Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1992, **26**, N° 4, 239-251

INTERPRÉTATION DE L'AMÉLIORATION DE LA STABILITÉ PROTÉIQUE DES VINS AU COURS DE L'ÉLEVAGE SUR LIES

Virginie LEDOUX*, L. DULAU** et D. DUBOURDIEU*

*Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération, 33405 Talence (France)
**Lallemand s.a., Z.I. Jacca, 3, chemin de la Menude
31770 Colomiers (France)

Résumé : *Les protéines ou glycoprotéines de poids moléculaire compris entre 20.000 et 35.000 Da sont responsables de la casse protéique des vins blancs.*

Leur séparation par électrophorèse capillaire permet de montrer que ce sont les fractions protéiques les moins thermostables qui sont les plus difficiles à éliminer par la bentonite.

D'autre part, il est montré que, lors de l'élevage sur lies des vins blancs, on assiste à une amélioration de la stabilité protéique. Cette amélioration n'est pas dûe à une activité protéolytique des levures au cours de leur autolyse puisque les teneurs en protéines varient peu et que l'addition d'un autolysat à activité protéolytique a peu d'effet sur la stabilité protéique. En fait, l'amélioration de la stabilité protéique des vins blancs au cours de l'élevage sur lies apparaît essentiellement due à l'effet protecteur de macromolécules libérées à partir des parois levuriennes. En effet, l'addition de mannoprotéines à un vin permet d'augmenter sa stabilité protéique et par la même de diminuer la dose de bentonite nécessaire à sa stabilisation.

INTRODUCTION

Plusieurs travaux récents (PAETZOLD et *al.*, 1990; WATERS et *al.*, 1991) ont permis de préciser que les molécules responsables de la casse protéique des vins blancs sont des protéines ou des glycoprotéines de poids moléculaires compris entre 20.000 et 35.000 daltons.

La maturation du raisin, le cépage et les modalités de la technologie préfermentaire, en particulier l'éraflage et la macération pelliculaire, sont les principaux facteurs qui influencent la teneur des vins en composés protéiques thermoinstables.

On ne dispose en revanche que d'observations ponctuelles concernant le rôle de l'élevage sur l'évolution de la stabilité protéique des vins blancs.

Dans ce travail, nous proposons une nouvelle méthode d'analyse des protéines du vin par électrophorèse capillaire et étudions l'influence de l'élevage sur lies des vins blancs sur leur stabilité protéique.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Les essais sont effectués sur un vin de Sauvignon de la récolte 1991.

L'extraction des jus est réalisée dans les conditions de la pratique de la façon suivante : les raisins sont foulés, éraflés et stockés dans une cuve de macération pendant 18 heures sous atmosphère inerte de CO_2 à 15°C sans apport de SO_2; la cuve est ensuite égouttée et les raisins pressés. Les jus de goutte et de presse sont assemblés, sulfités à 5 g/hl et subissent un débourbage statique à 8°C. Les fermentations se déroulent en barrique de 225 l. L'élevage est réalisé sur lies totales pendant 10 mois sans soutirage avec une remise en suspension hebdomadaire des lies, la dose de SO2 libre pendant l'élevage est maintenue à 20 mg/l.

1) Traitement à la bentonite

Le vin est traité par des doses croissantes de bentonite jusqu'à obtention de sa stabilité protéique, estimée par l'absence de trouble formé lors d'un traitement standardisé à la chaleur (DUBOURDIEU et *al.*, 1988), (80°C pendant 30 minutes), le trouble est mesuré par néphélomètrie (turbidimètre HACH RATIO).

2) Incidence de l'élevage sur la stabilité protéique

L'évolution de la stabilité protéique est étudiée au laboratoire sur le vin prélevé dans les barriques à l'occasion d'une homogénéisation des lies après 2 mois d'élevage. Il est placé en bouteilles, soit débarrassé des levures par centrifugation (5.000 RPM pendant 15 minutes), soit avec ses lies.

