

ÉTUDE COMPARÉE DES TESTS DE STABILITÉ PROTÉIQUE

D. DUBOURDIEU, M. SERRANO, Anne Claire VANNIER et P. RIBÉREAU-GAYON

Institut d'Oenologie, Université de Bordeaux II
351, Cours de la Libération, 33405 Talence (France)

Différents essais de laboratoire sont utilisés depuis longtemps pour évaluer le risque d'apparition d'un trouble protéique dans les vins blancs (RIBÉREAU-GAYON, 1931; KOCH et *al.*, 1963; BERG et AKIYOSHI, 1961; JAKOB, 1962; SIEGRIEST et BIOL, 1963).

Il nous a paru souhaitable de comparer ces différents tests en utilisant les méthodes récentes de mesure de la limpidité et de dosage des protéines.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I — CHOIX DES VINS

Le travail a été effectué sur des vins blancs secs de bordeaux du millésimes 1986, cépage Sémillon.

Dans le but d'obtenir des vins présentant des teneurs différentes en protéines nous avons fait varier : le lieu de la récolte, le mode de cueillette (manuelle ou mécanique), les conditions de pressurage (pressurage immédiat ou macération préfermentaire). Les quatre vins choisis ont été élaborés à partir des techniques suivantes :

Vin A : Vendange manuelle; macération préfermentaire.

Vin B : Vendange manuelle; pressurage immédiat.

Vin C : Vendange mécanique; macération préfermentaire.

Vin D : Vendange mécanique; pressurage immédiat.

Les quatre vins ont fermenté dans des cuves en acier inoxydable de 200 hectolitres en l'absence de bentonite.

Les échantillons ont été prélevés après achèvement de la fermentation alcoolique.

II — TESTS DE STABILITÉ PROTÉIQUE

Les tests sont effectués sur des vins clarifiés par centrifugation (15 mm à 10.000 tours / mm). A l'issue du test, les turbidités sont mesurées par néphélométrie. L'appareil utilisé est le SIGRIST PHOTOMETER modèle KTL 65.

Les tests suivants sont étudiés :

1) Chauffage au bain marie à 80°C pendant 5 mm : 100 millilitres de vin contenus dans une fiole conique de 250 ml sont placés au bain marie. Le trouble apparaît pendant le chauffage ou le refroidissement.

- 2) Chauffage au bain marie à 80°C pendant 30 mn : procédure identique à 1.
- 3) Chauffage à 35°C à l'étuve pendant 10 jours : le vin à étudier est placé dans une fiole jaugée de 100 ml bouchée émeri. Le trouble est mesuré à la sortie de l'étuve.
- 4) Ajout de tanin à la dose de 0,5 g par litre. Trois tanins ont été testés (tanin purifié à l'éther, tanin purifié à l'alcool, et tanin purifié à l'eau dit tanin œnologique). Ce sont tous les trois des produits issus de la noix de galle. Trois fois 100 ml de vin sont placés dans trois fioles coniques de 250 ml et additionnés des trois tanins à la dose de 500 mg par litre. On procède ensuite à la mesure du trouble.
- 5) Bentotest : 100 ml de vin sont additionnés de 10 ml de réactif à l'acide phosphomolybdique (bentotest). Le liquide se colore en bleu et le trouble qui apparaît instantanément est mesuré par néphélométrie.
- 6) Ajout d'acide trichloracétique. Dans une fiole conique de 250 ml on place 100 ml de vin et 10 ml d'acide trichloracétique à 55 p. 100. L'ensemble est chauffé 2 minutes au bain marie à 100°C puis laissé 15 minutes à température ambiante. On procède ensuite à la mesure de la turbidité.

III — DOSAGE DES PROTÉINES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

Les protéines solubles sont dosées après clarification des échantillons par centrifugation.

La méthode de dosage (DUBOURDIEU et *al.*, 1986) utilise la chromatographie liquide haute performance (CLHP) de tamisage moléculaire sur une colonne TSK G2000 SW (60 mm x 7,5 mm) précédée d'une précolonne de Trisacryl GF 05.

L'éluant est une solution aqueuse de chlorure de sodium 0,1 M au débit de 0,6 ml/mn. La détection spectrophotométrique en sortie de colonne est effectuée dans l'ultraviolet à 226 nm.

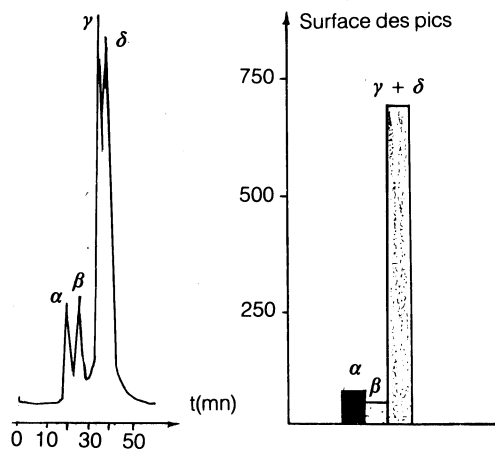


Fig. 1. — Chromatogramme et surface correspondante des pics des protéines d'un vin blanc.

