EVOLUTION DES ACIDES AMINES LIBRES DANS LE MOUT DE RAISIN SOUS L'ACTION DES LEVURES DE FLEUR

I. — ETUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES ACIDES AMINES LIBRES DES MOUTS DE RAISIN

M.C. POLO et C. LLAGUNO
Institut des Fermentations Industrielles
Conseil Supérieur de la Recherche Scientifique (C.S.I.C.)
Madrid (Espagne)

INTRODUCTION

La connaissance des composés azotés du moût de raisin, en particulier celle des acides aminés, présente un grand intérêt en raison de leur rôle nutritionnel vis-à-vis des levures qui effectuent la fermentation alcoolique ; ils sont également les précurseurs de certaines substances aromatiques ou qui interviennent dans le goût du vin.

La plus grande partie des travaux qui existent dans la bibliographie sur la teneur en acides aminés du raisin pendant l'évolution de la maturation ainsi que sur les teneurs des moûts et des vins de différents pays, ont été réalisés par chromatographie sur papier ou en utilisant des méthodes microbiologiques ou colorimétriques.

Certains de ces travaux portent sur les teneurs en acides aminés de divers cépages (LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD, 1961, GALLANDER et CAHAON, 1969, KLIEWER, 1969, etc.). Ils sont concordants quant au fait que les différences qui existent entre les cépages sont plus quantitatives que qualitatives. KLIEWER (1970) suggère qu'à partir de la comparaison des teneurs en acides aminés libres de divers cépages on peut déduire une relation génétique entre les groupes variétaux ; à l'appui de son hypothèse, il cite le cas de cépages Salvador où la concentration en α-alanine est très importante, de même que dans les cépages Niagara et Isabela ; il affirme que ces variétés présentent dans leur ascendance un **Vitis labrusca.**

OUGH (1968) a réalisé une étude sur la distribution de la proline dans les différentes parties de la grappe de quelques cépages de Californie. Il trouve que c'est dans le jus que la proline est en plus grande quantité quoiqu'il y ait dans la pellicule et les grains 50 p. 100 de l'azote total. La rafle par contre ne contient qu'une très faible quantité de proline.

D'après le même auteur (1969), un important pourcentage total des acides aminés contenus dans le vin s'y trouve sous forme de proline qui peut représenter 90 p. 100 de l'azote total. Il trouve dans le moût une teneur en proline variant entre 304 et 4.600 mg par litre avec une moyenne de 742 mg par litre pour 78 moûts analysés ; dans le vin, la teneur en proline oscille entre 0 et 3400 mg par litre avec, pour 42 vins, une moyenne de 869 mg par litre.

FEDUCHY et CARBALLO (1970) ont donné les teneurs en acides aminés libres des moûts de cépages Airén et Jaen. Ils identifient 21 acides aminés parmi lesquels la proline se trouve en quantité la plus élevée.

Dans la première partie de ce travail on étudie la teneur en acides aminés libres des moûts des cépages les plus utilisés en Espagne pour la vinification ainsi que celle de trois moûts d'hybrides producteurs directs. L'étude des hybrides permettra peut-être d'identifier les moûts de ce type de raisins et que la législation espagnole interdit.

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique.

Raisins mûrs provenant de la Station Expérimentale « El Encin » du Département d'Ampélographie et de Viticulture de l'Institut National de Recherches Agronomiques (Ministère de l'Agriculture).

Cépages blancs : Pardillo, Malvar, Jaen-41 B, Garnacha et Airén-41 B, récolte 1970 ; Airén-41 B, récolte 1971.

Cépages rouges : Tempranillo, Mazuela et Bobal, récolte 1970.

Hybrides producteurs directs : 3 Couderc, 1109 Grimaldi et 9090 Castel.

Microorganismes.

Saccharomyces cheresiensis, V-24 ; **Saccharomyces beticus,** 1652 ; **Saccharomyces montuliensis,** 1690 et **Saccharomyces rouxii,** 660, de la collection de l'Institut des Fermentations Industrielles.