Après 5 et 9 semaines de conservation en chambre noire à 18°C, on détermine la stabilité thermique, la teneur en protéines et la dose de bentonite nécessaire à la stabilisation.

3) Incidence de l'addition d'un autolysat de levures sur la stabilité protéique

Le même vin est supplémenté ou non par un autolysat de levures (10 p. cent), préparé dans les conditions suivantes :

Un culot de levure (souche CEG), issu de 400 ml de culture (4.10^9 cellules/ml) en phase exponentielle de croissance, repris dans 60 ml d'eau distillée stérile est autolysé pendant 20 heures à 48°C. Les cellules sont éliminées de l'autolysat par centrifugation. L'activité protéasique est évaluée par un test hémoglobine (MEUSSDOERFFER et *al.*, 1980).

4) Incidence de l'addition de mannoprotéines pariétales de levures sur la stabilité protéique

Le même vin est additionné de mannoprotéines de levures (0,1 g/l, 0,2 g/l et 1 g/l) préparées selon la méthode décrite par VILLETAZ (1980).

Des levures sèches actives (26 g) sont placées dans un flacon Schott avec 100 ml d'eau distillée ainsi que 5 ml de tampon citrate 20 mM pH 7, puis autoclavées pendant 2 heures à 138°C. Le milieu est centrifugé 20 minutes à 10.000 rpm. Le surnageant est précipité par 5 volumes d'éthanol. Le précipité sédimente durant la nuit à 2°C. Il est ensuite centrifugé, repris dans de l'eau distillée, dialysé et lyophilisé. Une partie aliquote de lyophilisat (1 g) est dissoute par de l'eau distillée, tamponnée à pH 8 par de la soude 2N. Les mannoprotéines sont précipitées par la liqueur de Fehling. Le culot est lavé avec de l'eau puis acidifié par l'acide chlorhydrique (5 N) jusqu'à disparition de la couleur bleue. Puis, la solution est dialysée et lyophilisée.

II — MÉTHODES DE DOSAGE DES PROTÉINES

1) Chromatographie liquide haute pression

Les protéines du vin sont séparées par chromatographie liquide à haute pression de tamisage moléculaire sur TSK G 2000 SW selon la méthode décrite par l'un de nous (DUBOURDIEU et *al.*, 1986).

2) Électrophorèse capillaire

L'analyse par électrophorèse capillaire est réalisée sur l'appareil DUAL IMPACT de la société EUROPHOR, équipé d'une colonne capillaire de 55 cm et de diamètre interne de 75 µm.

10 ml de vin préalablement centrifugés (5.000 RPM, 10 minutes) sont dialysés (seuil de coupure 6-8.000 Da) contre 5 litres de tampon de séparation acide citrique 20mM à pH 2,5. L'échantillon ainsi préparé est injecté de façon hydrodynamique pendant 1 seconde. La tension appliquée est de 10kV. La température d'analyse est régulée à 25°C. La détection de chaque fraction protéique en sortie de colonne se fait à 200 nm.

Dans ces conditions d'analyses les protéines chargées positivement (pHi est supérieur à 2,5) migrent de l'anode à la cathode.

Cette méthode permet de doser les protéines du vin avec un coefficient de variation moyen de 10 p. cent, les protéines ainsi séparées (figure 1) sont réparties en 7 pics alors qu'en CLHP de tamisage moléculaire (figure 2), 2 pics majeurs imparfaitement séparés sont observés. Le tableau I rapporte les teneurs exprimées en mg/l d'équivalents bovalbumine des différentes fractions protéiques séparées par électrophorèse capillaire.

