

## La déstabilisation colloïdale des boissons limpides : recherche sur les mécanismes impliqués et développement d'itinéraires technologiques de prévention

Bauduin R.<sup>1,10</sup>, Poupard P.<sup>1,10</sup>, Cottureau P.<sup>2</sup>, Charrier F.<sup>3</sup>, Meistermann E.<sup>4</sup>, Schwebel S.<sup>5</sup>, Vernhet A.<sup>6</sup>, Poncet-Legrand C.<sup>6</sup>, Millet M.<sup>1,7,10</sup>, Guyot S.<sup>7,10</sup>, Lequere J-M.<sup>7,10</sup>, Salmon J-M.<sup>8</sup>, Zanchi D.<sup>9</sup>

<sup>1</sup> IFPC, Domaine de la motte, F-35650 Le Rheu

<sup>2</sup> IFV, 7 Avenue Yves Cazeaux, F-30230 Rodilhan

<sup>3</sup> IFV, Château de la Frémoire, F-44120 Vertou

<sup>4</sup> IFV, Biopôle, 28 rue de Herrlisheim, F-68000 Colmar

<sup>5</sup> IFBM, 7 Rue du Bois de la Champelle, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy

<sup>6</sup> UMR SPO, INRA, Montpellier SupAgro - 2 Place Pierre Viala, F-34060 Montpellier

<sup>7</sup> INRAE BIA PRP - Domaine de la motte, F-35650 Le Rheu

<sup>8</sup> INRAE UEPR - Unité Expérimentale de Pech Rouge, F-11430 Gruissan

<sup>9</sup> UMR8640 PASTEUR, ENS, 24 rue Lhomond, F-75005 Paris

<sup>10</sup> UMT Actia Nova2Cidre, Domaine de la motte, F-35650 Le Rheu

**Correspondance** : remi.bauduin@ifpc.eu

### Résumé

Ce projet concerne les boissons limpides produites à partir de pommes à cidre (cidre, pommeau, jus de pomme), les vins (rouges et blancs) et les bières, produits qui présentent assez fréquemment une perte de limpidité néfaste pour l'appréciation du produit par le consommateur. Les résultats de recherche acquis au cours du projet ont permis d'identifier les acteurs de la déstabilisation colloïdale des différents produits mais aussi de lever, au moins partiellement, les verrous de connaissance sur les mécanismes impliqués. Ces nouvelles connaissances ont été mises à profit à la fois pour améliorer la fiabilité des outils de diagnostic prédictifs pour les praticiens, mais aussi pour proposer et optimiser les traitements curatifs ou préventifs de l'instabilité colloïdale.

**Mots-clés** : Troubles colloïdaux, interaction, réactivité, macromolécules, mécanismes, procédés, matériel végétal, cidre, bière, vin, jus de pomme, pommeau.

### Abstract: Colloidal destabilization of clear beverages: research on the mechanisms involved and development of technological prevention routes

This project concerns clear drinks produced from cider apples (cider, pommeau, apple juice), wines (red and white) and beers, products that quite often exhibit a loss of clarity that is detrimental to the consumer appreciation of the final product. The research results acquired during the project made it possible to identify the sources involved in the colloidal destabilization of the various products but also to remove, at least partially, the knowledge barriers on the mechanisms involved. This new knowledge has been used both to improve the reliability of predictive diagnostic tools for producers and to propose and optimize curative or preventive treatments for colloidal instability.

**Keywords**: Colloidal haze, interaction, reactivity, macromolecules, mechanisms, processes, plant material, cider, beer, wine, apple juice, pommeau

## Introduction

### Contexte

Les boissons limpides produites à partir de pomme (jus de pomme, cidres et pommeau) présentent fréquemment, au cours du stockage, une perte de limpidité allant à l'encontre des attentes des consommateurs ou de la distribution. Cette altération d'une des composantes majeures de la qualité sensorielle des produits entraîne des coûts de retrait et une dévalorisation de l'image de ces boissons auprès des consommateurs et de la distribution, faits dommageables pour la valorisation des produits et l'ensemble de l'économie de la filière. Cette problématique est clairement identifiée par tous les acteurs de la filière cidricole avec des volumes de produits concernés très significatifs. Sur le plan technique, il est possible de limiter l'occurrence de cette altération en éliminant les molécules les plus réactives par une opération de collage. Néanmoins, ce traitement aboutit à un appauvrissement important du produit sur le plan organoleptique (couleur, arôme et saveur) et potentiellement sur le plan nutritionnel, sans garantir l'absence de perte de limpidité ultérieure. Si l'utilisation de ces traitements ne doit pas être écartée, il semblerait au moins judicieux d'en éviter l'usage systématique. Or, actuellement, il est difficile de proposer des méthodes alternatives ou d'adapter le traitement aux produits car les mécanismes restent encore mal connus. Il s'agit donc de lever un réel verrou de connaissance lié à des enjeux de qualité, de santé des consommateurs et de compétitivité de la filière cidricole.

