OENOFRANCE

Instabilité protéique

Le 20 avril 2017

Philippe POINSAUT
RESPONSABLE APPLICATIONS

SOFRALAB

OENOFRANCE

Instabilité protéique

- Introduction
- Comparaison des Tests de stabilité Protéique
- Les bentonites
- Interaction CMC/protéines

SOFRALAB

OENOFRANCE

Introduction sur l'Instabilité Protéique

➢ Présence de Protéines dans les vins blancs et rosés

Dans les grains de raisins :

- Les Protéines servent pour le stockage des sucres, pour la défense de la baie de raisin, etc.

- La quantité et la qualité de ces Protéines de raisin est variable (cépage, année, terroir, etc.)

OENOFRANCE

Introduction sur l'Instabilité Protéique

➢ Présence de Protéines dans les vins blancs et rosés

Dans les moûts :

- Les Protéines du grain de raisin sont partiellement extraites par le pressurage

- La quantité et la qualité de ces Protéines de raisin est variable (cépage, année, terroir, etc.)

- La présence de ces Protéines dans les moûts est favorisé par certaines techniques vinicoles (Vendanges mécaniques et long transport de la récolte, macération pelliculaire, etc.)

- Les Protéines sont partiellement éliminées ou dégradées par la Fermentation Alcoolique

OENOFRANCE

Introduction sur l'Instabilité Protéique

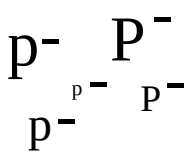
➢ Présence de Protéines dans les vins blancs et rosés

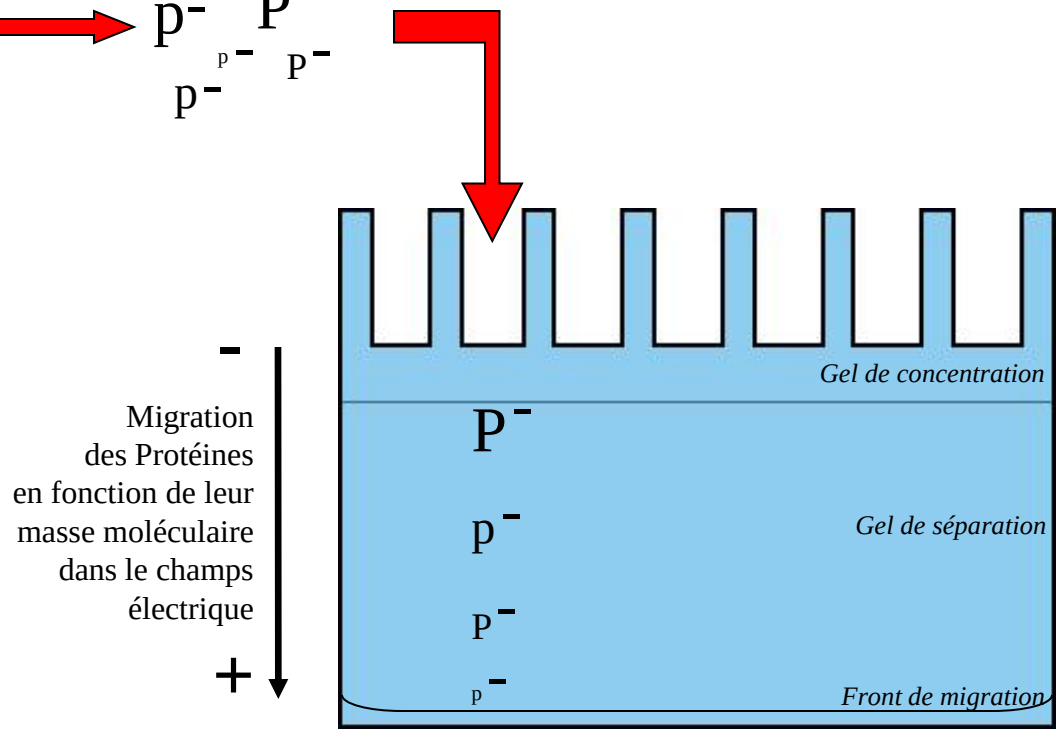
- *Dans les vins :*
  - La quantité maximale des Protéines d'origine levurienne ou bactérienne ne dépasse pas 5mg/L
  - La quantité maximale des Protéines provenant du raisin est d'environ 500mg/L
  - Dans les vins, il peut y avoir des protéines provenant des traitements œnologiques (lysozyme)

SOFRALAB

Technique: Électrophorèse en gel SDS PAGE & coloration

Protéines chargées négativement

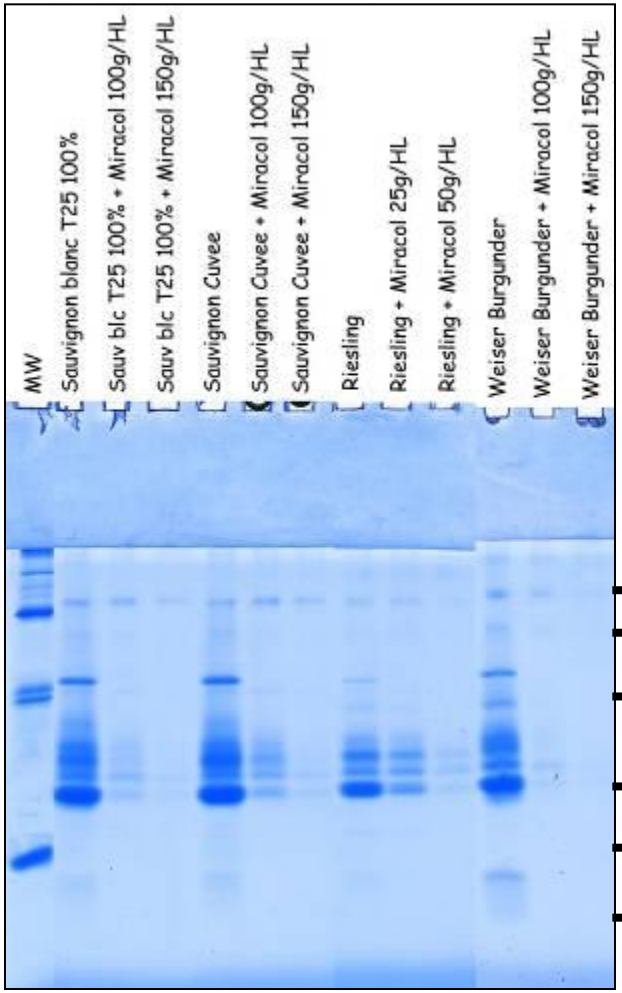




Western blot ou Coloration spécifique des protéines

- Les Protéines ont toutes la même charge.
- Les Protéines migrent dans le gel en fonction de leurs tailles.

