

# SAUVY™

## Para uma óptima expressão dos aromas de tióis varietais

### Novas descobertas

Jessica Noble, Anne Ortiz-Julien, José Maria Heras,  
Marion Bastien, Ann Dumont, Anthony Silvano

## ARTIGO TÉCNICO

## Introdução

Os tióis voláteis são uma família de compostos aromáticos muito conhecidos pela sua contribuição para obter notas frutadas nos vinhos. Esses aromas são muito característicos de algumas variedades de uvas, tais como Sauvignon Blanc, Colombard ou Verdejo, e representam uma grande parte da sua tipicidade. Contribuem também para a complexidade e a fruta de várias outras castas, mesmo nos vinhos tintos. O 3MH (3-sulfanil-hexan-1-ol, também conhecido como 3SH), o seu acetato 3MHA (também conhecido como 3SH-A) e o 4MMP (4-metil-4-sulfanilpentan-2-ona, também conhecido como 4MSP) são os três compostos mais abundantes; o 3MH está associado ao aroma da toranja, o 3MHA ao maracujá e o 4MMP é responsável pelos aromas da groselha preta e do buxo. O seu limiar de perceção é muito baixo, especialmente para o 4MMP (0,8 ng / L). Estes compostos estão presentes no mosto de uvas sendo precursores não voláteis inodoros, conjugados cisteinilados ou glutacionilados. Os tióis aromáticos são revelados pela ação enzimática da levedura durante a fermentação alcoólica.

## Os tióis voláteis são revelados pelas leveduras enológicas

A *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de absorver e clivar os precursores para libertar os tióis livres, o 3MH e o 4MMP (Figura 1). O 3MHA é derivado do 3MH por acetilação. A levedura enológica tem diferentes capacidades de revelar tióis voláteis, atendendo ao seu histórico genético e às suas atividades enzimáticas correspondentes.

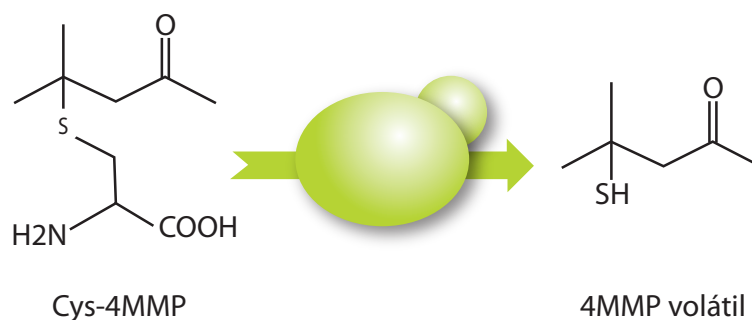


Figura 1. Conversão do precursor inodoro em tiol volátil pela levedura enológica.

## Compreender a liberação de tióis voláteis pela levedura enológica através da sua composição genética.

Os detalhes completos de todas as enzimas envolvidas na via de conversão de precursores em tióis voláteis ainda não são totalmente compreendidos. No entanto, sabe-se que uma família de enzimas, as  $\beta$ -liases carbono-exnófre, é responsável pela conversão dos precursores em 3MH e 4MMP.

O gene, *IRC7*, codifica uma enzima, uma  $\beta$ -liase capaz de clivar precursores conjugados com cisteína. O papel do gene *IRC7* foi destacado mais especificamente na formação de 4MMP, pois o *IRC7* codifica a  $\beta$ -liase por ter uma forte afinidade com o conjugado cys-4MMP [1, 2, 3]. Duas cópias do gene *IRC7* são encontradas na levedura enológica e, para uma melhor libertação de tióis, são necessárias 2 cópias completas (*IRC7<sup>+</sup>/IRC7<sup>+</sup>*).

A maioria das leveduras enológicas possuem uma versão do gene, e essa versão é frequentemente truncada e produz uma proteína não funcional, o *IRC7<sup>-</sup>* [1]. Isso resulta numa enzima incapaz de clivar os precursores dos tióis voláteis. No entanto, quando a levedura possui uma versão longa do gene (*IRC7<sup>+</sup>*), esta consegue clivar os precursores dos tióis voláteis.

