



HAL
open science

IMPACT DES ENZYMES DE MACERATION SUR LA COMPOSITION EN POLYSACCHARIDES ET EN POLYPHENOLS DES VINS ROUGES – ETUDE DE L’EVOLUTION DE CES COMPOSES EN SOLUTION MODELE VIN.

Marie-Agnès Ducasse

► **To cite this version:**

Marie-Agnès Ducasse. IMPACT DES ENZYMES DE MACERATION SUR LA COMPOSITION EN POLYSACCHARIDES ET EN POLYPHENOLS DES VINS ROUGES – ETUDE DE L’EVOLUTION DE CES COMPOSES EN SOLUTION MODELE VIN.. Chimie. Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc, 2009. Français. NNT : . tel-00425504

HAL Id: tel-00425504

<https://theses.hal.science/tel-00425504>

Submitted on 21 Oct 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

Année 2009

//_/_/_/_/_/_/_/

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : *Biochimie, chimie et technologie des aliments*
Ecole Doctorale : *Sciences des Procédés - Sciences des Aliments*

Présentée et soutenue publiquement

Le 29 juin 2009

par

Marie-Agnès DUCASSE

**IMPACT DES ENZYMES DE MACERATION SUR LA COMPOSITION EN
POLYSACCHARIDES ET EN POLYPHENOLS DES VINS ROUGES –
ETUDE DE L'EVOLUTION DE CES COMPOSES EN SOLUTION MODELE
VIN.**

Directeur de thèse : Véronique Cheynier
Co-Encadrants : Thierry Doco et Hélène Fulcrand

JURY

Mme RENARD C., Directeur de Recherche, INRA Avignon	Président
Mme CHEYNIER V., Directeur de Recherche, INRA Montpellier	Directeur
Mme RALET M-C., Chargé de recherche, INRA Nantes	Rapporteur
Mr RICARDO DA SILVA J., Professeur, Universidad Técnica de Lisboa, Portugal	Rapporteur
Mme CANAL-LLAUBERES R-M., Responsable Application Vin, Novozymes France	Examinateur
Mr VILLETAZ J-C., Professeur, Directeur R&D HES-SO Valais, Suisse	Examinateur

Ces travaux de thèse ont été réalisés à l'Institut de la Recherche Agronomique de Montpellier au sein de l'Unité Mixte de Recherche Sciences Pour l'Oenologie.

Je tiens à remercier Mme Marie-Christine Ralet, Chargé de recherche à l'INRA de Nantes et M. Jorge Ricardo Da Silva, Professeur à l'Université Technique de Lisbonne, d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Un très grand merci à Mme Catherine Renard, Directeur de Recherche à l'INRA d'Avignon, qui m'a fait l'honneur d'assurer la présidence du jury.

J'ai également été très honorée que M. Jean-Claude Villettaz, Professeur et Directeur R&D de HES-SO Valais, ait accepté d'examiner ce travail.

Je remercie tout particulièrement Véronique Cheynier, Directeur de recherche à l'INRA de Montpellier, pour avoir si bien encadré ma thèse et veiller à son bon déroulement, pour son savoir, sa disponibilité.

J'exprime ma gratitude à Thierry Doco pour avoir encadré la partie « polysaccharide » de mon sujet ainsi qu'à Pascale Williams pour leur soutien, pour tous les bons moments passés à chercher les « oligos » et pour avoir démasqué le « 605 ». Je remercie également Hélène Fulcrand pour avoir encadré la partie « polyphénol » de mon sujet.

Je remercie Novozymes et Laffort Oenologie pour avoir financé ces travaux. J'adresse tout particulièrement mes sincères remerciements à Rose-Marie Canal-Llaubères pour m'avoir suivie au quotidien, pour m'avoir fait connaître le « WEC », pour son organisation sans faille. Merci à Marie De Lumley qui, pendant un et demi, m'a également encadrée et à Virginie Moine-Ledoux pour avoir pris le relais par la suite.

Je ne sais comment remercier Jean-Marc Souquet, mon mentor « polyphénols », leur analyse n'a plus aucun secret pour lui. Merci pour ces trois années merveilleuses dans ton bureau, ton soutien, ton dynamisme, ta bonne humeur... Merci à Christine également pour ces petites attentions et sa joie de vivre.

Merci à Teresita pour ses bons conseils en matière de théâtre, merci à Manue pour tous ces précieux conseils en masse mais surtout pour votre soutien quotidien et votre amitié.

Merci à Jean-Paul, j'espère un jour qu'on partira aux Maldives...

Merci à Pascale pour ces attentions quotidiennes, son soutien « capillaire », pour avoir été là aux urgences, vive les savonnettes...

Merci à Aude et Céline pour leurs précieux conseils scientifiques et leur œil expert en matière de turbidité. Merci à Virginie avec qui j'aurai beaucoup aimé faire de la modélisation.

Merci à Gérard pour son expertise en statistique ainsi qu'à Jean-Claude pour l'infrarouge.

Merci à Fred et Claire Bouchut pour tous leurs coups de main, ainsi qu'à Arnaud, Stéphanie et Nicolas (Monsieur masse exacte).

Pour l'ambiance au quotidien et leur soutien, merci à Nancy, Agnès, Vivi, Jacqueline, Philippe, Jocelyne, aux Picoux, Hélène N., Jérémie, Isabelle (encore merci pour les publis), Frank, Fancis C..anon (bon courage pour la fin de thèse), Chloé (les derniers moments en ta compagnie, ont été précieux), Laetitia, Maeva, Marc, Eric, Maryam, Laurent, David, Rosy, Jean-Paul L., Aurélie, Axelle, Evelyne (...et sa caméra), Carine, Flo, Baloo, Louise, Marguerite, la chorale SPO, Clotilde, Jean-Luc, Martine, Fida, Soline, Violetta, Rafa, Lila et à tous ceux que j'aurais pu oublier...

Une dédicace spéciale et un énorme merci à Anysia pour son soutien au niveau travail et évidemment en dehors, pour tous les bons moments qu'on a partagé.

Merci également à Emilie, Mumu, Aurélie, Paméla et les amis, la belle famille : Bettina, Steph, Téo, Juju, Quentin, Alain, Nanette, Sylvie et Didier.

Ma plus grande gratitude va à Diloy pour son soutien, sa patience, et tout ce qu'il m'apporte au quotidien.

Pour finir, cette thèse n'aurait pas été réalisable sans ma famille : mes parents, Christian et Aline, à qui je dois énormément, la « may », le « pay », les taties et les tontons, les cousins, cousines... merci infiniment.

Valorisation des travaux de recherche

Publications :

Ducasse M-A, Williams P, Meudec E, Cheynier V & Doco T. *Isolation of Carignan and Merlot red wine oligosaccharides and their characterization by ESI-MS.* Carbohydrate Polymers, soumise pour publication.

Ducasse M-A, Canal-Llaubères R-M, De Lumley M, Williams P, Souquet J-M, Fulcrand H, Doco T & Cheynier V. *Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines.* Food Chemistry, Volume 118, Issue 2, 15 January 2010, Pages 369-376.

Présentations orales à des Congrès Internationaux :

Ducasse M-A, Canal-Llaubères R-M, De Lumley M, Williams P, Souquet J-M, Fulcrand H, Doco T & Cheynier V. *Effect of enzymatic treatment on polyphenol and polysaccharide composition of red wines.* Macrowine 2008, **4-6 juin 2008**, lieu : Montpellier, France.

Ducasse M-A, Williams P, Meudec E, Cheynier V & Doco T. *Identification of Wine Oligosaccharides by ESI-TOF.* VIème symposium In Vino Analytica Scientia, **2-4 juillet 2009**, lieu : Angers, France.

Présentations de posters à des Congrès Internationaux :

Ducasse M-A, Canal-Llaubères R-M, De Lumley M, Souquet J-M, Fulcrand H, Cheynier V. *Impact of enzymatic treatments on polyphenolic composition of red wines.* VIIIème Symposium International d'Oenologie de Bordeaux, **25-27 juin 2007**, lieu : Bordeaux, France.

Ducasse M-A, Canal-Llaubères R-M, De Lumley M, Williams P, Doco T & Cheynier V. *Modification of wine polysaccharide composition induced by pectinase preparations.* IIIème Conférence Internationale « Pectins and Pectinases », **21-23 avril 2008**, lieu : Wageningen, Pays-Bas.

Réunion transversale INRA :

Ducasse M-A, Canal-Llaubères R-M, De Lumley M, Williams P, Souquet J-M, Fulcrand H, Doco T & Cheynier V. *L'impact des traitements enzymatiques sur la composition polyphénolique et polysaccharidique des vins rouges.* Journées Polyphénols et Micronutriments, **14-15 novembre 2006**, lieu : INRA Montpellier, France.

Présentations orales à des séminaires industriels

Ducasse M-A, Canal-Llaubères R-M, De Lumley M, Williams P, Souquet J-M, Fulcrand H, Doco T & Cheynier V. *Optimisation de la macération en rouge.* V^{ème} Rencontres Techniques organisées par Laffort Oenologie, **30 avril 2009**, lieu : La Grande Motte, France

Ducasse M-A, Canal-Llaubères R-M, De Lumley M, Williams P, Souquet J-M, Fulcrand H, Doco T & Cheynier V. *Effet des enzymes de macération sur la composition des vins rouges.* Séminaire Laffort Oenologie, **27 mai 2009**, lieu : San Sebastian, Espagne.

LISTE DES ABREVIATIONS

%egc	pourcentage d'épigallocatechine
%gal	pourcentage d'épi-3-O-gallate
ACP	analyse en composante principale
AG-I	arabinogalactane type I
AG-II	arabinogalactane type II
AGP	arabinogalactane protéine
AGX	arabinoglucuronoxylane
ara	arabinose
AX	arabinoxylane
D _{Pm}	degré moyen de polymérisation
gal	galactose
gal A	acide galacturonique
GX	glucuronoxylane
HG	homogalacturonane
MP	mannoprotéine
Mv	malvidine
PG	polygalacturonase
PL	pectine lyase
PME	pectine méthylestérase
Pn	péonidine
PRAG	polysaccharides riches en arabinose et galactose
RG-I	rhamnogalacturonane type I
RG-II	rhamnogalacturonane type II
rha	rhamnose
XG	xyloglucane

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	9
SOMMAIRE.....	11
CONTEXTE ET SITUATION DU SUJET	17
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	20
I. LA BAIE DE RAISIN.....	20
A. LA STRUCTURE GENERALE DES PAROIS DE LA BAIE DE RAISIN	20
1. <i>Le réseau cellulose-hémicellulose</i>	21
a. Cellulose	21
b. Les hémicelluloses	22
➤ Xyloglucanes (XGs).....	23
➤ Xylanes	23
2. <i>Les polysaccharides pectiques</i>	24
a. Homogalacturonanes (HG).....	25
b. Rhamnogalacturonane I (RG-I).....	26
c. Rhamnogalacturonane II (RG-II)	29
3. <i>Les glucanes</i>	31
a. β -(1→3) glucanes	31
b. Glucanes mixtes	32
4. <i>Les enzymes de la baie de raisin</i>	32
a. Les pectinases	32
➤ Les glycosylhydrolases des pectines	32
➤ Les estérases	34
➤ Les lyases	34
b. Cellulases et hémicellulases	34
B. LES PRINCIPAUX COMPOSES PHENOLIQUES DU RAISIN	35
1. <i>Les composés non flavonoïdes</i>	35
a. Les acides phénols	36
b. Les stilbènes	36
2. <i>Les composés flavonoïdes</i>	37
a. Les anthocyanes.....	37
b. Les flavan-3-ol ou flavanols.....	38
➤ Les unités monomériques.....	39
➤ Les tanins condensés	40
c. Les flavonols	41
d. Les flavanonols	42
II. DU RAISIN AU VIN	42
A. LES POLYSACCHARIDES DU VIN	42
1. <i>Les mannoprotéines (MP)</i>	43
2. <i>Les polysaccharides riches en arabinose et galactose (PRAG)</i>	43
3. <i>Le rhamnogalacturonane de type II (RG-II)</i>	44
4. <i>Les oligosaccharides</i>	46
B. LES COMPOSES PHENOLIQUES DU VIN	46
1. <i>Les acides phénols</i>	46
2. <i>Les anthocyanes</i>	48
a. Equilibre des anthocyanes en milieu acide.....	49

b. Réactions avec le dioxyde de soufre	51
c. Dégradation des anthocyanes	51
d. La couleur des vins.....	52
➤ La copigmentation intermoléculaire.....	52
➤ La copigmentation intramoléculaire.....	52
➤ L'auto-association	52
➤ La mesure de la couleur des vins	53
3. <i>Les tanins et leurs propriétés</i>	53
a. Les phénomènes d'interactions tanins-tanins et tanins-polysaccharides.....	53
b. Les phénomènes d'interactions entre tanins et protéines	54
4. <i>Réactions des tanins et des anthocyanes</i>	55
a. Produits de type pyranoanthocyane	56
b. Produits de type A-T	57
c. Produits de type T-T et T-A	58
d. Réactions via les aldéhydes	60
e. Caractéristiques physico-chimiques des pigments dérivés.....	61
C. L'UTILISATION DES ENZYMES EN OENOLOGIE	62
1. <i>Applications technologiques des préparations enzymatiques commerciales</i>	63
a. Le débouillage des moûts et la clarification des vins	63
b. L'amélioration des rendements en jus.....	63
c. L'amélioration des extractions lors des macérations.....	63
d. L'amélioration de la filtrabilité des vins	64
e. La libération d'arôme à partir des précurseurs glycosylés	64
2. <i>Les enzymes de macération et leur impact sur la couleur, sur la composition en polyphénols et en polysaccharides</i>	64
a. Enzymes de macération et composition en polysaccharides	65
b. Enzymes de macération et composition en polyphénols.....	65
MATERIEL & METHODES.....	68
I. MATERIEL	68
A. VINS	68
1. <i>Cadre de l'étude</i>	68
2. <i>Préparation des essais</i>	68
B. SOLUTIONS MODELES	71
1. <i>Préparation des fractions</i>	71
a. Fraction de tanins	71
➤ Extraction des tanins de pépins de raisin	71
➤ Fractionnement de l'extrait de tanins de pépins.....	71
b. Fraction d'anthocyanes	72
c. Fraction d'arabinogalactane-protéine	73
d. Fraction de rhamnogalacturonane II.....	73
e. Fraction d'oligosaccharides.....	73
➤ Dégradation d'acide pectique.....	73
➤ Purification de la fraction d'oligosaccharides	74
2. <i>Préparation des solutions en milieu modèle vin</i>	74
a. Modèle vin.....	74
b. Conditionnement des solutions	75
c. Incubation des solutions	75
II. METHODES	75
A. PLAN D'EXPERIENCE ET SUIVI CINETIQUE DES SOLUTIONS MODELES	75

B. ANALYSE DES VINS ET DES SOLUTIONS MODELES	76
1. <i>Caractérisation et dosage des polysaccharides</i>	76
a. Préparation de la fraction de polysaccharides des vins	76
b. Analyse des masses molaires apparentes des polysaccharides	76
➤ Dans les vins.....	76
➤ Dans les solutions modèles	77
c. Analyse de la composition en oses neutres des vins	77
2. <i>Caractérisation des oligosaccharides des vins</i>	79
a. Préparation de la fraction d'oligosaccharides.....	79
b. Analyse des oses neutres et acides par triméthylsilylation	79
c. Analyse des liaisons glycosidiques par perméthylation	81
d. Analyse par spectrométrie de masse	83
➤ Analyse par ESI-IT.....	83
➤ Analyse par fragmentation	84
3. <i>Analyse de la couleur par spectrophotométrie UV-visible des vins et des solutions modèles</i>	84
a. Réactifs	85
b. Mesures	85
c. Calcul des indices de couleur	85
4. <i>Caractérisation et dosage des polyphénols</i>	86
a. Analyse par HPLC-DAD des vins.....	86
➤ Conditions d'analyse	86
➤ Caractérisation et dosage.....	87
b. Analyse par HPLC-DAD des tanins après phloroglucinolyse des vins et des solutions modèles	87
➤ Phloroglucinolyse des vins.....	88
➤ Phloroglucinolyse des solutions modèles.....	89
➤ Analyse par HPLC-DAD	89
c. Analyse par HPLC-DAD-ESI/IT-MS des solutions modèles	90
➤ Conditions des analyses HPLC	90
➤ Conditions des analyses par spectrométrie de masse	91
➤ Calibration et suivi des solutions modèles	91
5. <i>Analyse de la stabilité des solutions modèles par diffusion dynamique de la lumière</i>	92
6. <i>Analyse des précipités formés dans les solutions modèles après un an</i>	92
a. Analyse des précipités par IR	92
b. Analyse des précipités par HPCL-DAD-ESI/IT après phloroglucinolyse	92
7. <i>Analyse statistique des données</i>	92
RESULTATS ET DISCUSSION	94
CHAPITRE I. EFFET DES ENZYMES DE MACERATION SUR LA COMPOSITION EN POLYSACCHARIDES ET EN POLYPHENOLS DES VINS ROUGES.	94
I. RAPPEL DES ESSAIS ET CARACTERISATION DES VENDANGES	94
II. LES POLYSACCHARIDES ET LES OLIGOSACCHARIDES DES VINS	95
A. PROFIL DE DISTRIBUTION EN MASSES MOLAIRES DES POLYSACCHARIDES ISOLEES A PARTIR DES VINS ROUGES DE MERLOT	95
1. <i>Effet des préparations enzymatiques commerciales</i>	95

2. Effet de préparations non commerciales.....	98
3. Effet du temps de macération pré fermentaire à froid (MPF)	98
B. EFFET DES ENZYMES SUR LA COMPOSITION EN POLYSACCHARIDES	100
C. EFFET DES ENZYMES SUR LES OLIGOSACCHARIDES	104
1. Effet des enzymes sur le profil des masses des oligosaccharides	104
2. Effet des enzymes sur la composition en monosaccharides des oligosaccharides.....	106
3. Effet des enzymes sur la structure des oligosaccharides	108
4. Analyse de la fraction des oligosaccharides par spectrométrie de masse.....	111
a. Identification des ions.....	111
b. Analyse en composante principale (ACP) des spectres de masse des oligosaccharides des vins	117
D. BILAN.....	122
III. LA COULEUR DES VINS ROUGES ET LES POLYPHENOLS	123
A. EFFET DES ENZYMES SUR LA COULEUR DES VINS	123
B. EFFET DES ENZYMES SUR LES POLYPHENOLS	125
1. Identification et dosage des polyphénols par HPLC-DAD	125
2. Effet des enzymes sur les tanins et les anthocyanes	128
3. Effet des enzymes sur les acides phénols	130
C. MODULATION DE L'EFFET ENZYME PAR L'EFFET MILLESIME	133
III. CONCLUSION.....	135
CHAPITRE II. ETUDE DES POLYSACCHARIDES ET DES POLYPHENOLS EN MILIEU MODELE VIN.....	138
I. CARACTERISATION DES FRACTIONS ET PLAN D'EXPERIENCE.....	138
A. LES FRACTIONS DE POLYSACCHARIDES	138
1. La fraction d'AGP (G)	138
2. La fraction de RG-II (R).....	139
3. La fraction d'oligosaccharides (O).....	140
B. LES FRACTIONS D'ANTHOCYANES ET DE TANINS	142
1. La fraction d'anthocyanes (A).....	142
2. La fraction de tanins (T).....	142
C. RAPPEL DU PLAN D'EXPERIENCE.....	145
II. ETUDE DES POLYSACCHARIDES	145
III. ETUDE DE LA COULEUR.....	148
A. CINETIQUE DES PRINCIPAUX INDICES DE COULEUR	149
B. EVOLUTION DES SPECTRES D'ABSORPTION	154
C. EVOLUTION DE LA COULEUR DANS L'ESPACE CIELAB	155
IV. ETUDE DE LA STABILITE COLLOIDALE : CINETIQUE D'AGREGATION	158
V. ETUDE DES POLYPHENOLS	161
A. SUIVI DE LA DISPARITION DE LA MALVIDINE-3-O-GLUCOSIDE.....	161
B. IDENTIFICATION DES PRODUITS FORMES	162
B. ANALYSE DES STRUCTURES POLYMERIQUES PAR PHLOROGLUCINOLYSE.....	170
C. ANALYSE DES SOLUTIONS APRES UN AN D'EVOLUTION	176
1. Analyse des surnageants des solutions après un an.....	176

2. Analyse des tanins	179
3. Analyse des surnageants et des précipités par HPLC-MS après phloroglucinolyse.	180
4. Analyse des précipités par RMN ¹³ C du solide	184
5. Analyse des précipités par infrarouge	188
VI. CONCLUSION.....	190
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	192
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	196
ANNEXE 1. PUBLICATION	216
ANNEXE 2. SPECTRES DE MASSE EST-TI DES OLIGOSACCHARIDES DES VINS 2004 ET 2006	236
ANNEXE 3. PUBLICATION	242

CONTEXTE ET SITUATION DU SUJET

La transformation du raisin en vin est un procédé complexe et la qualité des vins dépend de nombreux facteurs relatifs à la qualité de la matière première et aux techniques de vinification employées. La qualité des vins rouges est en grande partie déterminée par les composés phénoliques, et plus particulièrement les anthocyanes, qui sont responsables de la couleur rouge, et les tanins, à l'origine de la sensation d'astringence. L'extraction de ces molécules à partir de la baie de raisin s'effectue pendant la phase de macération. Leur concentration dans les vins est modulée par la matière première (cépage, maturité,...) mais peut être également modifiée par les conditions de vinification. Les tanins et les anthocyanes extraits sont des molécules très réactives qui conduisent à la formation de nombreux produits dérivés contribuant également aux propriétés organoleptiques des vins. Ces réactions sont déterminées par les proportions des molécules natives extraites et notamment par le rapport entre tanins et anthocyanes. La maîtrise de la composition phénolique et de l'extraction est un enjeu important pour le vinificateur, notamment, la maîtrise de la stabilisation de la couleur par transformation des anthocyanes en d'autres pigments, au travers de réactions avec les tanins.

