Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1990, **24,** N° 1, 13-28.
Connaissance de la Vigne et du Vin.

FRACTIONNEMENT ET CARACTÉRISATION DES GLYCOPROTEINES DANS LES MOÛTS DE RAISINS BLANCS

M. PAETZOLD*, L. DULAU et D. DUBOURDIEU

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

Résumé : *Les auteurs étudient les glycoprotéines dans des moûts de raisins blancs. Ces glycoprotéines sont fractionnées par chromatofocalisation et caractérisées par différentes techniques séparatives : CLHP, électrophorèse SDS-PAGE, analyse des acides aminés, analyse des oses.*

Un traitement à la bentonite et un test à la chaleur d'un moût de Sauvignon mettent en évidence qu'une fraction sur les 7 isolées est plus facilement adsorbée par la bentonite et que seulement 3 fractions sur les 7 ont une aptitude à provoquer un trouble après chauffage. La teneur en glycoprotéines varie en fonction du cépage, du degré de maturité de la vendange et des modalités préfermentaires (sulfitage, pressurage et macération).

INTRODUCTION

Les protéines du moût sont une cause bien connue d'instabilité des vins blancs. Les troubles ou dépôts caractéristiques de la casse protéique apparaissent en bouteille durant la conservation à température élevée ou à la suite de l'enrichissement du vin en tannins du bouchon.

L'emploi de bentonite pour éliminer les protéines instables du vin blanc est préconisé depuis plus de 50 ans (SAYWELL, 1934; RIBÉREAU-GAYON, 1935). Cependant les premiers travaux sur la nature des substances responsables de la casse protéique sont apparus plus tard dans la littérature (KOCH et SAJAK, 1959; MORETTI et BERG, 1965; FEUILLAT, 1974). Les travaux récents sur ce sujet sont ceux de LEE (1986) et de HSU et HEATHERBELL (1987-1988).

Il semble cependant qu'au cours de la dernière décennie, les doses de bentonite nécessaires pour assurer la stabilité protéique des vins blancs soient en augmentation. Par exemple, selon RIBÉREAU-GAYON et *al.,* (1977), 20 à 40 g/hl de bentonite étaient généralement suffisants pour prévenir la casse protéique. Aujourd'hui, des doses de 80 à 100 g/hl sont souvent employées. A ces niveaux d'utilisation on peut se demander si la qualité des vins n'est pas affectée par le traitement de stabilisation.

---

* Stagiaire de recherche BECO-BEGEROW, détaché à l'Institut d'Oenologie de Bordeaux.

En dépit de nombreux travaux sur l'activité protéolytique des raisins (CORDONNIER et DUGAL, 1968) et des levures (FEUILLAT et *al.,* 1980) et sur l'utilisation d'éventuelles protéases exogènes (MODRA, 1989), le collage à la bentonite demeure la seule méthode efficace pour la stabilisation des vins blancs.

Dans cet article, nous caractérisons les principales glycoprotéines du moût responsables de la casse protéique. Nous étudions aussi leur stabilité thermique et leur élimination par la bentonite. D'autre part nous traitons des principaux facteurs influençant la teneur en protéines et la stabilité des vins blancs.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I — MATÉRIEL

Pour l'étude en chromatofocalisation, les protéines sont récupérées à partir d'un litre de moût Sauvignon 1988 par précipitation au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation soit 560 g/l. Après centrifugation 15 min à 5000 rpm, le culot est repris dans 10 ml d'eau distillée et dessalé sur une colonne G25 sephadex (500 × 15 mm). Puis la fraction dessallée est lyophilisée pendant 12 h. Le précipité ainsi purifié à partir d'un litre de moût correspond à 122 mg de poids sec.

Pour les autres techniques séparatives, électrophorèse et Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP), le moût de Sauvignon 1988 est utilisé directement.

Enfin pour l'étude des facteurs technologiques de l'enrichissement des vins en protéines, d'autres moûts de cépages blancs sont utilisés. Ce sont des moûts de Sauvignon, Sémillon et Muscadelle.

II — MÉTHODES

a) *Tamisage moléculaire en CLHP*

Les différents constituants polysaccharidiques et glycoprotéiques du moût sont analysés selon la méthode décrite par DUBOURDIEU et *al.,* (1986). La colonne utilisée est de type TSK G2000SW (LKB). Les poids moléculaires d'exclusion de ce gel sont de 70.000 D pour les protéines globulaires et de 20.000 D pour les polysaccharides linéaires. Les protéines sont détectées par spectrophotométrie dans l'ultraviolet à 225 nm. Les polysaccharides sont détectés par réfractométrie. La plupart des polysaccharides du moût ont des poids moléculaires supérieurs à 20.000 et sont donc exclus du gel TSK G2000SW.

b) *Électrophorèse sur gel d'acrylamide 10 %*

Les protéines du moût sont analysées par électrophorèse sur un gel d'acrylamide selon la technique SDS-PAGE décrite par LAEMMLI (1970) avec un gel de tassage à 4,5 % d'acrylamide et un gel de séparation à 10 % dans un système de tampon discontinu. Les électrophorèses sont effectuées sur un appareil vertical (Pharmacia) durant 4 h à 120 V. Les gels sont ensuite colorés par la méthode au nitrate d'argent (HEUKESHOVEN et DERNICK, 1985).