Protéines des vins blancs et rosés séparées par Électrophorèse SDS-PAGE



Chitinase

Thaumatin-Like

PM (Kda)

97

66

45

30

20,1

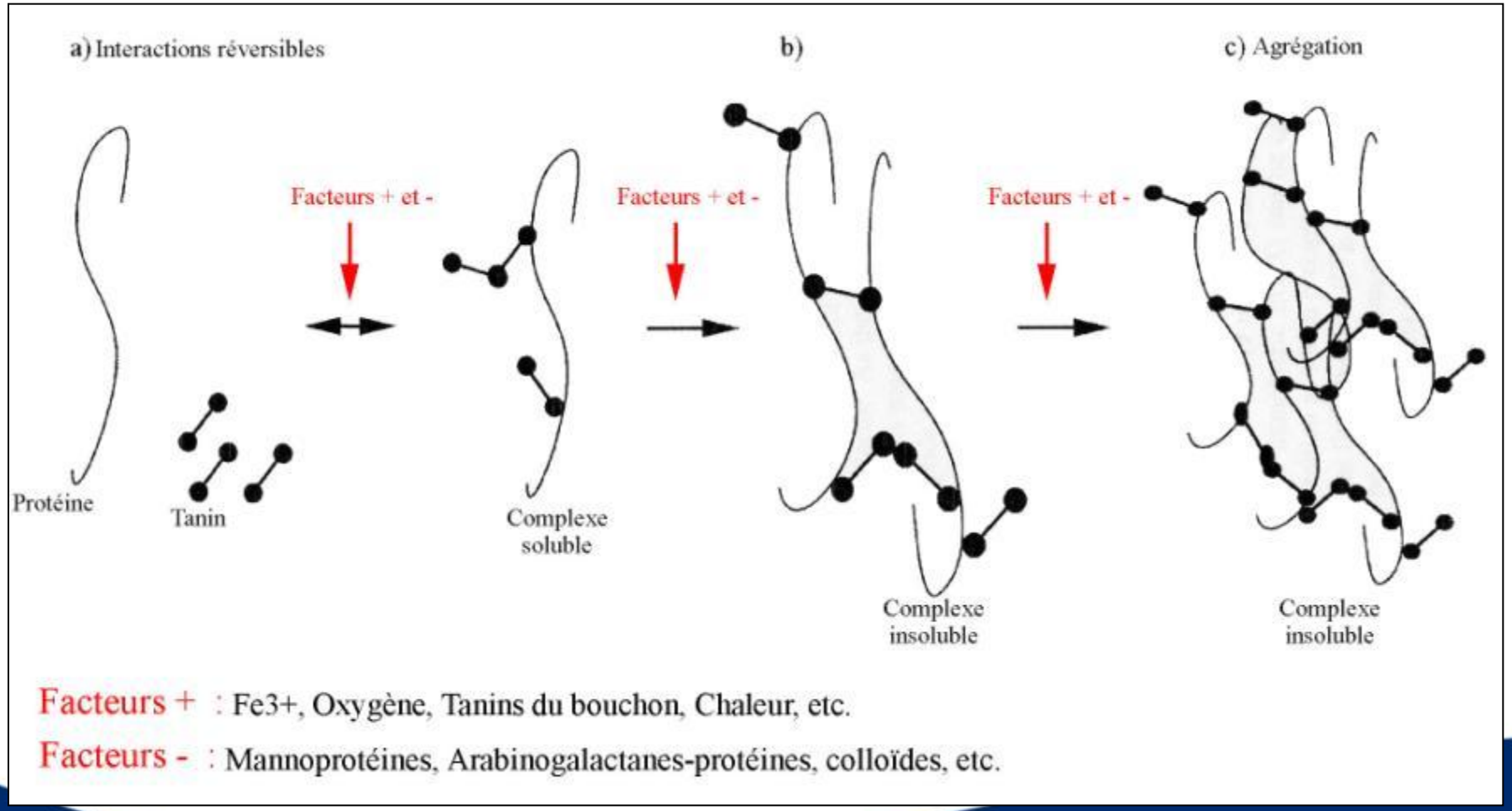
14,4

Quantification des protéines - Densitomètre TotalLab

vin	protéines	Concentration mg/L
Sauvignon blanc 1	Chitinase	73
	Taumatine	259
Sauvignon blanc 2	Chitinase	41
	Taumatine	236
Weiser Burgunder	Chitinase	25
	Taumatine	255

OENOFRANCE

Mécanisme de la Précipitation Protéique



d'après Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998 et Charlton *et al.*, 2002

OENOFRANCE

Mécanisme de la Précipitation Protéique

- La précipitation des Protéines est favorisée par :

  - La température de stockage des bouteilles

Précipitation de protéines d'un vin blanc en fonction de la température

20° C | 40° C | 80° C

20° C | 4° C

SOFRALAB

OENOFRANCE

Mécanisme de la Précipitation Protéique

- La précipitation des Protéines est favorisée par :

