

INTERET DE L'UTILISATION DES PROTEINES VEGETALES POUR LE COLLAGE DES MOUTS ET DES VINS

*Aline MARTIN, Nathalie SIECZKOWSKI
MARTIN VIALATTE Œnologie
79, Av AA Thèvenet, BP 1031 Magenta
51319 EPERNAY Cedex*

I- INTRODUCTION :

Le collage est une pratique courante en œnologie pour les traitements des vins. Il est réalisé pour obtenir des vins limpides (clarification, stabilité colloïdale, amélioration de la filtrabilité) ainsi que pour améliorer les caractères organoleptiques (réduction de l'astringence, sécheresse, amertume des vins). Actuellement, les origines des produits propres au collage sont de deux types : animale (gélatine, albumine d'œuf, colle de poisson, caséine) ou minérale (bentonite, gel de silice). Les gélatines sont largement utilisées depuis des générations comme agents de collage et sont fabriquées à partir du collagène contenu dans la peau, les os et les cartilages des animaux.

En Europe, le contexte de la maladie de Creutzfeld-Jacob a provoqué la suspicion

sur les produits animaux (interdiction de l'albumine de sang) et a conduit certains metteurs en marché à exiger la fourniture de vins non traités aux protéines animales, même si les gélatines désormais utilisées en œnologie sont d'origine porcine et ne présentent aucun risque pour le consommateur. Cette exigence pose des problèmes techniques aux élaborateurs. L'attente des vinificateurs pour des produits de substitution aux gélatines est donc très forte car il n'existe aucune autre pratique qui permette d'obtenir des résultats aussi complets que ceux obtenus avec les colles protéiques, en particulier sur les aspects organoleptiques des vins.

II- HISTORIQUE

En 1996, Martin Vialatte Œnologie a pris la décision de lancer un vaste programme de

recherche sur les protéines de collage d'origine végétale. Les objectifs étaient non seulement de développer des produits d'origine végétale innovants présentant une efficacité similaires à celle des gélatines tout en offrant des garanties d'innocuité mais aussi de satisfaire les opérateurs du secteur viti-vinicole. Pour mener à bien ces objectifs, nous avons respecté les contraintes et les exigences imposées par les démarches d'autorisation d'un nouveau produit œnologique.

Les différentes étapes de développement du projet sont résumées dans le tableau I. A ce jour, l'assemblée générale de l'OIV (Office International de la Vigne et du Vin) qui s'est tenue en juillet 2004 a adopté l'utilisation du gluten de blé et de la protéine de pois pour le collage des moûts et de vins.

Tableau I : Les différentes étapes de l'évolution du projet

ANNEES	ETAPES
1996-1997	<ul style="list-style-type: none"> o Approvisionnement et sélection des protéines végétales o Tests sur vins vis-à-vis des effets clarifiants, de la composante phénolique et des modifications organoleptiques
1998-2001	<ul style="list-style-type: none"> o Thèse de doctorat dans le Laboratoire du professeur Moutounet (INRA, UMR Sciences pour l'Œnologie, Montpellier) o Travaux fondamentaux et appliqués à l'Institut d'Œnologie d'Asti (Italie).
1999	<ul style="list-style-type: none"> o Essais en caves sous dérogation du gouvernement italien (10 000 hL) o Le projet d'utilisation des protéines végétales est soumis au comité scientifique et technique de l'OIV
2000-2003	<ul style="list-style-type: none"> o Essais en laboratoires et en cuveries expérimentales. o Essais en caves sous dérogation du gouvernement français (article 41 du règlement CE n° 1622/2000, 50 000 hL par an sur 3 ans) : mise en place et suivi des essais en caves.
2001-2004	<ul style="list-style-type: none"> o Travail suite à la demande de l'OIV : recherche des éventuels résidus de protéine végétale dans les vins et les moûts traités par une méthode de dosage des protéines végétales et de détermination du pouvoir antigénique des vins traités, méthode mise au point au laboratoire de toxicologie alimentaire (Professeur RESTANI, Institut Universitaire de Sciences Pharmacologiques de MILAN)
2004	<ul style="list-style-type: none"> o Remise à la DGCCRF du dossier des résultats des essais réalisés en caves en grand volume dans le cadre de l'article 41 du règlement CE n° 1622/2000 en vue de sa transmission à Bruxelles o Adoption par l'OIV de la méthode d'analyse des résidus et de l'utilisation du gluten de blé et du pois pour le collage des moûts et des vins