Após um estudo genético e uma triagem da nossa coleção de leveduras, identificámos uma levedura enológica peculiar que possui uma cópia 'longa' do gene, *IRC7<sup>+</sup>*. No entanto, este gene não é totalmente expresso na levedura enológica devido à presença da cópia truncada (curta) *IRC7<sup>-</sup>*. Com a nossa pesquisa, fomos capazes de selecionar uma levedura enológica com duas cópias longas do gene *IRC7<sup>+</sup>* podendo expressar totalmente todo o potencial desta enzima  $\beta$ -liase para a libertação de 4MMP.

A abordagem utilizada baseia-se na divisão celular para a exploração da diversidade, onde a nossa levedura parental foi induzida a esporular e produzir uma grande diversidade de fenótipos. A população decorrente foi analisada para cópias longas de *IRC7<sup>L</sup>* usando o PCR específico de alelo, permitindo-nos selecionar uma levedura enológica que possui os dois alelos longos do *IRC7<sup>L</sup>* (Figura 2) e, conseqüentemente, uma  $\beta$ -liase altamente funcional com uma grande afinidade ao cys-4MMP.

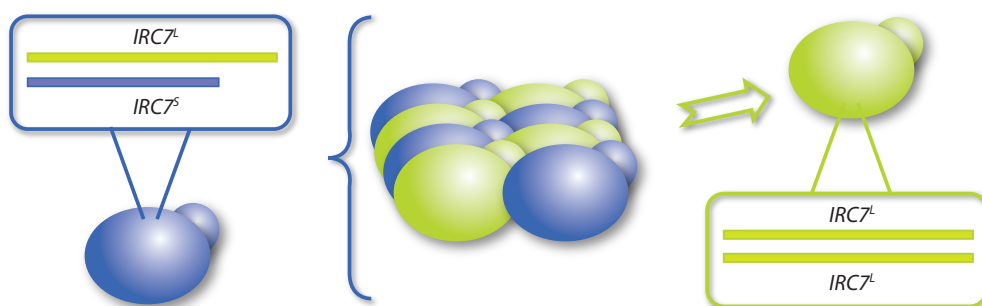


Figura 2. Um novo método baseado na divisão celular para a exploração da diversidade e seleção de uma levedura com duas cópias longas do gene *IRC7*: Sauvy™.

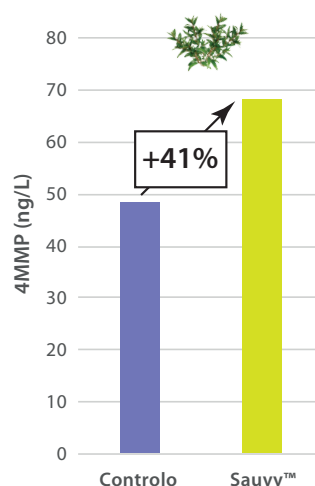
### Para além do comprimento do *IRC7*, as mutações podem ter um impacto negativo na atividade de libertação de tiol

Pesquisas recentes mostraram que o comprimento do gene *IRC7* não é o único parâmetro que tem um impacto na atividade enzimática. Neste caso, isto está relacionado com as mutações. As mutações existem naturalmente entre as leveduras enológicas, algumas das quais têm um impacto negativo na atividade enzimática [4], embora possuam um longo *IRC7*. Uma das mutações de maior impacto é o SNP (Polimorfismo de Nucleotídeo Único) causando uma substituição do aminoácido treonina por uma alanina na sequência da proteína da enzima na posição de aminoácidos 185, chamada T185A. À exceção de SAUVY™, a maioria das leveduras *IRC7<sup>L</sup>* possuem esta mutação, responsável por diminuir a capacidade de libertação de tióis. Este genótipo excepcional de SAUVY™ não é frequente, pois foi estimado que menos de 3% das estirpes de leveduras enológicas têm a combinação do alelo duplo longo *IRC7<sup>L</sup>* e a ausência da mutação T185A [4]. Entre todas as leveduras selecionadas disponíveis, SAUVY™ faz parte desses raros 3%, o que explica o seu fenótipo específico e único e, mais importante, a sua excelente capacidade de libertação de tióis.

### Desempenho real nas adegas

Três anos de vinificações em adegas do mundo inteiro confirmaram a capacidade específica de SAUVY™ em termos de produção de tióis voláteis, especialmente o 4MMP. Sete ensaios foram realizados em França, Alemanha, Estados Unidos, Nova Zelândia e Chile nos vinhos Sauvignon blanc comparando-os com uma levedura tiólica conhecida pela sua capacidade de produzir 4MMP. O nível deste tiol foi até 41% maior, em média, em comparação com o grupo de controlo (Figura 3).