  - Les relarguages de tanins de certains bouchons

Précipitation de protéines d'un vin blanc en présence d'un mauvais bouchon

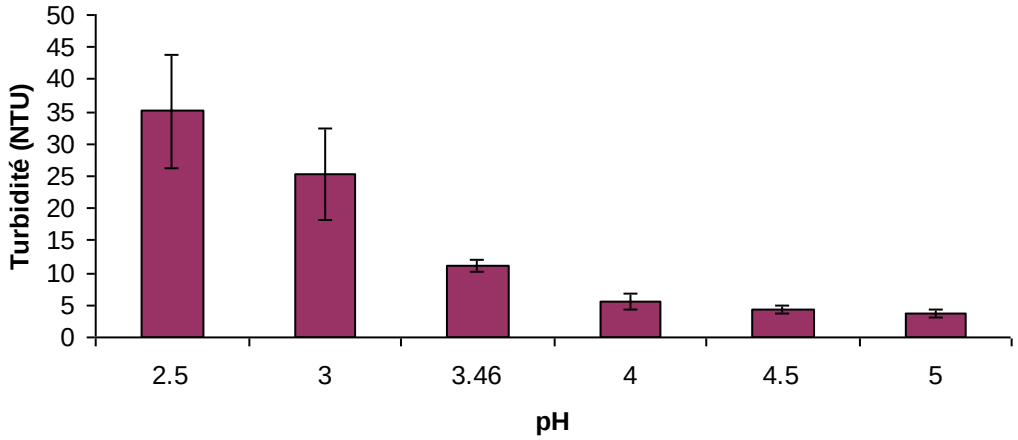
Tanins relargués par le bouchon

SOFRALAB

Mécanisme de la Précipitation Protéique

- La précipitation des Protéines est fonction du :

  - pH des vins



Mécanisme de la Précipitation Protéique

- La précipitation des Protéines est favorisée par :

↳ La quantité et la qualité des Protéines (et des Tanins) présentes dans les vins

↳ La température de stockage des bouteilles

↳ Les relarguages de tanins de certains bouchons

↳ pH des vins

↳ La présence de Fer, Cuivre & SO_4^{2-} (?) dans les vins

↳ L'oxygénation et/ou oxydation des vins

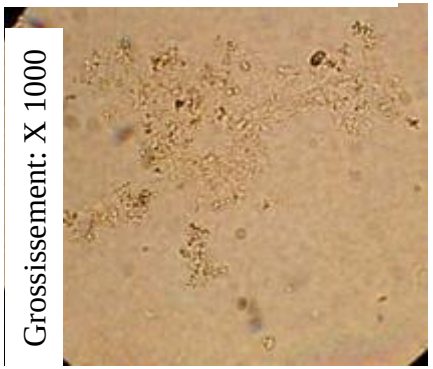
↳ Les traitements œnologiques comme l'ajout de lysozyme <u>sans stabilisation</u>

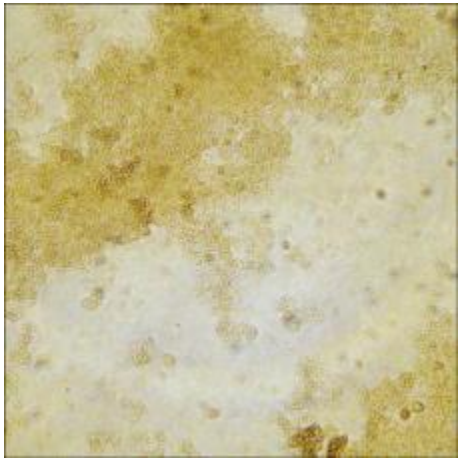
Observation microscopique d'une casse protéique

- Se produit le plus souvent en bouteille

(Il n'y a pas modification des arômes du vin)

Précipité protéique





↳ Défaut visuel ⇨ le vin est rejeté par les consommateurs

OENOFRANCE

Instabilité protéique

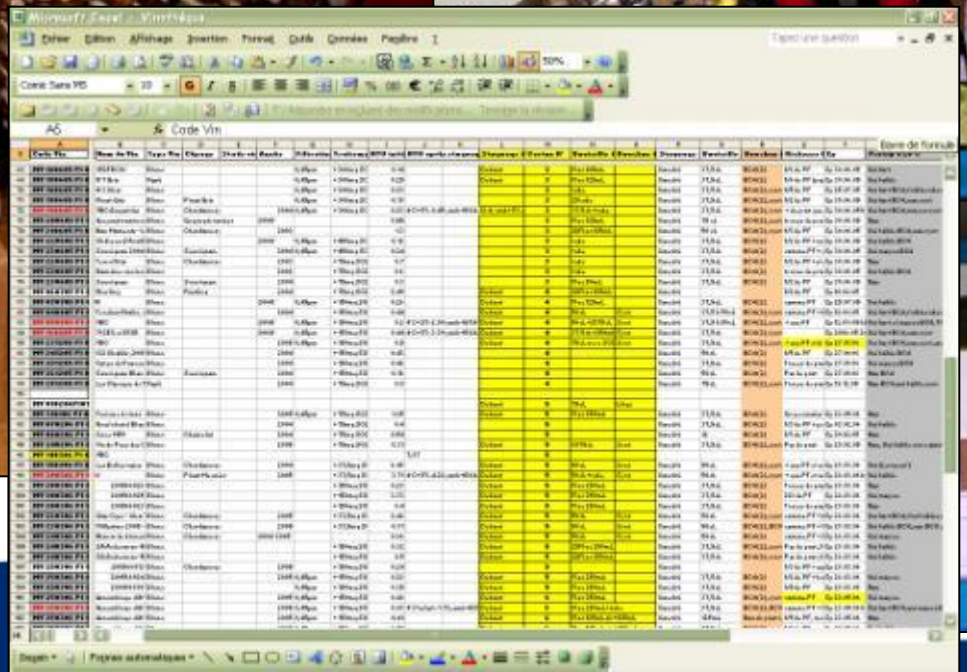
- Introduction
- Comparaison des Tests de stabilité Protéique
- Développement d'un nouveau test : l'Immunotest π

SOFRALAB

OENOFRANCE

Comparaison des Tests de stabilité Protéique

-**1er temps:** une vinothèque contenant plus de 150 vins (12 cépages, de 6 pays), stockés dans différentes conditions (17-25° C et 4° C), bouchés de différentes façons (bouchon liège de différentes qualités, bouchon synthétique).