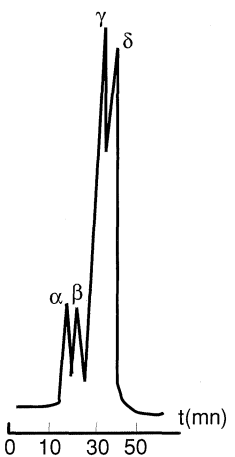


Fig. 1 — Séparation par CLHP de tamisage moléculaire de protéines de Sauvignon

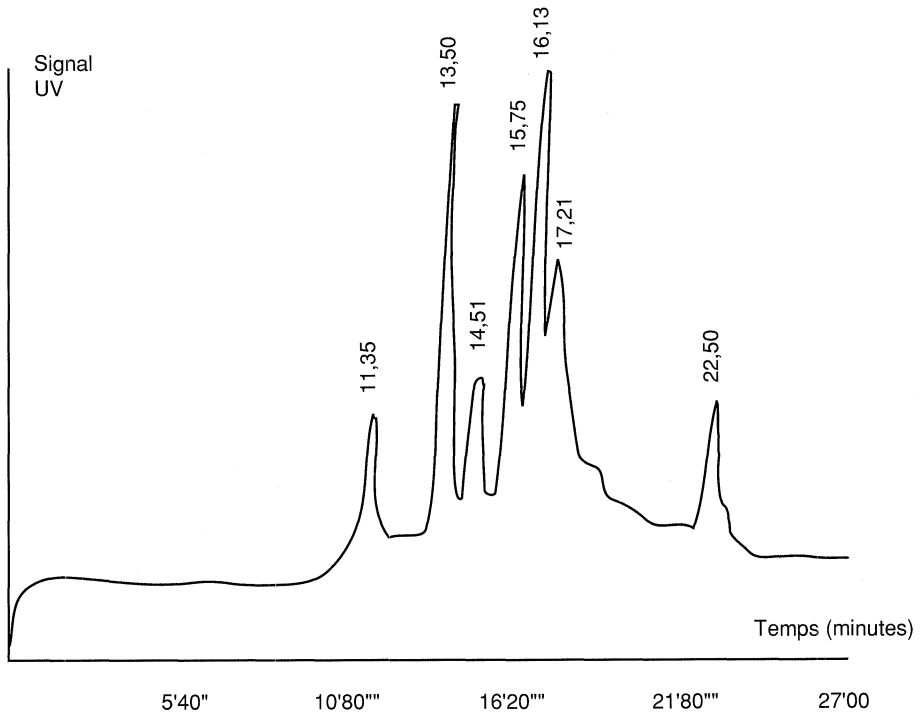


Fig. 2 — Séparation par électrophorèse capillaire de protéines de Sauvignon

TABLEAU I

Résultats d'électrophorèse capillaire des protéines de Sauvignon

Pic numéro	Temps de rétention min	Protéines mg/l éq BSA
1	11,35	21
2	13,5	58
3	14,67	21
4	15,75	35
5	16,43	39
6	17,21	22
7	22,5	20
Total		216

RÉSULTATS

I — STABILITÉ THERMIQUE DU VIN ET TRAITEMENT A LA BENTONITE

Les protéines résiduelles d'un vin stabilisé thermiquement, c'est-à-dire chauffé à 80°C pendant 30 minutes et filtré après refroidissement, sont analysées par électrophorèse capillaire. On détermine pour chaque pic, par comparaison avec l'analyse du vin témoin non chauffé, le pourcentage de diminution imputable au traitement thermique. (les résultats sont donnés figure 3).

Le pic 7 correspond à une fraction thermostable. Cette fraction apparaît seule dans les analyses des précipités à l'éthanol du vin témoin ou du vin chauffé. Compte tenu de la nature polysaccharidique des précipités éthanoliques et de l'absorption dans l'ultra-violet de cette fraction 7, il s'agit vraisemblablement de polysaccharides liés à des peptides.

Les autres fractions séparées par électrophorèse capillaire sont plus ou moins affectées par le traitement à la chaleur, la plus thermoinstable est la fraction 3 puis la fraction 5.

Par ailleurs, un vin est traité par des doses croissantes de bentonite jusqu'à obtention de sa stabilité thermique. On détermine pour chaque pic le pourcentage de protéines adsorbées par chaque dose de bentonite (figure 4).

