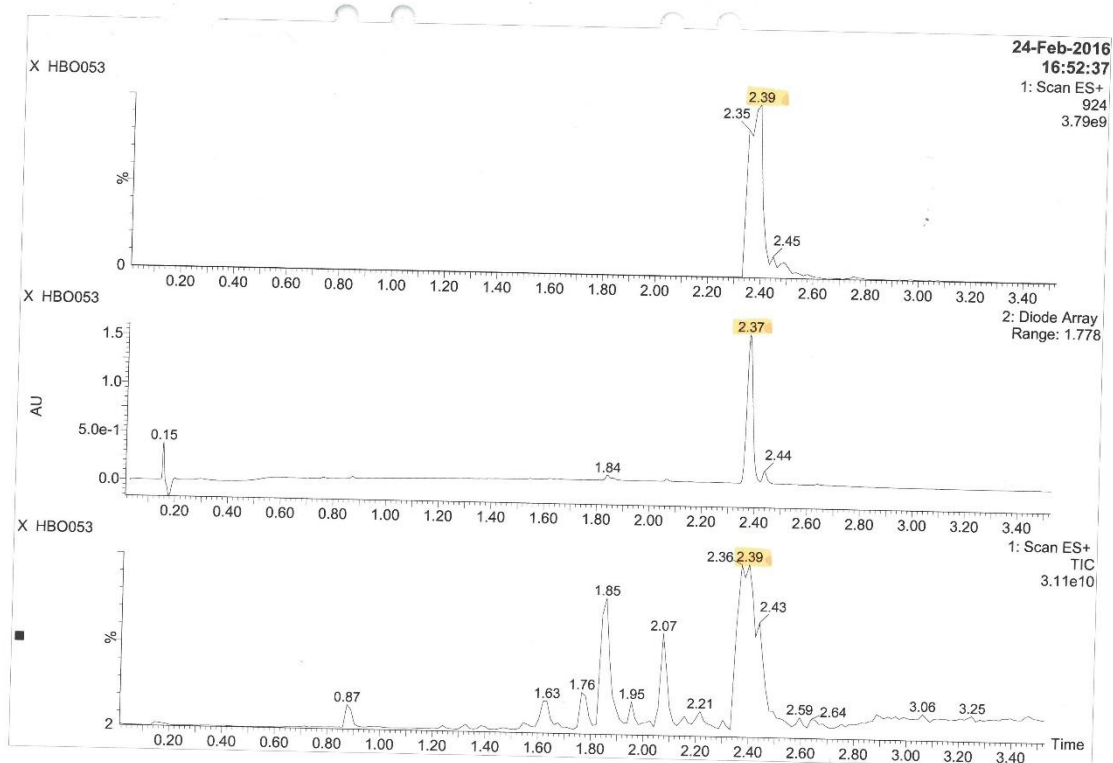
04/12/2015 13:45 #281 P.002

To: 00487144866

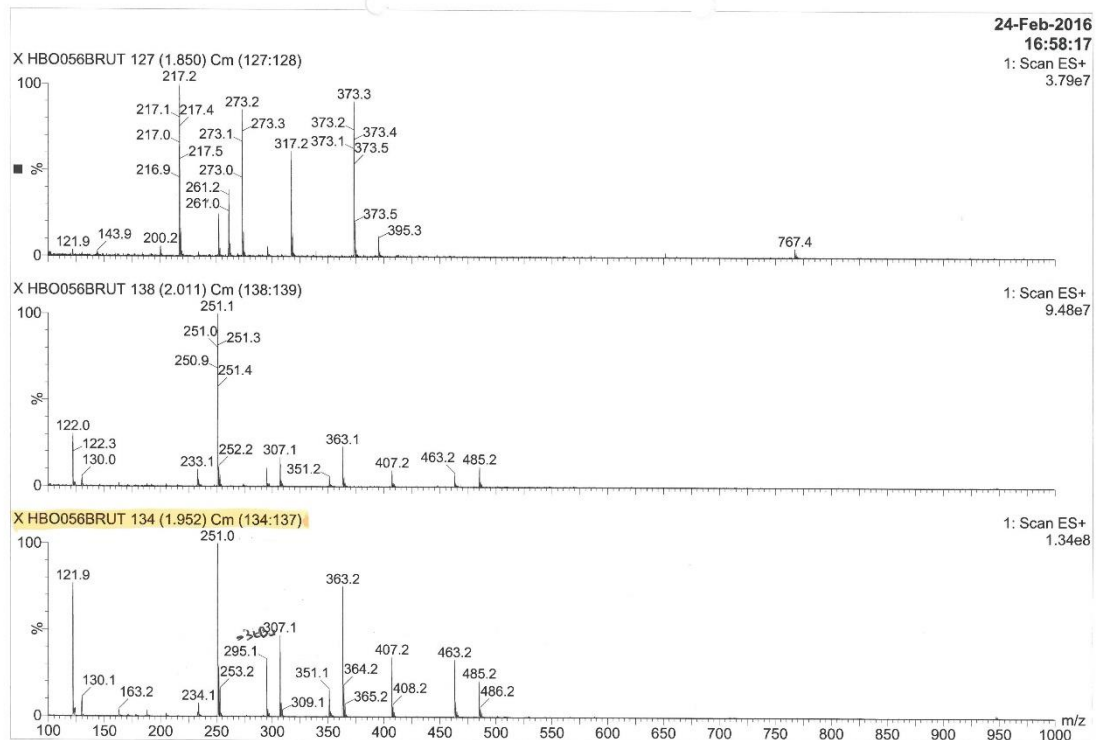
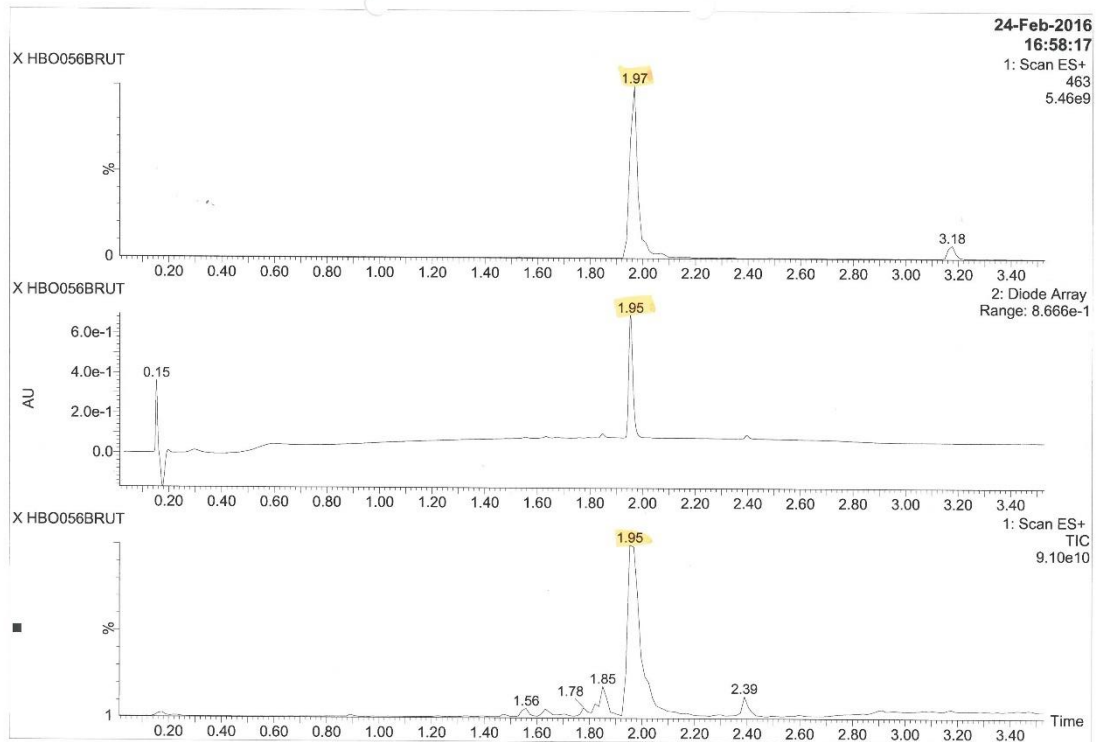
From: I BMN-UMR5247



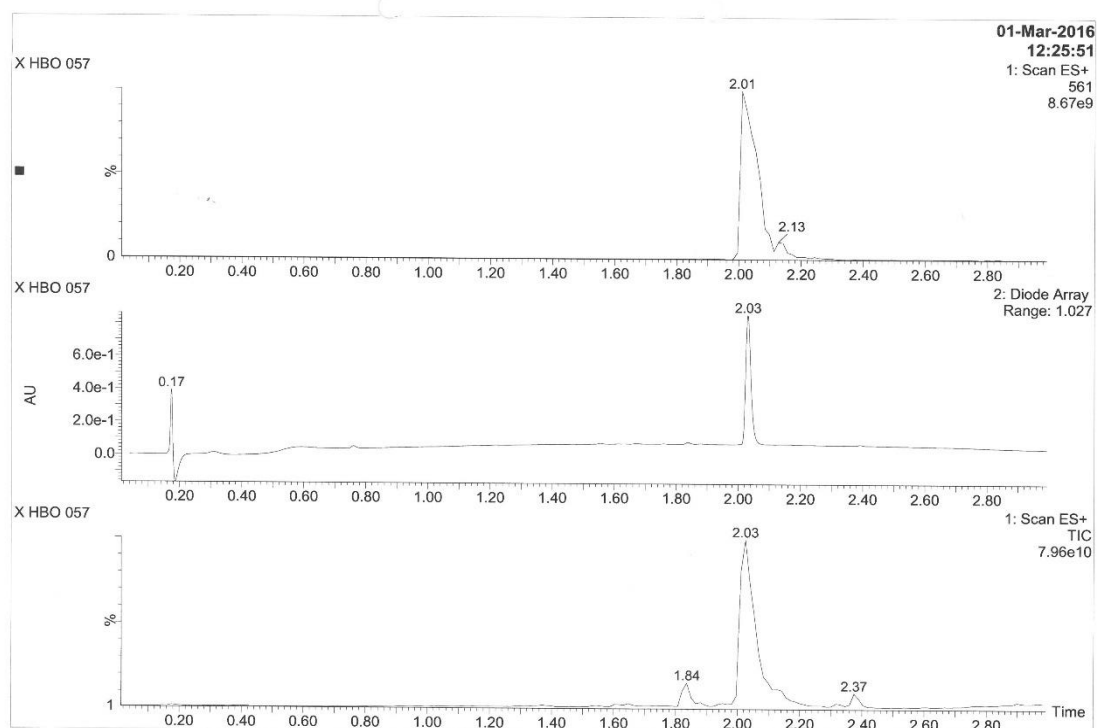
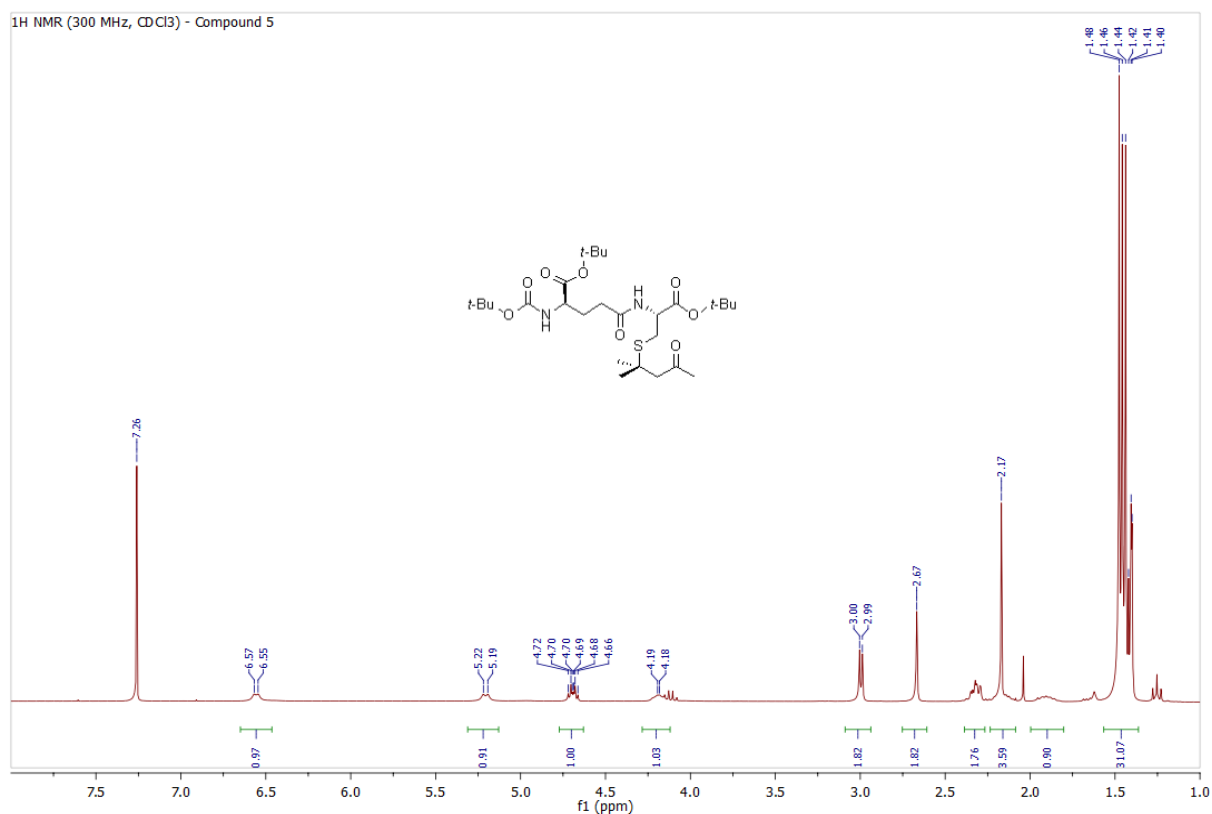
N-(*N*-Boc-*L*- γ -glutamyl)-*L*-cystine di-*tert*-butyl ester **3**

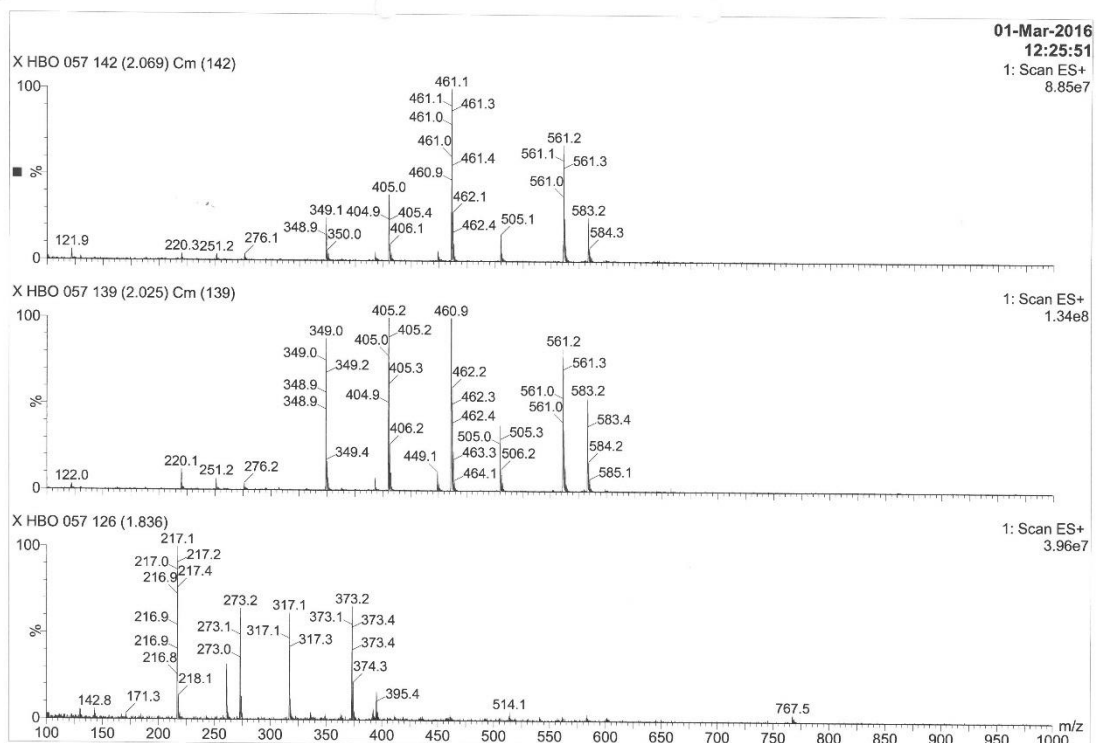


N-(*N*-Boc-*L*- γ -glutamyl)-*L*-cysteine *tert*-butyl ester **4**

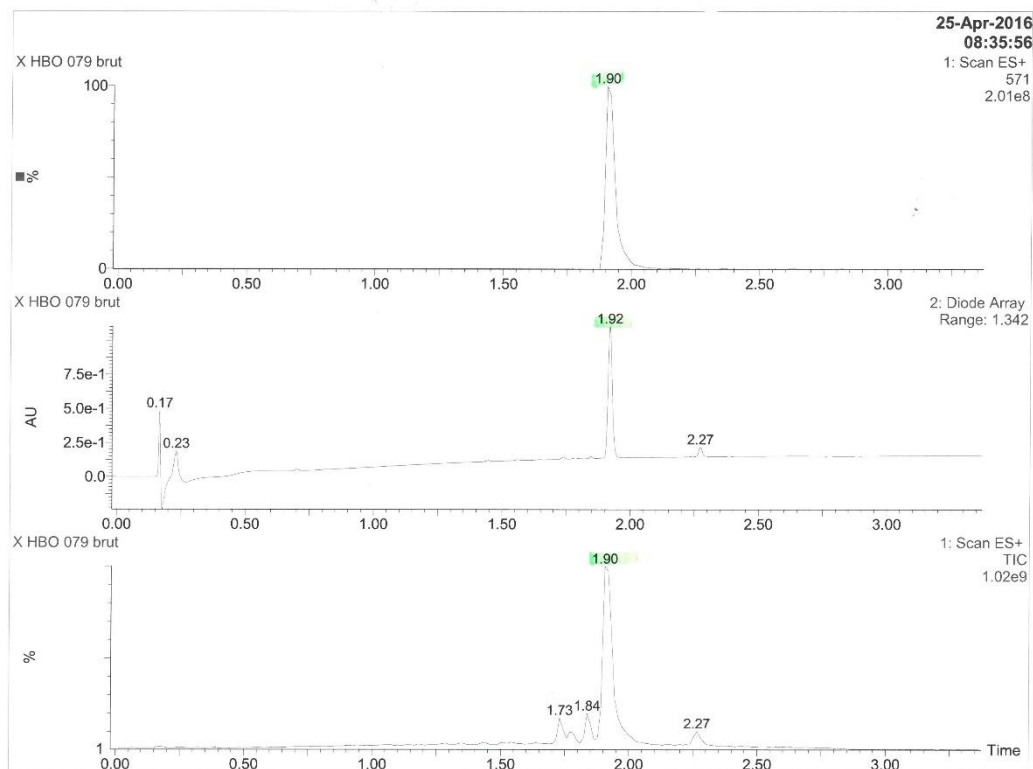


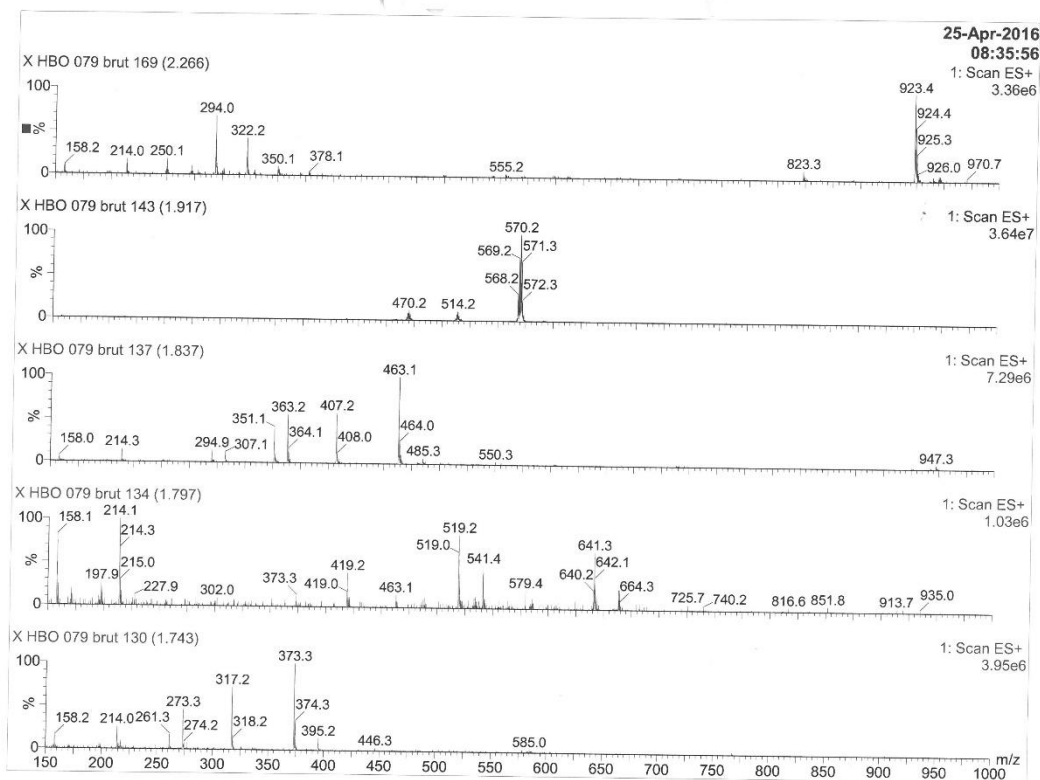
Natural S-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-N-(N-Boc-L-γ-glutamyl)-L-cysteine tert-butyl ester **5**



