J. Int. Sci. Vigne Vin, 1997, **31**, n°1, 23-31

PREMIERS RÉSULTATS DE STABILISATION TARTRIQUE DES VINS PAR ADDITION DE MANNOPROTÉINES PURIFIÉES (MANNOSTAB™)

FIRST RESULT OF TARTARIC STABILIZATION BY ADDING MANNOPROTEINS (MANNOSTAB™)

Virginie MOINE-LEDOUX*, A. PERRIN, I. PALADIN et D. DUBOURDIEU

Faculté d'Œnologie, Université Victor Segalen Bordeaux 2,
351, cours de la Libération, 33405 Talence cedex (France)
Courrier électronique (Email) : denis.dubourdieu@oenologie.u-bordeaux2.fr

Résumé : Des mannoprotéines pariétales de levure extraites par digestion enzymatique inhibent la cristallisation des sels de l'acide tartrique, en milieu modèle comme dans les vins. Ce rôle est essentiellement imputable à des mannoprotéines fortement glycosylées de poids moléculaire moyen (30 à 50 KDa), uniquement extractibles par digestion enzymatique. Nous présentons les premiers résultats de stabilisation tartrique obtenus par addition d'une préparation industrielle Mannostab™. Son efficacité est comparable à celle d'un traitement au froid par contact, et, contrairement à l'effet protecteur passager de l'acide métatartrique, la protection vis-à-vis des cristallisations tartriques de la préparation Mannostab™ est durable.

Abstract : Some mannoproteins which are extracted by enzymatic hydrolysis of yeast's cell wall with the aid of commercial preparation composed with beta-glucanases (Glucanex™) inhibits the tartaric acid's salt breakdown in model solution as well as in wines for an addition between 10 and 25 g/hl.
On the other hand, heat extracted mannoproteins are inactive on the tartaric precipitation stabilization. Furthermore, the crystallization inhibitor activity of the enzymatic extracted mannoproteins is due to the presence of sharply glycosylated mannoproteins of medium molecular weight (30 to 50 kda) which are not heat extracted. That is why the heat extracted mannoproteins are inactive.
The enzymatic extracted mannoproteins are produced at a pilot plan. This preparation (Mannostab™), soluble in wines, colourless and without any flavour, stabilize with the same efficiency than a freeze treatment and this effective live is superior to the metatartric acid.
Moreove, the necessary steps were been taked to permit experimentally this new product : Mannostab™

Mots clés : stabilité tartrique, mannoprotéines
Key words : tartaric stability, mannoproteins

INTRODUCTION

Le tartrate acide de potassium est dans un état de sursaturation dans le vin. Cet état conduit à la formation de cristaux sous l'action du froid ; on qualifie ce phénomène de précipitation tartrique. La sursaturation peut être exprimée par un intervalle de température (MAUJEAN *et al.*, 1985). Dans cet intervalle de température, il est possible de dissoudre du tartrate acide de potassium sans phénomène de cristallisation. La limite inférieure représente la température de cristallisation spontanée et la limite supérieure correspond à la température de saturation. L'importance de cet intervalle est fonction de la quantité de tartrate acide de potassium et de la quantité de colloïdes du vin. En effet, des modifications importantes de la composition colloïdale des vins après collage à la bentonite (MAUJEAN *et al.*, 1985) ou bien après des traitements plus sévères comme la microfiltration tangentielle (POIRIER et MIGNONAC, 1985; BARILLERE *et al.*, 1985) ou l'ultrafiltration tangentielle (MAUJEAN *et al.*, 1985 ; ESCUDIER *et al.*, 1987) facilitent les précipitations tartriques. Ces colloïdes constitués de polymères polysaccharidiques, protéiques et glycoprotéiques issus du raisin et des levures limiteraient les risques de précipitation en inhibant la croissance des cristaux de tartrate acide de potassium. Il apparaît alors que l'élimination partielle ou totale de ces colloïdes dits « protecteurs », par les différentes pratiques oenologiques entraîne une diminution de la stabilité tartrique des vins.

Afin de s'affranchir des risques de cristallisation lors de la conservation des vins en bouteilles trois méthodes de stabilisation sont actuellement utilisées. On peut conserver le vin pendant plusieurs semaines à des températures négatives, afin de hâter la rupture de la sursaturation et provoquer ainsi la cristallisation du tartrate acide de potassium ; il s'agit de la stabulation à froid. On peut aussi ensemencer à froid le vin par des germes cristallins de tartrate acide de potassium (MULLER-SPATH, 1977), c'est le procédé par

* chargée de recherche pour la Société SARCO

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

contact. Par ces deux méthodes, les cristaux tartriques doivent être éliminés par filtration avant réchauffement du vin. Ces deux procédés sont coûteux, et leur efficacité loin d'être garantie. En outre, les filtrations répétées ne sont pas sans conséquences pour les qualités organoleptiques des vins (FEUILLAT *et al.*, 1987). Un troisième procédé consiste à additionner le vin en acide métatartrique (SCAZZOLA, 1956) qui s'oppose à la cristallisation et dispense donc du traitement par le froid. Cependant, l'effet protecteur de l'acide métatartrique est de courte durée ; il s'hydrolyse d'autant plus rapidement que la température de conservation du vin est élevée. Ce traitement ne peut donc concerner que des vins destinés à une consommation rapide.