c) *Chromatofocalisation*

Les protéines purifiées à partir d'un litre de moût sont fractionnées en chromatofocalisation (SLUYTERMAN et ELGERESMA, 1978). Cette technique est une méthode de séparation des protéines selon leur pHi. La colonne utilisée (400 × 10 mm) est conditionnée avec un gel PBE 94 (Pharmacia) compatible avec une zone de pH comprise entre 9 et 4. Dans un premier temps, la colonne est stabilisée à pH 7,4 grâce à une solution d'imidazole/HCl 0,025 M. Puis un gradient de pH compris entre 7 et 4 est établi dans cette colonne grâce à un tampon PB 74 (Pharmacia). Le flux d'élution est de 0,4 ml/min. La fraction retenue (FR) après le gradient, contenant des protéines d'un pHi inférieur à 4, est éluée grâce à un tampon NaCl 1 M. La détection des protéines est réalisée à 280 nm (LKB). Les fractions obtenues sont dialysées contre 5 l d'eau distillée dans des tubes à dialyse ayant un seuil de coupure de 10.000 D. Chaque fraction est pesée après lyophilisation.

d) *Dosage des polysaccharides*

Les teneurs en polysaccharides neutres sont déterminées, dans chaque fraction obtenue après chromatofocalisation, par la méthode au phénol sulfurique (DUBOIS et *al.,* 1951) adaptée par MONTREUIL et SPIK (1963).

e) *Dosage des oses constitutifs en CPG (Chromatographie en Phase Gazeuse).*

Une partie aliquote (1 mg) des lyophilisats obtenus après chromatofocalisation est soumise à une hydrolyse acide totale à l'acide trifluoroacétique 4N pendant 4 h à 100 °C en présence d'un étalon interne : le mésoinositol. Les hydrolysats sont ensuite transformés en dérivés triméthylsilylés (TMS) en milieu anhydre (BERTRAND, 1975). Par la suite, les dérivés TMS sont analysés en chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire OV1 Marscheray und Nagel (50 m × 0,22 mm; 0,25 μ de phase) de phase et détectés en ionisation de flamme (FID).

f) *Quantification des acides aminés en CLHP*

Une hydrolyse acide avec de l'HCl 6N d'1 mg des fractions obtenues après chromatofocalisation est réalisée pendant 24 h à 120° C sous saturation d'azote. Puis les fractions sont évaporées à sec. Après 2 lavages au méthanol et une nouvelle évaporation, les échantillons sont repris dans 1 ml de tampon sodium pH 3,25 (Varian) auquel sont ajoutés 100 μl d'étalon interne (norleucine à 0,66 g/l). L'analyse est réalisée sur une colonne (150 × 4 mm) échangeuse de cations en forme sodique (Varian). La phase mobile est un mélange de 2 tampons sodium, l'un à pH 3,25 et l'autre à pH 7,4, dont les proportions varient au cours de l'analyse. Le débit de cette phase est de 0,4 ml/min. Une réaction à la ninhydrine est réalisée à la sortie de la colonne puis les acides aminés sont détectés à 570 nm et à 436 nm pour la proline et l'hydroxyproline.

g) *Stabilité protéique*

Les tests de stabilité protéique sont effectués directement sur le moût ou sur les fractions protéiques isolées par chromatofocalisation et remises en solution aqueuse.

Le test consiste à incuber une partie aliquote de la solution à analyser pendant 30 mm à 80° C. Après refroidissement, le trouble apparu est mesuré grâce à un turbidimètre (Hach Ratio/XR).

RÉSULTATS

I — FRACTIONNEMENT DES PROTÉINES DU MOÛT DE SAUVIGNON

Les protéines totales du moût sont tout d'abord fractionnées suivant leur poids moléculaire. Pour cela deux techniques ont été utilisées. Les protéines ont été analysées en Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP) et en électrophorèse SDS/PAGE (LAEMMLI, 1970). Les résultats obtenus en CLHP (figure 1) sont conformes à ceux de DUBOURDIEU et *al.*, (1986). Les protéines sont fractionnées en quatre pics α, β, γ, δ. Le volume d'élution du pic α correspond au volume d'exclusion de la colonne. Ce pic contient des protéines d'un poids moléculaire supérieur à 70.000 D. Le pic β correspond à des protéines d'un poids moléculaire d'environ 66.000 D. Les pics γ et δ imparfaitement séparés contiennent la majeure partie des protéines du moût. Ces protéines ont des poids moléculaires compris entre 30.000 et 20.000 D.

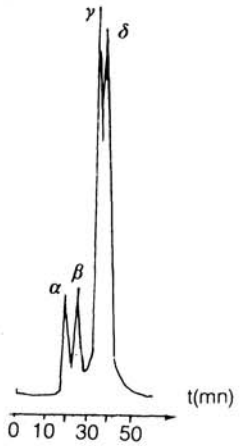


Fig. 1. — Chromatogramme des protéines d'un moût de Sauvignon macéré obtenu par CLHP sur une colonne de tamisage moléculaire.

