

SÉPARATION DES PROTÉINES DES MOÛTS DE RAISIN AU MOYEN DE TECHNIQUES ÉLECTROPHORÉTIQUES

I. CORREA, M.C. POLO, L. AMIGO et M. RAMOS

Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)
Juan de la Cierva, 3, 28006 MADRID (Espagne)

INTRODUCTION

L'azote du moût de raisin se présente dans sa majeure partie sous forme organique et dans des proportions moindre sous forme minérale. La fraction organique est constituée par des acides aminés, des amides, des peptides, des polypeptides, des protéines et de petites quantités de vitamines.

De toutes ces fractions, la plus connue, aussi bien pour le moût que pour le vin, est celle des acides aminés libres qui a fait l'objet de nombreuses publications dont certaines de notre groupe de travail (MARTIN et *al.* 1984, POLO et *al.* 1985, CACERES et *al.* 1986 et 1987, etc.). En revanche, la fraction protéique, cause de bien des problèmes techniques, est encore peu connue. En raison de leur nature colloïdale, les protéines font obstacles à des opérations essentielles comme la filtration: Aussi a-t-on d'ordinaire recours à des clarifications pour réduire leur effet au minimum. En même temps, elles peuvent être responsables de l'apparition en bouteille de turbidités (casses protéiques) et on leur attribue un rôle important dans le ralentissement de la précipitation du bitartrate de potassium lors de la stabilisation des vins par le froid. La répercussion économique de ces problèmes est grande, compte tenu de la nécessité de présenter au consommateur un produit agréable à l'œil donc limpide voire brillant.

Il n'a pas été trouvé de corrélation positive entre la quantité de protéines et les problèmes qui peuvent surgir avec le vin. On sait par contre que la nature des protéines a une influence. Leur caractérisation est donc d'un grand intérêt.

En outre, l'étude de la fraction protéique est intéressante en tant que critère de caractérisation variétale (WOLFE, 1976), ce qui a été démontré pour d'autres espèces végétales (COOKE, 1984).

Le présent travail analyse, au moyen de techniques électrophorétiques (électrophorèse sans agents dénaturants, électrophorèse sur SDS et focalisation isoélectrique), la fraction protéinique de moûts de différentes variétés de raisin de cuve, à divers degrés de maturité et en provenance de différentes vendanges.

Une partie de ce travail a été présentée au II^e Congrès Mondial de Technologie des Aliments, à Barcelone (1987).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. ÉCHANTILLONS

Moûts de raisin des variétés Garnacha, Tempranillo, Airén, Pardillo, Jaén, Macabeo et Xarel-lo, qui ont été obtenus au laboratoire et conservés à -20°C jusqu'à leur analyse.

II. MÉTHODES ANALYTIQUES

Azote total : Méthode Kjeldahl.

Azote aminé : est estimé égal au total de l'azote des acides aminés libres déterminés par chromatographie liquide à haute performance (MARTIN *et al.*, 1984).

Fraction protéique :

a) *Préparation de l'échantillon.* On dialyse 100 ml de moût face à de l'eau Milli-RO (Millipore Corp. Bedford, MA) à une température de 4°C pendant 48 heures. Puis on procède à la concentration en introduisant les sacs de dialyse dans des solutions de polyéthylène glycol (PM = 20.000) à 20 p. 100. On recueille le reste avec 1 ml d'eau Milli-RO, on centrifuge à 12.000 g pendant 30 minutes et on recueille le surnageant.

b) *Dosage des protéines totales.* Il est effectué sur les échantillons préparés comme indiqué ci-dessus, par la méthode BRADFORD, (1976).

c) *Électrophorèse sur gel de polyacrylamide.*

On a suivi la méthode de HILLIER (1976) en employant des plaques de 170 x 130 x 0,7 mm, la composition du gel étant T = 9,4 p. 100, C = 4,25 p. 100. Les solutions tampons utilisées sont la Tris-HCl pH = 8,9 pour la préparation du gel et la Tris-glycine pH = 8,3 pour les électrodes.

On a essayé trois formes différentes de coloration : a) au bleu brillant de Coomassie G-250 selon BLAKESLEY et BOEZI, (1977), dont la principale caractéristique est de ne pas nécessiter de déteinte; b) en appliquant la technique précédente avec le même colorant purifié selon NEUHOFF *et al.*, (1985) et c) au nitrate d'argent selon MERRIL *et al.*, (1981).

d) *Électrophèse sur SDS*

On a utilisé la méthode de LAEMMLI, (1970) avec un gel de concentration T = 5 p. 100 et C = 1,4 p. 100 et un gel de résolution T = 10 p. 100 et C = 2,7 p. 100.