La fraction 7 thermostable n'est pas adsorbée par la bentonite quelque soit la dose utilisée. Sa nature essentiellement polysaccharidique semble bien confirmée.

A l'inverse, les fractions 1 et 2 sont totalement éliminées du vin par des doses faibles de bentonite. La fraction 4 est éliminée à partir de 75 g/hl. Les autres fractions ne sont jamais complètement éliminées même par des doses élevées de bentonite. La bentonite n'a un effet appréciable sur la fraction 6 qu'au delà de 100 g/hl. Les fractions 3 et 5 subissent une certaine adsorption par la bentonite à faible dose.

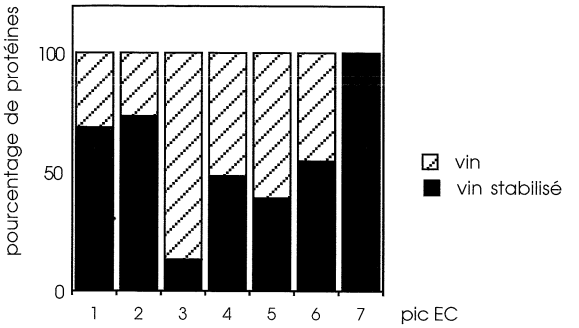


Fig. 3 — Stabilité thermique des protéines

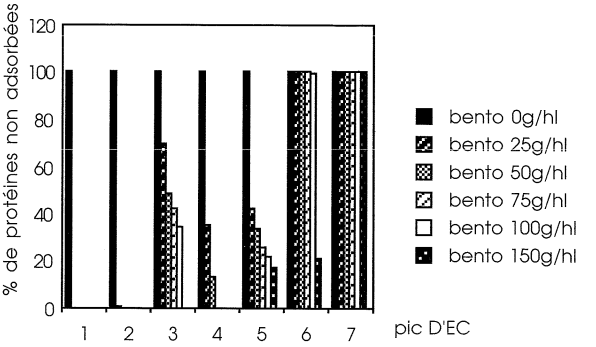


Fig. 4 — Stabilité protéique en fonction de la dose de bentonite

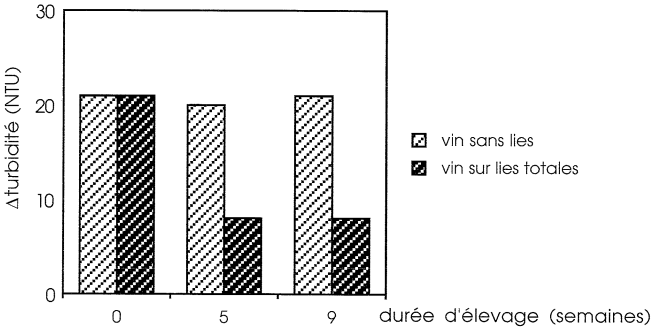


Fig. 5 — Stabilité thermique des protéines au cours de l'élevage

La comparaison des figures 3 et 4 appelle les remarques suivantes. A l'exception de la fraction 7, les protéines les moins thermoinstables (1 et 2) sont les plus faciles à éliminer par la bentonite. La nécessité d'utiliser des doses de bentonite élevées pour stabiliser un tel vin tient à la médiocre capacité d'adsorption de la bentonite vis-à-vis des fractions 3, 5 et 6 et plus particulièrement de la fraction 3 la plus thermoinstable.

I — INCIDENCE DE L'ÉLEVAGE SUR LIES SUR LA STABILITE PROTÉIQUE

Après 5 et 9 semaines de conservation à 18°C d'un vin en présence ou en absence de lies, on mesure l'évolution de son aptitude à former un trouble après chauffage (figure 5).

L'intensité du trouble, observé avec le vin conservé en absence de lies, n'évolue pas au cours de l'expérience. Par contre, dans le cas du vin élevé sur lies, elle est diminuée de moitié, dès 5 semaines de conservation.