Figura 3. O 4MMP libertado por SAUVY™ em comparação com uma levedura tiólica de referência (média de 7 ensaios realizados num Sauvignon blanc 2019 proveniente de França, Alemanha, Estados Unidos, Nova Zelândia e Chile).



Além de sua capacidade única de permitir a libertação ideal de 4MMP, SAUVY™ apresentou um perfil tiólico completo e intenso. Por exemplo, o índice de aromas com base no valor de atividade odorífera (Figura 4) num Sauvignon blanc do Gers, França, 2019, mostrou que Sauvy™ apresenta uma maior percepção tiólica vegetal, bem como um perfil aromático complexo com aromas de frutas cítricas, tropicais e amarelas em comparação com o grupo de controlo. SAUVY™, para além de revelar aromas mais intensos a buxo, também revela outras notas aromáticas tiólicas.

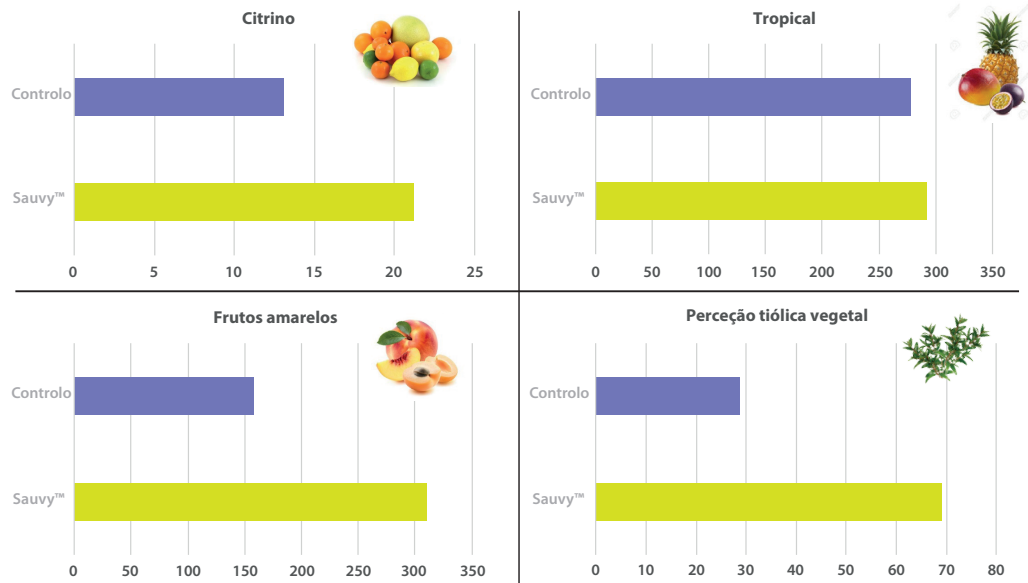


Figura 4. Índice dos aromas baseado no valor da atividade odorífera. Ensaio comparativo num grupo de controlo no vinho Sauvignon blanc (Gers, França, 2019) versus SAUVY™.

Foi realizada uma análise sensorial por um painel de 36 provadores profissionais num Sauvignon Blanc, Bordéus, França, 2018, mostrando uma alta complexidade com um aumento acentuado na “percepção de tiol vegetal” e notas “cítricas” com SAUVY™ em comparação com o controlo (Figura 5). O sabor foi percebido como sendo mais fresco com uma acidez significativamente mais elevada, e 26 de 36 provadores preferiram o vinho fermentado com Sauvy™.



Figura 5. Análise sensorial de um painel profissional (de 36 provadores) num Sauvignon Blanc, Bordeaux, França, 2018. Pontuação média: \*\* significativo no teste de Friedman em 5%. \* Significativo no teste de Friedman em 10%.

No centro da zona do mais famoso Sauvignon blanc, Marlborough na Nova Zelândia, avaliámos o impacto de SAUVY™ em comparação com uma típica levedura enológica de Sauvignon blanc em termos de aroma e sabor. As uvas eram provenientes da sub-região de Rarangi em Marlborough, em 2020, e foram fermentadas com SAUVY™ e com uma levedura enológica de um grupo de controlo. Os níveis de tióis (Figura 6) foram significativamente maiores quando fermentados com SAUVY™. A degustação desses vinhos revelou um significativo aumento da intensidade aromática e da percepção dos tióis (Figura 7).

