

## Nouvelles approches analytiques de l'évolution de la stabilité protéique des vins

ROLAND Clémentine, croland@labexcell.com

NICOLATO Tommaso, tnicolato@labexcell.com

RENOUF Vincent, vrenouf@labexcell.com

Dans les vins blancs et rosés, la casse protéique (figure 1) est un phénomène associé à une modification de la structure tridimensionnelle irréversible des protéines lors du chauffage du vin qui va rendre ces protéines insolubles lorsque le vin sera refroidi. Ces dernières forment alors un précipité aisément observable à l'œil nu et caractérisable au microscope. Lors d'un audit analytique de vins prélevés en linéaires en grande distribution un travail réalisé au laboratoire SARCO (devenu laboratoire EXCELL) il y a quelques années avait montré que 17% des vins étaient potentiellement instables d'un point de vue protéique (34% des vins blancs analysés et 2% des vins rosés).

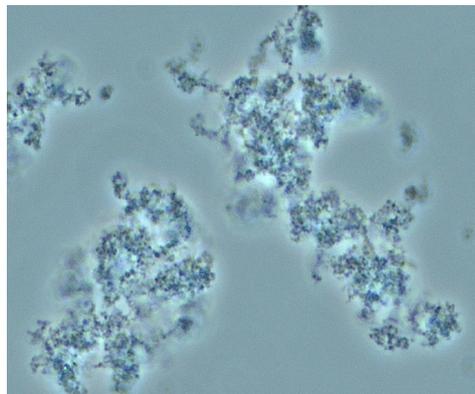


Figure 1 : Observation d'un précipité protéique au microscope ( $\times 400$ ) (Source Laboratoire EXCELL).

Ces dernières années plusieurs phénomènes ont certainement concouru à accroître la problématique. Parmi ces phénomènes ou ces hypothèses de phénomènes, notons :

- les interactions avec d'autres traitements de stabilisation comme l'usage de gomme de cellulose ou de polyaspartate à des fins de stabilisation tartrique qui, très certainement, interagissent avec des protéines résiduelles qui n'auraient pas présenté d'instabilité thermique si elles n'avaient pas été mises en contact avec ces produits. Cela nécessite donc un travail d'anticipation et parfois des efforts de stabilisation supplémentaires (doses de bentonites supérieures),
- les teneurs initiales et intrinsèques en protéines des raisins notamment du fait de stress hydrique et cryptogamiques car il est bien établi que de nombreuses voies de résistance aux stress font intervenir des agents protéiques (Jones et Dangl 2006, Boller et Felix 2009, Cardot 2017) dans le végétal et dans les baies en particulier,
- des protocoles de mises au propre et de stabilisation de plus en plus précoces qui réduisent les voies de stabilité acquises progressivement lors d'itinéraires plus classiques (élevage sur lies, froid « naturel » favorisant la sédimentation, gestion des phases d'exposition du vin à l'air favorisant la réactivité de certains constituants ...)
- les évolutions de certains paramètres physico-chimiques des vins, comme le pH (plus le pH est élevé moins les protéines sont chargées et moins les traitements de stabilisation à la bentonite sont efficaces), les teneurs en cuivre (le cuivre interagit avec les groupes SH des acides aminés soufrés présents dans les protéines ce qui concourt également à réduire les phénomènes de précipitation) ...

Dans ce contexte global, rester figé derrière le traditionnel test à la chaleur en guise de seule voie analytique pour guider nos partenaires vers les propositions techniques les plus adaptées nous semblait relativement restrictif. Nous avons donc lancé en 2020 un gros travail d'études de nouvelles approches analytiques visant à doser exhaustivement la quantité totale de protéines présentes dans les raisins, les moûts et les vins (ce qui jusqu'à présent n'était finalement jamais fait) et caractériser les profils protéiques afin d'évaluer plus finement les risques d'instabilités dans toutes les situations possibles.