Des auxiliaires technologiques comme les enzymes ont été développés pour améliorer les procédés de vinification (macération, pressurage, clarification, élevage). Depuis plusieurs décennies, diverses préparations enzymatiques commerciales sont utilisées durant la phase de macération en vinification en rouge pour améliorer les rendements en jus de goutte et faciliter l'extraction des pigments et des tanins. Les cibles de ces préparations, à base de pectinases principalement, sont les polysaccharides des parois végétales qu'elles dégradent, ce qui entraîne une libération accrue des anthocyanes et des tanins dans le milieu liquide. Les polysaccharides ont la capacité d'interagir avec les composés phénoliques. L'adsorption des polyphénols sur les parois peut constituer un frein à leur extraction. Dans les vins finis, les interactions entre les polyphénols et les polysaccharides sont impliquées dans les propriétés organoleptiques des vins, plus particulièrement dans la modulation de la perception de l'astringence des tanins. L'utilisation d'enzymes est donc un moyen de modifier l'extraction des composés d'intérêt (polysaccharides et composés phénoliques) en dégradant la paroi de la baie de raisin, ce qui influe sur leur comportement ultérieur et les propriétés qualitatives des vins.

Cependant, dans la littérature, les résultats sur l'impact des traitements enzymatiques sont divergents : dans certains cas, ils ne modifient pas la composition phénolique des vins

tandis que dans d'autres cas, ils favorisent l'extraction des tanins mais pas celle des anthocyanes ou, parfois, une augmentation des concentrations des pigments ou de la couleur est observée. L'objectif de ce travail de thèse est donc de clarifier l'impact des enzymes de macération sur la composition en polysaccharides et en polyphénols des vins rouges, et de mieux comprendre l'effet qui en découle sur la couleur.

Dans un premier temps, il est important dans l'étude bibliographique de définir la baie de raisin et ses constituants (polysaccharides et polyphénols) puis les phénomènes de maturation de la baie et donc les enzymes du raisin et enfin le passage du raisin au vin des différents composés et l'utilisation des enzymes commerciales de macération.

Après ces rappels bibliographiques, nous présenterons l'étude, articulée autour de deux axes :

Axe 1 : Impact des enzymes de macération sur la composition en polysaccharides et en polyphénols des vins rouges.

Jusqu'à aujourd'hui, peu de travaux portant à la fois sur l'effet des traitements enzymatiques sur les polysaccharides et les polyphénols des vins rouges sont disponibles dans la littérature. Dans cette partie, les polysaccharides ont été quantifiés et, pour la première fois, les oligosaccharides ont été caractérisés. Ensuite, les anthocyanes, les tanins et les acides phénols ont été dosés et la couleur des vins a été analysée. L'étude de tous ces composés et de la couleur a permis de comparer l'effet de plusieurs préparations enzymatiques commerciales sur trois millésimes.

Axe 2 : Etude de l'évolution des polyphénols et des polysaccharides en milieu « modèle vin ».

Suite aux résultats obtenus dans la première partie de la thèse, le deuxième axe de recherche s'est orienté vers un travail en solution « modèle vin » pour mieux comprendre l'évolution des anthocyanes et des tanins en présence ou non de polysaccharides. Plusieurs paramètres ont été suivis au cours du temps : la couleur et la stabilité colloïdale des solutions suivant leur composition et la réactivité des composés.

Cette thèse a été co-financée par la société Novozymes et la société Laffort Œnologie. Réalisé au sein de l'équipe « Polyphénols et Interactions » de l'UMR Sciences pour l'Oenologie, ce travail s'intègre dans la thématique de l'équipe qui vise à connaître d'une part la structure des polyphénols et leur réactivité et d'autre part les mécanismes d'interactions

physico-chimiques impliquant ces composés et leur incidence sur les caractéristiques des vins ou sur l'efficacité/la sélectivité des procédés technologiques mis en œuvre.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA BAIE DE RAISIN

Le mûrissement de la baie de raisin se traduit par le ramollissement, le changement de couleur, l'accumulation de sucres associée à une diminution de l'acidité et la synthèse de composés aromatiques. La paroi joue plusieurs rôles importants positifs sur la baie :

- elle participe à la cohésion des cellules et confère donc les propriétés mécaniques de fermeté et de texture à la baie,
- elle représente une protection vis-à-vis de l'attaque d'agents pathogènes et est impliquée dans les phénomènes de résistance.

Par ailleurs, en vinification, elle peut constituer un frein à la diffusion de composés recherchés dans les vins comme les polyphénols.

Dans cette première partie, quelques généralités sur la structure des parois, les enzymes présentes et la composition en polyphénols de la baie sont abordées.

A. LA STRUCTURE GENERALE DES PAROIS DE LA BAIE DE RAISIN

La paroi est une structure complexe et dynamique composée de polysaccharides de haut masses moléculaire (Fry, 2004; McCann *et al.*, 2001; Ridley, O'Neill & Mohnen, 2001) et de protéines (respectivement 90 et 10% en poids sec). Les protéines sont divisées en deux types : les protéines à activité catalytique (enzymes) et les protéines structurales. Des cations tels que Ca^{2+} (1 à 5% du poids sec) participent également aux propriétés physiques des parois, principalement à travers leur interaction avec les polysaccharides pariétaux. Les parois renferment également des lipides ainsi que des substances de faible masse moléculaire, tels que d'autres minéraux ou encore des composés aromatiques et phénoliques ainsi que des petites molécules telles que des sucres circulants. Dans le cas du raisin, en vinification la paroi joue un rôle de barrière dans les mécanismes d'extraction des constituants du raisin.

Le modèle architectural communément admis des parois primaires comprend trois domaines de structures indépendantes interconnectés entre eux (Carpita & Gibeaut, 1993)(Figure 1). Le premier domaine est constitué par le réseau cellulose-hémicellulose dans lequel est enchevêtré le second domaine constitué de la matrice pectique (polysaccharides pectiques composés de HG : homogalacturonane, RGI : rhamnogalacturonane, RGII : rhamnogactaturonane de type II, voire dans certain cas d'apiogalacturonane, de

xylogalacturonane (Visser & Voragen, 1995). Le troisième domaine est représenté par les protéines pariétales de structure (extensines).

Dans les modèles couramment décrits, le réseau cellulose-hémicellulose supporterait la structure des parois. La présence des hémicelluloses empêcherait l'agrégation des microfibrilles de cellulose insolubles facilitant ainsi l'expansion des parois (Chanliaud *et al.* 2004). La matrice pectique interviendrait dans la porosité et dans le contrôle de l'environnement ionique de la paroi (Carpita *et al.*, 1993), mais aussi dans l'adhésion des cellules (Jarvis *et al.* 2003).

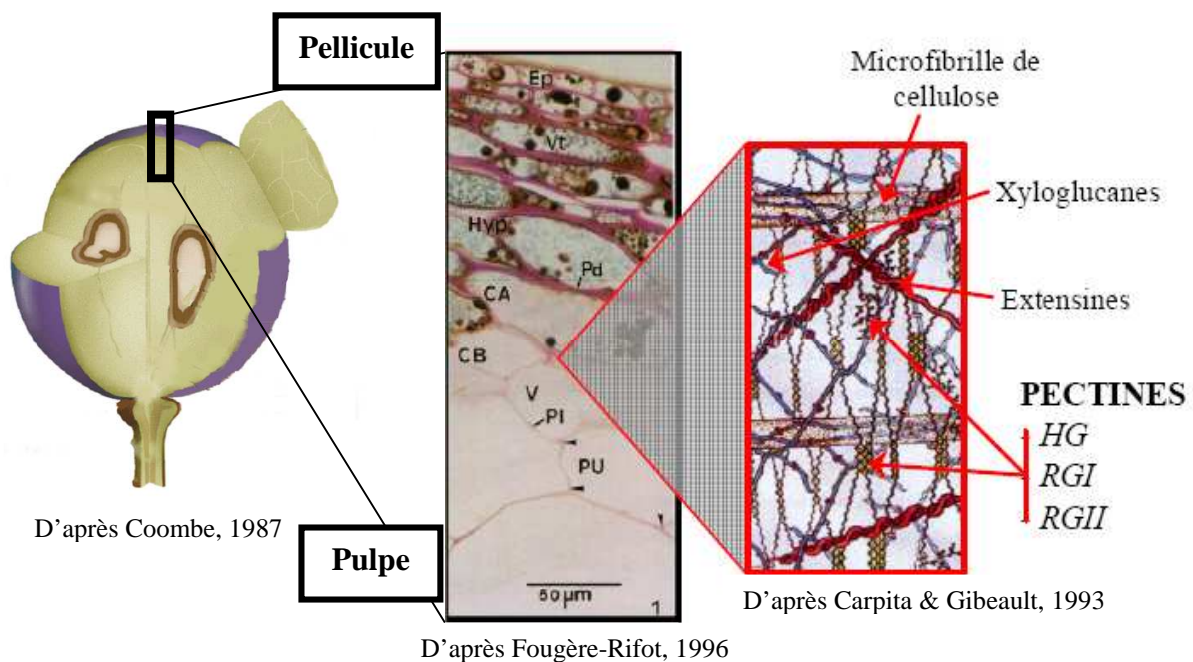


Figure 1 : Coupe d'une baie et organisation tissulaire (Coombe, 1987; Fougère-Rifot *et al.* 1996). Modèle d'organisation structurale de la paroi végétale primaire (Carpita *et al.*, 1993).

1. Le réseau cellulose-hémicellulose

a. Cellulose

La cellulose est formée de chaînes linéaires non ramifiées constituées d'un enchaînement de β -D-glucopyranoses liés en (1→4) (Figure 2). Le cellobiose, qui correspond à deux β -D-glucopyranoses liés en (1→4), constitue l'unité de répétition de la cellulose. L'organisation spatiale de la liaison β -1,4 de la cellulose fait que les fonctions homologues des monomères se trouvent alternativement au-dessus et en dessous du plan. Cette organisation implique que les chaînes de cellulose sont ensuite liées de manière non-covalente

par de nombreuses liaisons de type hydrogène ou forces de Van der Waals et s'organisent en microfibrilles.

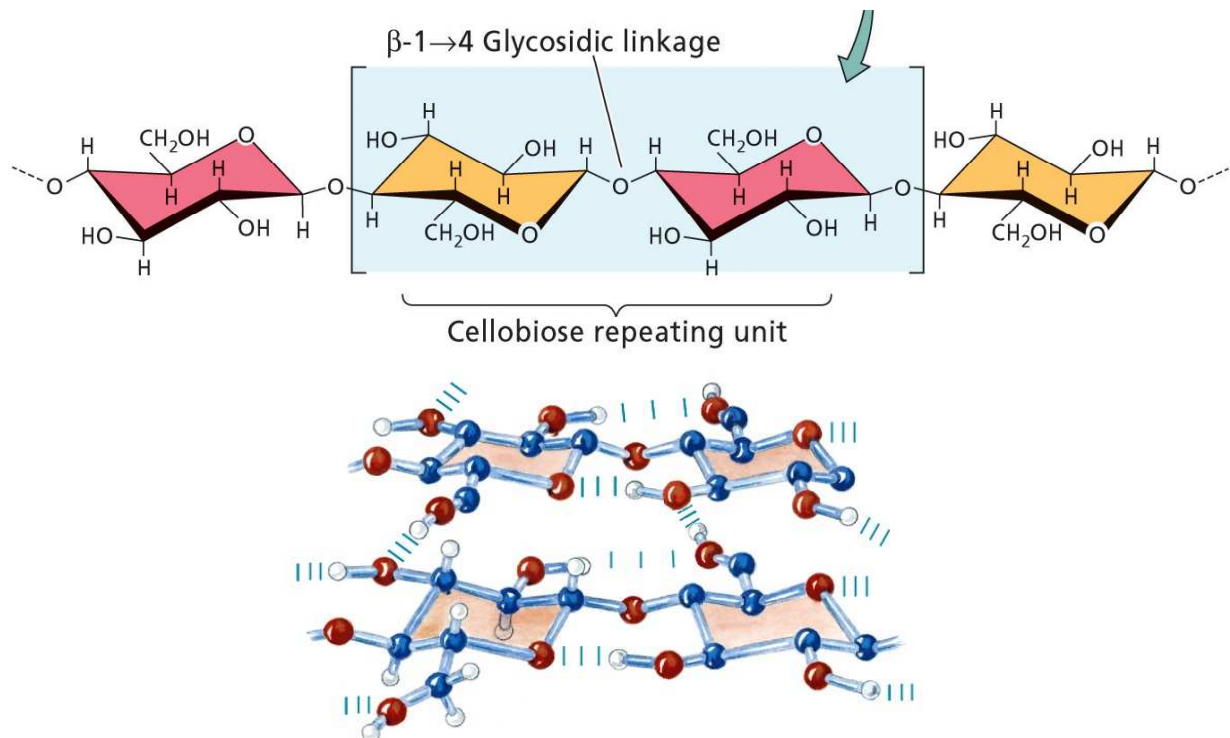


Figure 2 : Séquence primaire de la cellulose et liaisons hydrogène entre deux chaînes de cellulose.

Par microscopie électronique chez *Arabidopsis thaliana*, on observe que les motifs structuraux dominants qui correspondent aux microfibrilles de cellulose, d'un diamètre d'environ 3 nm, enveloppent la cellule et sont liés à des chaînes de polysaccharides de type xyloglucanes (Somerville *et al.*, 2004).

b. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont une classe de polymères très variés tant au niveau des oses constitutifs qu'au niveau des branchements. En fonction de leur conformation et de leur composition, les hémicelluloses peuvent se lier entre elles, ainsi qu'avec les microfibrilles de cellulose, mais aussi avec les polysaccharides pectiques de la paroi. La présence de courtes chaînes latérales sur la chaîne principale implique que ces polymères sont susceptibles de s'associer de manière non covalente par des ponts hydrogènes et donc de constituer des fibrilles. Ils peuvent ainsi jouer un rôle fondamental dans le maintien d'une architecture pariétale organisée en liant les microfibrilles de cellulose entre elles.

➤ Xyloglucanes (XGs)

Les hémicelluloses du raisin sont principalement constituées par les xyloglucanes (XGs) et représentent ~10% des polysaccharides pariétaux (Nunan *et al.* 1997). Les xyloglucanes des parois cellulaires de la baie de raisin ont des structures similaires à celles des xyloglucanes d'autres dicotylédones. Ils sont constitués d'une chaîne principale de β -D-glucopyranoses liés en (1→4) substitués en O-6 par des résidus d' α -D-xylopyranose. Le résidu xylosyl peut-être substitué par un résidu d' α -L-arabinose, de β -D-galactose, ou par le disaccharide β -D-galactose- α -L-fucose (Figure 3). Les xyloglucanes isolés des parois cellulaires de pulpe et de pellicule de baie de raisin sont composés de sept motifs oligosaccharidiques similaires: XXXG, XLXG, XXLG, XLLG, XXFG, XLFG, XFFG et XXG (Doco *et al.* 2003) d'après la nomenclature de Fry *et al.* (Fry *et al.*, 1993).

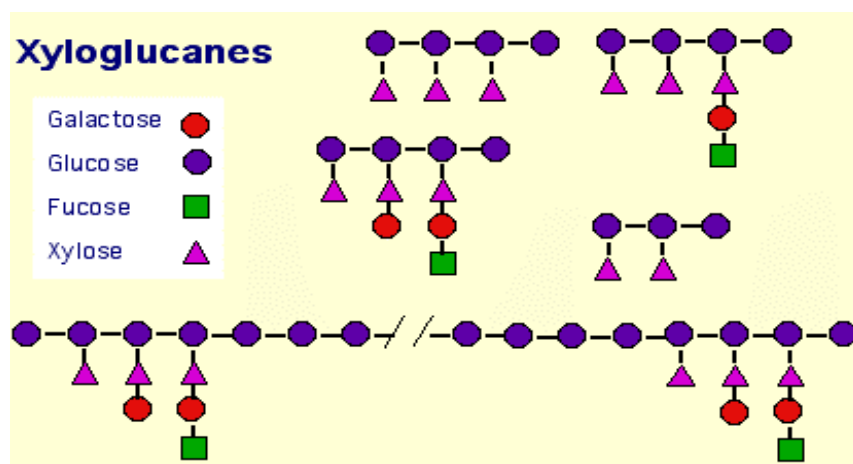


Figure 3. Représentation schématique des xyloglucanes.

➤ Xylanes

Les xylanes sont formés d'une chaîne principale d'unités D-xylopyranoses liées en β -(1→4). Cette liaison glycosidique de type β -(1→4) confère à la chaîne une conformation relativement étendue. Les xylanes sont généralement des hétéropolysaccharides, le xylose pouvant être substitué en position 3 et plus rarement en position 2. Selon la nature et l'agencement des substituants, on définit différents types de xylanes.

Les xylanes neutres sont peu branchés et contiennent peu ou pas d'acides uroniques.

Les arabinoxylanes (AX) sont substitués sur la position 3 ou sur les positions 2 et 3 par des unités d'arabinose ; ils peuvent également contenir en faible quantité d'autres unités

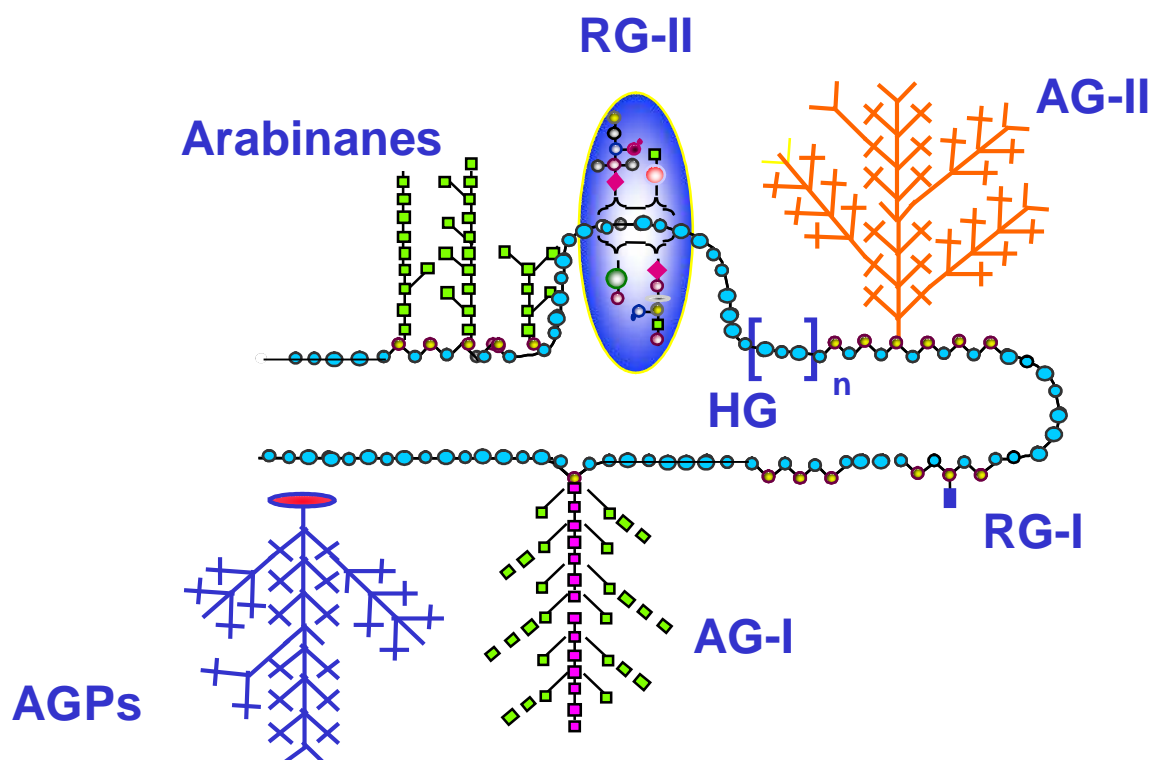


Figure 5 : Représentation schématique de pectines de baies de raisin (Doco *et al.* 1995).

a. Homogalacturonanes (HG)

La chaîne la plus simple est un polymère non-ramifié d'acide α -D-galacturonique appelé homogalacturonane (HG). Les homogalacturonanes sont des homopolymères d'acide α -D-galacturonique lié en (1 \rightarrow 4) contenant de 70 à 200 résidus pour des pectines de pomme, de betterave sucrière et de citron (Oosterveld *et al.* 2000; Thibault *et al.* 1993; Zhan, Janssen & Mort, 1998). Cependant les techniques mises en œuvre dans ces études provoquent la rupture des liaisons covalentes et les fragments homogalacturoniques observés peuvent donc être issus d'un polysaccharide plus important.

Ces polysaccharides abondants dans la matrice pectique sont dans les parois sous forme méthylestérifiée sur la fonction carboxylique portée par le carbone 6 (Figure 6). Le degré de méthylestérification (DM) est défini par le pourcentage molaire de fonctions carboxyliques méthylées par rapport aux fonctions carboxyliques libres. La diminution du degré de méthylestérification permet, par l'intermédiaire d'ion calcium Ca^{2+} , l'assemblage des homogalacturonanes en structures organisées, le calcium favorisant la formation de gels. D'autres modifications ou substitutions des homogalacturonanes, moins répandues que la méthylestérification, sont aussi observées. Les homogalacturonanes peuvent être sous forme acétylée en O-2,3 par de l'acide acétique. Les pectines natives ont généralement un degré

d'acétylation faible. Les acides galacturoniques constitutifs des homogalacturonanes peuvent également être substitués sur le C-3 par du xylose, formant ainsi un domaine xylogalacturonique. Des structures similaires ont également été observées avec des résidus d'apiose formant des domaines apiogalacturoniques chez la pomme (Schols *et al.* 1995).

Ces modifications, ainsi que les différentes combinaisons possibles, peuvent induire des changements dans les propriétés des pectines et par là même du domaine pectique.

