

## EFFET COLLOÏDE-PROTECTEUR D'EXTRAITS DE PAROIS DE LEVURES SUR LA STABILITÉ TARTRIQUE D'UNE SOLUTION HYDRO-ALCOOLIQUE MODELE

S. LUBBERS, Bénédicte LEGER, Claudine CHARPENTIER et M. FEUILLAT

Institut Universitaire de la Vigne et du Vin de l'Université de Bourgogne,  
Laboratoire d'Œnologie, Faculté Mirande, 21000 Dijon (France)

**Résumé :** *L'effet colloïde-protecteur d'extraits mannoprotéiques de parois de levures vis-à-vis de la précipitation tartrique a été étudié en solution hydroalcoolique, en utilisant un ISTMètre (Indice de Stabilité Tartrique).*

*Nous avons montré que les deux extraits levuriens inhibaient la cristallisation du bitartrate de potassium au même titre que l'acide métatartrique et la carboxyméthylcellulose, mais à un niveau plus faible. Le niveau de stabilité retenu (ISTC-75) est assuré avec des concentrations par litre de 7,5 mg d'acide métatartrique et de 18 mg de carboxyméthylcellulose. Des concentrations en extraits mannoprotéiques inférieures à 100 mg par litre assurent la stabilité tartrique du vin modèle à l'indice retenu. L'efficacité d'inhibition semble dépendre de la quantité de protéines de l'extrait. Ces polymères mannoprotéiques apportés en quantité suffisante éviteraient les risques de précipitation tartrique dans les vins.*

### INTRODUCTION

La présence de dépôts de tartre dans les bouteilles de vin, bien que ne causant pas de modifications des qualités organoleptiques du produit, apparaît comme un inconvénient commercial important.

De nombreux travaux ont été conduits pour mettre au point, d'une part, des procédés permettant d'éliminer le bitartrate en excès et, d'autre part, des méthodes d'analyses permettant de déterminer la stabilité des vins vis-à-vis des précipitations tartriques (WURDIG et *al.*, 1982; MAUJEAN et SAUSY, 1985; RATSIMBA et GAILLARD, 1988; GAILLARD et *al.*, 1990; BOIRET et *al.*, 1991).

Le bitartrate de potassium encore appelé hydrogénotartrate de potassium (KHT) est en général en sursaturation dans les vins aux températures usuelles (MAUJEAN et SAUSY, 1985; GAILLARD et *al.*, 1990). Un vin présentant une sursaturation élevée sera très sensible à une diminution de la température entraînant la précipitation de l'hydrogénotartrate de potassium.

Des modifications importantes de la composition colloïdale du vin après des traitements sévères comme la microfiltration tangentielle, augmentent également les risques de précipitation tartrique (POIRET et MIGNONAC, 1985; BARILLERE et *al.*, 1985). L'élimination des colloïdes dit "protecteurs" serait à l'origine du phénomène. Ces colloïdes constitués de polymères polysaccharidiques, protéiques et glycoprotéiques ayant le raisin et les levures pour origine, limiteraient les risques de précipitation en inhibant la croissance des cristaux de bitartrate de potassium.

L'acide métatartrique a une action reconnue d'inhibition de la cristallisation de l'hydrogénotartrate de potassium et est autorisé pour traiter les vins. Cependant cet adjuvant ne permet pas d'assurer au produit une stabilité à long terme, l'acide métatartrique ayant tendance à s'hydrolyser et cela d'autant plus rapidement que la température de conservation du vin est élevée.

D'autres types de molécules ont également des propriétés d'inhibition de cristallisation comme la carboxyméthylcellulose. Ce polymère glucidique a une utilisation très répandue en confiserie comme retardateur et stabilisant de cristallisation, mais son utilisation en œnologie n'est pas autorisée.

Dans ce travail, nous avons étudié l'efficacité protectrice de polymères glycoprotéiques de parois de levures vis-à-vis de la précipitation tartrique, en comparaison avec l'acide métatartrique et la carboxyméthylcellulose.