Dans les vins blancs et rosés, la présence de protéines instables peut conduire à la formation d'un trouble colloïdal (casse protéique) qui déprécie la qualité du vin en bouteille. La prévention de cette casse protéique est classiquement obtenue par un collage à la bentonite effectué sur moût ou sur vin. Mais, ce traitement à la bentonite sur vin entraîne une perte qualitative lorsque la dose de bentonite dépasse 50 g/hl. C'est pourquoi, lorsque le risque d'instabilité est élevé, le traitement est préférentiellement réalisé en cours de fermentation. Les collages à la bentonite se traduisent par ailleurs par des pertes non négligeables de volume (proportionnelles aux doses employées) et cette argile constitue la principale source d'enrichissement en aluminium des vins. Des méthodes d'évaluation du risque d'instabilité protéique existent sur le principe de tests de floculation avec mesure de la turbidité après déstabilisation. L'utilisation de ces tests est étendue au stade pré-fermentaire, voire en cours de maturation sur le raisin. Néanmoins, aucun de ces tests n'est très fiable (surtout au stade raisin) et la stabilisation protéique est finalement gérée par l'expérience empirique. Un test immunologique a été développé en 2010 par la société Sofralab. Il est un peu plus précis mais inapplicable sur moût et sa mise en œuvre est longue et fastidieuse. L'œnologie recherchant de plus en plus à maîtriser la réduction des intrants et donc l'optimisation des traitements de stabilisation, il manque un ou plusieurs tests fiables concernant ce problème technique.

Les vins rouges après fermentation renferment une fraction colorante instable, constituée de tanins et d'anthocyanes, mais dont la composition exacte n'est pas clairement définie. Cette fraction est plus importante lorsque la vinification comporte une phase d'extraction importante avec thermovinification. La stabilisation de la matière colorante, qui s'obtient naturellement au cours de l'élevage pour les vins de garde, pose des problèmes pour les vins destinés à une commercialisation rapide. Les traitements de stabilisation font appel au froid, à différents produits de collage ou à l'addition de colloïdes protecteurs comme la gomme arabique. Il n'existe pas de méthode fiable permettant d'évaluer la stabilité de ces vins et d'adapter le traitement de stabilisation.

Pour la bière, le trouble est principalement dû à l'association de polyphénols (catéchine, épicatechine et dimère) et les protéines dites « tannantes » riches en proline. La stabilisation de la bière se faisait majoritairement par l'utilisation de la polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) pour éliminer les polyphénols. Aujourd'hui, les brasseurs veulent garder les polyphénols dans la bière pour l'image positive de ces composés vis-à-vis des consommateurs et pour leur action protectrice contre l'oxydation de la bière au cours du stockage. Pour éliminer les protéines responsables du trouble, il est possible d'utiliser une enzyme (endoprotéase) hydrolysant spécifiquement les protéines riches en proline. Cette nouvelle

technologie est peu utilisée par les brasseurs car cette enzyme est issue d'OGM et n'est pas complètement détruite lors de la pasteurisation. Aujourd'hui, la brasserie a besoin d'une meilleure connaissance des protéines impliquées dans le trouble et de leur mécanisme d'action afin d'optimiser l'utilisation du gel de silice et de proposer d'autres alternatives de stabilisation de la bière.

### Objectifs du projet

- i) Lever les verrous de connaissance sur les mécanismes impliqués dans l'instabilité colloïdale des différents produits grâce à la mise en œuvre d'approches couplées de chimie et de physico-chimie des macromolécules (composition et mécanismes de formation des troubles) ;
- ii) Améliorer et proposer des outils prédictifs fiables de l'instabilité colloïdale des produits finis, ceci afin d'optimiser les traitements préventifs ou curatifs ;
- iii) A partir des connaissances acquises sur les mécanismes sous-jacents, proposer des méthodes pour favoriser la stabilité colloïdale des produits en utilisant une palette de leviers incluant le choix raisonné du matériel végétal et des itinéraires technologiques (y compris l'emploi de certains auxiliaires technologiques), et ce à qualités sensorielles et nutritionnelles équivalentes.