En conséquence, il n'existe pas à ce jour de technique idéale de stabilisation des vins vis-à-vis des précipitations tartriques.

La littérature récente (LUBBERS *et al.*, 1994) rapporte l'effet inhibiteur de cristallisation des mannoprotéines de levure de *Saccharomyces cerevisiae*, extraites de la paroi en tampon alcalin à chaud. Ces auteurs proposent d'utiliser, à des fins de traitement contre la cristallisation tartrique des vins, les propriétés si souvent décrites des agents colloïdes dits « protecteurs ». Mais l'efficacité des préparations n'est mise en évidence qu'en milieu modèle.

Dans ce travail, nous étudions l'effet inhibiteur des précipitations tartriques d'une préparation de mannoprotéines obtenue par hydrolyse enzymatique de parois de *S. cerevisiae* à l'aide d'une préparation commerciale de β-glucanases (Glucanex™), et nous présentons les premiers résultats des essais de stabilisation tartrique obtenus par addition de la préparation industrielle Mannostab™.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I — EXTRACTION DES MANNOPROTÉINES

Nous avons étudié deux types de préparations de mannoprotéines, des mannoprotéines extraites chimiquement à chaud et des mannoprotéines extraites par digestion enzymatique.

1) Mannoprotéines extraites chimiquement à chaud (PEAT *et al.*, 1961)

Des levures sèches actives (Zymaflore souche VL3) (26 g), placées dans un flacon Schott à bouchage hermétique à vis avec 100 ml d'eau distillée et 5 ml de tampon citrate 20 mM pH 7, sont autoclavées pendant 2 heures à 138°C. Le milieu est centrifugé 20 min 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 l'eau distillée, dialysé et lyophilisé.

Une partie aliquote de lyophilisat (1 g) est dissoute dans de l'eau distillée, amenée à pH 8 par de la soude 2 N ; les mannoprotéines sont précipitées par la liqueur de Felhing, le culot est lavé avec de l'eau puis acidifié par l'acide chlorhydrique (5 N) jusqu'à disparition de la couleur bleue. Enfin, la solution est dialysée et les mannoprotéines sont séchées par lyophilisation.

2) Mannoprotéines extraites enzymatiquement

Des parois de levure sont soumises à l'action d'une préparation industrielle de β-glucanases de *Trichoderma harzanium* commercialisée sous la marque Glucanex™ par la Société Novo-nordisk. Cette préparation comporte des activités exo-β-(1-3)-glucanase, endo-β-(1-3)-glucanase et exo-β-(1-6)-glucanase (DUBOURDIEU *et al.*, 1985). Son utilisation est autorisée en oenologie afin d'hydrolyser le glucane de *Botrytis cinerea* et par là même de faciliter la filtration (DUBOURDIEU *et al.*,1981). Les parois sont mises en suspension dans l'eau (10 p. cent en poids sec) ; la quantité de Glucanex™ apportée représente 0,5 p. cent du poids sec des parois mises en œuvre. A l'issue de la digestion réalisée à 42°C pendant 5 heures, l'hydrolysat est séparé par centrifugation, purifié par ultrafilitration et lyophilisé. Le produit obtenu, soluble dans l'eau et dans le vin, est incolore et inodore.

II — LE MILIEU MODÈLE

Nous avons utilisé le milieu proposé par MAUJEAN *et al.* (1985) dont la composition est la suivante :

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

Ce milieu contient donc 537 mg/l d'ion potassium et son pH est de 3,0. A ce pH, le pourcentage d'acide tartrique sous forme de tartrate acide de potassium est d'environ 47 p. cent (BERG et KEEFER, 1958).

III — TESTS DE STABILITÉ TARTRIQUE

1) Test de « tenue au froid »

Les vins supplémentés ou non par les différentes préparations de mannoprotéines sont filtrés sur membrane de 0,45 µm et conservés 6 jours à -4°C. Le vin est considéré comme stable s'il n'apparaît pas de cristaux de tartrate acide de potassium durant cette période. La cristallisation tartrique est estimée soit visuellement

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

par la présence de cristaux dans l'échantillon, soit analytiquement par la différence de concentration en potassium du vin filtré, dosée par photométrie de flamme, avant et après passage au froid.

2) Mesure de l'indice de stabilité tartrique (BOIRET *et al.*, 1991)

A 100 ml de milieu modèle ou de vin sont ajoutées différentes concentrations de mannoprotéines extraites par la chaleur (MPEC) ou de mannoprotéines extraites par digestion enzymatique (MPEE), et pour chacune d'entre elles différentes doses (0, 50, 75, 100 et 125 mg) de tartrate acide de potassium. Les différentes solutions sont agitées et placées à 30°C pendant 12 heures afin de dissoudre le tartrate acide de potassium ajouté. Après dissolution, les échantillons sont placés à -4°C pendant 20 heures. La différence des teneurs en potassium (mg/l) dans les échantillons (avant et après leur passage au froid) permet d'apprécier l'importance de la cristallisation.