Il existe de nombreux tests et protocoles différents pour estimer la stabilité protéique d'un vin :

Sur vin limpide, centrifugé ou filtré:

1- Test chaleur:

-35° C pendant 1mois (Pocock *et al.*, 2006)
-Fluctuation entre 35° C et 20° C pendant 8j (Pocock *et al.*, 2006)
-60° C pendant 24H (Toland *et al.*, 1996)
-80° C pendant 5min (Dubourdieu *et al.*, 1988)
-80° C pendant 2H (Pocock *et al.*, 2006)
-80° C pendant 6H + 4° C pendant 12H (Dawes *et al.*, 1994)
-80° C pendant 6H (Pocock *et al.*, 2006)

Récemment, Pocock et col. (2006) ont dénombré pas moins de 17 tests de détermination de la stabilité protéique des vins différents, dont 14 basés sur le chauffage du vin.

–Ajout de Tanin de noix de galle à 500mg/L (Dubourdieu *et al.*, 1988)
–Ajout de 2.5% (v/v) de Tanin de noix de galle à 100g/L + 80° C pendant 30min (SOFRALAB)

3- Bentotest (ac phosphomolybdique):

–Ajout de 1/10e du vol du vin (Dubourdieu *et al.*, 1988)

4-
–Aj urdieu *et al.*, 1988

5-
–Aj

6-
–Aj

7- Prostab:
–Ajout de 1/10e du vol du vin en réactifs 1&2 (Laboratoire Gresser)

Evaluation:
-Turbidité (NTU)
-DO 600nm
-DO 650nm
-Hauteur du trouble après 6H de réaction
-Observation visuelle
-Ou autre…

OENOFRANCE

Comparaison des Tests de stabilité Protéique

<u>2e temps:</u> Comparaison des tests de stabilités protéiques utilisés en Œnologie sur plus de 60 vins.

-Test à la chaleur
(30 min + 1 à 2 H de refroidissement)

-Test à la chaleur avec tanins
(30 min + 1 à 2 H de refroidissement)

-Test TriChloroacétique Acide
(3 min + 1 à 2 H de refroidissement)

-Bentotest (7 min)

-Prostab (en lecture directe) (12 min)

-Électrophorèse SDS-PAGE (+ coloration)
(6 H)

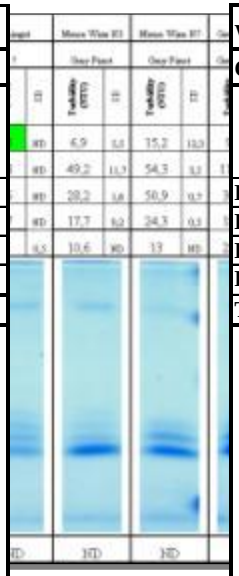
-Stabilité en bouteille
(plusieurs mois)

OENOFRANCE

Comparaison des Tests de stabilité Protéique

Faux Négatif !

Wine	Muscadet		Bourgogne Aligoté		Pinot Gris	
Cepage	Melon Bourgogne		Aligoté		Grey Pinot	
	Turbidity (NTU)	SD	Turbidity (NTU)	SD	Turbidity (NTU)	SD
Heat	0.3	0.1	2.1	0.4	1.7	0.2
Heat + Tannin	0.9	0.1	36.6	1.1	169	3
Bentotest	0.1	0.3	15.3	0.5	52.3	0.8
Prostab	0.2	0.1	8.3	0.2	28.9	0.3
TCA	0	0.1	4.9	0.2	45.5	ND
SDS-PAGE						
Visual Instability in bottle	-		+		+++	

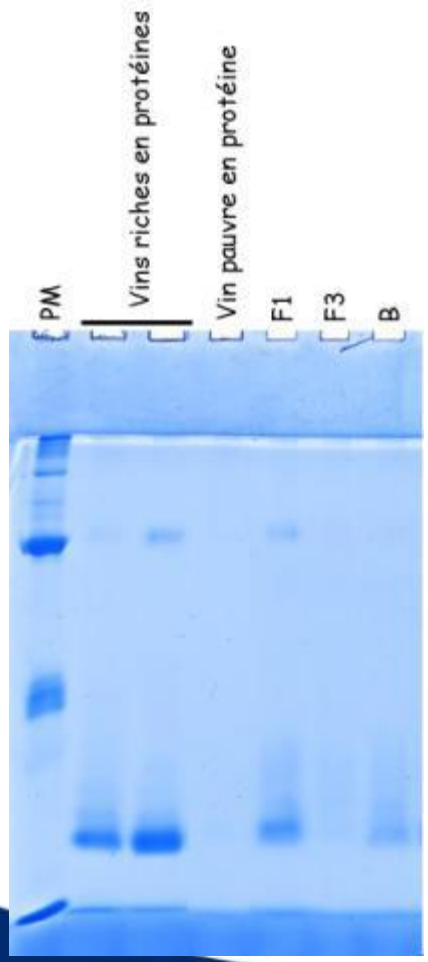


Faux Positif !

Wine	Muscadet		Jacob's Creek		Vino		Pouilly Fuissé		CBWine 2	
Cepage	Melon Bourgogne		Chardonnay		?		Chardonnay		Pinot Noir/Chard	
	Turbidity (NTU)	SD	Turbidity (NTU)	SD	Turbidity (NTU)	SD	Turbidity (NTU)	SD	Turbidity (NTU)	SD
Heat	0.3	0.1	0	0.1	0.3	0.1	10.2	3	10.7	3.9
Heat + Tan	0.9	0.1	0.3	0.1	1.3	0.1	278.4	7.1	210.9	40.8
Bentotest	0.1	0.3	147	7	148	6.6	93.8	1.8	133.6	2.8
Prostab	0.2	0.1	0.1	0	0.8	0	42.2	0	67.7	0
TCA	0	0.1	0.4	0.1	0.1	ND	58.4	0.5	83.7	0.4
SDS-PAGE										
Visual Instability in bottle	-		-		-		+++		++	

Les tests habituels ⇨ Faux négatifs & Faux positifs

Retour labo d'analyse: Exemple de vins instables



↳ Problématique: Stables avec un test à la Chaleur

	Concentration en protéines (mg/L)	Concentration en Performa (g/hL)
Vin riche en protéine	185	50.0
Vin pauvre en protéine	8	2
F1	135	37
F3	30	8
B	80	21