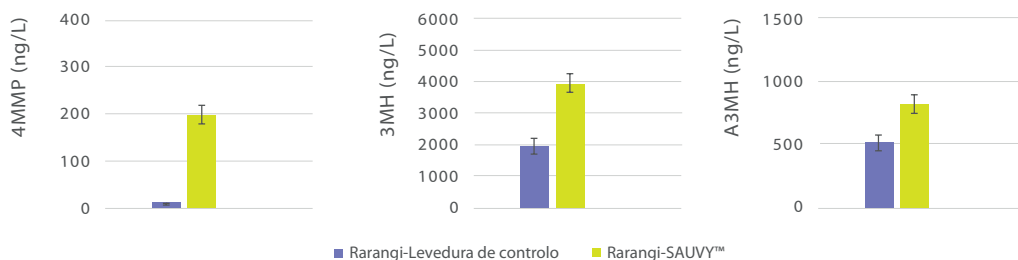


Figura 6. Produção de tióis no Sauvignon blanc 2020 na região de Rarangi em Marlborough (Nova Zelândia) com SAUVY™ versus uma levedura de controle.

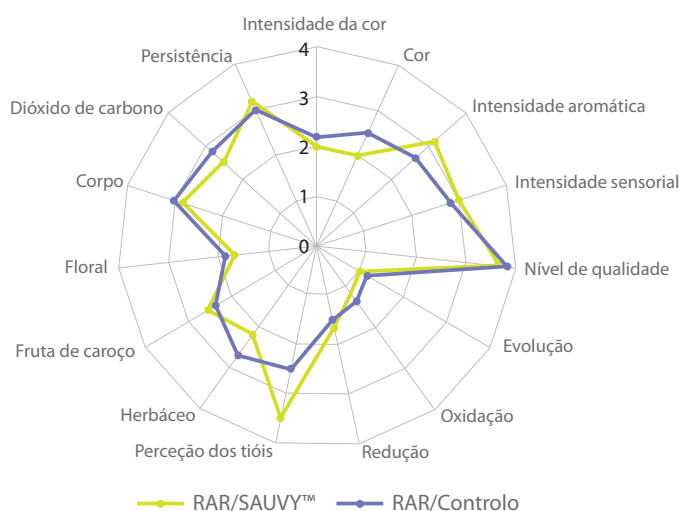


Figura 7. Avaliação sensorial do Sauvignon blanc 2020 (Rarangi, Marlborough, NZ) fermentado com SAUVY™ ou com uma levedura de controle.

## Desempenho sob diferentes condições de vinificação

Para além de sua contribuição aromática excepcional, SAUVY™ apresentou um excelente desempenho na fermentação. Nos 29 ensaios realizados à escala piloto e nas adegas sob várias condições e em diferentes países, os resultados confirmaram o bom desempenho na fermentação e na produção de 4MMP, com diferentes níveis de NFA, especialmente em condições de NFA inicial elevado ou com uma boa gestão da nutrição da levedura, bem como sob diferentes condições de temperatura.

Por exemplo, a baixas temperaturas (14 °C), SAUVY™ foi capaz de completar a fermentação 5 dias antes da levedura controle. Apesar do elevado SO<sub>2</sub> inicial, a duração da fermentação alcoólica foi menor com SAUVY™ e os vinhos produzidos tiveram um teor tiólico significativamente superior (Figura 8).

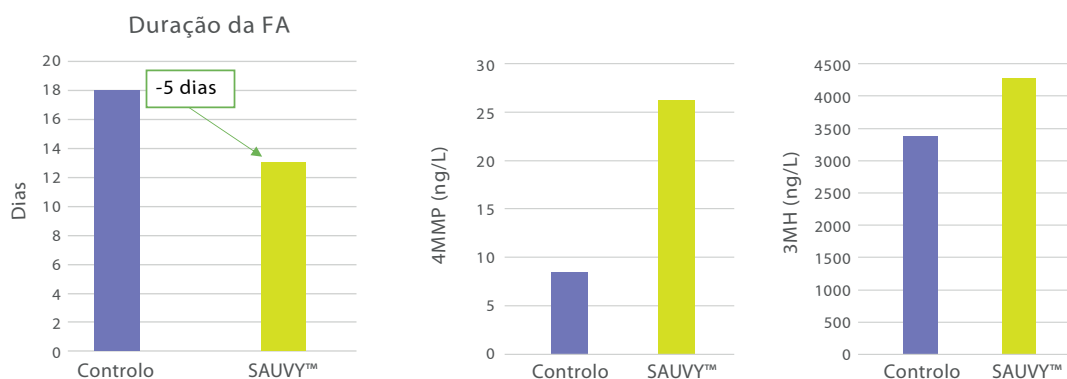


Figura 8. Duração da fermentação alcoólica e análise dos tióis. Ensaio comparativo num vinho Sauvignon blanc (sudeste de França, 2020) fermentado a 14 °C. Mosto com SO<sub>2</sub> inicial elevado. (SO<sub>2</sub> Livre = 28 mg/L - SO<sub>2</sub> Total = 87 mg/L).