Cet article détaille ce travail et propose différentes approches analytiques selon les objectifs techniques et les pratiques œnologiques. La première partie est consacrée à la validation d'une méthode de dosages des protéines, la seconde à la mise au point de la méthode caractérisation des profils protéiques des vins et enfin la troisième partie de cet écrit évoque des cas concrets d'usage de ces différentes approches analytiques. Ces possibilités analytiques sont mises en place au laboratoire depuis plusieurs mois. Elles apportent déjà des modes de gestions préventifs particulièrement intéressants (notamment dans le cadre d'actions anticipant les traitements de stabilisation tartrique à suivre).

## 1- Dosage des protéines

Pour doser les protéines totales dans le vin, plusieurs approches ont été envisagées : la méthode KDS/Smith (D. Gazzola, 2014) et la méthode Bradford. La méthode KDS/Smith est basée sur le dosage de complexes protéiques par réduction de l'acide bicinchoninique tandis que la méthode Bradford est basée sur le changement de couleur du bleu de Coomassie après liaison avec certains acides aminés présents dans les protéines. Après de nombreux essais basés notamment sur des ajouts dosés de protéines de référence sur différents vins, la méthode Bradford a été retenue. La méthode a ici été adaptée à partir de la thèse de P. Lui (2018).

Des essais ont été réalisés pour définir une gamme d'étalonnage. Dans un premier temps, une gamme à partir de la protéine BSA (protéine extraite du sérum de bovin) a été réalisée (figure 2) mais la protéine BSA n'étant pas une protéine présente dans le vin, une seconde gamme a été réalisée à partir de la protéine thaumatine (figure 3). Un dosage plus précis allant de 1mg/L à 20mg/L a pu être réalisé avec cette dernière.

DO (nm)	Gamme BSA (mg/L)	Concentration en BSA (mg/L)
0,133	5	4,04
0,231	10	10,40
0,318	15	15,40
0,383	20	20,27

Figure 2 : Gamme d'étalonnage réalisée à partir de la protéine BSA

DO (nm)	Gamme thaumatine (mg/L)	Concentration en thaumatine (mg/L)
0,02	1	0,25
0,085	5	5,25
0,159	10	10,94
0,217	15	15,4
0,268	20	19,32

Figure 3 : Gamme d'étalonnage réalisée à partir de la protéine thaumatine

Se rapprochant plus de la réalité de nos échantillons, la gamme réalisée à partir de la protéine thaumatine a été validée. Dans les deux cas, on a pu observer une saturation du signal à partir de 20 mg/L de thaumatine (ou BSA).

Des essais sur les vins ont été réalisés par la suite (figure 4). On a pu observer que pour des échantillons considérés instables, la concentration en protéines totales varie de 11 mg/L à 17 mg/L Eq thaumatine. Les densités optiques étant dans la gamme, il n'a pas été nécessaire de diluer les échantillons au préalable.

Echantillons	$\Delta DO$ 395nm	Concentration en BSA (mg/L)
1	0,237	16,9
2	0,163	11,2
3	0,197	13,9
4	0,201	14,2
5	0,222	15,8
6	0,22	15,6
7	0,229	16,3
8	0,234	16,7
9	0,232	16,6

Figure 4 : Tableau récapitulatif de quelques dosages des protéines dans les vins pris au laboratoire

Les résultats obtenus avec le dosage par la méthode Bradford et les différents tests à chaud réalisés au laboratoire ces derniers mois ont permis d'évaluer une teneur « critique » de 10 mg/L Eq thaumatine. Cette teneur de 10 mg/L Eq thaumatine est donc considérée comme un seuil d'acceptabilité lors de l'évaluation de la stabilité protéique à venir. Par exemple si un vin blanc est naturellement stable au test à la chaleur mais qu'il contient une concentration en protéines à ce niveau de concentration (ce qui signifie que des protéines intrinsèquement thermostables sont tout de même présentes à une concentration significative), nous recommanderons tout de même un effort d'abaissement de cette teneur en protéines en vue d'un éventuel traitement à la CMC pour la stabilisation tartrique.

