

# OPTIMISATION DE L'UTILISATION DE LA BENTONITE : INTÉRÊT DES COLLAGES SUR MOÛT POUR PRÉSERVER L'AROMATIQUE DES VINS

FRANÇOIS-XAVIER SAUVAGE

<sup>1</sup>INRA, UMR 1083 Sciences Pour l'Œnologie, 2 place Viala, 34060 Montpellier

<sup>2</sup>SupAgro, UMR 1083 Sciences Pour l'Œnologie, 2 place Viala, 34060 Montpellier

<sup>3</sup>UMI, UMR 1083 Sciences Pour l'Œnologie, 2 place Viala, 34060 Montpellier

sauvage@supagro.inra.fr

## RÉSUMÉ

Le traitement de collage à la bentonite est une étape que le vinificateur réalise sur ses vins pour éliminer les protéines et les risques d'instabilité colloïdale qui leur sont associés. Cette argile a la propriété d'adsorber les protéines au pH du vin. Lors de son emploi avant la mise en bouteille, il est reconnu une perte de la couleur et des arômes du vin. Ceci est d'autant plus marqué que les doses de bentonite utilisées sont élevées et les vinificateurs ont constaté, ces dernières années, une augmentation très importante des doses à mettre en œuvre pour stabiliser les vins. L'objectif de notre étude a été d'évaluer l'impact des ajouts de bentonite au cours de la fermentation alcoolique sur la stabilité et les caractéristiques organoleptiques des vins, ceci en tenant compte des doses de bentonite utilisées mais aussi du moment de l'ajout de la bentonite. Bien entendu, le suivi des cinétiques de fermentation des moûts ainsi que la disparition des protéines ont été observés. Le but est dans un premier temps de proposer (1) à la profession un nouveau protocole d'utilisation de la bentonite pour stabiliser les vins mais aussi (2) une diminution des doses et par conséquent (3) une réduction des effets indésirables sur la qualité du produit fini.

## INTRODUCTION

Les protéines du vin blanc ont longtemps été considérées comme un mélange de protéines provenant du raisin, mais aussi des levures [1 et 2] et des bactéries employées durant la vinification. Plus récemment, Ferreira et al. [3] ont montré, grâce aux nouvelles techniques immunologiques, que les protéines du vin blanc auraient une origine végétale et que la grande majorité proviendrait de la pulpe du raisin. Grâce aux évolutions de la spectrométrie de masse, la quasi-totalité des protéines contenues dans les vins blancs, identifiées à ce jour, sont des protéines issues du raisin et la majorité d'entre elles appartiennent à une seule catégorie : les Pathogenesis Related Protein (PRP) ou protéines de défense [4 et 5]. Ces PR protéines ne sont pas dégradées pendant la vinification et sont responsables de la casse protéique des vins après la mise en bouteilles [6]. Les vins blancs en contiennent des concentrations allant de 15 à 300 mg/L [7].

Cette instabilité protéique des vins se manifeste par un trouble blanchâtre. Ce trouble déprécie la qualité aux yeux du consommateur et occasionne donc une perte économique importante pour le viticulteur. Elle concerne majoritairement les vins blancs mais aussi certains rosés. Elle est attribuée à une dénaturation lente des protéines et peut être accélérée par d'autres composés du vin. Ainsi en présence de tannins, il peut se former un complexe tannins-protéines. Ce trouble peut aussi provenir de l'augmentation de la température du vin lors du transport ou du stockage : les protéines les plus sensibles à la chaleur vont s'agréger et précipiter. Si la quantité globale de protéines joue un rôle important dans l'instabilité des produits, cette instabilité est également très dépendante de la composition (répartition entre les différentes classes de protéines) [8].

Pour la prévenir, les protéines sont éliminées avant la mise en bouteille. La méthode la plus utilisée, car la plus simple et la moins coûteuse, est le traitement à la bentonite également appelé « collage ». Cette argile,

chargée négativement, est capable d'adsorber les protéines qui sont elles chargées positivement au pH du vin. Bien qu'efficace, ce collage à la bentonite présente de nombreux inconvénients. Il a pour conséquence une diminution de la couleur et du potentiel aromatique, lié à l'adsorption de matière colorante et d'arômes [9 et 10]. Il induit également des pertes non négligeables de vin, de l'ordre de 5 à 10% en volume [11].