Ce fait expérimental confirme bien les observations effectuées dans la pratique. Un vin conservé sur lies totales pendant plusieurs mois devient plus stable à la chaleur. La rapidité du phénomène au laboratoire tient vraisemblablement à la température de conservation plus élevée que dans les chais.

L'élevage des vins blancs secs sur lies contribue à améliorer leur stabilité protéique. Afin de déterminer s'il existe une relation entre la quantité de protéines et la stabilité protéique, le vin est analysé par électrophorèse capillaire au cours de sa conservation (figure 6 et 7).

Compte tenu de la reproductibilité du dosage, on peut considérer que les différences observées ne sont pas significatives et que la teneur en protéines du vin varie peu au cours de sa conservation en présence ou en absence de lies. En outre, les profils électrophorètiques (figure 6) sont pratiquement les mêmes dans tous les échantillons analysés, suggérant qu'il n'y a pas eu modification dans la structure moléculaire des fractions séparées. Cependant, après 9 semaines d'élevage (figure 7), la comparaison des différents pics dans les deux conditions d'élevage met en évidence une certaine diminution des fractions 2 et 5.

Le mode de conservation (avec ou sans lies) influe sur l'évolution de la dose de bentonite nécessaire à la stabilisation au cours de l'élevage. Cette dose varie peu pendant l'élevage dans le cas du vin élevé sans lies, elle diminue fortement (de moitié), dès 5 semaines d'élevage dans le cas du vin sur lies (figure 8).

On observe donc une bonne corrélation entre l'évolution de la turbidité après le test à la chaleur en cours d'élevage et la dose de bentonite nécessaire à la stabilisation, alors que pendant la même période la quantité globale des protéines du vin évolue peu.

Ces observations suggèrent que l'amélioration de la stabilité protéique des vins élevés sur lies n'est pas liée directement à une activité protéolytique des levures en cours d'autolyse. Ainsi, après 5 semaines d'élevage, alors que les profils électrophorètiques du vin sur lies et du vin sans lies sont identiques, le vin élevé sur lies donne un trouble après chauffage deux fois plus faible et nécessite deux fois moins de bentonite pour être stabilisé. Tout ce passe comme si la présence dans le vin de certains constituants cédés par les lies rendait les protéines plus thermostables.