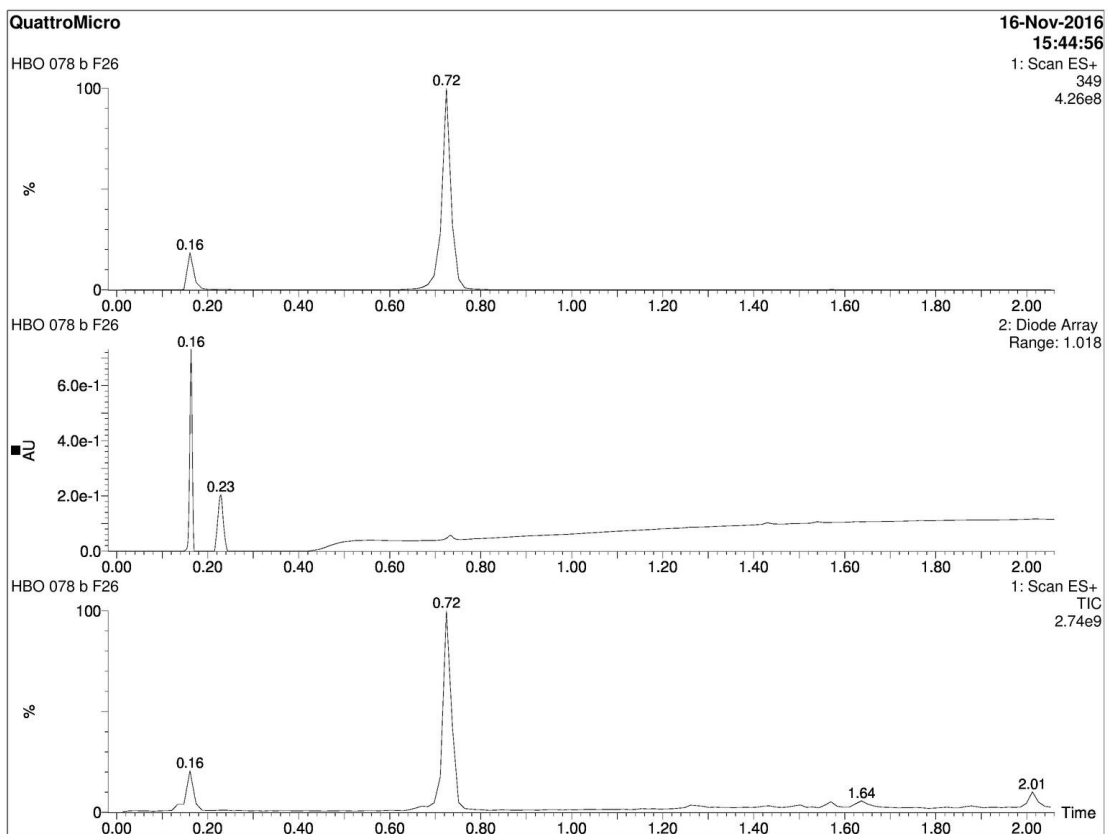


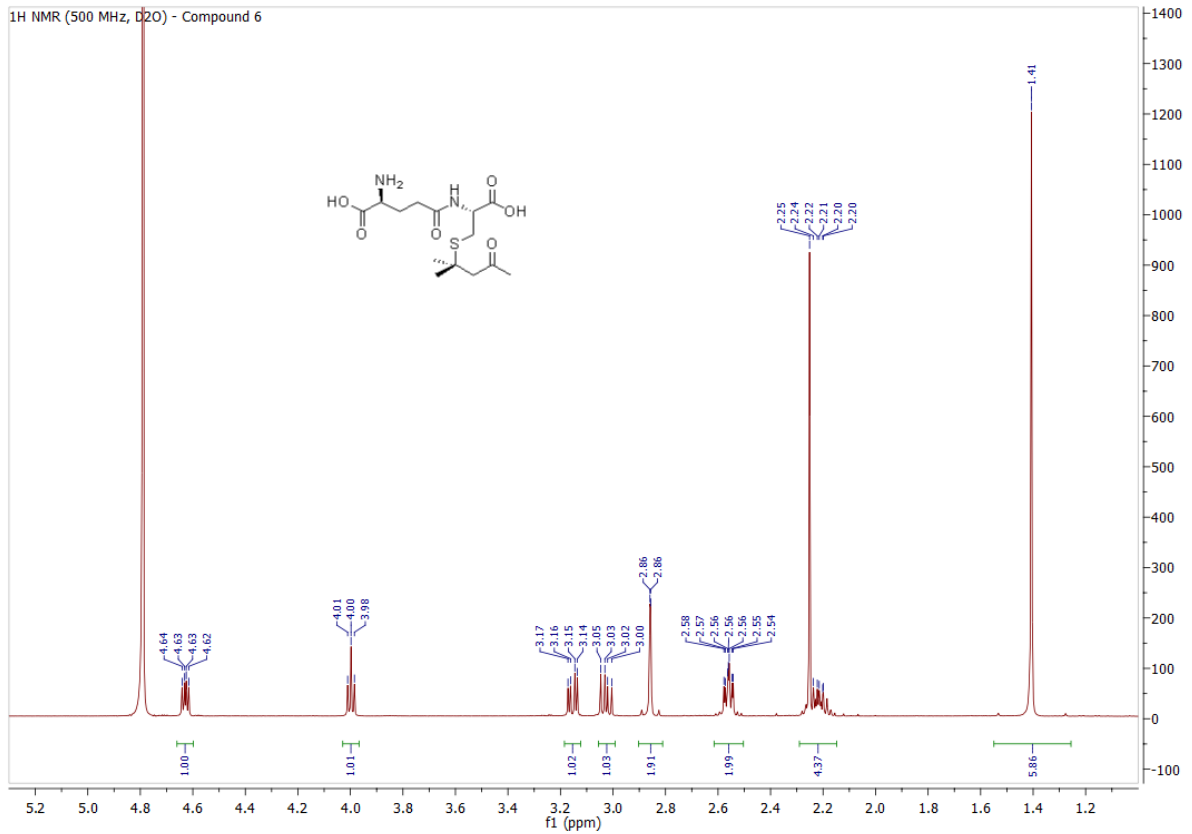
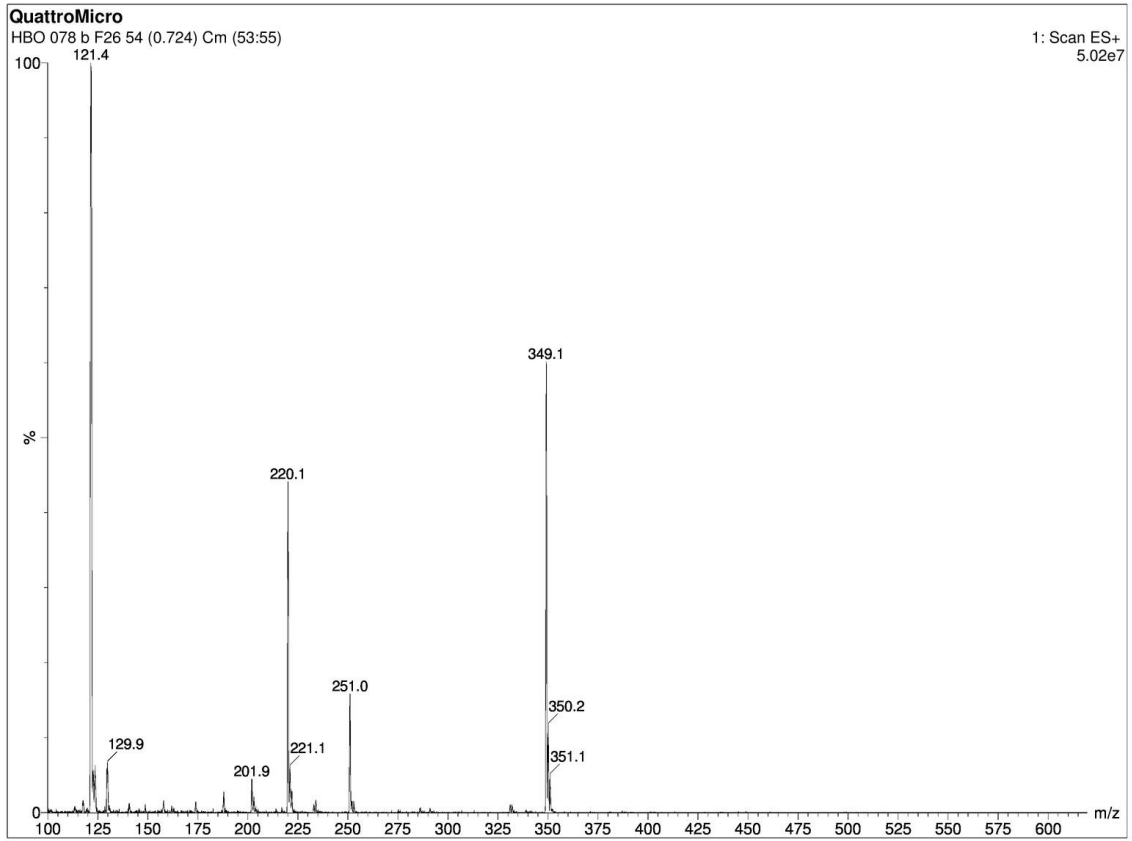
*Deuterated S-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-N-(N-Boc-L-γ-glutamyl)-L-cysteine tert-butyl ester **5-d-10***



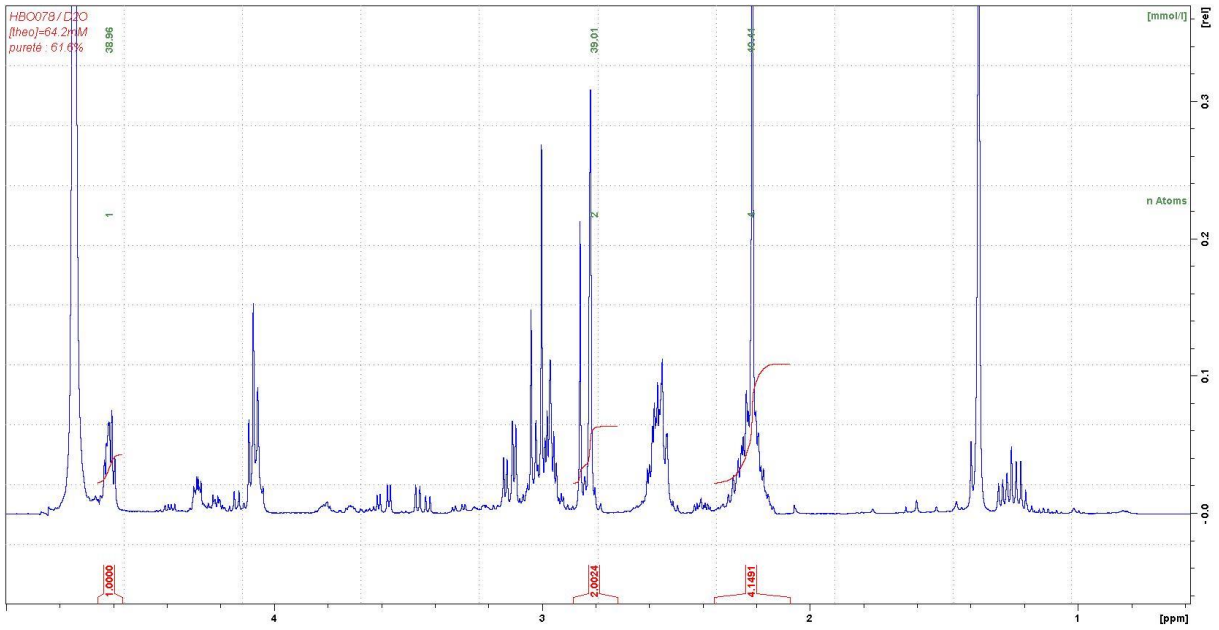
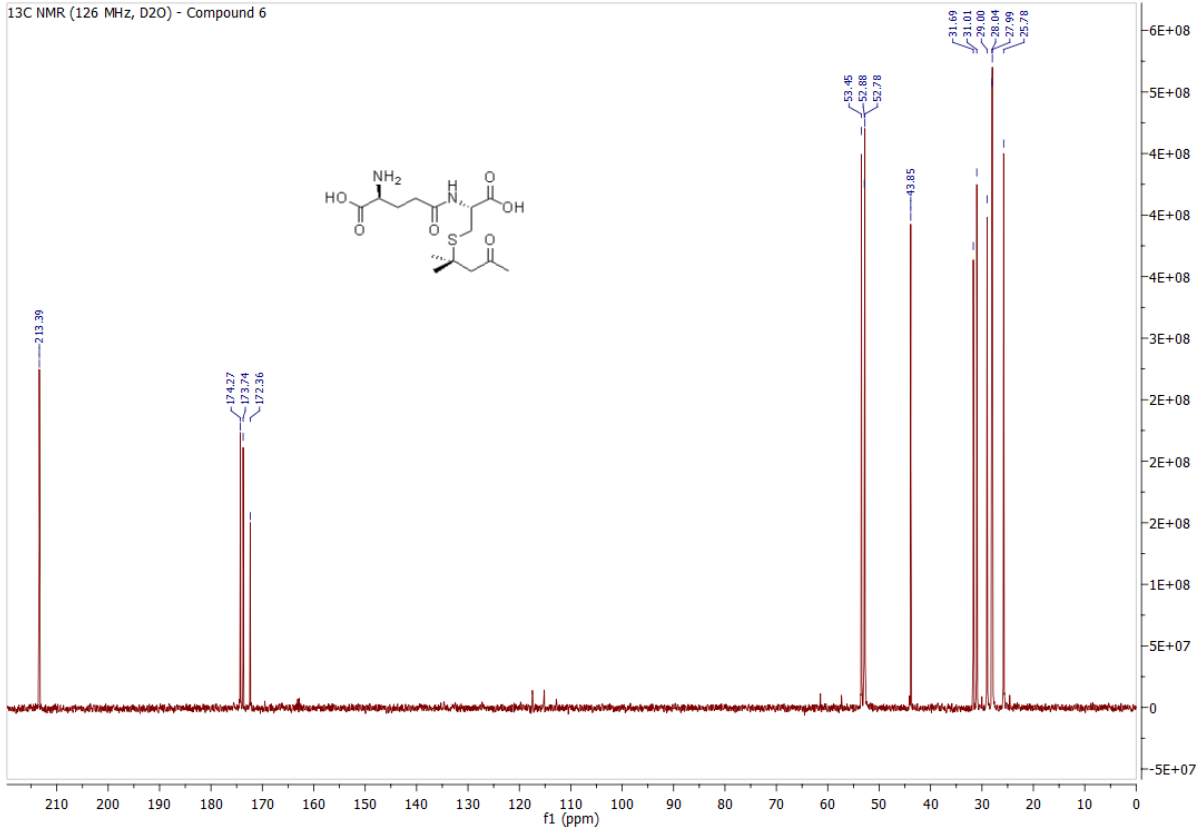


Natural S-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-N-(L-γ-glutamyl)-L-cysteine chloride 6





13C NMR (126 MHz, D2O) - Compound 6



Single Mass Analysis

Tolerance = 1.0 mDa / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

684 formula(e) evaluated with 2 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-100 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1

SYNAPT G2-S#UEB205

HBO078-GC4-2

Z-Cavelier17011102 331 (1.314)

11-Jan-2017

1: TOF MS ES+

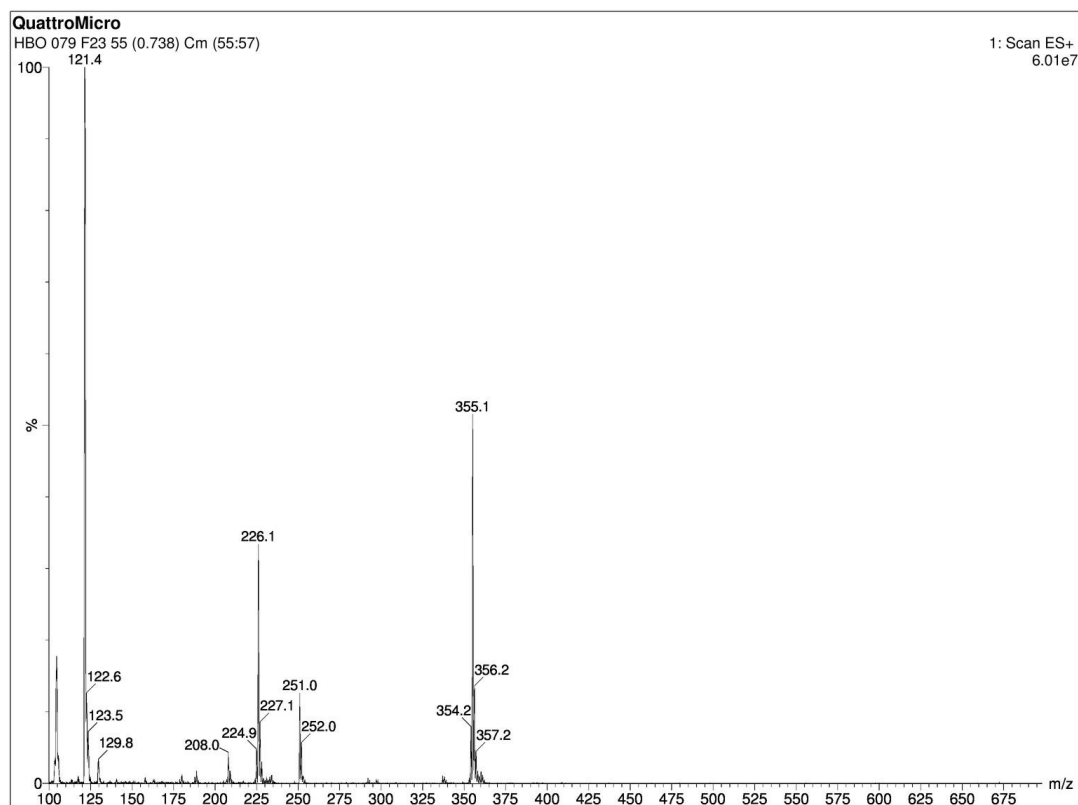
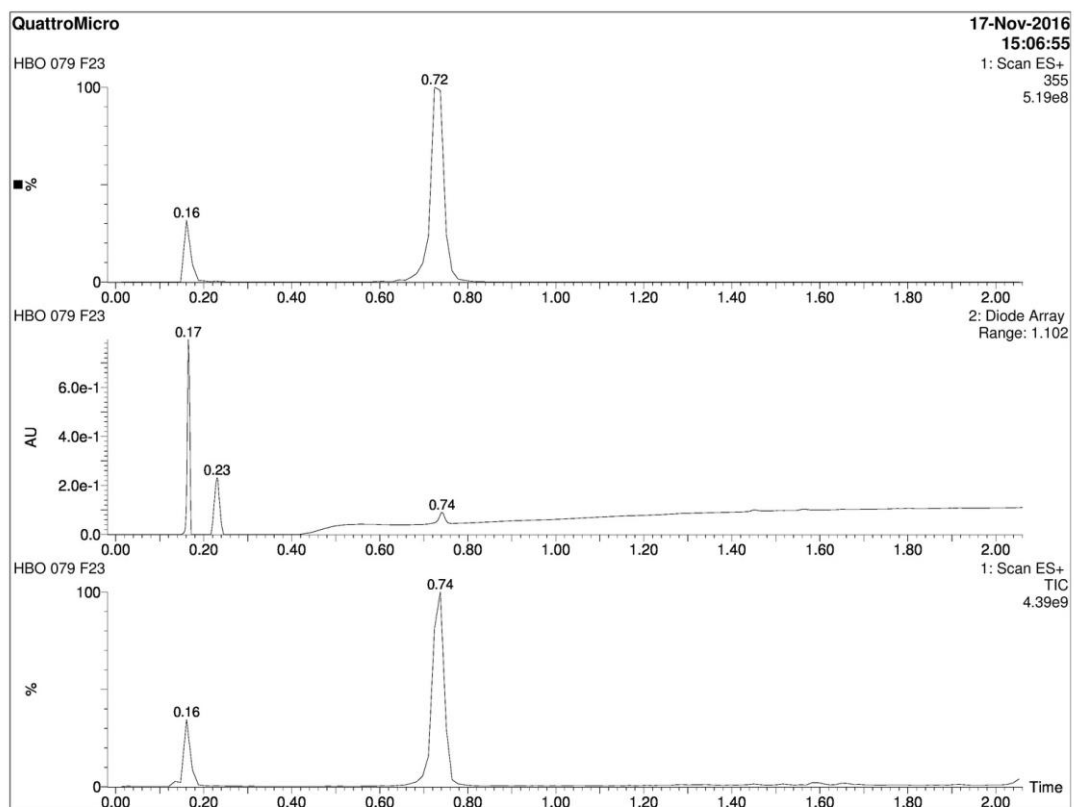
1.14e+006

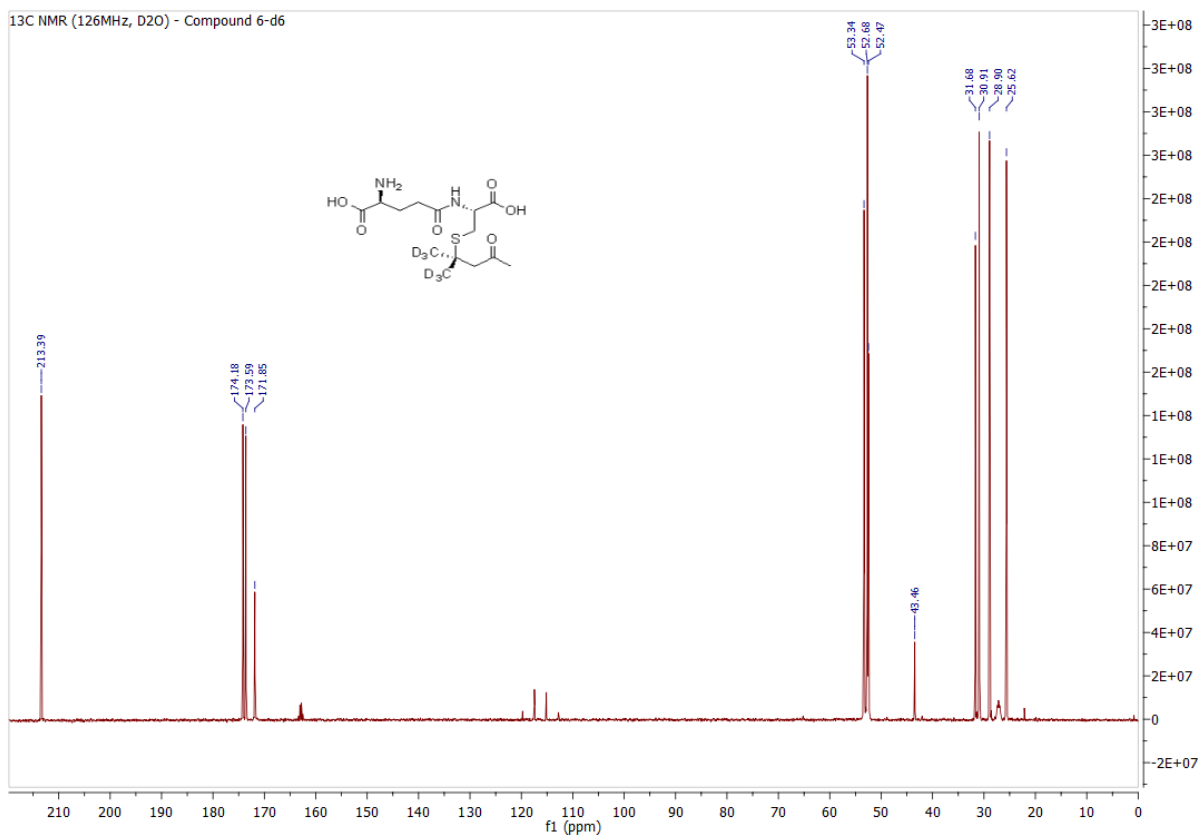
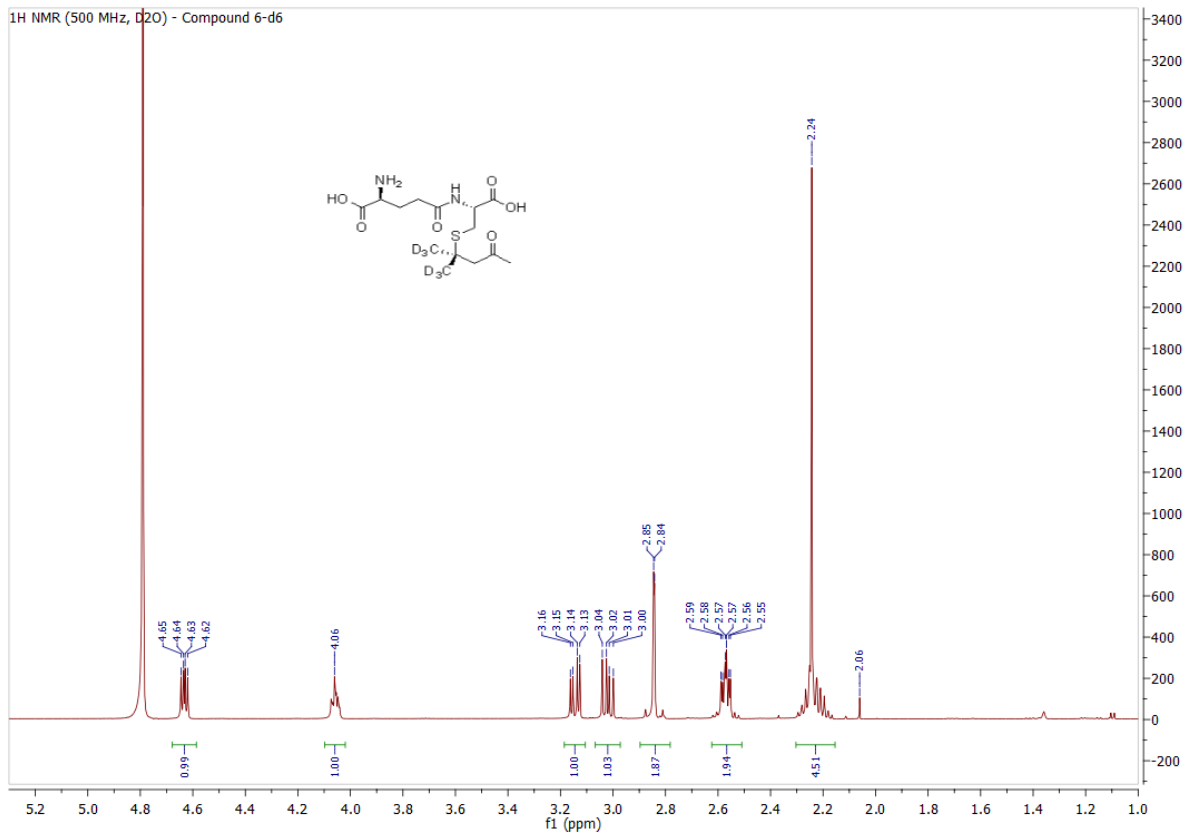


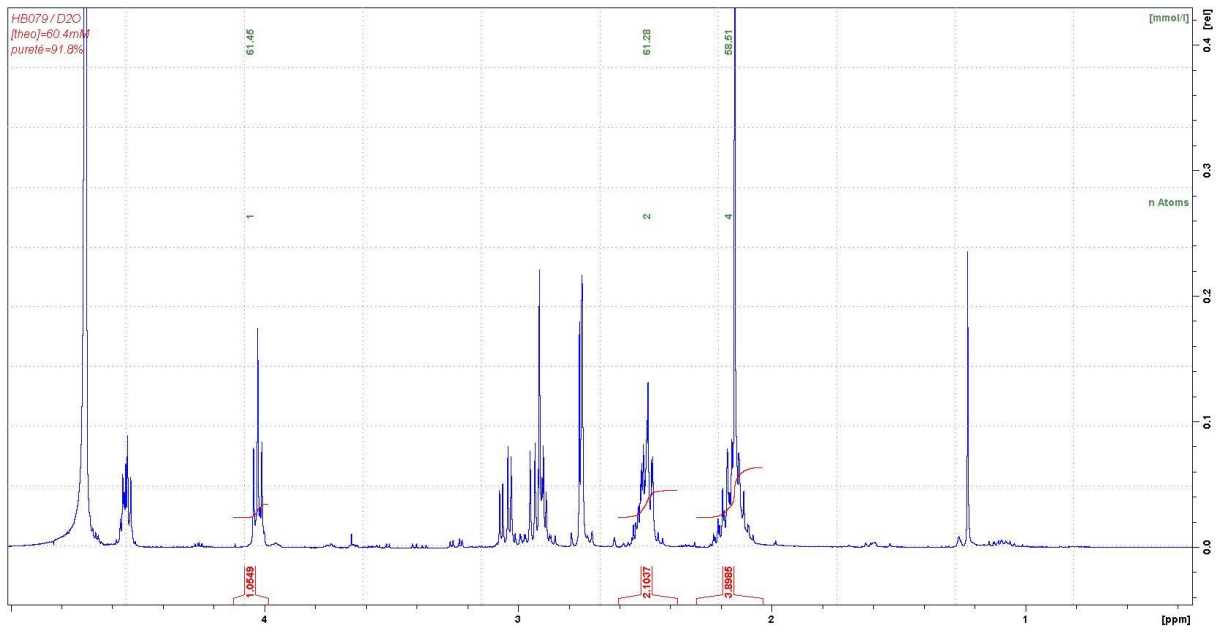
Minimum: -1.5
Maximum: 1.0 1.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf (%)	Formula
349.1428	349.1433	-0.5	-1.4	3.5	519.5	0.401	66.99	C14 H25 N2 O6 S
	349.1420	0.8	2.3	9.5	520.3	1.108	33.01	C11 H17 N12 S

Deuterated S-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-N-(L-γ-glutamyl)-L-cysteine chloride **6-d₆**







Single Mass Analysis

Tolerance = 1.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

2839 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 1H: 0-100 2H: 6-6 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1

SYNAPT G2-S#UEB205

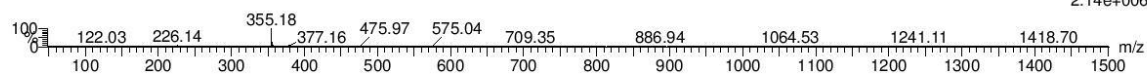
HBO079-GC4D-2

Z-Cavelier17011101 327 (1.300)