Pour remédier à ces différents inconvénients, les effets de l'ajout de bentonite à différents stades de la fermentation alcoolique ont été étudiés. En particulier, de façon à optimiser ce traitement, nous avons cherché à évaluer l'impact de la dose de bentonite et du moment de l'ajout sur la stabilité et la qualité gustative des vins obtenus.

## TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

Notre étude a porté sur 3 moûts issus de cépages différents : un Chardonnay, un Sauvignon et un Vermentino. 13 mini-vinifications ont été réalisées sur chaque cépage : une mini-vinification témoin, sans ajout de bentonite et 12 mini-vinifications avec ajout de 40, 80 et 150 g.HI-1 de bentonite au début de la fermentation alcoolique (FA), à ¼ de la FA, à ½ de la FA et à la fin de la FA. L'évolution de la fermentation alcoolique a été suivie par la mesure journalière de la densité. Durant cette fermentation, des prélèvements ont été réalisés tous les 2 jours afin d'analyser l'évolution du contenu en protéines des moûts. Les vins ont ensuite été soutirés (2 à 3 jours après la fermentation), ajustés en SO<sub>2</sub>, filtrés et mis en bouteilles avant l'évaluation de leurs caractéristiques sensorielles. L'instabilité des vins a été déterminée par un test à la chaleur (80 °C, 30 min) suivi d'une mesure de la turbidité.

Pour le suivi du contenu protéique, 500µl de chaque échantillon ont été concentrés 5 fois par ultrafiltration, réalisée au moyen de centricones (seuil de coupure 3kDa, Millipore). La centrifugation a été réalisée à 8000 g pendant 30 min. Le concentrat, contenant toutes les molécules dont la masse moléculaire est supérieure à 3kDa, a alors été mélangé avec le tampon Laemmli 4X (3 : 1 v/v) afin de dénaturer et de solubiliser les protéines avant la séparation électrophorétique 1D SDS PAGE. Cette séparation a été effectuée sur des gels d'acrylamide à 14%, sur lesquels a été déposé l'équivalent de 400 µl de chaque moût. La migration des protéines dans le gel a été effectuée sous un courant de 20mA par gel, à température ambiante. L'électrophorèse terminée, le gel a été coloré au bleu de Coomassie pendant 2 h puis décoloré à l'acide acétique 10% jusqu'à l'obtention d'un fond de gel incolore. Les gels décolorés ont été numérisés à 300 dpi grâce à un scanner à transmission avant d'être quantifiés par un logiciel d'analyses d'images (TotalLabTL120) en nuances de gris. Toutes les bandes de chaque puits ont été repérées en fonction de leur distance de migration, par référence à une gamme étalon composée de 6 protéines de quantité et de masse moléculaire connues. Il a ainsi été possible de suivre l'évolution de la concentration de chaque classe de protéines présentes dans l'échantillon et d'en déduire le pool total de protéines.

L'analyse sensorielle a été réalisée uniquement sur les vins Chardonnay, par un jury de 17 juges sélectionnés et entraînés. Les produits ont été présentés dans des verres blancs selon un plan carré latin [12]. Les

échantillons ont été notés sur une échelle d'intensité, linéaire, continue et bornée. L'analyse sensorielle a été réalisée en deux séances, avec deux répétitions de la notation et, au préalable, trois séances de génération de vocabulaire et d'entraînement. Les logiciels FIZZ (réseau Biosystème) pour l'acquisition des données et XLstat (Addinsoft) pour le traitement statistique des résultats ont été utilisés. La différenciation et la caractérisation des échantillons ont été obtenues par des analyses de variances et des analyses multidimensionnelles : ACP (Analyse en Composantes Principales). Les juges devaient noter 11 descripteurs appartenant aux 3 caractères classiquement utilisés : visuel (intensité de couleur, nuance vert à cuivré), olfactif (souffré, alcool, fleurs blanches, pêche, levure, animal) et gustatif (acidité, sucrosité, amertume).

## RÉSULTATS

### FERMENTATION DES MOÛTS

Les fermentations alcooliques des moûts témoins se sont déroulées à une température constante de 18°C, sur un temps plus ou moins long selon les cépages. En effet, le moût de Sauvignon a mis 18 jours pour atteindre une densité de 995 alors qu'il n'a fallu que 11 et 10 jours respectivement aux moûts de Chardonnay et de Vermentino pour atteindre ce même niveau de densité. Lorsqu'on rajoute la bentonite aux moûts en même temps que les levures et que l'on compare les durées de fermentation à celle des moûts témoins, on observe généralement des durées de fermentation légèrement plus courtes. Ceci est d'autant plus significatif que les quantités de bentonite ajoutées sont élevées.