Les protéines et glycoprotéines du vin sont ainsi fractionnées selon leur poids moléculaires en 4 pics α , β , γ , δ . Sont élués dans le pic α (volume d'exclusion de la colonne) les protéines de poids moléculaires supérieurs à 70.000. Par ailleurs, il a été précédemment montré que la majeure partie des polysaccharides linéaires du vin (de poids moléculaires > 20.000) se retrouvent également dans le pic α . Le pic β correspond à des protéines dont le poids moléculaire moyen est de 65.000. Dans les pics γ et δ , imparfaitement séparés, sont éluées les protéines de poids moléculaires compris entre 15.000 et 30.000. Elles constituent la majeure partie des protéines du vin. La figure 1 représente, d'une part, un chromatogramme et, d'autre part, sous forme d'histogramme les surfaces des différents pics.

RÉSULTATS

I — PROFILS PROTÉIQUES DES VINS TÉMOINS

Les histogrammes des surfaces des pics des chromatogrammes des protéines des vins témoins (avant application des tests) sont donnés figure 2.

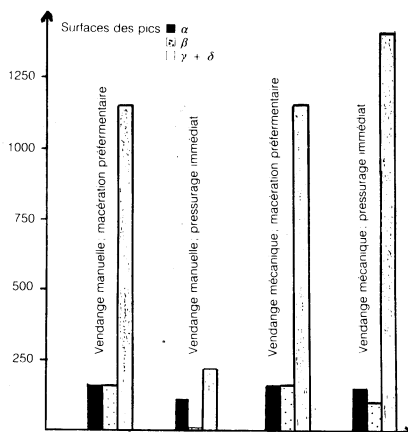


Fig. 2. — Surfaces des pics α , β , γ et δ des chromatogrammes de protéines de quatre vins issus du cépage Sémillon élaborés par des techniques différentes.

Les teneurs en protéines des quatre vins diffèrent sensiblement; il apparaît en particulier que le vin issu d'une vendange manuelle sans macération préfermentaire contient peu de substances protéiques. Par contre, dans le cas de vendange mécanique, il n'y a guère de différences entre les deux vins obtenus par pressurage immédiat ou par macération préfermentaire. Ce résultat recoupe de précédentes observations sur l'évolution des protéines solubles du moût au cours du contact préfermentaire entre les jus et les pellicules.

II — PROFILS PROTÉIQUES APRÈS APPLICATION DES TESTS

Les figures 3, 4, 5 et 6 traduisent l'évolution pour chaque vin des surfaces des pics des différentes fractions protéiques, en fonction des tests appliqués.