11-Jan-2017

1: TOF MS ES+

2.14e+006

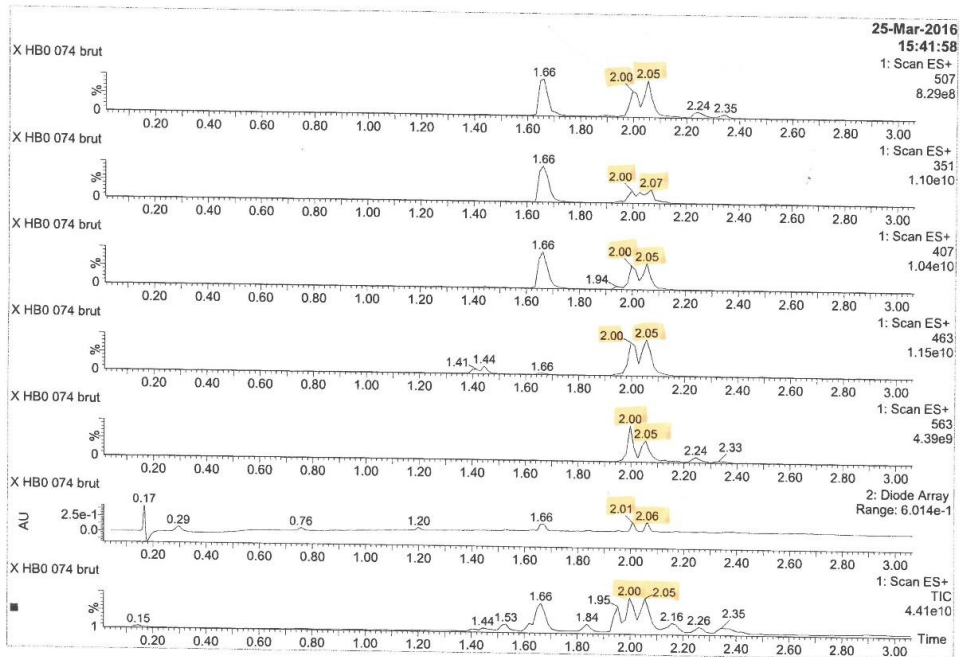


Minimum: -1.5
Maximum: 1.0 1.0 50.0

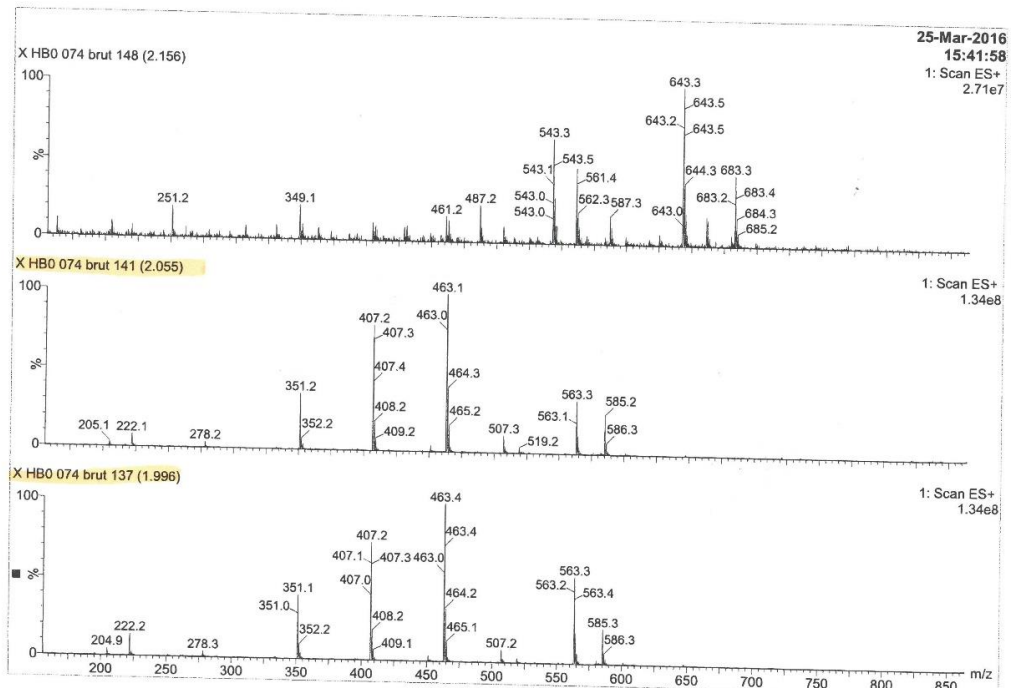
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf (%)	Formula
355.1813	355.1810	0.3	0.8	3.5	966.1	n/a	n/a	C14 1H19 2H6 N2 O6 S

Natural S-3-(hexan-1-ol)-N-(N-Boc-L-γ-glutamyl)-L-cysteine tert-butyl ester 7

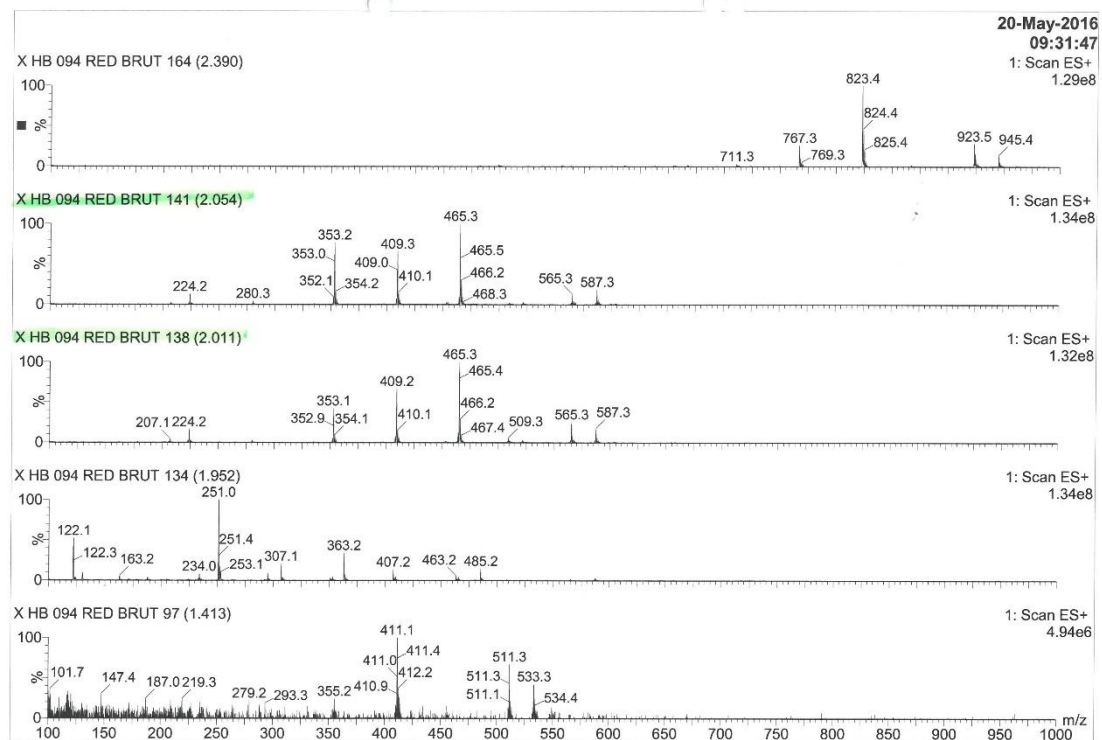
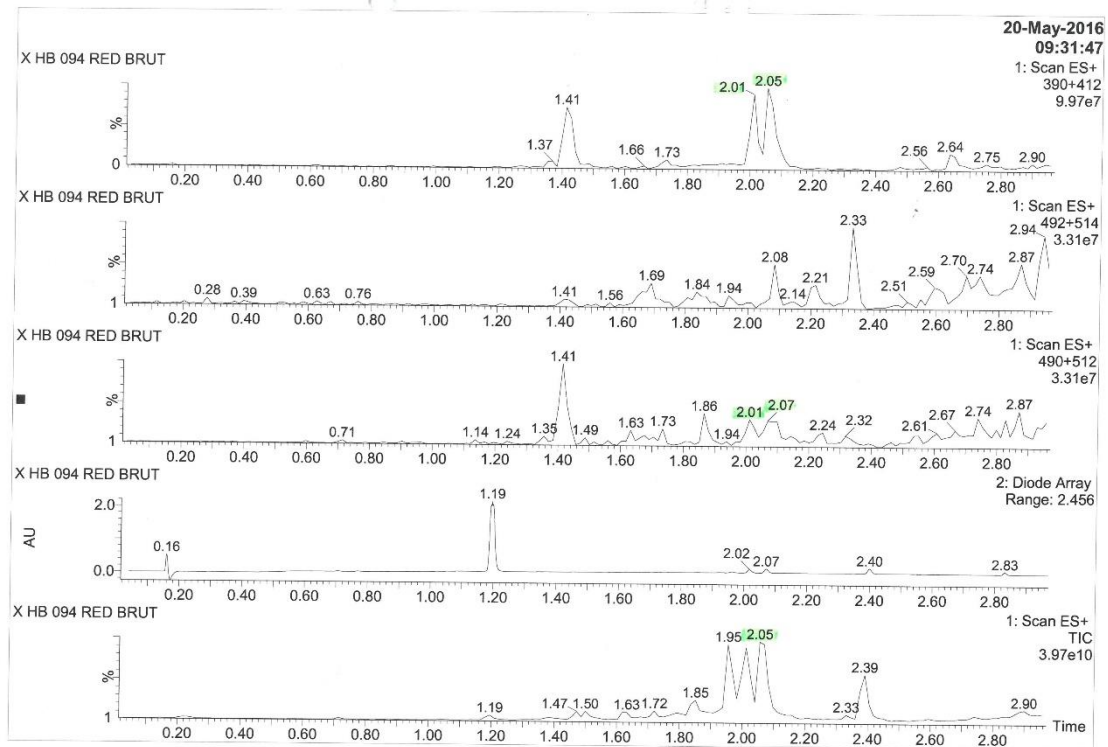
25/03/2016 16:15 #455 P.001/015
 Te:00487144868
 From: BHM-UMR5247



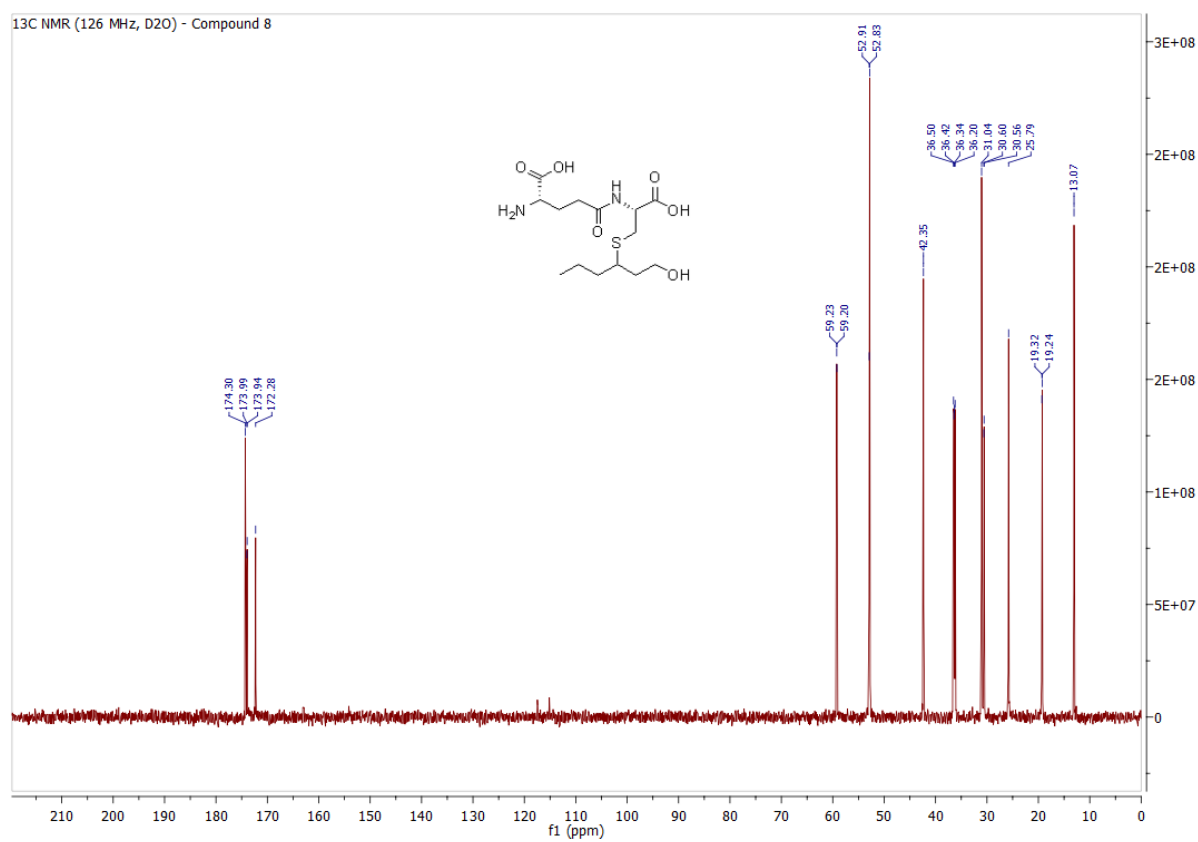
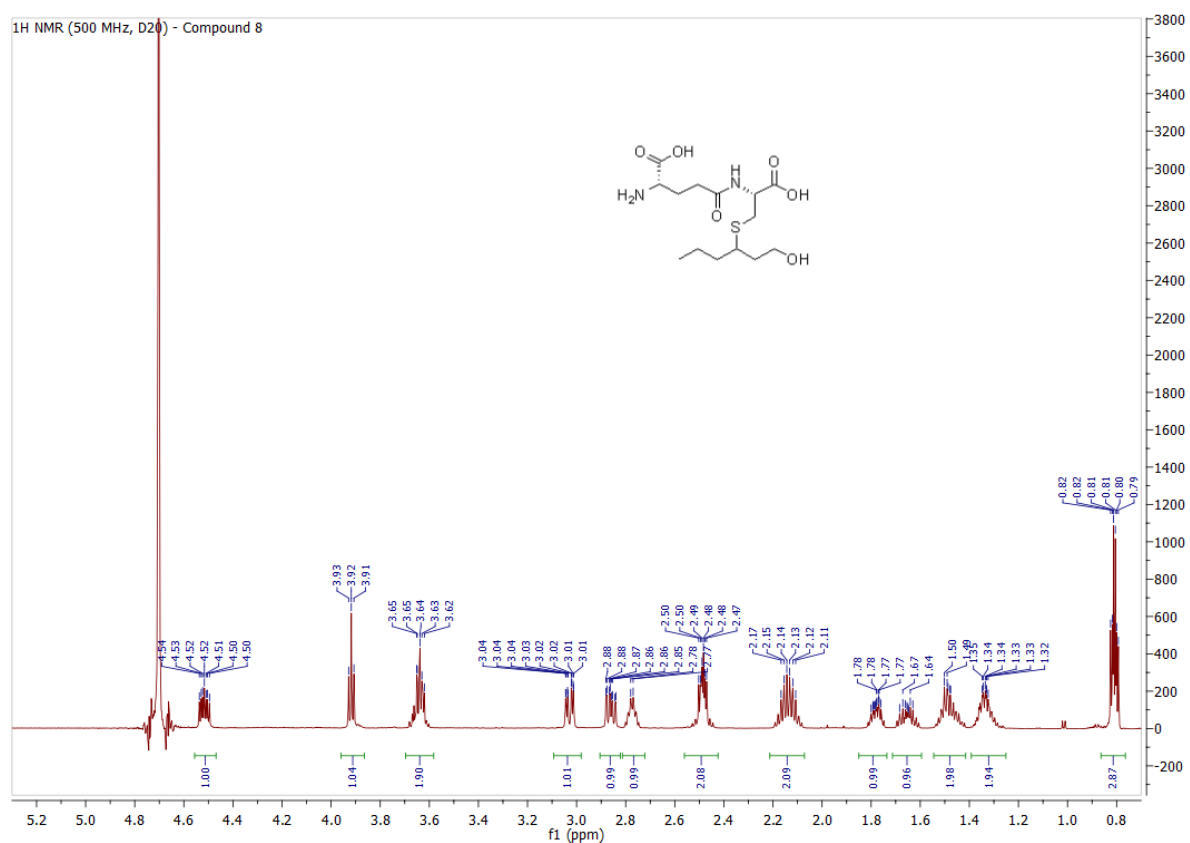
25/03/2016 16:15 #455 P.003/015
 Te:00487144868
 From: BHM-UMR5247

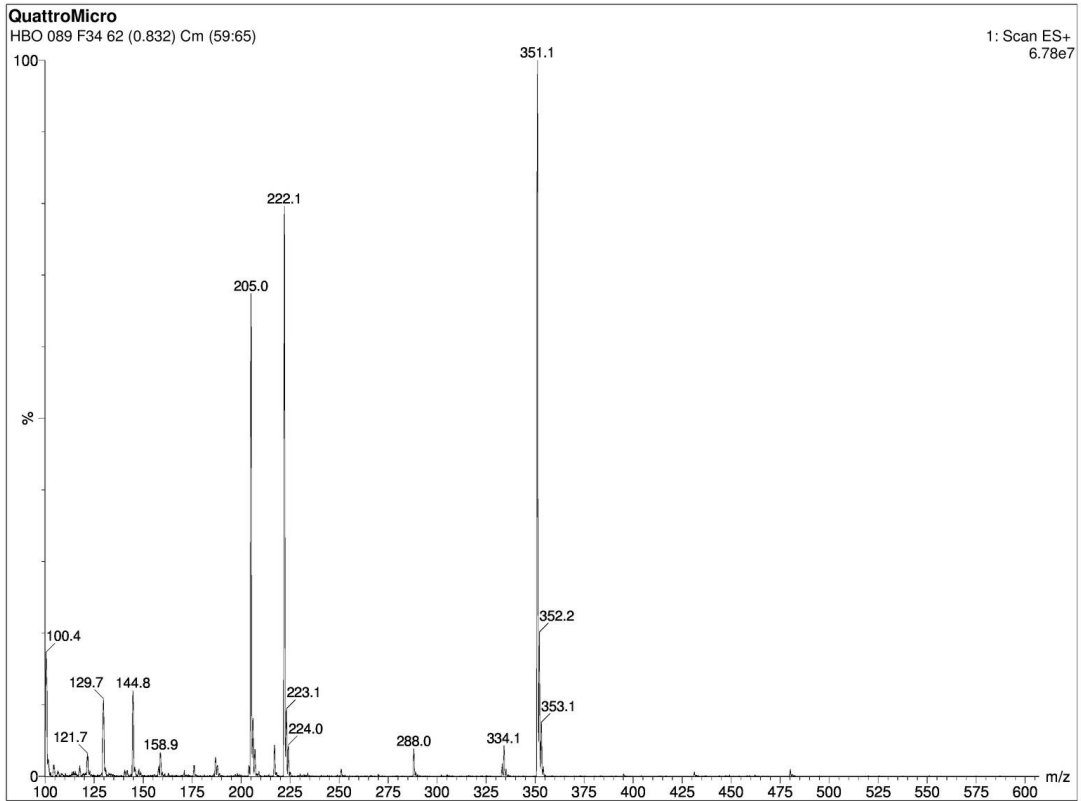
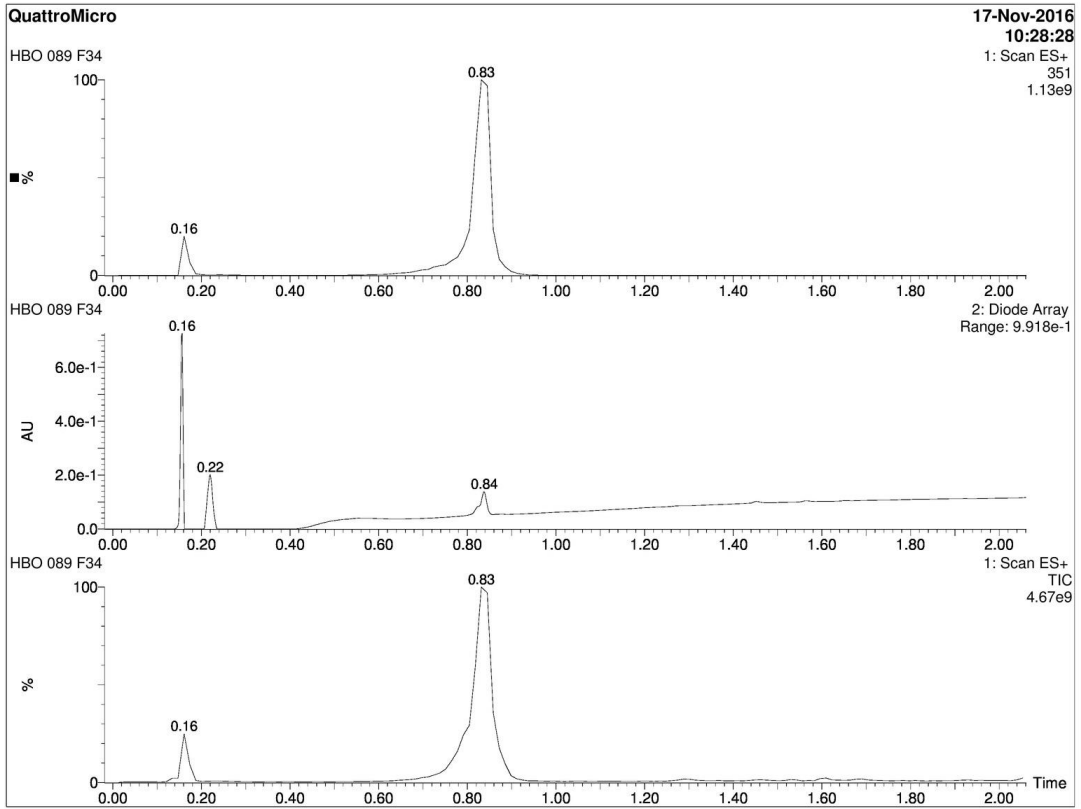


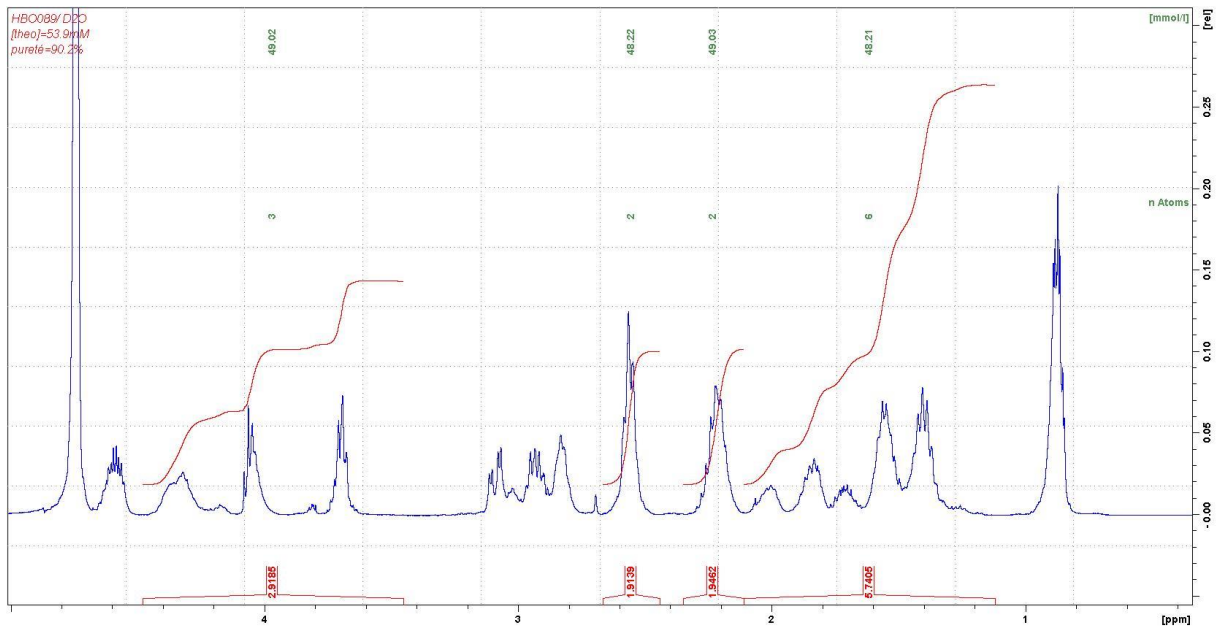
Deuterated S-3-(hexan-1-ol)-N-(N-Boc-L-γ-glutamyl)-L-cysteine tert-butyl ester **7-d₂**



Natural S-3-(hexan-1-ol)-N-(L-γ-glutamyl)-L-cysteine chloride **8**







Single Mass Analysis

Tolerance = 1.0 mDa / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

698 formula(e) evaluated with 2 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-100 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1

SYNAPT G2-S#UEB205

HBO089-GC3-1

Z-Cavelier17011103 360 (1.430)