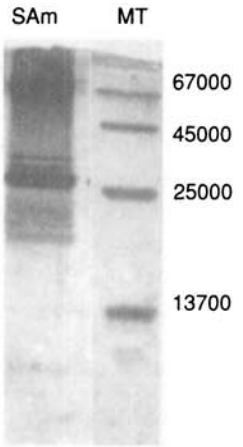


Photo 1 : Profil électrophorétique d'un moût de Sauvignon après macération.
SAm : Sauvignon macéré MT : marqueur de tailles

L'analyse de ces protéines en électrophorèse SDS/PAGE confirme les résultats obtenus en CLHP (Photo 1). Une première famille de protéines faiblement visible sur le gel correspond à des protéines d'un poids moléculaire supérieur à 67.000 D. Un deuxième groupe de deux ou trois protéines d'environ 66.000 D de poids moléculaire représente une autre partie minoritaire des protéines du moût. Il existe aussi un groupe majeur de 7 à 8 protéines dont les poids moléculaires s'échelonnent entre 30.000 et 20.000 D. Enfin, une bande correspondant à un peptide de 10.000 D de poids moléculaire est détectée en électrophorèse. Il est important de noter que suivant les millésimes, la composition du moût en protéines varie (résultats non publiés). Cependant, les

principales familles de protéines décrites sont systématiquement retrouvées en CLHP et en électrophorèse SDS/PAGE. Seule la proportion et la composition fine des différentes familles protéiques varient d'un millésime à l'autre.

Les protéines récupérées à partir d'un litre de moût Sauvignon 1988 sont ensuite fractionnées en fonction de leurs points isoélectriques suivant la technique de chromatofocalisation (figure 2). Après passage sur une colonne de PBE94 (Pharmacia), 7 fractions de pHi différents ont été récupérées (figure 3).

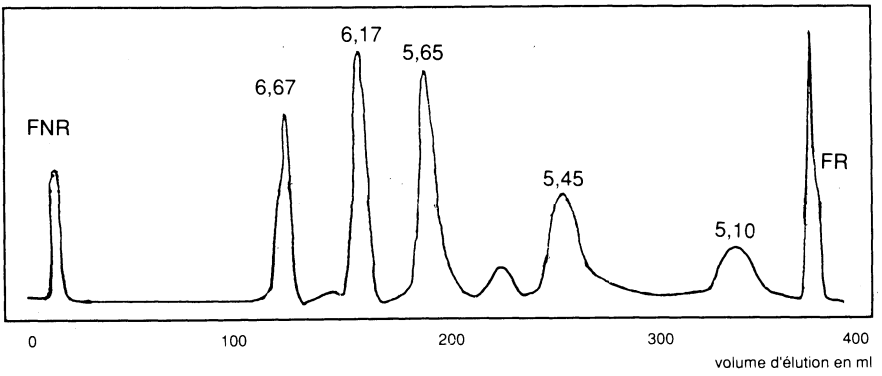


Fig. 2. – Séparation des protéines d'un moût de Sauvignon par chromatofocalisation entre pH 7 et pH 4

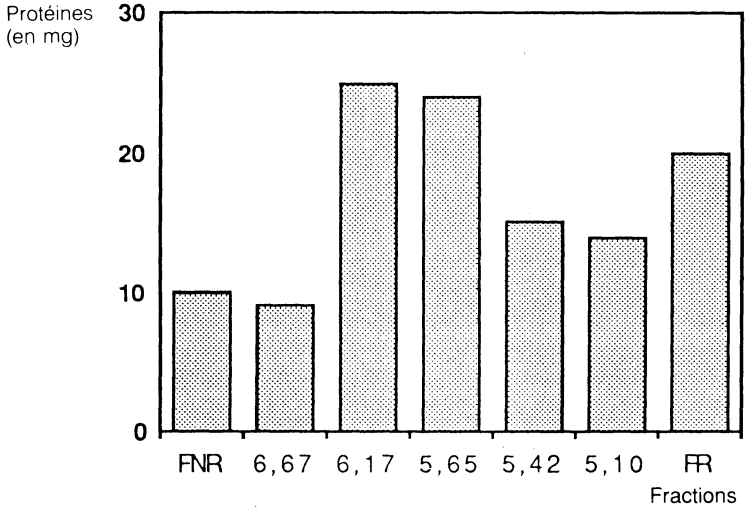


Fig. 3. – Poids sec des différentes fractions obtenues par chromatofocalisation

Les trois fractions principales (en poids sec) ont des pHi respectifs de : 6,17 ; 5,65 et inférieur à 4. Les quatre autres fractions ont des pHi de : 6,67 ; 5,42 ; 5,1 et supérieur à 7,4. En fait cette dernière fraction a un pHi supérieur à 9 comme l'a montré une chromatofocalisation avec un gradient de pH 9 - 4.