↳ Test Chaleur ⇨ Faux négatifs

OENOFRANCE

Comparaison des Tests de stabilité Protéique

	Reproductibilité	Sensibilité	Fiabilité
Test Chaleur	+	+	-
Test Chaleur + Tanin	+	+++	+++
Bentotest	+++	+++	-
TCA	+++	++	+++
Prostab	+++	++	++
Electrophorèse	+++	+++	+++

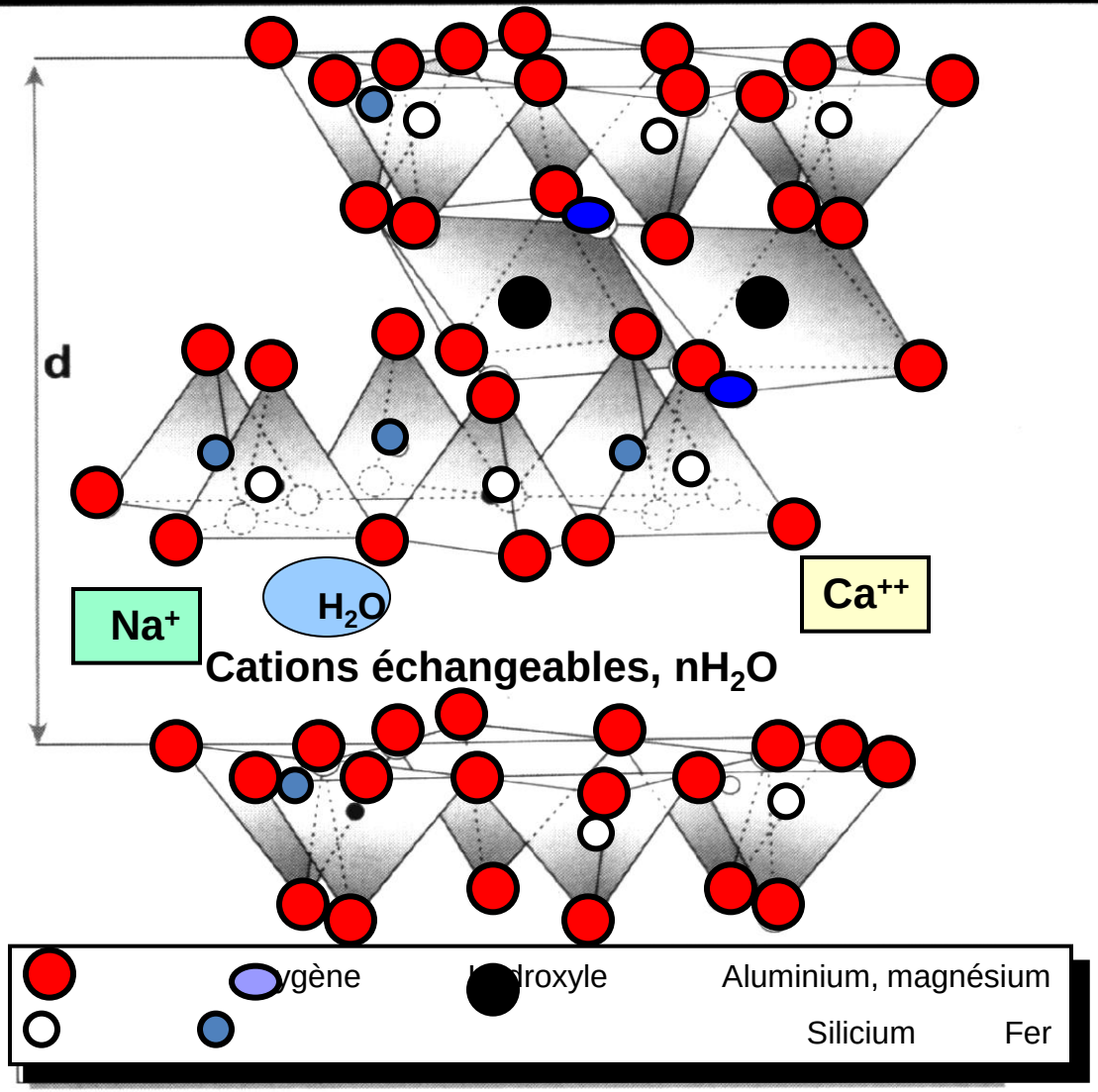
	Avantages	Inconvénients
Test Chaleur	Test classique	Assez long. Peu sensible et peu fiable
Test Chaleur + Tanin	Test classique. Très sensible	Assez long. Parfois problème de reproductibilité. Réaction avec toutes les protéines
Bentotest	Simple car 1 produit à temp. amb. et rapide	Faux Positifs
TCA	Assez simple	Le TCA est Dangereux pour l'environnement
Prostab	Assez simple et rapide	Conservation des réactifs au réfrigérateur
Electrophorèse	Visualisation et semi-quantification de toutes les protéines	Très long, produits toxiques et matériel coûteux

OENOFRANCE

LES BENTONITES

SOFRALAB

Structure des bentonites



Analyse des bentonites

OENOFRANCE

Bentonites		Ca (mg/100g)	Na (mg/100g)	Taux de gonflement en %	pH
calciques activées	N°1	1628	940	7	9.44
	Granula	1700	980	4	9.21
	Electra	1780	800	5	9.88
	Miracol	1448	1880	9	8.98
	Benteff	1650	1010	3	9.36
Volclay SPV (sodique naturelle)		620	780	2.4	8.78
N°10 (calcique naturelle)		1280	14	0.2	6.62

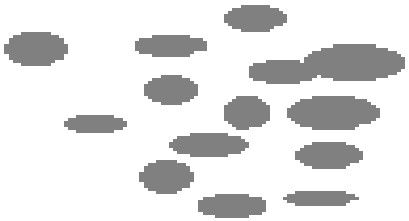
SOFRALAB

Analyse des bentonites

Bentonites	Protéines adsorbées en %	Taux de gonflement en %	Charges en µeq/g
N°1	80	7	112
Granula	69	4	75
Electra	80	5	128
Miracol	94	9	180
Benteff	65	3	80
Volclay SPV	72	2.4	101
N°10	37	0.3	10