3) Détermination de la température de cristallisation spontanée

La méthode proposée par MAUJEAN *et al.* (1985) consiste à déterminer le domaine de sursaturation d'un vin par le suivi de sa conductivité en fonction de la température. Cette méthode permet d'accéder à la température de cristallisation spontanée.

Pour cela, il faut établir trois courbes (a), (b), (c), (figure 1). La courbe (a) représente la variation de conductivité du vin brut lors de son réchauffement de 0°C à 60°C. La courbe (b) représente la variation de conductivité du vin additionné de 4 g/l de tartrate acide de potassium non dissous lors de son réchauffement de 0°C à 60°C. La courbe (c) représente la variation de conductivité du vin additionné de 4 g/l de tartrate acide de potassium dissous lors de son refroidissement de 60°C à 0°C. L'intersection entre les courbes (a) et (b) correspond à la température de saturation du vin (Ts_0) ; c'est la température à partir de laquelle il est possible de dissoudre du tartre dans le vin. L'intersection entre les courbes (b) et (c) correspond à la température de saturation avec ajout de tartre (Ts_4). La température de cristallisation spontanée avec ajout de tartre (Tc_4) correspond à la chute de conductivité produite par la cristallisation. Par ces trois températures, on peut déterminer la température de cristallisation spontanée du vin (T_{C0}) qui correspond à la température de saturation moins le domaine de sursaturation. $T_{C0} = Ts_0 - (Ts_4 - Tc_4)$

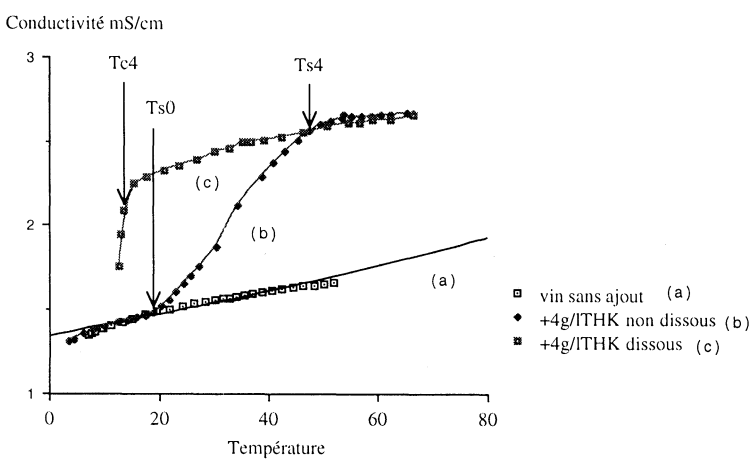


Fig. 1 — Détermination de la température de cristallisation spontanée d'un vin

Fig. 1 — Determination of wine's spontaneous crystallization température

Nous avons défini certains paramètres comme, le domaine de température (0 à 60°C), la quantité de tartrate acide de potassium à ajouter (4 g/l) et le volume de vin nécessaire à l'analyse (100 ml).

IV — MÉTHODES D'ANALYSE ET DE FRACTIONNEMENT

1) Analyse des mannoprotéines par chromatographie liquide haute performance de tamisage moléculaire

Les préparations de mannoprotéines sont fractionnées selon leurs poids moléculaires par CLHP sur gel TSK G2000 SW (LKB) selon la méthode de séparation des protéines du vin décrite par DUBOURDIEU *et al.* (1986). La zone de fractionnement est de 10 à 70 000 Da pour les protéines globulaires. Le profil d'élution est obtenu par le suivi en continu de la densité optique à 225 nm.

2) Fractionnement des mannoprotéines par chromatographie d'affinité sur gel de concanavaline A Sépharose

La concanavaline A (Con A) a été immobilisée sur une matrice de Sépharose par couplage au bromure de cyanogène. Le gel Sigma utilisé contient 10-16 mg de lectine par ml de gel. L'élution des molécules fixées sur le gel se fait par une molécule compétitive l'α-D méthyl mannoside ajoutée au tampon initial (citrate 50 mM pH 5,0 ; NaCl 0,5 M ; $CaCl_2$ 1mM ; $MnCl_2$ 1mM). Le profil protéique est obtenu par mesure de la densité optique à 280 nm des fractions éluées.

RÉSULTATS

I — ANALYSE DES DIFFÉRENTES PRÉPARATIONS DE MANNOPROTÉINES

Les mannoprotéines extraites soit enzymatique-

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

ment soit thermiquement sont analysées par différentes méthodes. Les teneurs en protéines sont déterminées par la méthode de Bradford (BRADFORD, 1976), le pourcentage de polysaccharides par la méthode au phénol sulfurique (MONTREUIL et SPIK, 1963), la composition osidique de la partie polysaccharidique par chromatographie en phase gazeuse des oses libérés par hydrolyse à l'acide trifluoroacétique et dérivés par silylation (TRANCHANT, 1982) (tableau I).

