Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1995, **29**, N°1, 43-48

COMPOSITION PROTÉIQUE DE QUELQUES GÉLATINES DESTINÉES AU TRAITEMENT DES VINS

CHARACTERIZATION OF PROTEIC CONTENT OF GELATINS

Eliane BAYLE, L. LAGUNE, Y. GLORIES et P. SUDRAUD*

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II,
351, cours de la Libération, 33405 Talence (France)
*Laboratoire de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes
351, cours de la Libération, 33405 Talence (France)

Résumé : La méthode Kjeldahl, recommandée par le Codex Œnologique, toujours utilisée actuellement exprime la richesse globale en composés azotés des gélatines mais ne renseigne pas sur la structure de ces protéines.

Afin de caractériser le contenu protéique des gélatines , des dosages simples et rapides, basés sur des réactions colorimétriques ont été mis au point.

A partir de deux de ces méthodes : Biuret et Ninhydrine, un coefficient C correspondant au rapport des concentrations protéiques Biuret/Ninhydrine a été établi. Il apparaît que les gélatines liquides et solubles à froid sont caractérisées par un coefficient C < 35 alors que les gélatines solubles à chaud ont un coefficient C > 35.

Abstract : Enological gelatins are currently used in the red wines collage. We found those gelatins added with particular composants in white wines treatment.

The Kjeldahl method recommanded by the Enology Codex gives the global concentration in nitrogen containing compounds. In order to characterize the protein content of œnological gelatins, simple and rapid determinations, based on colorimetric reactions have been selected. The proteic concentrations have been determined from commercial kits SIGMA : Biuret and Ninhydrin reactions are both concerned. They have a good repetability (variation coefficient < 6 p. cent). With Biuret, hot soluble gelatins have high concentrations, instead cold soluble and liquid gelatins have light concentrations. With Ninhydrin, results are reversed. A coefficient corresponding to the ratio of those two methods allows to characterize the hydrolyse degree of proteic chains : C = [B] / [N]. Gelatins can be classified in two groups : C < 35 for cold soluble and liquid gelatins , C > 35 for hot soluble gelatins.

Otherwise, results obtained in Kjeldahl and Biuret methods are proportional. In fact, the authors suggest a limit proteic concentration expressed in mg BSA/g solid gelatin : 750 mg BSA /g corresponding to the standard decided by the Codex, 14 % nitrogen minimum.

Mots clefs : gélatines - protéines
Key words : gelatins - proteins

INTRODUCTION

D'après le codex œnologique « la gélatine est le produit de l'hydrolyse partielle du collagène contenu dans les peaux, le tissu conjonctif et les os des animaux ». Le codex d'autre part, spécifie certaines caractéristiques mais ne précise pas leur composition protéique directement en relation avec leur aptitude à précipiter les tanins du vin.

En effet, les gélatines sont couramment employées pour le collage des vins rouges en raison de leur action sur les polyphénols (BERGERET, 1974). Outre leur fonction clarifiante, elles affinent les qualités gustatives du vin en modifiant l'astringence et la souplesse du vin (BERGERET, 1963 ; CERF, 1973 ; IKONOMOU, 1985.).

Nous nous proposons dans cet article, de présenter les résultats obtenus à partir de deux dosages colorimétriques des protéines constitutives des gélatines : l'un basé sur la réaction de Biuret a été mis au point à partir d'un kit de dosage commercial SIGMA et l'autre, concerne la réaction entre les acides aminés libres ou N-terminaux des chaînes protéiques.

**chercheur de SARCO - Bordeaux (33), détachée à l'Institut d'Œnologie

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I — MATÉRIELS

Le réactif de Biuret (solution alcaline de sulfate de cuivre) provient d'un kit de dosage SIGMA DIAGNOSTICS, TOTAL PROTEIN généralement utilisé pour la détermination de la concentration en protéines totales dans le sérum ou le plasma.

La ninhydrine (hydrate du dicéto-hydrindène) est fournie par MERCK.

L'ensemble des solvants utilisés sont de qualité RP.

Les gélatines étudiées diffèrent par la nature et l'intensité de l'hydrolyse subie :
- gélatines solubles à froid.
- gélatines liquides.
- gélatines solubles à chaud.

II — MÉTHODES DE DOSAGE DES PROTÉINES CONSTITUTIVES DES GÉLATINES

1) Méthode Kjeldahl

Le mode opératoire utilisé pour le dosage de l'azote dans les gélatines est celui conseillé par le codex.

2) Le réactif de Biuret

La procédure proposée dans le kit commercial SIGMA (DOUMAS et *al.*) a dû être adaptée au cas particulier des gélatines.