11-Jan-2017

1: TOF MS ES+

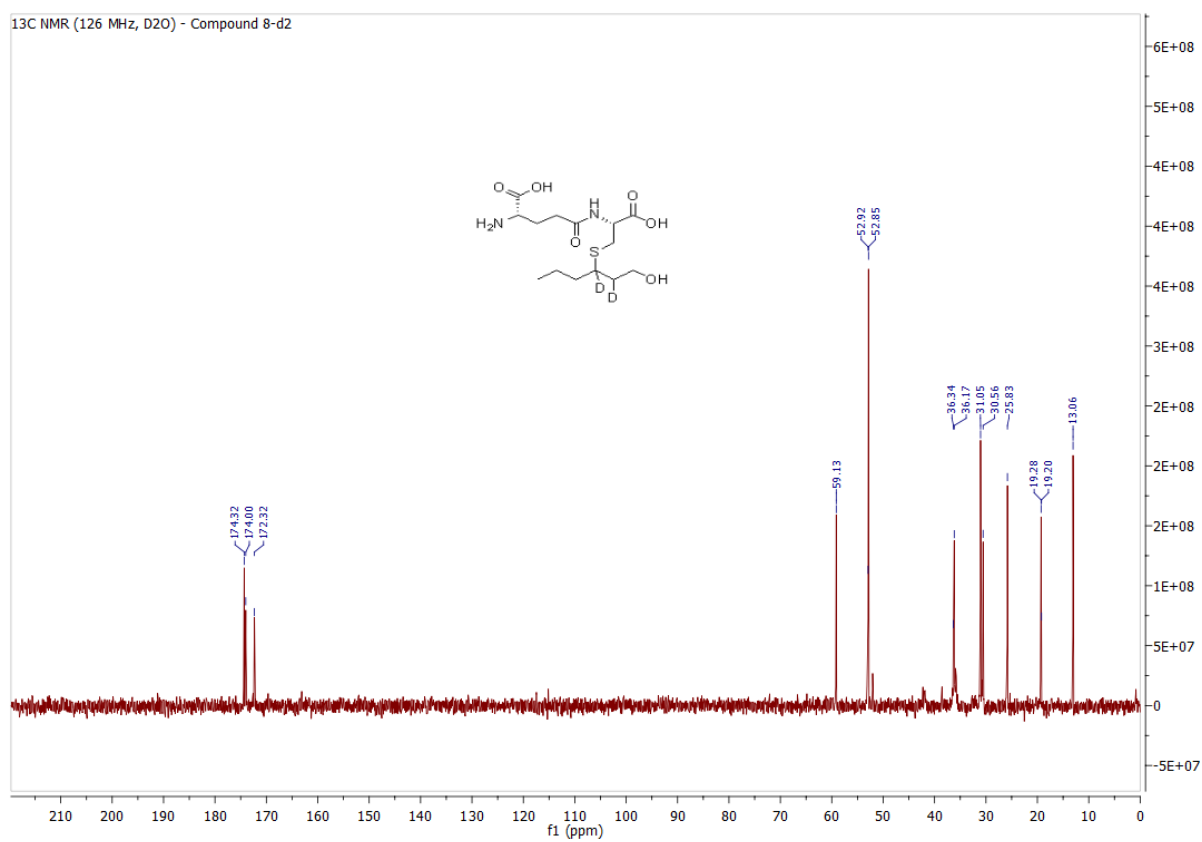
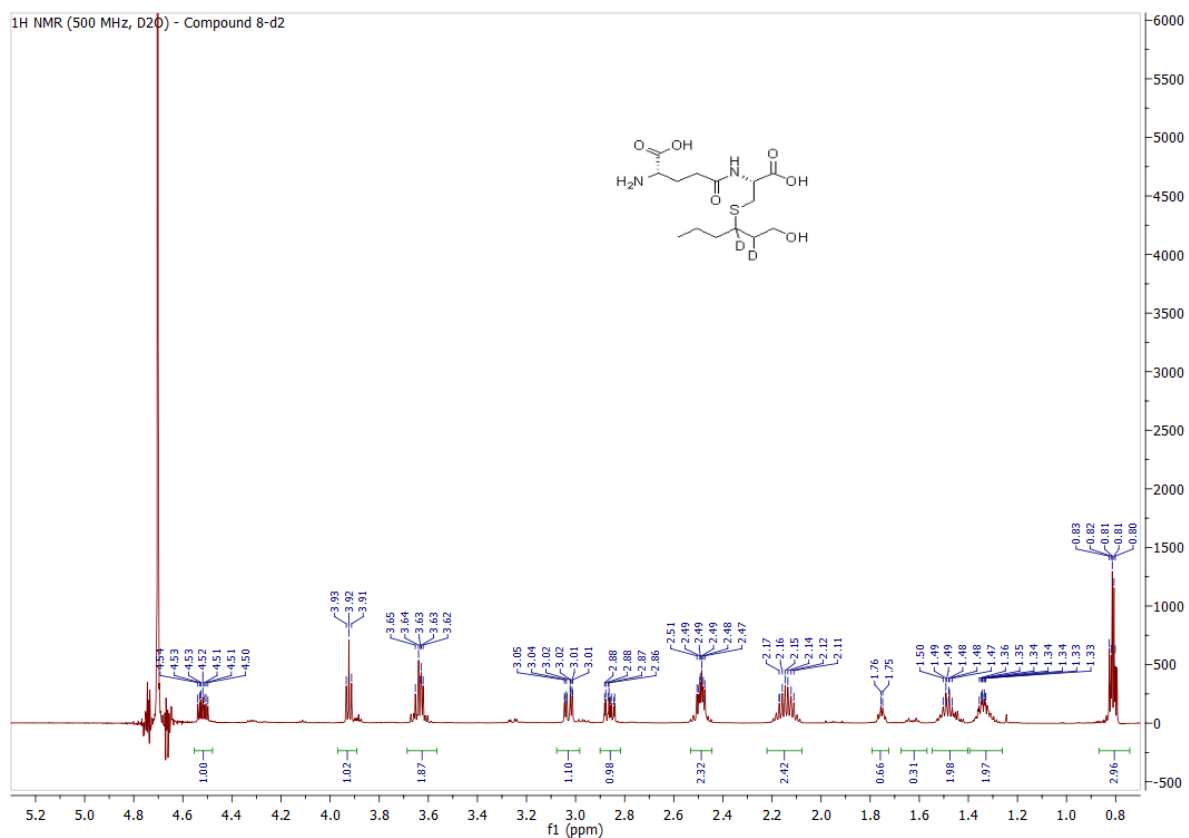
1.89e+006

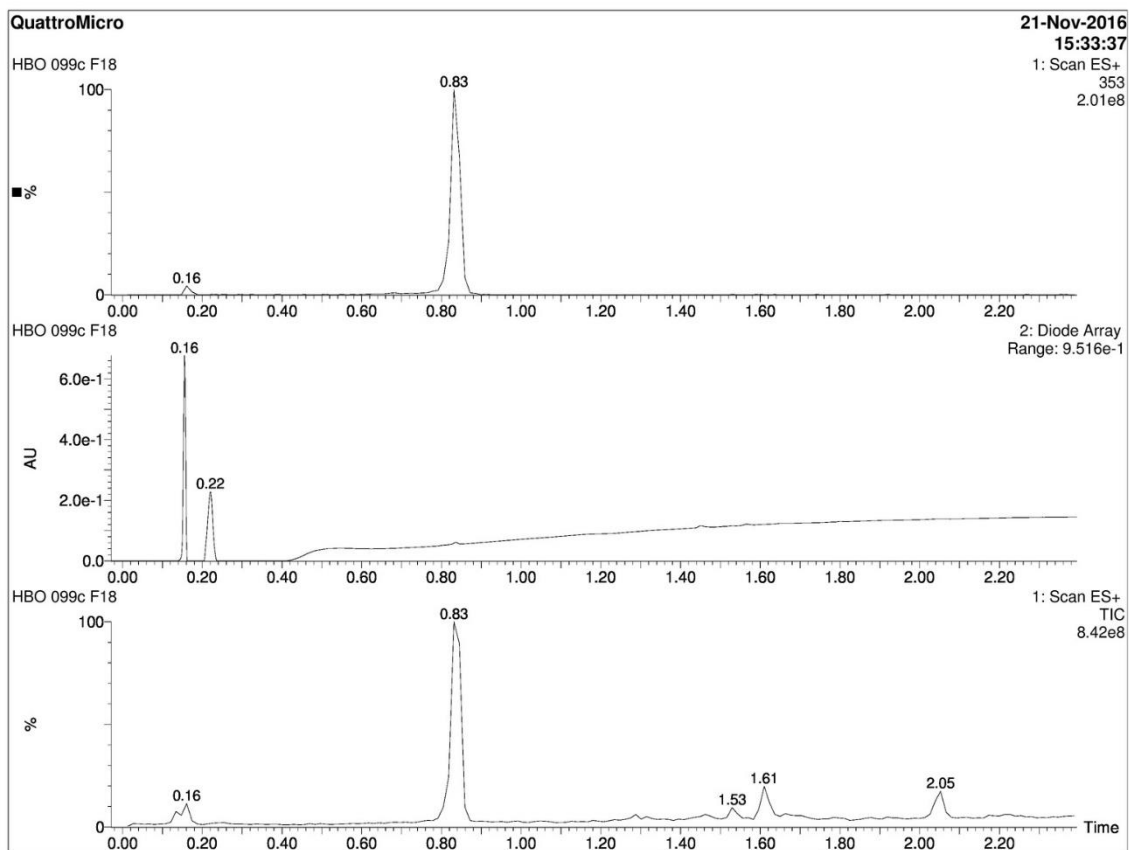
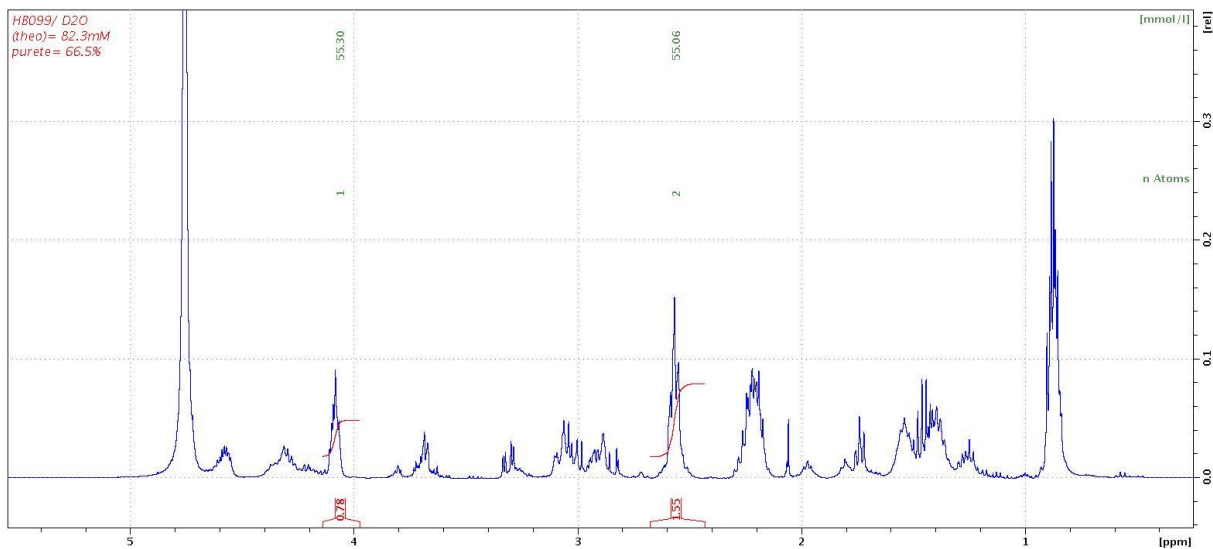


Minimum: -1.5
Maximum: 1.0 1.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf (%)	Formula
351.1594	351.1590	0.4	1.1	2.5	803.7	0.051	95.05	C14 H27 N2 O6 S
	351.1603	-0.9	-2.6	7.5	806.7	3.006	4.95	C15 H23 N6 O2 S

Deuterated S-3-(hexan-1-ol)-N-(L-γ-glutamyl)-L-cysteine chloride **8-d₂**

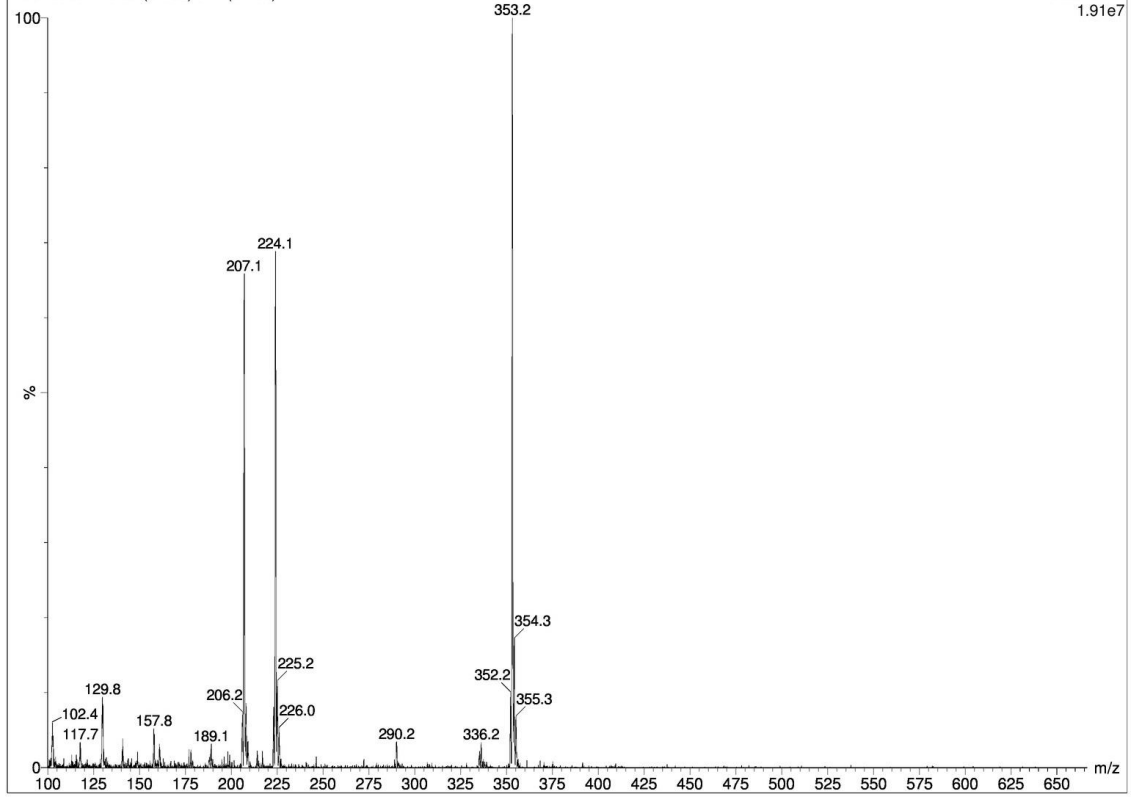




QuattroMicro

HBO 099c F18 62 (0.832) Cm (61:63)

1: Scan ES+
1.91e7



Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 1.0 PPM / DBE: min = -1.0, max = 100.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

6612 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

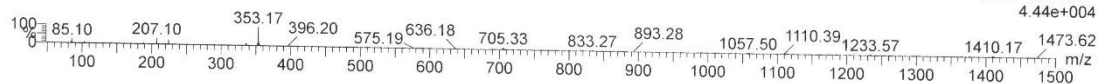
Elements Used:

C: 0-100 N: 0-20 O: 0-20 S: 0-1 H: 0-100 2H: 2-2

SYNAPT G2-S#UEB205
Z-JM16120105 354 (1.407)

HBO099-GC3D-1

01-Dec-2016
1: TOF MS ES+
4.44e+004

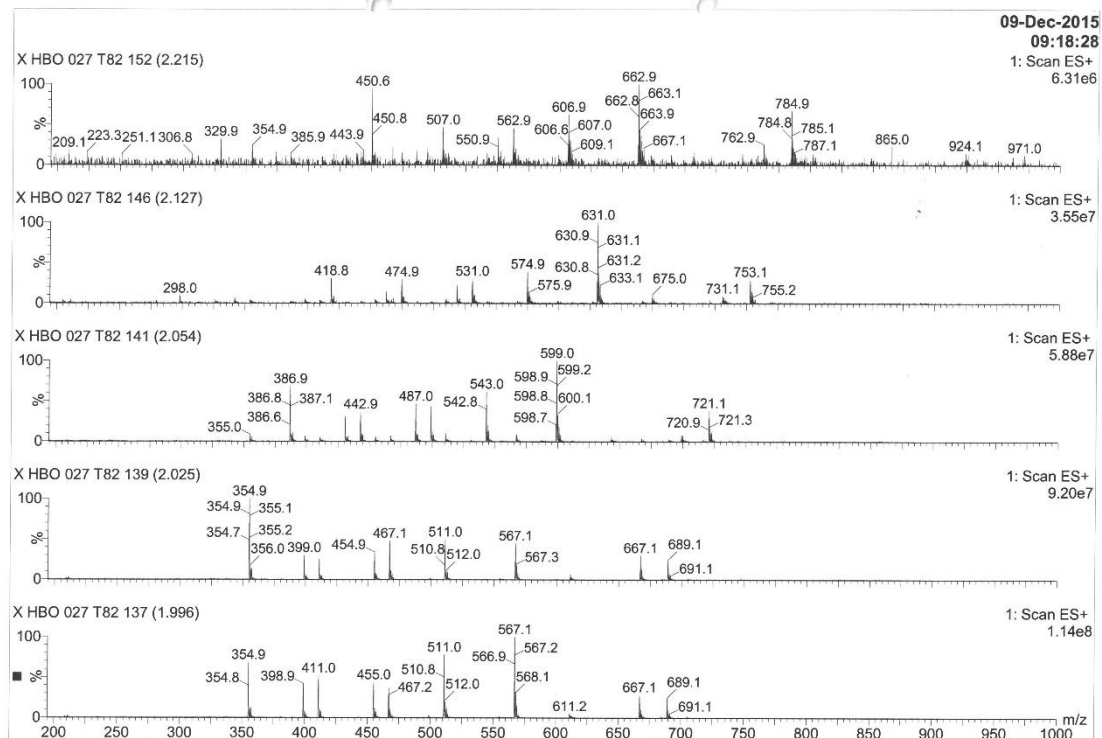
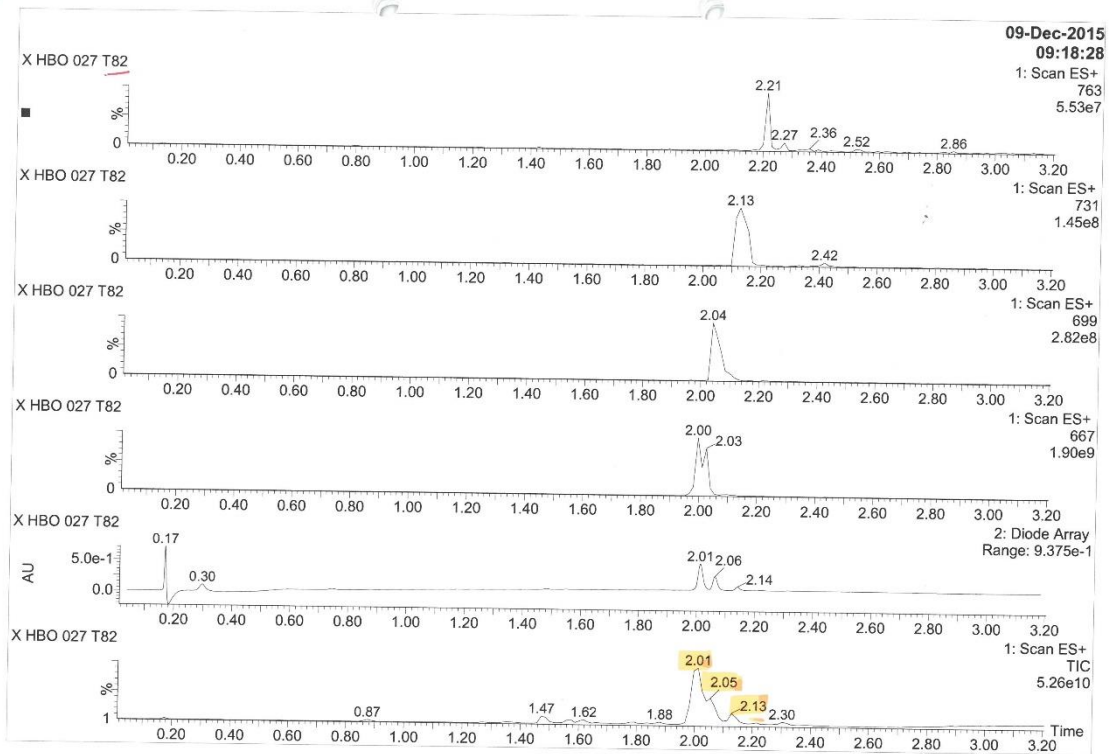


Minimum: -1.0
Maximum: 100.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
353.1712	353.1715	-0.3	-0.8	2.5	544.5	0.000	100.00	C14 N2 O6 S 1H25 2H2
	353.1714	-0.2	-0.6	-0.5	561.8	17.313	0.00	C6 N8 O9 1H21 2H2

CysGly precursors identification

N-N'-di-Boc-L-cystinyl-glycine tert-butyl ester 9

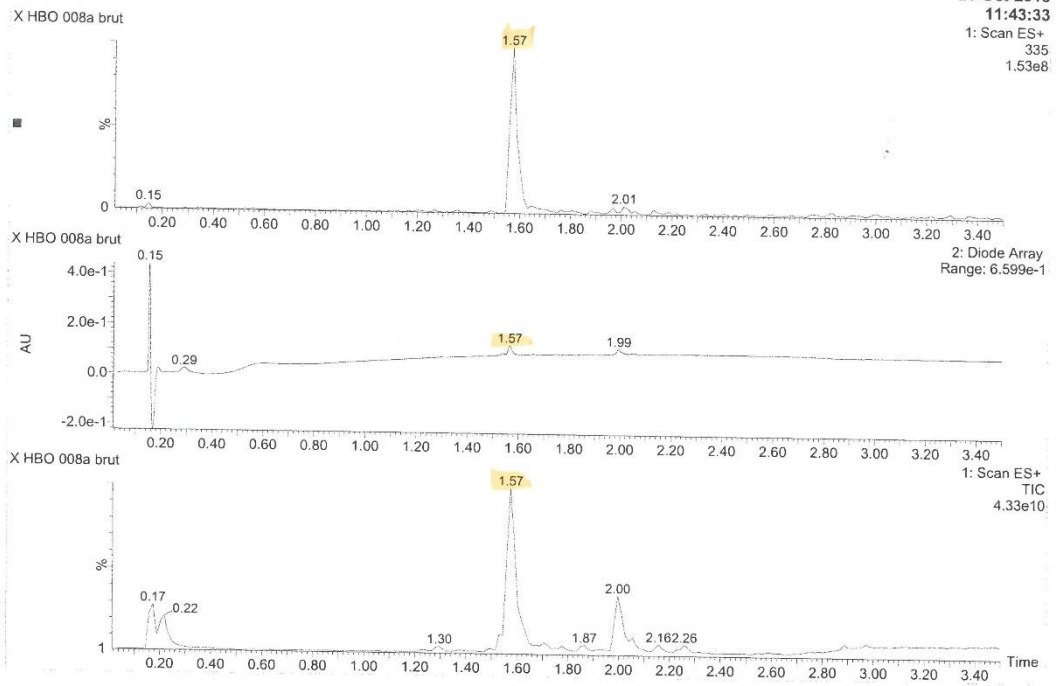


N-Boc-L-cysteinyl-glycine tert-butyl ester 10

21/10/2015 12:22 #140 P. 001/009

To: 00487144806

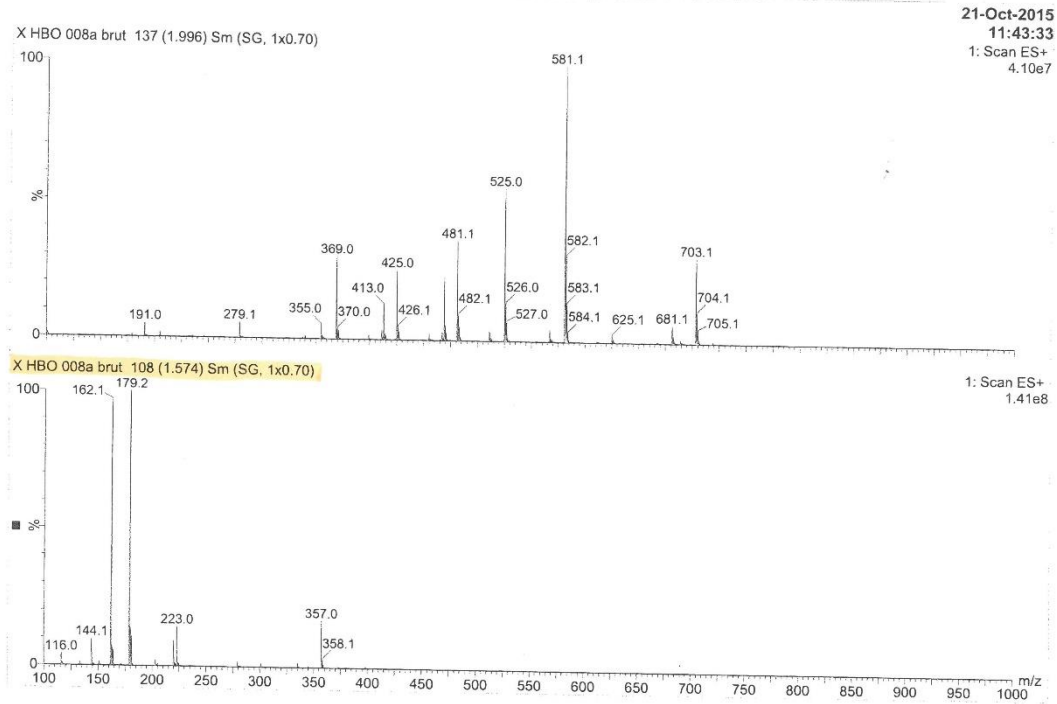
From: BMM-UMR5247



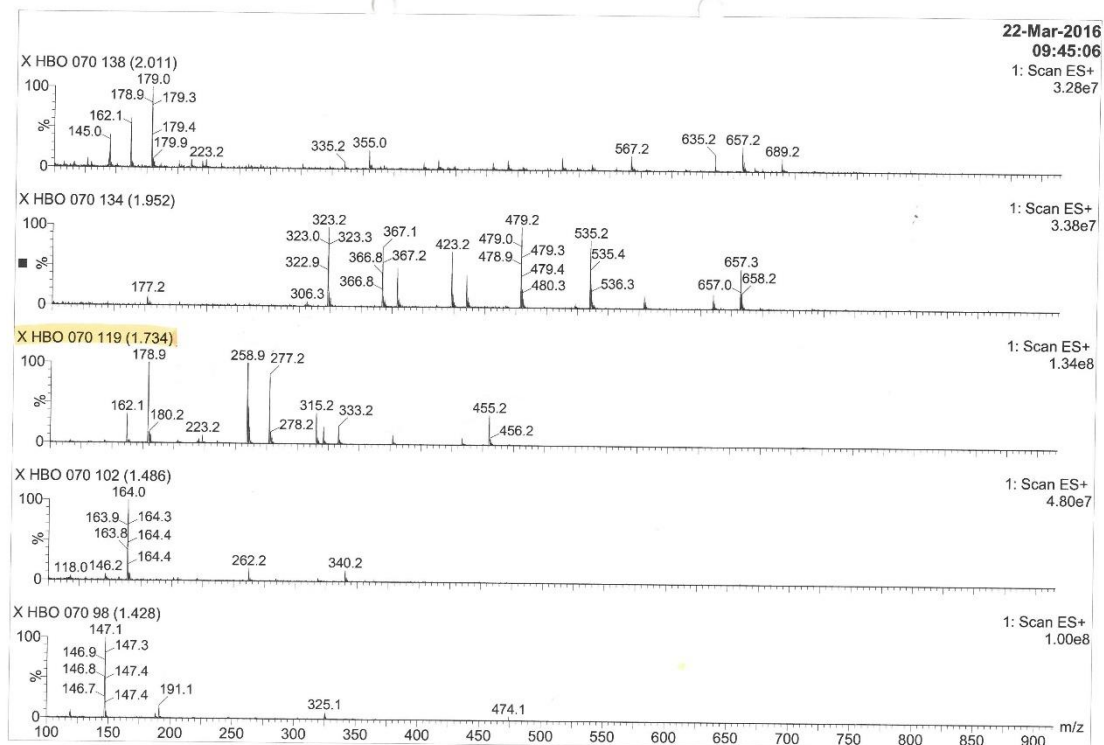
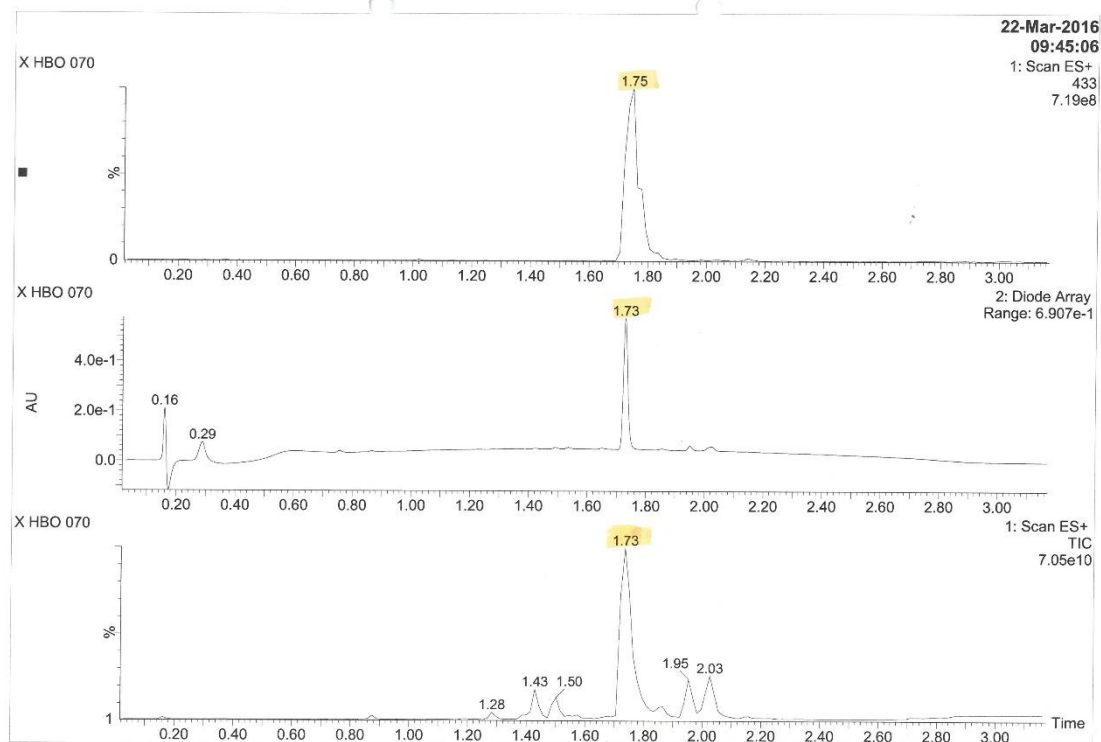
21/10/2015 12:22 #140 P. 002/009