Présentation des bentonites

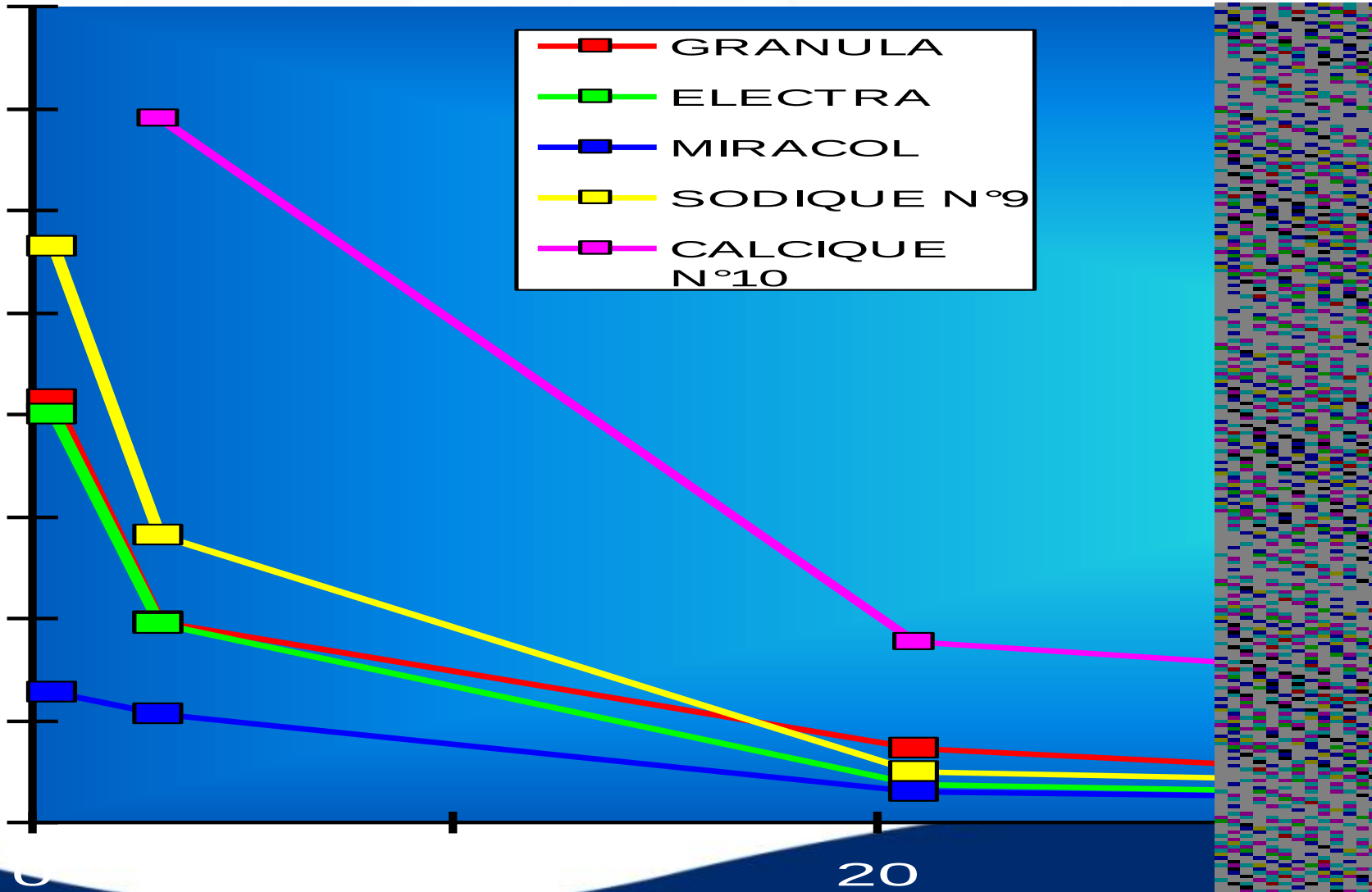
Poudre



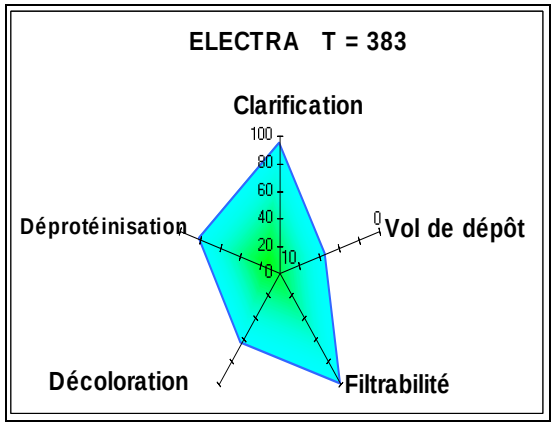
Granulés

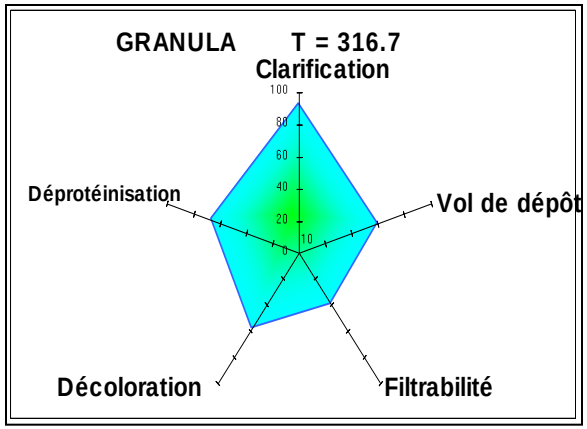
Couleurs des bentonites

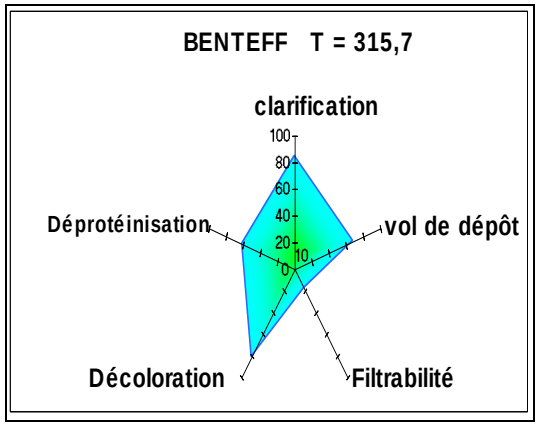
Collage à la bentonite (50 g/hL)