### ÉVOLUTION DES PROTÉINES CONTENUES DANS LES MOÛTS TÉMOINS

Les quantités totales de protéines dans les moûts témoins et leur évolution ont été déterminées en considérant les 4 classes de protéines obtenues par électrophorèse (figure 1). Les bandes observées sont généralement attribuées à des Thaumatin-like protéines (19-24 kDa), des Chitinases (25-30 kDa), des  $\beta$ -Glucanases (40 kDa) et des Invertases (66 kDa). La quantité totale de protéines, obtenue par la moyenne de trois répétitions, est déterminée avec une incertitude relative de 6%. Les analyses réalisées au cours de la fermentation des trois moûts témoins (sans ajout de bentonite) mettent en évidence une diminution de la teneur en protéines (figure 2). Dans le cas du Vermentino, cette perte s'élève à environ 75% des protéines initialement présentes dans le moût, alors que pour le Sauvignon et le Chardonnay ces pertes sont respectivement de 35 et 45%. Ces évolutions touchent différemment les classes de protéines en fonction du cépage considéré. Les 3 vins en fin de fermentation contiennent encore des protéines (entre 5 et 35 mg.l<sup>-1</sup>) et sont considérés comme instables après filtration. En effet, par exemple, le test à la chaleur sur 13 vins Sauvignons ont montrés que le vin témoin sans ajout de bentonite est instable (NTU = 9) contrairement aux autres échantillons traités à la bentonite qui montrent une turbidité inférieure ou égale à 2.

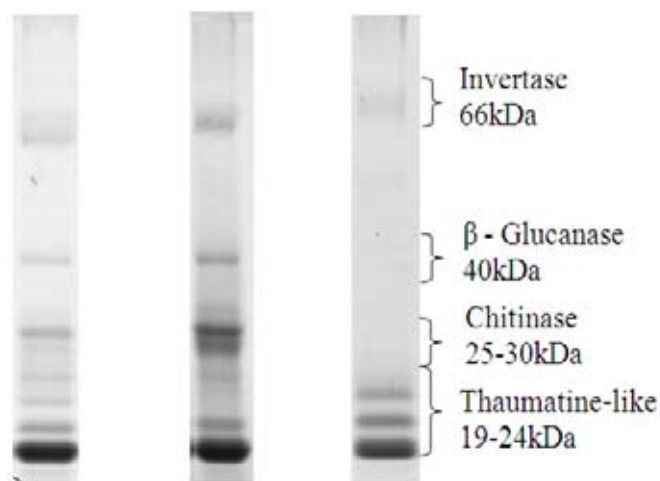


Figure 1 : Diagramme 1D PAGE des protéines contenues dans les 3 moûts témoins

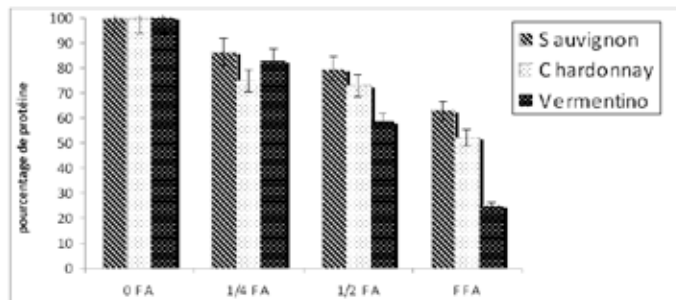


Figure 2 : Cinétique de disparition des protéines des 3 moûts témoins au cours de la fermentation alcoolique

### ÉVOLUTION DES TENEURS EN PROTÉINES EN COURS DE FERMENTATION ET EN PRÉSENCE DE BENTONITE

Quel que soit le cépage considéré, l'ajout de bentonite au cours de la FA se traduit par une diminution significative des teneurs en protéines par rapport aux moûts témoins. Pour le moût de cépage Vermentino, des doses de 40 g.Hl-1 entraînent la disparition quasi immédiate de l'ensemble des protéines, et ce quelque soit le moment d'introduction