To: 00487144806

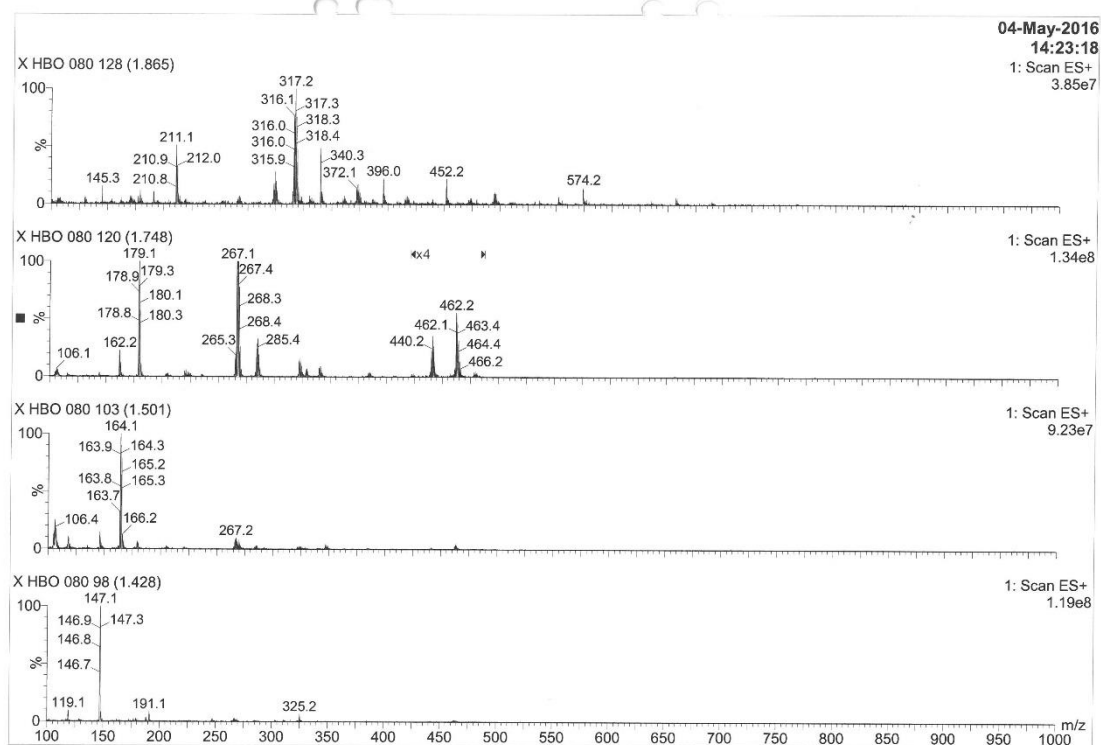
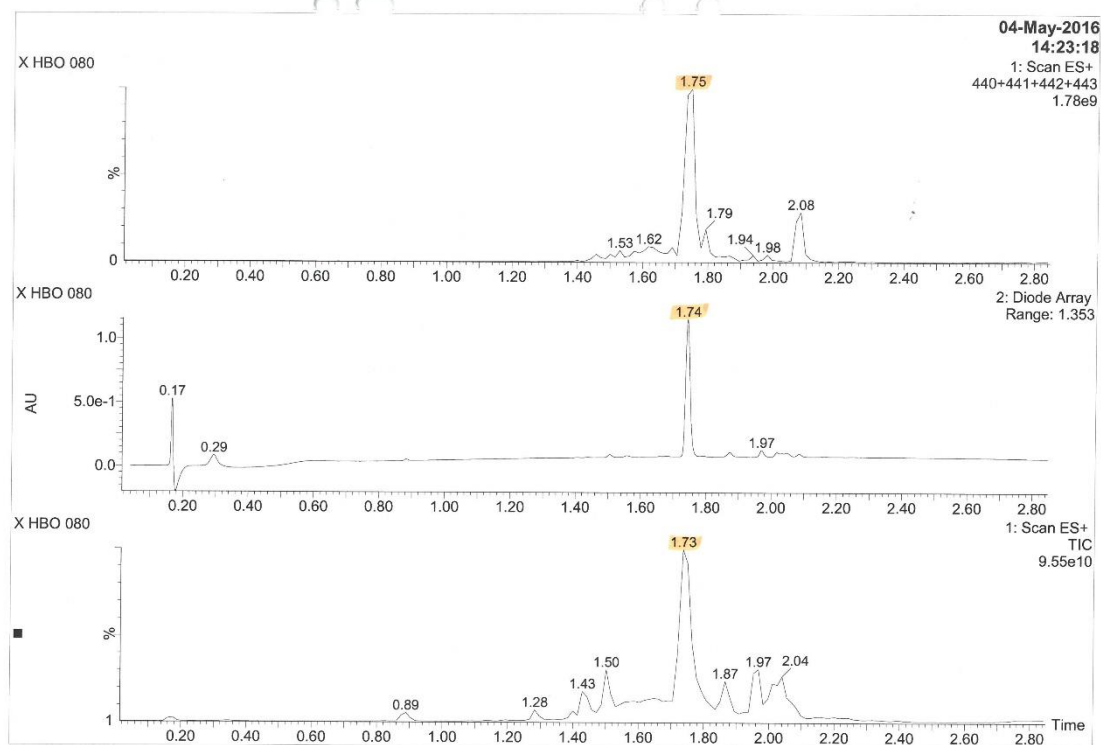
From: BMM-UMR5247



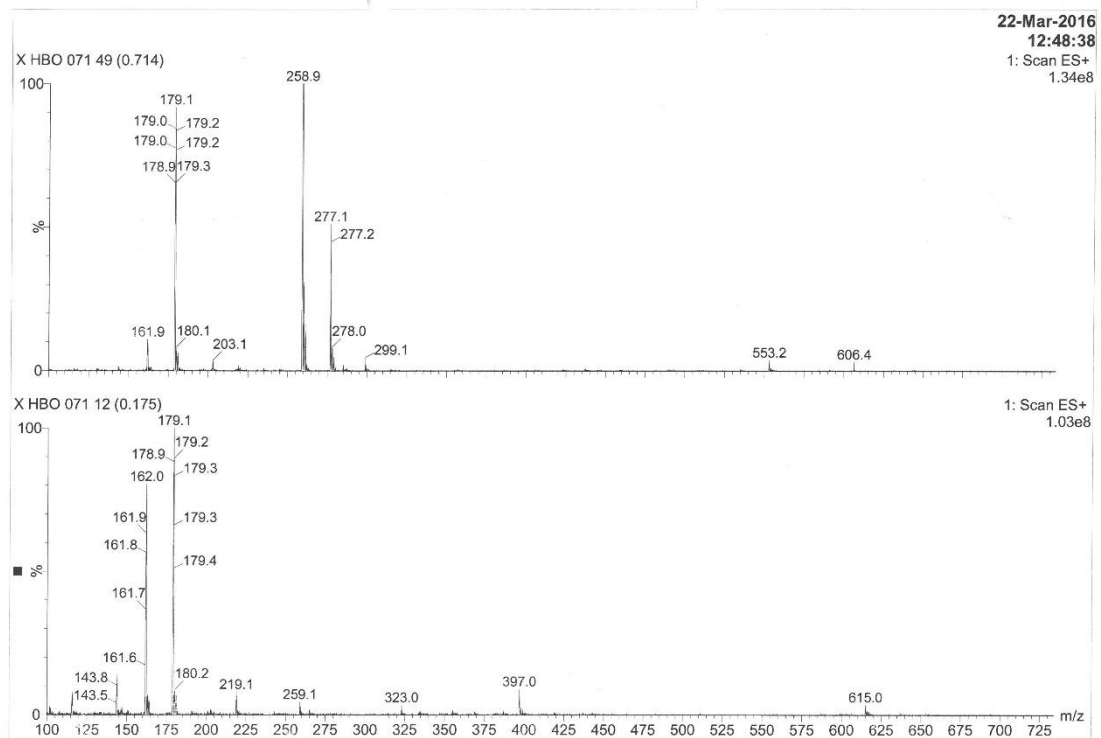
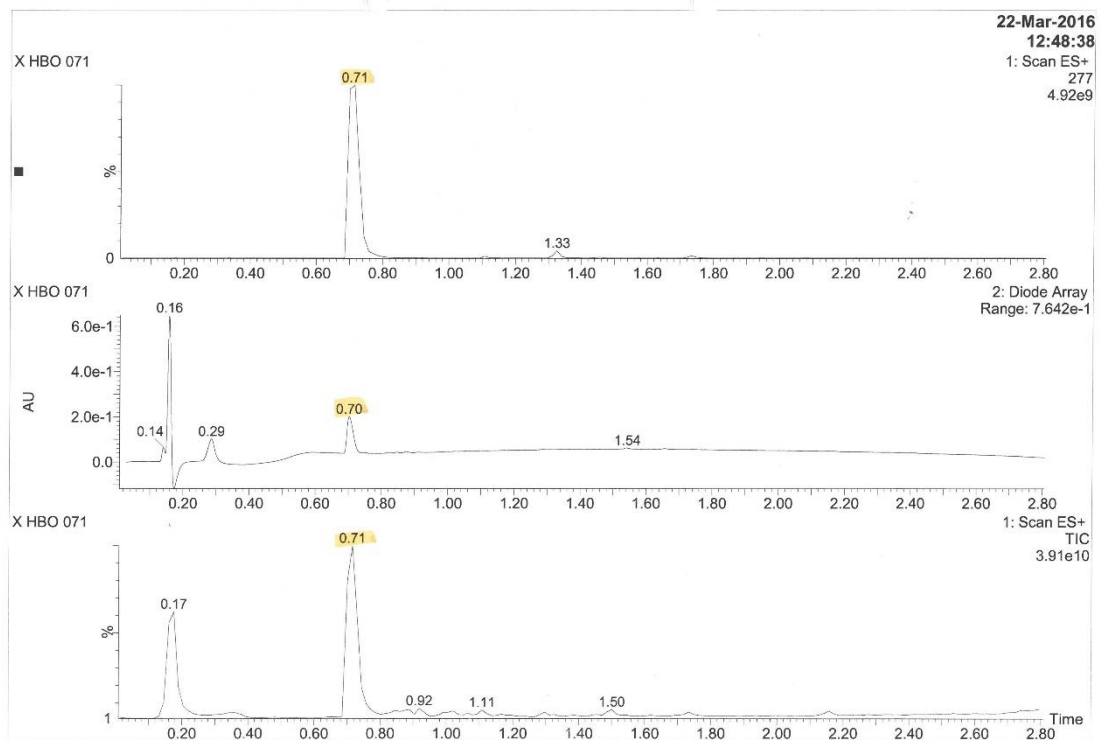
Natural S-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-N-Boc-L-cysteinyl-glycine tert-butyl ester **11**

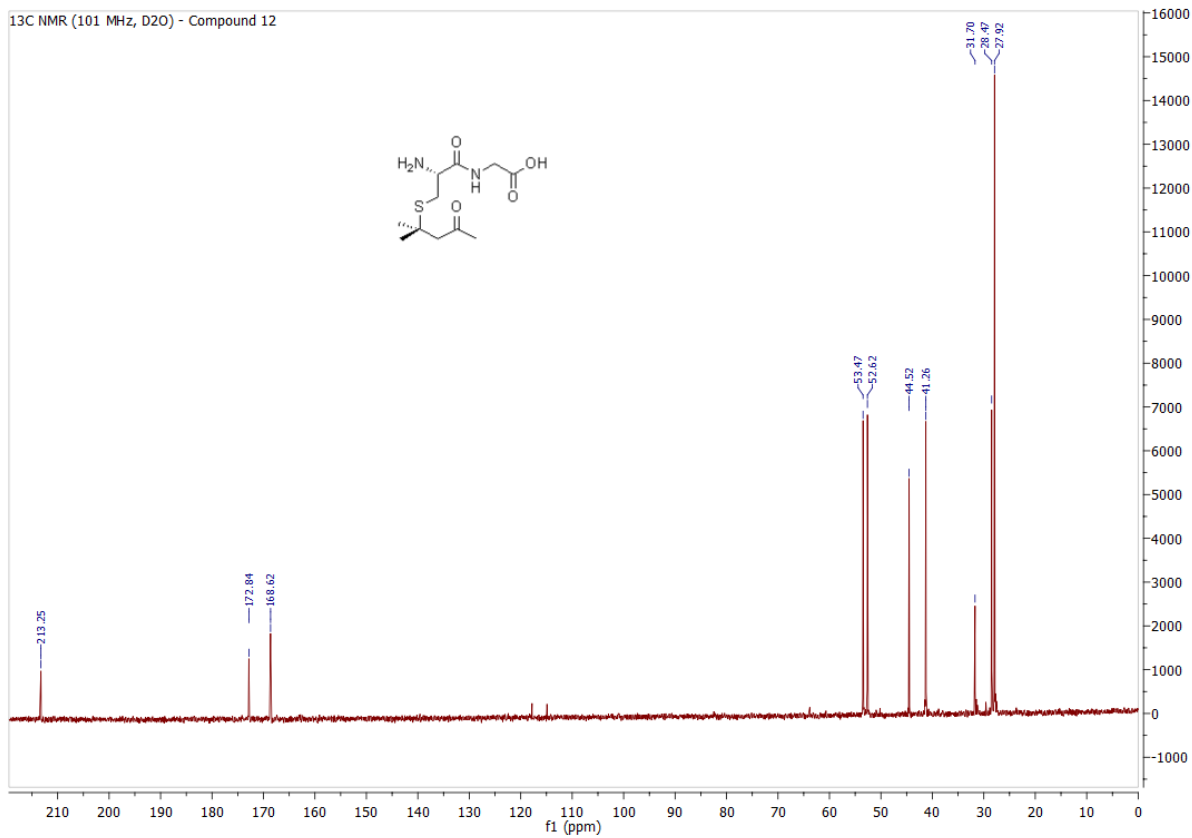
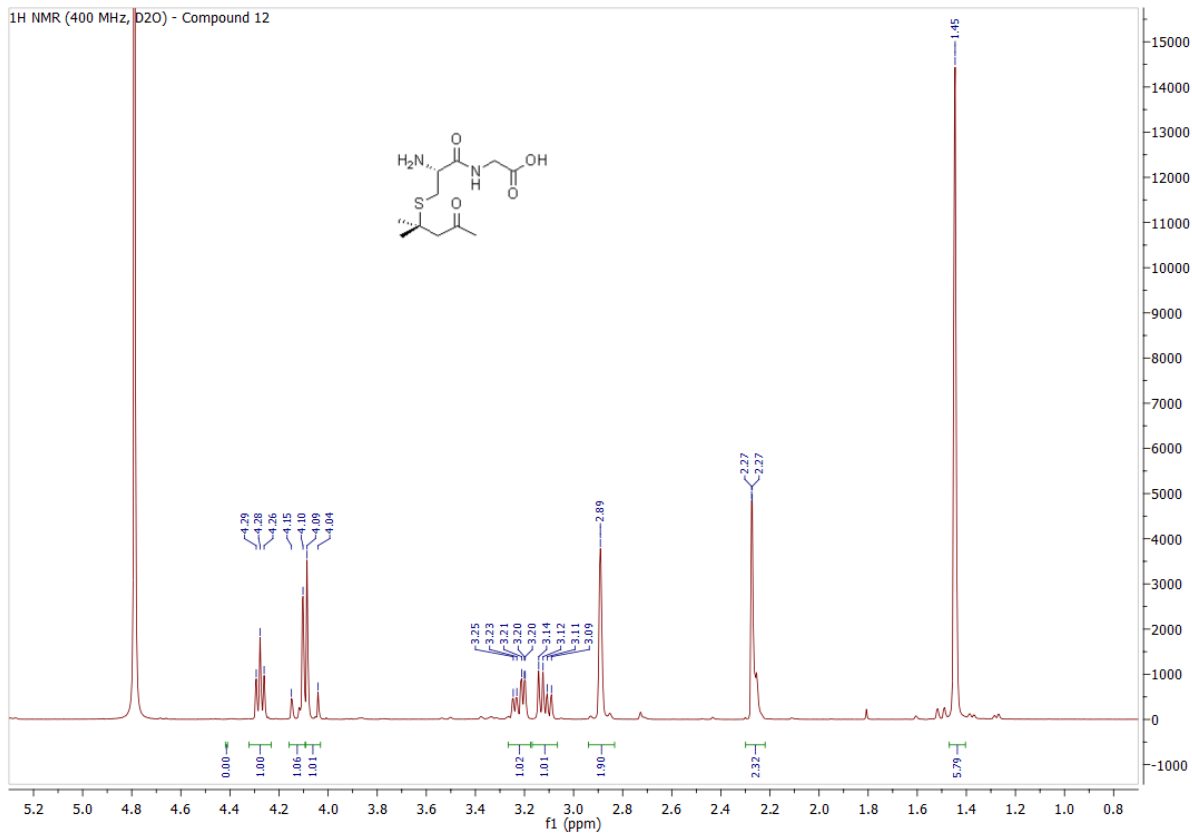


Deuterated S-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-N-Boc-L-cysteinyl-glycine tert-butyl ester **11-d₆**



Natural S-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-L-cysteinyl-glycine chloride 12





Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 1.0 PPM / DBE: min = -1.0, max = 100.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

838 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

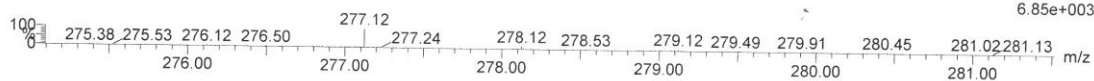
C: 0-100 H: 0-100 N: 0-20 O: 0-20 S: 0-1

SYNAPT G2-S#UEB205

Z-JM16120107 263 (1.051) Cm (260:277)

HBO071-CG4

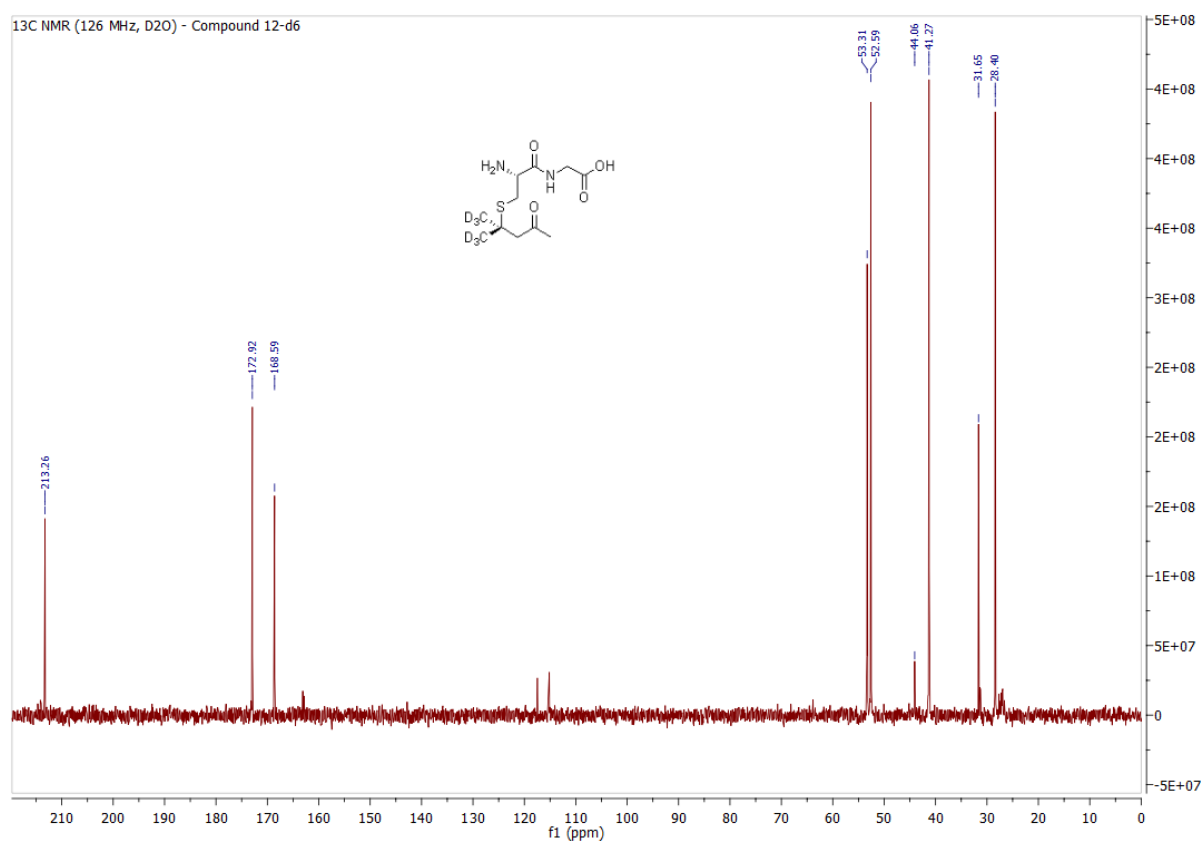
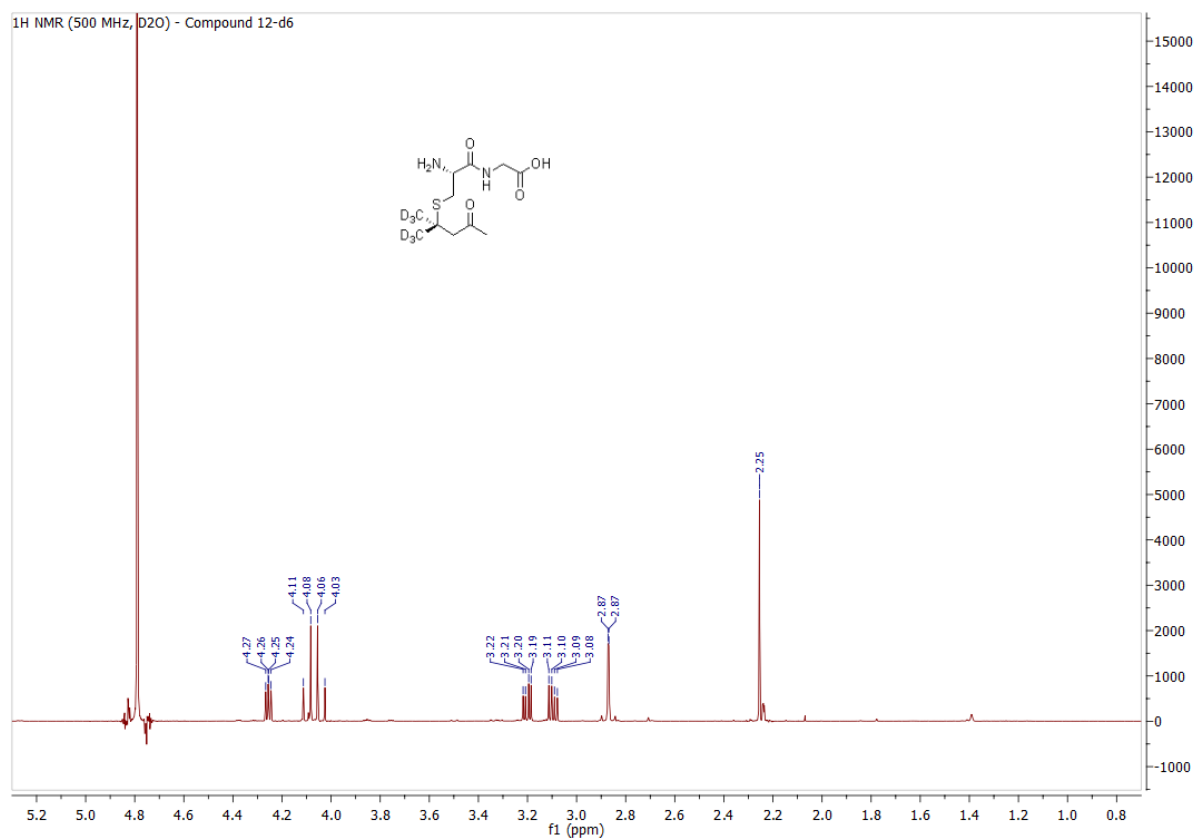
01-Dec-2016
1: TOF MS ES+
6.85e+003