Cette étude a été effectuée en solution hydroalcoolique afin de s'affranchir des autres constituants du vin, avec un appareil de mesure de la stabilité tartrique des vins utilisé par la profession, l'ISTmètre (Indice de Stabilité Tartrique).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### I — MATÉRIEL EXPÉRIMENTAL

#### 1) Agents protecteurs

Nous avons utilisé deux agents ayant une action reconnue sur l'inhibition de la précipitation tartrique:

##### a) L'acide métatartrique

L'acide métatartrique (Groupement des Laboratoires Œnologiques, Rueil-Malmaison, France) est un polyester d'acide tartrique produit par fusion de l'acide tartrique vers 170°C. Nous avons vérifié l'indice d'estérification du produit. On titre par NaOH 0,1 N, l'acidité de l'acide métatartrique avant et après saponification. On détermine alors que 40 p. cent des fonctions carboxyliques de l'acide métatartrique sont estérifiées. L'efficacité du produit dépend de son degré d'estérification. L'acide métatartrique est le seul inhibiteur de cristallisation actuellement autorisé dans les vins.

### b) La carboxyméthylcellulose

La carboxyméthylcellulose de Sigma est constituée de cellulose estérifiée par des groupes carboxyméthyles sur les carbones en C6 mais aussi en C2. L'efficacité du produit varie en fonction du degré de substitution et de polymérisation. La carboxyméthylcellulose utilisée est de faible densité, avec un degré de substitution de 0,8-1. La viscosité à 25°C est de 50 à 200 cps pour une solution aqueuse à 4 p. cent (p/v).

### 2) Polymères d'origine levurienne

Deux extraits mannoprotéiques issus de parois de levures *Saccharomyces cerevisiae* ont été produits par la société Fould Springer (Maisons-Alfort, France). La composition des deux extraits mannoprotéiques ECT et EP est donnée dans le tableau I.

#### a) L'extrait ECT

L'extrait ECT est constitué de molécules solubilisées à partir de parois de levures par un traitement en tampon alcalin pH 7-8, à 100°C, pendant 3 heures. L'extrait ECT liquide fourni renfermant encore des débris de parois, est centrifugé à 13.000 g, 15 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et lyophilisé.

#### b) L'extrait EP

Cet extrait mannoprotéique est obtenu à partir de l'extrait précédent ECT après précipitation à l'éthanol. Un rapport de cinq volumes d'éthanol pour un volume d'extrait liquide a été utilisé lors de la précipitation. Le précipité obtenu est alors séché.

**TABLEAU I**

**Composition des extraits mannoprotéiques ECT et EP**

	Extrait	
	ECT	EP
Protéines <sup>(1)</sup>	11,3	5,8
Oses neutres <sup>(1)</sup>	77,6	89,4
Lipides <sup>(1)</sup>	4,2	3,2
Rapport mannose/glucose	11,6	20,3

<sup>(1)</sup>Teneur exprimée en mg pour 100 mg de matière sèche

### 3) La solution hydroalcoolique

Nous avons utilisé le milieu proposé par MAUJEAN et SAUSY (1985). Cette solution permet d'étudier le couple acide tartrique-ion potassium sans interférence avec les autres sels et acides organiques présents dans le vin.

Ce milieu hydroalcoolique contient par litre 537 mg d'ion potassium, son acidité apportée par l'acide tartrique, exprimée en g d'acide sulfurique par litre est de 1,37 et son pH de 3,01.

La composition de ce milieu est la suivante :

- éthanol : 105 ml
- acide tartrique : 2,10 g
- chlorure de potassium : 1,10 g
- eau distillée qsp : 1 litre

Rappelons qu'à pH 3,01, nous avons un pourcentage élevé d'acide tartrique sous forme d'hydrogénéotartrate de potassium : environ 47 p. cent (BERG et KEEFER, 1958).