III- SELECTION DES PROTEINES VEGETALES :

Depuis vingt ans, le marché des protéines végétales en Europe n'a cessé d'évoluer. Le perfectionnement des procédés d'obtention, la diversification des sources végétales, l'amélioration des conditions de mise en œuvre ont été les principaux facteurs de développement des protéines végétales dans le secteur agro-alimentaire. Elles constituent aujourd'hui une vaste famille d'ingrédients de pointe, compétitifs et performants car elles ont su s'adapter au marché alimentaire à chaque étape de son évolution et ont su répondre aux exigences de qualité de plus en plus fortes.

Dans notre étude, l'approvisionnement en protéines végétales en vue de leur sélection a porté sur des produits disponibles et

commercialisés pour l'alimentation humaine. Par conséquent, ils répondent aux normes du Codex Alimentarius qui sont des normes internationales relatives aux denrées alimentaires dans le double objectif de protéger la santé des consommateurs et d'assurer la loyauté des pratiques suivies dans le commerce.

Elles entrent dans la composition de nombreuses catégories d'aliments : biscuits, pâtisseries et produits de boulangerie, produits laitiers (fromages fondus, crèmes glacées, desserts), produits à base de poisson, produits à base de viande, produits de charcuterie, aliments diététiques etc..

La sélection des différents échantillons de protéines végétales s'est déroulée en trois étapes comme indiqué sur la figure 1. Au

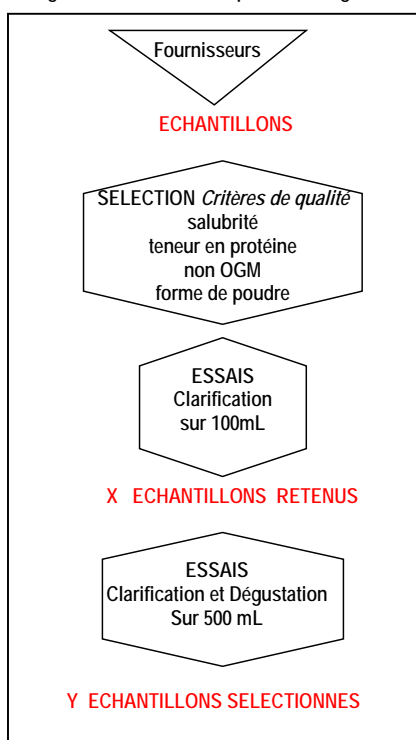
cours de la première étape, une centaine de protéines d'origine végétale existants sur le marché a été choisie en fonction des critères suivants : conformité aux spécifications du codex, non-OGM, présentation sous forme de poudre et teneur en protéine. Des essais de clarification sur des petits volumes de vins rouges ont permis de retenir 35 protéines. Ces dernières ont ensuite été testées sur vins blancs et sur vins rouges pour évaluer leur comportement en clarification et leur impact sur la qualité gustative. A l'issue de ces tests, 15 échantillons ont été sélectionnés pour une campagne d'expérimentation sur moûts, vins blancs et vins rouges en comparaison avec des gélatines.

IV- ESSAIS REALISES EN VUE DE LA VALIDATION DES PROTEINES VEGETALES :

IV. 1. Objectifs des essais :

Suite à ces premières sélections, des essais ont été réalisés en grand volume en situation de pratique de caves en France et en Italie selon la procédure de la

Figure 1 – Sélection des protéines végétales



réglementation communautaire des 50 000 hL des produits non encore autorisés (article 41 du règlement CE n° 1622/2000). Ces essais avaient pour objectif de définir l'efficacité des protéines végétales lors du collage des moûts et des vins en remplacement des protéines d'origine animale (gélatines, colles de poisson par exemple), de déterminer leur influence sur les caractéristiques analytiques et organoleptiques des vins Traités.