On a révélé selon la méthode décrite par HAMES, (1985) en employant comme colorant le bleu brillant de Coomassie R-250 à 0,1 p. 100 dans une solution d'eau : méthanol : acide acétique (5:5:2) pendant une nuit et, pour la déteinte, une solution aqueuse d'alcool isopropylique à 12,5 p. 100 et d'acide acétique à 10 p. 100 pendant 48 heures.

Les poids moléculaires ont été déterminés par comparaison à des protéines étalons : phosphorylase b (94.000), sérum-albumine bovine (BSA) (67.000), ovalbumine

(43.000), anhydrase carbonique (30.000), inhibiteur de la trypsine du soja (21.000) et α -lactalbumine (14.400), de Pharmacia Fine Chemicals.

e) *Focalisation isoélectrique.*

On a utilisé un appareil LKB Multiphor 2117 à circuit de refroidissement. La focalisation isoélectrique a été réalisée à 5° C sur un gel de 0,2 mm d'épaisseur, ayant une composition T = 7,5 p. 100 et C = 3 p. 100, avec un gradient de pH de 3,5 à 9,5, préparé au laboratoire. On fait une préfocalisation de 40 minutes à 1200 V, 50 mA et 10 W et, après la mise en place de l'échantillon, on procède à la focalisation pendant 80 minutes à 1500 V, 50 mA et 30 W.

Le pH a été mesuré à des intervalles de 1 cm à la surface du gel avec une électrode de surface LKB, à 5° C; le gel a été coloré au bleu brillant de Coomassie G-250 en appliquant la méthode de BLAKESLEY et BOEZI, (1977).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le tableau I donne les teneurs en azote total, en azote aminé et en protéine totale ainsi que le degré Baumé des échantillons analysés. Il permet de constater que la teneur en protéine présente des valeurs comprises entre 1,0 et 5,0 mg de BSA par litre et que cet azote ne dépasse en aucun cas 0,38 p. 100 de l'azote total des moûts. Ces valeurs ressemblent à celles signalées, pour des raisins cultivés au Japon, par YOKOTSUKA *et al.*, (1977), qui estiment que la protéine comme le total des acides aminés des échantillons dialysés, et elles sont inférieures à celles données par HSU et HEATHERBELL, (1987), qui dosent directement la protéine dans l'échantillon selon la méthode BRADFORD.

Les études préalables qu'il a fallu réaliser pour aboutir aux déterminations électrophorétiques des protéines des moûts nous permettent de faire les observations générales suivantes : a) l'échantillon doit être concentré au moins 100 fois et la quantité de protéine appliquée sur le gel doit être supérieure à 10 μ g ; b) l'utilisation comme révélateur du bleu brillant de Coomassie G-250 purifié selon NEUHOFF *et al.*, (1985), réduit considérablement le fond, ce qui permet d'apercevoir plus nettement les bandes minoritaires.

Le tableau II montre que les bandes détectées lors de l'électrophorèse des moûts sur gel de polyacrylamide avec deux colorations distinctes (au bleu Coomassie G-250 purifié et au nitrate d'argent). On repère en tout 13 bandes dont certaines (bandes E, K, L et M) n'apparaissent qu'avec la coloration au nitrate d'argent et d'autres (Bandes B et H), qu'avec la coloration au bleu de Coomassie. Les deux méthodes de révélation sont complémentaires.

On observe dans la figure 1 des différences entre les électrophorégrammes de moûts de raisins de variétés différentes et, en revanche, des similitudes entre les électrophorégrammes de moûts de raisins de la même variété. Ces résultats nous indiquent qu'il est possible que l'électrophorèse de HILLIER soit une bonne technique pour distinguer les variétés de raisin, ce qu'il faudra confirmer avec un plus grand nombre d'échantillons.

TABLEAU I

Formes diverses d'azote contenues dans les moûts.