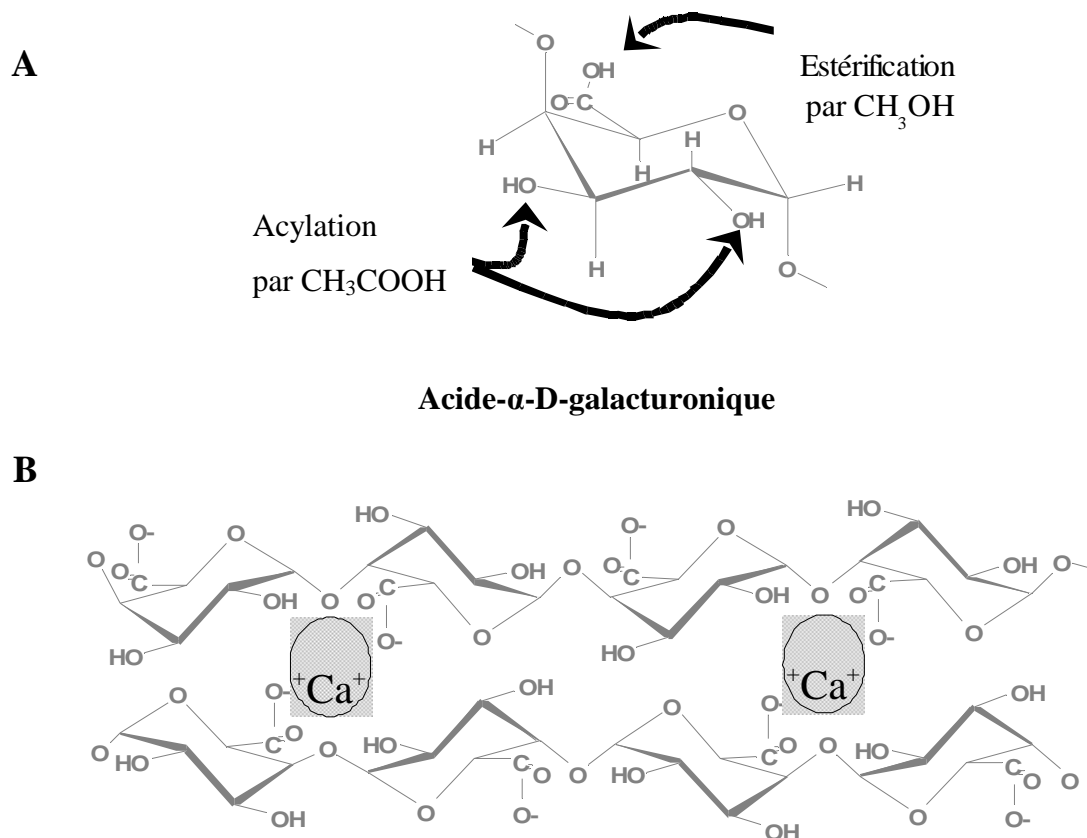


Figure 6 : A) Schéma d'estérification par le méthanol ou d'acétylation par l'acide acétique de l'acide α -D-galacturonique. B) Complexation des ions calcium et formation de gels par les chaînes homogalacturoniques partiellement desestérifiées.

b. Rhamnogalacturonane I (RG-I)

Le deuxième polysaccharide des pectines est le rhamnogalacturonane I ou RG-I, il est composé par la répétition du disaccharide $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow]$ (Figure 7). Ce motif peut être répété plus de 100 fois pour former cet hétéropolymère (Albersheim *et al.* 1996). Le RG-I est abondant et il semble être attaché par liaison glycosidique aux domaines homogalacturoniques (Willats *et al.* 2001a). Les résidus galacturonosyls du RG-I peuvent être estérifiés ou acétylés tout comme dans les

homogalacturonanes ; dans la pectine de betterave, il a été montré qu'un petit nombre de résidus galacturonosyls (~2%) était substitué par une unité d'acide glucuronique (Renard, *et al.* 1999). Généralement, les résidus de rhamnose constitutifs du RG-I sont substitués en O-4 à raison de 20 à 80% par des résidus d'oses neutres formant des chaînes dont la taille peut varier de une à plus de 50 unités. Ces chaînes latérales sont majoritairement composées d'arabinose et de galactose, bien que de faibles proportions de fucose et de xylose aient été détectées ainsi que de l'acide férulique et de l'acide coumarique (Saulnier & Thibault, 1999). Ces chaînes peuvent être constituées d'une seule unité [β -Galp-(1→4)] ou de polymères tels que les arabinanes, les galactanes ou les arabinogalactanes.

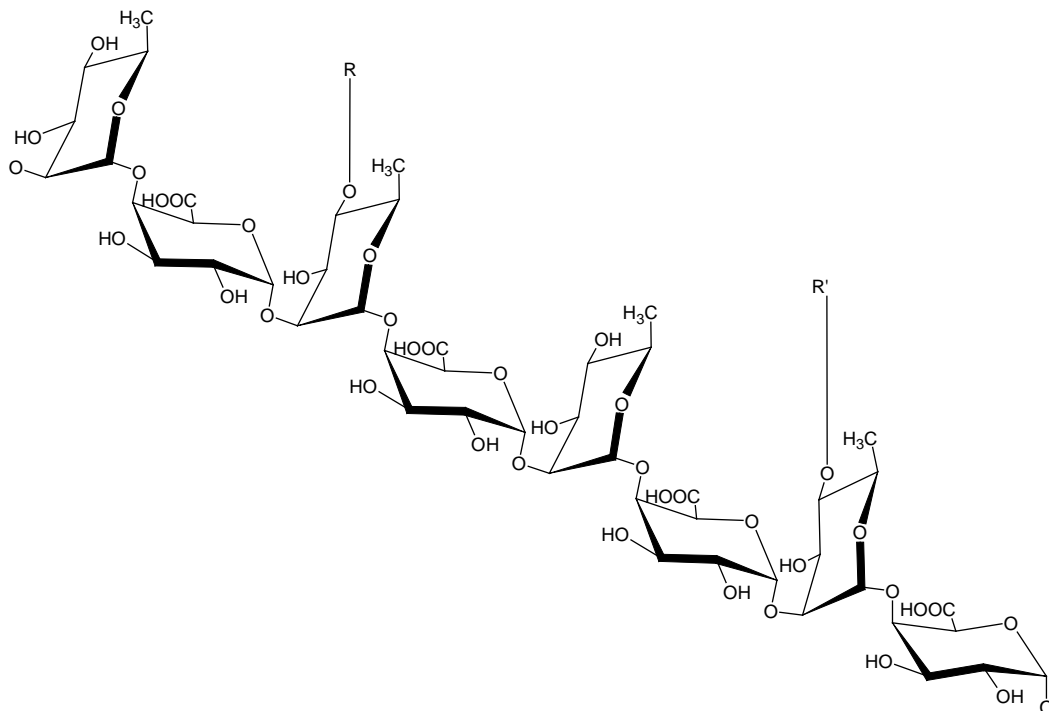


Figure 7 : Modèle structural du squelette du rhamnogalacturonane I substitué en R et R' par des chaînes latérales (Flanzy, 1998).

Les chaînes latérales principalement trouvées dans le RG-I sont décrites ci-dessous.

La chaîne principale des arabinanes est constituée d' α -L-arabinofuranose lié en (1→5)(Figure 8). Ces chaînes sont généralement hautement branchées par des résidus simples ou des courtes chaînes d'arabinose lié en O-2, et/ou en O-3 (Ridley *et al.*, 2001).

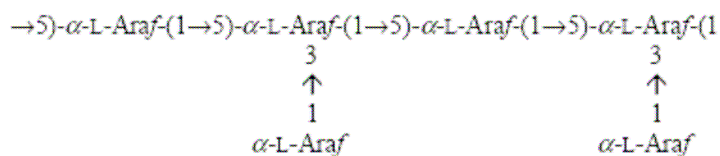


Figure 8 : Séquence primaire des arabinanes (Flanzy, 1998).

Les arabinogalactanes de type I (AG-I) sont constitués de polymères de β -D-galactopyranose lié en (1 \rightarrow 4), ramifié par la présence d' α -L-arabinofuranose qui se lie en O-3 d'un résidu galactosyl (Figure 9).

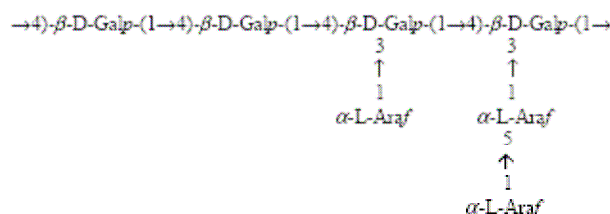
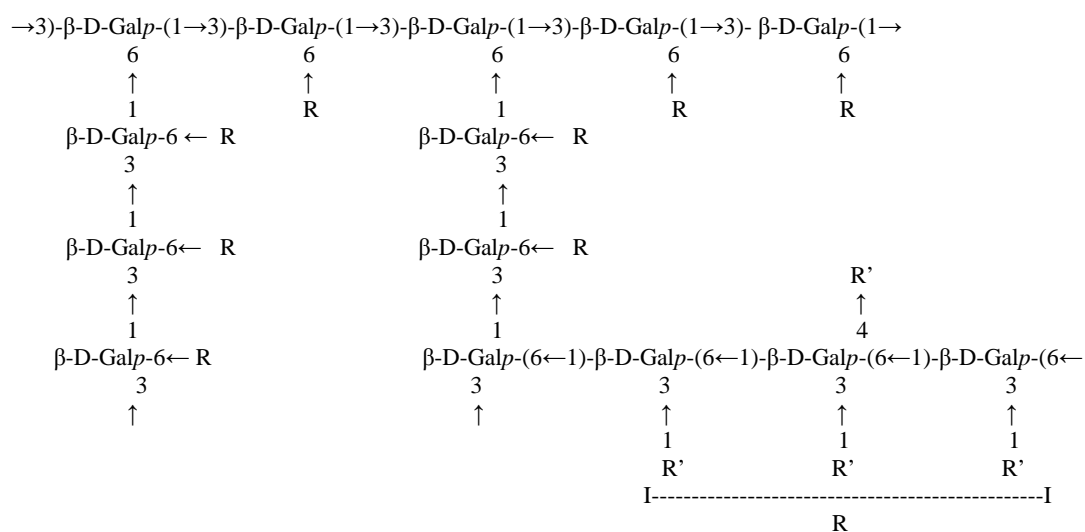


Figure 9 : Séquence primaire des arabinogalactanes de type I (AG-I) (Flanzy, 1998).

Les arabinogalactanes de type II (AG-II) sont constitués d'une chaîne principale de β -D-galactopyranose lié en (1 \rightarrow 3), ramifié en O-6 par de courtes chaînes de β -D-galactopyranose lié en (1 \rightarrow 6) pouvant être elles-même substituées en O-3, ou de courtes chaînes d' α -L-arabinofuranoses liés en (1 \rightarrow 4) (Figure 10). D'autres oses sont également détectés (L-Rhap, D-Manp, D-Xylp, D-Glcp, et des acides D-glucuronique et D-galacturonique et leurs dérivés 4-O-méthylés respectifs), leur pourcentage molaire excédant rarement 5 %. Bien que les AG-II soient souvent co-extraits avec les pectines et difficilement séparables, leur appartenance aux pectines n'est pas clairement établie (Willats *et al.*, 2001a). Les arabinogalactanes de type II sont souvent liés à une cupule protéique (2 à 10 % en masse, caractérisée par la présence d'hydroxyproline) et forment ainsi les arabinogalactanes protéines (AGP). Les AGP sont soit libres et solubles, soit associés aux pectines, impliqués dans des liaisons avec le RG-I. Lors de la maturation de la baie de raisin, une augmentation de la part des AGP solubles ainsi que de l'hydroxyproline ont été observées dans la paroi (Nunan, *et al.* 1998).



R' = α -L-araf, α -D-Glcp A, α -L-Rhap-(1 4)- α -D-Glc A

Figure 10 : Séquence primaire des arabinogalactanes de type II (AG-II) du raisin (Flanzy, 1998).

En raison de ces différents branchements, la zone du RG-I est également appelée « région hérissée » par opposition aux « zones lisses » des homogalacturonanes. Son abondance et sa nature sont considérablement modifiées selon l'espèce (Vincken *et al.*, 2003).

c. Rhamnogalacturonane II (RG-II)

Malgré la similitude des noms, la structure du rhamnogalacturonane II ou RG-II diffère de celle du RG-I. Le RG-II correspond à un polymère de degré de polymérisation proche de trente, ce qui lui vaut le nom de méga-oligosaccharide (Rodriguez-Carvajal *et al.* 2003). Ishii et Matsunaga ont mis en évidence la nature covalente de la liaison entre la chaîne homogalacturonique des pectines et le RG-II (Ishii & Matsunaga, 2001). Sa structure contient un squelette homogalacturonique constitué de 8 à 10 résidus d'acide galacturonosyls liés en α -(1 \rightarrow 4), substitués par 4 chaînes latérales principales: A, B, C et D (O'Neill *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2000b). Ces chaînes oligosaccharidiques contiennent onze monosaccharides différents incluant notamment des oses rares comme le β -D-apiofuranose (Darvill *et al.* 1978), le 2-O- α -L-méthylfucose, le 2-O- α -D-méthylxylose (Darvill *et al.*, 1978), le DHA (acide 3-déoxy- β -D-lyxo-heptulosarique) (Stevenson *et al.* 1988), le Kdo (acide 3-déoxy- α -D-manno-octolosonique) (York *et al.* 1985), et le résidu d'acide α -L-acérique (acide 3-C- carboxy-5-deoxy-L-Xylose (Spellman *et al.* 1983), ce dernier étant considéré comme un véritable

marqueur de la présence de RG-II. Le clivage sélectif et la perméthylation ont permis de mettre en évidence le fait que les résidus d'apiose et de Dha sont directement liés au squelette homogalacturonique (Puvanesarajah *et al.* 1991). Des études par RMN ou modélisation ont été menées pour déterminer la conformation de ce méga-oligosaccharide en optimisant la distribution des chaînes latérales (Rodriguez-Carvajal *et al.*, 2003; Vidal *et al.*, 2000b) (Figure 11).

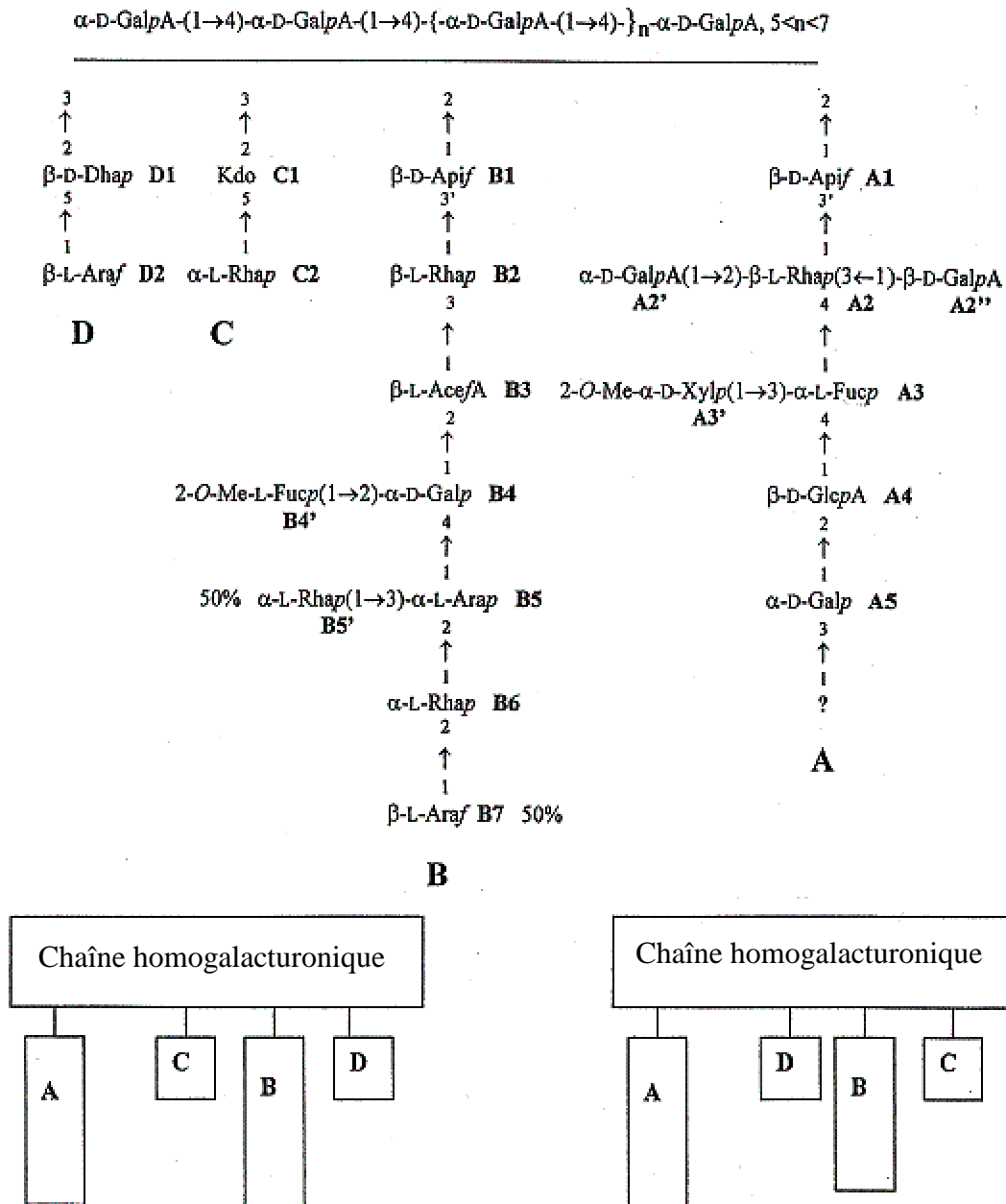


Figure 11 : Schéma du RG II avec les deux arrangements possibles (déterminés par RMN) (du Penhoat *et al.* 1999).

Le résidu de β -D-apiose présent dans la chaîne A (caractérisé par la présence du résidu de 2-O-méthyl- α -D-xylose) peut-être estérifié par de l'acide borique (Ishii *et al.* 1999; O'Neill *et al.*, 1996). Le RG-II se retrouve alors sous forme dimérisée par l'établissement de liaisons covalentes de diester de bore (O'Neill *et al.*, 1996).

Dans les parois cellulaires de la baie de raisin, Vidal *et al.* (2001) ont montré que le domaine pectique était constitué par des homogalacturonanes (HG), du rhamnogalacturonane I (RG-I) et du rhamnogalacturonane II (RG-II) qui représentent respectivement 80, 15 et 5% de la totalité des polysaccharides pectiques de la pellicule et de la pulpe. L'ensemble HG, RG-I et RG-II, issus de la pellicule, représente 75% de la totalité des HG, RG-I et RG-II au sein de la baie (Vidal *et al.* 2001), ce qui met en avant la forte quantité de paroi dans ce tissu. Une étude récente (Arnous & Meyer, 2009) a estimé le pourcentage des principaux polysaccharides structuraux des parois des baies de Merlot, de Cabernet Sauvignon et de Syrah : de 0,5 à 1,0% de mannane, de 55 à 61% d'HG, environ 5% de RG-I, de 3,5 à 4% de RG-II, environ 0,3% d'arabinogalactane, environ 7% d'arabinane, de 16 à 20% de xyloglucane et de 5 à 10% de cellulose.

Le polymère d'homogalacturonane est généralement intercalé dans des zones rhamnogalacturoniques. Il a été récemment suggéré que le RG-I serait la base de la structure sur laquelle les chaînes homogalacturoniques ainsi que les rhamnogalacturonanes II (RG-II) seraient liés de manière covalente (Vincken *et al.*, 2003). La matrice pectique ainsi composée influence la perméabilité des parois (Willats *et al.*, 2001a).

3. Les glucanes

a. β -(1→3) glucanes

Chez les végétaux supérieurs, les β -(1→3) glucanes sont communément appelés callose, en raison de leur rôle dans la formation du cal. La liaison β -(1→3) confère aux polymères une forme hélicoïdale, parfois branchée en (1→6), et des propriétés gélifiantes. Le dépôt de callose est généralement observé dans les tissus blessés ou lors d'attaque de pathogène ou de stress physiologique. La contamination des raisins par *Botrytis cinerea* conduit aussi à la présence de glucanes (β -(1→3) et β -(1→6) libérés par le champignon (Dubourdiou, 1978).

b. Glucanes mixtes

Les glucanes mixtes sont des polymères de β -D-(1 \rightarrow 4)-glucopyrannose dont certains résidus sont alternés par des liaisons en β -(1 \rightarrow 3). Les liaisons en β -(1 \rightarrow 3) sont généralement séparées par deux, trois ou quatre résidus liés en β -(1 \rightarrow 4). Ces structures, au-delà de leur rôle structural, sont des réserves, source d'énergie.

4. Les enzymes de la baie de raisin

La maturation du raisin s'accompagne d'une perte de fermeté des tissus. Ce processus est dû à la modification structurale des parois et plus particulièrement à la dégradation des pectines et des xyloglucanes. Au cours de la maturation de la baie de raisin, une augmentation de la fraction soluble, parallèlement à une diminution des hémicelluloses, de la cellulose et des pectines insolubles a été décrite (Huang, Huang & Wang, 2005). Une autre étude montre une perte de galactose provenant des AG-I, une baisse du degré de méthylestérification des pectines, une augmentation des protéines riches en proline et en hydroxyproline et une augmentation de la fraction soluble des polysaccharides (Vicens, 2007). Ceci suggère donc une hydrolyse des polysaccharides structuraux au sein des parois de la pellicule de raisin. Toutes ces modifications sont le résultat de l'action combinée de nombreuses enzymes (Barnavon, 1999). On distingue les enzymes agissant sur les chaînes principales (polygalacturonase, pectine et pectate lyases, rhamnogalacturonane hydrolases et lyases, pectine méthyl et acétyl estérases, rhamnogalacturonane acétyl estérases) ou celles agissant sur les chaînes latérales des zones hérissées (arabinofuranosidases, β -galactosidases...) ou sur les xyloglucanes (cellulases, hémicellulases). Les pectinases sont classées en trois catégories : les glycosylhydrolases, les estérases et les lyases.

Dans ce paragraphe, seules les pectinases, les cellulases et les hémicellulases les plus fréquemment décrites seront abordées.

a. Les pectinases

➤ Les glycosylhydrolases des pectines

Les glycosylhydrolases correspondent aux enzymes impliquées dans l'hydrolyse de liaisons osidiques. On distingue les *exo*- et les *endo-O*-glycosylhydrolases. Les *exo*-glycosylhydrolases sont nombreuses dans la paroi, elles sont généralement classées en fonction de leur spécificité de substrat.

- Les polygalacturonases

Les polygalacturonases (PG) composent une des familles les plus étudiées dans les fruits au cours du développement. Les PG hydrolysent la liaison glycosidique en α -(1→4) entre des résidus d'acide galacturonique non estérifié, notamment dans les zones homogalacturoniques.