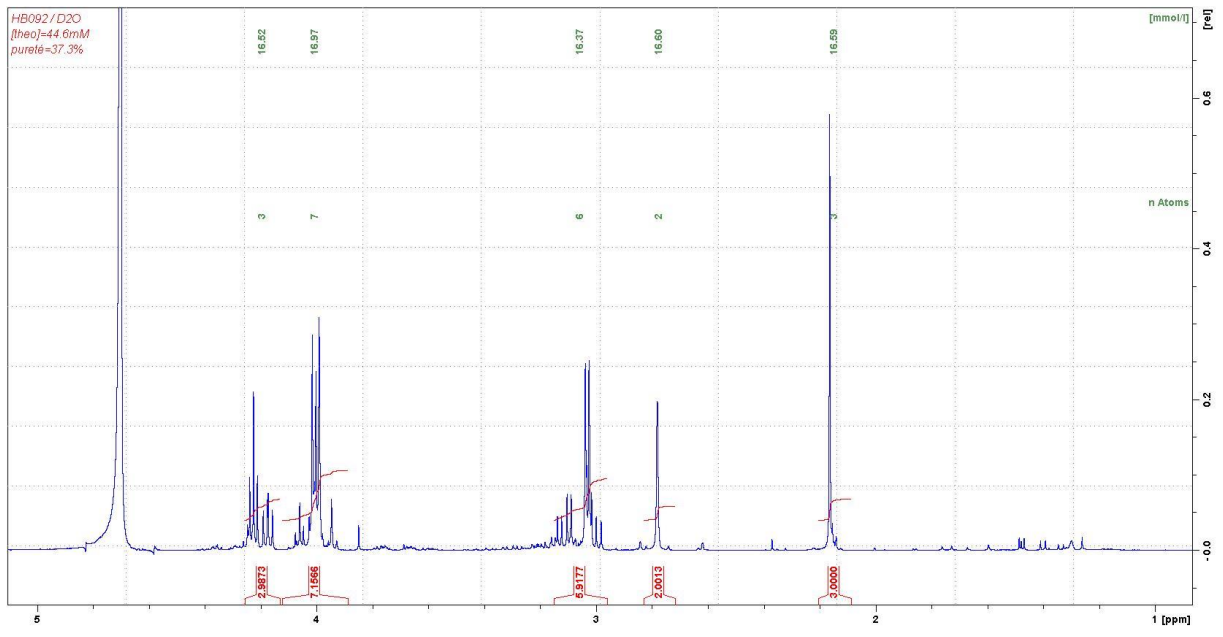


Minimum: -1.0
Maximum: 3.0 1.0 100.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
277.1221	277.1222	-0.1	-0.4	2.5	290.6	0.000	100.00	C11 H21 N2 O4 S
	277.1220	0.1	0.4	-0.5	308.5	17.836	0.00	C3 H17 N8 O7

Deuterated S-4-mercapto-4-methylpentan-2-one-L-cysteinyl-glycine chloride **12-d₆**





Single Mass Analysis

Tolerance = 1.0 mDa / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

1552 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)

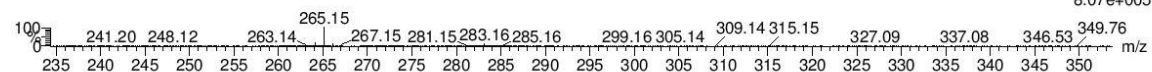
Elements Used:

C: 0-100 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1 1H: 0-100 2H: 6-6

SYNAPT G2-S#UEB205
Z-Cavelier17011105 226 (0.905)

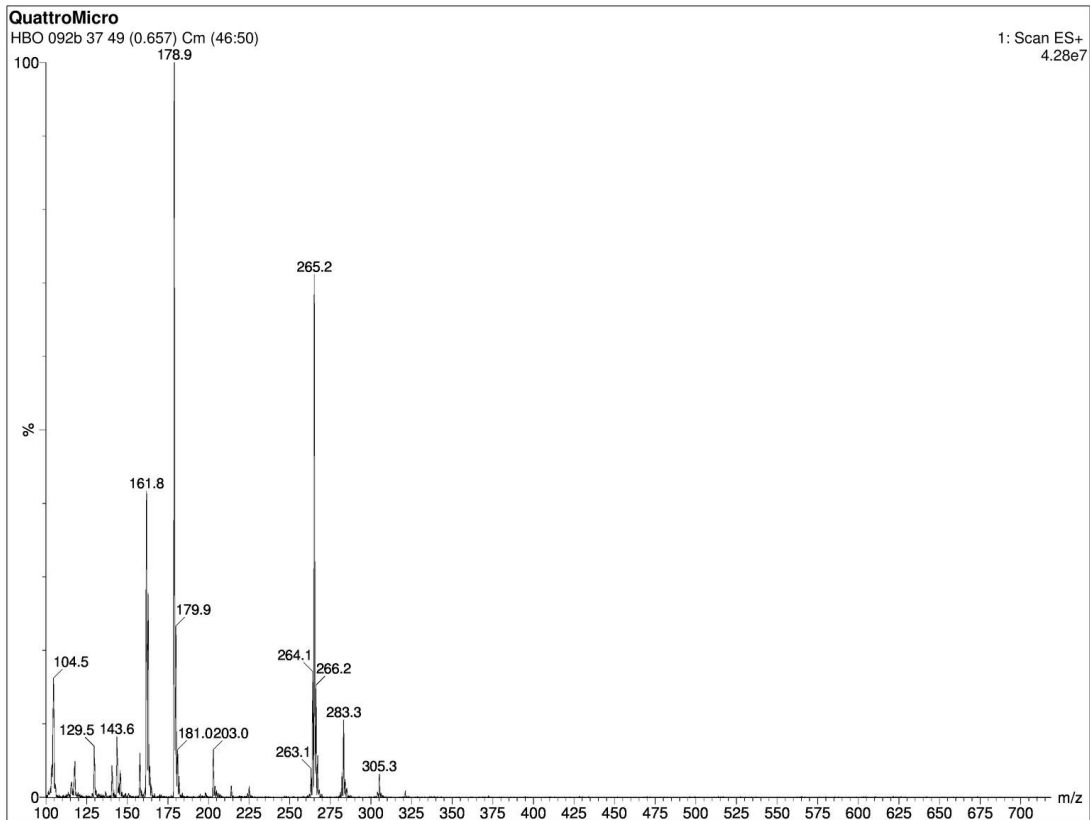
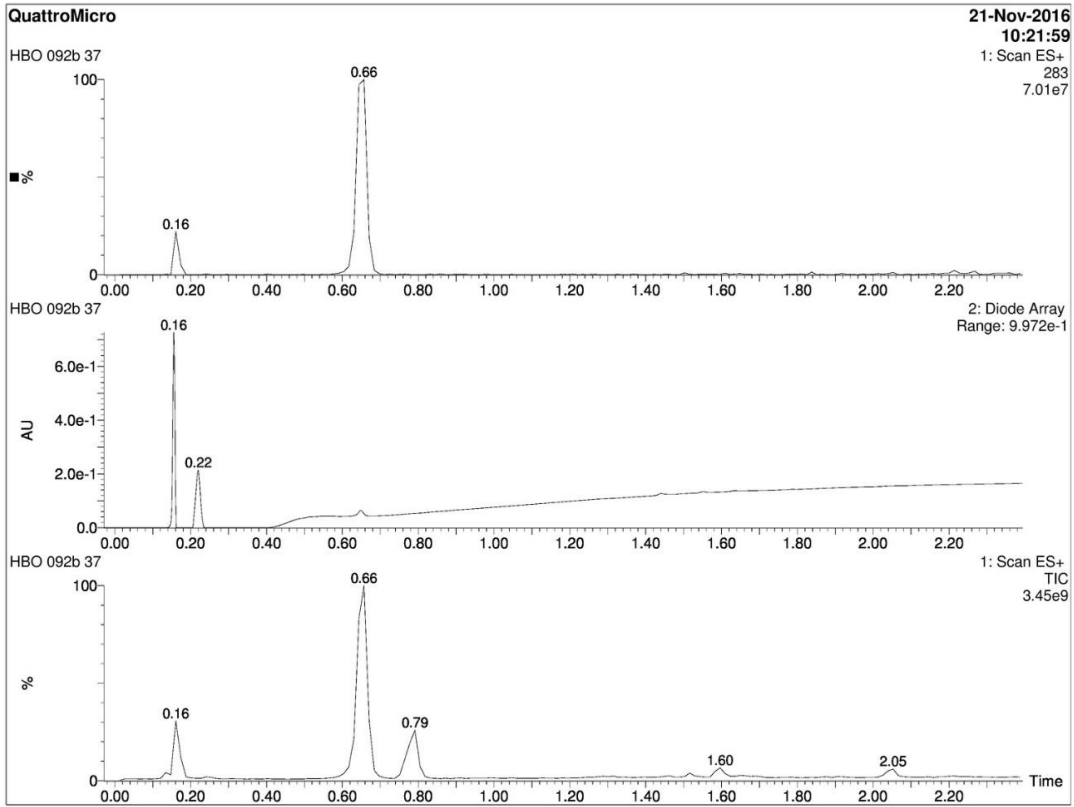
HBO092-GC40-1

11-Jan-2017
1: TOF MS ES+
8.07e+005

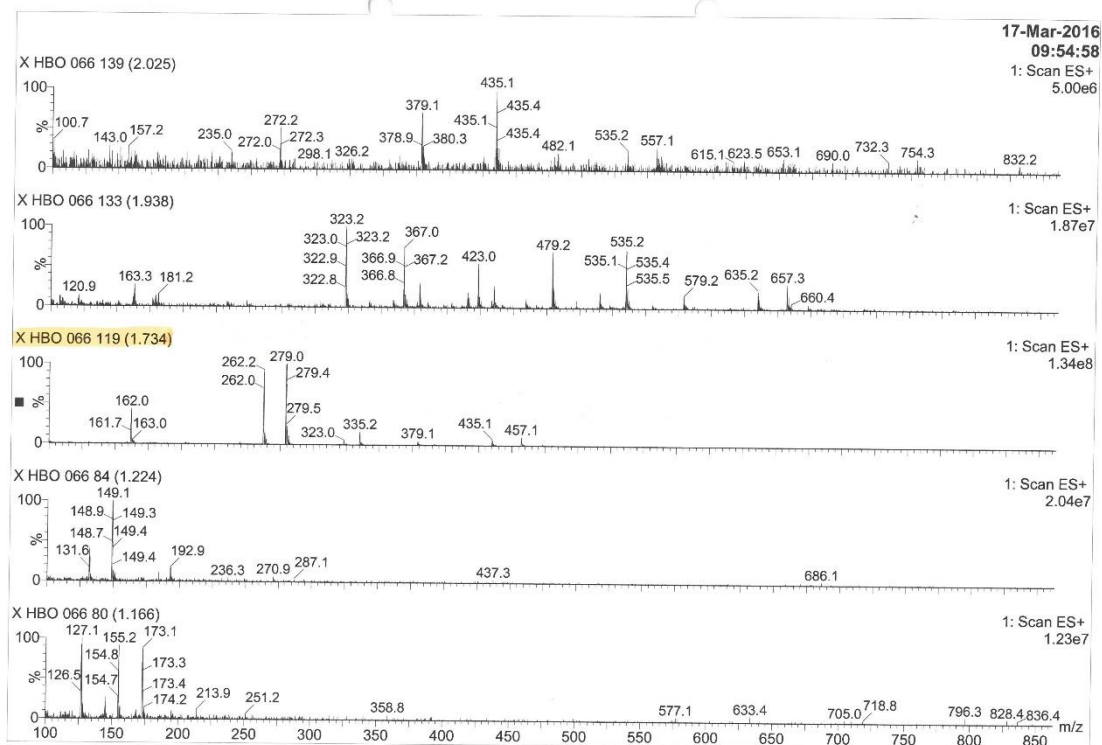
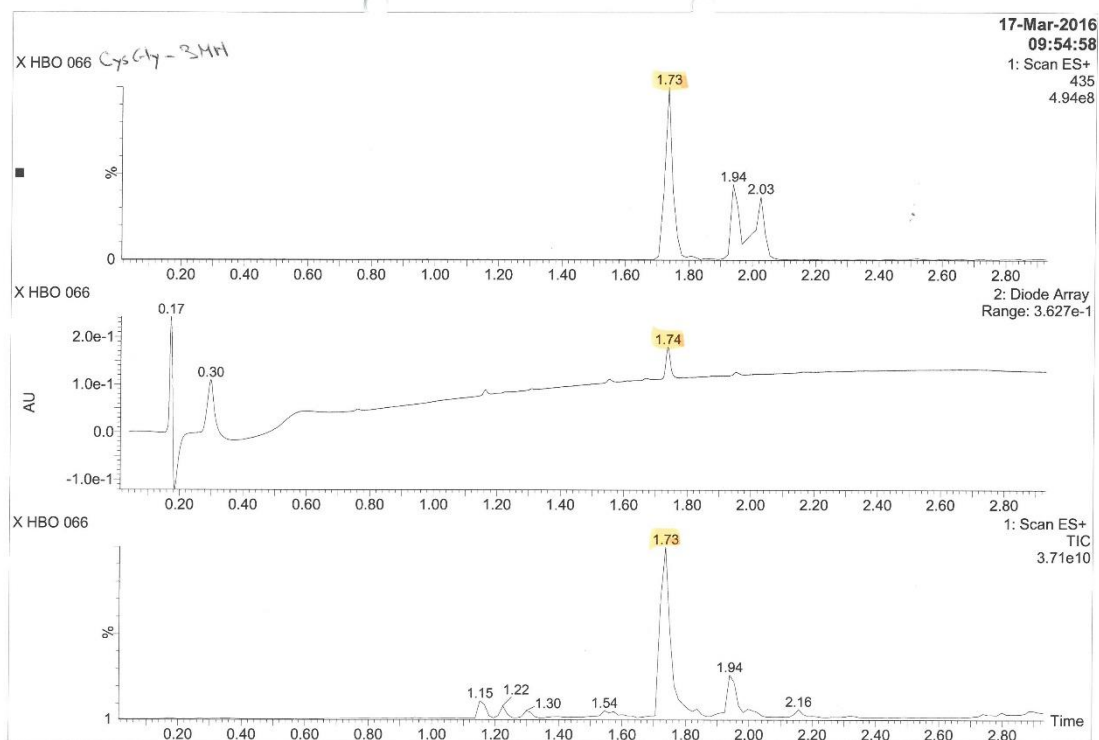


Minimum: -1.5
Maximum: 1.0 1.0 50.0

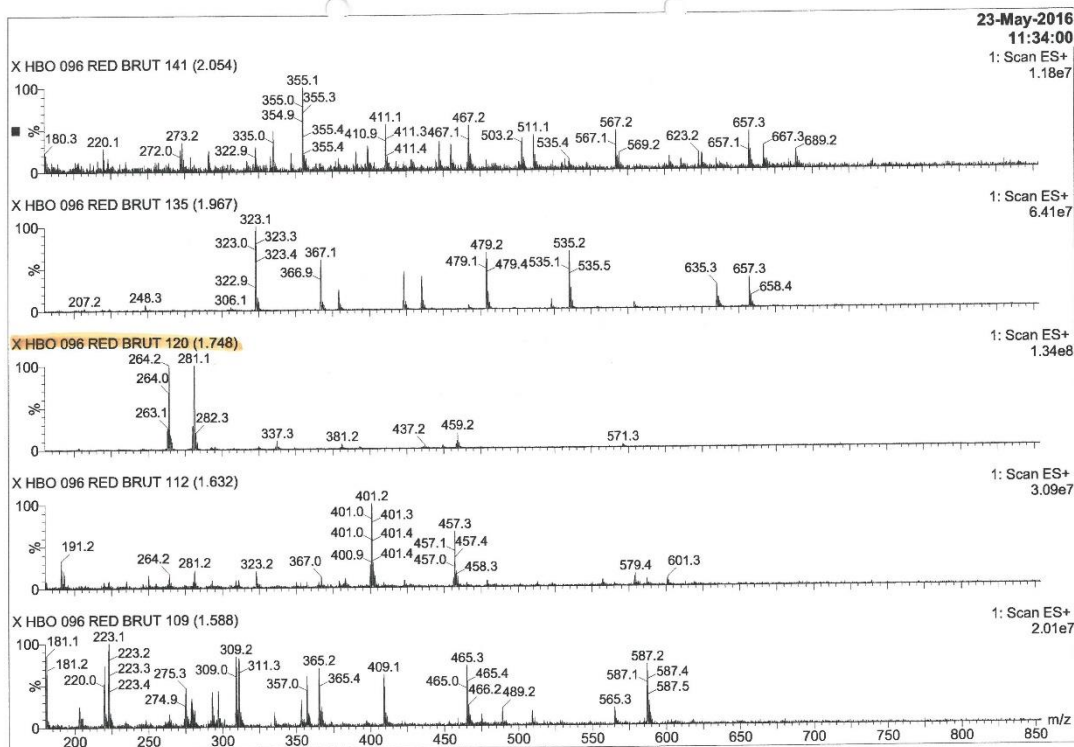
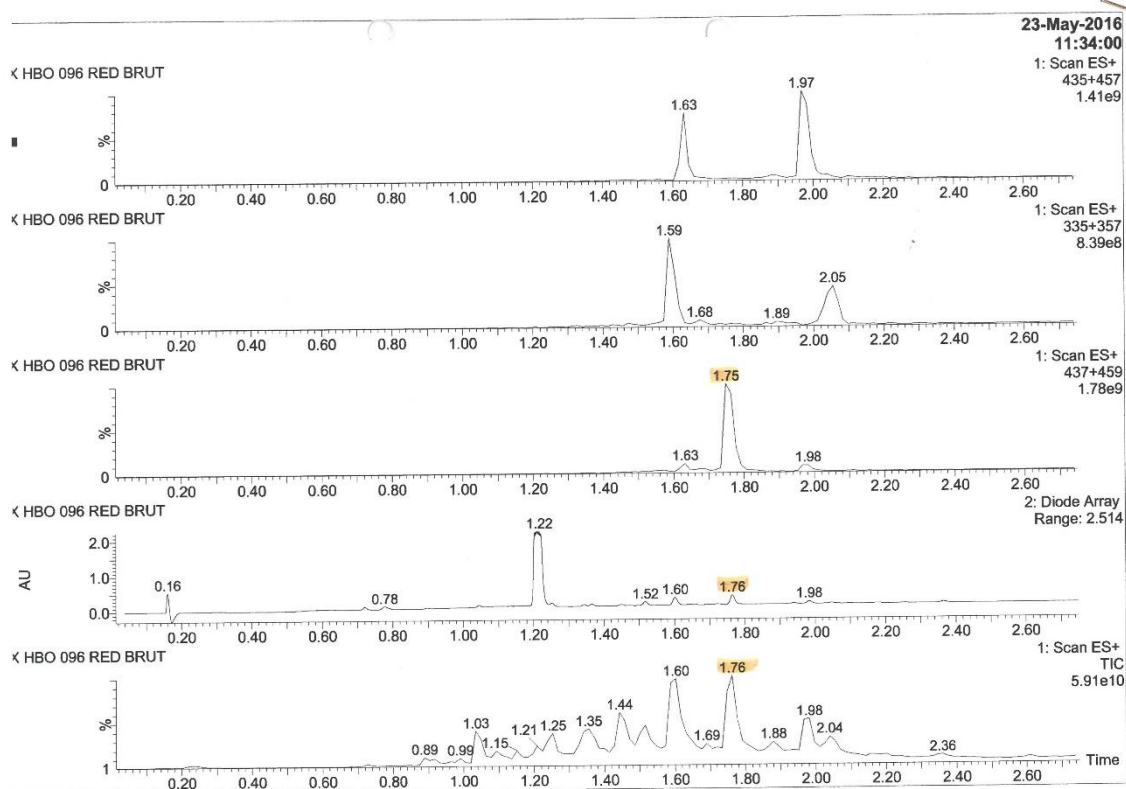
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf (%)	Formula
283.1592	283.1599	-0.7	-2.5	2.5	902.5	n/a	n/a	C11 N2 O4 S 1H15 2H6



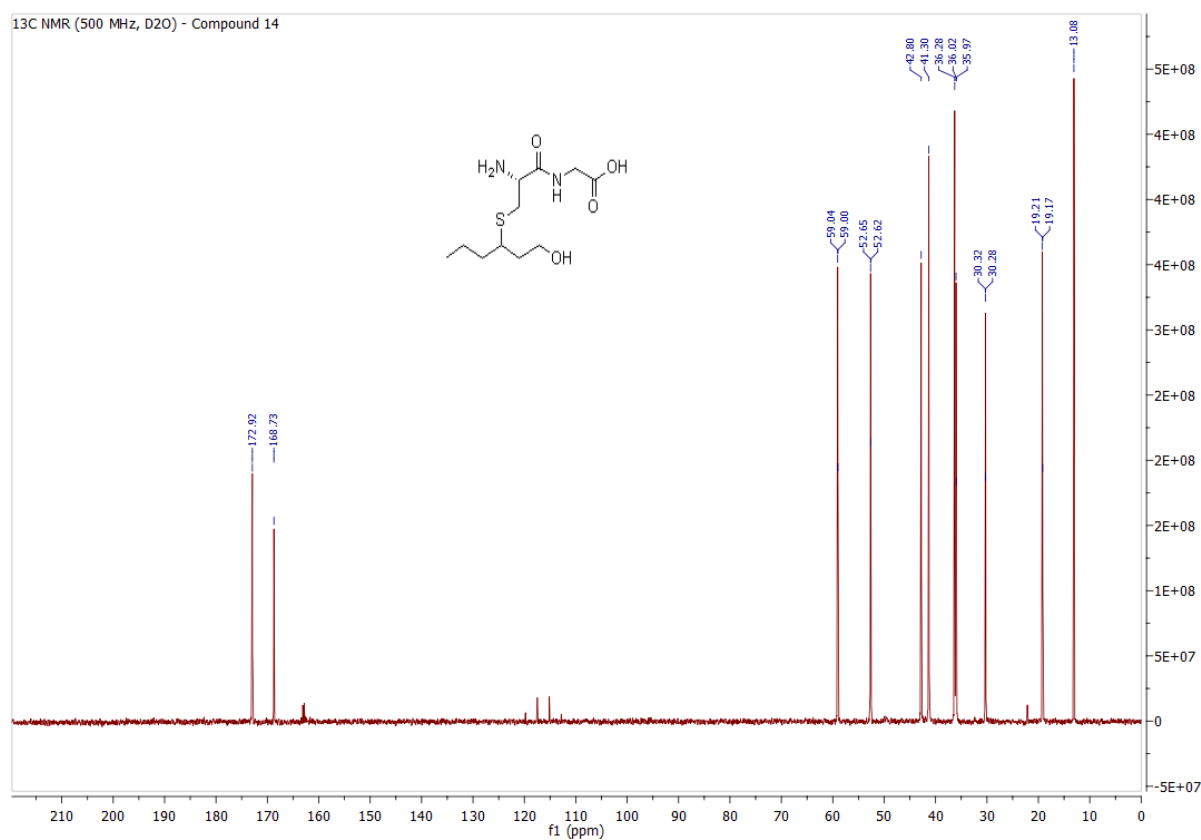
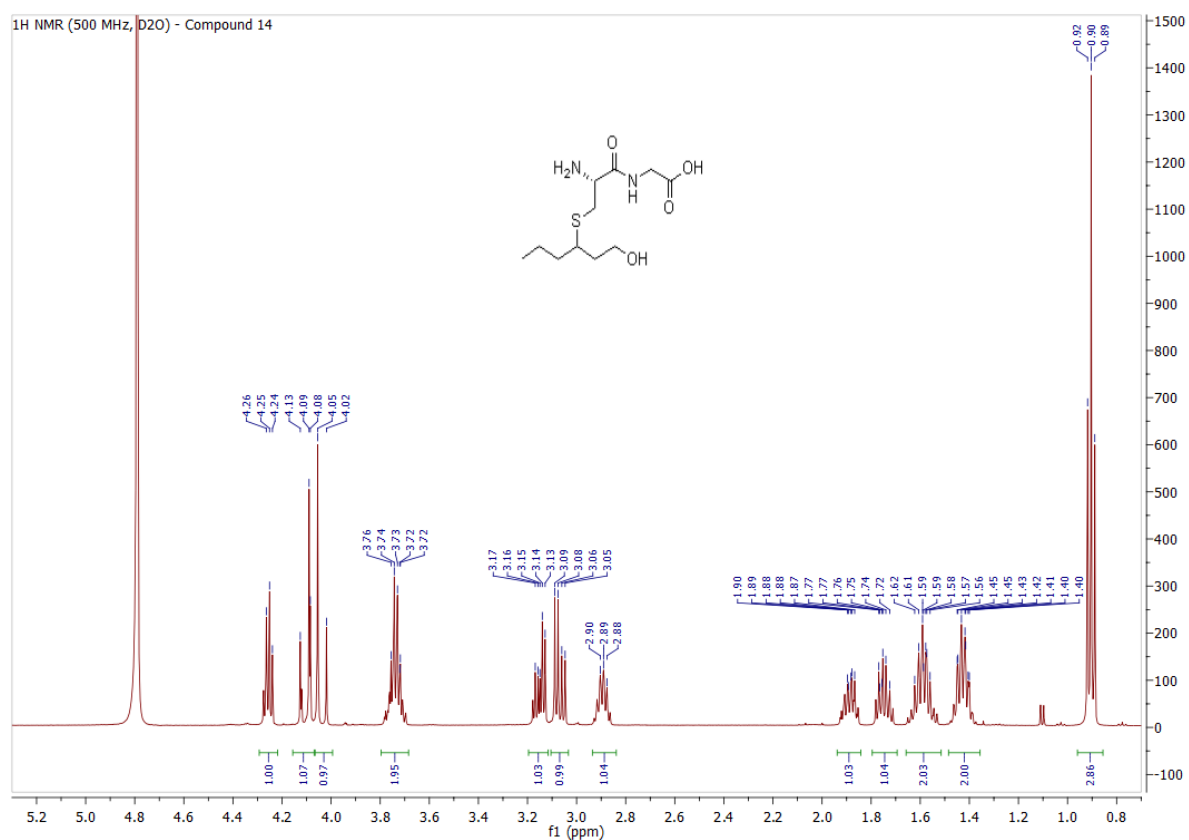
Natural S-3-(hexan-1-ol)-N-Boc-L-cysteinyl-glycine tert-butyl ester **13**