Echantillon N° variété	Degré Baumé	N total (mg/l)	N aminé (mg/l)	N protéique (mg/l)	Protéine (mg BSA/l)	$\frac{\text{N aminé}}{\text{N total}} \times 100$	$\frac{\text{N protéique}}{\text{N total}} \times 100$
1 Garnacha	12.3	203	25.2	0.16	1.0	12.4	0.08
2 Garnacha	12.6	168	23.4	0.21	1.3	13.9	0.13
3 Garnacha	13.2	301	88.6	0.27	1.7	29.4	0.09
4 Tempranillo	11.9	456	162.5	0.51	3.2	35.6	0.11
5 Airén	12.9	210	62.0	0.80	5.0	29.5	0.38
6 Airén	13.4	257	90.3	0.18	1.1	35.1	0.07
7 Airén	12.6	600	262.1	0.69	4.3	43.7	0.12
8 Jaén	11.4	279	88.6	0.45	2.8	31.8	0.16
9 Pardillo	12.5	241	76.9	0.34	2.1	31.9	0.14
10 Macabeo	11.5	451	103.8	0.53	3.3	23.0	0.12
11 Xarel-lo	9.6	375	123.7	0.59	3.7	33.0	0.16
12 Xarel-lo	10.3	525	211.9	0.50	3.1	40.4	0.09

TABLEAU II

Bandes détectées par l'électrophèse sur gel de polyacrylamide dans les moûts de raisin.

Échantillon N° variété	Coloration au Bleu Brilliant Coomassie													Coloration au Nitrate d'argent												
	Mobilité :													Mobilité :												
	0.34	0.38	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	0.34	0.40	0.44	0.47	0.49	0.52	0.60	0.64	0.69	0.71	0.81			
1 Garnacha	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-				
2 Garnacha	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-				
3 Garnacha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-				
4 Tempranillo	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+++	+	-	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-				
5 Airén	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-				
6 Airén	+	++	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	++	++	-	+	+	-	-	-	-	-				
7 Airén	+	++	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	++	+	-	+	+	+	+	-	+	+				
8 Jaén	-	+	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-				
9 Pardillo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-				
10 Macabeo	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	++	++	-	++	+	+	-	-	-	-				
11 Xarel-lo	+	++	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	++	++	+	++	-	+	+	+	-	-				
12 Xarel-lo	++	++	+	++	++	++	++	++	+	-	-	+	++	++	-	++	+	+	+	+	+	-				