On distingue les *exo*- et les *endo*-PGs : les *exo*-PGs catalysent l'hydrolyse des résidus d'acide galacturonique situés aux extrémités non réductrices des chaînes d'acides galacturoniques, libérant des unités monomériques d'acide galacturonique, alors que les *endo*-PGs catalysent l'hydrolyse des chaînes d'acide galacturonique de façon aléatoire, libérant de courtes chaînes d'acide galacturonique.

- Les β -galactosidases

En raison de la grande diversité des résidus et des liaisons osidiques qui constituent les chaînes latérales des zones hérissées, de nombreuses enzymes sont impliquées dans leur dégradation (α - et β -galactosidases, α -arabinofuranosidases/ β -xylosidases, arabinases,...).

Un des phénomènes importants observés au cours de la maturation des fruits est la perte de galactose pariétal, accompagnée généralement d'une augmentation du galactose solubilisé (Redgwell *et al.* 1997). Ces modifications ont été attribuées à l'action de galactosidases. Les β -galactosidases pourraient également être impliquées dans l'hydrolyse des résidus galactoses β -(1→3) et β -(1→6) des chaînes polysaccharidiques des arabinogalactanes protéines (AGP) (Kotake *et al.*, 2005). Chez le raisin, une diminution de la présence de galactose au sein de la paroi est décrite et imputée à une diminution significative des AG-I (Nunan *et al.*, 1998). Une autre étude montre la diminution du galactose parallèlement à une augmentation de l'activité β -galactosidase (Barnavon *et al.* 2000).

- Les glycosidases

Elles sont spécifiques d'un sucre (glucosidase, galactosidase) et d'un type de liaison glycosidique (β -glucosidase...). Elles sont capables d'hydrolyser les précurseurs d'arôme glycosylés et ainsi libérer les arômes. Les terpénols peuvent être libérés à partir de leurs précurseurs par hydrolyse enzymatique. Elles ont une action potentielle sur les composés phénoliques glycosylés et ont pour conséquence une perte de couleur dans le cas des anthocyanes et la formation de troubles dans celui des flavonols.

➤ Les estérases

Les estérases, pectine méthylestérase et acétylestérase, catalysent la rupture d'une liaison ester. Les pectine méthylestérases (PME) catalysent l'hydrolyse de l'ester méthylique des homogalacturonanes, libérant du méthanol et des acides pectiques. Une augmentation de l'activité PME au cours de la maturation a été observée chez de nombreux fruits.

Chez les végétaux, la plupart des PME agissent de façon linéaire sur les homogalacturonanes, en libérant les esters méthyliques à partir des extrémités non-réductrices ou d'un résidu d'acide galacturonique non-estérifié des homogalacturonanes, et en procédant linéairement par la suite le long des chaînes. Ce mécanisme d'action favoriserait l'interaction des groupements carboxyliques avec les ions calcium, induisant ainsi la rigidification des parois et limitant l'accessibilité à la polygalacturonase. Cela favorise aussi l'adhésion cellulaire (Willats *et al.*, 2001b). Au contraire, lorsque les PME agissent de façon aléatoire, la déméthylestérification permettrait de promouvoir l'activité de la polygalacturonase et, en ce sens, les PME contribueraient au ramollissement des parois. Chez le raisin, la diminution du degré de méthylestérification des acides uroniques est également décrite au cours du développement (Barnavon *et al.* 2001; Nunan *et al.*, 1998; Vicens *et al.* 2009). Une augmentation de l'activité pectine-méthylestérase au cours de la maturation a été observée (Barnavon *et al.*, 2001).

➤ Les lyases

Les pectate lyases, sous forme *endo*- ou *exo*- catalysent la dégradation des chaînes homogalacturoniques par un mécanisme de trans-élimination entre deux résidus d'acide α -D-galacturonique non méthylestérifiés liés en (1→4), générant ainsi une double liaison entre le C4 et le C5 à l'extrémité terminale non réductrice du polygalacturonate. Les pectates lyases pourraient agir en synergie avec la pectine-méthylestérase au cours de la maturation en dépolymérisant les pectines et en augmentant ainsi leur solubilité.

b. Cellulases et hémicellulases

Concernant la famille des cellulases/hémicellulases, seules les endo- β -1,4-D-glucanases (EGases) ont été décrites chez les végétaux. Dans des conditions *in vitro*, ces enzymes hydrolysent les liaisons β -1,4-D-glucanes, ce qui suggère que le xyloglucane est un bon substrat *in vivo*. De plus, les EGases ne dégradent pas la cellulose cristalline mais elles pourraient dégrader les régions non-cristallines des microfibrilles, modifiant ainsi l'organisation et particulièrement la cohésion des fibrilles (O'Donoghue *et al.* 1994).

L'activité EGase est associée à la transformation des parois, à l'élongation des cellules et au ramollissement du fruit (Llop-Tous *et al.* 1999).

De nombreuses hémicellulases semblent impliquées dans le processus de maturation des fruits. Les études portant sur la dégradation des xyloglucanes rapportent un grand nombre d'enzymes spécifiques de ce substrat dont principalement la xyloglucane endo-transglycosylase/hydrolase (XET) (Fry, 2004; Rose *et al.* 2002), une α -D-xylosidase active sur les oligosaccharides issus de xyloglucane (Minic & Jouanin, 2006).

Les XET catalysent une réaction de type « greffe moléculaire » où le squelette d'une molécule de xyloglucane est clivé, résultant en une courte chaîne de xyloglucanes qui est par la suite transférée et liée à l'extrémité non-réductrice d'une seconde chaîne de xyloglucanes (Chanliaud *et al.*, 2004). Les XET pourraient être impliquées dans l'assemblage et l'expansion des parois, dans l'incorporation de nouvelles chaînes de xyloglucanes permettant l'extension des cellules, mais aussi dans le relâchement des parois. Chez certains fruits, comme le kiwi ou la pomme, il a été noté une corrélation entre l'augmentation de l'activité XET et la maturation (Schroder *et al.* 1998; Vincken *et al.* 1998). Dans le kiwi, cette augmentation de l'activité XET est concomitante à une diminution de la masse moléculaire des xyloglucanes. Ceci suggère qu'en plus de leur implication apparente dans l'expansion cellulaire, les XET favoriseraient la dépolymérisation et/ou la solubilisation des xyloglucanes pendant le désassemblage des parois, par leur activité hydrolase.

B. LES PRINCIPAUX COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DU RAISIN

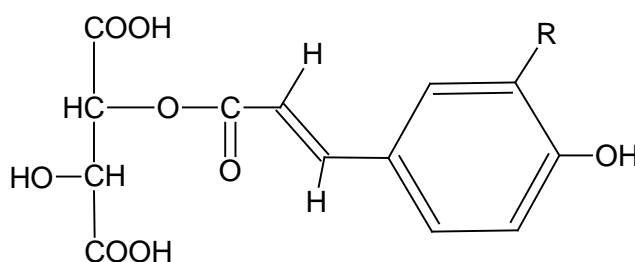
Les composés phénoliques exercent une influence majeure sur la qualité des vins rouges. La connaissance des principaux composés phénoliques du raisin est donc primordiale. D'un point de vue chimique, les composés phénoliques sont caractérisés par un noyau benzénique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles. Deux classes sont à distinguer : les composés non flavonoïdes et les flavonoïdes.

1. Les composés non flavonoïdes

Les composés non flavonoïdes recouvrent les acides phénols, divisés en acides hydroxybenzoïques et acides hydroxycinnamiques, porteurs d'une chaîne latérale insaturée, mais également d'autres dérivés phénoliques tels que les stilbènes.

a. Les acides phénols

Dans les vacuoles des cellules de pulpe et de pellicule du raisin, les acides phénols sont principalement des acides hydroxycinnamiques caractérisés par un squelette en C6-C3, rencontrés sous forme d'esters tartriques (Ribéreau-Gayon, 1965). Les trois structures de bases : l'acide caftarique, l'acide coutarique et l'acide fertarique, se différencient par les substituants du noyau aromatique (Figure 12). Ils sont principalement sous la forme *trans* mais existent aussi sous forme *cis*.



Esters hydroxycinnamiques	R
Acide <i>t</i> -caféoyl tartrique (caftarique)	OH
Acide <i>t-p</i> -coumaroyl tartrique (coutarique)	H
Acide <i>t</i> -féruloyl tartrique (fertarique)	OCH ₃

Figure 12 : Structures des principaux esters hydroxycinnamiques dans le raisin

Concernant les acides hydroxybenzoïques, caractérisés par un squelette en C6-C1, le raisin contient principalement de l'acide gallique (Figure 13), présent sous forme libre et glycoside et aussi estérifié par les flavanols (cf. I.B.2.b, p 38)

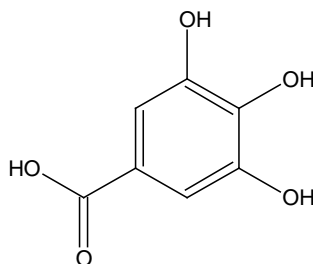


Figure 13 : Structure de l'acide gallique

b. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la résonance des électrons sur la totalité de la

molécule. Les plus abondants dans le raisin sont le *trans*-resvératrol et son dérivé glucosylé : le picéide (Jeandet *et al.* 1991; Waterhouse & Lamuela-Raventos, 1994)(Figure 14). La présence de resvératrol est observée particulièrement dans la pellicule alors qu'il n'est pas rencontré dans les pépins, et les quantités présentes fluctuent en fonction de la qualité sanitaire du raisin. Des baies botrytisées, par exemple, contiennent des teneurs en resvératrol beaucoup plus élevés (Borie, Jeandet, Parize, Bessis & Adrian, 2004).

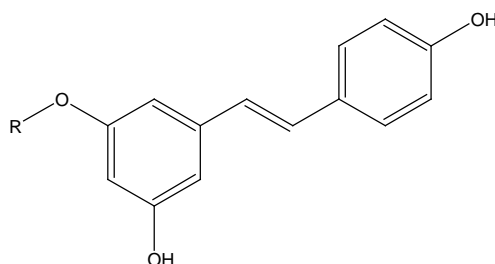


Figure 14 : Structures du resvératrol (R = H) et du picéide (R = glucose)

2. Les composés flavonoïdes

Les flavonoïdes sont caractérisés par un squelette de base à 15 carbones (C6-C3-C6), correspondant à la structure de la 2-phényl-benzopyrone (Figure 15). Ce groupe comprend plusieurs familles qui se différencient par le degré d'oxydation du noyau pyranique central. Chez le raisin, deux familles de composés sont principalement représentées, les anthocyanes et les flavan-3-ols, auxquels s'ajoutent les familles des flavonols et des flavanonols.

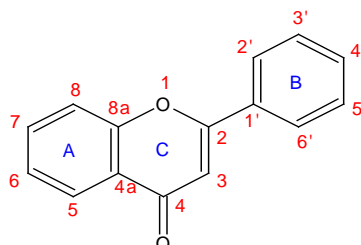


Figure 15 : Structure du noyau 2-phényl benzopyrone

a. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont responsables de la coloration des raisins rouges. Elles sont localisées dans les vacuoles des cellules de la pellicule (Amrani Joutei, 1993) et quelquefois également de la pulpe pour les cépages teinturiers. Elles sont caractérisées par un noyau flavylum glycosylé en position C-3 (Figure 16). La variation du degré d'hydroxylation ou de méthylation du cycle B conduit aux cinq aglycones, ou anthocyanidines rencontrés dans le genre *Vitis* : la delphinidine, la cyanidine, la pétonidine, la péonidine et la malvidine (Tableau 1). L'aglycone constitue le groupement chromophore du pigment. Les anthocyanes se divisent

en différentes sous-classes en fonction de la nature des substituants portés par le glucose du cycle C. Le glucose peut-être acylé en position 6 par l'acide acétique, l'acide *para*-coumarique ou l'acide caféique (Tableau 2).

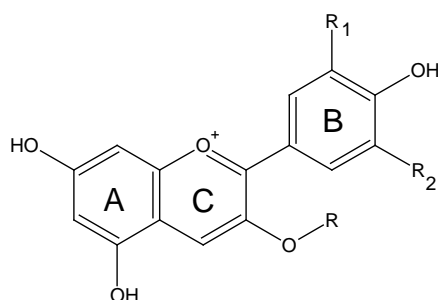


Figure 16 : Structures chimiques des anthocyanes du raisin sous forme de cation flavylium

Tableau 1 : Anthocyanidines de base chez *Vitis* (substitution du cycle B).

Anthocyanidines	R=H	R1	R2
<i>Delphinidine</i>		OH	OH
<i>Cyanidine</i>		OH	H
<i>Pétunidine</i>		OCH ₃	OH
<i>Péonidine</i>		OCH ₃	H
<i>Malvidine</i>		OCH ₃	OCH ₃

Tableau 2 : Anthocyanes : sous-classes définies par la substitution du cycle C.

Sous-classes	R
<i>Anthocyanidines</i>	H
<i>Anthocyanes</i>	glucoside
Anthocyanes acylées	
<i>Anthocyanes acétylées</i>	acétylglucoside
<i>Anthocyanes coumaroylées</i>	6-p-coumaroyl-glucoside
<i>Anthocyanes caféoylées</i>	6-caféoyl-glucoside

Ces différentes possibilités conduisent à l'existence de vingt formes, plus des formes mineures 3,5 diglucoside et leurs dérivés acylés. La teneur et la composition en anthocyanes dans le raisin varient selon l'espèce et la variété (Mazza & Miniati, 1993).

b. Les flavan-3-ol ou flavanols

Les flavanols regroupent les monomères et les tanins, nom commun donné aux oligomères et polymères de flavanols qui, du fait de leur affinité avec les protéines, ont des propriétés « tannantes ». Ils jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques des

vins, notamment dans la sensation d'astringence. La pellicule, les pépins et les rafles sont les zones de concentration de cette famille de composés. Plus précisément, dans les pépins, les tanins sont essentiellement localisés dans les enveloppes internes et externes. Au sein de la pellicule, ils se présentent sous forme granulaire, ou d'amas, dans les vacuoles des cellules. Ils semblent également en partie liés aux parois cellulaires et aux membranes vacuolaires (Amrani Joutei, 1993).

➤ Les unités monomériques

Les formes monomériques des flavanols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C-2 et C-3, la présence de substituants galloyles, ainsi que par le niveau d'hydroxylation du noyau B (Figure 17, Tableau 3). On distingue ainsi les formes dihydroxylées (famille des catéchines) des formes trihydroxylées (famille des gallocatéchines). Ces dernières n'ont pas été identifiées dans le raisin sous leurs formes monomériques, mais leur présence dans les formes polymériques, notamment dans les pellicules et la pulpe de *Vitis vinifera*, suggère leur existence en tant que monomères (Souquet *et al.* 1996, Mane *et al.*, 2007).

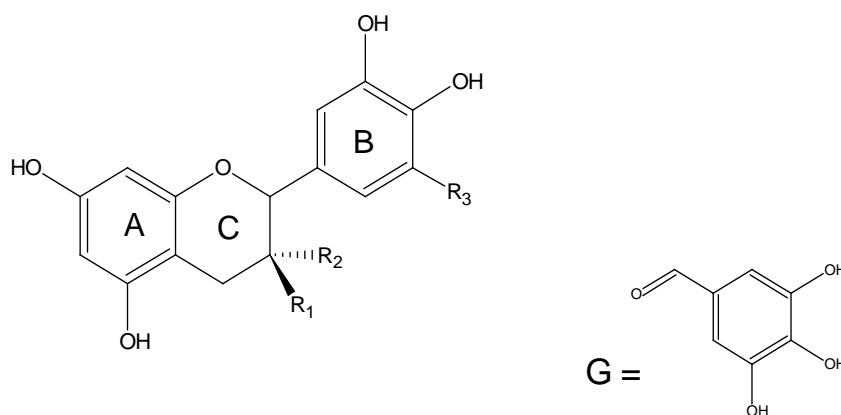


Figure 17 : Structure des unités monomériques constitutives des tanins condensés

Tableau 3 : Nomenclature des principales unités constitutives des flavanols présents dans le raisin.

Monomères	R1	R2	R3
<i>Catéchine</i>	H	OH	H
<i>Epicatéchine</i>	OH	H	H
<i>Epigallocatechine</i>	OH	H	OH
<i>Epicatéchine gallate</i>	OG	H	H

➤ Les tanins condensés

Les tanins condensés du raisin sont des oligomères ou polymères de flavanols (Figure 18) qui ont la propriété de libérer des anthocyanidines en milieu acide, à chaud, par rupture de la liaison intermonomérique à partir des unités « du haut », c'est-à-dire substituées en C4 dans le polymère initial (Bate-Smith, 1954). Dans le raisin, on distingue deux types de proanthocyanidines suivant la nature de l'anthocyanidine libérée. D'une part, les procyanidines (polymères de catéchine et d'épicatéchine), qui libèrent de la cyanidine, et d'autre part, les prodelphinidines (polymères de gallocatéchine et d'épigallocatéchine), qui libèrent de la delphinidine. Dans les tanins de pépins, seules les unités procyanidines sont présentes (Prieur, Rigaud, Cheynier & Moutounet, 1994), alors que les tanins de pellicules et les rafles contiennent des unités procyanidines et prodelphinidines (Souquet *et al.*, 1996; Souquet *et al.* 2000).

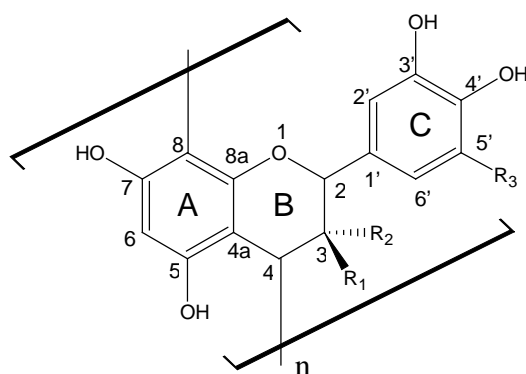


Figure 18 : Structure des tanins condensés (R1, R2, R3 : Tableau 3)

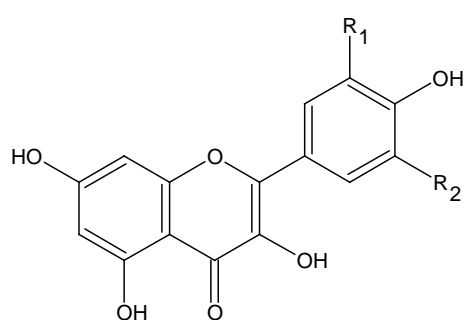
Outre la nature des unités constitutives, les tanins se différencient par le nombre d'unités, appelé degré de polymérisation, qui les constituent ainsi que par le type et la position des liaisons intermonomériques. Les proanthocyanidines de type B se caractérisent par une liaison intermonomérique entre le carbone 4 (C4) de l'unité supérieure et le carbone 6 (C6) ou le carbone 8 (C8) de l'unité inférieure, de configuration *trans* par rapport à l'hydroxyle en position C3. Les proanthocyanidines de type A contiennent une liaison éther supplémentaire entre le carbone C2 et les hydroxyles 5 ou 7 du noyau A inférieur. Ces structures de type A ont déjà été identifiées dans le litchi par exemple (Le Roux, 1999, Boukharta *et al.* 1988; Ricardo da Silva, 1992). Il est à noter que l'existence de proanthocyanidines de type A n'est

pas confirmée dans le raisin mais seulement supposée à partir de caractéristiques chromatographiques (Glories *et al.* 1996; Salagoity-Auguste & Bertrand, 1984).

Les tanins de pépins sont constitués de procyanidines partiellement galloylées. Leur degré moyen de polymérisation (DPm) de l'ordre de 10 est largement inférieur à ceux des pellicules qui contiennent également des prodelphinidines et dont le degré moyen de polymérisation (DPm) avoisine en moyenne les 30 unités (Prieur *et al.*, 1994; Souquet *et al.*, 1996). Au sein de la pulpe, la présence de monomères et d'oligomères de flavanols a été détectée, et certaines teneurs sont reportées dans la littérature (Bourzeix *et al.* 1986). Récemment, la présence de tanins de plus haut degré de polymérisation dont les caractéristiques s'approchent de celles des tanins de pellicules a été mise en évidence (Souquet, Veran, Mané & Cheynier, 2006).

c. Les flavonols

Dans la baie de raisin, les flavonols, pigments de couleur jaune pâle, sont présents uniquement au sein de la pellicule. Ils sont sous forme de glycosides en position 3, généralement glucosylés mais on trouve également des quantités importantes de glucuronides. Quatre flavonols glycosylés dérivés de quatre aglycones (la kaempférol, la quercétine, la myricétine et l'isorhamnétine, Figure 19) sont majoritairement présents dans le raisin. Des dérivés de syringétine et de laricitrine ont récemment été mis en évidence dans les variétés rouges (Mattivi *et al.* 2006).



Flavonols	R1	R2
Kaempférol	H	H
Quercétine	OH	H
Myricétine	OH	OH
Isorhamnétine	OCH ₃	H
syringétine	OCH ₃	OCH ₃
laricitrine	OH	OCH ₃

Figure 19 : Structure aglycone des flavonols du raisin

d. Les flavanonols

Cette famille de composés a été identifiée dans la pellicule de raisin blanc. L'astilbine et l'engeletine (3-rhamnosides de dihydroquercetine et dihydrokämpferol) en sont les représentants (Figure 20). Ces mêmes molécules ont également été observées dans les rafles (Souquet *et al.* 1998).

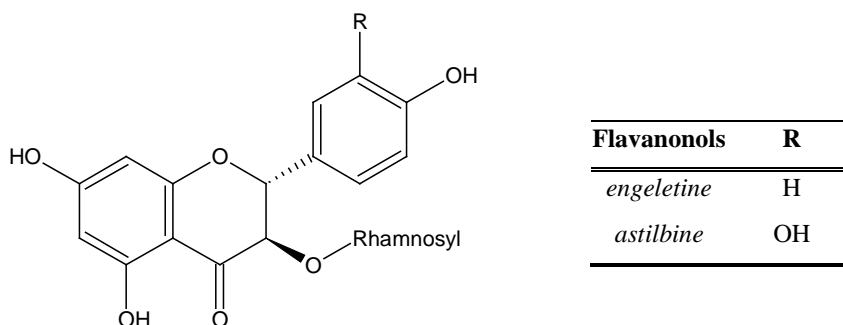


Figure 20 : Structure des flavanonols

II. DU RAISIN AU VIN

Au cours de la vinification, la paroi de la baie est dégradée mécaniquement avec le foulage et biochimiquement par les enzymes du raisin. Les polysaccharides pectiques sont alors libérés dans le moût. Cette dégradation entraîne la libération des composés phénoliques dans le milieu liquide. L'extraction de tous ces composés peut être modulée par la qualité et la maturité des baies, les conditions de vinifications (température, temps de macération, teneur en alcool et en SO₂, remontages) et, ce qui nous intéresse dans cette étude, par l'utilisation d'enzymes commerciales de macération. Dans cette partie, les polysaccharides et les composés phénoliques présents dans le vin ainsi que l'emploi des enzymes de macération seront donc abordés.