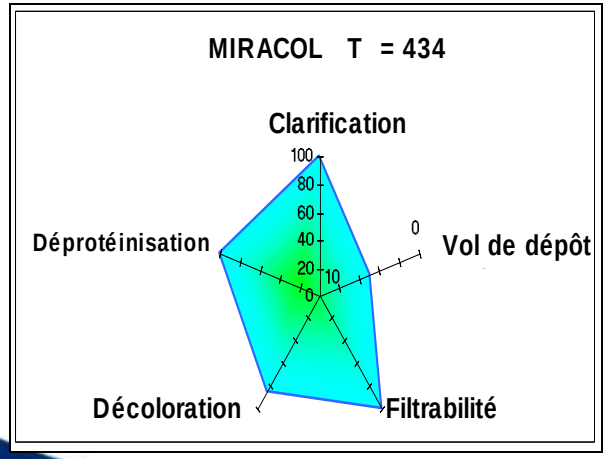


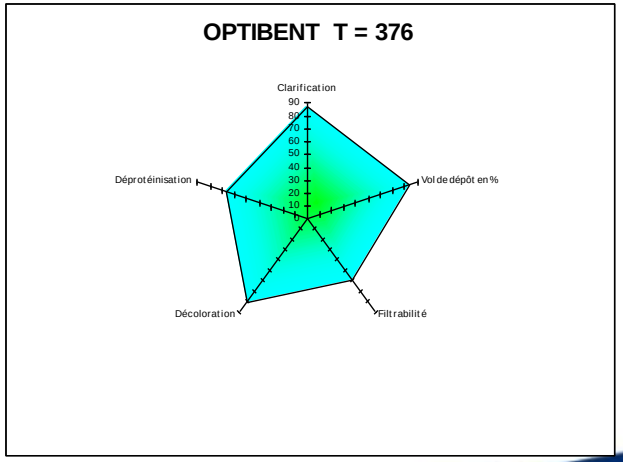
Graphiques des bentonites

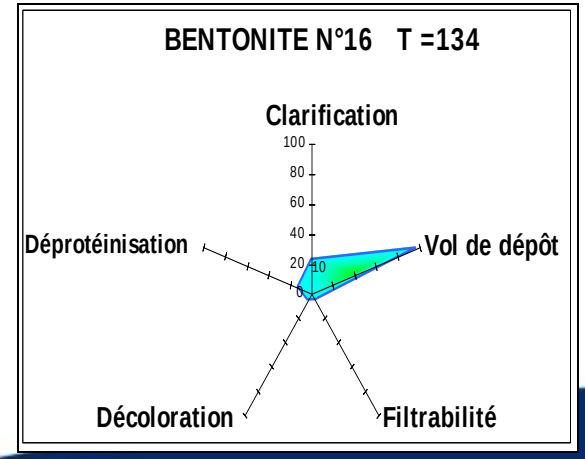






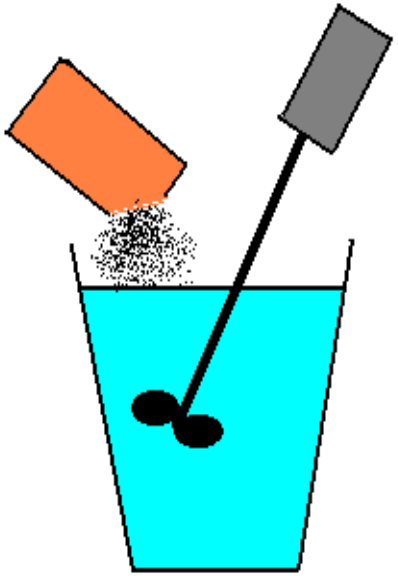






Bentonite calcique :

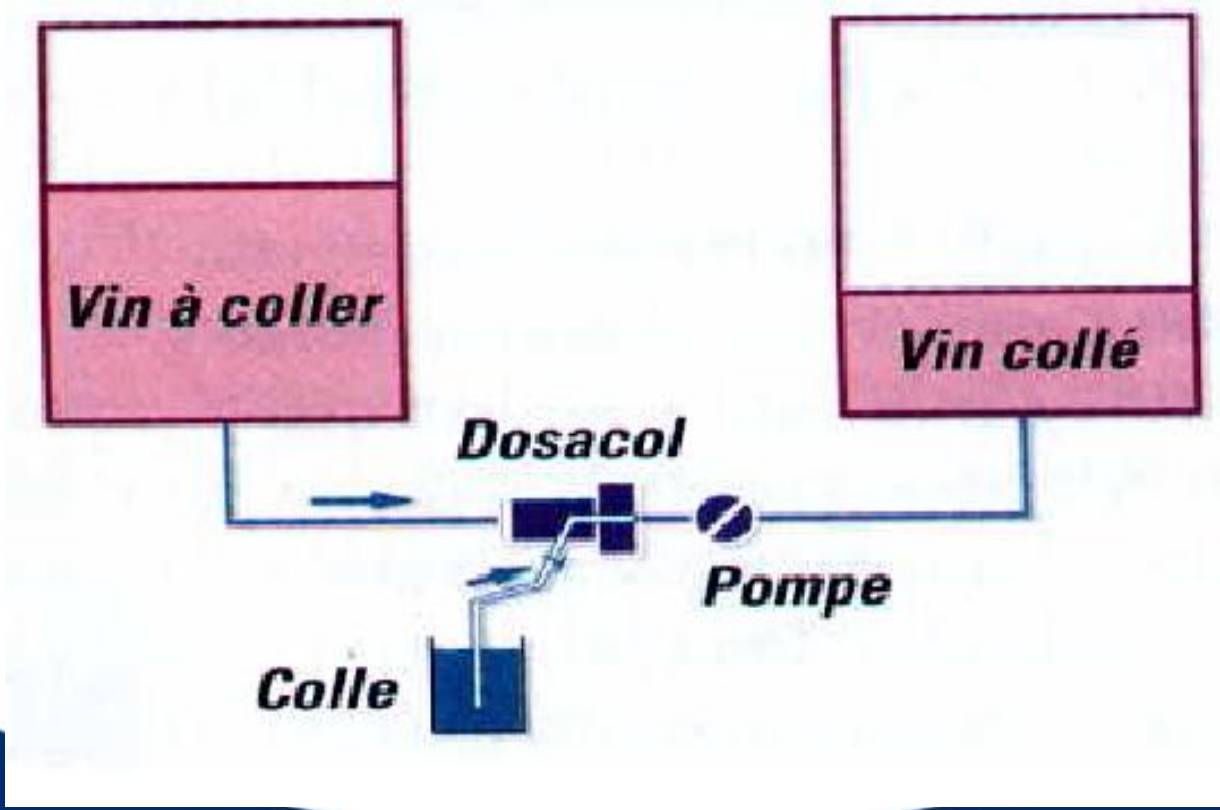
☞Faire des essais pour déterminer la dose optimale