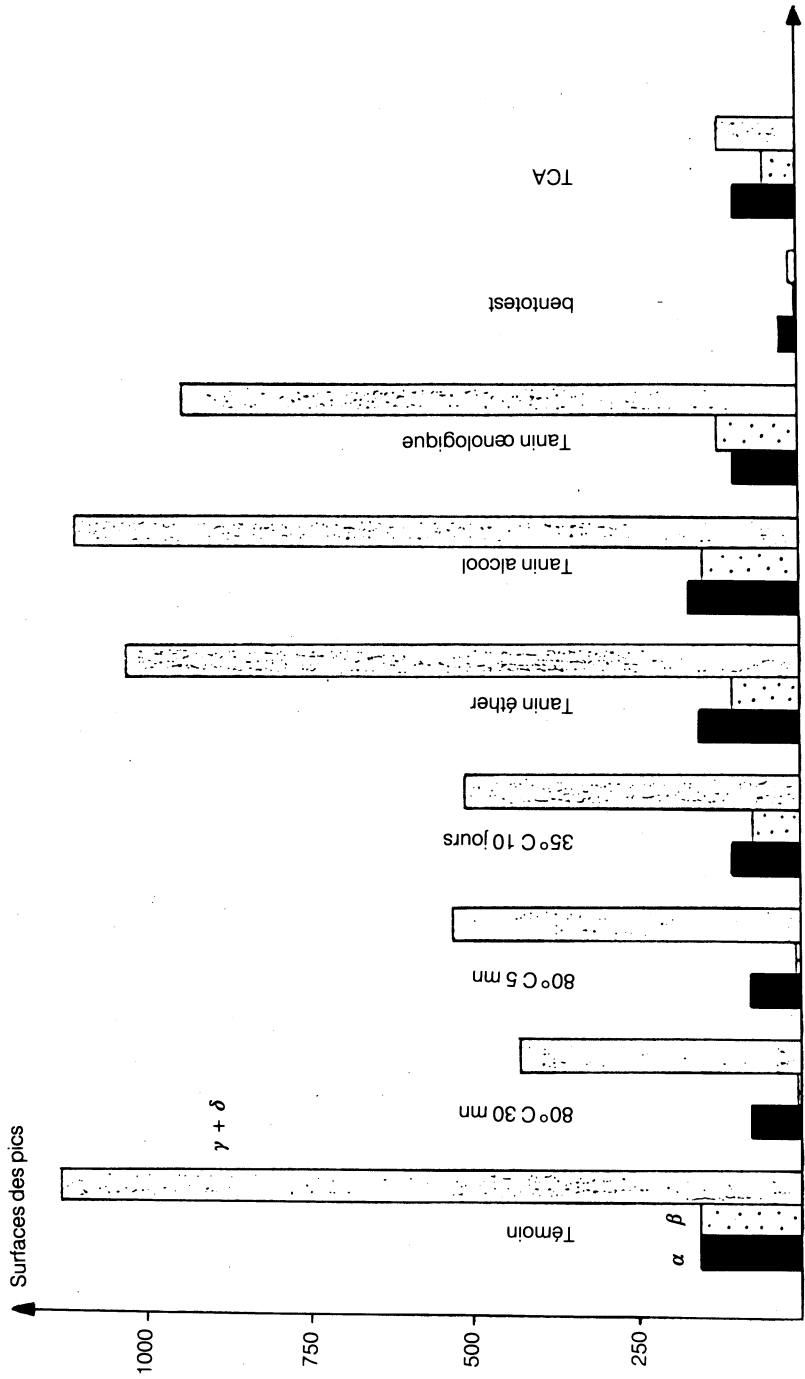


Fig. 3. — Comparaison des surfaces des pics α , β , γ , δ , des chromatogrammes des protéines d'un vin blanc de Sémillon avant et après différents tests de stabilité. Vin issu de vendange manuelle avec macération.

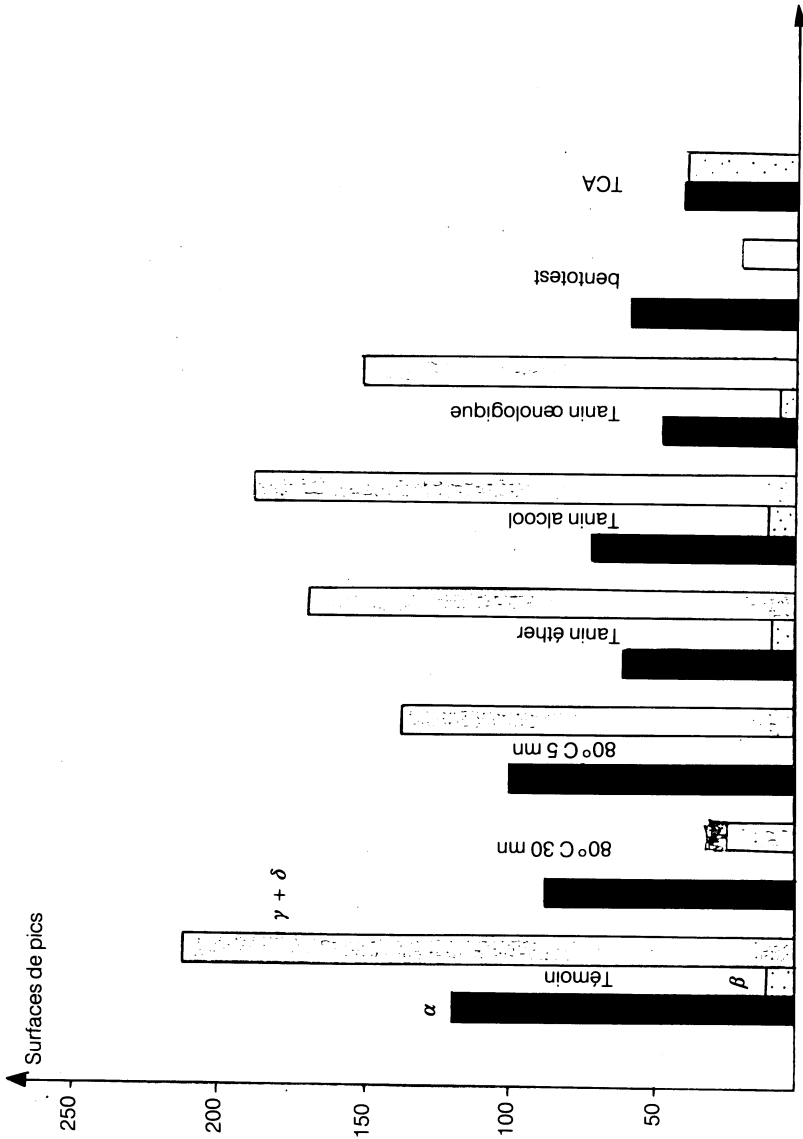


Fig. 4. — Comparaison des surfaces des pics α , β , γ , δ , des chromatogrammes des protéines d'un vin blanc de Sémillon avant et après différents tests de stabilisés. Vin issu de vendange manuelle sans macération.