SAUVY™ também apresenta uma boa sinergia com o nutriente específico Stimula Sauvignon blanc™ garantindo uma absorção ideal dos precursores dos tióis e uma intensa produção de tióis voláteis (Figura 9).

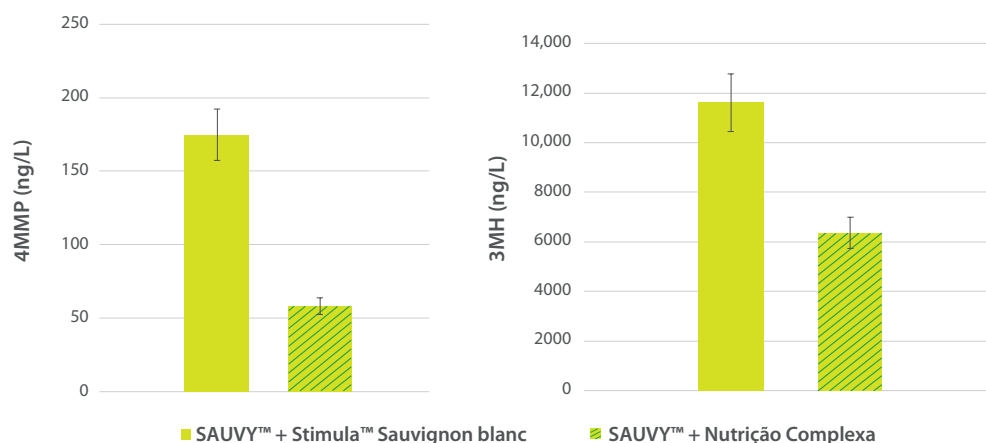


Figura 9. Análise de tióis. Ensaio comparativo em vinho Sauvignon blanc (Chile, 2019) fermentado a 14 ° C com SAUVY™. Aplicação de 40g/hL de Stimula Sauvignon blanc™ no início da fermentação alcoólica.

## Conclusão

Uma compreensão aprofundada da base genética responsável pela libertação de tióis voláteis e a nossa experiência na seleção e caracterização de leveduras enológicas permitiu-nos efetivamente selecionar uma nova levedura enológica com uma óptima libertação de compostos de tióis varietais, em particular o 4MMP. A levedura Sauvy™ possui duas cópias completas do gene *IRC7<sup>L/L</sup>* e não é alvo da mutação T185A, garantindo a atividade  $\beta$ -liase ideal e a libertação tiólica do precursor. Entre todas as leveduras vínicas selecionadas à disposição dos enólogos, SAUVY™ apresenta um potencial excecional e único para a produção de vinhos brancos aromáticos intensos e frescos.

Os vinhos fermentados com SAUVY™ apresentam perfis sensoriais típicos descrevendo o buxo, groselha, folha de tomate, maracujá, frutas cítricas e a groselha preta. SAUVY™ também revela uma sensação de boca refrescante e crocante.

## Referências

- [1] Roncoroni M, Santiago M, Hooks DO, Moroney S, Harsch MJ, Lee SA, Richards KD, Nicolau L, Gardner RC (2011) **The yeast *IRC7* gene encodes a  $\beta$ -lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine.** *Food Microbiol.* 28(5):926-935
- [2] 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 Res* 8: 1076–1086
- [3] Santiago M, Gardner RC (2015) **Yeast genes required for conversion of grape precursors to varietal thiols in wine.** *FEMS Yeast Res.* 15(5):fov034
- [4] Cordente AG, Borneman, AR, Bartel C, Capone D, Solomon M, Roach M, Curtin CD. 2019. **Inactivating mutations in *Irc7p* are common in wine yeasts, attenuating carbon-sulfur  $\beta$ -lyase activity and volatile sulfur compound production.** *Appl Environ Microbiol* 85:e02684-18. <https://doi.org/10.1158/AEM.02684-18>.