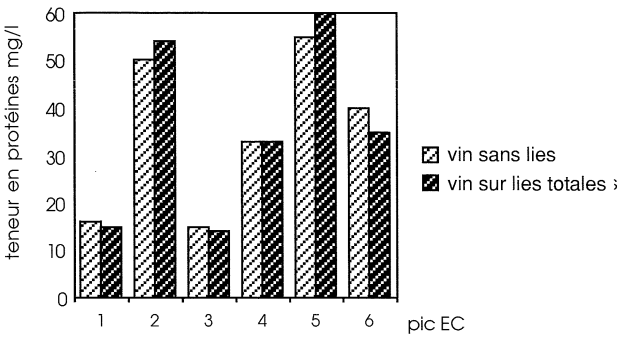


Fig. 6 — Evolution de la teneur en protéines après 5 semaines d'élevage

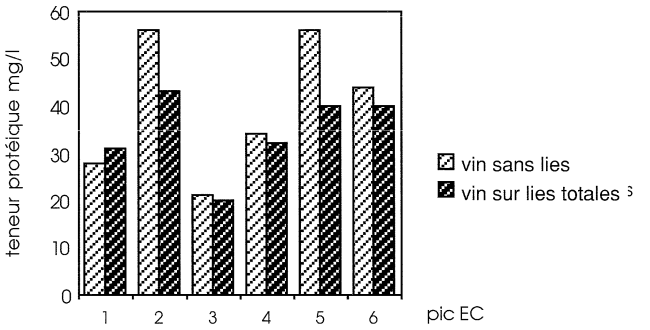


Fig. 7 — Teneur en protéines après 9 semaines d'élevage

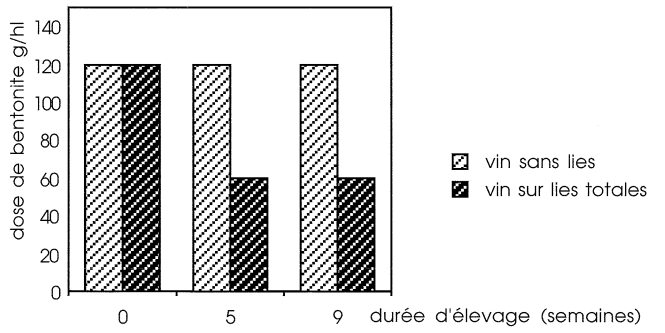


Fig. 8 — Dose de bentonite nécessaire à la stabilisation

A partir des expériences précédentes on peut faire deux hypothèses pour interpréter le rôle des lies sur la stabilité protéique du vin :

- Hypothèse 1 : les activités protéolytiques (FEUILLAT, 1984; DULAU, 1990), en particulier protéase acide, libérées au cours de l'autolyse des levures agissent faiblement sur les protéines thermoinstables du vin;

- Hypothèse 2 : des composés macromoléculaires d'origines pariétales (mannoprotéines) libérés dans le vin au cours de la conservation sur lies (LLAUBÉRES et *al.*,1987) sont susceptibles de diminuer la sensibilité des protéines du vin au traitement à la chaleur.

Ces deux hypothèses sont testés dans les expériences suivantes.

III — INCIDENCE DE L'ADDITION D'UN AUTOLYSAT DE LEVURE SUR LA STABILITE PROTÉIQUE

Au cours de l'autolyse des levures, il se produit un phénomène de libération du matériel enzymatique de la levure. Notre attention s'est portée sur les protéases acides.

Après 5 semaines d'incubation à 18°C, les comportements à la chaleur du même vin supplémenté ou non en autolysat de levures sont identiques. De même, les 2 échantillons, témoin et supplémenté en autolysat, nécessitent la même dose de bentonite pour obtenir la stabilité protéique.

Cependant, les résultats obtenus par électrophorèse capillaire (figure 9) montrent une nette diminution de la fraction 2 dans le vin traité par l'autolysat.

IV — INCIDENCE DE L'ADDITION DE MANNOPROTÉINES SUR LA STABILITE PROTÉIQUE

Le même vin dépourvu de levure par filtration stérilisante est supplémenté ou non en mannoprotéines de levures (voir matériel et méthodes). Les échantillons sont placés 8 jours à 18°C. Leur stabilité thermique, leur teneur en protéines et les doses de bentonite nécessaire pour les stabiliser sont rapportées figures 10, 11 et 12.

L'addition de mannoprotéines d'origines pariétales dans un vin permet de diminuer le trouble à la chaleur et la dose de bentonite de 50 p. cent pour une dose de mannoprotéines de 1 g/l sans entraîner de diminution significative des teneurs en protéines. Il est donc prouvé que ce sont les macromolécules issues des parois levuriennes qui permettent d'améliorer la stabilité protéique des vins au cours de l'élevage sur lies. Il s'agit donc d'une stabilisation colloïdale des protéines du vin diminuant ainsi leur sensibilité à la chaleur.

Cette expérience confirme bien que la stabilité protéique d'un vin blanc ne dépend pas seulement de sa teneur en protéines thermoinstables, mais aussi et surtout, de l'environnement colloïdal de ces molécules.