### Partenaires du projet

- Institut Français des productions Cidricoles (IFPC)
- Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV)
- Institut Français des Boissons, de la Brasserie et de la Malterie (IFBM)
- INRA centre Angers-Nantes (UR 1268 Biopolymères, Interactions Assemblage – Equipe PRP)
- INRA centre de Montpellier (UMR A 1083 Sciences Pour l'Œnologie – Equipe SPIRAL et Halle de Biotechnologie, en collaboration avec l'UE Pech Rouge - UE0999)
- CNRS Centre national de la recherche scientifique (UMR 8640 CNRS-ENS-UPMC – Laboratoire de Physique Théorique et Hautes Energies, Ecole Normale Supérieure, Département de Chimie)

## 1. Analyse fine des troubles des différentes matrices

### 1.1 Objectif et démarche

L'objectif finalisé est de formuler, à partir de la composition fine des troubles, des hypothèses sur les mécanismes impliqués dans la formation des troubles. Ce travail regroupe deux tâches : i) le recueil du trouble et la séparation des éléments constitutifs du trouble et ii) l'identification des éléments constitutifs du trouble. Suite à une collecte de 35 produits différents (cidre, pomeau, jus de pomme, vin blanc, vin rouge et bière), 23 troubles ont pu être isolés et analysés par les différents partenaires du projet.

### 1.2 Principaux résultats

#### 1.2.1 Analyse des polyphénols

Pour les produits cidricoles, les polyphénols natifs dosés représentent 1 à 15% de la masse du trouble lyophilisé (Millet et al., 2017). Les cidres sont les produits qui présentent la teneur en polyphénols natifs la plus importante avec 8 à 15% de masse. Pour les jus de pomme et les pomeaux, les teneurs sont plus faibles. Sur le plan qualitatif, on remarque que les tanins représentent une part très importante du trouble par rapport aux autres types de polyphénols natifs dosés. Enfin, le degré de polymérisation « apparent » des procyanidines natives est supérieur dans le trouble par rapport à celui des surnageants. Pour les produits cidricoles, il est très probable que la quantité de polyphénols dosés dans les troubles soit très inférieure à la réalité car seuls les polyphénols natifs sont dosés.

Dans le cas des vins, le calcul du degré de polymérisation moyen (DPM) « apparent », montre comme dans le cas des produits cidricoles, un DPM plus important dans les troubles que dans les surnageants correspondants. Divers marqueurs de réactions chimiques ont été mis en évidence dans le trouble, notamment les marqueurs d'adduits anthocyanes-tanins dans les vins rouges. Les marqueurs présents dans les troubles et les surnageants des vins sont différents. Dans les vins rouges, on retrouve ces mêmes spécificités pour des marqueurs d'autres types de réaction : réactions directes, polycondensations (des marqueurs spécifiques apparaissent dans le culot), oxydation (de très nombreux marqueurs apparaissent dans les surnageants). L'analyse de la proportion d'oxydation des tanins a permis de déterminer que le taux d'oxydation des tanins dans les culots varie entre 70 et 90 % en fonctions des échantillons, bien au-delà de ce qui est présent dans les surnageants.

Pour la bière, les polyphénols natifs dosés représentent environ 1 à 1,6 % de la masse du trouble.

### **1.2.2 Analyse des polysaccharides**

Les polysaccharides des troubles des différents produits analysés sont assez différents quantitativement et qualitativement. Pour les troubles des produits cidricoles, les teneurs en polysaccharides vont de 0,4 à 29 % de trouble lyophilisé (Millet et al., 2017). Dans les vins, elles vont de 10 à 19% et enfin dans les bières, elles sont voisines de 10%. Qualitativement, les troubles cidricoles se distinguent par des proportions importantes en galactose et en arabinose, probablement dues à des résidus de chaînes latérales de pectine.

### **1.2.3 Composés azotés**

Dans les produits cidricoles, la proportion d'azote contenu dans le trouble est en général assez faible à très faible (Millet et al., 2017). Pour les vins, l'azote représente entre 1 et 9% du trouble et les bilans effectués montrent que le trouble totalise entre 1 et 2% de l'azote total contenu dans le produit (98 à 99% étant dans le surnageant). Dans les bières, l'azote représente entre 6 et 8,5% du trouble. Les bilans effectués montrent que le trouble totalise 1% de l'azote total contenu dans le produit (99% étant dans le surnageant).

Dans la plupart des produits cidricoles, les protéines n'ont pas été détectées par SDS-PAGE, ni dans les produits initiaux, ni dans leurs surnageants. La présence de protéines est uniquement mise en évidence dans deux troubles issus de jus de pomme. Des bandes à 23 et 26 kDa sont communes aux deux jus de pomme et deux autres bandes (35 et 13 kDa) sont spécifiques à un jus de pomme (Millet et al., 2019 ; Millet et al., 2020). La révélation des gels au nitrate d'argent des produits initiaux et des surnageants ne fait pas apparaître de protéines de façon significative malgré le seuil de révélation plus faible. Dans les vins, on ne détecte pas de protéines dans les produits initiaux et les surnageants, mais on en détecte en faible quantité dans les troubles, surtout ceux issus de vins blancs (casse protéique). Dans la bière, on identifie une protéine majoritaire à 45/50 kDa. Cette protéine est majoritaire dans le surnageant. Le trouble présente deux bandes, l'une à 45 kDa et une supplémentaire à 100 kDa qui est peut-être un dimère de cette protéine.