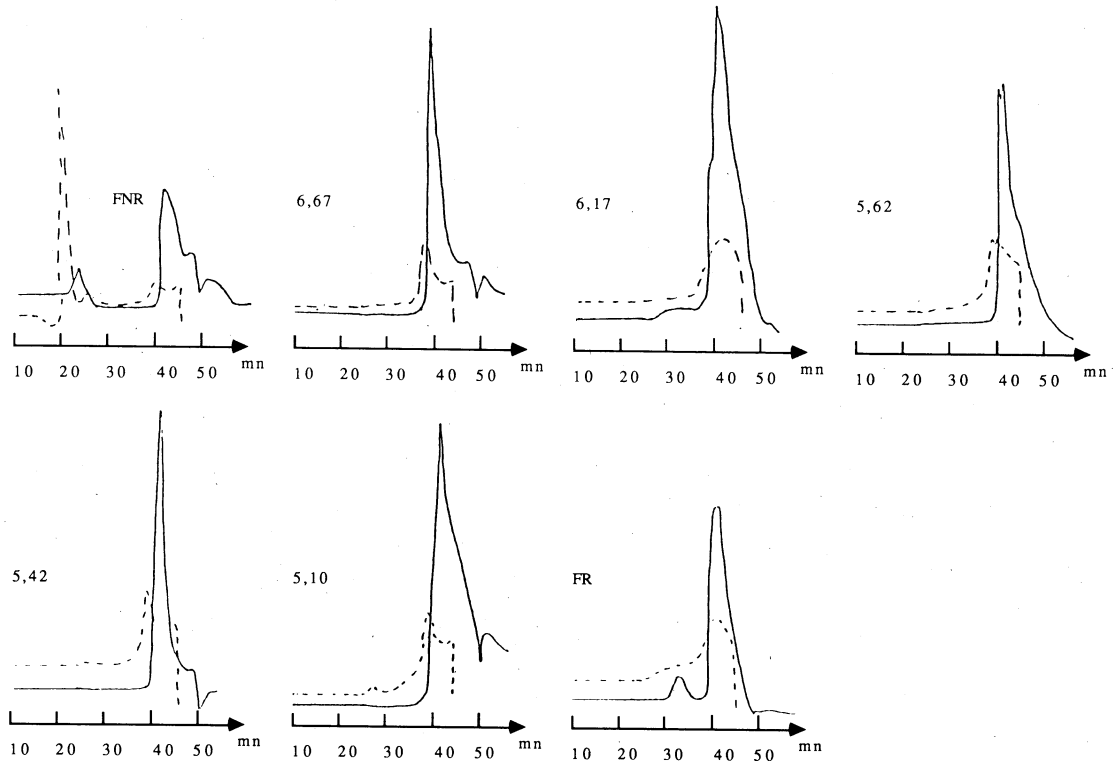


Fig. 4. – Séparation par CLHP des fractions obtenues par chromatofocalisation

Protéines (DO 280 nm)

Polysaccharides (Réfractométrie)

Toutes les fractions obtenues par cette méthode ont été par la suite analysées en CLHP et en électrophorèse SDS/PAGE afin de préciser leur poids moléculaires (figure 4 et photo 2).

La fraction non retenue (FNR) est composée de trois types de protéines de poids moléculaire compris entre 30.000 et 20.000 D.

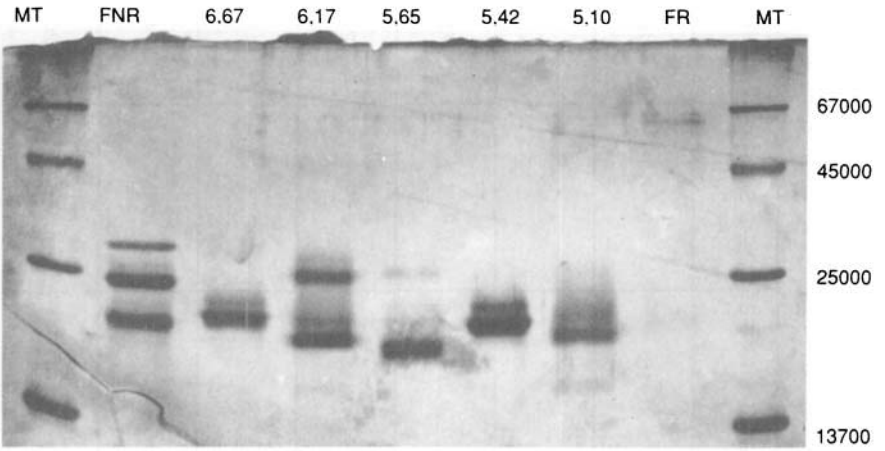


Photo 2 : Profil électrophorétique des différentes fractions d'un moût de Sauvignon obtenues après séparation par chromatofocalisation

Les fractions 6,67 et 5,42 ont le même type de profil électrophorétique et sont composées de deux types de protéines ayant des P.M. d'environ 23.000 et 21.000 D.

La fraction 6,17 comporte deux principaux types de protéines de P.M. respectifs de 25.000 et 19.000 D.

La fraction 5,65 est composée majoritairement par un seul type de protéines de P.M. de 18.000 D.

Enfin les protéines de pHi inférieur à 4 ont des poids moléculaires d'environ 60.000 D.

Les protéines d'un moût Sauvignon 1989 ont été aussi fractionnées par chromatofocalisation. Le chromatogramme obtenu montre qu'il existe une hétérogénéïté entre les millésimes au niveau des pHi des protéines composant le moût. Un plus grand nombre de fractions (10) a été obtenu avec le moût 1989. Cependant, 3 principales fractions sont retrouvées dans les deux moûts. Ces fractions ont pour pHi respectifs : 6,67 ; 6,17 et 5,42.

II — ANALYSE DES FRACTIONS ISOLÉES PAR CHROMATOFOCALISATION

Analyse de la partie polysaccharidique

Le glucose, le galactose, le mannose et l'arabinose sont les quatre sucres principaux trouvés dans les fractions (tableau I). Il existe une bonne correspondance entre le

TABLEAU I

Analyse de la composition en oses totaux (en g/g de poids sec) des fractions obtenues après chromatofocalisation.

	GLUCOSE	GALACTOSE	MANNOSE	ARABINOSE	TOTAL SUCRES CPG	TOTAL SUCRES PHENOL	POIDS SEC mg/l DE MOÛT	
FNR	0,155	0,105	0,065	0,09	0,415	0,4	10	8,5
6,67	0,027				0,027	0,107	9	7,6
6,17	0,019	0,019	0,025	0,021	0,084	0,08	25	21,3
5,65	0,02	0,008	0,012		0,041	0,095	24	20,5
5,42	0,078	0,126	0,049	0,011	0,223	0,24	15	12,8
5,1	0,045	0,026	0,016		0,087	0,084	14	11,9
FR	0,037	0,035	0,03	0,011	0,114	0,167	20	17

TABLEAU II

Analyse de la composition en acides aminés des fractions obtenues en chromatofocalisation.