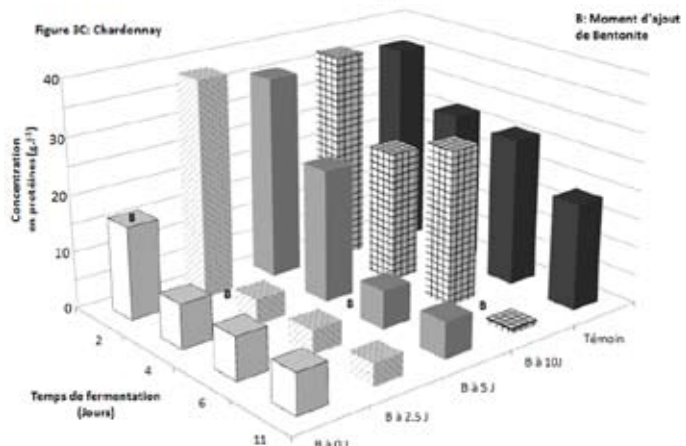
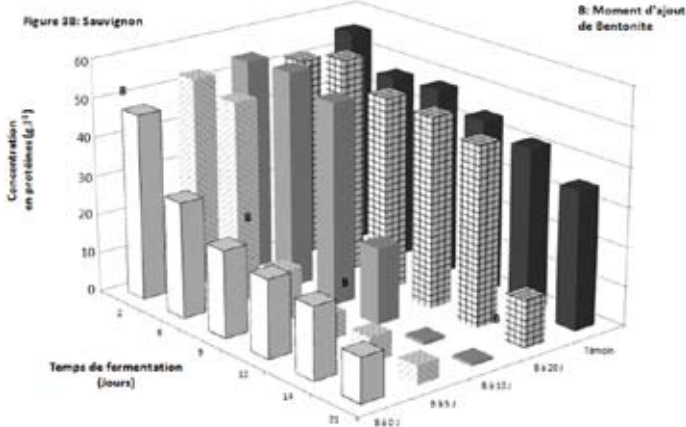
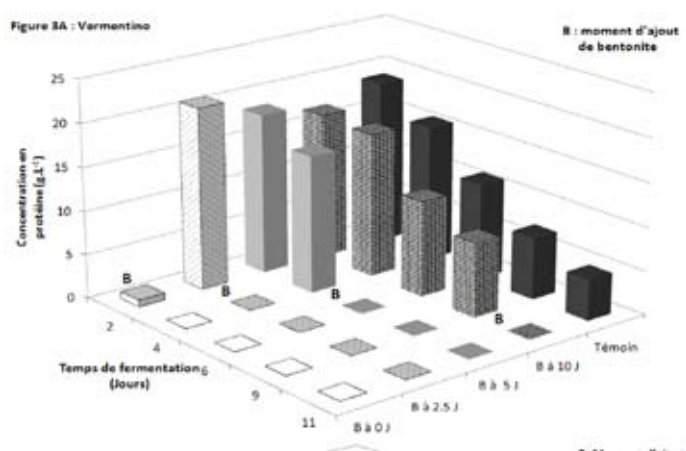


Figure 3 : Evolution des protéines au cours de la fermentation alcoolique en présence de 40 g.Hl-1 de bentonite pour le Vermentino (3A), le Sauvignon (3B) et le Chardonnay (3C).

de l'argile (figure 3A). Dans le cas des cépages Sauvignon et Chardonnay, ces doses de 40 g. HI-1 ne sont pas suffisantes pour éliminer la totalité des protéines (figures 3B et 3C). A 40 g. HI-1 et selon le moment de l'ajout de la bentonite, les quantités de protéines au soutirage dans ces vins varient de 2 à 12 mg l-1. Une addition à mi-fermentation dans le cas du Sauvignon semble plus favorable mais ne se vérifie pas pour le Chardonnay. Les protéines résiduelles sont dans les deux cas des invertases et des Thaumatine-like protéines. En dépit des faibles quantités résiduelles à 40 g.HI-1, les doses nécessaires pour obtenir, au soutirage, l'élimination totale de ces protéines ont été de 80 g.HI-1 dans le cas du Chardonnay et 150 g.HI-1 dans le cas du Sauvignon. En accord avec des résultats antérieurs, il existe une adsorption différentielle des protéines présentes dans les moûts et les vins et certaines Thaumatinés nécessitent des doses très importantes d'argiles pour pouvoir être totalement adsorbées (8). Dans l'ensemble, ces résultats montrent que les bentonites sont efficaces quelque soit le moment de leur ajout. Les quantités résiduelles de protéines sont essentiellement liées aux doses employées et à la composition initiale du moût.