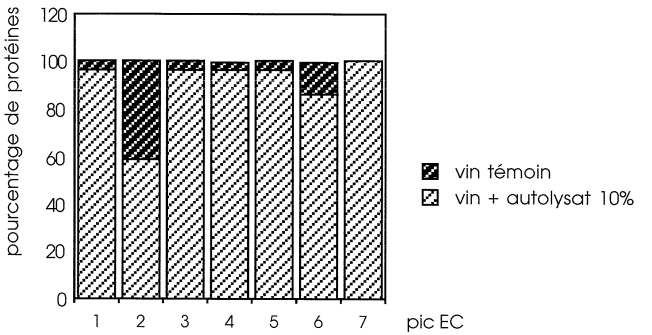


Fig. 9 — Pourcentage de protéines dosées par électrophorèse capillaire

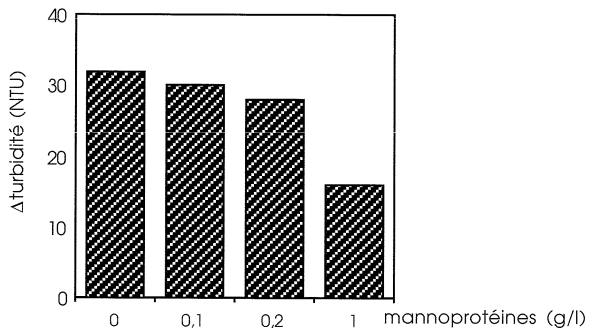


Fig. 10 — Stabilité thermique en fonction de la dose de mannoprotéines ajoutée

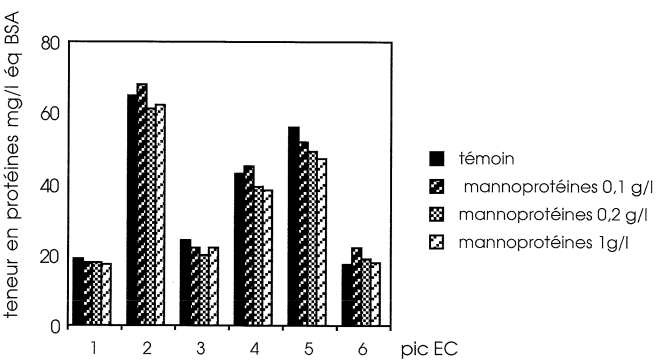


Fig. 11 — Teneur en protéines des vins traité par les mannoprotéines

A noter qu'il s'agit d'une expérience préliminaire dans laquelle, on sait a priori que la méthode rapide de préparation des mannoprotéines utilisée ne permet pas d'obtenir ces composés purs. En outre, le degré de pureté de l'extrait obtenu n'a pas été déterminé; on peut prévoir que l'extrait utilisé contient d'autres composés que les mannoprotéines, comme des peptides ou d'autres polysaccharides. En conséquence, il conviendrait de reproduire les expériences en améliorant la purification des extraits mis en œuvre; il est possible que des doses plus faibles puissent alors être utilisées. Il resterait alors à interpréter les mécanismes physico-chimiques des phénomènes observés.

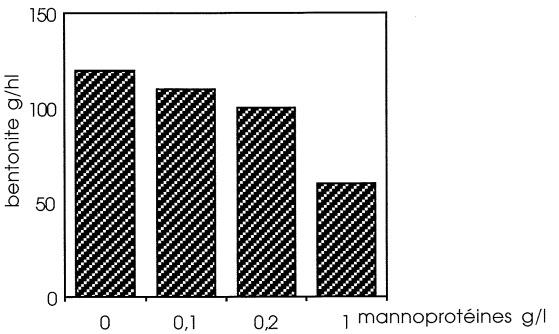


Fig. 12 — Dose de bentonite nécessaire à la stabilisation

DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans ce travail, nous proposons une nouvelle méthode de séparation et de dosage des différentes fractions protéiques du vin par électrophorèse capillaire. Le mode opératoire est simple à mettre en œuvre, les analyses sont sensibles et reproductibles.