TABLEAU I

Conditions d'analyse (Technicon Autoanalyser NCl) pour l'identification et le dosage des acides aminés

	Chromatogramme de 4 heures	Chromatogramme de 6 heures	Chromatogramme de 16 heures
Longueur de la colonne (cm)	75	75	140
Diamètre interne de la colonne (cm)	0,65	0,65	0,65
Hauteur de résine dans la colonne (cm)	65	65	130
Type de résine	Chromobeads Technicon C	Chromobeads Technicon C	Chromobeads Technicon A
Température de la colonne (°C)	60 ± 0,1	60 ± 0,1	60 ± 0,1
Eluants	Tampons citrate de sodium	Tampons citrate de sodium	Tampons citrate de sodium
Volume d'éluant	360	360	540
Débit d'élution (ml par min.)	1,4	0,8	0,55
Volume maximal d'échantillon (ml)	0.3	0,3	2
Concentration optimale d'azote total dans l'échantillon (mg)	0,8 pour les aminoacides libres 0,04 pour les aminoacides d'hydrolysats de protéines	0,8 pour les aminoacides libres 0,04 pour les aminoacides d'hydrolysats de protéines	0,8 pour les aminoacides libres 0,04 pour les aminoacides d'hydrolysats de protéines
pH de l'échantillon	$1 < pH < 2$	$1 < pH < 2$	$1 < pH < 2$
Pression à la partie supérieure de la résine (p. s. i.)	500 (34 bars)	300 (20,4 bars)	200 (13,6 bars)
Révélateur	Ninhydrine — Sulfate d'hydrazine	Ninhydrine — Sulfate d'hydrazine	Ninhydrine — Sulfate d'hydrazine
Gaz de fractionnement dans le mannifold	Azote	Azote	Azote
Température du bain d'huile (° C)	95 ± 0,1	95 ± 0,1	95 ± 0,1
Vitesse de défilement du papier d'enregistrement (cm par h.)	45,72	45,72	15,42
pH du tampon d'équilibrage de la résine	3,10	3,10	2,80
Composition de l'autograd Chambre 1	40 ml pH 2,75	38 ml à pH 2,75 + 2 ml de MeOH	53 ml à pH 2,80 + 7 ml de MeOH
Chambre 2	27 ml à pH 2,75 + 13 ml à pH 2,875	12 ml à pH 2,75 + 28 ml à pH 2,875	58 ml à pH 2,80 + 2 ml de MeOH
Chambre 3	40 ml pH 2,875	40 ml pH 2,875	60 ml pH 3,00
Chambre 4	40 ml pH 3,80	40 ml pH 3,80	»
Chambre 5	40 ml pH 3,80	»	56 ml à pH 3,80 + 4 ml à pH 6,10
Chambre 6	17 ml à pH 5,00 + 23 ml à pH 6,10	40 ml pH 6,10	60 ml pH 6,10
Chambre 7	40 ml pH 6,10	»	»
Chambre 8	20 ml à pH 6,10 + 20 ml à pH 11,68	»	»
Chambre 9	40 ml pH 11,68	»	»

Identification et dosage des acides aminés.

Chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions suivie du dosage colorimétrique de l'éluat. La chromatographie est réalisée à l'aide d'un autoanalyseur d'acides aminés « Technicon Autoanalyser N.C.I. ». Les conditions en sont précisées dans le Tableau I.

Pour l'élimination des protéines de l'échantillon avant introduction dans la colonne, on emploie la précipitation par l'acide trichloroacétique suivie d'une centrifugation à 20.000 g pendant 30 minutes.