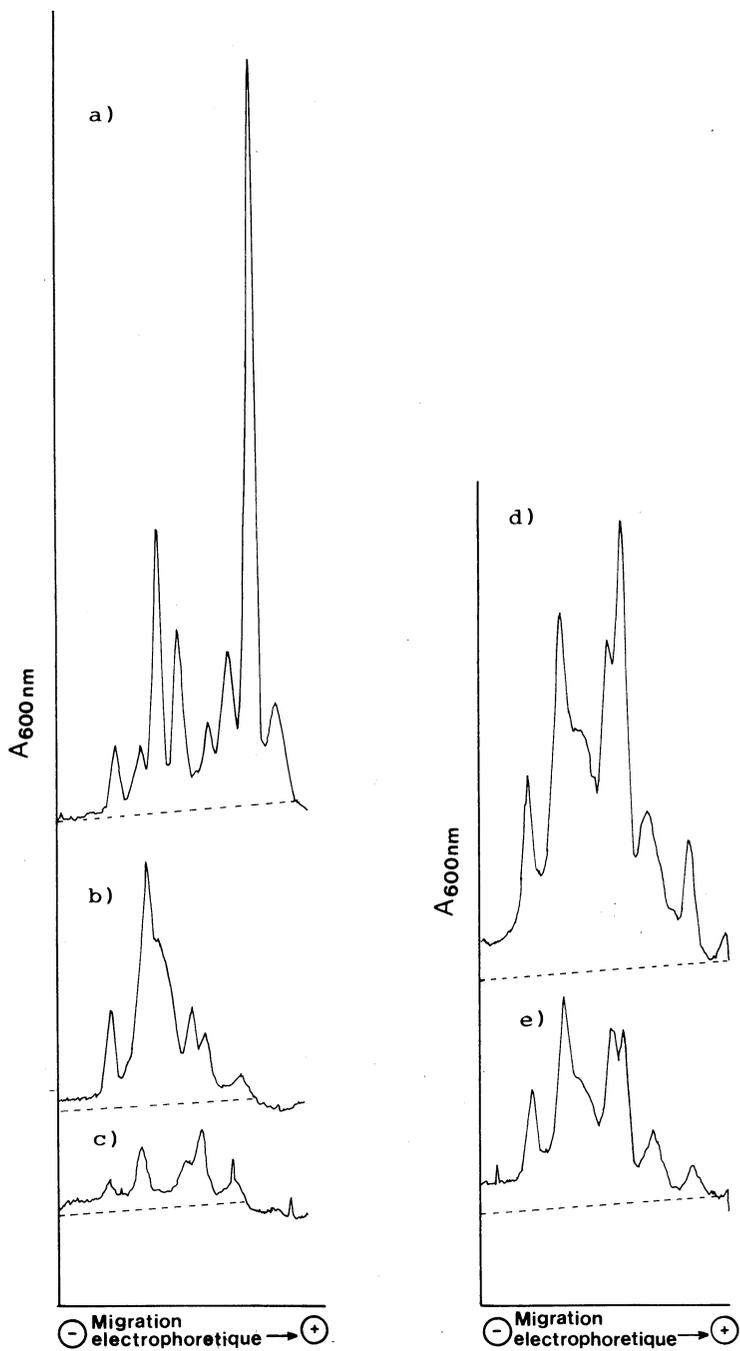


Fig. 1. — Densitogramme des bandes électrophorétiques des moûts de raisin, sur gel de polyacrylamide, colorées par le Bleu Coomassie G-250. (TLC-Scanner, Shimadzu CS-930).
 a) Tempranillo, n° 4; b) Airén, n° 6; c) Macabeo, n° 10; d) Xarel-lo, n° 11; e) Xarel-lo, n° 12.

Le tableau III donne la répartition des poids moléculaires détectée par électrophorèse sur SDS pour un ensemble de moûts. Les moûts 1, 2, et 3, qui correspondent à la variété Garnacha, proviennent de la même vendange et du même vignoble, la différence résidant dans le degré de maturation. L'échantillon du raisin le plus mûr fait apparaître une bande qui n'est pas très bien définie, de poids moléculaire approximativement égal à 43.000, et qui n'existe pas dans les moûts des raisins moins mûrs. A l'intérieur du groupe des bandes à poids moléculaire moindre, la bande majoritaire du moût du raisin moins mûr, qui a un poids moléculaire d'environ 21.000, diminue d'intensité à mesure que la maturation progresse. Il apparaît parallèlement une bande à PM = 18.500, qui augmente au fil de la maturation.

TABLEAU III

Bandes détectées par électrophorèse sur SDS polyacrylamide dans les moûts de raisin.

Poids moléculaire	Garnacha			Airén	Macabeo
	1	2	3	5	10
43.000	—	—	+	+	—
23.000	—	—	—	+	—
21.000	++	+	+	—	—
20.500	—	—	+	+	+
19.500	—	—	—	+	—
19.000	+	+	—	+	—
18.500	+	++	++	—	+
17.500	—	+	+	—	+
16.500	+	+	+	—	+
15.500	—	—	—	+	—

La répartition des poids moléculaires des moûts des raisins des variétés Airén et Macabeo diffère de celle des moûts de la variété Garnacha. Dans tous les échantillons analysés, on constate la prédominance des fractions correspondant à des protéines de poids moléculaire compris entre 16.500 et 25.000 daltons. LAMIKANRA, (1987) trouve, dans les raisins Muscadine, des protéines d'un poids moléculaire de 100.000 daltons mais ce même auteur précise qu'il n'est pas courant de trouver dans les raisins des protéines d'un poids moléculaire supérieur à 30.000 daltons. Dans un des premiers travaux où l'on appliqué l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide à l'étude des moûts et des vins, FEUILLAT *et al.*, (1972), trouvent deux groupes de protéines dans des moûts de raisins de la variété Chardonnay, l'un d'un poids moléculaire égal ou supérieur à 150.000 et l'autre, voisin de 50.000. DUBOURDIEU *et al.*, (1986), par

chromatographie liquide haute performance de tamisage moléculaire fractionnent des protéines d'un vin blanc sec. Les pics majoritaires qu'ils obtiennent correspondent à des protéines de poids moléculaires voisins de 29.000 et 25.000 daltons.

Les points isoélectriques des protéines des moûts analysés par focalisation isoélectrique sont compris entre 3,5 et 6,0, les bandes à point isoélectrique inférieur étant majoritaires. Le grand nombre des bandes observées, dans une gamme étroite de pH, rend l'interprétation des résultats difficile et, au stade actuel de l'expérimentation, il ne permet pas d'en tirer des résultats concluants. Ce qu'on peut néanmoins affirmer au vu des résultats, c'est que dans les bandes apparues dans les diagrammes électrophorétiques des tableaux II et III, qui correspondent à des protéines dont le poids moléculaire et la mobilité électrophorétique coïncident, il pourrait y avoir regroupement de protéines de nature différente.