Par rapport aux mannoprotéines extraites par la chaleur, les mannoprotéines, obtenues par digestion enzymatique de la paroi possèdent une teneur en protéines nettement supérieure. En effet, d'après KLIS (1994) certaines liaisons covalentes liant la partie peptidique des mannoprotéines au mannane sont probablement détruites lors de l'extraction par la chaleur. Les protéines ainsi libérées pourraient coaguler sous l'effet de la température (110°C). De plus, l'analyse de la fraction polysaccharidique montre la présence de glucose dans les mannoprotéines extraites par la chaleur, alors que les mannoprotéines extraites enzymatiquement ne renferment que du mannose. Ce résultat est parfaitement conforme au mode d'action de la préparation enzymatique utilisée, capable de dégrader les glucanes servant de points d'ancrage aux mannoprotéines dans la structure générale de la paroi des levures.

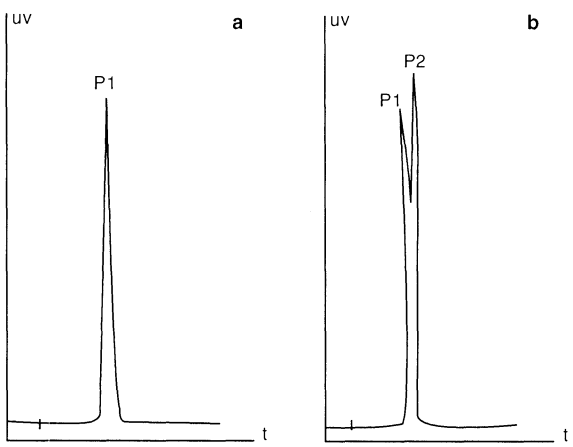


Fig 2 — Analyse par CLHP des mannoprotéines extraites par la chaleur (a) et par digestion enzymatique (b)

Fig 2 — Analysis by HPLC of heat extracted mannoproteins (a) and enzymatic extracted mannoproteins (b)

De plus, l'analyse par CLHP de tamisage moléculaire des 2 types de préparations (figure 2) montre la présence d'un pic supplémentaire correspondant à des molécules de masse moléculaire comprise entre 30 et 50 KDa dans la préparation extraite enzymatiquement.

II — ÉTUDE DE L'EFFET INHIBITEUR DE CRISTALLISATION DES MANNOPROTÉINES EXTRAITES PAR LA CHALEUR OU ENZYMATIQUEMENT

1) Comparaison de l'effet inhibiteur de cristallisation des deux préparations de mannoprotéines en milieu hydroalcoolique modèle

Nous avons utilisé le milieu proposé par MAUJEAN *et al.*, (1985) comme LUBBERS et *al.*,. (1994). La stabilité tartrique est appréciée par la mesure de l'Indice de Stabilité Tartrique (BOIRET *et al.*,1991).

La cristallisation tartrique en milieu modèle sans ajout de mannoprotéines survient dès l'addition de 75 mg de tartrate acide de potassium (tableau II). La présence de 25 g/hl de mannoprotéines extraites par la chaleur permet la dissolution de 75 mg de tartrate acide de potassium sans apparition de cristallisation lors du passage au froid. En revanche, pour une supplémentation équivalente les mannoprotéines obtenues par digestion enzymatique inhibent la cristallisation jusqu'à addition de 100 mg de tartrate acide de potassium. Ces résultats en milieu modèle montrent donc une efficacité nettement supérieure des mannoprotéines extraites enzymatiquement par rapport à celles extraites par la chaleur.

Afin de confirmer les résultats obtenus en milieu modèle, cette expérience est renouvelée sur un vin blanc.

2) Comparaison de l'effet inhibiteur de cristallisation des deux préparations de mannoprotéines sur un vin blanc

L'effet inhibiteur de cristallisation des mannopro-

TABLEAU I

Composition des différentes préparations de mannoprotéines

Table I — Composition of various mannoproteins preparations

Mannoprotéines	Protéines (en %)	Polysaccharides (en %)	Mannose (en %)	Glucose (en %)
extraites par la chaleur	4,2	93,8	92	8
extraites enzymatiquement	15	83,2	100	0

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

TABLEAU II

Différence de concentration en potassium (mg/l) d'une solution hydroalcoolique modèle enrichie en tartrate acide de potassium (avant et après passage au froid) et contenant ou non des mannoprotéines de levure

Table II — Potassium difference concentration of a model solution adding by THK (before and after freezing) and supplemented or not by mannoproteins

THK mg/100 ml	0	50	75	100	125
Témoin	0	0	40	100	180
MEC 10 g/hl	0	0	30	100	180
MEC 25 g/hl	0	0	0	20	100
MEC 50 g/hl	0	0	0	20	100
MEE 10 g/hl	0	0	60	80	120
MEE 25 g/hl	0	0	0	0	60
MEE 50 g/hl	0	0	0	0	0

MEC : mannoprotéines extraites par la chaleur
MEE : mannoprotéines extraites enzymatiquement

téines est étudié avec le même protocole expérimental sur un vin blanc appellation Bordeaux, millésime 94.

La stabilité tartrique est appréciée par la mesure de l'Indice de Stabilité Tartrique. L'importance de la cristallisation est estimée par la différence de potassium (mg/l) dosée par photométrie de flamme dans les échantillons avant et après leur passage au froid (tableau III).