Azote total

Détermination par la méthode semimicro de KJELDAHL. L'échantillon est évaporé à sec ; on le minéralise avec du sulfate de potassium et du sulfate de cuivre en milieu sulfurique en présence de mercure comme catalyseur. L'ammoniaque entraîné par la vapeur est recueilli dans 20 ml de H_2SO_4 0,05 N ; l'acide sulfurique en excès est ensuite titré par une solution de NaOH 0,05 N en présence d'indicateur de Shiro Tashiro.

Acidité totale.

Détermination sur 10 ml d'échantillon décarboniqué, à l'aide de la soude 0,1 N, avec le rouge phénol comme indicateur.

Sucres.

Méthode de BERTRAND (J. RIBEREAU-GAYON et E. PEYNAUD, 1962).

RESULTATS

La détermination des acides aminés libres dans les moûts de raisins blancs montre que la proline est toujours l'acide aminé que l'on trouve en plus grande quantité (tableau II) ; sa teneur varie entre 1910 µmoles par litre (220 mg par litre) dans le moût 1971 du cépage Airén et 8.700 µmoles par litre (1 000 mg par litre) dans le moût 1970 de ce cépage ; elle est suivie par l'arginine, l'acide glutamique et l'acide γ-aminobutyrique qui sont toujours les cinq acides aminés les plus abondants dans chacun des moûts blancs étudiés.

La cystine et la méthionine sont toujours présentes à l'état de traces (moins de 20 µmoles par litre, soit moins de 2 mg par litre) ; elles sont mêmes absentes dans certains moûts ; seul le moût de Malvar contient plus de 20 µmoles de méthionine par litre.

TABLEAU II

Teneur en acides aminés libres de quelques moûts de raisins blancs

ACIDES AMINES	VENDANGE 1970										VENDANGE 1971	
	Pardillo		**Malvar**		**Jaen-41 B**		**Garnacha**		**Airen-41 B**		**Airen-41 B**	
	µmoles par l	mg par l	µmoles par l	mg par l	µmoles par l	mg par l	µmoles par l	mg par l	µmoles par l	mg par l	µmoles par l	mg par l
Hydroxyproline	460	60	328	43	—	—	—	—	—	—	—	—
Ac. aspartique	445	59	350	47	540	72	186	25	490	65	214	29
Thréonine	266	32	597	71	320	38	202	24	264	31	161	19
Sérine	286	30	770	81	380	40	266	28	330	35	232	24
Ac. glutamique	320	53	770	127	940	155	975	161	990	163	765	126
Proline	2200	253	4320	496	7700	855	4150	477	8700	1000	1910	220
Glycine	20	2	124	9	—	—	95	7	470	35	240	18
Alanine	146	13	710	63	590	53	336	30	0	0	0	0
Valine	200	23	390	46	206	24	204	24	322	38	100	12
Cystine	Traces (1)	traces	traces	traces	0	0	0	0	—	—	traces	traces
Méthionine	»	»	0	0	0	0	0	0	28	4	»	»
Isoleucine	60	8	217	29	77	10	60	8	78	10	37	5
Leucine	82	11	460	60	132	17	99	13	194	26	50	7
Tyrosine	traces	traces	175	32	76	14	55	10	105	19	25	5
Phényl-alanine	89	15	377	62	160	27	59	10	120	20	107	18
Ac. γ-aminobutyrique	—	—	1300	134	525	54	1030	106	555	57	386	40
Tryptophane	420	86	282	58	—	—	65	13	910	186	—	—
Lysine	traces	traces	148	22	36	5	47	7	44	6	traces	traces
Histidine	51	8	45	7	177	28	183	28	280	44	»	»
Arginine	480	84	3700	644	2160	376	2360	410	2130	371	504	88

(1) traces : moins de 20 µmoles par l et de 2 mg par l.

TABLEAU III

Teneur en acides aminés libres de quelques moûts de raisins rouges.