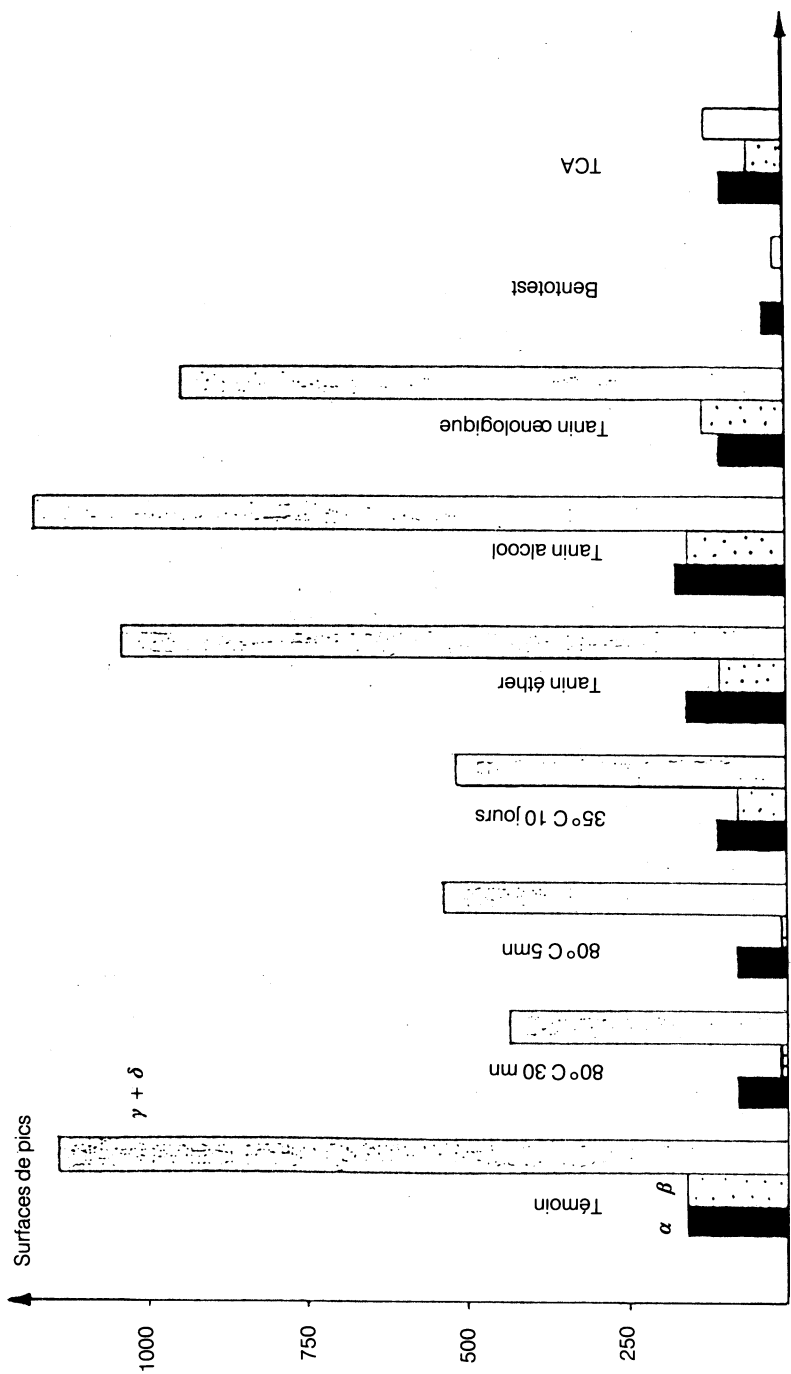


Fig. 5. — Comparaison des surfaces des pics α , β , γ , δ , des chromatogrammes des protéines d'un vin blanc de Sémillon avant et après différents tests de stabilité. Vin issu de vendange mécanique avec macération.