En parallèle, nous avons vérifié l'innocuité des vins collés, pour écarter le risque de présence de résidus de protéines végétales et plus spécifiquement de gluten de blé, pouvant provoqué des allergies chez les patients intolérants (maladie de cœliaque) ou allergiques (dermatite atopiques, asthme du boulanger).

IV.2. Présentation des essais réalisés :

Les 19 essais réalisés en caves en France sur les vins et les moûts sont répartis de la façon suivante :

- 3 sur vins rouges
- 4 sur moûts :
 - 1 sur moût concentré rectifié
 - 2 sur moûts issus de raisins blancs (clarification statique)
 - 1 sur moût issu de raisins blancs (clarification par flottation) : deux essais supplémentaires ont été réalisés en Suisse. Ils ont permis de valider l'utilisation des protéines végétales en flottation.
- 12 sur vins blancs : pour les vins blancs, les essais ont été plus nombreux car

l'utilisation d'un auxiliaire de collage (tanin, bentonite ou gel de silice) augmente le nombre de modalités.

IV.3. Synthèse des résultats des essais réalisés : démonstration de l'efficacité et de l'innocuité des Protéines Végétales

Les résultats montrent que dans la plupart des essais, les protéines végétales ont une action équivalente, voire meilleure que celle des protéines animales utilisées en référence. Par rapport aux collages de référence et selon les objectifs de collage recherchés c'est-à-dire clarification, amélioration des propriétés gustatives ou les deux, plusieurs points ressortent :

a- Au niveau des effets technologiques, les protéines végétales :

- s'utilisent sur les moûts et les vins à des doses équivalentes aux protéines animales, type gélatine, soit entre 2 et 25 g/hL,
- clarifient avec une cinétique de clarification équivalente,
- permettent d'obtenir au moment du soutirage une faible turbidité, cette faible turbidité étant souvent conservée au cours de la vinification,
- donnent dans la majorité des cas un pourcentage de lies faible,
- éliminent les tanins des vins rouges,
- ne gênent pas la stabilisation tartrique, ni la stabilisation protéique,
- améliorent ou conservent la filtrabilité obtenue avec le traitement de référence.

b- Au niveau des analyses de base, les protéines végétales :

- ne modifient pas les valeurs des analyses de base,
- respectent parfois mieux l'intensité colorante et/ou la teinte.

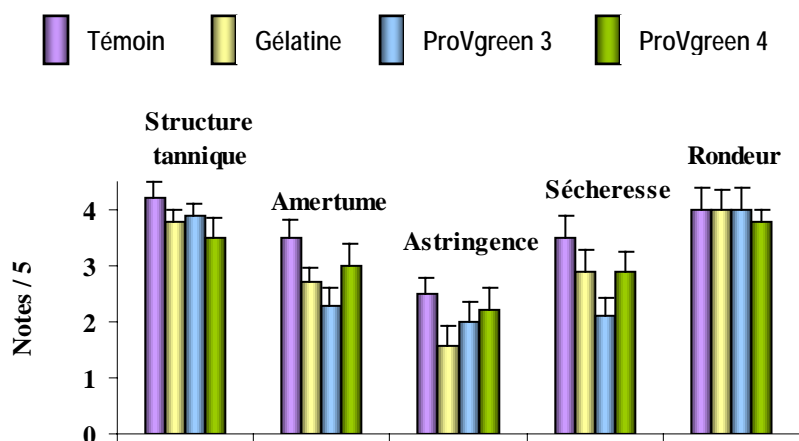
c- Au niveau des tests organoleptiques, les protéines végétales :

- dans la majorité des cas, ne présentent pas de différences significatives à la dégustation (tests de dégustation en triangulaire non significatifs au seuil de 5%), ce qui traduit l'absence totale d'effets organoleptiques désagréables,
- sont capables d'améliorer les propriétés gustatives des vins. En effet, les tests de préférence les classent souvent en première position.