## **2. Elucidation des mécanismes de formation des troubles**

### *2.1 Objectif et démarche*

L'objectif est i) d'étudier la formation et du développement du trouble en solution modèle et ii) l'identification fine des mécanismes impliqués et leurs cinétiques. Une étape préalable est la fourniture en quantités suffisantes de fractions globales pour chacune des matrices de polyphénols, polysaccharides et composés azotés.

## 2.2 Méthodes de travail utilisées

Le fractionnement des pools polyphénoliques, polysaccharidiques et azotés, est réalisé par des techniques de chromatographie préparative avec des substrats d'affinités différentes et des techniques séparatives (ultrafiltration et diafiltration) avec différents seuils de coupures. La mesure de la turbidité et la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS) sont employées pour étudier la dynamique de formation du trouble en solution modèle et milieu réel. Les techniques de protéomique sont aussi utilisées pour identifier les protéines de bières isolées dans les troubles.

## 2.3 Principaux résultats obtenus

### 2.3.1 Produits cidricoles

Afin de mieux comprendre le rôle de l'oxydation dans la génération de trouble, une étude a été menée en solution modèle afin de déterminer le niveau d'implication des procyanidines oxydées dans la formation de trouble, en particulier dans les cidres et les pommeaux.

Pour cela, l'agrégation des procyanidines oxydées en solution a été suivie par DLS tandis que l'évolution de la composition polyphénolique de la solution (surnageant et culot) a été suivie par des prélèvements réguliers (Millet et al., 2019). Les résultats montrent sans ambiguïté (Figure 1) l'impact de l'oxydation sur la cinétique d'agrégation des tanins : sans oxydation, on n'observe pas de formation de trouble dans le laps de temps de 300 minutes.

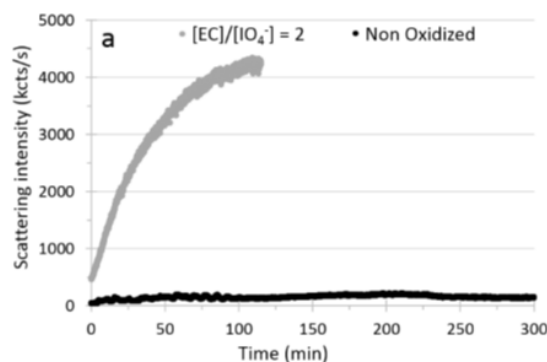


Figure 1 : Suivi de l'agrégation de procyanidines par diffusion de la lumière.

L'analyse LC-MS après phloroglucinolyse des milieux modèles filtrés versus non filtrés a permis de révéler la présence de certains marqueurs d'oxydation. Ceux-ci correspondent pour l'essentiel à des motifs structuraux impliquant la formation de nouvelles liaisons covalentes intramoléculaires dans le squelette des procyanidines, tandis que les marqueurs correspondants au couplage oxydatif intermoléculaire (liaison covalente entre procyanidines) ne semblent pas être particulièrement impliqués dans la formation de trouble. Par conséquent, l'agrégation ne proviendrait pas d'un phénomène de polymérisation oxydative des procyanidines, mais de modifications structurales intramoléculaires. Celles-ci augmenteraient la rigidité moléculaire et l'hydrophobicité favorisant ainsi les interactions non covalentes entre molécules oxydées et par conséquent leur agrégation.

L'effet du degré de polymérisation (DP) des procyanidines a aussi été évalué. Il en ressort que la formation de trouble est plus rapide lorsque le degré de polymérisation des procyanidines est plus élevé (DP2 à DP5), sous l'effet de l'oxydation.

La réversibilité du trouble à la température et l'impact des cycles chauffage/refroidissement ont aussi été évalués en solution modèle. Le refroidissement du milieu entraîne une forte augmentation du trouble qui diminue ensuite fortement voire disparaît lorsqu'on chauffe à nouveau. Le comportement observé en solution modèle est relativement similaire à celui du pommeau réel.

En conclusion, il semble que le trouble du pommeau puisse s'expliquer par l'oxydation d'oligomères de procyanidines sans la nécessité d'autres constituants macromoléculaires. Cette oxydation procède essentiellement par la formation de nouvelles liaisons covalentes dans la structure des tanins, les rendant plus rigides et hydrophobes, favorisant ainsi leur agrégation. Cette agrégation est plus rapide avec les plus grands oligomères et a comme particularité d'être réversible en fonction de la température. D'après ces résultats, le refroidissement des pommeaux dans un premier temps pour potentialiser le trouble, avant de l'éliminer par une filtration à froid est une solution technologique à envisager.