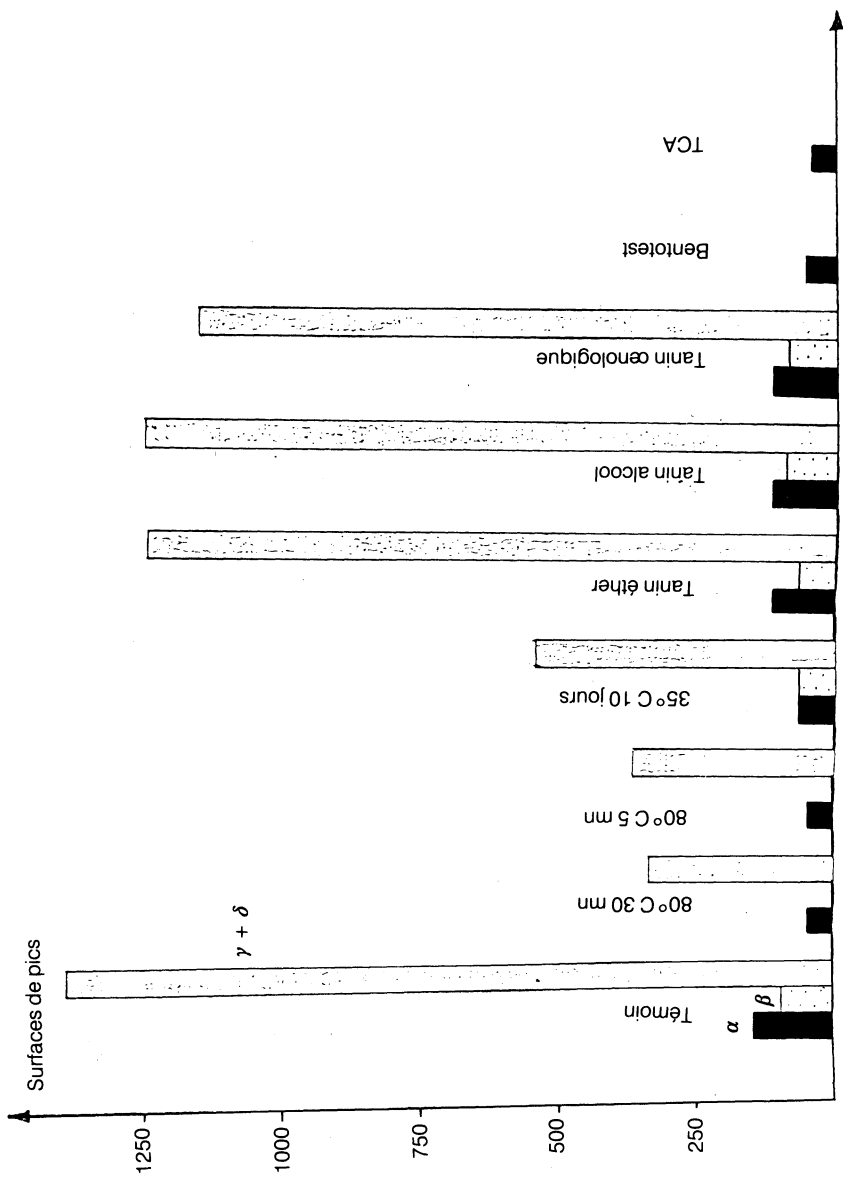


Fig. 6. — Comparaison des surfaces des pics α , β , γ , δ , des chromatogrammes de protéines d'un vin blanc de Sémillon avant et après différents tests de stabilités. Vendanges mécanique sans macération.

L'examen des résultats obtenus après application des tests à la chaleur montre que le chauffage du vin, à 80° C pendant 5 minutes ou une demi-heure, entraîne une diminution quasi égale des différentes fractions de protéines. Les protéines de poids moléculaires moyen (pic β) sont éliminés presque totalement; les substances à poids moléculaire élevé (pic α), correspondant en particulier aux glycoprotéiques, sont les moins touchés. Les petites protéines (pics γ et δ) diminuent d'environ 50 p. 100. Par contre, si le chauffage modéré à l'étuve donne des résultats similaires pour les protéines de haut et bas poids moléculaire, il n'entraîne pas la disparition des protéines de poids moléculaires intermédiaires.

Par rapport aux vins témoins, les teneurs en protéines des vins traités par addition de tanins ne sont pas notablement modifiées. Cependant, on note dans tous les cas une légère diminution des protéines de faible poids moléculaire. Les trois produits utilisés n'ont pas une action identique; ce résultat doit être relié à la différence de pureté des trois tanins. En effet, le tanin à l'éther est pur à quasiment 100 p. 100; par contre, le tanin à l'alcool et le tanin dit œnologique ne contiennent respectivement que 92 p. 100 et 75 p. 100 de tanins.