Les résultats de cet essai, montrent que la cristallisation du tartrate acide de potassium dans un vin blanc peut être inhibée par l'ajoût de mannoprotéines extraites par digestion enzymatique. En effet, la précipitation tartrique survient dans le vin témoin dès l'ajout de 50 mg de tartrate acide de potassium. En revanche, 25g/hl de mannoprotéines obtenues par digestion enzymatique permettent de le stabiliser. Par ce traitement, il est possible de solubiliser 125 mg de tartrate acide de potassium sans qu'il n'apparaisse de cristaux. Par ailleurs, les mannoprotéines extraites par la chaleur s'avèrent inefficaces ; le vin traité se comporte comme le vin témoin. La relative efficacité des mannoprotéines extraites par la chaleur en milieu modèle n'est donc pas confirmée dans le vin blanc testé. Ce résultat atteste de la difficulté de modélisation des phénomènes de cristallisation survenant dans des milieux complexes comme le vin. Les expériences suivantes seront donc uniquement réalisées dans des vins.

III — ISOLEMENT DES MANNOPROTÉINES PARIÉTALES DE LEVURE INHIBANT LES CRISTALLISATIONS TARTRIQUES

TABLEAU III

Incidence d'un passage au froid sur la variation de concentration en potassium (mg/l) d'un vin blanc supplémenté en mannoprotéines

Table III — Freeze effect on potassium difference concentration (mg/l) of white wine mannoproteins added

THK mg/100 ml	0	50	75	100	125
Témoin	0	20	40	60	80
MEC 10 g/hl	0	20	40	40	60
MEC 25 g/hl	0	20	20	20	60
MEC 50 g/hl	0	0	40	40	60
MEE 10 g/hl	0	0	0	20	60
MEE 25 g/hl	0	0	0	0	0
MEE 50 g/hl	0	0	0	0	0

MEC : mannoprotéines extraites par la chaleur
MEE : mannoprotéines extraites enzymatiquement

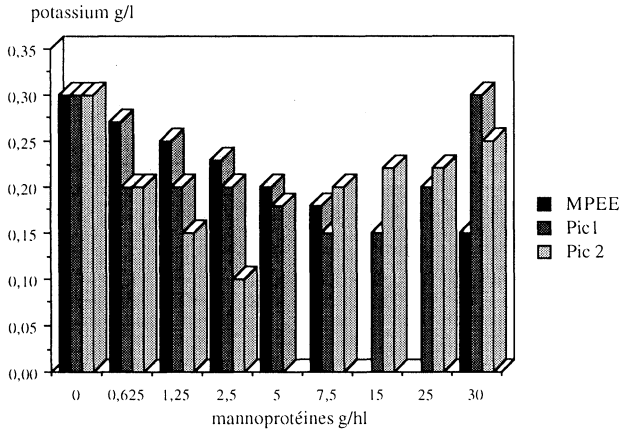
1) Chromatographie liquide haute performance de tamisage moléculaire

Les mannoprotéines sont séparées suivant leur taille par chromatographie de tamisage moléculaire sur TSK G2000SW en 2 fractions P1 et P2 (figure 2a). Rappelons que P1 correspond à des mannoprotéines de masse moléculaire supérieure à 70 KDa et P2 à des mannoprotéines de masse moléculaire comprise entre 30 et 50 KDa. Les 2 fractions ainsi séparées sont dialysées contre de l'eau et lyophilisées.

Les 2 fractions isolées sont additionnées à un vin blanc à différentes doses. Les vins ainsi traités subissent un test de « tenue » au froid. La différence de concentration en potassium des vins filtrés avant et après passage au froid permet d'estimer l'importance de la cristallisation tartrique (figure 3).

Dans le vin blanc utilisé dans cette expérience (Sancerre, 1995), les mannoprotéines extraites enzymatiquement permettent d'inhiber la cristallisation du tartrate acide de potassium dès 15 g/hl. En effet, pour cette dose la concentration en potassium dans le vin est identique avant et après passage au froid. Les mannoprotéines éluées dans le pic 1 ne permettent pas la stabilisation tartrique du vin. En revanche, celles éluées dans le pic 2 (masses moléculaires moyennes) sont actives pour une dose de 5 g/hl. Ce résultat montre que la différence d'efficacité observée entre les mannoprotéines extraites par la chaleur et celles extraites par digestion enzymatique est due à l'absence de composés de masses moléculaires moyennes dans les mannoprotéines extraites par la chaleur.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)



MPEE : mannoprotéines extraites enzymatiquement
P1 : mannoprotéines de masse moléculaire supérieure à 70 Kda
P2 : mannoprotéines de masse moléculaire comprise entre 30 et 50 KDa

Fig. 3 — Stabilité tartrique d'un vin blanc supplémenté en MPEE, P1 et P2

Fig. 3 — Tartaric stability of a white wine adding by MPEE, P1 et P2

Les fractions séparées par HPLC de tamisage moléculaire sont analysées, leur composition est déterminée par le dosage des protéines et des polysaccharides (tableau IV).