### 2.3.2 Vin

Le travail mené en solutions modèles (vin blanc et vin rouge) a été réalisé avec un suivi de la turbidité (trouble) dans le temps. Le choix des composés évalués et l'analyse de leur niveau de concentration ont été effectués à partir des résultats de l'analyse des troubles. Du fait des nombreux facteurs à évaluer, les plans d'expériences ont été optimisés. Au total 86 modalités ont été suivies : 27 en solution modèle « vin rouge » pour deux rapports anthocyanes/tanins et 32 en solution modèle « vin blanc ». Les modalités étudiées sont reprises dans le Tableau 1.

**Tableau 1** : Plan expérimental pour les solutions modèles vin blanc et vin rouge

	Vins rouges	Vins blancs
Paramètres	[polyphénols] : 0-5 g/L [polysaccharides] : 0 – 1 g/L pH : 3,2-4,0 [Cu 2+] : 0- 0,2 mg/L Rapport anthocyanes/tanins *	[Protéines] : 0- 200 mg/L [polyphénols] : 0-800 mg/L [polysaccharides] : 0-500 mg/L pH : 3,0-3,8 Force ionique : 20-150 mM
Grandeurs observées	[O <sub>2</sub> ] Turbidité Evolution des polyphénols dans le surnageant	[O <sub>2</sub> ] Turbidité Evolution des protéines solubles

Pour le modèle vin rouge, le traitement statistique des données de turbidité a permis de mettre en évidence les paramètres statistiquement significatifs pour les différents moments d'observation. Ainsi après une durée de 14 semaines, l'impact des concentrations en polyphénols et en polysaccharides est significatif pour les solutions modèles les plus riches en anthocyanes. Pour les solutions modèles, les plus riches en tanins, les polysaccharides n'ont pas d'impact significatif. Seuls, le pH, son terme quadratique et son terme d'interaction avec la concentration en polyphénols ont un impact significatif. Parallèlement au suivi de turbidité, un suivi de l'évolution dans le surnageant de la concentration en polyphénols a été réalisé. Ainsi, après 14 semaines, la concentration en anthocyanes libres a diminué entre 50 et 90 %, avec une évolution différente en fonction du pH, de l'anthocyane dosée et du rapport tanins/anthocyanes. La même évolution est observée pour la concentration en flavanols monomères libres dans la quasi-totalité des modalités. Enfin, dans tous les échantillons, on observe toujours dans le surnageant après 14 semaines, une diminution plus ou moins marquée du rendement de dépolymérisation, ce qui indique la formation de tanins oxydés et de pigments anthocyanes-tanin dans le trouble. Les expérimentations en solutions modèles « vins rouges » ont permis de mettre en évidence différents points : i) la relation entre les phénomènes d'oxydations et la formation des troubles, ii) le rapport anthocyane / tanins est un déterminant dans la formation du trouble, iii) le pH joue un rôle important sur l'oxydation (pour les vins les plus riches en anthocyanes) et sur la turbidité (pour les vins les plus riches en tanins) et enfin iv) le cuivre n'a pas de rôle décisif dans la formation de trouble.

Pour les solutions modèles « vin blanc », on observe des comportements totalement différents en début de suivi de cinétique et au bout de 8 semaines. En début d'expérimentation, la concentration en protéines, et ses interactions avec le pH et la force ionique, ainsi que la concentration en

polysaccharides et ses interactions avec le pH et la force ionique sont statistiquement significatifs. Après 8 semaines, c'est uniquement la concentration en polyphénols qui devient décisive. Parallèlement, le suivi de l'évolution dans le surnageant de la concentration en protéines montre que les protéines « thaumatin-like » (22 kDa et 19 kDa) sont les premières à précipiter au cours du temps, alors que les invertases, présentes en plus petites quantités à l'origine, restent stables plus longtemps (i.e. ne précipitent pas). Pour expliquer ces observations plusieurs hypothèses ont été envisagées sans qu'il soit possible de trancher : i) certains tanins oxydés moins solubles s'agrègent et contribuent fortement au trouble, ii) les tanins oxydés interagissent plus avec les protéines (ou avec une plus grande variété de protéines), iii) la dénaturation des protéines favorise les interactions entre protéines et polyphénols, enfin iv) des réactions chimiques entre protéines et polyphénols conduisent à la formation d'espèces moins solubles.

### **2.3.3 Bière**

Devant l'impossibilité de préparer des fractions pures de polyphénols et de protéines issues de bières, préalable nécessaire à des essais de précipitations contrôlées, le travail initialement prévu a été réorienté en fin de projet vers des analyses qualitatives des protéines par les méthodes de protéomique. Quatre protéines issues de l'orge ont pu être identifiées dans les troubles en grande abondance. Si le travail mené dans le projet n'a pas permis d'étudier la formation des troubles dans la bière, il apparaît que les outils de protéomique peuvent être utilisés et qu'il est possible de concevoir des études de matière première ou des études planifiées des procédés technologiques pour réduire le risque de trouble.