Afin d'expliquer la faible différence des résultats des dosage de protéines des vins témoins et additionnés des trois tanins, il est possible de faire intervenir l'existence de combinaisons tanin-protéines qui ne flocculent pas et ne sont pas éliminés par centrifugation, mais qui seraient détectées à 225 nm lors de l'analyse chromatographique. Les molécules de tanin ayant un faible poids moléculaire par rapport aux protéines, le volume d'élution du complexe tanins-protéines n'est guère différent de celui d'une protéine; il se peut qu'il ait un coefficient de réponse beaucoup plus important que la protéine seule. Pour apprécier les liaisons tanins-protéines, il faudrait réaliser les dosages chromatographiques avant et après percolation sur colonne de polyvinylpyrrolidone.

Après application du bentotest, il reste exclusivement des traces du pic α correspondant aux protéines de haut poids moléculaire (glycoprotéines); de plus, on observe la disparition quasi totale du reste de l'édifice protéique.

L'acide trichloracétique entraîne l'élimination d'une forte proportion des protéines de faible poids moléculaire.

En résumé, le pic α , correspondant aux protéines de poids moléculaire élevé, n'est jamais éliminé en totalité, quelque soit le test. Le chauffage à 80° C, pendant 5 ou 30 minutes, implique systématiquement la disparition du pic β des protéines de poids moléculaire moyen; ce pic est par ailleurs peu affecté par le chauffage modéré de 10 jours à 35° C. Les teneurs en protéines de poids moléculaires plus faible, soit les pics γ et δ , sont diminués de manière similaire, quel que soit le temps de chauffage. Il semble donc que la casse protéique, provoquée dans la pratique par une élévation modérée de la température, mette en cause tous les composés protéiques analysés; par contre, dans les tests comportant un chauffage rapide à température élevée, les protéines de poids moléculaire moyen sont impliquées de façon plus importante.

III — APPRÉCIATION DES TESTS PAR MESURE DE LA TURBIDITÉ

Les résultats sont rassemblés dans le tableau I.

Les tests à la chaleur (80°C ; 30 mn) et (80°C ; 5 mn) donnent des valeurs de turbidité équivalentes dans le cas des deux vins élaborés à partir d'une récolte mécanique. Pour les vins issus de vendange manuelle, les valeurs de la turbidité sont d'autant plus élevées que le chauffage à 80°C a duré plus longtemps; le trouble obtenu après chauffage à 35°C pendant 10 jours est conséquent.

Si l'on compare les résultats de ces tests de chauffage aux profils protéiques correspondants, il apparaît que le test le plus efficace est celui à 80°C pendant 30 minutes.

En ce qui concerne les tests comportant l'addition de tanins, une très grande dispersion des valeurs de la turbidité est à corrélérer aux résultats obtenus par chromatographie liquide haute performance. De plus, l'important trouble observé par ajout de tanin n'est pas en accord avec la faible différence entre les chromatogrammes de vins témoins et des vins «déprotéinés» par les tanins.

TABLEAU I

Application des différents tests de stabilité à quatre vins blancs de cépage Sémillon issus de techniques d'élaboration différentes.

Mesure de turbidité exprimée en NTU.

Mode de récolte	Manuelle		Mécanique	
	Macération préfermentaire	Pressurage immédiat	Macération préfermentaire	Pressurage immédiat
Témoin	1,90	3,50	2,50	1,67
80°C - 30 mn	40,6	14,5	4,0	13,5
80°C - 5 mn	27,4	4,3	3,9	14,5
35°C - 10 jours	18,3	7,6	8,9	16,7
Tanin éther	49,5	5,0	9,0	> 50
Tanin alcool	7,8	5,4	3,16	9,2
Tanin œnologique	> 50	14,0	22,3	> 50
Bentotest	> 50	46,0	> 50	> 50
Acide trichloracétique	> 50	7,4	> 50	> 50

Le bentotest et l'acide trichloracétique provoquent un trouble important. L'examen des chromatogrammes montre que ces traitements touchent toutes les fractions protéiques de façon plus importante que le test au chauffage. Pour un des quatre vins, le bentotest est plus drastique que l'addition d'acide trichloracétique.

IV — CUMUL DE DEUX TESTS

Nous avons appliqué les tests à la chaleur 80°C-30 mn, 80°C-5 mn, ainsi que les tests par ajout de tanin à un vin de sémillon instable sur le plan protéique. Les échantillons sont ensuite clarifiés par centrifugation puis soumis à nouveau à ces tests. L'apparition d'un nouveau trouble est alors noté.

Les résultats de cette expérimentation sont rassemblés dans le tableau II.

TABLEAU II

Application de plusieurs tests successifs sur un même vin.