Le mélange réactionnel se compose de 0,4 ml d'une solution de gélatine à 5 g/l préparée dans de l'acide citrique à 5 g/l et de 2 ml de réactif.

Les mesures d'absorbances sont réalisées à la longueur d'onde 540 nm dans des cuves de 1 cm de parcours optique et au temps t = 30 min (le temps t = 0 correspond au moment du mélange réactif + gélatine).

3) Dosage avec la ninhydrine

Ce dosage est une adaptation de la méthode proposée par ROSEN (1957). A 1 ml de solution protéique (gélatine à 10 g/l préparée dans de l'eau distillée), 0,5 ml de solution tampon* et 0,5 ml de ninhydrine** sont ajoutés. Les tubes sont alors placés dans un bain-marie à 100°C pendant 15 minutes. Dès la sortie du bain, on introduit 5 ml de méthylcellosolve. Lorsque les tubes reviennent à température ambiante, mesurer l'intensité de la coloration avec un spectrophotomètre à 570 nm. Une dilution au 1/20ième dans le méthylcellosolve permet d'obtenir des absorbances correctes et inférieures à 1, dans des cuves de 1 cm de parcours optique.

La coloration bleue-violette formée est stable pendant 1 heure. Par conséquent, les mesures d'absorbances ne doivent pas être effectuées au delà de cet intervalle de temps.

*La solution tampon utilisée ici se compose (pour un volume de 100 ml) de 2 ml de cyanure de sodium (NaCN) à 0,49 g/l. Le volume est complété à 100 ml avec une solution préparée comme suit : dans une fiole de 100 ml, on introduit 36 g d'acétate de sodium (NaOAc, 3 H_2O), 27 ml d'eau distillée et 6,7 ml d'acide acétique glacial ; le volume est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée.

**La solution de ninhydrine est préparée à 3 p. cent dans du méthylcellosolve.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I — ÉTUDE DE LA SPECIFICITÉ ET DE LA RÉPÉTABILITÉ DES MÉTHODES DE DOSAGE

1) La méthode Kjeldahl

La méthode Kjeldahl reste une méthode de référence en analyse appliquée (alimentation, agriculture, biochimie et pharmacologie) mais elle présente quelques inconvénients. En raison de sa mise en œuvre délicate, cette méthode possède une répétabilité et une reproductibilité moyennes (10 p. cent) ; l'utilisation d'un appareillage au coût élevé permet d'obtenir de meilleurs résultats. En outre, il s'agit d'une méthode globale d'estimation de la teneur en composés azotés de ces gélatines.

2) Dosage par le réactif de Biuret

La réaction de Biuret est la réaction la plus générale, utilisée pour doser les protéines (AGNERAY et *al.*, 1990). Elle est basée sur la formation en milieu alcalin d'un complexe rose entre l'ion cuivrique et la fonction peptide. Cette coloration se superpose à la couleur bleue du sulfate de cuivre ($CuSO_4$) en excès. L'intensité de la coloration est fonction du nombre de liaisons peptidiques par gramme de protéines à analyser. Elle est pratiquement indépendante de la masse moléculaire des protéines et présente un maximum d'absorption à la longueur d'onde 540 nm.

La répétabilité de la méthode a été étudiée à partir de quatre gélatines :
- gélatine soluble à froid (1),
- gélatine liquide (2),
- gélatines solubles à chaud (3 et 4).

TABLEAU I

Etude de la répétabilité de la méthode de dosage des protéines par le réactif de Biuret

Numéro essai	Absorbance* gélatine 1	Absorbance* gélatine 2	Absorbance* gélatine 3	Absorbance* gélatine 4
1	0,160	0,144	0,171	0,162
2	0,153	0,150	0,170	—
3	0,160	0,143	0,179	0,169
4	0,159	0,145	0,172	0,166
5	0,161	0,150	0,176	0,167
6	0,160	0,142	0,173	0,169
7	0,157	0,146	0,179	—
8	0,159	0,142	0,178	0,169
9	—	0,144	0,175	0,170
10	0,158	0,144	0,178	0,164
Moyenne des absorbances	0,158	0,145	0,175	0,167
Écart type	0,002	0,003	0,003	0,003
Cœfficent de variation (%)	1,5	2,0	1,9	1,7

*absorbance à 570 nm

A partir de dix échantillons par gélatine, on observe dans le tableau I que le cœfficient de variation est inférieur à 2 p. cent, conférant à la méthode une bonne répétabilité.