- ont aussi la capacité de diminuer les défauts comme amertume et sécheresse (voir Figure 2, cas d'un vin de cépage Syrah, millésime 2002).

Les impacts au niveau des propriétés organoleptiques sont variables suivant la qualité de la matière première utilisée et suivant les types de moûts et de vins à traiter, comme c'est d'ailleurs le cas pour les protéines animales.

Figure 2- Dégustation d'un vin Syrah collé avec les protéines végétales



d- Au niveau de l'analyse des résidus protéiques :

- le dosage très sensible de l'azote total par la méthode de DUMAS des vins traités démontre que le collage avec les protéines végétales, comme le collage avec les gélatines, n'augmente pas la teneur en azote total et par conséquent n'augmente pas la teneur en protéine des boissons traitées.
- le dosage du gluten résiduel réalisé par le test ELISA, test couramment utilisé en industrie agroalimentaire pour doser la quantité de gluten présent dans les produits alimentaires destinés à la consommation humaine, indiquent qu'il ne reste aucun résidu à base de gluten et que par conséquent les boissons traitées au gluten dans le cadre de ces essais ne possèdent pas de pouvoir allergène.

(article 46 du règlement CE n° 1493/1999) ont été analysés.

Tous les résultats sont inférieurs à 10 ppm et indiquent qu'il ne reste aucun résidu à base de gluten et que par conséquent les boissons traitées au gluten de blé dans le cadre de ces essais ne possèdent pas de pouvoir allergène.

Les résultats de ces essais montrent que les propriétés technologiques des protéines végétales sont équivalentes à celle des protéines animales et que les résidus protéiques sont absents des produits finis.

e- Au niveau du pouvoir antigénique des vins:

Dans un souci de sécurité alimentaire total, nous avons fait le choix de faire analyser plus de 300 vins collés aux protéines végétales à des doses extrêmes de 50g/hL selon une méthode immunologique très spécifique. Cette méthode utilise des anticorps fabriqués chez l'animal pour le pois et des anticorps humains provenant de sérums de patients sensibles au gluten de blé (coeliaques et allergiques). Elle permet de déterminer le potentiel allergène des vins traités aux protéines végétales donc de prévenir le consommateur des risques d'allergie. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Mme Restani, responsable du laboratoire de toxicologie

L'expérience et le savoir faire de Martin Vialatte Œnologie ont permis de mettre au point des formulations spécifiques par type de vin de façon à couvrir la majorité des cas rencontrés en œnologie. Comme pour le collage avec les protéines animales, il est préférable et conseillé de faire des essais de collage préalables en laboratoire afin de déterminer la dose et le produit le plus adapté au collage du vin.

alimentaire et professeur de chimie alimentaire au département de sciences pharmacologiques de l'université de Milan. Cette méthode « SDS-PAGE et Immunoblot » a été adoptée à l'assemblée générale de l'OIV en juillet 2004 et apparaîtra au Recueil des Méthodes d'Analyses.

En terme de sécurité alimentaire, les résultats des analyses SDS-page immunoblot *montrent que les moûts, les vins rouges et les vins blancs clarifiés avec du gluten de blé ne présentent aucun risque lorsqu'ils sont consommés par les individus coeliaques et par les allergiques au gluten de blé. Avec une sensibilité de 0,03 ppm, cette méthode permet la même conclusion pour les individus allergiques à la protéine de pois.*

IV.4. Autres essais réalisés à travers le monde

Les nombreux essais menés dans les laboratoires, les caves et les instituts techniques, européens et non européens (France, Italie, Allemagne, Luxembourg, Autriche, Espagne, Portugal, Suisse, Grèce, Hongrie, Etats-Unis, Australie) ont validé au niveau technologique (effet clarifiant, composante phénolique, caractéristiques analytiques et

Dans le cadre de notre étude, nous avons travaillé avec un laboratoire privé qui utilise le test mis au point par Skerritt et Hill (12), seul disponible actuellement pour le contrôle des aliments « sans gluten » destinés aux malades coeliaques. La sensibilité de ce test est de 10 ppm, soit 1 g/hL de gluten. Pour le Codex Alimentarius, un produit « gluten free » ne doit pas contenir plus de 20 ppm.