## **3. Tests prédictifs de déstabilisation**

### *3.1 Objectif et démarche*

Il s'agit d'améliorer ou de développer de nouveaux tests prédictifs de stabilité et d'instabilité colloïdale à la fois à partir des acquis du travail sur l'élucidation des mécanismes de formation des troubles, mais aussi des tests déjà existants mais parfois peu pertinents. Les échanges entre les différentes filières des protocoles et de tests novateurs ont permis une réelle plus-value sur ce travail.

### *3.2 Principaux résultats obtenus*

#### **3.2.1 Produits cidricoles**

L'objectif initial était d'adapter le test prédictif du trouble du pommé déjà existant au cidre et au jus de pomme. Ce test prédictif existant consiste à réaliser, sur produit limpide et prêt à la mise en bouteille, 3 cycles chaud/froid et de mesurer la turbidité finale à une température de 10°C, l'instabilité du produit étant corrélée à la valeur de turbidité finale. Les travaux effectués ont montré que le test pommé n'est pas extrapolable au cidre et au jus de pomme, ce qui est conforme avec des mécanismes de déstabilisation colloïdale différents. Néanmoins, ces travaux ont fait ressortir, pour la première fois à notre connaissance, une forte réversibilité du trouble des pommés avec l'élévation de la température.

#### **3.2.2 Vins blancs et rosés**

Le travail effectué a porté sur l'optimisation des conditions de réalisation du test à la chaleur avec l'objectif de limiter le taux de faux positifs. Il a été réalisé sur 23 vins provenant de 5 régions viticoles (Alsace, Bordelais, Languedoc, Val de Loire, Provence) et de 8 cépages différents. Différentes modalités de prétraitement du vin (dose de bentonite et standardisation du pH à 3-4) et d'intensité de traitement thermique du test ont été évaluées en comparaison avec un traitement de référence (bouteilles à l'étuve à 35°C pendant 15 jours). Les résultats ont tout d'abord permis de mettre en évidence le comportement atypique des vins de Gewurztraminer, qui réagissent peu à un chauffage

modéré (40°C, 30 mn), contrairement au Sauvignon et surtout aux vins rosés, alors que ces mêmes vins de Gewurztraminer réagissent beaucoup à un chauffage important (80°C, 30 mn). La comparaison entre les différents traitements thermiques montre que :

- Le test à la chaleur 80°C / 30 mn n'est pas adapté à l'évaluation du risque d'apparition du trouble (absence de corrélation). La stratégie de collage appliquée avec ce test consiste à éliminer toutes les protéines qui réagissent à cette température même si elles ne risquent pas de provoquer un trouble ; ce test conduit à des traitements de collage inutiles.
- Le test à la chaleur 40°C pendant 4 heures est mieux corrélé au suivi à l'étuve mais les écarts peuvent être importants. Pour une même réponse au test, on peut avoir des évolutions différentes à 35°C. Les différences de comportement selon les cépages sont également très nettes.
- Le test à la chaleur 40°C pendant 30 mn donne des résultats comparables au précédent pour le sauvignon et les vins rosés. Par contre, il n'est pas adapté au Gewurztraminer.

### **3.2.3 Vins rouges**

Des tests « au froid » permettent déjà d'apprécier la tenue de la couleur des vins rouges (i.e. apparition du trouble), mais les conditions de réalisation du test (durée, température de lecture et prétraitement de l'échantillon) entraînent des variations sur le résultat du test. Il s'agissait donc d'optimiser les conditions de réalisation des tests prédictifs. Les résultats des travaux ont permis de constater que : i) pour des vins en fin de préparation à la mise ou après mise en bouteille, il ne semble pas souhaitable de réaliser une centrifugation avant le test, ii) l'instabilité au froid est rendue plus intense avec la présence de polyaspartate de potassium et de gomme de cellulose ; ainsi, un de ces produits pourrait aussi permettre de rendre plus sensible un test au froid, et enfin iii) un test avec plusieurs alternances chaud / froid ou froid / chaud pourrait avoir un intérêt.

### **3.2.4 Bière**

Comme pour le vin rouge, il existe déjà de nombreuses méthodes pour prédire la stabilité colloïdale d'une bière. Certains tests sont basés sur un trouble « global » (traitement thermique), comme les tests forcés, d'autres uniquement sur les protéines (protéines sensibles) et d'autres sur les polyphénols (quantification des flavonoïdes ou tanins). L'objectif a été à la fois d'améliorer le test « global » en travaillant sur la durée d'incubation du test et le nombre de cycles de température mais aussi de comparer ce test aux autres méthodes d'évaluation de l'instabilité. Globalement, les nouvelles méthodes d'évaluation testées lors du projet ne permettent pas d'améliorer la fiabilité de la prévision du trouble. En revanche, les travaux ont permis de montrer et de confirmer que le test de stabilité forcée est le test le plus performant.