A. LES POLYSACCHARIDES DU VIN

Avant de décrire les polysaccharides issus de la baie de raisin, une autre famille de polysaccharides présents dans les vins est à mentionner : ceux provenant des parois des levures utilisés pour la fermentation alcoolique, c'est-à-dire les mannoprotéines (MP). Concernant les polysaccharides issus de la baie, bien que les parois cellulaires puissent libérer leurs constituants lors de la macération des parties solides, tous les polysaccharides ne sont pas solubles dans le vin. On ne retrouve pas de traces d'AG-I dans les moûts ou les vins. Vidal *et al.* (2003b) ont montré que les polysaccharides d'un vin rouge étaient composés de :

35% de MP, 42% d'AGP, 4% de RG-I et de 19% de RG-II. Je ferai ici la distinction dans les vins de trois familles majoritaires issus des polysaccharides pectiques de la baie : les polysaccharides riche en arabinose et galactose (PRAG), le rhamnogalacturonane de type II (RG-II) et les oligosaccharides.

1. Les mannoprotéines (MP)

Ce sont des protéoglycannes libérés dans les moûts en fermentation, dès le début de la croissance des levures (Llaubères *et al.* 1987, Waters *et al.* 1993). Elles sont composées par environ 20% de protéines et 80% de chaînes de mannoses liés en α -(1→6), α -(1→2) et α -(1→3). Leur masse molaire est très hétérogène, allant de 5000 à plus de 400000. Les teneurs dans les vins sont proches de 100-150 mg/L suivant la souche de levures utilisée.

2. Les polysaccharides riches en arabinose et galactose (PRAG)

Les PRAG regroupent les arabinogalactanes (AG-II), des arabinogalactane-protéines de type II (AGP) et des arabinanes.

Les AG-II sont des chaînes latérales liées aux résidus rhamnose des RG-I présents dans les zones hérissées des pectines. Ils sont libérés au cours de la macération des parties solides de la baie par dégradation enzymatique. Ils contiennent à la fois des acides glucuroniques (de 6 à 15%) et galacturoniques (2%) et un taux de protéine faible (Pellerin *et al.* 1995).

Les AGP sont solubles dans la paroi et diffusent dès le début de la vinification dans le milieu liquide. Une étude a identifié plusieurs fractions d'AGP (Vidal *et al.*, 2003b) dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau 4.

Tableau 4. Composition et masse molaire apparente des fractions d'AGP isolées à partir d'un vin rouge (Vidal *et al.*, 2003b).

Glycosyl-résidue	AGP0 ^b	AGP0 ^c	AGP1	AGP2	AGP3	AGP4
<i>Neutral</i>						
Arabinose	40.3 (2.8) ^a	36.4 (1.3)	41.9 (2.3)	40.2 (2.0)	36.9 (0.6)	24.3 (0.8)
Rhamnose	1.0 (0.6)	1.4 (0.0)	3.0 (0.2)	3.9 (0.2)	9.2 (0.2)	14.1 (0.2)
Fucose	nd ^b	nd	nd	nd	nd	0.3 (0.2)
Xylose	0.6 (0.0)	nd	nd	0.6 (0.2)	nd	2.6 90.1)
Mannose	0.4 (0.1)	1.6 (0.0)	1.4 (0.2)	2.0 (0.1)	3.8 (0.8)	5.0 90.5)
Galactose	51.8 (1.4)	51.4 (1.3)	46.7 (2.4)	44.4 (2.2)	36.4 (1.6)	28.8 (0.3)
Glucose	1.6 (0.5)	5.6 (0.5)	0.5 (0.1)	1.4 (0.6)	0.6 (0.0)	0.8 (0.1)
<i>Acidic</i>						
Galacturonic acid	nd	nd	nd	nd	5.6 (0.1)	9.6 (0.3)
Glucuronic acid	4.2 (0.4)	3.6 (0.5)	7.0 (0.3)	7.5 (0.5)	7.8 (0.3)	14.7 (0.5)
Apparent MW (kDa)	75	48	110	105	192	177

Ratio of anhydromotes.

^a The values are the mean of three repetitions (standard deviations in brackets).

^b Non-detected.

Les chaînes d'arabinanes liées aux zones hérissées peuvent être libérées dans le moût au cours de la macération. Elles sont néanmoins peu abondantes dans les vins. Des études ont isolé un arabinane soluble dans le moût, voire dans l'alcool 80% (Villettaz *et al.* 1981) et un arabinane linéaire insoluble dans un vin rouge (Belleville *et al.* 1993). Ce phénomène d'insolubilisation des arabinanes semble être dû à la perte des résidus d'arabinose terminaux liés en α -(1→3) sur la chaîne principale sous l'action d'arabinofuranosidases. Tant que la molécule reste branchée, elle est soluble même dans l'alcool (par opposition à une molécule linéaire).

La teneur en PRAG est comprise entre 50 et 150 mg/L dans les vins blancs et entre 100 et 200 mg/L dans les vins rouges.

3. Le rhamnogalacturonane de type II (RG-II)

Le RG-II est libéré dans le vin par dégradation des zones lisses des pectines sous l'action d'endo-polygalacturonase. L'abondance du RG-II dans les parois de la baie de raisin et sa résistance aux dégradations enzymatiques due à sa structure si particulière en font l'un des polysaccharides majeurs des vins d'où il peut être facilement isolé (Pellerin *et al.* 1996). Du fait de ses propriétés de dimérisation avec le bore, on peut le retrouver sous forme monomère ou dimère dans le vin. (Vidal *et al.* 2003b) a isolé plusieurs fractions de RG-II à partir de vin rouge, les caractéristiques des RG-IIs isolés à partir d'un vin rouge de Carignan sont présentées dans le Tableau 5. Les fractions RG-II 1 et 2 sont sous forme monomère, la fraction 3 majoritairement sous forme dimère (87%), la fraction 4 est un mélange des deux formes (45% de forme dimère et 55% de forme monomère).

Tableau 5. Composition des fractions de RG-II isolé à partir d'un vin rouge (Vidal *et al.*, 2003b).

Glycosyl-residue	RG-II1	RG-II2	RG-II3	RG-II4
<i>Neutral</i>				
Arabinose ^a	13.5 (1.2)	9.2 (0.2)	8.4 (0.4)	7.7 (0.2)
Rhamnose	14.4 (0.6)	14.2 (0.0)	15.5 (0.4)	15.3 (0.2)
Fucose	2.8 (0.3)	3 (0.2)	4.1 (0.2)	4.0 (0.1)
Xylose	nd ^b	nd	nd	nd
Mannose	nd	0.35 (0.1)	0.15 (0.1)	nd
Galactose	11.2 (1.9)	6.7 (0.3)	5.3 (0.2)	5.7 (0.2)
Apiose	3.9 (1.7)	4.9 (1.0)	5.8 (0.3)	4.5 (0.8)
2-O-Me-Xylose	4.9 (0.3)	5.8 (0.3)	5.7 (0.4)	5.6 (0.4)
2-O-Me-Fucose	4.1 (0.2)	4.8 (0.2)	5.0 (0.3)	5.0 (0.4)
<i>Acidic</i>				
Galacturonic acid	27.9 (0.9)	33.6 (1.0)	33.6 (1.8)	35.3 (2.1)
Glucuronic acid	4.4 (0.3)	3.6 (0.3)	3.3 (0.1)	3.5 (0.2)
Aceric Acid	5.9 (0.1)	8.7 (0.3)	8.5 (1.1)	8.4 (1.1)
DHA	1.5 (0.4)	2.5 (0.1)	2.5 (0.1)	2.33 (0.2)
KDO	2.2(0.6)	2.8 (0.3)	3.0 (0.1)	2.5 (0.4)

^a Ratio of anhydromoles. The values are the mean of three repetitions (Standard deviation in brackets).

^b Non-detected.

Le RG-II est présent dans les moûts de raisin dès le début de la vinification ce qui indique qu'il est probablement partiellement libéré au cours de la maturation du raisin. Sa concentration augmente au cours des étapes de macération des parties solides (Doco, Brillouet & Moutounet, 1996). La concentration du RG-II est donc plus abondante dans les vins rouges (80 à 150 mg/L) que dans les vins blancs (<50 mg/L).

Il est aussi important de noter que ce méga-oligosaccharide possède des propriétés remarquables :

- il a un effet sur la cristallisation de l'hydrogénotartrate de potassium. A basse concentration (<30 mg/L, cas des vins blancs), il est activateur de la nucléation, à forte concentration (> 100 mg/L, cas des vins rouges), il inhibe la croissance des cristaux (Gerbaud *et al.*, 1996).
- il ne se dégrade pas dans les vins pendant environ 10 ans (Doco *et al.* 1999)
- il chélate le plomb dans les vins. Les dimères de RG-II peuvent former des complexes de coordination avec certains cations (Pellerin *et al.*, 1997)
- il a des propriétés pharmacologiques. Plusieurs fractions de polysaccharides pectiques acides ont été testées, les plus actives contenaient des RG-I et du RG-II (Yamada, 1996).
- il diminue l'astringence des tanins en solutions modèles vin (Vidal *et al.*, 2004c).

4. Les oligosaccharides

Ils sont constitués de fragments courts issus de la dégradation des pectines. Peu de travaux dans la littérature décrivent cette fraction. Dans les vins, on retrouve des chaînes courtes d'acides galacturoniques de DP 2 à 6, plus ou moins méthylés, produits de la dégradation des zones lisses des pectines (Doco *et al.* 1997). Des résidus de xylose, mannose, glucose sont détectés dans les moûts et les vins mais les structures dont ils sont issus n'ont pas encore été identifiés. Les oligosaccharides pourraient provenir non seulement de la dégradation de pectines mais également de la dégradation d'hémicellulose et de cellulose et la présence de fragments de xylanes ne peut pas non plus être écartée (Flanzy, 1998).

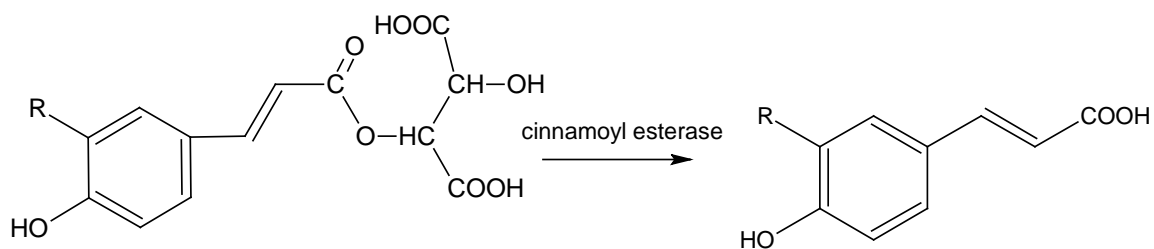
B. LES COMPOSES PHENOLIQUES DU VIN

Au cours de la vinification, les différents types de composés phénoliques présents dans la baie de raisin sont libérés plus ou moins rapidement dans le moût suivant leur localisation cellulaire, leur solubilité et leur adsorption sur les parois. A cause de leur réactivité, une grande diversité et complexité des molécules est représentée dans les vins par rapport à la baie de raisin. Tous les phénomènes biochimiques et chimiques de transformation des composés natifs ne seront pas abordés. Tout d'abord, nous exposerons les acides phénols présents dans le vin puis les anthocyanes et le phénomène de la couleur, et enfin les tanins et leur implication dans la sensation d'astringence.

1. Les acides phénols

Les acides phénols majoritairement présents dans le vin sont l'acide caftarique et l'acide coutarique. On y trouve aussi de l'acide fertarique, en moindre concentration. L'hydrolyse de ces esters a lieu naturellement mais peut être amplifiée sous l'action d'estérases. Les esters caftarique, *p*-coumarique et fertarique sont alors transformés en acides caféique, *p*-coumarique et férulique (Figure 21). Ils sont impliqués dans des phénomènes d'oxydation enzymatique ou chimique qui conduisent au brunissement des jus de raisin et du vin (Cheynier *et al.* 1989; Mane, *et al.* 2007). Leur influence sur le goût du vin semble peu importante (Noble & Shannon, 1987; Verette *et al.* 1988). Cependant, la dégradation des acides *p*-coumarique et férulique conduit à la formation de phénols volatils (vinyl- et éthyl-phénol, vinyl- et éthyl-gaïacol) responsables de défauts olfactifs (Chatonnet *et al.* 1993). La Figure 22 montre la formation du vinyl-4-phénol par décarboxylation de l'acide *p*-coumarique, sa transformation en éthyl-phénol sous l'action d'une réductase (Baumes, *et al.*

1986) et sa réaction avec une anthocyane pour former un adduit vinylphénol-anthocyane (= phenyl-pyranoanthocyane) de couleur orangée (Cameira dos Santos *et al.* 1996) (cf. II.B.4.a, p 48).



Esters	
hydroxycinnamiques	R
acide caftarique	OH
acide coutarique	H
acide fertarique	OCH ₃

Acides	
hydroxycinnamiques	R
acide caféique	OH
acide coumarique	H
acide ferulique	OCH ₃

Figure 21. Hydrolyse des esters hydroxycinnamiques.

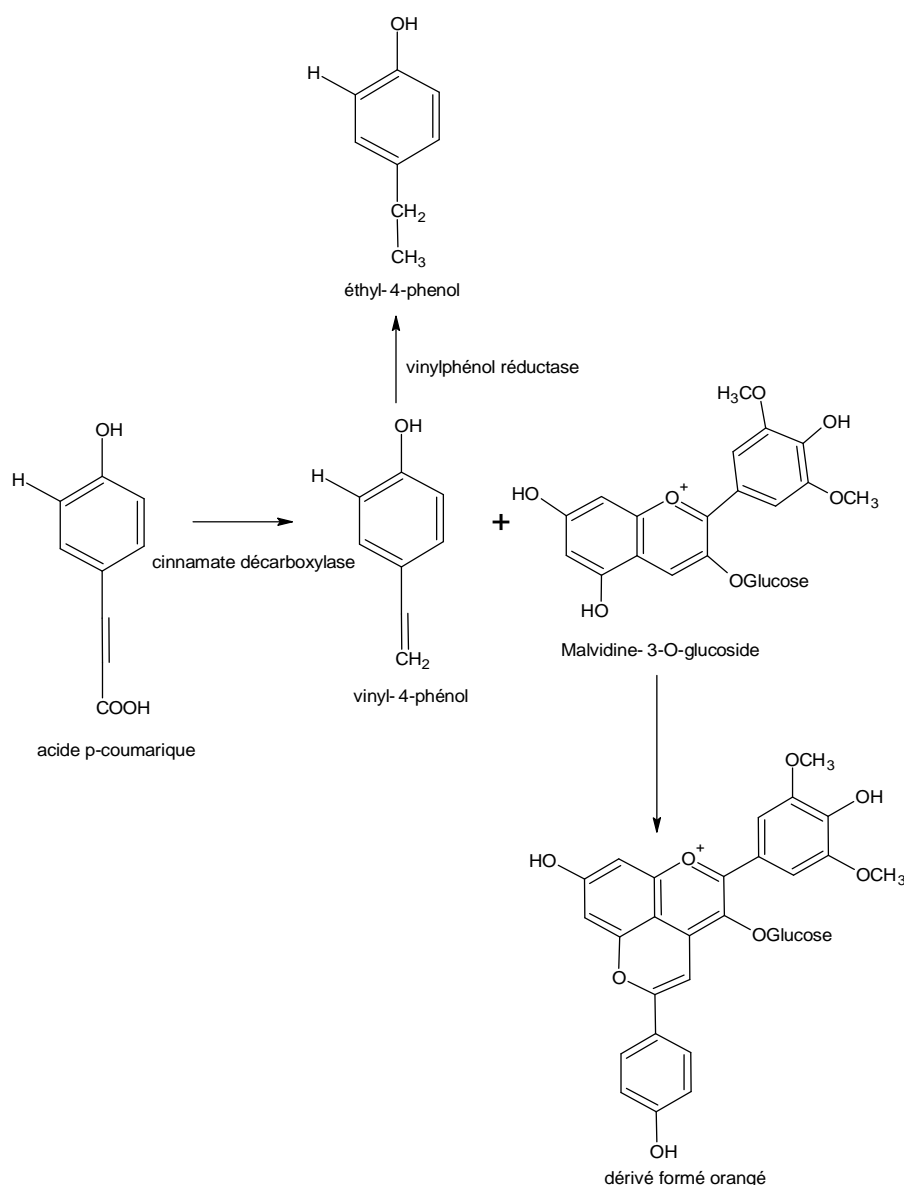


Figure 22. Formation de l'éthyl-phénol et du dérivé hydroxyphényl-pyranomalvidine-3-O-glucoside.

2. Les anthocyanes

Les anthocyanes, principalement présentes dans la pellicule de la baie, diffusent rapidement dans le moût dès le début de la vinification. Leur concentration atteint un maximum en quelques jours pour ensuite diminuer du fait de leur implication dans de nombreuses réactions (Ribéreau-Gayon, 1982; Somers, 1971, Cheynier *et al.* 1997a; Mayen, *et al.* 1995; Romero-Cascales *et al.* 2005). Ce sont des pigments instables mais leur réactivité conduit à de nombreux pigments qui participent à la couleur des vins rouges et à sa stabilité.

a. Equilibre des anthocyanes en milieu acide

En solution, les anthocyanes existent sous diverses formes en équilibre dépendant du pH (Figure 23 et Figure 24).

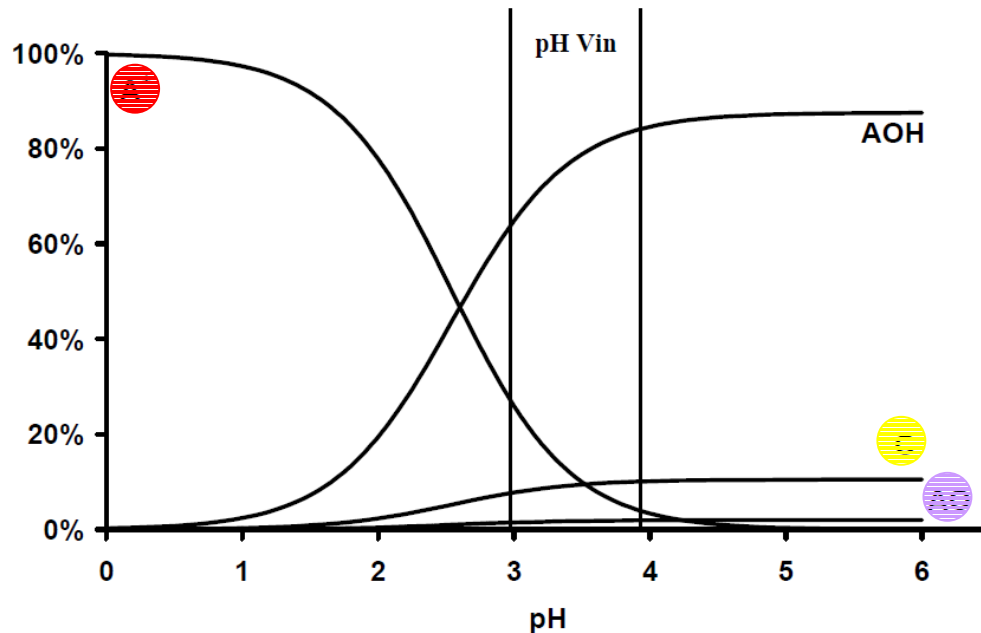


Figure 23. Equilibre des formes de la malvidine-3-O-glucoside en solution acide (Brouillard & Dubois, 1977) : A⁺ : forme flavylium, AOH : forme hémiacétal, AO : forme quinonique, C : forme chalcone.

L'ion flavylium A⁺, forme colorée en rouge sous laquelle est représentée généralement les anthocyanes, n'est prédominante qu'en milieu acide (pH < 2) et est soumise à des réactions de déprotonation et d'hydratation dès que le pH augmente (Brouillard *et al.*, 1977). La cinétique d'échange de proton A⁺ - AO s'effectue très rapidement, mais lors d'une augmentation de pH, c'est la forme incolore hémiacétal (AOH) qui prédomine. Au pH du vin, compris entre 3 et 4, la forme colorée A⁺ ne représente donc qu'entre 10 et 30% alors que la forme incolore représente entre 60 et 80% des formes en équilibre. La forme incolore hémiacétal AOH donne la chalcone jaune pâle C (en formes *cis* et *trans*) par ouverture du cycle.

b. Réactions avec le dioxyde de soufre

L'apport de SO_2 pendant la vinification peut également influencer la couleur des anthocyanes. En effet, l'addition de métabisulfite de sodium sur le carbone 4 de l'anthocyane (Figure 25) conduit à sa décoloration (Timberlake & Bridle, 1967, Berke *et al.* 1998) par formation d'un 4-sulfonate incolore. Cette réaction est réversible et la forme flavylum rouge peut être régénérée par acidification ou ajout d'acétaldéhyde qui combine le bisulfite.