Turbidité du vin témoin : 1,24 NTU

	80°C 30 mn	80°C 5 mn	Tanin éther	Tanin alcool	Tanin œnologique
Après le test	60	30	150	40	180
Après clarification des échantillons par centrifugation	0,50	0,55	1,78	2,00	0,54
Turbidité après application de nouveaux tests de stabilité protéique					
80°C à 30 mn	0,60	0,75	600	700	425
Tanin éther	125	160	—	270	190
Tanin alcool	41	90	70	—	60
Tanin œnologique	124	186	270	270	—

Si les deux tests successifs sont les tests à la chaleur, le vin ne se retrouve pas de manière sensible. Par contre, si l'on chauffe un vin prétraité aux tanins, ou si l'on ajoute des tanins à un vin déprotéiné par chauffage, un trouble notable est observé. Ce trouble est d'ailleurs beaucoup plus conséquent quand le chauffage est appliqué après l'ajout de tanins; on confirme la meilleure efficacité des tests à la chaleur. On notera que ces résultats ne sont pas en accord avec ceux observés par SIEGRIEST et BIOL (1963).

Le dosage chromatographique des fractions protéiques (figure 7) conduit à des résultats identiques. Le test à la chaleur, appliqué après un test quelconque, provoque l'élimination totale des protéines de moyen et bas poids moléculaire; il reste toujours une fraction de protéines de poids moléculaire élevé.

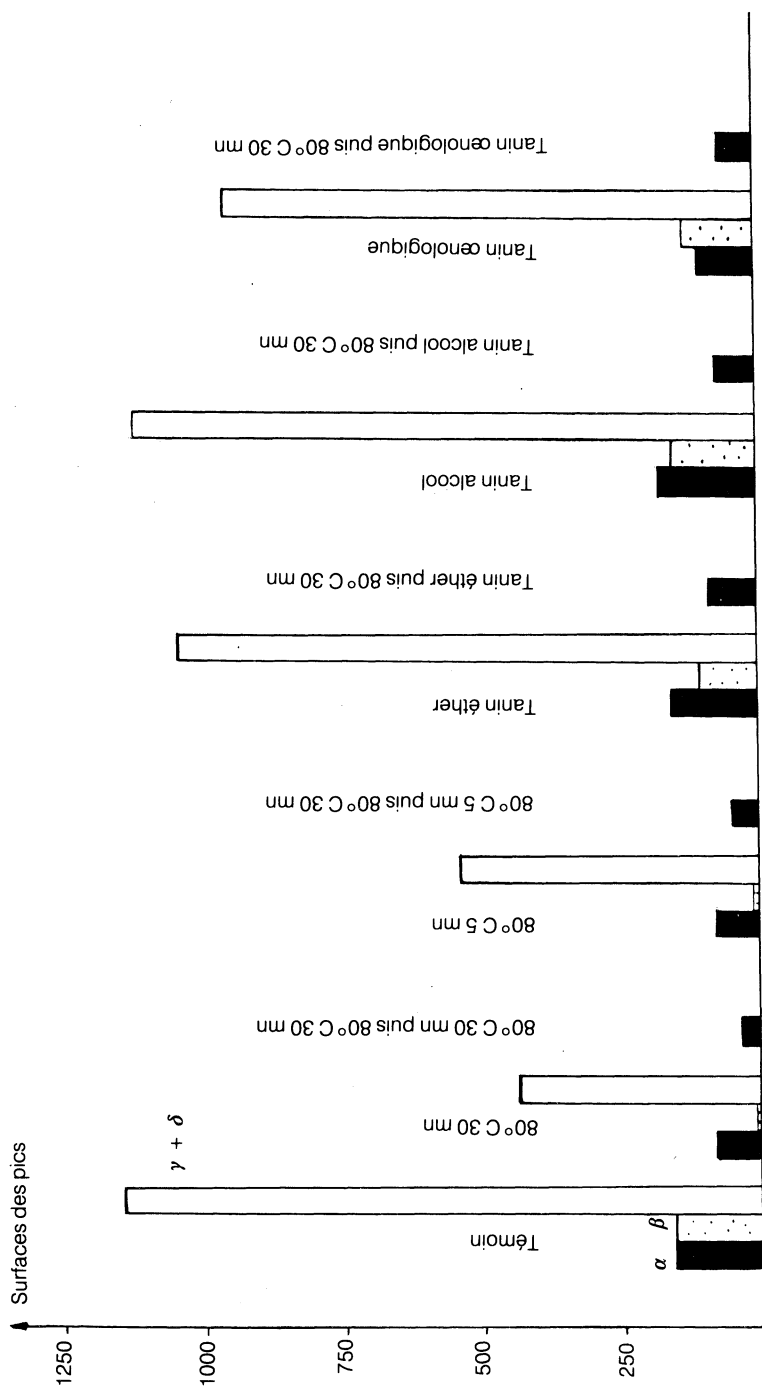


Fig. 7. — Comparaison des surfaces des pics α , β , γ , δ , des chromatogrammes de protéines d'un vin blanc de Sémillon après application de deux tests successifs.