Tous les vins issus des essais réalisés dans le cadre de la dérogation des 50 000 hL,

organoleptiques des vins) l'intérêt de l'utilisation de ces nouveaux produits de collage en œnologie.

Ces différents travaux ont fait l'objet de différentes publications (1-3). Ils démontrent que les protéines d'origine végétale peuvent avoir une efficacité de clarification aussi bonne que celle observée avec les gélatines ; pour certains paramètres, les résultats sont même plus performants qu'avec les gélatines.

V- ACTIONS DES PROTEINES VEGETALES SUR LES COMPOSES PHENOLIQUES DES VINS :

Des recherches menées en collaboration avec l'IPV – INRA de Montpellier dans le cadre d'un travail de thèse ont été, également conduites sur la structure chimique des tanins éliminés par le collage à l'aide des protéines végétales comparativement aux résultats préalablement établis avec les gélatines (4 - 6).

La figure 3 présente les résultats de la clarification et de l'étude qualitative des tanins éliminés au cours du collage d'un vin Merlot, millésime 1998 avec 10 g/hL de protéine végétale (deux formulations : ProVgreen 1 et ProVgreen 2) et de gélatine. Le résultat des turbidités obtenues après 48 heures sur colle montre une diminution de la turbidité d'au moins 50 % par rapport à celle du vin témoin non collé (Figure 3-a). ProVgreen 1 et 2 ont une activité clarifiante similaire à celle de la gélatine.

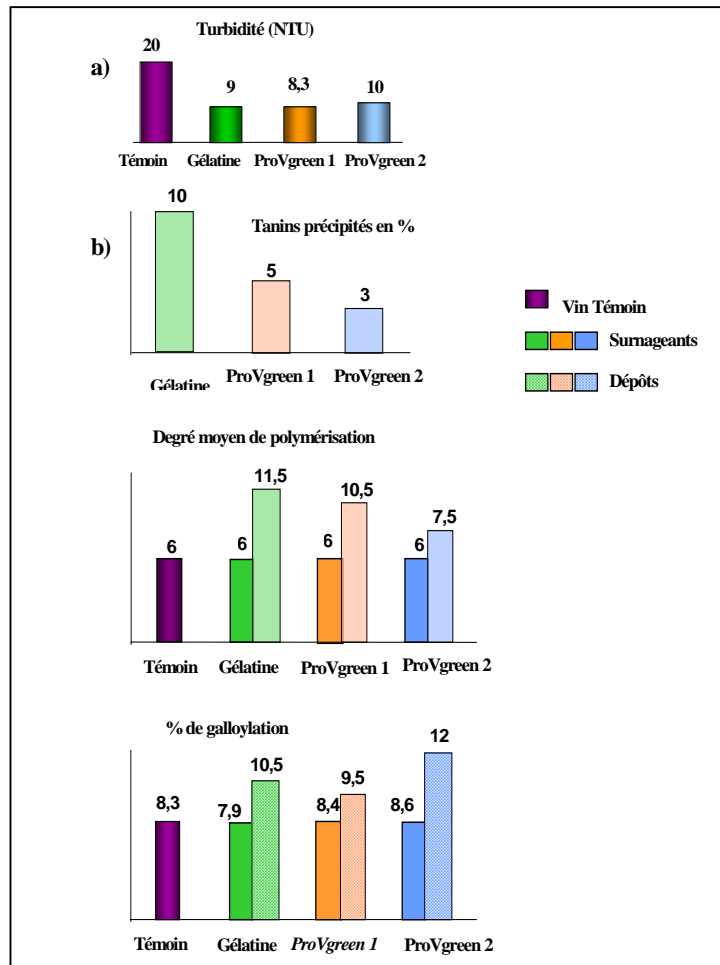


Figure 3-

a) Turbidités à 48 h d'un vin Merlot 1998 collé avec les protéines végétales ProVgreen 1 et 2 et avec la gélatine