## II — MÉTHODE DE MESURE AVEC L'ISTMETRE

### 1) Principe de la méthode

La stabilité tartrique d'un vin peut être estimée par le test de tenue au froid. Ce test très utilisé en œnologie consiste à maintenir un échantillon de vin à - 5°C pendant 6 jours. Le vin est considéré comme stable, s'il n'y a pas de cristallisation de bitartrate de potassium durant cette période.

La méthode utilisée est basée sur le même principe. L'ISTmètre (Indice de Stabilité Tartrique) permet d'obtenir une réponse identique en quelques heures en enrichissant l'échantillon en cristaux d'hydrogénéotartrate de potassium et en abaissant la température à - 5°C. La quantité d'hydrogénéotartrate de potassium pour induire la cristallisation ajoutée à l'échantillon sera d'autant plus importante que le vin est stable, c'est-à-dire faiblement concentré en acide tartrique et en ion potassium.

De nombreux vins de différentes origines ont été testés avec l'ISTmètre afin de déterminer la quantité d'hydrogénéotartrate de potassium à ajouter à un échantillon pour considérer qu'il est stable vis-à-vis de la précipitation tartrique. L'ISTC (Indice de Stabilité Tartrique Critique) a été fixé pour un ajout de 75 mg d'hydrogénéotartrate de potassium/100ml de solution (vin). Si l'échantillon testé renferme des agents inhibiteurs de la cristallisation, il faudra alors une charge en hydrogénéotartrate de potassium supérieure à 75 mg / 100ml pour visualiser des cristaux.

Dans nos expériences nous faisons varier la quantité d'agents protecteurs en fonction de la concentration en hydrogénéotartrate de potassium ajouté.

### 2) Conduite des expérimentations

L'appareil est un ISTmètre IST 2000 de Labover. Il est constitué d'un bain thermostaté de -5° à 35°C dans lequel sont placés six bêchers contenant les échantillons. Une platine d'agitateurs à hélice assure l'agitation des solutions dans les bêchers facilitant ainsi les phases de dissolution et de cristallisation. Chaque bêcher contient 100ml de la solution hydroalcoolique modèle additionnés d'agents protecteurs, en présence de dose croissante d'hydrogénéotartrate de potassium, comprise entre 0 et 200 mg par palier de 12,5 mg.

Le cycle de température (figure 1) dure 5 heures, avec une phase de dissolution de l'hydrogénotartrate de potassium à 35°C et une phase de cristallisation à -5°C. La "lecture" se fait pour une température stabilisée à 10°C. Cette "lecture" consiste à visualiser la présence de cristaux dans les bêchers sous un éclairage puissant. La présence de cristaux entre deux bêchers contenant une charge en hydrogénotartrate de potassium augmentant de 12,5 mg détermine l'indice de stabilité tartrique (IST) pour une concentration en agent protecteur donnée (figure 2).

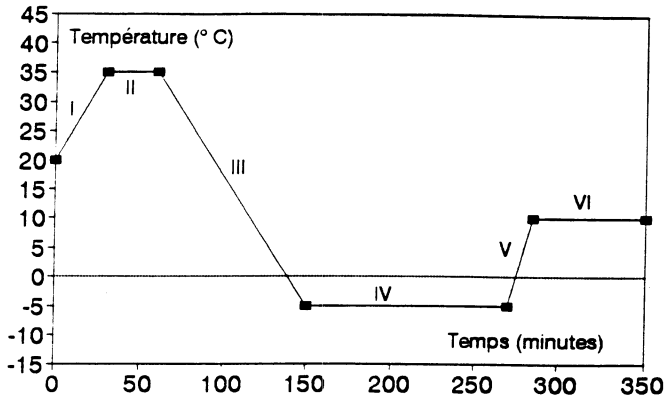


Fig. 1 — Cycle de température de l'ISTmètre

I-II: phase de dissolution de l'hydrogénotartrate de potassium ajouté, sursaturation de la solution; III-IV: phase de cristallisation et maintien à -5°C; V: phase de remontée en température à 10°C; VI: lecture après arrêt de l'agitation