TABLEAU IV

Analyse des fractions éluées par HPLC de tamisage moléculaire

Table IV — Composition of the HPLC eluted fractions

Mannoprotéines	Protéines (en %)	Polysaccharides (en %)
MPEE	15	83
P1	5,3	84,5
P1	8,7	90,3

La fraction P2 inhibitrice de la cristallisation tartrique est composée de 8,7 p. cent de protéines et de 90,3 p. cent de polysaccharides.

Cette fraction est à nouveau purifiée par chromatographie d'affinité sur gel de conA.

2) Chromatographie d'affinité sur ConA Sépharose

La fraction P2 est purifiée par chromatographie d'affinité (figure 4) ; on obtient deux fractions, l'une non retenue (FNR) et l'autre retenue (FR) sur la lectine puis éluée par l'α-méthyl mannoside. Les deux fractions sont recueillies, dialysées et lyophilisées.

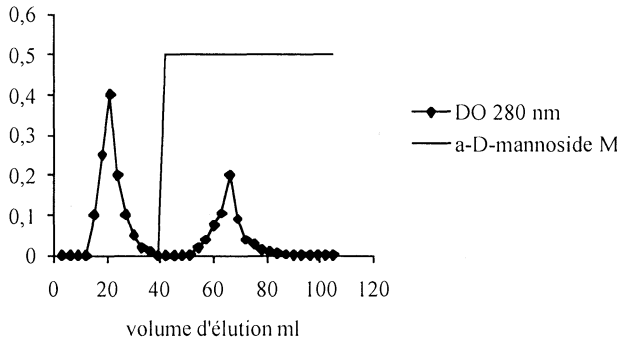
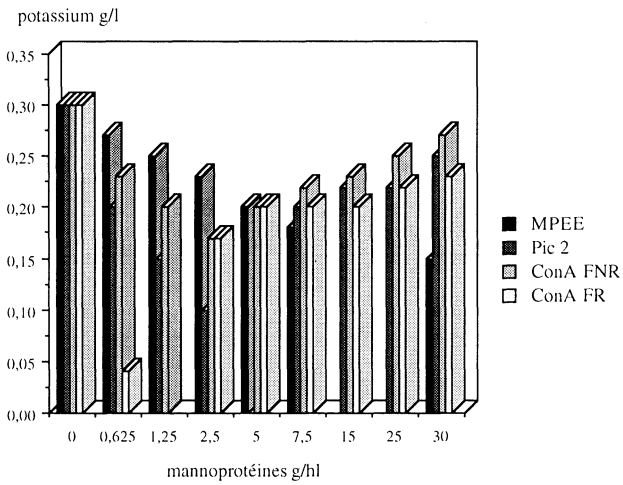


Fig. 4 — Fractionnement sur ConA Sépharose

Fig. 4 — Division on Con A Sepharose



MPEE : mannoprotéines extraites enzymatiquement
Pic 2 : mannoprotéines de masse moléculaire comprise entre 30 et 50 Kda
Con A FNR : fraction non retenue sur ConA
Con A FR: fraction retenue sur ConA

Fig. 5 — Activité des fractions éluées sur ConA Sépharose vis-à-vis de la stabilité tartrique d'un vin

Fig. 5 — Tartaric stability of a white wine adding by MPEE, P2, and by Con A Sepharose eluted fractions

Les 2 fractions isolées sont additionnées à un vin à différentes doses. Les vins ainsi traités subissent un test au froid. La concentration en potassium des vins après passage au froid permet d'estimer la cristallisation tartrique (figure 5).

La fraction non retenue ne permet pas d'inhiber la cristallisation des sels de l'acide tartrique. En revanche, la fraction retenue prévient la cristallisation pour une supplémentation remarquablement faible de 1,25 g/hl. Ces deux étapes de purification ont permis de diminuer 12 fois la quantité de mannoprotéines nécessaire à la stabilisation tartrique. L'activité de la fraction purifiée est particulièrement importante.

Le domaine de stabilisation des mannoprotéines est l'écart entre la dose minimum et maximum garan-

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

tissant la stabilité tartrique d'un vin. Ce domaine de stabilité des mannoprotéines est d'autant plus étroit que celles-ci sont plus actives. Ainsi, pour le vin utilisé dans cette expérience la préparation brute inhibe la cristallisation des sels de l'acide tartrique de ce vin entre 15 et 25 g/hl alors que, les fractions purifiées ne sont actives qu'à une seule dose, 5g/hl pour la fraction purifiée par HPLC de tamisage moléculaire et 2,5g/hl pour celle purifiée par chromatographie d'affinité sur Concanavaline A.

Comme précédemment les fractions éluées sont analysées afin de déterminer leur composition (tableau V).

La fraction active vis-à-vis de la stabilisation tartrique est composée de 2,5 p. cent de protéines et de 97,5 p. cent de polysaccharides formés exclusivement de mannose.