## **4. Itinéraires technologiques permettant de limiter l'occurrence des troubles**

### *4.1 Objectif et démarche*

L'objectif initial était, à partir des acquis scientifiques, de mieux cibler les traitements préventifs de stabilisation en optimisant les méthodes physiques ou les doses d'auxiliaires technologiques en fonction de la sensibilité des produits.

### *4.2 Principaux résultats obtenus*

#### **4.2.1 Cidre**

Suite à la mise en évidence du rôle de l'oxydation dans la formation des troubles, des mesures d'oxygène dissous dans des cidres mis en bouteille dans une cidrerie industrielle, présentant des



problèmes récurrents de trouble post-embouteillage, ont été réalisées. Ces mesures ont permis de montrer que les cidres présentaient parfois des quantités importantes à très importantes d'oxygène (> 5 mg/L) après l'embouteillage. Suite à ce constat, des essais d'ajout d'un mélange de SO<sub>2</sub> et d'acide ascorbique lors de l'étape de mise en bouteille ont été réalisés afin de faire baisser significativement le taux d'oxygène dissous. Cet ajout s'est révélé efficace pour prévenir l'apparition et l'intensité du trouble en bouteille, après 12 mois de mise en bouteille. Ainsi, sans forcément comprendre les mécanismes sous-jacents, ces essais montrent que le contrôle de l'oxygène à la mise en bouteille est un levier important pour limiter l'apparition du trouble dans les cidres.

Ces résultats ont aussi montré, sur l'échantillonnage expérimental de la cidrerie industrielle, que les cidres bio développent une turbidité plus importante en l'absence de protection vis-à-vis de l'oxygène. Deux hypothèses sont possibles pour expliquer ces observations : i) la plus faible quantité de SO<sub>2</sub> (protection vis-à-vis de l'oxygène) utilisée pour les cidres bio que pour les cidres conventionnels et ii) l'impact du mode de culture des pommes avec par exemple une possible plus grande richesse en protéines de défense dans les fruits. Les résultats obtenus dans ce projet n'ont pas permis de trancher entre ces deux hypothèses.

#### **4.2.2 Pommeau**

D'après les connaissances acquises sur l'élucidation des mécanismes de formation des troubles (potentialisation du trouble à froid), des essais de microfiltration tangentielle (MFT) ont été réalisés à différentes températures. Les microfiltrations à des températures inférieures à 2°C se sont révélées très efficaces pour éliminer l'apparition du trouble. D'autres essais, réalisés à l'échelle pilote, ont aussi montré l'importance du seuil de coupure. Ainsi, pour un même pommeau, la turbidité était toujours inférieure à 1 NTU plus d'un an après MFT après un passage sur membrane à 0,14 µm, alors qu'elle était proche de 10 NTU après un passage sur une membrane de 1,4 µm. Après avoir validé ces résultats à l'échelle pilote, des essais de MFT (seuil de 0,14 µm) à froid ont été réalisés chez deux élaborateurs de pommeau, en comparaison de leur pratique habituelle, avec des résultats très probants. En prenant en compte l'ensemble des expérimentations réalisées, la microfiltration tangentielle à 0,14 µm à basse température (< 2°C) a permis de stabiliser parfaitement les pommeaux dans 80% des cas (< 10 NTU pendant 1 an).

#### **4.2.3 Vins blancs et rouges**

Pour les vins, les résultats obtenus sur l'élucidation des mécanismes de formation des troubles sont arrivés trop tardivement pour abonder le travail sur la recherche de nouveaux itinéraires.

Néanmoins, des essais en cave, sur deux millésimes, ont montré que les collages notamment avec la bentonite, permettent une amélioration de la stabilité de la couleur des vins rouges traités. Suite aux résultats positifs obtenus sur pommeau, la microfiltration tangentielle à froid a été testée. Les tests de stabilité ont montré qu'après un stockage au froid pendant 7 jours, la turbidité du vin est plus forte pour celui dont la MFT a été effectuée à 20°C que pour celui dont la MFT a été réalisée à 2°C. Néanmoins, cette différence n'est pas sensible lorsque le vin retrouve la température ambiante. Ce procédé ne semble donc pas aussi efficace que sur le pommeau.

#### **4.2.4 Bière**

Suite aux résultats obtenus lors de l'analyse des troubles, en particulier sur la surconcentration des ions divalents dans le trouble, et afin de proposer un itinéraire technologique innovant, un nouveau traitement de stabilisation par ajout d'EDTA et/ou d'EGTA afin de chélater les ions divalents, potentiellement responsables d'une partie du trouble de la bière, a été évalué. Ce traitement a été comparé à deux traitements stabilisants connus et efficaces : i) le collage à l'aide de PVPP et ii) un cocktail d'endoprotéases.