FRACTIONS / ACIDES AMINES	FNR %	6,67 %	6,17 %	5,65 %	5,42 %	5,1 %	FR %
Asp	NM	14	13,9	15	8,8	15,4	10,9
Thr	NM	5	8	9,1	6,5	10,3	5,1
Ser	NM	7	5	4,8	12	5,8	3,7
Glu	NM	6	6,5	6,2	2,4	6,1	6,5
Gly	NM	6,5	6,5	6,5	NM	5,8	4,4
Ala	2	7,7	6,1	5,1	NM	5,8	5,8
Cys	1,4	2	8,9	7,5	NM	9,7	0,5
Val	1,2	4,7	2,7	2	NM	2,8	3
Met	NM	NM	0,15	0,1	NM	0,3	NM
Iso	1,7	5,1	2,2	3,9	3,5	2,4	3
Leu	2,4	4,4	4	5	2,8	4,6	5,1
Tyr	2	6,5	4,6	5	4,7	4,5	4,1
Phe	3,8	7,5	8	6,8	5	7,6	4,1
Lys	2,4	2,8	1,3	0,4	1,9	0,7	2
His	7,6	4,4	4,4	4,7	1,9	3,4	4,1
Arg	75,7	11,5	10,1	8,2	49	9,2	32
Pro	NM	2,3	5,6	7,4	NM	4,5	3,4
Hydroxypro	NM	NM	0,14	0,6	NM	NM	1
Quantité totale d'AA (μg/mg)	138	531	627	493	735	737	146
Quantité totale test ninhydrine	ND	404	324	319	304	427	148

NM : non mesurable. ND : non déterminé.

dosage des oses neutres totaux par la méthode au phénol sulfurique et la somme des oses identifiés en CPG. Cependant les fractions 6,67 et 5,65 se caractérisent par un plus faible rendement de l'hydrolyse de leur partie glucidique par l'acide trifluoroacétique. A l'exception de la FNR, la partie glucidique des autres fractions analysées est comprise entre 8 et 24 % du poids sec. Dans la FNR, cette proportion est de 40 % (tableau I). Ceci est confirmé par les résultats obtenus en CHLP (figure 4) où la partie glucidique de la FNR, détectée par réfractométrie en sortie de colonne, est plus importante.

Dans la partie glucidique de la fraction 6,67, seul le glucose est identifié. Les autres fractions sont de nature hétérosidique. Ainsi, la fraction non retenue, les fractions 6,17; 5,42 et la fraction retenue contiennent du glucose du galactose du mannose et de l'arabinose. Ce dernier sucre est absent des fractions 6,67 et 5,1. Le xylose et le rhamnose, constituants habituels des polysaccharides du moût sont absents de toutes les fractions analysées.

Analyse de la partie peptidique

La composition en acides aminés de chaque fraction issue de la chromatofocalisation a été analysée en CLHP (tableau II). A noter que la méthode utilisée ne permet pas la détection de l'asparagine et de la glutamine. Les fractions 6,67, 6,17, 5,65 et 5,1 ont des compositions voisines en acides aminés et l'acide aspartique est largement représenté. La FNR, la FR et la fraction 5,42 ont des teneurs en arginine très importantes. Les parties peptidiques des FNR et FR représentent respectivement 13 et 14 p. 100 du poids sec. Pour les autres fractions, la partie peptidique est comprise entre 40 et 73 p. 100.

Il apparait donc que toutes les fractions analysées sont des glycoprotéines dont les proportions en glucides et en peptides sont données dans la figure 5.

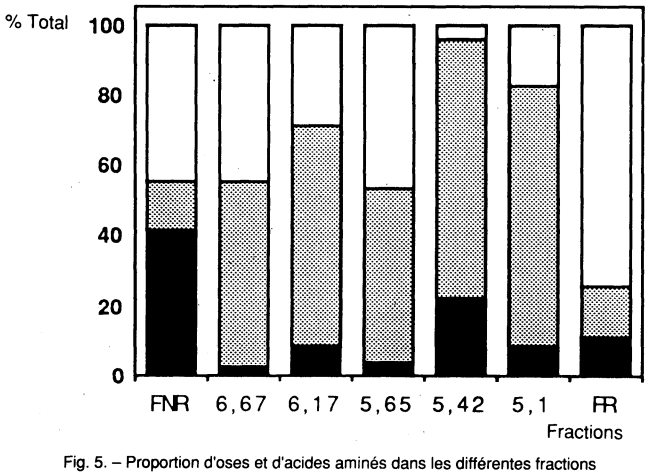


Fig. 5. – Proportion d'oses et d'acides aminés dans les différentes fractions

■ % Sucres ▨ % Acides aminés □ autres

III — EFFET DE LA BENTONITE SUR LES GLYCOPROTÉINES DU MOÛT SÉPARÉES PAR CHROMATOFOCALISATION

Les glycoprotéines d'un moût traité par des doses croissantes de bentonite sont fractionnées en chromatofocalisation. La fraction la plus sensible à l'action de la bentonite est la FNR, correspondant à des protéines de pHi supérieur à 9. Elle est éliminée du moût dès 40 g/hl. L'élimination des autres fractions nécessite des doses plus élevées de bentonite (figure 6).