#### ANALYSE SENSORIELLE DES VINS DE CHARDONNAY

Dans un premier temps l'analyse statistique des résultats a mis en évidence les performances du jury, dont la notation est répétable et consensuelle. D'un point de vue général, les différences sensorielles notées par les dégustateurs sur l'ensemble des vins issus du cépage Chardonnay et pour les différentes doses de bentonite (0, 40, 80 et 150 g.HI-1) sont relativement faibles. Notamment, aucune perte d'intensité aromatique et de couleur n'a été mise en évidence, et ce même pour les vins traités à 150 g.HI-1. De même, le moment de l'ajout pour une dose donnée n'induit pas de différence significative. En revanche, les analyses statistiques des notes en considérant l'effet conjoint de la concentration et du moment d'ajout indiquent des différences significatives pour 6 descripteurs sur les 11 évalués par le jury (tableau 1). Lorsque les ajouts de bentonite sont réalisés en même temps que le levurage en début de FA, une dose croissante de bentonite conduit à des vins plus cuivrés, plus pêche, moins soufré, moins animal et moins acide (figure 4). L'effet dose a tendance à s'annuler lorsque les ajouts de bentonite sont réalisés en fin de fermentation (figure 5).

#### CONCLUSION

	dose x moment
<i>int couleur</i>	0,0003
<i>nuance</i>	< 0,0001
<i>soufré</i>	0,010
<i>alcool</i>	0,624
<i>fleurs blanches</i>	0,309
<i>pêche</i>	0,019
<i>levure</i>	0,133
<i>animal</i>	0,034
<i>acidité</i>	< 0,0001
<i>amertume</i>	0,790
<i>sucrosité</i>	0,118

Tableau 1 : Probabilités de l'analyse de variance pour l'interaction dose x moment d'ajout.

Cette expérimentation montre en premier lieu, grâce à l'analyse sensorielle que l'ajout de bentonite au cours de la fermentation alcoolique ne dégrade ni la couleur ni la qualité aromatique du vin contrairement au traitement de collage juste avant la mise en bouteilles. De plus il semblerait que l'apport de bentonite au début de la fermentation alcoolique diminue sa durée et accélère les fermentations languissantes. Les apports de bentonites ont un impact différent suivant le cépage et les doses utilisées. Par exemple pour un ajout de 40g.HI-1 de bentonite, au soutirage et quelque soit le moment d'ajout le vin Vermentino ne possède plus de protéines alors que pour les vins Sauvignon et Chardonnay, respectivement un maximum de 35% et 40% de protéines par rapport au départ est quantifié. Pour obtenir des vins dépourvus

de protéines après soutirage, il était nécessaire d'ajouter seulement 80g.HI-1 de bentonite, l'emploi de fortes doses 150g.HI-1 de bentonite était inutile. L'élimination des protéines est dépendante de la matrice vin mais aussi de la composition initiale du moût en protéines. Dans tous les cas, le fait d'ajouter la bentonite en même temps que les levures supprime l'étape supplémentaire de collage et par conséquent un gain de volume de vin avant la mise en bouteilles.

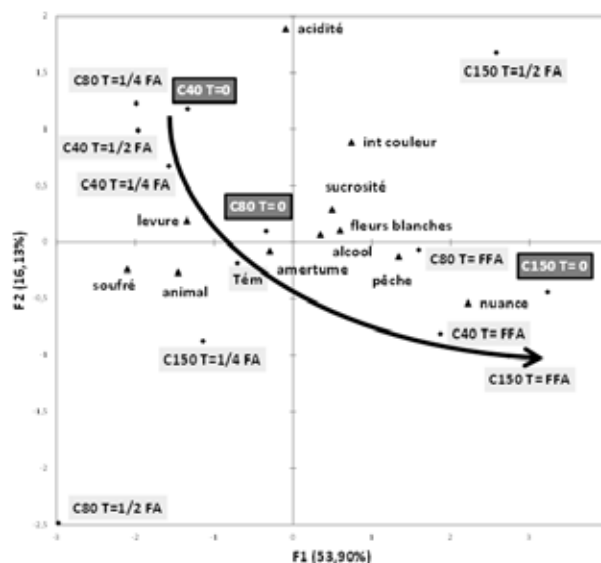


Figure 4 : Effet de la dose de bentonite ajoutée en début de fermentation sur les caractéristiques sensorielles