ACIDES AMINES	Tempranillo		Mazuela		Bobal	
	µmoles par l	mg par l	µmoles par l	mg par l	µmoles par l	mg par l
Acide aspartique	243	32	69	9	64	9
Thréonine	400	48	227	27	476	57
Sérine	460	48	235	25	547	58
Acide glutamique	803	132	375	62	—	—
Proline	7750	890	11700	1350	—	—
Glycine	61	5	153	11	144	11
Alanine	557	50	455	41	547	49
Valine	235	28	304	35	258	30
Cystine	traces(1)	traces	—	—	traces	traces
Méthionine	»	»	—	—	»	»
Isoleucine	126	17	125	16	100	13
Leucine	177	23	117	15	151	20
Tyrosine	55	10	39	7	27	5
Phénylalanine	63	10	57	9	53	9
Acide γ-aminobutyrique	1300	134	375	39	1220	126
Tryptophane	1460	298	—	—	1540	314
Lysine	traces	traces	63	9	43	6
Histidine	210	33	172	27	140	22
Arginine	750	130	1125	196	1540	268

(1) traces : moins de 20 µmoles par l soit 2 mg par l.

TABLEAU IV

Teneur en acides aminés libres de quelques moûts d'hybrides producteurs directs

ACIDES AMINES	3 Couderc		1109 Grimaldi		9090 Castel	
	µmoles par l	mg par l	µmoles par l	mg par l	µmoles par l	mg par l
Hydroxyproline	34	437	2680	352	2730	358
Acdie aspartique	245	33	254	34	508	68
Thréonine	340	41	342	41	—	—
Sérine	550	58	580	61	715	75
Acide glutamique	1250	203	1620	267	1340	220
Proline	7050	810	6500	747	8800	944
Glycine	224	168	77	58	—	—
Alanine	1850	165	1370	122	1400	125
Valine	365	31	274	32	124	15
Cystine	—	—	traces(1)	traces	traces	traces
Méthionine	—	—	»	»	»	»
Isoleucine	132	17	124	16	»	»
Leucine	279	37	212	28	350	46
Tyrosine	134	24	77	14	96	17
Phénylalanine	126	21	129	21	70	12
Acide γ-aminobutyrique	1380	142	2180	225	1560	161
Tryptophane	forte teneur		—	—	56	11
Lysine	traces	traces	0	0	67	10
Histidine	322	50	0	0	434	67
Arginine	765	133	254	44	1320	230

(1) traces : moins de 20 µmoles par l soit 2 mg par l.

Dans la plupart des moûts analysés, les acides aminés libres présents en plus faible quantité sont l'isoleucine, la leucine, la phénylalanine et la lysine (exceptions faites de la cystine et de la méthionine déjà mentionnées).

Les moûts du cépage Airén-41 B, ceux de 1970 comme de 1971, ne contiennent pas d'alanine sous forme libre.

Les acides aminés libres de ces moûts représentent 40 à 60 p. 100 de l'azote total, la proline sous forme libre représentant 10 à 23 p. 100 et l'arginine 9 à 33 p. 100.

Dans les moûts de raisins rouges analysés, les acides aminés libres présents en plus faibles quantités sont la tyrosine, la phénylalanine et la lysine, en plus de la cystine et de la méthionine présents seulement sous forme de traces (moins de 20 µmoles par litre soit 2 mg par litre) comme on l'a observé également dans les moûts de raisins blancs. La proline est dans ces moûts l'acide aminé le plus abondant (tableau III), suivie de l'arginine, de l'acide γ-aminobutyrique, du tryptophane et de l'acide glutamique.

La proline sous forme libre représente environ 25 p. 100 de l'azote total des moûts de raisins rouges, l'arginine 10 p. 100 et le tryptophane 13 p. 100.

Les résultats du tableau IV rassemblant les teneurs en acides aminés libres dans les moûts d'hybrides producteurs directs, montrent de fortes teneurs en hydroxyproline, en proline, en alanine et en acide γ-aminobutyrique ; l'un des moûts analysés ne contient ni lysine, ni histidine. La cystine et la méthionine sont présentes sous forme de traces (moins de 20 µmoles par litre, soit 2 mg par litre).