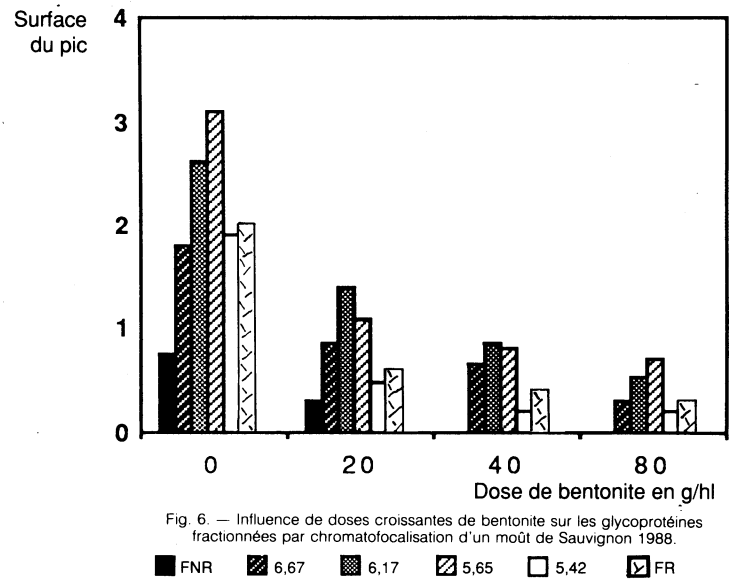


Fig. 6. — Influence de doses croissantes de bentonite sur les glycoprotéines fractionnées par chromatofocalisation d'un moût de Sauvignon 1988.

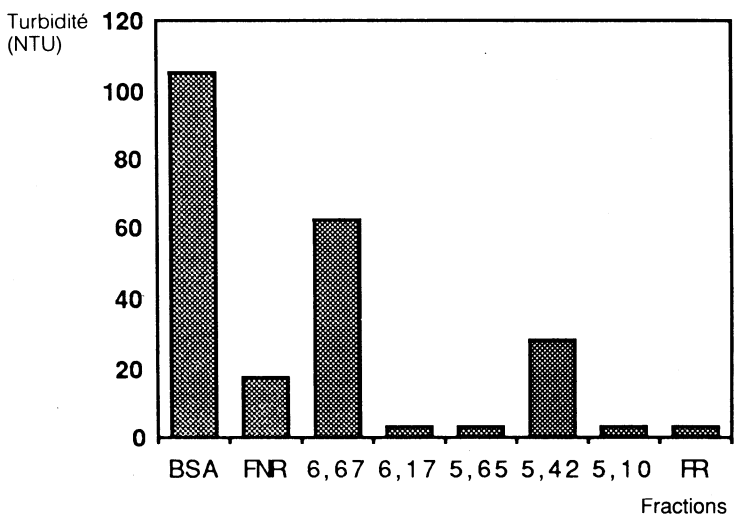


Fig. 7. – Mesure par néphélométrie du trouble apparu après chauffage de chaque fraction
BSA : Bovine Serum Albumin

IV — APTITUDE A FORMER UN TROUBLE APRÈS CHAUFFAGE DES DIFFÉRENTES FRACTIONS GLYCOPROTÉIQUES

Des solutions aqueuses à 100 mg/l des différentes fractions glycoprotéiques séparées par chromatofocalisation sont soumises à un traitement thermique (80° C pendant 30 mn). Après refroidissement, la turbidité de chaque échantillon est mesurée par néphélométrie (figure 7). Seules les fractions de pHi 6,67, 5,42 et supérieur à 9 provoquent un trouble significatif. Ces fractions semblent donc jouer un rôle important dans la casse protéique. Il est intéressant de noter que les fractions 6,67 et 5,42 contiennent des protéines de poids moléculaires identiques (photo 2). De plus, les trois groupes de protéines sont retrouvés dans les moûts de Sauvignon des millésimes 1988 et 1989.

V — FACTEURS TECHNOLOGIQUES D'ENRICHISSEMENT DES TENEURS EN PROTÉINES DES MOÛTS

Pour cette étude, trois cépages blancs ont été utilisés : Sauvignon, Muscadelle et Sémillon. Des raisins de ces trois cépages, cultivés sur des terroirs comparables, sont prélevés au cours de la maturation en 1988. Les analyses portent sur des jus obtenus en laboratoire soit par pressurage immédiat du raisin foulé éraflé, soit après macération préfermentaire de 18 heures à 18° C en présence de 30 mg/l de SO_2. La teneur en protéines des jus augmente durant la maturation du raisin (figure 8). Les moûts de Sauvignon et de Muscadelle à maturité obtenus après pressurage immédiat ont des teneurs similaires en protéines (figure 8). Dans les mêmes conditions d'extraction des jus, le contenu en protéines d'un moût de Sémillon est plus faible.