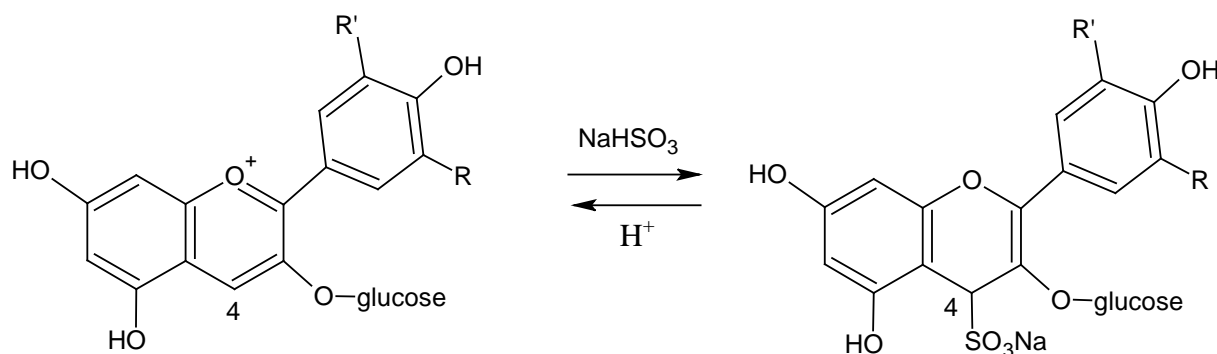


Figure 25. Addition du bisulfite de sodium sur le cation flavylum.

c. Dégradation des anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments instables, sensibles à la chaleur et aux agents oxydants. La dégradation de la malvidine-3-O-glucoside conduit à la formation principalement de l'acide 2,4,6-trihydroxyphénylacétique et de l'acide syringique (Cemeroglu *et al.* 1994; Piffaut, *et al.* 1994, Figure 26). En condition oxydante, ces produits peuvent se former en passant par la formation de malvone. La dégradation oxydante peut aussi conduire à l'apparition de forme coumarine (Hrazdina & Franzese, 1974).

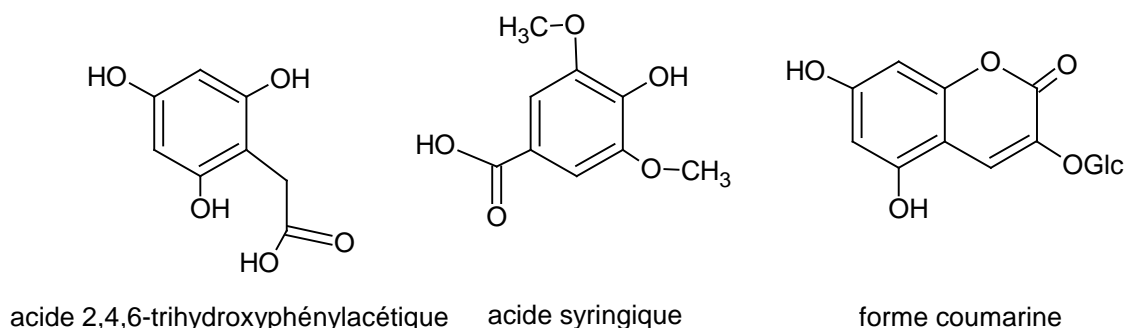


Figure 26. Produits de dégradation de la malvidine-3-O-glucoside.

d. La couleur des vins

Les différentes formes des anthocyanes et leur couleur peuvent être stabilisées par des phénomènes physico-chimiques, tels que l'auto-association ou la copigmentation intermoléculaire et intramoléculaire, résultant de l'interaction hydrophobe des anthocyanes entre elles ou avec d'autres molécules du milieu (copigments). Ces phénomènes se traduisent par un effet hyperchrome (augmentation de l'intensité d'absorption) et bathochrome (déplacement de la longueur d'onde du maximum d'absorption vers les plus fortes longueurs d'onde) sur le domaine visible (Brouillard *et al.* 1989; Gonzalez-Manzano, *et al.* 2009; Goto & Kondo, 1991; Haslam, 1998).

➤ La copigmentation intermoléculaire

Elle résulte de l'empilement vertical entre la partie plane riche en électrons π du copigment et les formes colorées de l'anthocyane (Brouillard *et al.*, 1989; Cai *et al.* 1990; Dangles & Brouillard, 1992a; Dangles & Brouillard, 1992b). Les formes colorées (A^+ , AO) ont des structures assez planes avec une forte délocalisation des électrons π permettant un stacking de type π - π avec le copigment. La formation de ces complexes protège l'anthocyanne de l'hydratation entraînant ainsi une intensification de la couleur due à la stabilisation du cation flavylum.

Ce phénomène serait la première étape dans les réactions entre anthocyanes et tanins (Brouillard & Dangles, 1994; Liao, Cai & Haslam, 1992; Rein & Heinonen, 2004).

➤ La copigmentation intramoléculaire

Elle met en jeu deux parties de la même molécule, dont l'une joue le rôle de copigment, l'autre étant le chromophore (Brouillard *et al.* 1993; Dangles, Saito & Brouillard, 1993; Figueiredo *et al.* 1996; Goto *et al.*, 1991). Par exemple, dans les anthocyanes coumaroylés et caféoylés, le noyau aromatique de la partie acylée substituant le glucose peut entraîner une stabilisation de la partie anthocyane sous forme flavylum.

➤ L'auto-association

A forte concentration, les formes colorées des anthocyanes se groupent entre elles pour former des dimères non covalents par empilement hydrophobe vertical. Ce phénomène entraîne une intensification de la couleur et une déviation de la loi de Beer-Lambert (Asen, 1972; Goto *et al.*, 1991; Hoshino, 1991). Des dimères covalents peuvent aussi se former de type $A-A^+$ (Salas, 2005; Vidal *et al.* 2004d).

➤ La mesure de la couleur des vins

La couleur des vins est mesurée classiquement par l'intensité colorante (IC) qui est la somme des absorbances à 420, 520 et 620 nm et la teinte (T) qui est le rapport entre l'absorbance à 420 nm et 520 nm (Glories, 1984). L'absorbance à 280 nm (IPT, indice des polyphénols totaux) est également mesurée pour analyser les polyphénols dans les vins. Compte-tenu des équilibres des anthocyanes en solution, d'autres indices ont été développés pour affiner cette mesure (Atanasova, 2003; Somers & Evans, 1977). Au pH du vin, tous les pigments ne sont pas colorés, des mesures de l'absorbance à 520 nm à pH acide (<1) permettent d'assurer la conversion de toutes ces molécules sous forme flavylium et d'atteindre les pigments totaux présents dans le vin. La mesure des absorbances après ajout d'acétaldéhyde permet d'accéder à tous les pigments au pH du vin en libérant les anthocyanes impliquées dans les adduits bisulfites (cf.B.2.b, p 43). La mesure après ajout de bisulfite permet d'atteindre les pigments dérivés résistants à la décoloration, issus des réactions des anthocyanes avec les autres constituants du vin (tanins, ...).

3. Les tanins et leurs propriétés

Au cours de la vinification, l'extraction des proanthocyanidines est plus lente que celle des anthocyanes. Les proanthocyanidines de pellicule diffusent plus rapidement que celles provenant des pépins, à cause de leur localisation et de la solubilité supérieure des prodelphinidines par rapport aux procyanidines galloylées. L'extraction des proanthocyanidines des pépins démarre quand la teneur en alcool augmente (Labarbe, 2000, Canals *et al.* 2005, Cheynier *et al.*, 1997a). Les tanins sont réactifs et peuvent former par réaction avec eux-mêmes ou avec les anthocyanes de nombreux dérivés tanins-tanins ou anthocyanes-tanins dans les vins. Ils ont aussi des propriétés physico-chimiques particulières et peuvent former des agrégats et interagir avec les protéines et les polysaccharides.

a. Les phénomènes d'interactions tanins-tanins et tanins-polysaccharides

Les tanins ont la propriété de s'agréger et sont impliqués dans la structure colloïdale des vins. En effet, ils peuvent former des agrégats colloïdaux en fonction de leur structure, de leur concentration et de la nature du solvant (Pianet *et al.*, 2008; Saucier *et al.* 1997; Vernhet *et al.* 2002). Leur agrégation peut être modifiée par leur interaction avec les autres constituants du vin comme les polysaccharides (Riou *et al.* 2002). Vernhet *et al.* (2002) ont montré que la taille moyenne des particules formées par l'agrégation des tanins augmentait

avec le DPm (jusqu'à un DPm de 10) puis diminuait pour des fractions de tanins de plus haut DPm. A cause de leur partie galloylée, les fractions de tanins issus de pépins forment des particules de tailles plus grandes que des polymères constitués d'épicatéchine et de catéchine. Les interactions entre tanins et polysaccharides sont aussi modulées par la teneur en alcool et la force ionique du milieu : elles décroissent lorsque la teneur en alcool augmente et accroissent lorsque la force ionique augmente. Les polysaccharides influencent également ces agrégations. Ils ne préviennent pas l'agrégation mais jouent un rôle sur l'évolution de la taille des particules. Les AGP et le RG-II sous forme monomère n'ont pas d'impact sur les agrégations alors que celles-ci sont fortement inhibées par les MP et les AGP les plus acides (Riou *et al.*, 2002). Le RG-II sous forme dimère augmente la taille des particules suggérant la co-agrégation des particules de tanins avec les polysaccharides (Riou *et al.*, 2002). Ces propriétés d'interactions avec les polysaccharides sont notamment exploitées dans des procédés œnologiques tels que l'utilisation de la gomme arabique pour empêcher la précipitation des tanins présents à l'état colloïdal dans les vins. La formation de complexes solubles (tanins-polysaccharides) pourrait être à la base de cette stabilisation.

b. Les phénomènes d'interactions entre tanins et protéines

Les tanins ont également la capacité d'interagir avec les protéines. En particulier, les interactions avec les protéines de la salive riches en proline produisent une sensation de dessèchement en bouche, une perte de la lubrification, désignée par le terme d'astringence (Bate-Smith, 1954). Cette propriété d'affinité pour les protéines est aussi utilisée dans des procédés œnologiques tel que le collage protéique où il conduit à la précipitation sélective des tanins de plus haut degré de polymérisation (Maury *et al.*, 2001).

Beaucoup d'études se sont intéressées à ces interactions (Canon *et al.* 2008; Haslam, 1974; Pascal *et al.* 2008; Sarni-Manchado & Cheynier, 2002; Sarni-Manchado *et al.* 1999; Saucier, 1997 ; Simon *et al.*, 2003). Les interactions sont modulées par la taille, la charge, le type de protéines, la structure et la concentration en tanins ainsi que par le solvant. Parmi les facteurs en relation avec le niveau d'astringence, les études en solution modèle de (Vidal *et al.*, 2003a) montrent que le degré de polymérisation des tanins est une variable importante. L'augmentation du degré de polymérisation est corrélée à une augmentation des qualificatifs « crayeux », « agressifs » et « asséchants », associés au niveau d'astringence. De même, l'astringence des tanins galloylés est plus élevée que celle des homologues non galloylés (Vidal *et al.*, 2003a). Dans d'autres études, il a été observé qu'à concentrations égales, les

tanins de pépins de faible D_{Pm} seraient aussi astringents que des tanins de pellicule de plus haut D_{Pm} et de taux de galloylation plus faible (Brossaud, Cheynier & Noble, 2001). Les monomères sont plus amers qu'astringents alors que lorsque le D_{Pm} augmente, les tanins sont plus astringents qu'amers (Lea, 1978; Robichaud & Noble, 1990; Sarni-Manchado & Cheynier, 2006). Pour finir, les oligomères de flavan-3-ols formés avec la participation de l'acétaldéhyde ont une astringence équivalente aux tanins de même masse (Vidal, *et al.* 2004b). Toutefois, l'astringence n'est pas uniquement en relation avec la composition et la concentration en flavanols natifs. Ces derniers sont sujets à de nombreuses réactions qui conduisent à divers types d'adduits issus des réactions directes d'addition nucléophile entre tanins et anthocyanes et des réactions impliquant l'acétaldéhyde dont l'incidence sur le caractère astringent reste à déterminer. Par ailleurs, une étude de l'influence des polysaccharides pectiques du vin sur l'interaction entre des tanins condensés et deux protéines salivaires montre un effet des polysaccharides, même si cet effet est fonction de la nature de la protéine, de la nature du polysaccharide et de sa charge (Carvalho *et al.* 2006). Ces résultats sont cependant difficilement extrapolables à la sensation détectée en bouche. Une étude par analyse sensorielle d'un jus frais ou d'une solution pure de tanins purifiés de kaki montre que l'astringence est largement diminuée par ajout de pectine de citrus (Taira & Ono, 1997). Dans les modèles de type vin, le RG II est responsable d'une diminution de l'astringence (Vidal *et al.*, 2004a; Vidal *et al.*, 2004c) alors que les autres polysaccharides n'ont pas d'effet sur la perception des tanins. La formation de complexes ternaires solubles (tanins-protéines-RGII) pourrait être à la base de cette réduction d'astringence.

4. Réactions des tanins et des anthocyanes

Plusieurs mécanismes dus à la réactivité chimique des flavonoïdes peuvent donner naissance à de nombreux types de produits. Le noyau A est nucléophile, le noyau B est oxydable et le noyau C est électrophile (sous forme cationique seulement) (Figure 27).

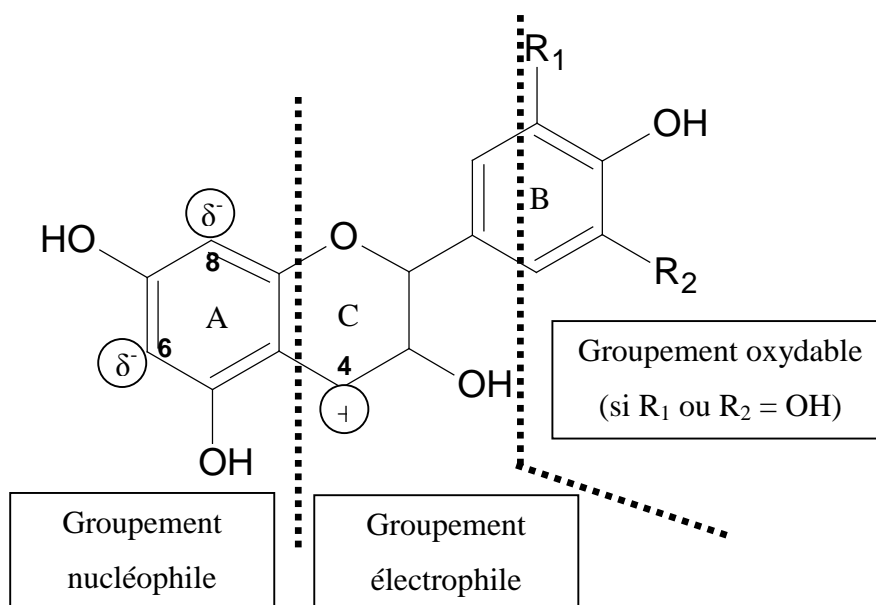


Figure 27. Réactivité chimique des flavonoïdes.

a. Produits de type pyranoanthocyane

Des pigments basés sur une structure pyranoanthocyane ont été détectés dans le vin (Bakker & Timberlake, 1997; Cameira dos Santos *et al.*, 1996; Fulcrand *et al.* 1996; Revilla, *et al.* 1999). Leur mécanisme de formation (Fulcrand *et al.* 1998) consiste en une addition entre les anthocyanes et d'autres constituants du vin, possédant une double liaison polarisable, incluant divers métabolites des levures comme l'acétaldéhyde, l'acide pyruvique et le vinyl-phénol (BenAbdeljalil *et al.* 2000; Fulcrand *et al.*, 1998 ; Fulcrand *et al.*, 1996). Les dérivés pyranoanthocyane, carboxy-pyranoanthocyane et phenyl-pyranoanthocyanes produits par réaction de la malvidine 3-glucoside et de ses dérivés acylés avec l'acétaldéhyde, l'acide pyruvique et le vinyl,4- phénol, respectivement, (Figure 28) ont été mis en évidence dans les vins. Un pigment résultant de la réaction entre la procyanidine dimère, l'acétaldéhyde et la malvidine-3-O-glucoside a obtenu en solution modèle (Francia-Aricha *et al.* 1997). Mateus *et al.* (Mateus & Freitas, 2001; Mateus *et al.* 2002) ont isolé à partir d'un vin de Porto des structures similaires : (épi)catéchine- pyranomalvidine-3-O-glucoside et flavanol dimère-pyranomalvidine-3-O-glucoside. La spécificité de ces produits réside dans leur couleur jaune-orangé mais aussi leur grande stabilité, notamment vis-à-vis de la décoloration par le bisulfite et les variations de pH (Bakker *et al.*, 1997; Sarni-Manchado *et al.* 1996).

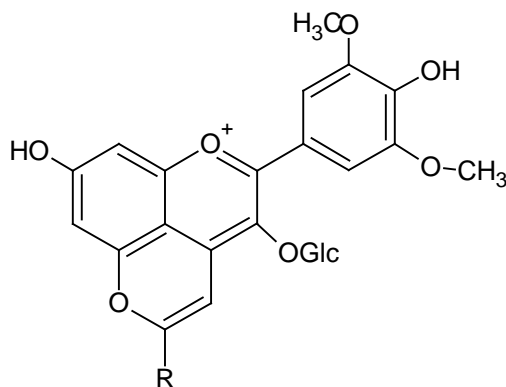


Figure 28. Structure des pyranomalvidine-3-O-glucoside détectés dans le vin ou solution modèle : R = H, pyranomalvidine-3-O-glucoside ; R= COOH, carboxy-pyranomalvidine-3-O-glucoside ; R= phénol, 4,hydroxyphényl-pyranomalvidine-3-O-glucoside ; R= flavanol monomère ou dimère, flavanyl-pyranomalvidine-3-O-glucoside.

b. Produits de type A-T

Dans ce type de réaction, l'anthocyane se trouve sous forme cationique et réagit par son sommet C4 sur un centre nucléophile du tanin (C6 ou C8) pour donner un produit incolore (anthocyane-flavan-3-ol) de type flavène (Figure 29). Celui-ci peut évoluer vers une forme cyclique dont la structure est analogue à celle des dimères de type A ou vers le cation flavylum correspondant. Ce dernier peut se réarranger pour des pigments de couleur jaune-orangée (Hrazdina & Borzell, 1971; Liao *et al.*, 1992; Salas, 2005; Santos-Buelga *et al.* 1995 ; Somers, 1971; Timberlake & Bridle, 1976).

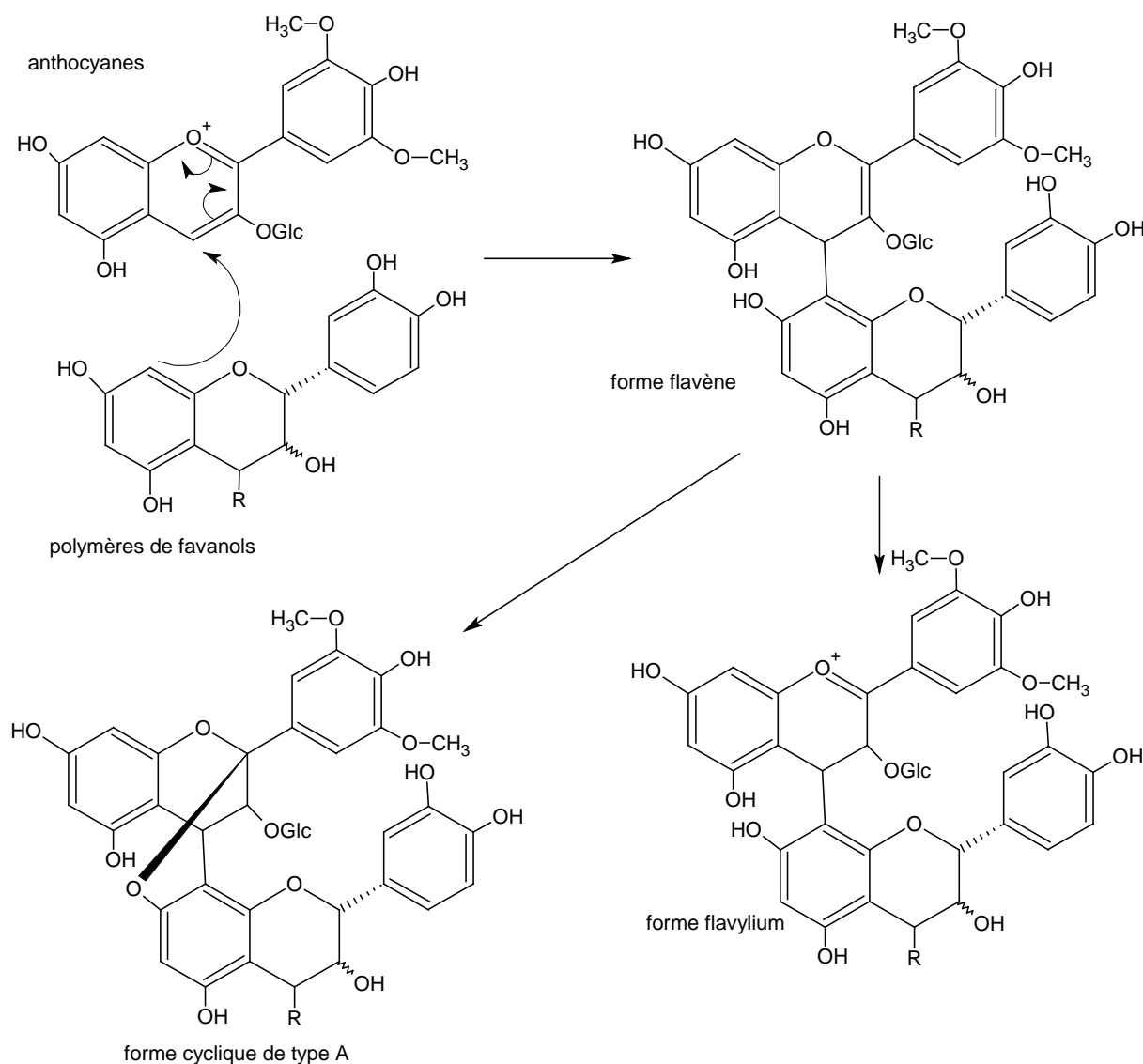


Figure 29. Structures des produits de type A-T ($R = (\text{flavanol})_n$).

c. Produits de type T-T et T-A

En milieu acide, les liaisons interflavaniques des tanins condensés sont labiles. Par rupture, un 4-carbocation se forme au niveau de l'unité supérieure, l'unité terminale étant libérée telle quelle. Ce carbocation réagit avec un carbone 6 ou 8 du cycle A d'une anthocyane présentant un caractère nucléophile (Somers, 1971). En effet, sous forme hémiacétal, le noyau A de l'anthocyane a un caractère nucléophile en C6 ou C8. La forme T-AOH incolore est en équilibre avec la forme T-A⁺ rouge ((Salas *et al.* 2003), Figure 30)). Leur présence dans les vins a été démontrée aussi sous des formes T-A-A⁺ (Alcalde-Eon, *et al.* 2007). Les carbocations libérés par rupture des liaisons interflavaniques des tanins peuvent aussi réagir avec une autre molécule de flavanol pour donner naissance à un nouveau tanin.