TABLEAU V

Analyse des fractions purifiées sur Con A Sépharose

Table V — Composition of the Con A Sepharose eluted fractions

Mannoprotéines	Protéines (en %)	Polysaccharides (en %)
MPEE	15	83
P2	8,7	90,3
Con A FNR	12	34
Con A FR	2,5	97,5

IV — PREMIERS RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX DE STABILISATION TARTRIQUE PAR UNE PRÉPARATION INDUSTRIELLE DE MANNOPROTÉINES EXTRAITES ENZYMATIQUEMENT : MANNOSTAB™

La mise au point d'une préparation de mannoprotéines permettant d'inhiber la cristallisation du tartrate acide de potassium a fait l'objet d'un brevet français N°94-13261 et international N° PCT-FR 95-01426 (DUBOURDIEU et MOINE-LEDOUX, 1994). Une production industrielle au stade pilote des mannoprotéines correspondantes a été réalisée. Nous rapportons ici les essais de stabilisation au laboratoire de différents vins mettant en oeuvre la préparation Mannostab™ obtenue.

L'efficacité de la préparation Mannostab™ est vérifiée sur différents vins blancs du millésime 96 prélevés dans un chai du négoce bordelais juste avant le traitement par le froid qu'ils subissent normalement avant leur mise en bouteille. Au laboratoire, les vins sont additionnés par des doses croissantes, puis filtrés sur membrane de 0,45 µm et placés à -4°C pendant 6 jours. La cristallisation du tartrate acide de potassium dans les différents échantillons est estimée visuellement et par dosage du potassium.

Ces premiers résultats montrent que la préparation Mannostab permet d'inhiber la cristallisation du tartrate acide de potassium pour des supplémentations comprises entre 15 et 25 g/hl (tableau VI). En revanche, sur certains vins (Bordeaux blanc 96 et Graves blanc 96) des additions plus importantes peuvent ne manifester aucun effet stabilisant. La dose de Mannostab nécessaire à la stabilisation d'un vin doit être déterminée par des essais préalables. L'inefficacité d'une supplémentation trop importante est indéniable.

L'addition aux vins de ce produit pourrait remplacer les méthodes actuelles de stabilisation. Dans cet objectif, nous avons donc comparé l'efficacité de ce produit par la mesure de la température de cristallisation spontanée, à deux autres méthodes de stabilisation tartrique : le traitement au froid par contact en continu et l'addition d'acide métatartrique (tableau VII).

L'addition de Mannostab, 15 g/hl pour le vin 1 ou 25 g/hl pour le vin 2 permet d'atteindre une stabilité comparable à celle obtenue par le traitement au froid en continu (la même température de cristallisation spontanée). En revanche l'addition d'acide métatartrique permet d'obtenir une température de cristallisation nettement plus basse. Cependant, l'acide métatartrique s'hydrolyse dans les vins et l'enrichissement en acide tartrique qui en résulte facilite la cristallisation du tartrate acide de potassium. Dans les mêmes conditions, les mannoprotéines sont stables et leur effet protecteur, vis-à-vis des cristallisations tartriques, durable. Ainsi, un vin blanc traité par l'acide métatartrique ou par la préparation Mannostab est placé à 30°C pendant 10 semaines, puis soumis à un test de « tenue » au froid. L'échantillon traité par l'acide métartrique cristallise tandis que celui qui a reçu une addition de Mannostab demeure stable (tableau VIII).

CONCLUSION

Nous montrons que certaines mannoprotéines contenues dans la paroi des levures pouvant être extraites par digestion enzymatique à l'aide d'une préparation de glucanases (Glucanex™) sont inhibitrices de la cristallisation des sels de l'acide tartrique en milieu modèle et dans les vins à raison de 10 à 25 g/hl.

La fraction active du complexe mannoprotéique obtenu industriellement Mannostab™ est constituée

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

TABLEAU VI

Stabilisation tartrique de différents vins par addition de Mannostab. Observation visuelle des cristaux et baisse de la concentration en potassium Δ(K+) (mg/l), après conservation à -4°C pendant 6 jours

Table VI — Tartaric stabilization of some wines by adding Mannostab

		Mannostab g/hl				
Vins		0	15	20	25	30
Blanc de Blanc 96	Test visuel	**	0	0	0	0
	$\Delta(K^+)$ mg/l	52	72	17	0	0
Vin de table	Test visuel	**	0	0	0	0
	$\Delta(K^+)$ mg/l	104	53	33	0	0
Bordeaux blanc 96	Test visuel	**	0	0	0	0
	$\Delta(K^+)$ mg/l	62	21	0	0	21
Graves 96	Test visuel	**	**	0	0	0
	$\Delta(K^+)$ mg/l	155	52	0	0	62
Bordeaux blanc 96	Test visuel	**	0	0	0	0
	$\Delta(K^+)$ mg/l	51	0	0	0	0
Entre deux mers 96	Test visuel	0	0	0	0	0
	$\Delta(K^+)$ mg/l	52	0	0	0	11

TABLEAU VIII

Influence d'une conservation de 10 semaines à 30°C sur la stabilité tartrique d'un vin blanc supplémenté en acide métatartrique ou en Mannostab

Table VIII — Effect of 10 weeks storage at 30°C on a white wine tartaric stability adding by metatartaric acid or Mannostab

	Différence de concentration en potassium (mg/l) après 6 jours de conservation à -4°C
Témoin	200
Acide métatartrique 10 g/hl	260
Mannostab 25 g/hl	0

par des molécules fortement glycosylées de masse moléculaire comprise entre 30 et 50 KDa.