Idéal: gonflement 12 h

ou 4h à l’eau tiède

Principe du DOSACOL



OENOFRANCE

Instabilité protéique

- Introduction
- Comparaison des Tests de stabilité Protéique
-Interaction entre CMC et Protéines

SOFRALAB

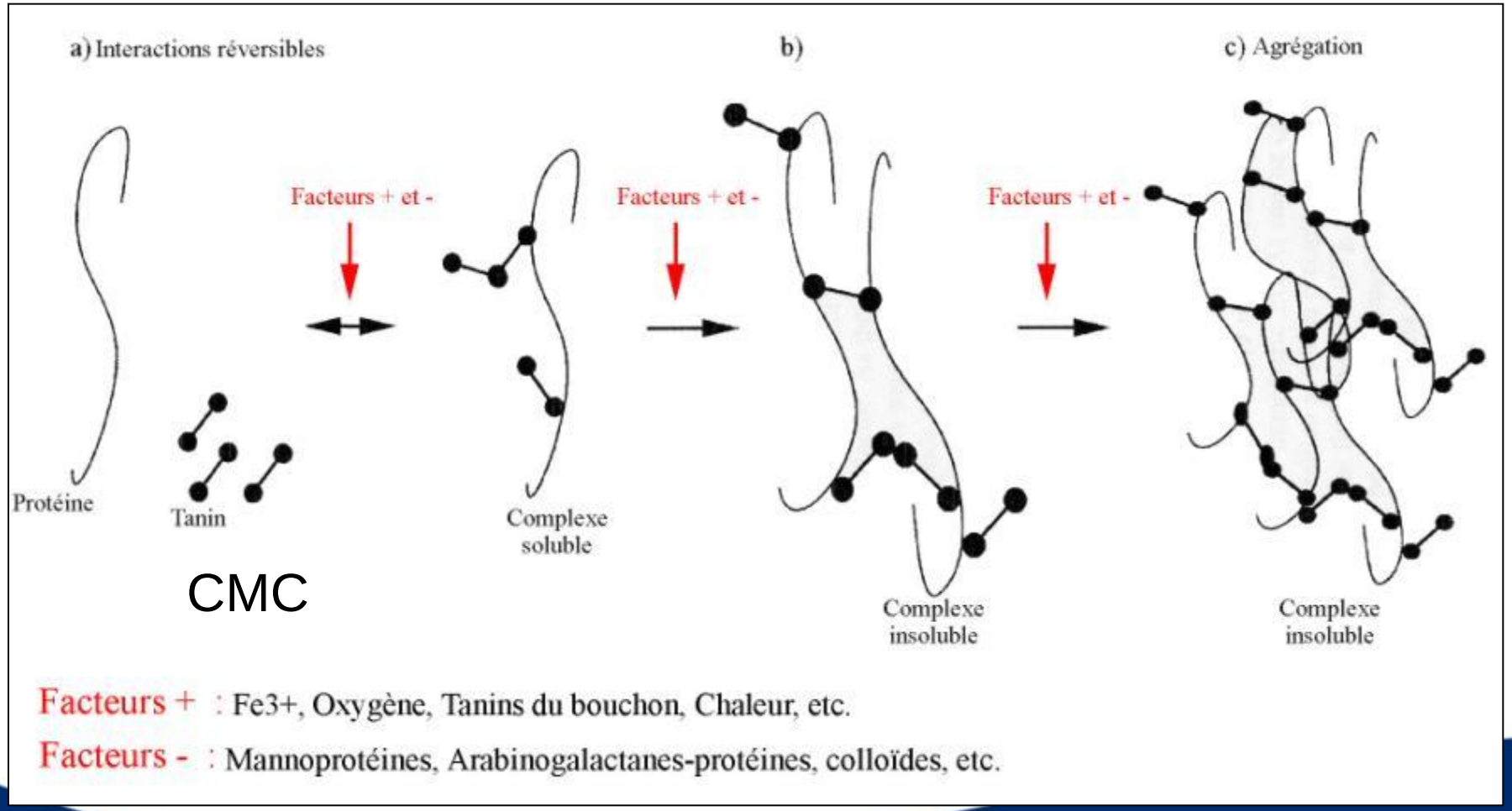
Interaction CMC/protéines

Au pH du vin :
Les protéines sont chargées +
La CMC est chargée –

➔ Réaction de floculation et de précipitation

OENOFRANCE

Mécanisme de la Précipitation Protéique



d'après Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998 et Charlton *et al.*, 2002

Comment éviter

Parfaitement déprotéiniser le vin

Vérifier par le test chaleur tanin

Dans ces conditions aucun problème à l'utilisation de Kyocel