Ces mécanismes de rupture et de recombinaison peuvent conduire soit à une augmentation de degré de polymérisation moyen des tanins soit à une diminution de celui-ci si le milieu contient un excès d'unités monomériques (Haslam, 1980; Vidal *et al.* 2002).

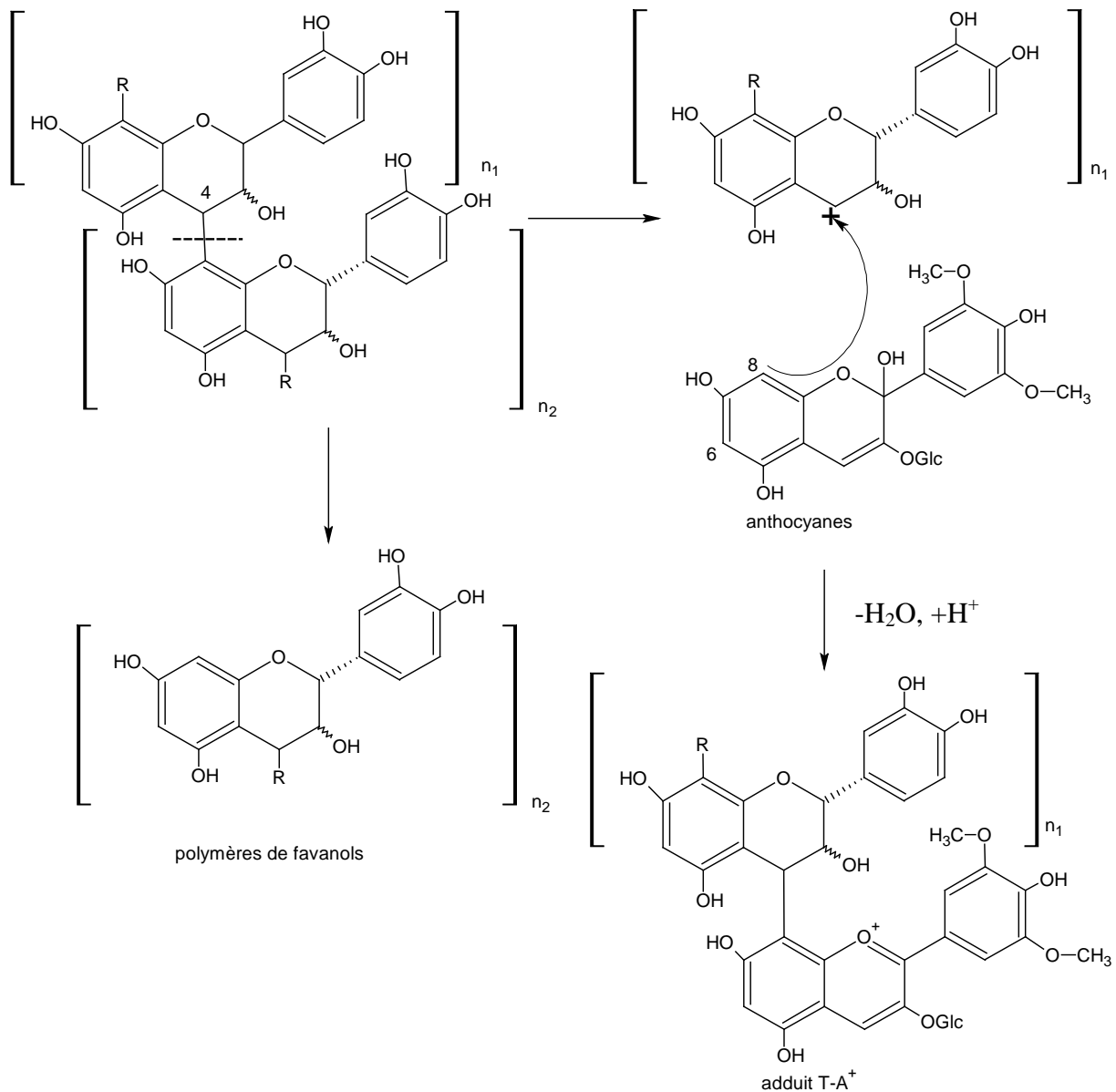


Figure 30. Mécanisme de formation des adduits T-A⁺.

d. Réactions via les aldéhydes

D'autres types de réactions existent faisant intervenir des aldéhydes comme par exemple l'acétaldéhyde qui se forme par décarboxylation de l'acide pyruvique (Liu & Pilone, 2000) ou oxydation de l'éthanol (Wildenradt & Singleton, 1974). Dans ce mécanisme, la forme protonée de l'acétaldéhyde est l'espèce électrophile. Le carbone C6 ou C8 nucléophile du flavanol attaque le carbone positif de l'acétaldéhyde pour donner un adduit flavanol-acétaldéhyde. Ce dernier, qui se protone en milieu acide, devient électrophile en perdant une molécule d'eau et subit l'attaque du carbone C8 ou C6 d'une anthocyane sous forme d'un hémiacétal (Figure 31). Le produit résultant de cette réaction est un adduit flavanol-anthocyane dans lequel les noyaux A des deux flavonoïdes sont liés par un pont méthylmethine (CH-CH₃), généralement appelé « pont éthyl » dans la littérature œnologique. L'adduit flavanol-éthyl-anthocyane, initialement sous forme d'un hémiacétal, donne le cation flavylum correspondant par déshydratation et protonation. L'intermédiaire flavanol-acétaldéhyde peut aussi réagir avec une autre molécule de flavanol pour donner un dimère catéchique dont les unités sont reliées par un pont éthyl CH-CH₃. La présence de structures dimériques et trimériques de type catéchine-éthyl-catéchine (Cheynier *et al.* 1997b; Saucier *et al.* 1997) ainsi que de type catéchine-éthyl-anthocyane (Atanasova, 2003; Es-Safi *et al.* 1999b) a été démontrée dans des solutions modèles et dans le vin, confirmant la formation de ces composés au cours de la vinification.

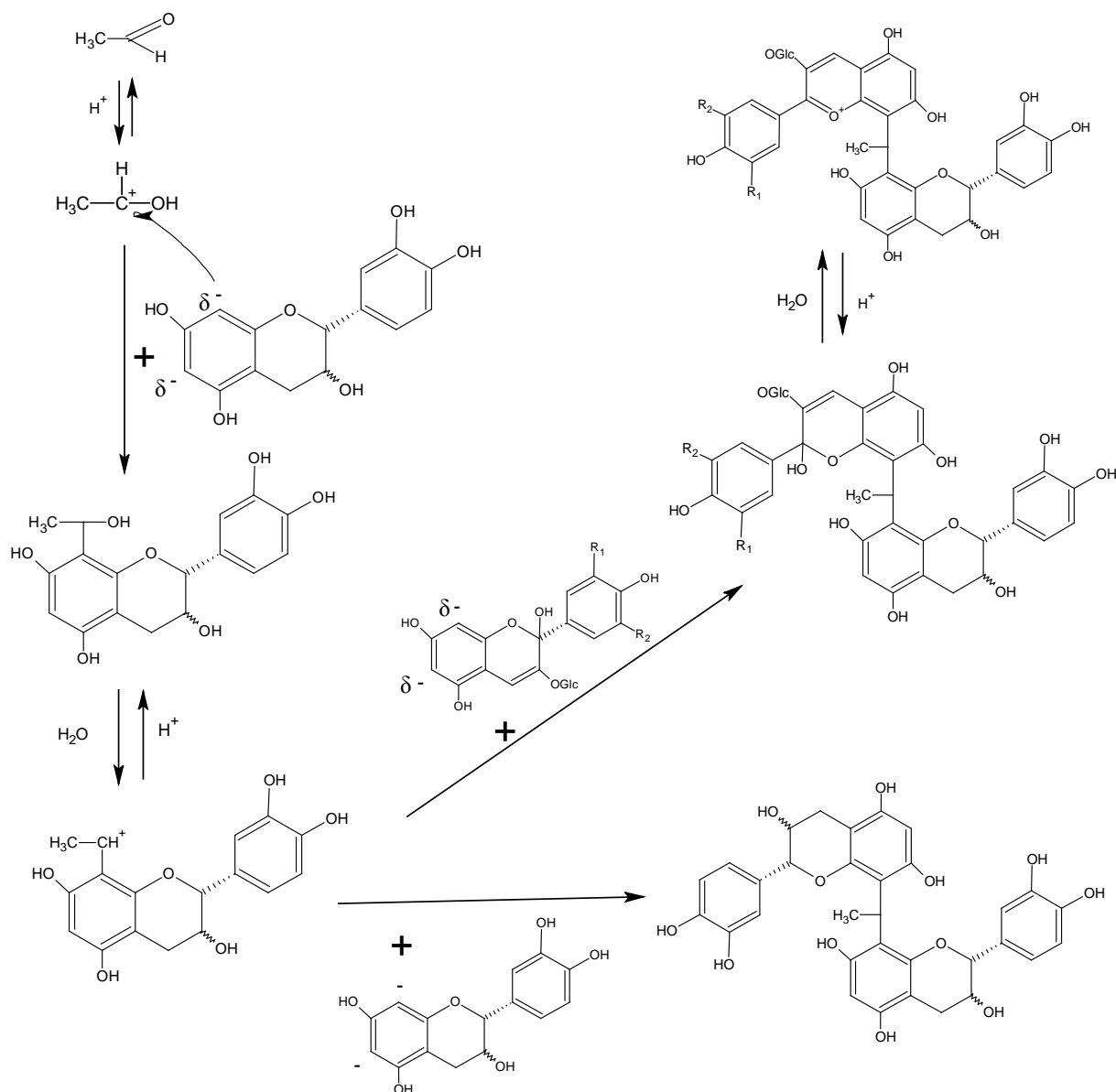


Figure 31. Mécanisme de formation des adduits flavanol-éthyl-flavanol et flavanol-éthyl-anthocyanane par réaction de condensation avec l'acétaldéhyde.

e. Caractéristiques physico-chimiques des pigments dérivés

Les structures des pigments issus des réactions des anthocyanes natives sont susceptibles de présenter de nouvelles propriétés, liées notamment aux modifications des équilibres physico-chimiques d'hydratation et d'acidité. Des travaux antérieurs (Duenas, *et al.* 2006) ont permis d'établir les constantes d'hydratation et d'acidité des pigments de type T-A et T-éthyl-A (Tableau 6). On en déduit que le dimère T-A a un comportement très similaire à la molécule d'anthocyanane mère. De ce fait, on peut penser que ce type de structure contribue

très peu à la couleur des vins. En revanche, les pigments formés par condensation avec l'acétaldéhyde ont une plus grande stabilité vis-à-vis de la réaction d'hydratation du fait de leur auto-association. Ils restent colorés dans la gamme de pH des vins en étant présents sous deux formes, cations flavylum et bases quinoniques. Par conséquent, la formation de ce type de pigments pourrait apporter une intensification de la couleur des vins (Cheynier *et al.*, 2006) dans la mesure où cette réaction s'opère à partir de la forme incolore de l'anthocyane. En outre, ces pigments concourent probablement à la teinte violette que présentent certains vins du fait du maximum d'absorbance des formes quinoniques (Figure 23).

Tableau 6. Constantes expérimentales d'hydratation et d'acidité.

Pigment	pKh	pKa
Malvidine3-glucoside	2,8	4,2
T-A	2,6	-
T-éthyl(R)-A	4,2	3,5
T-éthyl(S)-A	-	3,3
A ₍₁₎ -éthyl-A ₍₂₎	1,8 ₍₁₎ 4,6 ₍₂₎	-

Tous ces mécanismes ne sont pas exhaustifs, beaucoup de réactions entre les molécules natives du raisin et leurs dérivés se passent au cours de la vinification et du vieillissement du vin. Certains produits ont été identifiés dans les vins mais sont plus rarement dosés. En effet, ces nombreuses réactions conduisent à des structures polymériques très hétérogènes et en faible quantité dans les vins et ayant des propriétés colorantes différentes.

C. L'UTILISATION DES ENZYMES EN OENOLOGIE

En œnologie, les enzymes exogènes ont commencé à être utilisées dans les années 70. Les préparations enzymatiques commerciales servent essentiellement à amplifier et améliorer les phénomènes naturels observés au cours des étapes de vinification. Elles contiennent principalement des pectinases (PG, PL, PME) et des β -glucanases. Ces activités sont naturellement présentes dans le milieu piqu'on les retrouve dans le raisin, la levure ou la flore microbienne contaminante. Les enzymes commerciales sont produites par des micro-organismes sélectionnés : *Aspergillus niger* pour les pectinases et *Trichoderma harzianum* pour les β -glucanases. Les préparations s'utilisent tout au long du processus de vinification (Canal-Llaubères, 2000) :

- sur le raisin (macération, pressurage)
- sur le moût et le vin de presse (clarification, débourbage)
- sur le vin jeune en fin de fermentation alcoolique (élevage, filtration).

Après un rappel des applications technologiques des préparations enzymatiques commerciales, nous aborderons plus en détail l'impact des enzymes de macération sur la composition en polysaccharides et en polyphénols et la couleur des vins.

1. Applications technologiques des préparations enzymatiques commerciales

a. Le débourbage des moûts et la clarification des vins

Dans les moûts, les macromolécules (chaînes homogalacturonanes) chargées et leurs interactions électrostatiques conduisent au maintien de particules en suspension. La dégradation des chaînes homogalacturonanes sous l'action conjuguée d'endo-PG et de PME facilite la décantation rapide des bourbes (Marteau *et al.* 1963). L'ajout d'enzymes joue sur la viscosité et sur la vitesse de débourbage (Canal-Llaubères & Barbe, 1989). D'autres activités enzymatiques sont utilisées pour clarifier les vins : les β -glucanases lorsque les vendanges sont contaminées par *Botrytis cinerea* (Villettaz *et al.* 1982).

b. L'amélioration des rendements en jus

L'ajout d'enzymes, en augmentant la dégradation des parois cellulaires de la baie de raisin, conduit à une plus grande libération de jus. L'amélioration des rendements en jus lors du pressurage a été confirmée (Marteau, 1972). Plus précisément, une augmentation de la quantité de jus de goutte est observée (Canal-Llaubères *et al.*, 1989 ; Villettaz, 1996).

c. L'amélioration des extractions lors des macérations

La dégradation poussée des parois cellulaires de la pellicule par les préparations commerciales entraîne aussi une augmentation de l'extraction du potentiel aromatique et

polyphénolique de la vendange (Canal-Llaubères, 1990 ; Lecas, 1994 ; Villettaz, 1996). Les préparations dites de macération sont riches en pectinases et contiennent des activités secondaires type cellulase-hémicellulase pour améliorer l'extraction des anthocyanes et donc de la couleur. Cependant, des activités contaminantes (β -D-glucosidases) des cellulases dégradant les anthocyanes et les flavonols ont été détectées (Le Traon-Masson & Pellerin, 1998) entraînant la perte de couleur pour les anthocyanes et l'apparition de trouble du fait de la faible solubilité des aglycones des flavonols (Somers & Ziemelis, 1985).

d. L'amélioration de la filtrabilité des vins

Le colmatage par les vins des supports de filtration est dû à la présence des polysaccharides issues de la dégradation des parois du raisin et des levures, des glucanes, en cas de contamination par *Botrytis cinerea*, et des polyphénols (Belleville *et al.* 1992 ; Boissier, 2006; Cameira Dos Santos, 1995 ; Villettaz, 1990). L'utilisation de pectinases et de β -glucanases améliore la filtrabilité des vins (Humbert *et al.* 2003).

e. La libération d'arôme à partir des précurseurs glycosylés

Les préparations commerciales de pectinases, cellulases, hémicellulases ou glucanases contiennent des glycosidases impliquées dans la libération d'arôme (Cordonnier *et al.* 1989 ; Canal-Llaubères 1990 ; Dupin *et al.* 1992 ; Günata *et al.* 1993). Elles permettent d'enrichir le milieu en composés d'arômes grâce à l'hydrolyse de leurs précurseurs glycosylés (Dupin *et al.*, 1992). Pour éviter l'apparition de défauts olfactifs tels que les arômes phénolés, les préparations ont été mises au point et purifiées de l'activité cinnamoyl estérase conduisant à la formation de vinylphénols (Barbe, 1995; Chatonnet *et al.* 1992).

2. Les enzymes de macération et leur impact sur la couleur, sur la composition en polyphénols et en polysaccharides

Tout d'abord, les études traitant de l'effet des enzymes de macération sur la composition en polysaccharides des vins seront mentionnées. Concernant l'effet des préparations enzymatiques sur la composition polyphénolique, les résultats trouvés dans la littérature sont conflictuels. Il convient, par conséquent, de faire le point sur ces résultats divergents.

a. Enzymes de macération et composition en polysaccharides

Peu de publications ont étudié l'effet des enzymes sur la composition en polysaccharides des vins. Dans les moûts et les vins blancs, (Brown & Ough, 1982) ont montré une diminution de pectines méthylées et (Lao *et al.* 1996), une diminution de la turbidité, une augmentation des acides galacturoniques et une baisse des polysaccharides neutres et acides. Cependant l'effet est dépendant du cépage et du millésime. Plus récemment, dans les vins rouges, il a été démontré que les enzymes entraînaient une augmentation de la concentration de RG-II (Ayestaran *et al.* 2004; Doco *et al.* 2007). L'effet sur les PRAG est plus partagé : (Doco *et al.*, 2007) observent une diminution et une modification (perte d'arabinose) des PRAG et (Ayestaran *et al.*, 2004) une augmentation des AG et des AGP. L'ensemble de ces résultats semble indiquer que les enzymes de macération modifient la composition en polysaccharides des vins différemment suivant le cépage, le millésime, la qualité de la vendange, les conditions de vinification et la nature des enzymes.

b. Enzymes de macération et composition en polyphénols

Beaucoup d'études ont cherché à démontrer l'effet des enzymes sur la composition des vins en polyphénols. Une extraction accrue des tanins et l'augmentation de l'indice des polyphénols totaux sont observés dans de nombreux cas (Bautista-Ortin *et al.* 2005; Canal-Llaubères, 1990; Guadalupe *et al.* 2007; Kelebek *et al.* 2007; Revilla *et al.* 2003; Revilla *et al.* 2002; Salinas *et al.* 2003; Villettaz, 1996). Les effets sur l'extraction des anthocyanes et sur la couleur sont plus controversés. Une augmentation de la teneur en anthocyanes est décrite dans certains cas (Bautista-Ortin *et al.*, 2005; Kammerer *et al.* 2005; Parley, 1997; Wightman, *et al.* 1997) tandis que dans d'autres études, l'effet des enzymes sur les anthocyanes n'est pas décelable ou se traduit par une perte (Kelebek *et al.*, 2007; Pardo *et al.* 1999; Revilla *et al.*, 2002; Salinas *et al.*, 2003). La couleur étant liée à de nombreux paramètres (réactivité des anthocyanes, pH, bisulfite, copigmentation), l'impact des traitements enzymatiques sur l'intensité colorante n'est pas toujours corrélé à la concentration en anthocyanes. Ainsi, (Kelebek *et al.*, 2007) ont observé une augmentation de l'IC et des anthocyanes alors que d'autres auteurs (Bautista-Ortin *et al.*, 2005; Parley, 1997) ont démontré une augmentation de l'IC et une diminution des anthocyanes et suivant les préparations enzymatiques, une diminution de l'IC et des anthocyanes.

(Pinelo *et al.* 2006; Sacchi *et al.* 2005), dans deux revues concernant les techniques de vinification proposent plusieurs phénomènes concomitants pouvant expliquer ces résultats disparates :

- la dégradation de la paroi de la baie de raisin par les enzymes utilisées au cours de la macération peut entraîner une meilleure extraction des tanins et des anthocyanes et par conséquent un gain de couleur
- la formation de pigments dérivés (réactions entre anthocyanes et tanins) peut expliquer la diminution des anthocyanes et l'augmentation de l'intensité colorante
- les activités contaminantes telles que les β -glucosidases présentes dans certaines préparations enzymatiques dégradent les anthocyanes, ce qui induit une perte de couleur.

Toutes ces études relatent la difficulté d'établir clairement l'effet des enzymes sur la composition des vins, d'autant plus que Pimenta-Braz *et al.* (1998) ont montré que toutes les préparations enzymatiques commerciales ne sont pas équivalentes entre elles et présentent des spectres différents d'activités. Pour expliquer tous les phénomènes observés, beaucoup de paramètres rentrent en jeu tels que le cépage, la maturité des baies, les conditions de vinification, la réactivité des polyphénols, les activités enzymatiques des préparations commerciales. L'originalité des travaux de cette thèse, compte-tenu de ce contexte, a consisté à étudier simultanément les polysaccharides et les polyphénols des vins avec différentes méthodes analytiques. Ceci permettra une interprétation détaillée des données analytiques pour comprendre les effets des enzymes et leurs incidences sur la qualité des vins.

MATERIEL & METHODES

I. MATERIEL

A. VINS

1. Cadre de l'étude

Les vins de trois millésimes (2004, 2005 et 2006) ont été préparés à partir de baies de Merlot (*Vitis Vinifera L.* Figure 32A) récoltées sur une parcelle expérimentale constituée de 14 rangs de 130 pieds (Figure 32B) sur le vignoble du château Goudichaud (Saint Germain du Puch, Bordeaux, France).



Figure 32. A-Grapes de Merlot

B-Parcelle expérimentale

Les grappes ont été vendangées dans des cagettes de 13kg. Ces cagettes ont été numérotées et distribuées tous les six pieds dans le but d'obtenir un échantillonnage représentatif de la parcelle dans chaque cuve.

2. Préparation des essais

Les essais 2004, 2005 et 2006 ont été préparés au chai expérimental de Novozymes et de Laffort Œnologie au château Goudichaud (Figure 33). Des lots de 170 kg de vendanges ont été éraflés, foulés et distribués dans des cuves de 200L.



Figure 33. Chai expérimental (Crédit photo©, Novozymes).