La préparation Mannostab™ expérimentée, soluble dans les vins, incolore et sans saveur présente une efficacité comparable à celle d'un traitement au froid par contact et en continu. Contrairement à l'effet protecteur passager de l'acide métatartrique la protection vis-à-vis des cristallisations tartriques de la préparation Mannostab est durable.

L'attente des professionnels pour un tel produit, simple à mettre en oeuvre, sans incidence organoleptique sur le vin, à effet immédiat et durable justifie d'entreprendrre à court terme les démarches en vue d'une autorisation en oenologie comme colloïde biologique stabilisant.

TABLEAU VII

Effet de différents traitements sur la température de cristallisation spontanée d'un vin

Table VII — Effect of various treatments on the spontaneous crystallization temperature

Traitements de stabilisation	Vin1	Vin2
Témoin	- 10°C	- 11°C
15 g/hl Mannostab	- 21°C	- 18°C
25 g/hl Mannostab	- 31°C	- 13°C
Contact continu	- 28°C	- 17°C
10 g/hl acide métatartrique	- 40°C	- 40°C

Vin 1 : Entre-deux-Mers 96 - Vin 2 : Bordeaux blanc 96

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BARILLERE J. M., ESCUDIER J. L., MOUTONNET M. et BERNARD P., 1985. *Microfiltration tangentielle de moûts et de vins. Ultrafiltration et Microfiltration Tangentielle en Œnologie*. (Ed) Institut Technique de la Vigne et du Vin, Paris, 179-188.

BERG H. W. et KEEFFER R. M., 1958. Analytical determination of tartrate stability in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **9**, 180-193.

BOIRET M., MARTY A., FABREGA C., GUITTARD A., TIXIER A., SCHAEFFET A. et SCHLEWITZ A., 1991. Indice de stabilité tartrique des vins et risque de précipitation. *R. F. Œ.*, **128**, 53-58

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**, 248-254.

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. et MOINE-LEDOUX V., 1994. *Produit biologique pour la stabilisation physico-chimique d'un vin*. Brevet d'invention N° de publication 2 726 284.

DUBOURDIEU D., VILLETAZ J.C., DESPLANQUES C. et RIBÉREAU-GAYON P., 1981. dégradation enzymatique du glucane de *Botrytis cinerea*. Application à l'amélioration de la clarification des vins issus de raisins pourris. *Connaissance Vigne Vin*, **15**, n°3, 101-177.

DUBOURDIEU D., VILLETAZ J.C., DESPLANQUES C. et RIBEREAU-GAYON P., 1985. Investigations of an industrial β-D-glucanase from *Trichoderma harzanium*. *Carbohydr. Res.*, **144**, 227-287.

ESCUDIER J. L., MOUTONNET M. et BERNARD P., 1987. Influence de l'ultrafiltration sur la cinétique de cristallisation du bitartrate de potassium des vins. *R. F. Œ.*, **108**, 52-57.

FEUILLAT M, PEYRON D. et BERGER J. L., 1987. Influence de la microfiltration tangentielle des vins sur leur composition physico-chimique et leurs caractères sensoriels. Applications aux vins de Bourgogne. *O.I.V.*, 673-674.

KLIS F. M., 1994. Review : Cell Wall Assembly in Yeast. *Yeast*, **10**, 851-869.

LUBBERS S., LEGER B., CHARPENTIER C. et FEUILLAT M., 1994. Effet colloïde protecteur d'extraits de parois de levures sur la stabilité tartrique d'une solution modèle. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **27**, n°1, 13-22.

MAUJEAN A., SAUSY L. et VALLÉE D., 1985. Détermination de la sursaturation en bitartrate de potassium d'un vin. Quantification des effets colloïdes protecteurs. *R. F. Œ. Cahier scientifique*, **100**, 39-49.

MONTREUIL J. et SPICK G., 1963. *Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux*. Monographie du laboratoire de chimie biologique de la Faculté des Sciences de Lille.

MULLER-SPATH M., 1977. La stabilisation du tartre avec le procédé à contact. *R. Fr. Œnol.*, **73**, 41-47.

PEAT S., WHELAN W. J. et EDWARDS T. E., 1961. Polysaccharide of baker's yeast. Part IV. Mannan. *J. Chem. Soc.* (London), 28-35.

POIRIER D. et MIGNONAC J., 1985. *Microfiltration tangentielle de moûts et de vins sur membranes minérales. Ultrafiltration et Microfiltration Tangentielle en Œnologie*. (Ed) Institut Technique de la Vigne et du Vin, Paris, 161-178.

SCAZZOLA E., 1956. Sur un produit inhibiteur de la cristallisation du tartre dans les vins. *Ann. Falsif. Fraudes*, **49**, 159.

TRANCHANT J., 1982. *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*. Ed Masson, Paris.

Manuscrit reçu le 16 décembre 1996 ;
accepté pour publication le 14 mars 1997

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)