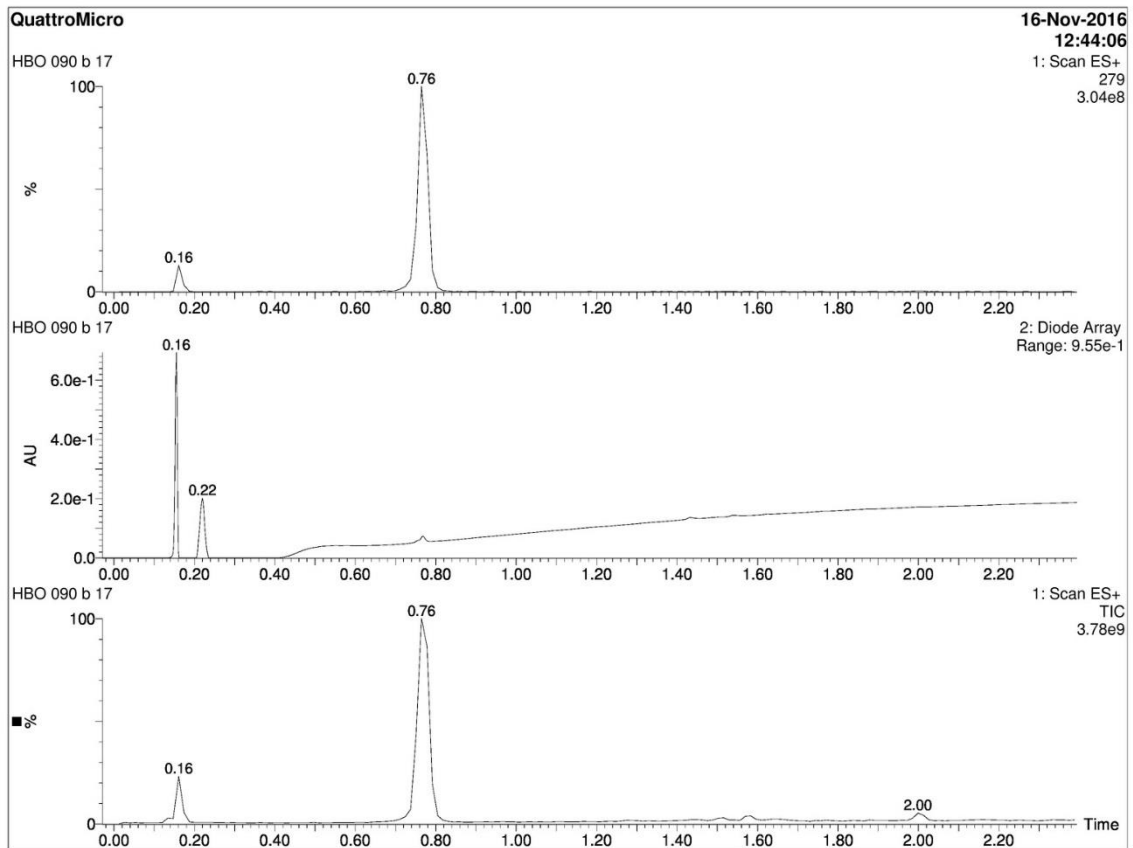
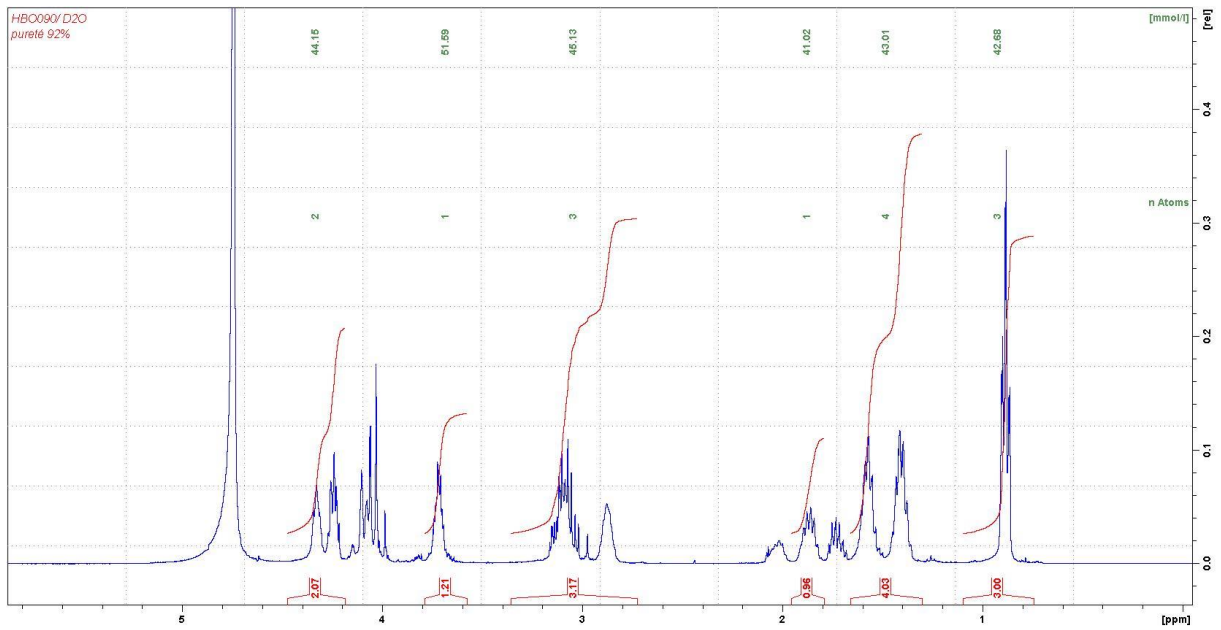


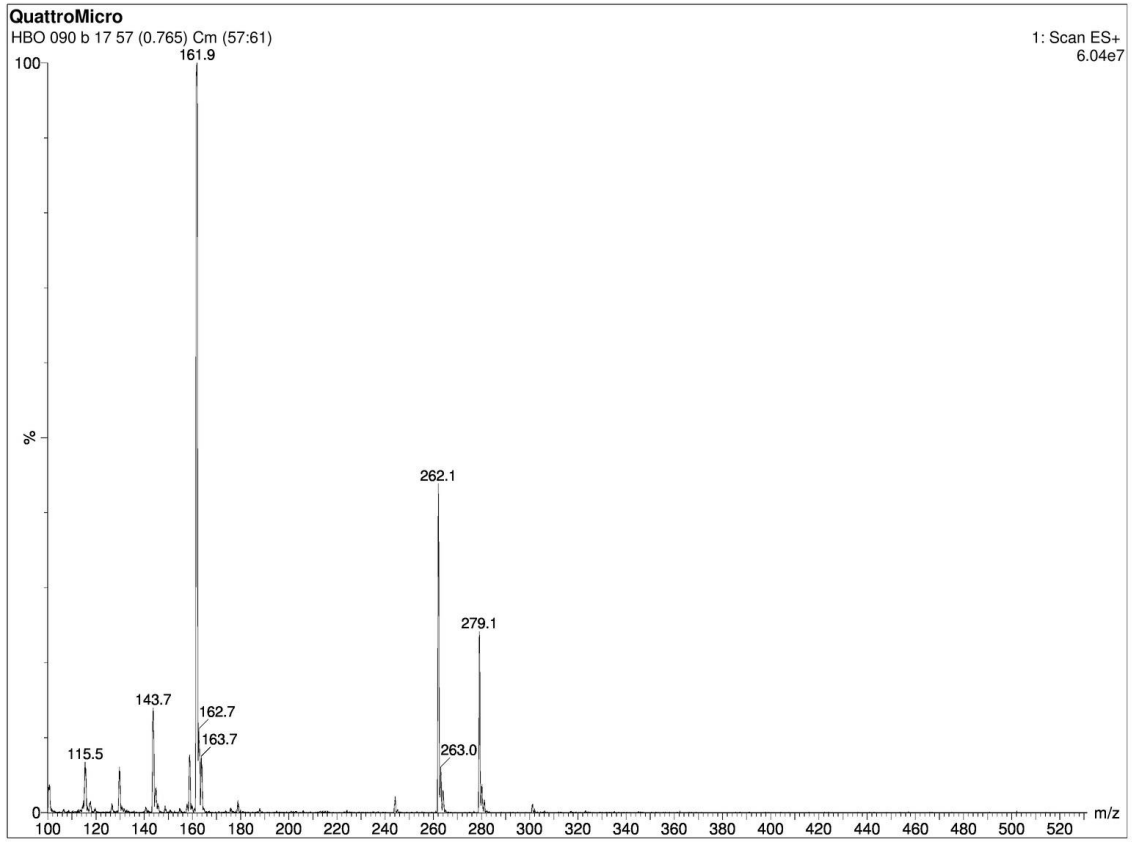
Deuterated S-3-(hexan-1-ol)-N-Boc-L-cysteinyl-glycine tert-butyl ester **13-d₂**



Natural S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteinyl-glycine chloride **14**







Single Mass Analysis

Tolerance = 1.0 mDa / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

373 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-100 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1

SYNAPT G2-S#UEB205

HBO090-GC3-3

Z-Cavelier17011104 309 (1.231)

11-Jan-2017

1: TOF MS ES+

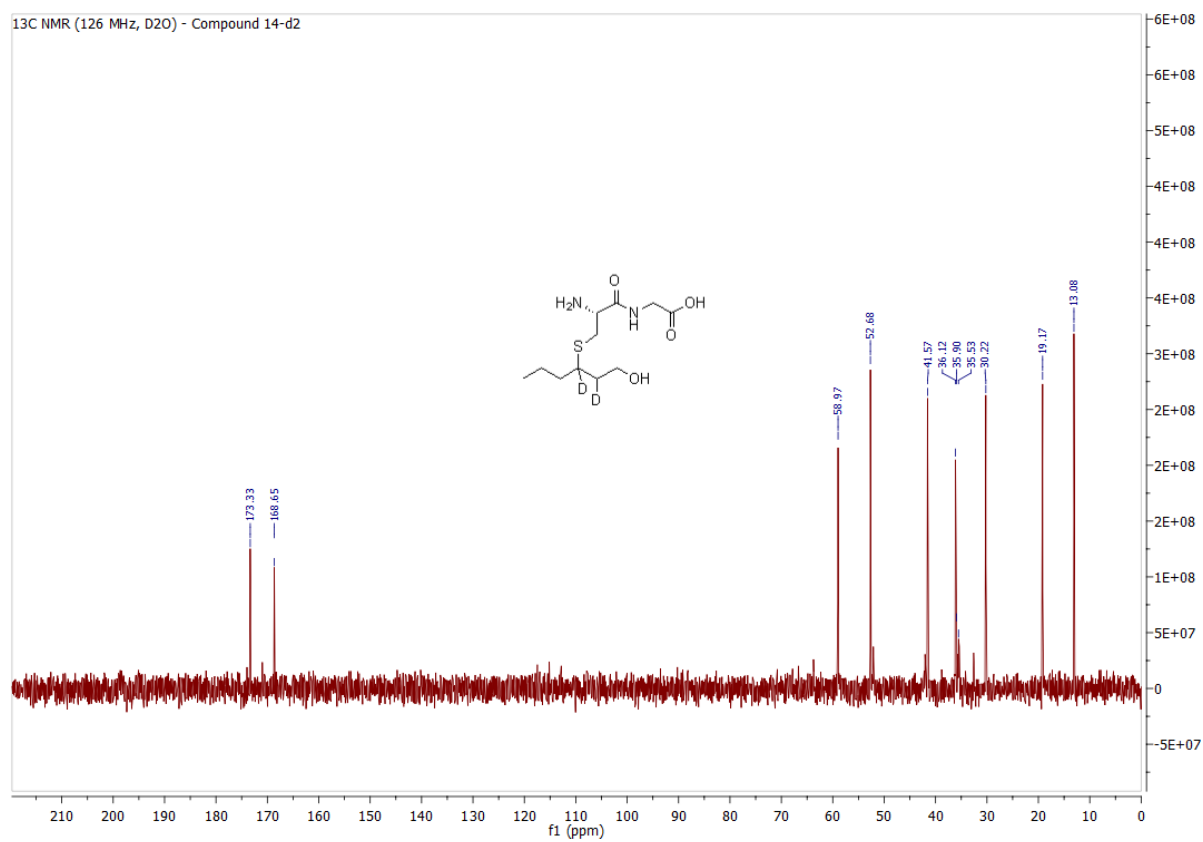
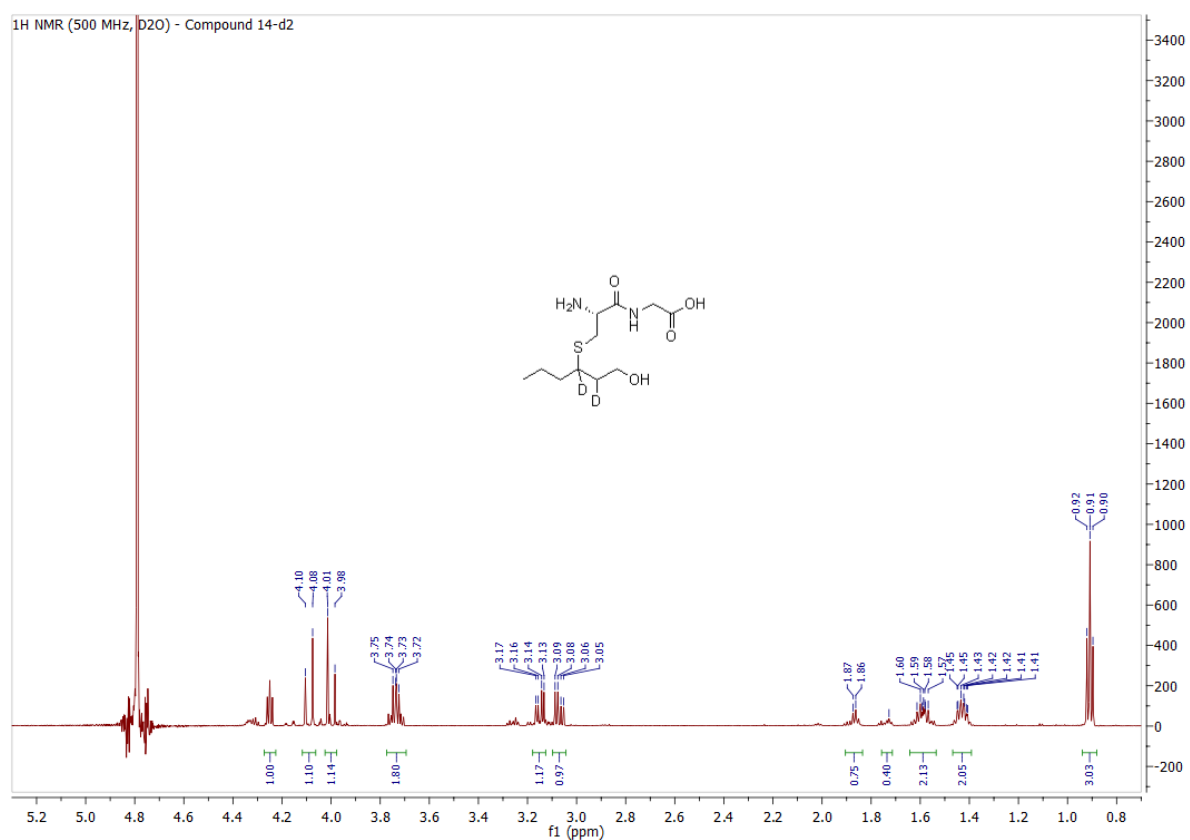
6.32e+005

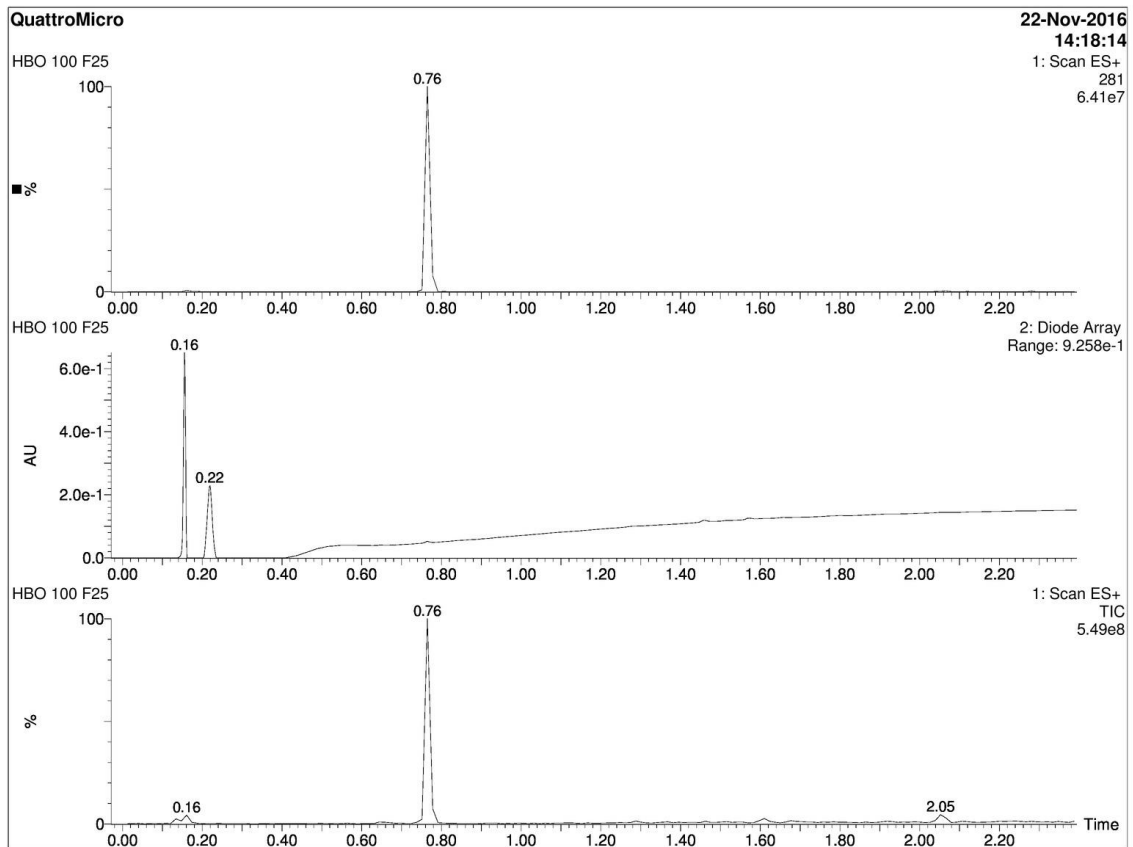
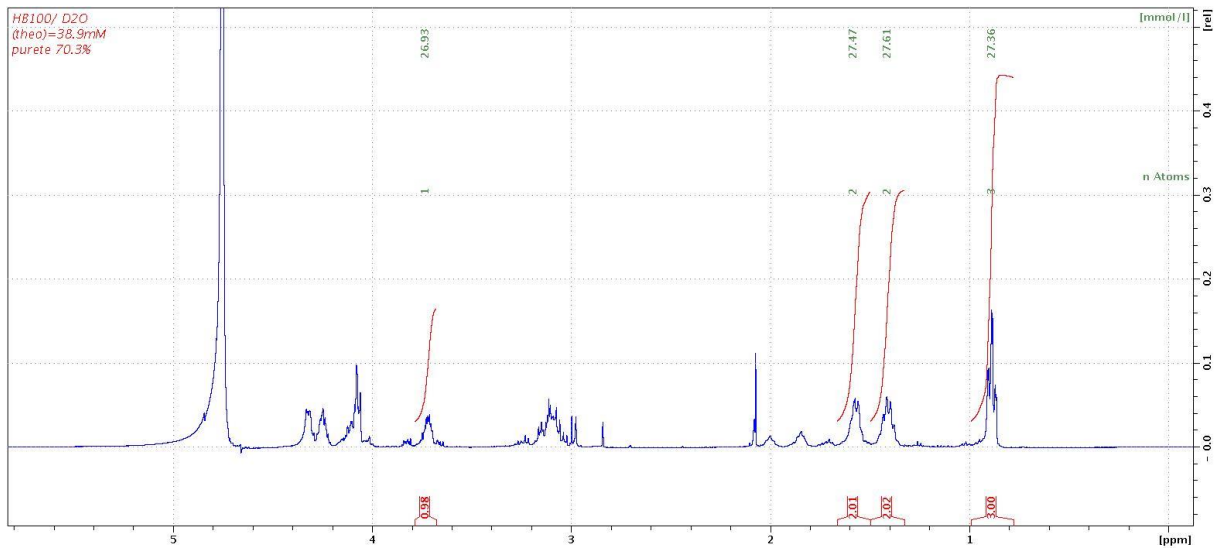


Minimum: -1.5
Maximum: 1.0 1.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf (%)	Formula
279.1379	279.1379	0.0	0.0	1.5	1621.1	n/a	n/a	C11 H23 N2 O4 S

Deuterated S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteinyl-glycine chloride **14-d₂**

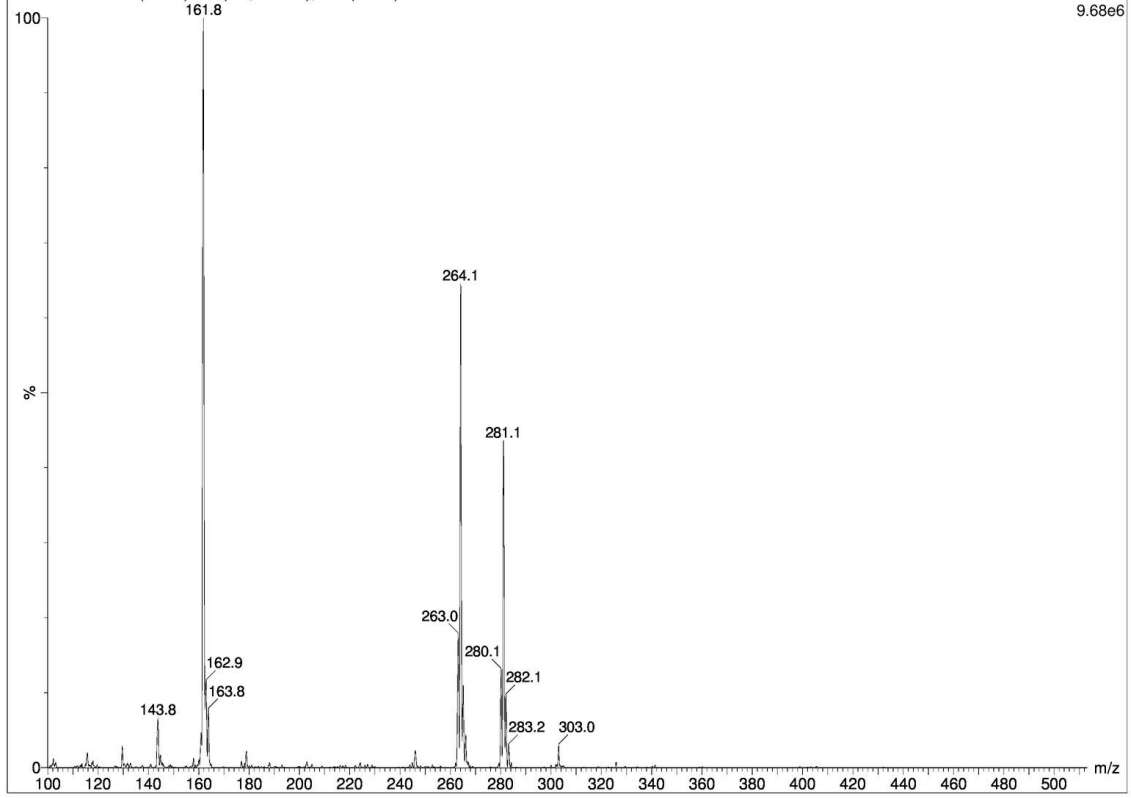




QuattroMicro

HBO 100 F25 57 (0.765) Sm (Mn, 1x0.75); Cm (57:58)

1: Scan ES+
9.68e6



Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 2.0 mDa / DBE: min = -1.0, max = 100.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

3832 formula(e) evaluated with 5 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 1H: 0-100 2H: 2-2 N: 0-20 O: 0-20 S: 0-1

SYNAPT G2-S#UEB205

HBO0100-CG3D-1

Z-JM16120106 306 (1.220)

01-Dec-2016
 1: TOF MS ES+
 4.41e+003



Minimum: -1.0
 Maximum: 100.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf (%)	Formula
281.1491	281.1504	-1.3	-4.6	1.5	73.9	0.179	83.61	C11 1H21 2H2 N2 O4 S
	281.1477	1.4	5.0	2.5	75.6	1.815	16.28	C7 1H17 2H2 N8 O2 S
	281.1489	0.2	0.7	4.5	81.0	7.249	0.07	1H9 2H2 N18 O
	281.1484	0.7	2.5	11.5	82.0	8.255	0.03	C15 1H13 2H2 N6
	281.1511	-2.0	-7.1	10.5	83.2	9.425	0.01	C19 1H17 2H2 O2

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Antonelli, A., Castellari, L., Zambonelli, C., & Carnacini, A. (1999). Yeast Influence on Volatile Composition of Wines. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *47*, 1139-1144.
- Arrhenius, S. P., McCloskey, L. P., & Sylvan, M. (1996). Chemical markers for aroma of *Vitis vinifera* var Chardonnay regional wines. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *44*, 1085-1090.
- Aznar, M., Tsachaki, M., Linforth, R. S. T., Ferreira, V., & Taylor, A. J. (2004). Headspace analysis of volatile organic compounds from ethanolic systems by direct APCI-MS. *International Journal of Mass Spectrometry*, *239*, 17-25.
- Bartowsky, E. J., Francis, I. L., Bellon, J. R., & Henschke, P. A. (2002). Is buttery aroma perception in wines predictable from the diacetyl concentration? *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *8*, 180-185.
- Baumes, R., Wirth, J., Bureau, S., Günata, Z., & Razungles, A. (2002). Biogenesis of C13-norisoprenoid compounds: Experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines. *Analytica Chimica Acta*, *458*, 3-14.
- Baumes, R. (2009). Wine Aroma Precursors. In M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry*, (pp. 251-274). Berlin: Springer.
- Bayonove, C. (1998). L'arôme varietal. In C. Flanzky (Ed.), *Cœnologie: Fondements Scientifiques et Technologiques*, (pp. 165-181). Paris: Lavoisier Tec & Doc.
- Blanchard, L., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2001). Formation of furfurylthiol exhibiting a strong coffee aroma during oak barrel fermentation from furfural released by toasted staves. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *49*, 4833-4835.
- Boidron, J. N., Chatonnet, P., & Pons, M. (1988). Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *Connaissance Vigne Vin*, *22*, 275-294.
- Bonnafox, H., Roland, A., Rémond, E., Delpech, S., Schneider, R., & Cavelier, F. (2017). First identification and quantification of S-3-(hexan-1-ol)- γ -glutamyl-cysteine in grape must as a potential thiol precursor, using UPLC-MS/MS analysis and stable isotope dilution assay. *Food Chemistry*, *237*, 877-886.
- Bouchilloux, P., Darriet, P., Henry, R., Lavigne-Cruège, V., & Dubourdieu, D. (1998). Identification of Volatile and Powerful Odorous Thiols in Bordeaux Red Wine Varieties. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *46*, 3095-3099.