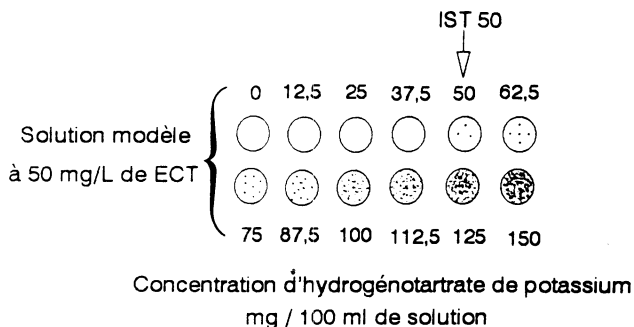


Fig. 2 — Schéma de détermination de l'indice de stabilité tartrique (IST)

L'échantillon renfermant par litre 50 mg/d'extrait ECT présente des cristaux à partir de 50 mg d'hydrogénotartrate de potassium ajouté par litre, soit IST = 50

L'hydrogénotartrate de potassium ajouté, très pur, (Merck) présente la granulométrie suivante: 70 p. cent plus fin que 70 microns, 30 p. cent plus gros que 70 microns et 0,2 p. cent plus gros que 150 microns.

## RÉSULTATS

Nous avons déterminé la dose minimale d'agents protecteurs nécessaire pour obtenir une solution stable vis à vis de la précipitation tartrique correspondant à l'ISTC-75. Pour chaque concentration en agent protecteur, nous avons noté la concentration en hydrogénotartrate de potassium ajouté qui provoque une apparition de cristaux.

### I — ACIDE MÉTATARTRIQUE ET CARBOXYMÉTHYLCELLULOSE

L'analyse de la figure 3 montre que la quantité d'hydrogénotartrate de potassium nécessaire pour obtenir une cristallisation augmente en fonction de la dose d'agent protecteur additionnée. La solution hydroalcoolique est stable à l'indice de stabilité retenu (ISTC-75) avec une dose de 10 mg d'acide métatartrique par litre. L'acide métatartrique est, comme nous l'avons dit, sensible à la température et se dépolymérise, perdant ainsi de son efficacité. Le cycle de température de l'ISTmètre comportant un palier à 35°C, nous avons vérifié quel était l'état de dégradation du produit. Après saponification et titrage à la soude des fonctions carboxyliques libres, nous avons trouvé que seulement 30 p. cent des fonctions acides étaient estérifiées. L'indice d'ester passe de 40 (produit de départ) à 30, soit une diminution de 25 p. cent. En extrapolant, une dose de 7,5 mg d'acide métatartrique par litre serait strictement nécessaire pour obtenir l'ISTC-75 avec un produit non dénaturé.

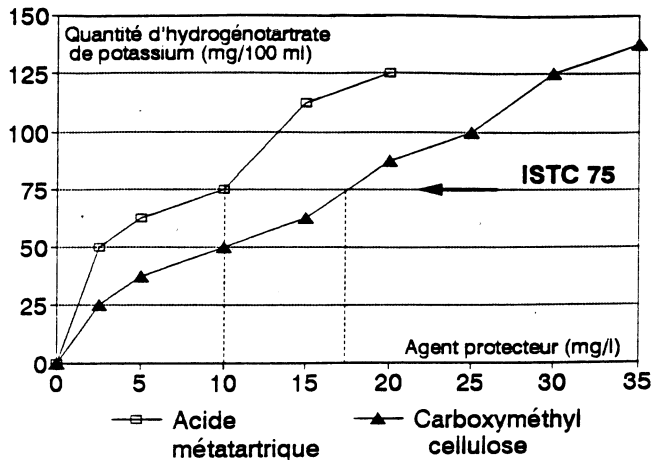


Fig. 3 — Mesure des IST en présence d'acide métatartrique et de carboxyméthylcellulose

L'évolution de la cristallisation en fonction de différentes doses de carboxyméthylcellulose ajoutées est similaire à celle de l'acide métatartrique. L'efficacité de ce polymère glucidique est moins importante que celle de l'acide métatartrique, la dose de carboxyméthylcellulose pour avoir l'indice de stabilité souhaité étant de 18 mg par litre. A cette concentration la limpidité de la solution hydroalcoolique n'est pas modifiée.