3) Dosage du contenu protéique des gélatines par la ninhydrine

La réaction avec la ninhydrine est une réaction fondamentale pour la détection et la quantification des acides aminés. Avec la majorité des acides aminés, deux molécules de ninhydrine interviennent pour former un complexe de couleur bleue-violette possédant un maximum d'absorbance à 570 nm. Dans le cas de la proline et l'hydroxyproline, le composé formé est de coloration jaune (ou rouge en milieu très acide) et ne met en œuvre qu'une seule molécule de ninhydrine. Le maximum d'absorption se situe pour ce genre de complexe à 410 nm.

Pour le dosage du contenu protéique des gélatines, seuls les acides aminés N-terminaux des protéines, polypeptides et peptides peuvent réagir avec la ninhydrine. La réaction de la ninhydrine avec un acide aminé libre est la même qu'avec un acide aminé N-terminal d'une chaîne protéique. Donc, la concentration obtenue indique la quantité d'acides aminés libres et d'extrémités N-terminales de chaînes protéiques contenus dans la solution de gélatine.

Tout comme dans le dosage précédent, la répétabilité a été étudiée à partir de dix échantillons des quatre gélatines : 1, 2, 3 et 4 préparées à 10 g/l dans de l'eau distillée. Le tableau II regroupe les résultats et calculs statistiques obtenus. Le coefficient de variation est inférieur à 6 p. cent.

II — ESTIMATION ET EXPRESSION DES CONCENTRATIONS EN PROTÉINES

1) Choix de la protéine étalon

L'étalonnage de la réaction de Biuret se fait généralement avec une gamme de sérumalbumines bovines (BSA). En effet, les sérumalbumines sont des holoprotéines qui réagissent stœchiométriquement dans la réaction de Biuret (AGNERAY et *al.*, 1990). De même, la droite étalon de la ninhydrine a été tracée à partir de la BSA.

2) Estimation du contenu protéique de différentes gélatines

Dans le dosage de BIURET et en se référant aux moyennes d'absorbances (x) obtenues lors de l'étude de la répétabilité (tableau I), les concentrations des gélatines 1, 2, 3 et 4 ont été calculées en mg BSA/g de gélatine solide à partir de l'équation :

$$C \text{ (mg BSA/g gélatine)} = (A_{540} \cdot 1000 - 35{,}24)/1{,}09$$

TABLEAU II

Etude de la répétabilité de la méthode de dosage des protéines par la ninhydrine

Numéro essai	Absorbance* gélatine 1	Absorbance* gélatine 2	Absorbance* gélatine 3	Absorbance* gélatine 4
1	0,406	0,425	0,259	0,223
2	—	—	0,294	0,247
3	0,404	0,431	0,284	0,242
4	0,414	0,466	0,286	0,249
5	0,396	0,401	0,296	0,250
6	0,392	0,441	0,291	0,248
7	0,416	0,431	0,291	0,267
8	0,403	0,401	0,311	0,264
9	0,443	0,425	0,280	0,238
10	0,403	0,379	0,286	0,269
Moyenne des absorbances	0,408	0,422	0,288	0,245
Écart type	0,015	0,025	0,013	0,014
Cœfficent de variation (%)	3,7	6,0	4,6	5,6

*absorbance à 540 mm

Pour le dosage à la ninhydrine (tableau II), l'équation devient :

$$C \text{ (mg BSA/g gélatine)} = (A_{540} \cdot 100 - 0{,}36)/1{,}32$$

Concernant le dosage Kjeldahl, la teneur en azote total des gélatines s'exprime en mg d'azote par gramme de gélatine sèche (mg N/g).

III — COMPARAISON DES CONCENTRATIONS PROTEIQUES OBTENUES DANS LES TROIS DOSAGES : KJELDAHL, BIURET ET NINHYDRINE

La méthode Kjeldahl est une méthode de dosage globale qui représente la teneur en composés azotés des gélatines. En se référant aux concentrations protéiques obtenues dans ce dosage (tableau III), nous pouvons constater qu'elles sont peu différentes les unes des autres. Autrement dit, bien que ces gélatines aient subi des traitements d'hydrolyse de natures et d'intensités différentes, elles possèdent la même teneur en azote total, et ne sont pas différenciables par cette méthode.

Théoriquement, les concentrations relevées dans le dosage de Biuret, sont directement reliées au nombre de liaisons peptidiques. Autrement dit, une concentration élevée devrait révéler la présence de nombreuses liaisons, donc de longues chaînes protéiques, correspondant à une gélatine peu hydrolysée, c'est-à-dire une gélatine soluble à chaud. Par contre, une concentration plus faible devrait correspondre à un nombre de liaisons moins important, donc à des chaînes plus courtes. On constate en effet que les gélatines solubles à chaud ont des teneurs supérieures aux gélatines solubles à froid et liquides.