b) Evaluation quantitative et qualitative des tanins condensés précipités après le collage

Concernant la qualité des tanins éliminés, ProVgreen 1 et ProVgreen 2 précipitent des tanins hautement polymérisés (degré de polymérisation moyen de 10,5 et 7,5 respectivement) et se rapprochent des taux obtenus avec la gélatine (11,5). Comme avec les gélatines, les unités galloylées sont sélectivement précipitées par les protéines végétales (Figure 3-b).

Les protéines végétales réagissent comme les gélatines. Les tanins avec des degrés de polymérisation moyens élevés et fortement galloylés sont sélectivement éliminés.

VI- LA GAMME PROVGREEN :

Au vu de l'ensemble des résultats satisfaisants obtenus avec les protéines végétales pour assurer un excellent collage des moûts et des vins et de l'expérience acquise dans ce domaine, Martin Vialatte œnologie a développé une gamme de produits de collage 100% d'origine végétale.

Cette gamme sera commercialisée sous la marque ProVgreen. Elle comprend quatre formulations adaptées en œnologie :

➤ **ProVgreen Red** pour le collage des vins rouges : clarification, assouplissement et finesse aromatique

➤ **ProVgreen Extra Red** pour le collage des vins rouges structurés : clarification et élimination de défauts (amertume , sécheresse , ..)

➤ **ProVgreen White** pour le collage des vins blancs et des vins rosés : clarification et affinage organoleptique

➤ **ProVgreen Must** pour la clarification des moûts blancs ou rosés

En parallèle des applications en œnologie, les protéines végétales sont aussi adaptées :

➤ pour le collage des vinaigres de vins ou de cidre : développement d'une

première formulation « **ProVgreen vinaigre** ».

Ces produits s'utilisent de façon comparable aux collages de protéines animales (mise en œuvre, dose d'emploi, emploi avec des adjuvants de collage suivant certaines applications). Ces produits sont conformes aux Codex Alimentarius et œnologique, et sont garantis non OGM.

La gamme devrait s'étoffer tant sur le plan des applications, que de leur forme.

VII- CONCLUSIONS :

Ce projet sur les protéines végétales montre bien que dans le cadre de développement de nouveaux produits œnologiques, la société Martin Vialatte Œnologie s'est fortement engagée et impliquée dans des études rigoureuses et contrôlées, ceci dans le but de proposer des auxiliaires technologiques qui puissent répondre aux besoins des marchés, tout en tenant compte des exigences de sécurité alimentaire pour les consommateurs. Le cas des protéines végétales montre que le cheminement est long entre la démonstration de l'intérêt technologique avéré et la possibilité de les utiliser en caves.

Tous nos travaux de recherche et développement démontrent que les protéines végétales sont des protéines de collage des moûts et des vins tout aussi efficaces que les gélatines animales. Leurs modes d'action sont assez similaires et ceci à plusieurs niveaux : technologique, qualité organoleptique des vins, interaction avec les tanins, etc....

Toutes nos études entreprises pour déterminer :

- 1) les risques éventuels de présence de résidus de gluten de blé et de pois dans les moûts et les vins,
- 2) le pouvoir antigénique des vins (risque de provoquer une allergie ou une réaction chez les patients sensibles),

ont montré qu'il n'y avait pas de présence de résidus de protéines végétales (blé et pois) dans les vins traités à la dose maximale. Aucun des 325 vins analysés par la méthode immunologique SDS-Immunoblot que nous avons adaptée spécifiquement à l'œnologie, ne présente de risque potentiel pour les consommateurs, et en particulier pour les sujets allergiques ou sensibles.