## II — POLYMERES D'ORIGINE LEVURIENNE

Les mesures de stabilité en présence des deux extraits mannoprotéiques sont présentées sur la figure 4. La quantité d'hydrogénotartrate de potassium ajouté pour visualiser des cristaux augmente proportionnellement avec la concentration en extrait. L'efficacité semble atteindre un palier pour des charges en hydrogénotartrate de potassium supérieures à 90 mg par litre.

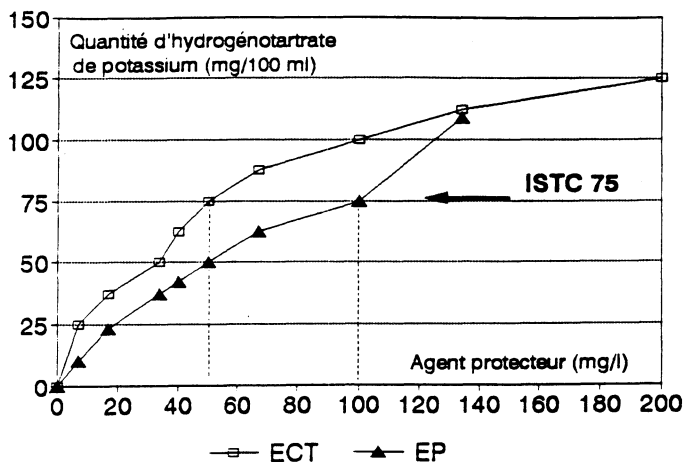


Fig. 4 — Mesure des IST en présence de polymères levuriens ECT et EP

La solubilité des deux polymères dans la solution hydroalcoolique de pH 3 est de 67 p. cent. Des solutions concentrées des extraits ECT et EP ont été préparées dans la solution hydroalcoolique puis filtrées sur filtres d'acétate de cellulose 0,45  $\mu$ m afin d'éliminer l'insoluble. En effet, ce matériel ne doit pas apporter de trouble qui générerait la visualisation des cristaux lors de la mesure. Le niveau de stabilité souhaité à l'ISTC-75 est atteint avec une concentration en ECT de 75 mg par litre, soit 50 mg de produit soluble effectivement ajouté et une concentration en extrait EP de 150 mg par litre soit 100 mg de colloïdes solubilisés.

## DISCUSSION

L'acide tartrique dans la solution hydroalcoolique de pH 3,01, est sous forme d'ions bitartrate (47,15 p. cent) et d'ions tartrate (2,76 p. cent) (BERG et KEEFER, 1958). L'ion bitartrate en présence d'ions potassium a tendance à cristalliser. La précipitation de l'hydrogénotartrate de potassium est régie par le processus de nucléation et de croissance des nucléi (DUNSFORD et BOULTON, 1981; RODRIGUEZ-CLEMENTE et CORREA GOROSPE, 1988). Si la vitesse de nucléation spontanée est suffisamment rapide pour que le rayon critique ( $r_c$ ) du nucléi soit atteint, le cristal croît par agrégation moléculaire d'hydrogénotartrate de potassium diffusant vers l'interface du noyau cristallin (DUNSFORD et BOULTON, 1981).

Des études cristallographiques ont montré que le cristal d'hydrogénéotartrate de potassium s'allonge dans une direction préférentielle. La face du cristal notée (010) a tendance à adsorber plus d'ions  $K^+$  contribuant à un déséquilibre de charge de cette face. Ainsi certaines faces des cristaux d'hydrogénéotartrate de potassium offrent des possibilités de liaisons ioniques avec des impuretés. L'adsorption d'impuretés sur ces faces bloquent la croissance du cristal et donc sa précipitation ultérieure (RODRIGUEZ-CLEMENTE et CORREA-GOROSPE, 1988).