En outre, parmi les gélatines peu dégradées, les protéines sont caractérisées par de longues chaînes plus ou moins repliées sur elles-mêmes (en raison de problèmes spatiaux) ayant tendance à s'opposer à la pénétration de l'ion cuivrique à l'intérieur de la molécule. D'où une réactivité différente avec les gélatines 3 et 4 (tableau III).

Concernant les teneurs obtenues par le dosage à la ninhydrine, on constate que les résultats sont en accord avec le degré d'hydrolyse de la gélatine. La gélatine soluble à froid (1) et liquide (2), qui possèdent un plus grand nombre de chaînes protéiques courtes présentent la réactivité la plus forte. C'est l'inverse pour les gélatines solubles à chaud (3 et 4).

IV — DIFFÉRENCIATION DES GÉLATINES : LE COEFFICIENT C

Il est intéressant de regrouper les deux méthodes

TABLEAU III

Concentrations protéiques obtenues dans les trois méthodes de dosage des protéines

N° gélatine	[K] (mgN/g)	[B] (mgBSA/g)	[B]/[K]	[B] (mgBSA/g)
1	154	767	4,98	30,5
2	145	705	4,86	31,6
3	157	848	5,40	21,5
4	146	810	5,55	18,2

[K] : concentrations protéiques obtenues dans le dosage de Kjeldahl - [B] : concentrations protéiques obtenues dans le dosage de Biuret
[N] : concentrations protéiques obtenues dans le dosage à la ninhydrine
[B]/[K] : cœfficient de proportionnalité entre les deux méthodes de dosage : Biuret et Kjeldahl

de dosage : Biuret et ninhydrine. En effet, ces deux méthodes sont complémentaires et nous renseignent sur la nature des chaînes protéiques. Des concentrations élevées en Biuret et faibles avec la ninhydrine correspondent à des gélatines peu hydrolysées : les gélatines solubles à chaud possèdent un petit nombre de longues chaînes protéiques. Pour les gélatines liquides ou solubles à froid, les résultats sont inversés.

Un coefficient tenant compte de ces deux méthodes devrait permettre de caractériser le degré d'hydrolyse des gélatines, soit :

$$C = [B] / [N]$$

avec

[B] : concentration protéique obtenue dans le dosage de Biuret,

[N] : concentration protéique obtenue dans le dosage à la ninhydrine.

La figure 1 présente les valeurs de ce cœfficient pour des gélatines solubles à chaud, solubles à froid et liquides. Il est ainsi possible de séparer les gélatines œnologiques en deux groupes, suivant la valeur du coefficient C. Les gélatines liquides et solubles à froid sont caractérisées par un cœfficient $C < 35$ qui représente d'une part un nombre élevé de chaînes protéiques et d'autre part, des longueurs de chaînes courtes, obtenues par une hydrolyse intense. Inversement, les gélatines solubles à chaud qui sont constituées de chaînes protéiques longues mais en nombre réduit, ont un coefficient $C > 35$, représentatif d'une hydrolyse faible.

V — DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION PROTÉIQUE LIMITE

Dans le paragraphe « dosage de l'azote total », le codex œnologique indique la quantité d'azote total minimale que doit contenir 100g de gélatine sèche : 14 p. cent (ou 140 mgN/g dans notre cas). Il serait intéressant d'obtenir une concentration limite exprimée en mgBSA/g de gélatine solide correspondant à cette norme, en utilisant la méthode de Biuret.

Les concentrations déterminées par ces deux méthodes : Biuret et Kjeldahl sont proportionnelles (tableau III). En effet, les unités étant toutefois différentes, les résultats obtenus par la méthode du Biuret sont en moyenne 5,2 fois supérieurs à ceux obtenus dans la méthode Kjeldahl.

La concentration minimale alors obtenue à partir de Biuret est : 728 mgBSA/g de gélatine solide.

CONCLUSION

Cette étude permet de mettre en évidence la relation existant entre les deux méthodes de dosage: Biuret et Kjeldahl ; les concentrations protéiques obtenues sont proportionnelles. Ainsi, en vue de la révision du codex, on pourrait proposer d'exprimer la quantité d'azote minimale en mg BSA/g de gélatine solide.