## 2- Profils protéiques

Une fois la quantification des protéines totales possible par le test évoqué ci-dessus, nous avons développé une voie analytique fournissant une description du type de protéines présents. Pour cela nous avons testé et comparé différents types de systèmes électrophorétiques. Notre choix s'est alors porté sur le système BioanalyZer® proposé par la société Agilent. La figure 5 illustre les potentialités de finesse de ce système analytique sur une gamme a été réalisée avec la protéine thaumatine.

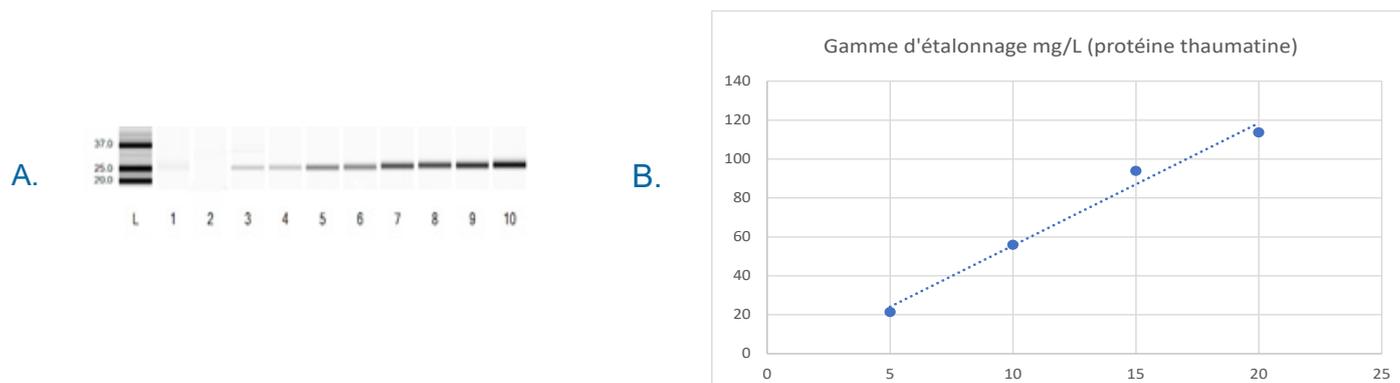


Figure 5 A : gel électrophorèse des points de gammes de 5mg/L à 20mg/L de thaumatine.  
5 B : courbe d'étalonnage représentative.

Après différentes étapes de préparations, des profils protéiques semblables à celui de la figure 6 peuvent ainsi être établis pour caractériser les protéines présentes en fonction de leur poids moléculaires. La littérature, relativement bien détaillée, permet alors d'identifier ces protéines (Sluyter, 2015). Dans l'immense majorité des vins, les protéines majoritairement retrouvées dans les échantillons sont des chitinases et des glucanases. La figure 6 illustre le profil d'un vin instable à la chaleur. Le nombre de bandes et l'intensité de ces dernières servent à surévaluer les résultats du test de stabilité à la chaleur et proposer une dose de bentonite efficace.

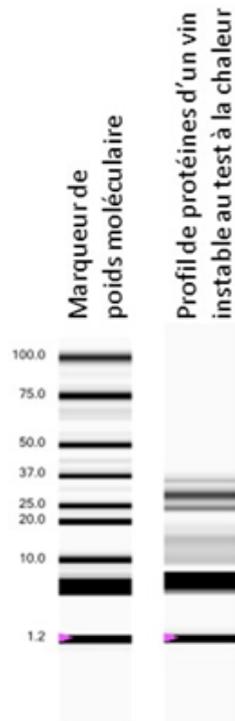


Figure 6 : Illustration d'un profil protéique d'un vin instable au test à la chaleur obtenu avec le système d'électrophorèse capillaire disponible au laboratoire EXCELL.