L'action de l'acide métatartrique n'est pas connue précisément, mais il semble qu'il soit adsorbé à la surface des germes cristallins, arrêtant la croissance des cristaux en bloquant l'accumulation de molécules de bitartrate. Son efficacité est très importante mais son instabilité à des températures élevées de conservation du vin, ne permet pas d'assurer une stabilité à long terme du produit traité.

L'existence d'un potentiel positif créé par l'accumulation d'ions  $K^+$  sur une face permet à des molécules chargées négativement de s'adsorber (RODRIGUEZ-CLEMENTE et CORREA-GOROSPE, 1988). Ce phénomène peut expliquer l'effet protecteur des polymères glucidiques : la carboxyméthylcellulose et les extraits mannoprotéiques ECT et EP.

La carboxyméthylcellulose est un polyélectrolyte de pKa proche de 4 (NEWELL et HAIG-ZERONIAN, 1985). Au pH de 3,01, elle présente donc des charges négatives sur les groupements carboxyliques permettant de s'adsorber sur les germes d'hydrogénéotartrate de potassium, inhibant ainsi leur croissance. La carboxyméthylcellulose peut également intervenir en complexant des ions  $K^+$ , diminuant la quantité d'ions libres participant à l'édification des cristaux (NEWELL et HAIG-ZERONIAN, 1985; RODRIGUEZ-CLEMENTE et CORREA-GOROSPE, 1988).

Les extraits mannoprotéiques ont une efficacité d'inhibition beaucoup moins importante que la carboxyméthylcellulose. Ces polymères présentent une charge nette qui n'est due qu'à la partie protéique. Le minimum de solubilité des deux extraits dans la solution hydroalcoolique est à un pH 2,5, représentant le pHi moyen des protéines constitutives des extraits. A pH 3, les deux extraits ont une charge nette plutôt négative. Ces molécules peuvent donc s'adsorber sur les cristaux d'hydrogénéotartrate de potassium au même titre que la carboxyméthylcellulose, mais à un niveau beaucoup plus faible. Le rôle de cette partie protéique semble être déterminante. Ainsi parmi les deux extraits, l'extrait ECT plus riche en protéines a une efficacité inhibitrice plus élevée que l'extrait EP présentant deux fois moins de protéines.

La perte des molécules de petite taille ne précipitant pas à l'éthanol dans l'extrait EP, peut aussi expliquer sa moindre efficacité. Des études sur la taille de colloïdes de vin vis-à-vis de la précipitation tartrique (PIRACCI et GAROFALO, 1990) ont montré que les colloïdes les plus efficaces étaient de très haute masse moléculaire (1000 kDa) mais aussi de petite masse moléculaire (inférieures à 10 kDa).

Les concentrations en extraits levuriens nécessaires pour assurer la stabilité de la solution hydroalcoolique sont relativement faibles, inférieures à 100 mg par litre et ne modifient



pas la limpidité de celle-ci. Des vins présentant une charge en acide tartrique plus importante, mais ayant une concentration en colloïdes élevée comme c'est le cas pour certains vins blancs élevés sur lies, très riches en composés mannoprotéiques suite à l'autolyse des levures (FERRARI et FEUILLAT, 1988; FEUILLAT et al., 1989), peuvent donc présenter une stabilité tartrique accrue. Il apparaît également que l'élimination d'une trop grande partie des colloïdes, déstabilise le vin et favorise les risques de précipitation tartrique.

L'ajout d'extraits mannoprotéiques d'origine levurienne, en remplacement de l'acide métatartrique pour stabiliser les vins vis-à-vis des précipitations tartriques, représenterait un avantage intéressant en œnologie, ces produits pouvant être naturellement présents dans les vins. Les modalités de leur utilisation dans les vins restent toutefois à préciser.