Le couplage des deux réactions de dosage : Biuret et ninhydrine, nous permet d'accéder à la structure des chaînes protéiques. A partir du cœfficient C, il devient possible de classer les gélatines en fonction de l'intensité de l'hydrolyse subie. En effet, tel que cela apparaît sur la figure 1 et à partir d'un échantillonnage de 20 gélatines différentes, le coefficient C permet de discriminer d'une part, les gélatines liquides et solubles à froid ($C < 35$) et d'autre part, les gélatines solubles à chaud ($C > 35$).

Il serait souhaitable d'envisager une réadaptation du test de précipitation des gélatines par « le tanin »,

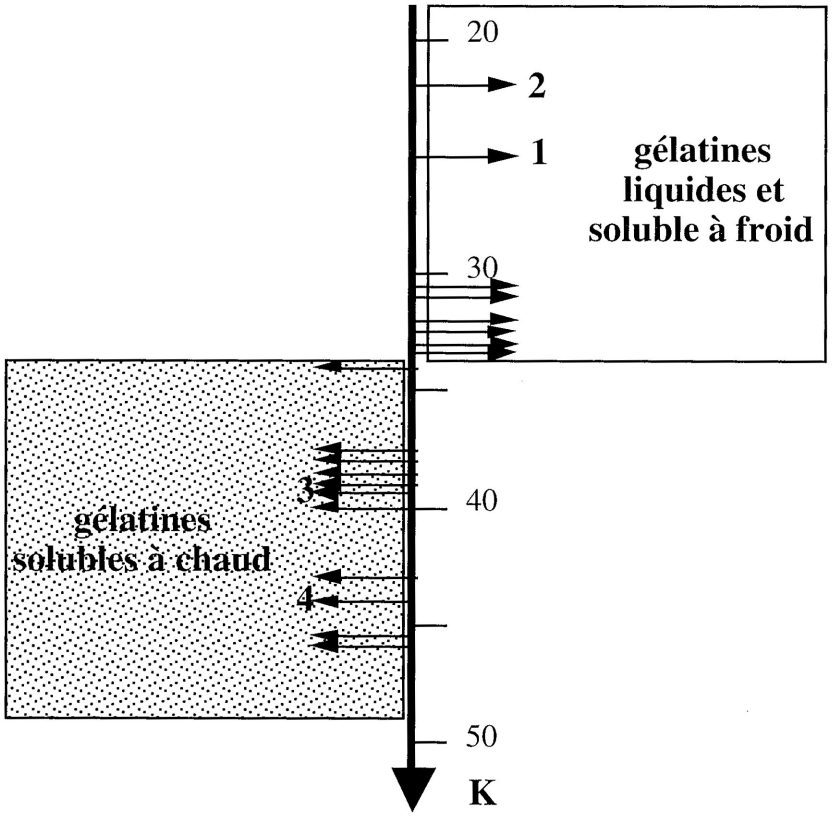


Fig. 1 — Caractérisation de différentes gélatines par le cœfficient C = [B]/[N]

recommandé par le codex œnologique. Elle devrait éliminer les facteurs de variabilité dus à la nature du tanin, à l'imprécision des méthodes visuelles d'évaluation du trouble et appliquerait certaines des méthodes mises au point dans cette étude.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AGNERAY J. et METAIS P., 1990. *Biochimie Clinique, 1-Biochimie analytique*, 2ième édition. Ed Simep.

BERGERET J., 1963. Action de la gélatine et de la bentonite sur la couleur et l'astringence de quelques vins. *Ann. Technol. Agric.*, **12**, 15.

BERGERET J., 1974. « Les gélatines ». Structures et propriétés œnologiques. *Rev. Fr. Œnol.*, **54**, 19.

CERF P., 1973. Contribution à l'étude de l'action des produits œnologiques à base de gélatine et de tanin. *Thèse de Docteur Ingénieur*, Institut de Biologie appliquée à la nutrition et à l'alimentation, Université de Dijon.

CODEX ŒNOLOGIQUE, 1971. *Journ. Officiel*, 7 Novembre 1971, 260, 11016-11040.

DOUMAS B.T., BAYSE D.D., CARTER R.J. , 1981. A candidate reference méthod for determination of total protein in serum. *Clin. Chem.*, **27**, 1642.

IKONOMOU M., 1985. Etude de la réaction entre les protéines et les tanins. Influence du collage sur le contenu phénolique et protéique des vins rouges. *DEA Œnologie et Ampélologie*, Université de Bordeaux II.

ROSEN H.,1957. A modified ninhydrin colorimetric analysis for aminoacids. *Arch. Biochem. Biophysics*, **67**, 10-15.

Manuscrit reçu le 18 septembre 1994
accepté pour publication le 17 novembre 1994