CONCLUSION

L'ensemble des protéines, d'un vin de Sémillon, analysées par CLHP de tamisage moléculaire protéique sur colonne TSK G 2000 SW, participent à l'instabilité protéique (pics β , γ et δ). Les glycoprotéines de poids moléculaire élevés exclues de cette colonne sont résistantes aux différents tests mis en œuvre à l'exception du bentotest. Ces résultats confirment les analyses électrophorétiques effectuées sur différents cépages par HSU et HEARTHERBELL (1987).

La comparaison des tests de stabilité protéique montre que le test à la chaleur (80° C-30 mn) est le plus fiable.

Le bentotest présente un caractère de sûreté plus important, mais il s'éloigne trop des conditions d'apparition des troubles dans la pratique.

Nous décrivons dans un prochain travail la correspondance entre les fractionnements par CLHP et électrophorèse des protéines du raisin et la spécificité d'absorption par la bentonite des différentes protéines, glycoprotéines et peptides séparés.

Manuscrit reçu le 2 décembre 1987; accepté pour publication le 11 mars 1988.

RÉSUMÉ

Différents essais de laboratoire sont utilisés depuis longtemps pour évaluer le risque d'apparition d'un trouble protéique. Les auteurs comparent ces différents tests en utilisant les méthodes récentes de mesure de la limpidité (néphélométrie) et de dosage des protéines (CLHP).

Les résultats obtenus montrent que le test à la chaleur (80° C-30 mn) reste l'essai de laboratoire le plus fiable, car il est simple à mettre en œuvre et il se rapproche le plus des conditions d'apparition des troubles protéiques dans la pratique.

SUMMARY

Various laboratory stability tests have been used for a long time to check the risks of protein turbidity. The authors have been comparing those different tests with the help of more modern methods of measuring out cloudiness (nephelometry) and protein (HPLC).

Six tests were examined :

- The test consisting in heating for 5 minutes at 80° C in a double-boiler.
- The test consisting in heating for 30 minutes at 80° C in a double-boiler.
- The test consisting in heating for 10 days at 35° C in an oven.
- The adding of 0.5 g of tannin per litre.
- The adding of a reagent to phosphomolybdic acid (bentotest).
- The adding of trichloroacetic acid.

The results are as follows :

- For the tests involving heat, the longer the heating at 80° C, the higher the measures of the turbidity are; the cloudiness observed for the test consisting in heating at 35° C for 10 days is quite important.

If the results obtained with these heating tests are to be compared to the real protein values, the most efficient test consists in heating 30 minutes at 80° C.

- For the tests consisting in adding tannins, a high variation of turbidity values must be related to the results obtained through high performance liquid chromatography. Moreover, the important cloudiness observed when the tannins were added does not correspond to the small difference observed between the chromatograms of the wine treated with the tannins and those of the original samples.

- The reagent to phosphomolybdic acid (bentotest) and the trichloroacetic acid test create an important turbidity. After chromatographic examination, the use of these reagents proved to be acting more thoroughly on every sort of protein than the use of heat in the heating tests. For two out of the four wine-samples examined, the bentotest was more drastic than the addition of trichloroacetic acid.

As a conclusion the heating test (80°C for 30 minutes) remains the most reliable laboratory test, because it is simple and easy to make; it is also very close to the conditions in which protein turbidity may appear in reality

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERG H.W. et AKIYOSHI M., 1961. Détermination of protein stability in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **12**, N° 3, 107-110.

DUBOURDIEU D., LLAUBÈRES 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.

HSU J.C. et HEATHERBELL D., 1987. Heat unstable proteins in wine. Characterization and removal by bentonite fining and heat treatment. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, N° 1, 11-16.

JAKOB L., 1962. Bentotest. Eine Schnellmethode zur Ermittlung des Bentonitsbedarf bei der Bentonitschönung von Säften und Weinen. *Das Weinblatt*, N° 57, 805-810.

RIBÉREAU-GAYON J., 1932. Sur les matières albuminoïdes des vins blancs. *Anna Falsif Fraudes*, N° 25, 518-524.

ROMAT H., 1986. Étude de l'utilisation de parois métalliques poreuses frittées pour la filtration des vins. *Thèse de Doctorat d'Université, Université de Bordeaux II*.

SIEGRIST J. et BIOL H., 1964. Sur l'appréciation de la qualité des bentonites utilisées pour le traitement des vins. *Vignes et vins*, N° 132, 103-106.