Les protéines du vin peuvent être ainsi séparées en 7 fractions pouvant correspondre chacune à des protéines pures ou à un mélange de protéines présentant la même mobilité électrophorétique. De telles séparations quantitatives n'avaient jamais été, à notre connaissance, effectuées sur les protéines du vin. De plus, nous avons pu, par ce procédé, déterminer la stabilité protéique des fractions séparées et leur réactivité vis-à-vis de la bentonite. A l'exception de la fraction 7 qui est thermostable et non adsorbée par la bentonite, les autres fractions protéiques présentent des thermostabilités variables, les plus thermosensibles, notamment la fraction 3 apparaissant plus difficile à éliminer par la bentonite.

La stabilité des profils électrophorètiques des protéines à la fois qualitative (mobilité électrophorétique) et quantitative au cours de la conservation sur lies démontre que l'amélioration majeure de stabilité protéique observée ne peut être attribuée à l'élimination de fractions thermoinstables.

La médiocre efficacité de l'addition d'autolysat de levure à activités protéases sur la dégradation des protéines d'une part et sur l'amélioration de la stabilité protéique des vins d'autre part, apporte une preuve supplémentaire à la démonstration précédente. Elle est en accord avec les résultats de WATERS et *al.*, (1991).

En revanche, l'addition de mannoprotéines de levure à un vin se traduit par une stabilité des profils électrophorétiques néanmoins associée à une nette amélioration de la stabilité protéique. Cette observation permet donc d'affirmer que la stabilité thermique des protéines du vin est liée à leur environement colloïdal. En présence de certaines macromolécules telles les mannoprotéines de levures, les protéines du vin précipitent moins sous l'effet de la chaleur.

Au cours de la conservation sur lies, l'enrichissement colloïdal du vin est essentiellement imputable à la libération de mannoprotéines à partir des parois levuriennes (plusieurs centaines de mg), selon la durée de conservation, sa température et la fréquence des remises en suspension de la biomasse. Ce rôle protecteur des mannoprotéines libérées vis-à-vis des phénomènes de casse protéique constitue certainement l'interprétation la plus vraisemblable de l'amélioration de la stabilité protéique des vins blancs au cours de leur conservation sur lies.

Manuscrit reçu le 2 juin 1992; accepté pour publication le 4 septembre 1992

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DUBOURDIEU D., LLAUBERES R-M. et OLLIVIER C.,1986. Estimation rapide des constituants macromoléculaires des moûts et des vins par chromatographie liquide haute pression de tamisage moléculaire. *Connaissance Vigne Vin*, **20**, n°2, 119-123.

DUBOURDIEU D., SERRANO M., VANNIER A-C. et RIBÉREAU-GAYON P., 1988. Etude comparée des tests de stabilité protéique. *Connaissance Vigne Vin,* **22**, n°4, 261-273.

DULAU L., 1990. Recherche sur les protéines responsables de la casse protéique des vins blancs secs. *Thèse de Doctorat*, Université de Bordeaux II.

FEUILLAT M., 1984. Mise en évidence de souches de levures à caractère protéolytique au cours de la fermentation alcoolique d'un moût de raisin. *Bull O.I.V.*, 645, 878-890.

LLAUBÉRES R.M.,1987. Exocellular polysaccharides from the yeast *Saccharomyces* in wines. *J. Sc. Food. Agric.*, **41**, n°3, 267-286.

MEUSSDOERFFER F., TORTORA P. et HOLZER H., 1980. Purification and properties of proteinase from yeast. *J. Biol. Chem.*, 255,12087-12093.

PAETZOLD M., DUBOURDIEU D. et DULAU L., 1990. Fractionnement et caractérisation des glycoprotéines dans les moûts de raisins blancs. *Connaissance Vigne Vin*, **24**, n°1, 13-28.

VILLETAZ J.C., 1980. Untersuchung der Kolloïde von Traubensaft und Weiner. *Thèse de Doctorat*, Eidegenössischen Techischen Holchschule, Zürich.

WATERS E. J., WALLACE W. et WILLIAM P. J., 1991. Heat haze characteristics of fractionated wine proteins. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, n°2,123-127.