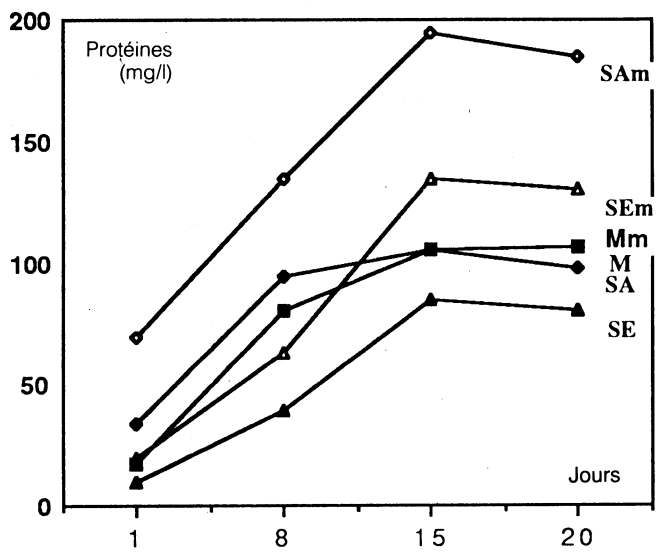


Fig. 8. – Evolution de la teneur en protéines au cours de la maturation suivant le cépage et le traitement préfermentaire

SAm : Sauvignon macéré - SEm : Sémillon macéré
Mm : Muscadelle macérée - M : Muscadelle - SA : Sauvignon - SE : Sémillon

Pour le Sauvignon et le Sémillon, à maturité, la macération pelliculaire provoque par rapport au pressurage immédiat des augmentations importantes des teneurs en protéines (respectivement de 100 et 50 %). Les profils électrophorétiques des protéines montrent en outre qu'un peptide de poids moléculaire de 10.000 D apparait dans les moûts de Sauvignon et de Sémillon (photo 3). La macération pelliculaire des moûts semble avoir moins d'influence sur la teneur en protéines des moûts de Muscadelle. Durant la macération, la teneur en protéines du jus augmente principalement dans les 10 premières heures (figure 9).

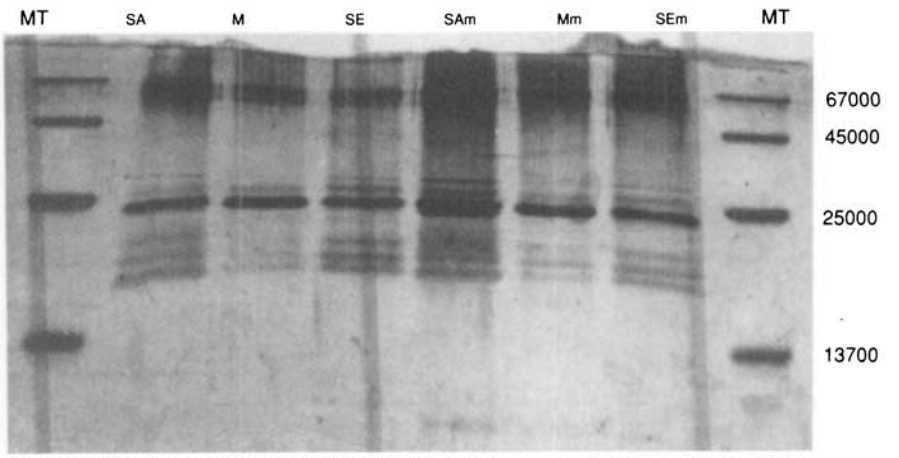


Photo 3 : Profil électrophorètique d'un moût de Sauvignon, Semillon et Muscadelle avant et après macération
MT : marqueur de tailles - SA : Sauvignon - SE : Sémilion - M : Muscadelle - m : après macération

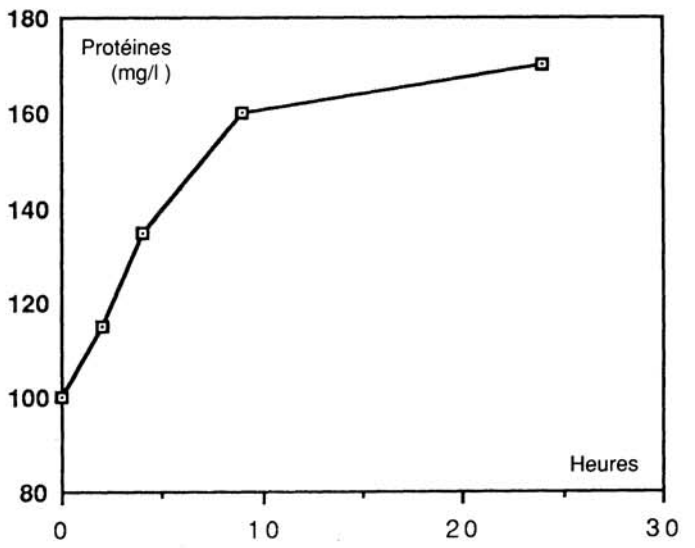


Fig. 9. – Evolution de la teneur en protéines d'un moût au cours de la macération préfermentaire

Le sulfitage, même à des doses faibles (2 g/hl) favorise aussi l'extraction des protéines des parties solides pendant la macération (figure 10).

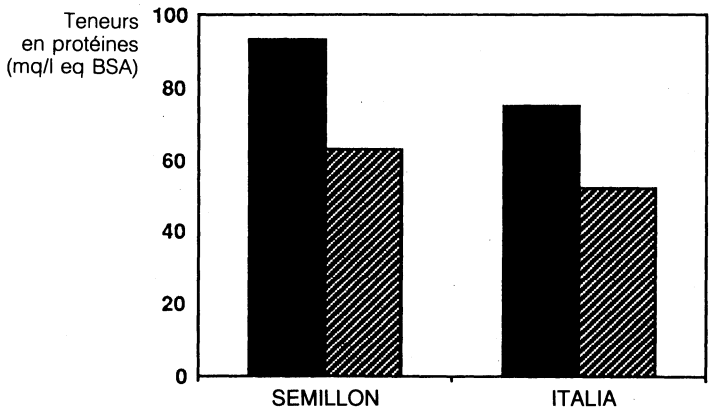


Fig. 10. — Influence du sulfitage des vendanges avant la macération sur les teneurs en protéines des vins.