Remerciements : Cette recherche a été partiellement financée par la firme Codorníu S.A. de San Sadurní de Noya (Barcelone).

Manuscrit reçu le 28 septembre 1987; accepté pour publication le 7 janvier 1988.

RÉSUMÉ

En recourant à des techniques électrophorétiques (électrophorèse sans agents dénaturants, électrophorèse sur SDS et focalisation isoélectrique), on étudie la fraction protéique de moûts de raisins des variétés Garnacha, Tempranillo, Airén, Pardillo, Jaén, Macabeo et Xarel-lo. On observe des différences entre les moûts des différentes variétés de raisin et entre les moûts de la même variété à divers degrés de maturité.

SUMMARY

The study of the proteic component in grape-musts, based upon Grenache, Tempranillo, Airén, Pardillo, Jaén, Macabeo and Xarel-lo grapes using electrophoretic methods of investigation (electrophoresis without denaturants, SDS electrophoresis and isoelectric focalization) shows some differences between the musts depending on the grape variety, but also within the musts of the same grape variety at different stages of maturation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BLAKESLEY, R.W. et BOEZI, J.A. 1977. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Anal. Biochem.* **82**, 580-582.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, **72**, 248-255.
- CACERES I., BARAHONA F., et POLO C., 1986. El analisis integro de los vinos. IV Cromatografía de líquidos de alta eficacia. *Alimentación, equipos y tecnología*, mayo-junio, 141-152.
- CACERES I., POLO M.C., CABEZUDO M.D., 1987. El análisis íntegro de los vinos. V. La fracción nitrogenada. *Alimentación, equipos y tecnología*, marzo-abril, 123-128.

- COOKE R.J., 1984. The characterisation and identification of crop cultivars by electrophoresis. *Electrophoresis*, **5**, 59-72.
- DUBOURDIEU D., LLAUBERES R.M. et OLLIVIER C., 1986. Estimation rapide des constituants macromoléculaires des moûts et des vins par chromatographie liquide haute pression (CLHP) de tamisage moléculaire. *Connaissance Vigne Vin*, **20**, N° 2, 119-123.
- FEUILLAT M., BERGERET J. et TEXIER J.J., 1972. Séparation, concentration et analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de protéines solubles du Raisin et du Vin. *Revue Française d'Oenologie*, **48**, 5-11.
- HAMES B.D., 1985. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. HAMES B.D. and RICKWOOD D., 1-91. IRL Press, Oxford.
- HILLIER R.M., 1976. The quantitative measurement of wye proteins using polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Res.*, **43**, 259-266.
- HSU J.C. et HEARTHERBELL D.A., 1987. Isolation and characterization of soluble proteins in grapes, grape juice and wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 6-10.
- LAEMMLI U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- LAMIKANRA O., 1987. The proteins of muscadine grapes. *J. Food Sci.*, **52**, 483-484.
- MARTIN P., POLO C., CABEZUDO M.D. et DABRIO M.V., 1984. Dansyl aminoacids behaviour on a Radial Pack C18 column. Derivatization of grape wine musts, wine and wine vinegars. *J. Liquid Chromat.*, **7**, 539-558.
- MERRIL C.R., GOLDMANN D., SEDMAN S.A. et EBERT M.H., 1981. Ultrasensitive stain for protein in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*, **211**, 1437-1438.
- NEUHOFF V., STAMM R. et EIBL H., 1985. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels : A systematic analysis. *Electrophoresis*, **6**, 427-448.
- POLO M.C., HERRAIZ M. et CABEZUDO M.D. 1985. Instrumental analysis of foods. Recent progress. CHARALAMBOUS G. and INGLET G., Ed. Academic Press, New-York, Vol. 2, 357-374.
- WOLFE W.H., 1976. Identification of grape varieties by isozyme banding patterns. *Am. J. Enol. Vitic.*, **27**, 68-73.
- YOKOTSUKA K., YOSHII M. AIHARA T. et KUSHIDA T., 1977. Isolation and characterization of proteins from juices, musts and wines from Japanese grapes. *J. Ferment. Technol.*, **55**, 510-515.