L'utilisation des protéines de pois et du gluten de blé pour le collage des moûts et des vins a été validée par le règlement Européen 2165/2005 en fin d'année 2005. Cette pratique œnologique avait d'ores et déjà été admise par les experts scientifiques de l'OIV en 2004.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) LEFEBVRE S., GERLAND C., MAURY C., GAZZOLA M., 2000 - Nouvelles colles végétales : origines, propriétés et performances. Revue Française d'Œnologie 184, 28-32.
- (2) LEFEBVRE S., GERLAND C., MAURY C., 2001 - Utilisation des protéines végétales pour le collage des vins. Intervitis – Interfructa, mai, STUTTGART, 281-292.
- (3) LEFEBVRE S., GERLAND C., SCOTTI B., BONI G., 2002 - Le collage aux protéines végétales : performances à l'échelle de la cave. Revue Française d'Œnologie, 195, 31-34.
- (4) MAURY C., SARNI-MANCHADO P., LEFEBVRE S., CHEYNIER and MOUTOUNET M., 2001 - Influence of fining with different molecular weight gelatins on proantho-cyanidin composition and perception of wines. American Journal of Oenology and Viticulture, vol. 52:2, n°2.
- (5) MAURY C., SARNI-MANCHADO P., LEFEBVRE S., CHEYNIER V., MOUTOUNET M., 2003 - Influence of fining with plant proteins on proanthocyanidin composition of red wines. American Journal of Oenology and Viticulture, 54:2, 105-111.
- (6) LEFEBVRE S., MAURY C., SARNI-MANCHADO P., CHEYNIER V., MOUTOUNET M., 2003 - Etude de la composante phénolique des vins rouges collés avec des protéines végétales. Vinidea.net, Wine Internet Technical Journal, 13.
- (7) PALOSUO, K., 2003 - Update on wheat hypersensitivity. Allergy and Clinical Immunol. 3, 205-209
- (8) SAUCIER, C., 1997 - Les tanins du vin : étude de leur stabilité colloïdale. Thèse de doctorat n°537, Université Victor Segalen Bordeaux 2.
- (9) BESLER, M., 2001 - Determination of allergens in foods. Trends in analytical chemistry, 20 (11), 662-672
- (10) VALDES, I., GARCIA, E., LLORENTE, M. and MENDEZ, E., 2003 - Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 15(5), 465-474.
- (11) DENERY-PAPINI, S., NICOLAS, Y. et POPINEAU, Y., 1999 - Efficiency and limitations of immunochemical assays for the testing of gluten-free foods. Journal of Cereal Science, 30, 121-131.
- (12) SKERRITT, J.H., DEVERY, J.M. and HILL, A.S., 1991 - Chemistry, coeliac-toxicity and detection of gluten and related prolamins in foods. Panminerva medica, 33 (2), 65-74.
- (13) RESTANI P., BERETTA B., BALLABIO C., GALLI C.L., BERTELLI A.A.E., 2002 - Evaluation by SDS-PAGE and immunoblotting of residual antigenicity in gluten-treated wine : a preliminary study. International Journal Tissue Reactions, XXIV (2), 45-51.
- (14) CATTANEO A., BALLABIO C., BERTELLI A.A.E., FIOCCHI A., GALLI C.L., ISOARDI P., TERRACCIANO L., RESTANI P., 2003 - Evaluation of residual immunoreactive in red and white wines clarified with gluten or gluten derivatives. International Journal Tissue Reactions, XXV (2) 57-64.
- (15) CATTANEO A., BALLABIO C., BERNARDINI R., BERTELLI A.A.E., NOVEMBRE E., VIERUCCI A., RESTANI P., 2003 - Assessment of residual immunoreactivity in red or white wines clarified with pea and lupin extracts. International Journal Tissue Reactions