## CONCLUSION

L'étude sur l'inhibition de cristallisation du bitartrate de potassium a permis de mettre en évidence le rôle protecteur de macromolécules levuriennes. Cette observation confirme donc l'importance de la fraction colloïdale des vins sur la stabilité tartrique. La concentration en protéines de l'extrait paraît être un facteur influençant l'efficacité d'inhibition du produit. L'utilisation de ces polymères comme agent inhibiteur de cristallisation pourrait avantageusement remplacer l'utilisation de l'acide métatartrique, qui est un composé exogène par rapport à la composition du vin. De plus un apport en quantité suffisante de polymères levuriens éviterait tout risque de précipitation tartrique même à long terme.

Cette étude réalisée en solution hydroalcoolique devra être effectuée avec différents types de vins pour confirmer nos résultats au niveau de la pratique.

### Remerciements

Cette étude a été effectuée avec le soutien financier du Conseil Régional de Bourgogne et de la Société FOULD SPRINGER. Nous remercions la Société ODIL pour le prêt de l'ISTmètre.

Manuscrit reçu 24 octobre 1992; accepté pour publication le 4 décembre 1992

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARILLERE J.M., ESCUDIER J.L., MOUTOUNET M. et BENARD P., 1985. Microfiltration tangentielle de moûts et de vins. 1<sup>ère</sup> partie : compte-rendu des essais 1984. Ed. Institut Technique du Vin. *Ultrafiltration et microfiltration tangentielle en œnologie*, 179-188.
- BERG H.W. and KEEFER R.M., 1958. Analytical determination of tartrate stability in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **9**, n°4, 180-193.

- BOIRET M., MARTY A., FABREGA C., GUITARD A. et TIXIER A., 1991. Indice de la stabilité tartrique des vins et risque de précipitation. *R.F.OE.*, **128**, 53-58.
- DUNSFORD P. and BOULTON R., 1981. The kinetics of potassium bitartrate crystallization from table wines. I. Effect of particle size, particle surface area and agitation. *Am. J. Enol. Vitic.*, **32**, n°2, 100-105.
- FERRARI G. et FEUILLAT M., 1988. L'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne. I. Etude des composés azotés, des acides gras et analyse sensorielle de vins. *Vitis*, **27**, 183-197.
- FEUILLAT M., FREYSSINET M et CHARPENTIER C., 1989. L'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne. II. Evolution des macromolécules : polysaccharides et protéines. *Vitis*, **28**, 161-176.
- GAILLARD M., RATSIMBA B. et FAVAREL J-L., 1990. Stabilité tartrique des vins: comparaison de différents tests, mesure de l'influence des polyphénols. *R.F.OE.*, **123**, 7-13.
- MAUJEAN A. et SAUSY L., 1985. Détermination de la sursaturation en bitartrate de potassium d'un vin. Quantification des effets colloïdes-protecteurs. *R.F.OE.*, **100**, 39-49.
- NEWELL T.P. and HAIG ZERONIAN S., 1985. *Cellulose chemistry and its applications*. Ed. Ellis Horwood Limited Cooper street, Chichester, West Sussex, England.
- PIRACCI A. et GAROFOLO A., 1990. Impreviste asquisizioni sulle dimensioni molecolari di colloidi del vino che inibiscono la precipitazione del bitartrato di potassio. *Riv. Vitic. Enol.*, **1**, 59-73
- POIRET D. et MIGNONAC J., 1985. Microfiltration tangentielle de moûts et de vins sur membranes minérales. Ed. Institut Technique du Vin. *Ultrafiltration et microfiltration tangentielle en œnologie*, 161-178.
- RATSIMBA B. et GAILLARD M., 1988. Détermination de la stabilité des vins par le repérage de leur température de saturation. *R.F.OE.*, **114**, 43-48.
- RODRIGUEZ-CLEMENTE R. and CORREA-GOROSPE I. 1988. Structural, morphological, and kinetic aspects of potassium hydrogen tartrate precipitation from wines and ethanolic solutions. *Am. J. Enol. Vitic.*, **39**, n°2, 169-179.
- WURDIG D., MULLER TH. et FRIEDRICH G. 1982. Méthode pour caractériser la stabilité du vin vis-à-vis du tartre par détermination de la température de saturation. *Bul. O.I.V.*, **613**, 220-229