■ 2 g de SO2 ▨ 0 g de SO2

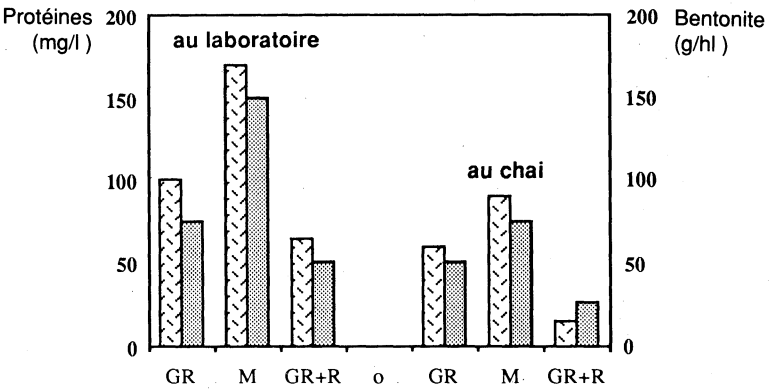


Fig. 11. – Influence de la macération et du pressurage avec rafle sur la teneur en protéines et la dose de bentonite nécessaire à la stabilité protéique

protéines mg/l Bentonite g/hl

GR : vendange éraflée - M : vendange macérée - GR+R : Vendange entière

Une dernière expérience met en évidence le rôle de l'éraflage sur la teneur en protéines des moûts. Le contenu protéique et la dose de bentonite nécessaire à la stabilisation d'un jus provenant du pressurage immédiat de grappes éraflées sont beaucoup plus importants que ceux d'un jus provenant du pressurage immédiat de grappes entières (figure 11). Ainsi, les vendanges mécaniques qui éliminent les rafles, peuvent être considérées comme un facteur important de l'instabilité protéique des vins blancs de certains cépages.

CONCLUSION

Les molécules responsables de l'instabilité protéique des vins blancs de Sémillon, Sauvignon et Muscadelle sont essentiellement des glycoprotéines dont le poids moléculaire est compris entre 30.000 et 18.000 D. Ces glycoprotéines fractionnées par chromatofocalisation présentent une gamme étendue de pHi. Pour le cépage Sauvignon, trois fractions de pHi 6,17 ; 5,65 et supérieur à 9 sont plus particulièrement responsables de l'apparition d'un trouble après chauffage. La fraction de pHi supérieur à 9 est éliminée facilement du moût que nous avons étudié, par une dose de bentonite de l'ordre de 40 g/hl. L'adsorption des protéines de poids moléculaires de 21.000 et 23.000 D (protéines correspondant aux autres fractions) nécessite des doses de bentonite plus élevées.

La teneur des moûts en glycoprotéines instables dépend du cépage, du degré de maturité de la vendange et des modalités préfermentaires (sulfitage, pressurage, macération préfermentaire). En particulier, l'éraflage et par conséquent la récolte mécanique jouent certainement un rôle important dans l'augmentation des teneurs en protéines des moûts blancs.

Manuscrit reçu le 25 juin 1990 ; accepté pour publication le 2 juillet 1990.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERTRAND A., 1975. Recherches sur l'analyse des vins par chromatographie en phase gazeuse. Thèse Doctorat d'État Sciences, Université de Bordeaux II.

CORDONNIER R. et DUGAL A., 1968. Les activités protéolytiques du raisin. *Ann. Technol. Agric.,* **17,** n° 3, 189-206.

DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMITH F.A., 1951. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature,* n° 168, 167.

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

FEUILLAT M., 1974. Thèse Doctorat. Université Dijon.

FEUILLAT M., BRILLANT G. et ROCHARD J. 1980. Mise en évidence d'une production de protéases exocellulaires par les levures au cours de la fermentation alcoolique du moût de raisin. *Conn. Vigne Vin,* **14,** n° 1, 37-52.

HEUKESHOVEN J. et DERNICK R., 1985. *Electrophoresis,* 6, 103-112.

HSU J.C. et HEATHERBELL D.A., 1987. *Am. J. Enol. Vitic.* n° 1, 6.

KOCH J. et SAJAK E., 1959. *Am. J. Enol. Vitic.,* 10, 114-123.

LAEMMLI. U.K., 1970. *Nature,* 227, 680-685.

LEE T.H., 1986. Physical Stability of wine. T.H. Lee (Éd.) 23-39. The Australian Wine Research Institute. Glen Osmond, S.A. Australia.

MODRA E.J., 1989. IV Symposium International Oenologie, Bordeaux juin 1989.

MONTREUIL J. et SPIK G., 1963. Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux. Monographie du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille.

MORETTI R.H. et BERG H.W., 1965. *J. Enol. Vitic.,* 16, 69-78.

RIBÉREAU-GAYON J., 1935. *Rev. Vitic.,* 82, 367.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., SUDRAUD P., RIBÉREAU-GAYON P., 1977. Sciences et Techniques du Vin (tome IV), Dunod Éd.

SAYWELL L.G., 1934. Ing. Chem., 987.

SLUYTERMAN, L.A.A.E., ELGERSMA O., 1978. I. General Principles J. Chromatogr., 150, 17-30.