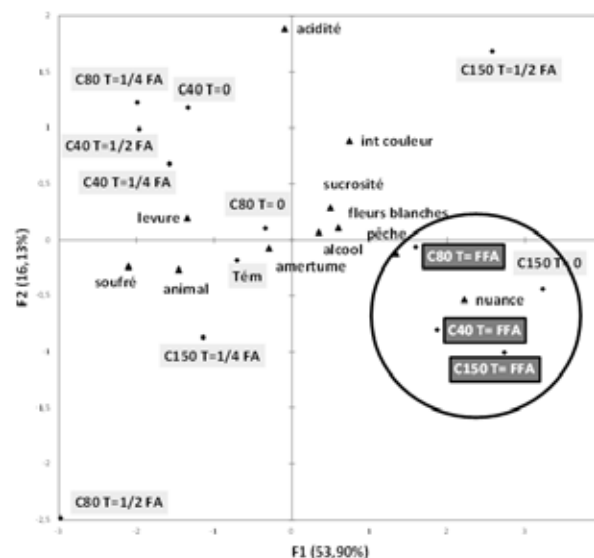


Figure 5 : Effet de la dose de bentonite ajoutée en fin de fermentation sur les caractéristiques sensorielles

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- HSU J.C. ET HEARTHERBELL D.A., 1987a. Isolation and characterization of soluble proteins in grapes, grape juice and wine. . American Journal of Enology and Viticulture, 38, 6-10.
- 2- HSU J.C. ET HEARTHERBELL D.A., 1987B. Heat-unstable proteins in wine. Characterization and removal by bentonite fining and heat treatment . American Journal of Enology and Viticulture, 38, 11-16.
- 3- FERREIRA R.B., MONTEIRO S., PICARRA-PEREIRA M.-A., TANGANHO M .C., LOUREIRO V.-B. ET TEXEIRA A.R., 2000. Characterization of the Proteins From Grapes and Wines by Immunological Methods. American Journal of Enology and Viticulture, 51, 22-28.
- 4- WATERS, E. J., SHIRLEY, N. J., & WILLIAMS, P. J. (1996). Nuisance pro-

teins of wine are grape pathogenesis-related proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 3-5.

5- SAUVAGE F-X., MANTEAU S., POINSAUT P., SIECZKOWSKI N. ET MOUTOUNET M., 2006, Haze forming protein in white wine: separation, identification and quantification of bentonite-absorbed and heat-induced haze active protein using 1D and 2D electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Macromolecules and Secondary Metabolites of Grapes and Wine*, Reims. pp. 169-175.

6- WATERS E.J., WALLACE W., WILLIAMS P.J., 1992. Identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1514-1519.

7- DAWES H, BOYES S., KEENE J. ET HEATHERDELL D., 1994. Protein Instability of Wine : Influence of Protein Isoelectric Point. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 319-326.

8- SAUVAGE, F. X., BACH, B., MOUTOUNET, M., VERNHET, A., 2010. Proteins in white wines: Thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite. *Food Chemistry* 2010, 118, (1), 26-34.

9- BAYONOVE C., CABAROGLU T., DUFOUR C., RAZUNGLES A., SAPIS J

.-C., BAUMES R. ET GUNATA Z., 1995. Influence du collage sur le potentiel aromatique variétal du vin. XXI Congrès de la Vigne et du Vin, OIV, Uruguay.

10- LAMBRI, M., DORDONI, R., SILVA, A., & DE FAVERI, D. (2010). Effect of Bentonite Fining on Odor-Active Compounds in Two Different White Wine Styles. *American Journal of Viticulture and Enology*, 61(2), 225-233.

11- WATERS E.J., ALEX G., MUHLACK R., POCOCK K.-F., COLBY C., O'NEILL B.-K., HOJ P.-B. et JONES P., 2005. Preventing protein haze in bottled white wine. *The Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 215-225.

12- WILLIAMS E.J., 1949. Experimental designs balanced for the estimation of residual effects of treatments. *Australian Journal of Scientific Research* 2, 149-168.