## Conclusions et propositions analytiques

Afin de déterminer la dose de bentonite nécessaire à la stabilisation protéique d'un vin blanc ou rosé, le test à la chaleur reste, selon nous, la référence à condition de bien respecter certains éléments essentiels (préparation de l'échantillon, temps et température appliqués, refroidissement de l'échantillon, contrôle de la dose de bentonite déterminée par le premier test...). Nous testons et confrontons fréquemment ce test aux autres voies alternatives possibles mais nous restons figés sur cette position. Néanmoins compte-tenu de la sensibilité croissante de la problématique au regard des évolutions évoquées dans l'introduction de cet article, nous avons cherché à associer à ce test des éléments permettant de mieux anticiper les processus de stabilisation dans leur globalité. Pour cela nous avons développé deux éléments analytiques : le dosage des protéines totales et la caractérisation du profil protéique du vin. Dans le cahier des charges de ces développements, nous avons fixé comme objectifs que ces analyses devront être rapides, peu onéreuses et facilement interprétables par rapport à des référentiels bien établis (équivalence en protéines de référence par exemple...). La quantification des protéines totales nous paraît un point essentiel. A un instant t donné, dans un vin toutes les protéines ne sont pas thermo-instables or le traitement à la bentonite déterminé par le test à la chaleur n'éliminera que ces dernières. Donc, si initialement, la teneur en protéines est élevée, un risque est à anticiper si d'autres opérations peuvent venir interagir avec les protéines résiduelles.

Le profil protéique permet de caractériser les protéines présentes. Cette analyse peut notamment intervenir dans le cas de difficultés récurrentes à la stabilisation protéique d'un lot ou d'un vin afin de connaître les protéines qui en sont responsables. Le test peut aussi être fait à plusieurs étapes de l'élaboration du vin afin de préciser l'interaction de telle ou telle technique sur le contenu protéique. Ce test pourrait aussi prochainement devenir un élément clef pour objectiver les traitements à base de protéases qui sont en cours de validation auprès de l'OIV (RÉSOLUTION OIV-OENO 541B-2021 et 625-2021) pour être une option nouvelle dans ces processus de stabilisation en comparant les profils obtenus avant et après traitement.

A partir de ces développements, au laboratoire EXCELL nous proposons donc désormais 3 formules analytiques possibles pour l'analyse de la stabilité protéique des vins blancs et rosés (chaque analyse pouvant bien sûr être réalisée seule)

- Le pack StabProt S : test à la chaleur de détermination de la dose de bentonite et contrôle de l'efficacité de cette dose
- Le pack StabProt M : test à la chaleur de détermination de la dose de bentonite + dosage des protéines totales et contrôle de l'efficacité de la dose déterminée par le test à la chaleur et de cette dose majorée en cas de quantification importante de protéines totales (> 10 mg/L en eq. Thaumatine)
- Le pack StabProt L : test à la chaleur de détermination de la dose de bentonite + dosage des protéines totales et contrôle de l'efficacité de la dose déterminée par le test à la chaleur et de cette dose majorée en cas de quantification importante de protéines totales (> 10 mg/L en eq. Thaumatine) + profils protéiques avant et après traitements à la bentonite.

Ces 3 formules sont déclinées en deux versions, la version classique précédemment évoquée réalisée sur l'échantillon de vin tel que nous le recevons au laboratoire et une version pour laquelle les tests sont réalisés sur le vin tel quel et sur le vin additionné du traitement de stabilisation tartrique qui serait susceptibles d'être utilisé par la suite (CMC, polyaspartate) afin d'anticiper également l'éventuelle interaction de ces traitements avec la stabilité protéique qui aurait été acquise et d'éviter d'avoir à retraiter une nouvelle fois à la bentonite (et tous les désagréments liés à ce genre de situation : nouvelle filtration, perte de temps, de vin, prise d'oxygène...).

	Pack StabProt S	Pack StabProt M	Pack StabProt L
Test à la chaleur	X	X	X
Dosage des protéines totales		X	X
Profil électrophorétique des protéines			X
Sur demande	Avec ou sans ajout de CMC ou de polyaspartate	Avec ou sans ajout de CMC ou de polyaspartate	Avec ou sans ajout de CMC ou de polyaspartate