Les résultats montrent que le traitement des bières avec différentes doses d'EDTA ou d'EGTA permet certes de diminuer la turbidité des bières de 25%, mais qu'il est moins efficace que le traitement de référence avec un cocktail d'endoprotéases.

## Conclusion

L'analyse fine des constituants du trouble a montré la présence de polyphénols (principalement des procyanidines), de polysaccharides, de protéines et de minéraux pour l'ensemble des produits analysés. Une part non négligeable de la masse des troubles reste non expliquée et correspond probablement à des polyphénols oxydés (procyanidines oxydés). Ces résultats ont aussi permis de formuler des hypothèses concernant les composés impliqués dans la formation de trouble en fonction du type de produits.

La purification de macromolécules susceptibles d'intervenir dans la formation du trouble a ensuite été réalisée sur l'ensemble des produits avec plus ou moins de difficultés.

Sur les produits cidricoles et les vins, la compréhension des phénomènes de formation de trouble a été réalisée par des expérimentations planifiées en solutions modèles mettant en contact les différents acteurs potentiels du trouble. Dans le pommé, la formation du trouble semble s'expliquer par l'oxydation d'oligomères de procyanidines sans la nécessité d'autres constituants. Cette oxydation procède essentiellement par la formation de nouvelles liaisons covalentes dans la structure des tanins, les rendant plus rigides et hydrophobes, favorisant ainsi leur agrégation. Cette agrégation est plus rapide avec les plus grands oligomères et est réversible en fonction de la température. Pour le jus de pomme, les travaux ont permis d'identifier précisément les protéines particulièrement impliquées dans la formation de trouble. Il a été également montré que la dénaturation de ces protéines par un traitement thermique pouvait générer un trouble, et cela même à faibles concentrations et sans la présence nécessaire de procyanidines. Pour les vins rouges, les résultats montrent : i) une relation entre les phénomènes d'oxydation et la formation des troubles, ii) que la composition phénolique (notamment le rapport anthocyanes / tanins) est un facteur déterminant dans la formation des troubles et que iii) le pH joue un rôle important sur l'oxydation (pour les vins les plus riches en anthocyanes) et sur la turbidité (pour les vins les plus riches en tanins). Pour les vins blancs, le suivi de l'évolution des protéines dans le surnageant montre une différence d'instabilité (faculté à précipiter) entre les différentes protéines sans qu'il soit possible de trancher sur les hypothèses des mécanismes sous-jacents (interactions polyphénols / protéines).

Pour la bière, il n'a pas été possible de séparer les 3 fractions : polyphénols, protéines et polysaccharides. L'approche en plan d'expérience réalisée sur vins et produits cidricoles n'a pas pu être réalisée, néanmoins un travail de protéomique a permis d'identifier les protéines présentes dans le trouble. L'identification par cette méthode permettra dans le futur d'évaluer la pertinence de procédés et d'orienter le choix du matériel variétal. L'ensemble des travaux de recherche ont également abouti à de nombreuses valorisations scientifiques (thèse, articles dans des revues à comité de lecture, rapports de stages de master).

Sur le plan plus applicatif, les instituts techniques ont travaillé sur l'amélioration de la fiabilité des tests prédictifs. Ce travail a permis de revisiter et de comparer les tests existants avec de nouvelles modalités plus particulièrement en bière et en vin. Suite aux résultats obtenus sur les mécanismes de déstabilisation colloïdale, des travaux sur les itinéraires technologiques et méthodes de stabilisation ont été réalisés. Pour les cidres et les pommés, des solutions technologiques (contrôle de l'oxygène à la mise en bouteille et microfiltration tangentielle à froid) ont pu être mises en œuvre en pilote et testées avec succès en cidrerie. Pour les autres produits (jus de pomme, bière et vins), les travaux sur la compréhension ayant abouti plus tardivement, les essais n'ont pu être réalisés qu'en pilote mais les résultats ouvrent déjà des perspectives d'application intéressantes.

### Références bibliographiques

Millet M., Poupard P., Le Quere J.M., Bauduin R., Guyot S., 2017. Haze in Apple-Based Beverages: Detailed Polyphenol Polysaccharide, Protein, and Mineral Compositions. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, Aug 9 ; 65(31), 6404-6414

Millet M., Poupard P., Guillois-Dubois S., Zanchi D., Guyot S., 2019. Self-aggregation of oxidized procyanidins contribute to the formation of heat-reversible haze in apple-based liqueur wine. *Food Chemistry*, 276, 797-805

Millet M., Poupard P., Guillois-Dubois S., Poiraud A., Fanueld M., Rogniaux H., Guyot S., 2020. Heat-unstable apple pathogenesis-related proteins alone or interacting with polyphenols contribute to haze formation in clear apple juice. *Food Chemistry* 309, 125636

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0).



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « *Innovations Agronomiques* », la date de sa publication, et son URL ou DOI).