- Britton, G. (1982). Carotenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologie Végétale*, 20, 735–755.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal*, 9, 1551-1558.
- Bureau, S. (1998). Modification de l'environnement limineux des grappes et des ceps de vigne: effets sur le potentiel aromatique des baies de Syrah et de Muscat de Frontignan. Thèse de Doctorat (p. University of Montpellier II).
- Capone, D. L., Pardon, K. H., Cordente, A. G., & Jeffery, D. W. (2011a). Identification and Quantitation of 3-S-Cysteinyglycinehexan-1-ol (Cysgly-3-MH) in Sauvignon blanc Grape Juice by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 11204-11210.
- Capone, D. L., Sefton, M. A., & Jeffery, D. W. (2011b). Application of a modified method for 3-mercaptohexan-1-ol determination to investigate the relationship between free thiol and related conjugates in grape juice and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4649-4658.
- Capone, D. L., Sefton, M. A., & Jeffery, D. W. (2012). Analytical Investigations of Wine Odorant 3-Mercaptohexan-1-ol and Its Precursors. In M. C. Qian & T. H. Shellhammer (Eds.), *Flavor Chemistry of Wine and Other Alcoholic Beverages*, (pp. 15-35). Washington, DC: American Chemical Society.
- Concejero, B., Hernandez-Orte, P., Astrain, J., Lacau, B., Baron, C., & Ferreira, V. (2016). Evolution of polyfunctional mercaptans and their precursors during Merlot alcoholic fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 770-776.
- Cordonnier, R., & Bayonove, C. (1974). Mise en évidence dans la baie de raisin, variété Muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzymes de fruits. *Connaissance Vigne Vin*, 278, 3387-3390.
- Culleré, L., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). An Assessment of the Role Played by Some Oxidation-Related Aldehydes in Wine Aroma. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55, 876–881.
- Da Porto, C., & Nicoli, M. C. (2002). A study of the physico-chemical behavior of diacetyl in hydroalcoholic solution with and without added catechin and wood extract. *Lebensm.-Wiss. -Technol.*, 35, 466-471.
- Dagan, L. (2006). Potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. cv. Petit Manseng et Gros Manseng. Contribution à l'arôme des vins de pays Côtes de Gascogne. Thèse de Doctorat (p. 238): Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.
- Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J. N., & Dubourdiou, D. (1995). Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines: 4-Mercapto - 4 - methylpentan - 2 - one. *Flavour and Fragrance Journal*, 10, 385-392.

- De La Presa-Owens, C., & Noble, A. C. (1997). Effect of storage at elevated temperatures on aroma of Chardonnay wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, *48*, 310-316.
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A. M., & Adams, W. W. I. (1996). In vivo functions of carotenoids in higher plants. *FASEB Journal*, *10*, 403-412.
- Drawert, F. (1974). The chemistry of winemaking as a biological-technological sequence. In A. D. Webb (Ed.), *Chemistry of winemaking*, (pp. 1-10). Washington: American Chemical Society.
- Dugelay, I., Günata, Z., Bitteur, S., Sapis, J. C., Baumes, R., & Bayonove, C. (1992). Formation of volatile phenols from cinnamic precursors during wine making : the role of cinnamoyl esterase from commercial enzymic preparations. In P. Schreier & P. Winterhalter (Eds.), *Progress in flavour studies*, (pp. 189-193). Carol Stream: Allured Publishing Co.
- Enzell, C. (1985). Biodegradation of carotenoids – an important route to aroma compounds. *Pure and Applied Chemistry*, *57*, 693-700.
- Escudero, A., Cacho, J., & Ferreira, V. (2000a). Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography-olfactometric study. *European Food Research and Technology*, *211*, 105-110.
- Escudero, A., Hernandez-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2000b). Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *48*, 4268-4272.
- Escudero, A., Gogorza, B., Melús, M. A., Ortín, N., Cacho, J., & Ferreira, V. (2004). Characterization of the aroma of a wine from maccabeo. Key role played by compounds with low odor activity values. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *52*, 3516-3524.
- Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). Analytical Characterization of the Aroma of Five Premium Red Wines. Insights into the Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *55*, 4501-4510.
- Fedrizzi, B., Pardon, K. H., Sefton, M. A., Elsey, G. M., & Jeffery, D. W. (2009). First Identification of 4-S-Glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a Potential Precursor of 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon Blanc Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 991-995.
- Fedrizzi, B., Guella, G., Perenzoni, D., Gasperotti, M., Masuero, D., Vrhovsek, U., & Mattivi, F. (2012). Identification of intermediates involved in the biosynthetic pathway of 3-mercaptohexan-1-ol conjugates in yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Phytochemistry*, *77*, 287-293.
- Ferreira, A. C. S., de Pinho, P. G., Rodrigues, P., & Hogg, T. (2002). Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *50*, 5919-5924.

- Ferreira, V., Lopez, R., & Cacho, J. (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*, 1659-1667.
- Ferreira, V., Ortín, N., Escudero, A., López, R., & Cacho, J. (2002). Chemical Characterization of the Aroma of Grenache Rose´ Wines: Aroma Extract Dilution Analysis, Quantitative Determination, and Sensory Reconstitution Studies. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *50*, 4048–4054.
- Ferreira, V., Torres, M., Escudero, A., Ortín, N., & Cacho, J. (2005). Aroma composition and aromatic structure of red wines made with Merlot. In P. S. T. Hofman (Ed.), *State of the art in flavour chemistry and biology. Proceedings from the 7th Wartburg Symposium*, (pp. 292-299). Garching, Germany: Deutsche Forschungsanst. f. Lebensmittelchemie
- Ferreira, V., Escudero, A., Campo, E., & Cacho, J. (2007). The chemical foundations of wine aroma: a role game aiming at wine quality, personality and varietal expression. In A. W. I. T. C. Inc. (Ed.), *13th, Australian wine industry technical conference* (pp. 142-150). Adelaide: Proceedings of the Australian Wine Industry Technical Conference.
- Fischer, C., Fischer, U., & Jakob, L. (1996). Proceedings for the 4th international symposium on cool climate Viticulture and enology. In T. Henick-Kling, T. E. Wolf & E. M. Harkness (Eds.), *International Symposium on Cool Climate Enology & Viticulture*, (pp. 42-46). Rochester, N. Y.: Geneva, N.Y.
- Fornachon, J. C. M., & Lloyd, B. (1965). Bacterial production of diacetyl and acetoin in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *16*, 710-716.
- Goodwin, T. W. (1980). The biochemistry of the carotenoids. In *Vol. I. Plants, Second edition*. London: Chapman and Hall.
- Grant-Preece, P. A., Pardon, K. H., Capone, D. L., Cordente, A. G., Sefton, M. A., Jeffery, D. W., & Elsey, G. M. (2010). Synthesis of wine thiol conjugates and labeled analogues: fermentation of the glutathione conjugate of 3-mercaptohexan-1-ol yields the corresponding cysteine conjugate and free thiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 1383-1389.
- Guedes de Pinho, P., Silva Ferreira, A. C., Mendes Pinto, M., Benitez, J. G., & Hogg, T. A. (2001). Determination of Carotenoid Profiles in Grapes, Musts, and Fortified Wines from Douro Varieties of *Vitis vinifera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(11), 5484-5488.
- Gunata, Z., Bittour, S., Brillouet, J.-M., Bayonove, C., & Cordonnier, R. (1988). Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydrate Research*, *184*, 139-149.
- Gunata, Z., Dugelay, I., Sapis, J. C., Bayonove, C., & Baumes, R. (1993). Role of enzymes in the use of the flavor potential from grape glycosides in

- winemaking. In P. Schreier & P. Winterhalter (Eds.), *Progress in Flavor Precursor, studies*, (pp. 219-234). United States: Allured Published.
- Günata, Z. (1984). Recherche sur la fraction liée de nature glycosidique de l'arôme du raisin : importance des terpénylglycosides, action des glycosidases. *Doctoral dissertation*, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier (p. University Montpellier II).
- Guth, H. (1997). Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *45*, 3027-3032.
- Halpern, B. P. (1982). Environmental Factors Affecting Chemoreceptors: An Overview. *Environmental Health Perspectives*, *44*, 101-105.
- Jeffery, D. W. (2016). Spotlight on Varietal Thiols and Precursors in Grapes and Wines. *Australian Journal of Chemistry*, *69*, 1323–1330.
- Lee, S. J., & Noble, A. C. (2003). Characterization of odor-active compounds in Californian Chardonnay wines using GC-olfactometry and GC-mass spectrometry. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *51*, 8036-8044.
- Liu, J., Meng, X., & Chan, W. (2016). Quantitation of Thioproline in Grape Wine by Isotope Dilution-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(6), 1361-1366.
- Loscos Deodad, N., Ségurel, M., Dagan, L., Sommerer, N., Marlin, T., & Baumes, R. (2008). Identification of S-methylmethionine in Petit Manseng grapes as DMS precursor in wine. *Analytica Chimica Acta*, *621*, 24-29.
- Marais, J. (1979). Effect of storage time and temperature on the formation of dimethyl sulfide and on white wine quality. *Vitis*, *18*, 254-260.
- Marais, J. (1983). Terpenes in the aroma on grape and wine: a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, *4*, 49-58.
- Marais, J. (1987). Terpene concentration and wine quality of *Vitis vinifera* L. cv Gewürztraminer as affected by grape maturity and cellar practices. *Vitis*, *26*, 231-245.
- Marais, J., Van Wyk, C., & Rapp, A. (1989). Carotenoids in grapes. In G. Charalambous (Ed.), *Flavors and off-Flavors*, (pp. 71-85). Amsterdam: Elsevier Science.
- Martineau, B., Henick-Kling, T., & Acree, T. (1995). Reassessment of the influence of malolactic fermentation on the concentration of diacetyl in wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, *46*, 385-388.
- Masneuf, I., Murat, M.-L., Naumov, G. I., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2002). Hybrids *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* having a high liberating ability of some sulfur varietal aromas of *Vitis vinifera* Sauvignon blanc wines. *Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin*, *36*.
- Masuda, M., Okawa, E., Nishimura, K., & Yunome, H. (1984). Identification of 4,5-dimethyl-3-hydroxy-2(5H)-furanone (Sotolon) and ethyl 9-hydroxynonanoate in botrytised wine and evaluation of the roles of

- compounds characteristic of it. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48, 2707-2710.
- Mathieu, S., Terrier, N., Procureur, J., Bigey, F., & Günata, Z. (2005). A Carotenoid Cleavage Dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C13-norisoprenoid accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 56, 2721-2731.
- Moneger, R. (1968). Contribution à l'étude de l'influence exercée par la lumière sur la biosynthèse des caroténoïdes chez *Spirodela polyrrhiza* L. Schleiden. *Physiologie Végétale*, 6, 165-202.
- Morrot, G., Brochet, F., & Dubourdieu, D. (2001). The Color of Odors. *Brain and Language*, 79(2), 309-320.
- Murat, M.-L., Masneuf, I., Darriet, P., Lavigne, V., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2001a). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strains on the Liberation of Volatile Thiols in Sauvignon blanc Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 136-139.
- Murat, M.-L., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2001b). Assessing the Aromatic Potential of Cabernet Sauvignon and Merlot Musts Used to Produce Rose Wine by Assaying the Cysteinylated Precursor of 3-Mercaptohexan-1-ol. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 5412–5417.
- Murat, M.-L., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2001c). Mise en évidence de composés clefs dans l'arôme des vins rosés et clarets de bordeaux. *Journal international des sciences de la vigne et du vin*, 35, 99-105.
- Nahm, S., & Weinreb, S. M. (1981). N-methoxy-n-methylamides as effective acylating agents. *Tetrahedron Letters*, 22, 3815-3818.
- Österbauer, R. A., Matthews, P. M., Jenkinson, M., Beckmann, C. F., Hansen, P. C., & Calvert, G. A. (2005). Color of Scents: Chromatic Stimuli Modulate Odor Responses in the Human Brain. *Journal of Neurophysiology*, 93, 3434-3441.
- Pardon, K. H., Graney, S. D., Capone, D. L., Swiegers, J. H., Sefton, M. A., & Elsey, G. M. (2008). Synthesis of the Individual Diastereomers of the Cysteine Conjugate of 3-Mercaptohexanol (3-MH). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3758-3763.
- Park, S. K., Morrison, J. C., Adams, D. O., & Noble, A. C. (1991). Distribution of free and glycosidically bound monoterpenes in the skin and mesocarp of Muscat of Alexandria grapes during development. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 39, 514-518.
- Park, S. K., Boulton, R. B., Bartra, E., & Noble, A. C. (1994). Incidence of volatile sulfur-compounds in California wines – a preliminary survey. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 341-344.
- Peña-Gallego, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2012). S-Cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors in grapes. A review. *Food Chemistry*, 131, 1-13.

- Petka, J., Cacho, J., & Ferreira, V. (2003). Comparison of flavour perception routes in a synthetic wine model and with GC-olfactometric data. In A. Lonvaud-Funel (Ed.), *Oenologie 2003 : 7e Symposium international*, (pp. 563-565). Paris: Lavoisier.
- Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2000). Measuring the aromatic potential of *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon blanc grapes by assaying S-cysteine conjugates, precursors of the volatile thiols responsible for their varietal aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3387-3391.
- Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2002). Sulfur Aroma Precursor Present in S-glutathione Conjugate Form: Identification of S-3-(Hexan-1-ol)-glutathione in Must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4076-4079.
- Pollnitz, A. P., Pardon, K. H., & Sefton, M. A. (2000). 4-Ethylphenol, 4-ethylguaiacol and oak lactones in Australian red wines. *Australian Grapegrower Winemaker*, 438, 47-50.
- Puglisi, C. J., Daniel, M. A., Capone, D. L., Elsey, G. M., Prager, R. H., & Sefton, M. A. (2005). Precursors to damascenone: synthesis and hydrolysis of isomeric 3,9-dihydroxymegastigma-4,6,7-trienes. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 3895-34900.
- Razungles, A., Bayonove, C., Cordonnier, R., & Baumes, R. (1987). Etude des caroténoïdes du raisin à maturité. *Vitis*, 26, 183-191.
- Ribéreau-Gayon, P., Boidron, J. N., & Terrier, A. (1975). Aroma of muscat grape varieties. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 23, 1042-1047.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2017). *Traité d'Oenologie. Chimie du vin. Stabilisation et traitements*: Dunod.
- Roland, A., Schneider, R., Le Guernevé, C., Razungles, A., & Cavelier, F. (2010a). Identification and quantification by LC-MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: Elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chemistry*, 121(3), 847-855.
- Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Le Guernevé, C., & Cavelier, F. (2010b). Straightforward synthesis of deuterated precursors to demonstrate the biogenesis of aromatic thiols in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10684-10689.
- Roland, A., Vialaret, J., Moniatte, M., Rigou, P., Razungles, A., & Schneider, R. (2010c). Validation of a nanoliquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the identification and the accurate quantification by isotopic dilution of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in white grape juices. *Journal of Chromatography A*, 1217(10), 1626-1635.
- Roland, A. (2011). Influence des phénomènes d'oxydation lors de l'élaboration des moûts sur la qualité aromatique des vins de Melon B. et de Sauvignon

- Blanc en Val de Loire. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier (p. 210): Montpellier SupAgro.
- Roland, A., & Schneider, R. (2015). Development and validation of a high-throughput analysis of glutathione in grapes, musts and wines by Stable Isotope Dilution Assay and LC–MS/MS. *Food Chemistry*, *177*, 152-157.
- Roland, A., Delpech, S., Dagan, L., Ducasse, M.-A., Cavelier, F., & Schneider, R. (2016a). Innovative analysis of 3-mercaptohexan-1-ol, 3-mercaptohexylacetate and their corresponding disulfides in wine by Stable Isotope Dilution Assay and nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1468*, 154-163.
- Roland, A., Viel, C., Reillon, F., Delpech, S., Boivin, P., Schneider, R., & Dagan, L. (2016b). First identification and quantification of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one in hops (*Humulus lupulus*). *Flavour and Fragrance Journal*, *31*, 455-463.
- Schneider, R. (2001). Contribution à la connaissance de l'arôme et du potentiel aromatique du Melon B. (*Vitis vinifera* L.) et des vins de Muscadet. Thèse de Doctorat (p. 222): Université de Montpellier II.
- Schneider, R., Charrier, F., Razungles, A., & Baumes, R. (2006). Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wines. *Analytica Chimica Acta*, *563*, 58-64.
- Schreier, P., Drawert, F., Junker, A., Barton, H., & Leupold, G. (1976). Über die Biosynthese von Aromastoffen durch Mikroorganismen. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.*, *162*, 279-284.
- Ségurel, M. (2005). Contribution des précurseurs glycosidiques et du sulfure de diméthyle des baies de *Vitis vinifera* L. cv. Grenache noir et Syrah à l'arôme des vins de la vallée du Rhône. Thèse de Doctorat (p. 241): École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.
- Ségurel, M., Razungles, A., Riou, C., Trigueiro, M. G. L., & Baumes, R. (2005). Ability of possible precursors to release DMS during wine aging and in the conditions of heat alkaline treatment. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *53*, 2637-2645.
- Ségurel, M. A., Razungles, A. J., Riou, C., Salles, M., & Baumes, R. L. (2004). Contribution of dimethyl sulfide to the aroma of Syrah and Grenache Noir wines and estimation of its potential in grapes of these varieties. *Food Chemistry*, *52*, 7084-7093.
- Shinkaruk, S., Thibon, C., Schmitter, J.-M., Babin, P., Tominaga, T., Desbat, B., Jussier, C., Bennetau, B., Dubourdieu, D., & Bennetau-Pelissero, C. (2008). Surprising Structural Lability of a Cysteine-S-Conjugate Precursor of 4-Methyl-4-sulfanylpentan-2-one, a Varietal Aroma in Wine of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *Chemistry & Biodiversity*, *5*, 793-810.

- Skouroumounis, G. K., Massy-Westropp, A., & Sefton, M. A. (1992). Precursors of β -damascenone in fruit juices. *Tetrahedron Letters*, *33*, 3533-3536.
- Starkenmann, C. (2003). Analysis of a Model Reaction System Containing Cysteine and (*E*)-2-Methyl-2-butenal, (*E*)-2-Hexenal, or Mesityl Oxide. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *51*, 7146–7155.
- Styger, G., Prior, B., & Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *38*, 1145-1159.
- Subileau, M. (2008). Paramètres influant sur la libération des thiols variétaux par la levure *Saccharomyces cerevisiae* : d'un milieu synthétique à la complexité d'un moût de Sauvignon blanc. Thèse de Doctorat (p. 156): Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier.
- Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J.-M., & Degryse, E. (2008). New Insights on 3-Mercaptohexanol (3MH) Biogenesis in Sauvignon Blanc Wines: Cys-3MH and (*E*)-Hexen-2-al Are Not the Major Precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(19), 9230–9235.
- Thibon, C., Shinkaruk, S., Tominaga, T., Bennetau, B., & Dubourdieu, D. (2008). Analysis of the diastereoisomers of the cysteinylated aroma precursor of 3-sulfanylhexanol in *Vitis vinifera* grape must by gas chromatography coupled with ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1183*, 150-157.
- Thibon, C., Shinkaruk, S., Jourdes, M., Bennetau, B., Dubourdieu, D., & Tominaga, T. (2010). Aromatic potential of botrytized white wine grapes: Identification and quantification of new cysteine-S-conjugate flavor precursors. *Analytica Chimica Acta*, *660*, 190-196.
- Thibon, C., Böcker, C., Shinkaruk, S., Moine, V., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2016). Identification of *S*-3-(hexenal)-glutathione and its bisulfite adduct in grape juice from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc as new potential precursors of 3SH. *Food Chemistry*, *199*, 711-719.
- Tominaga, T., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (1996). Identification of 3-mercaptohexyl acetate in Sauvignon wine, a powerful aromatic compound exhibiting box-tree odor. *Vitis*, *35*, 207-210.
- Tominaga, T., Murat, M.-L., & Dubourdieu, D. (1998a). Development of a Method for Analyzing the Volatile Thiols Involved in the Characteristic Aroma of Wines Made from *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *46*, 1044–1048.
- Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., & Dubourdieu, D. (1998b). A New Type of Flavor Precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: *S*-Cysteine Conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 5215-5219.
- Tominaga, T., Baltenweck-Guyot, R., Peyrot Des Gachons, C., & Dubourdieu, D. (2000). Contribution of Volatile Thiols to the Aromas of White Wines Made From Several *Vitis vinifera* Grape Varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, *51*, 178-181.

- Tominaga, T., Guimbertau, G., & Dubourdieu, D. (2003a). Role of Certain Volatile Thiols in the Bouquet of Aged Champagne Wines. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *51*, 1016–1020.
- Tominaga, T., Guimbertau, G., & Dubourdieu, D. (2003b). Contribution of Benzenemethanethiol to Smoky Aroma of Certain *Vitis vinifera* L. Wines. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *51*, 1373–1376.
- Van Wyk, C. J., Augustyn, O. P. H., De Wet, P., & Joubert, W. A. (1979). Isoamyl acetate, a key fermentation volatile of wines of *Vitis vinifera* cv. Pinotage. *American Journal of Enology and Viticulture*, *30*, 167-173.
- Voirin, S., Baumes, R., Bittour, S., Günata, Z., & Bayonove, C. (1990). Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *38*, 1373-1378.
- Wakabayashi, H., Wakabayashi, M., Eisenreich, W., & Engel, K. H. (2004). Stereochemical course of the generation of 3-mercaptohexanal and 3-mercaptohexanol by β -lyase-catalysed cleavage of cystein conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 110-116.
- Williams, P. J., Strauss, C. R., Wilson, B., & Dimitriadis, E. (1984). Recent studies into grape terpene glycosides. In J. Adda (Ed.), *Progress in Flavour Research*, (pp. 349–357). Amsterdam: Elsevier Science.
- Wilson, B., Strauss, C. R., & Williams, P. J. (1984). Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing Muscat grapes. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *32*, 919-924.
- Winterhalter, P. (1993). The generation of C13-norisoprenoid volatiles in Riesling wine. In J. Crouzet, C. Flanzky, C. Martin & J. C. Sapis (Eds.), *Connaissance aromatique des cépage et qualité des vins*, (pp. 65-73). Montpellier: Revue française d'oenologie.
- Wood, C., Siebert, T. E., Parker, M., Capone, D. L., Elsey, G. M., Pollnitz, A. P., Eggers, M., Meier, M., Voessing, T., Widder, S., Krammer, G., Sefton, M. A., & Herderich, M. J. (2008). From wine to pepper: rotundone, an obscure sesquiterpene, is a potent spicy aroma compound. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *56*, 3738-3744.

Identification de nouveaux précurseurs de thiols variétaux dans les moûts et implication dans les mécanismes de révélation du potentiel aromatique.

La mise au point d'une méthode d'analyse par UPLC-MS/MS et dilution isotopique nous a permis d'identifier pour la première fois dans un moût le S-3-(hexan-1-ol)- γ -glutamyl-cystéine (γ GluCys-3MH). Suite à cette découverte, l'étude des inter-conversions entre les glutathionylés, dipeptides et cystéinylés S-conjugués au 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) ou à la 4-mercapto-4-méthyl-pentan-2-one (4MMP), a permis de mettre en évidence deux nouvelles formes de précurseurs. Le suivi de l'évolution de ces différents composés au cours de fermentations alcooliques à l'échelle laboratoire a permis de clarifier leur rôle de précurseurs et d'établir les éventuels mécanismes d'inter-conversion. Par ailleurs, à travers plusieurs expérimentations viticoles et œnologiques conduites à l'échelle pilote en Languedoc et Val de Loire pendant trois années consécutives, des éléments nouveaux ont pu être apportés quant à l'impact de la maturation du raisin et son hétérogénéité, ainsi qu'à l'importance des opérations pré-fermentaires comme la macération pelliculaire ou la stabulation sur bourbes.

Mots-clés : thiols variétaux, précurseurs d'arôme, 3MH, 4MMP, vinification, dilution isotopique

Identification of new varietal thiol precursors in musts and involvement in the revelation mechanisms of the aromatic potential.

The development of a method using UPLC-MS/MS and stable isotope dilution assay allowed us to identify for the first time the S-3-(hexan-1-ol)- γ -glutamyl-cysteine (γ GluCys-3MH) in musts. Following this discovery, the study of inter-conversions between glutathione, dipeptides and cysteine S-conjugates to 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) or 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one (4MMP) highlighted two new forms of precursors. The evolution monitoring of these compounds during alcoholic fermentations at laboratory scale allowed us to clarify their role as precursors and to establish the possible inter-conversion mechanisms. In addition, through several viticultural and oenological experiments carried out at pilot scale in Languedoc and Val de Loire during three consecutive years, new elements could be highlighted about the impact of grape ripening and its heterogeneity, as well as the importance of prefermentative processes, such as skin maceration and must conservation on lees.

Keywords: varietal thiols, aroma precursors, 3MH, 4MMP, winemaking, SIDA