La teneur en acides aminés libres est très élevée et représente 59 à 74 p. 100 de l'azote total des moûts respectifs.

Les teneurs en sucre des moûts analysés varient de 192 à 313 mg par litre (exprimés en glucose) ; les valeurs les plus élevées correspondent aux moûts de raisins blancs (385 mg par litre en moyenne) — (tableau V).

Les valeurs des acidités totales oscillent entre 2,6 et 6 g par litre (exprimées en acide tartrique). Les moûts de raisins blancs sont les plus

acides (4,65 g par litre en moyenne) ; ceux de raisins rouges sont les moins acides (3 g par litre en moyenne pour les moûts analysés) (tableau V).

TABLEAU V

Teneurs en sucre, azote total et acidité totale de quelques moûts.

	SUCRES (mg de glucose par l)	AZOTE TOTAL (mg par l)	ACIDITE TOTALE (g acide tartrique par l)
Moûts blancs :			
Pardillo	205	280	3,3
Malvar	286	609	3,5
Jaén-41 B	237	280	5,7
Garnacha	231	407	5,0
Airén-41 B. Vendange 1970	266	539	6,0
Airén-41 B. Vendange 1971	192	196	4,4
Moûts rouges :			
Tempranillo	245	308	2,6
Mazuela	221	665	3,3
Bobal	219	317	3,0
Moûts d'hybrides producteurs directs :			
3 Couderc	234	507	2,8
1.109 Grimaldi	228	414	4,6
9.090 Castel	213	463	3,2

CONCLUSIONS

Les teneurs en acides aminés libres des moûts des divers cépages analysés présentent des différences quantitatives mais non qualitatives. Il faut cependant excepter les deux moûts du cépage Airén (récoltes 1970 et 1971) qui ne contiennent pas d'alanine libre et le 1109 Grimaldi qui ne contient ni lysine ni histidine.

La proline et l'acide γ-aminobutytique sont, dans les moûts, les acides aminés les plus abondants.

L'arginine et l'acide glutamique sont parmi les plus abondants dans les moûts de raisins blancs et rouges.

Dans les moûts de raisins rouges, le tryptophane est l'aminoacide présent en plus grande quantité.

L'hydroxyproline et l'alanine appartiennent au groupe des aminoacides majoritaires dans les moûts d'hybrides producteurs directs.

La cystine, la méthionine et la phénylalanine sont présents en plus faible proportion dans les moûts ; la tyrosine, la lysine et l'isoleucine le sont dans les moûts de raisins blancs et la tyrosine, la lysine et le glycocolle dans ceux des hybrides producteurs directs.

Manuscrit reçu le 22 février 1974.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

FEDUCHY E. et CARBALLO J., 1970. **Boletin del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, 30,** 62, 68.

GALLANDER J.F. et CAHOON, G.A., 1969. « Free amino acids in must of earsten grape varieties ». **Amer. J. Enol. Vit. 20,** 3, 140.

KLIWER W.M., 1969. « Free amino acids and other nitrogenous substances of table grape varieties ». **J. Food Science, 34,** 3, 274.

KLIWER W.M., 1970. « Free amino acids and other nitrogenous fractions in wine grapes ». **J. Food Science, 35,** 1, 17.

LAFON-LAFOURCADE S. et PEYNAUD E., 1961. « Composition azotée des vins en fonction des conditions de vinification ». **Ann. Techn. Agric. 10,** 2, 143.

OUGH C.S., 1968. « Proline content of grapes and wines ». **Vitis, 7,** 321.

OUGH C.S., 1969. « Ammonia content of California grapes ». **Am. J. of Enol. and Vit. 20,** 3, 213.

RIBEREAU-GAYON J. et PEYNAUD E., 1962. **Analysis de vinos,** Aguilar éd., Madrid.