A l'encuvage, le bisulfite (6g/hL) et les différentes préparations enzymatiques ont été ajoutés. Les différents essais d'enzymes et de procédés de vinification pour chaque millésime sont récapitulés dans le Tableau 7. Après une macération pré-fermentaire à froid (MPF) à 12°C, durant 12 heures, sous atmosphère de dioxyde de carbone, les moûts ont été levurés avec Excellence SP (Lamothe-Abiet, Bordeaux, France) à 20g/hL pour démarrer la fermentation alcoolique. Pour compenser une carence en azote de la parcelle, les moûts ont été enrichis en Thiazote (Laffort Œnologie, Bordeaux, France) pour atteindre 180 mg/L d'azote assimilable. L'homogénéité des moûts et l'implantation des levures ont été contrôlées par le laboratoire S.A.R.C.O. (laboratoire de Laffort, Bordeaux, France). L'aération des moûts et l'arrosage du chapeau ont été réalisés par deux remontages quotidiens de 75L durant les premiers jours de la fermentation alcoolique. Ensuite, les remontages ont été faits sans aération une fois par jour jusqu'à la fin de la fermentation alcoolique. Les cinétiques de fermentation ont été régulées par un système de contrôle de température équipant les cuves. La vinification a été suivie de manière quotidienne par des mesures de densité et de température, et tous les deux jours par des mesures analytiques d'intensité colorante (IC) et d'indice des polyphénols totaux (IPT). En fin de fermentation alcoolique, les moûts ont été égouttés et pressés. Les volumes des jus de goutte et de presse ont été mesurés et les jus de goutte de chaque essai ont été transférés dans une cuve de 200L. La fermentation malolactique a été ensuite induite par implantation de bactéries lactiques. Après six mois, les vins ont été filtrés, mis en bouteille et conservés au chai expérimental jusqu'à leur analyse.

Tableau 7. Liste des essais 2004, 2005, 2006.

Code	Modalité des essais	Dose: / 100 kg	Procédé
Essais 2004			
control04	témoin sans enzyme	0	12 h MPF*
A04	Vinozym Vintage FCE °	3,5g	12 h MPF
AB04	Vinozym Vintage FCE + Vinoflow FCE	3,5g + 3g	12 h MPF
C04	Lafase HE Grand Cru	4g	sans MPF
C04	Lafase HE Grand Cru	4g	12 h MPF
X04	Enzyme concurrente liquide non FCE	0,8mL	12 h MPF
Essais 2005			
control05	témoin sans enzyme	0	12 h MPF
A05	Vinozym Vintage FCE	3,5g	12 h MPF
AB05	Vinozym Vintage FCE + Vinoflow FCE	3,5g + 3g	12 h MPF
C05	Lafase HE Grand Cru	4g	12 h MPF
D05	Lafase Fruit	4g	12 h MPF
controlc05	témoin sans enzyme - c: série corsée	0	24 h MPF
Ac05	Vinozym Vintage FCE	3,5g	24 h MPF
Essais 2006			
control06	témoin sans enzyme	0	12 h MPF
A06	Vinozym Vintage FCE	3,5g	12 h MPF
AB06	Vinozym Vintage FCE + Vinoflow FCE	3,5g + 3g	12 h MPF
B06	Vinoflow FCE	5g	12 h MPF
D06	Lafase Fruit	4g	12 h MPF
E06	USP concentré FCE	2g	12 h MPF
Acx06	Vinozym Vintage FCE + cx: cellulase (NS35012)	3,5g + 10mL	12 h MPF
F06	PG/ PE (NS33081) + PL (NS33008) + cx (NS35012)	10 + 10 + 10mL	12 h MPF
G06	PG (NS35011) + PE (NS33009) + PL (NS33008) + cx (NS35012)	10 + 10 + 10 + 10mL	12 h MPF
I06	pectinase ssf (NS35010)	10mL	12 h MPF
J06	pectinase ssf (NS35013)	10mL	12 h MPF

* MPF: macération préfermentaire à froid, °FCE: faible en activité cinnamoyl-estérase

B. SOLUTIONS MODELES

1. Préparation des fractions

a. Fraction de tanins

➤ Extraction des tanins de pépins de raisin

La fraction de tanins issus de pépins de raisin a été préparée au laboratoire suivant le protocole adapté de précédents travaux (Riou *et al.*, 2002). 686,5g de pépins de Carignan ont été réduits en poudre au broyeur à billes (Dangoumau) sous azote liquide. La poudre de pépins a ensuite subi deux extractions successives à l'acétone 60% pendant 3h sous agitation à température ambiante. Les 3,5 L de liquide d'extraction ont été centrifugés puis évaporés pour réduire le volume à 1,4 L. Une extraction liquide/liquide avec de l'hexane (6*250mL) a permis d'éliminer principalement les composés lipidiques. Seule la phase aqueuse a été conservée et concentrée à l'évaporateur rotatif afin de déposer le moins de volume possible (800mL) sur la colonne de fractionnement.

➤ Fractionnement de l'extrait de tanins de pépins

L'extrait a été fractionné par chromatographie d'adsorption stérique sur une colonne Buchi (diamètre interne 70mm, Rungis, France). Pour préparer la colonne, le Fractogel TSK[®] HW-50F a été conditionné avec le solvant EtOH/H₂O/TFA (55/45/0.05, v/v/v). Les 800 mL de la phase aqueuse mélangés à 500 mL de Fractogel ainsi conditionnés ont été déposés en tête de colonne (Figure 34).



Figure 34. Préparation de la colonne de fractionnement des tannins.

Plusieurs éluions successives ont permis de séparer l'échantillon en plusieurs fractions :

- éluion avec le solvant EtOH/H₂O/TFA (55/45/0.05, v/v/v), débit 10ml/min : obtention de deux fractions F1, contenant uniquement du solvant, et F2 contenant les flavanols monomères et dimères et l'acide gallique.
- éluion à l'acétone 30%, débit 3ml/min, collecte des fractions toutes les deux heures : obtention de 8 fractions F3 à F10
- éluion à l'acétone 60%, débit 10ml/min : obtention de la fraction F60%

Les fractions ont ensuite été concentrées, congelées puis lyophilisées. Les fractions F5 à F8 ont été regroupées et cette fraction qui sera codée T par la suite a été retenue pour l'étude en solution modèle.

b. Fraction d'anthocyanes

Un pool d'anthocyanes disponible au laboratoire issu de pellicules d'Alicante Bouchet a subi deux purifications successives à l'aide d'un système Gilson comportant 2 pompes (305 et 306) et un détecteur UV-visible Jasco utilisé à 280 nm. La purification été réalisée sur une colonne Dynamax C18 (60Å 83-241C, 25 cm x 4.14 cm) suivant les conditions présentées dans le Tableau 8.

Tableau 8. Gradient d'éluion de la première purification du pool d'anthocyanes.

Temps (min)	Débit	Solvants	
		eau/HCl 0,2%	eau/acétonitrile 80% /HCl 0,2%
0	2mL/min	80	20
0,2	injection de 8 mL	80	20
0,5	4mL/min	80	20
0,8	20mL/min	80	20
20	20mL/min	60	40
24	20mL/min	40	60
26	20mL/min	40	60
28	20mL/min	80	20

Les fractions collectées n'étant pas suffisamment pures ont été concentrées, congelées puis lyophilisées pour être à nouveau purifiées. La seconde purification a été réalisée sur une colonne Microsorb C18 (B0-220-C5, 25 cm x 2.14 cm) suivant les conditions présentées dans le Tableau 9.

Tableau 9. Gradient d'éluion de la seconde purification.

Temps (min)	Débit	Solvants	
		eau/HCl 0,2%	eau/acétonitrile 80%/HCl 0,2%
0	10mL/min	82	18
0,01	injection de 2 mL	82	18
10	10mL/min	79	21
20	10mL/min	70	30
22	10mL/min	20	80
24	10mL/min	20	80
26	10mL/min	82	18

Les fractions contenant principalement de la malvidine-3-O-glucoside ont été regroupées, concentrées, congelées et lyophilisées. Cette fraction purifiée sera codée A pour l'étude en solution modèle.

c. Fraction d'arabinogalactane-protéine

Plusieurs fractions d'arabinogalactane-protéine de type II (AGP0, 1, 2, 3, 4) issues de vin rouge ont été préparées lors de précédents travaux (Doco *et al.*, 1995) et sont disponibles au laboratoire. La fraction AGP3 qui sera codée G par la suite a été retenue pour l'étude en solution modèle.

d. Fraction de rhamnogalacturonane II

Plusieurs fractions de rhamnogalacturonane II (RGII1, 2, 3, 4) issues de vin rouge ont été préparées lors de précédents travaux (Pellerin *et al.*, 1996) et sont disponibles au laboratoire. La fraction RGII3 qui sera codée R par la suite a été retenue pour l'étude en solution modèle.

e. Fraction d'oligosaccharides

➤ Dégradation d'acide pectique

La fraction d'oligosaccharides a été obtenue à partir de la dégradation d'acide pectique (Fluka) par une polygalacturonase II (PGIIase fournie par Novozymes, Danemark) selon le protocole suivant :

-200 mg d'acide pectique ont été dissous dans 40 mL de solution tampon d'acétate de sodium 0,1M à pH=4,2

- 1mg de PGIase a été dissous dans 1mL de cette même solution tampon
- 40µL de la solution de PGIase ont été ajoutés à la solution d'acide pectique
- Après deux heures de dégradation à température ambiante, l'enzyme a été inactivée par 5 minutes de bain-marie à 100°C.

➤ Purification de la fraction d'oligosaccharides

Cette fraction a été purifiée par passage sur un système de chromatographie liquide d'exclusion stérique moyenne pression équipé d'une colonne Superdex 30 (1,6 cm x 60 cm, domaine de fractionnement 5.10^2 à 10^4 , Amersham Biosciences). Cette colonne a été équilibrée par du formiate d'ammonium 30mM à pH=5,6 à un débit de 1mL/min. Les 40 mL d'acide pectique dégradé ont été fractionnés par injections successives de 2mL. La chromatographie d'exclusion stérique d'une durée de 120 min (Figure 35) a été suivie sur un réfractomètre (Erma, Japan). La fraction intéressante est collectée de 74 à 90 min puis congelée et lyophilisée. Elle a été retenue pour l'étude en solution modèle et sera codée O par la suite.

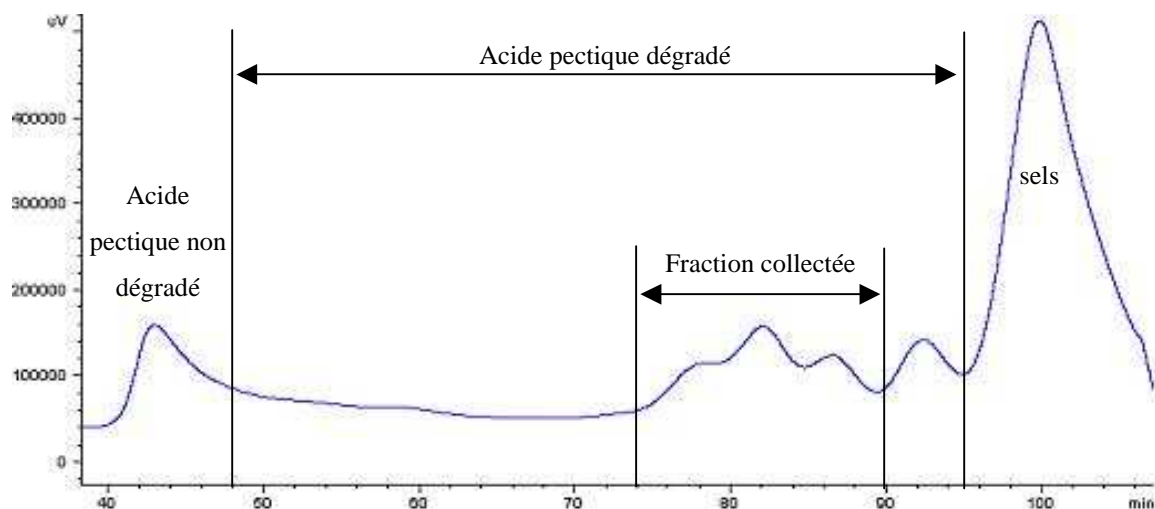


Figure 35. Profil chromatographique des oligosaccharides issus de la dégradation de l'acide pectique.

2. Préparation des solutions en milieu modèle vin

a. Modèle vin

Le milieu modèle vin utilisé est une solution aqueuse d'éthanol à 12% contenant 2 g/L d'hydrogène-tartrate de potassium et 0,8 g/L d'hydroxyde de potassium. Le pH a été ajusté à 3,4 par addition d'acide sulfurique.

b. Conditionnement des solutions

Afin d'éviter les contaminations des échantillons par des microorganismes, la verrerie utilisée (entonnoirs, béchers, pipettes) et 234 flacons à sertir, septums et bouchons ont été autoclavés pendant 20 min à 120°C. Dans le même but, la solution mère contenant la fraction de tanins et celle contenant la fraction d'anthocyanes ont été ultracentrifugées à 100 000 g pendant 45 min. Les solutions contenant les fractions de polysaccharides ont été filtrées sur filtre 0,22 µm de diamètre de pore (Millex-GV PVDF, Millipore, Irlande). Toutes les opérations de préparation ont été réalisées sous hotte à flux laminaire.

c. Incubation des solutions

234 flacons de 3mL ont été remplis avec 2,5 mL des différentes solutions. Ils ont ensuite été placés dans une armoire thermostatée à 25°C à l'abri de la lumière jusqu'à leur analyse.

II. METHODES

A. PLAN D'EXPERIENCE ET SUIVI CINETIQUE DES SOLUTIONS MODELES

Les différentes solutions ont été préparées en mélangeant les différentes fractions A, T, G, R, O dans le milieu modèle vin (cf I.B.2.a) suivant le plan d'expérience expliqué dans le Tableau 10.

Tableau 10. Plan d'expérience des solutions modèles.

code des solutions	fraction A d'anthocyanes C=500mg/L	fraction T de tanins C=2,8g/L	fraction G d'AGP3 C=200mg/L	fraction R de RG-II C=200mg/L	fraction O d'oligosaccharides C=200mg/l
A	1	0	0	0	0
AG	1	0	1	0	0
AR	1	0	0	1	0
AO	1	0	0	0	1
T	0	1	0	0	0
TG	0	1	1	0	0
TR	0	1	0	1	0
TO	0	1	0	0	1
AT	1	1	0	0	0
ATG	1	1	1	0	0
ATR	1	1	0	1	0
ATO	1	1	0	0	1
GRO	0	0	1	1	1
ATGRO	1	1	1	1	1

1 : présence ; 0 : absence

Les solutions ont été analysées à t=0, 3, 6, 10, 14, 21, 31, 45 jours et 1an.

B. ANALYSE DES VINS ET DES SOLUTIONS MODELES

1. Caractérisation et dosage des polysaccharides

a. Préparation de la fraction de polysaccharides des vins

La fraction de polysaccharides a été isolée à partir de chaque vin des trois millésimes comme décrit précédemment (Vidal *et al.*, 2003b). 2,5 mL de vin ont été mis à sec par un évaporateur sous vide (EZ-2, Genevac®). Le résidu sec a été redissous par 0,5 mL d'eau milliQ. L'addition de 2,66 mL d'éthanol 95% acidifié par 0,5% HCl permet de précipiter les colloïdes totaux du vin après une nuit à 4°C. Le surnageant a été éliminé après centrifugation (10 min, 15000 tours/min). Le culot a ensuite été dissous dans 1mL d'eau milliQ. La purification de la fraction polysaccharidique été réalisée par passage sur une colonne (volume total de 4mL) échangeuse d'ions (Mix Bed Resin AG 501-X8, Bio Rad). Les polysaccharides, non retenus, ont été élués par 10 mL d'eau milliQ et cette fraction a été congelée puis lyophilisée.

b. Analyse des masses molaires apparentes des polysaccharides

➤ Dans les vins

La distribution des masses moléculaires des polysaccharides des vins a été déterminée par chromatographie d'exclusion stérique haute pression utilisant un système équipé d'un injecteur automatique (234-137 Gilson, Roissy, France), d'une pompe LC-10 AS Shimadzu (Kyoto, Japon).

1 mg de la fraction des polysaccharides des vins a été dissout dans 250 µL d'eau milliQ. 50 µL ont été injectés et élués à 1mL/min de LiNO₃ 0,1M sur deux colonnes Shodex Ohpak KB-803 et KB-805 (0,8 cm x 30 cm, Showa Denkko, Japon) montées en série et reliées à un réfractomètre (ERC-7512, Erma, Japon).

Les masses molaires apparentes ont été déduites à partir de la courbe de calibration établie avec un kit de calibration de pullulanes (P-400, PM = 380 000 ; P-200, PM = 186 000 ; P-100, PM = 100 000 ; P-50, PM = 48 000 ; P-20, PM = 23 700 ; P-10, PM = 12 200 ; P-5,

PM = 5 800 ; Showa Denko K.K., Japon). L'équation de la courbe de calibration est $\log PM = 28,321 - 1,04tR$ (tR = temps de rétention au maximum du pic et $r^2 = 0.997$).

➤ Dans les solutions modèles

A $t = 0$ jours et 1an, 50 μL de chaque solution ont été directement injectés sur le système décrit précédemment.

c. Analyse de la composition en oses neutres des vins

L'analyse de composition a été réalisée selon la méthode décrite par Albersheim (Albersheim *et al.* 1967) modifié par Harris (Harris *et al.* 1984).

Hydrolyse

Les polyosides (de 1 à 2mg de la fraction des polysaccharides des vins) ont été hydrolysés en milieu acide (acide trifluoroacétique 2M, 0,5mL) pendant 75 min à 120°C afin de libérer les oses constitutifs (Figure 36). Cette solution a alors été séchée sous air avant ajout des étalons internes (inositol, 100 μL à 1 mg/mL, et allose, 100 μL à 1 mg/mL).

Réduction

Les échantillons ont été à nouveau séchés puis réduits par 500 μL de borohydrure de sodium (NaBH_4 dans NH_3 1N, 20mg/mL) pendant 60 min à 60°C. Après réduction, 500 μL d'acétone ont été ajoutés pour stopper la réaction et permettre un séchage sous air plus rapide.

Acétylation

Les échantillons ont ensuite été dissous dans 100 μL d'acide acétique puis acétylés par addition de 500 μL d'acétate d'éthyle, 1,5 mL d'anhydride acétique et 50 μL d'acide perchlorique à 70% (v). Après 15 minutes au bain à ultrasons, l'excès d'anhydride acétique a été éliminé par 5 mL d' H_2O en présence de 50 μL de 1-méthylimidazole.

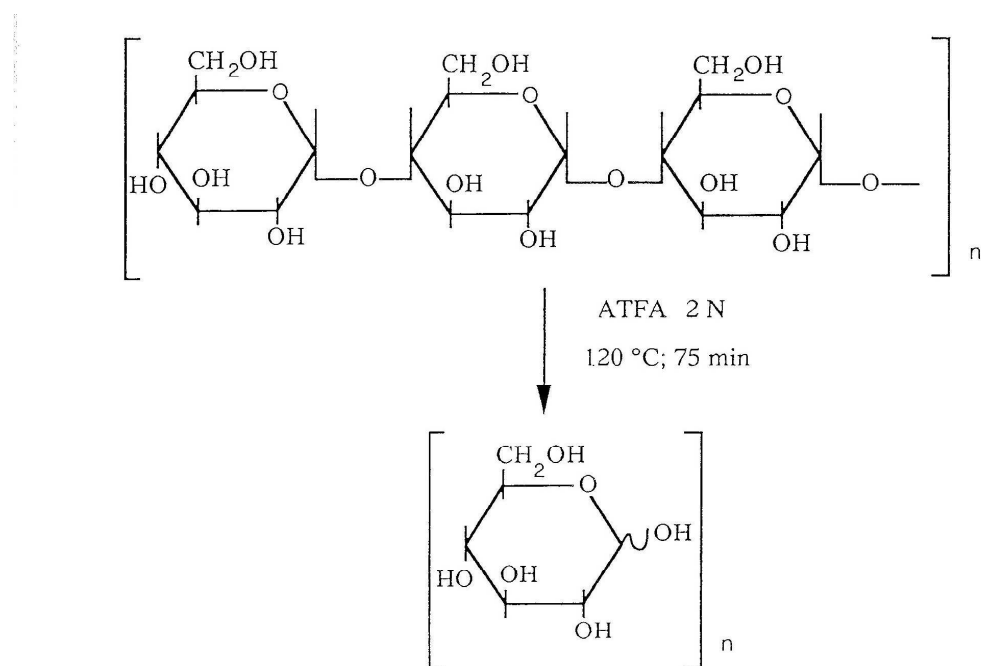
Extraction

Les dérivés réduits et acétylés sont alors extraits par 500 μL de chloroforme. Après décantation, la phase organique est récupérée et transférée pour être conservée au congélateur jusqu'à injection.

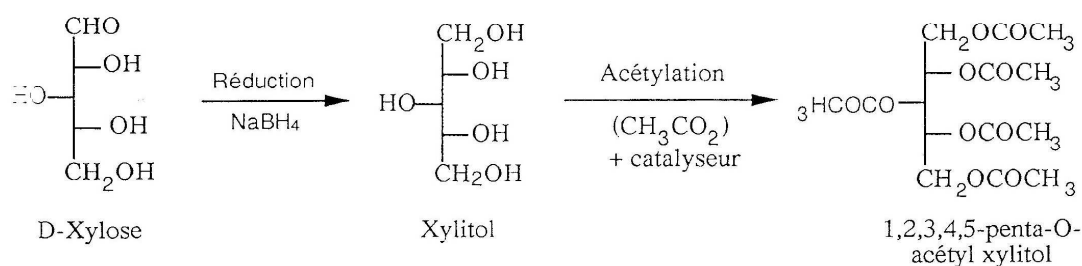
Injection en chromatographie en phase gazeuse

Les unités osidiques ainsi transformées, ou acétates d'alditols, sont séparées en chromatographie en phase gazeuse en isotherme à 210°C sur une colonne capillaire en silice fondue greffée à 50 % par du diméthylpolysiloxane et à 50 % par du cyanopropylsiloxane (DB-225) (L = 30 m, ID = 0,32 mm, film = 0,5 μm) (température de l'injecteur : 250°C,

injecteur split : 1/10, gaz vecteur H₂, débit 1 mL/min). La détection se fait par ionisation de flamme à 250°C. Pour identifier et quantifier chaque ose, les temps de rétention et les coefficients de réponse ont été calculés à l'aide d'un mélange d'oses standards et d'une solution étalon d'allose (1 mg/mL). La quantité en oses constitutifs exprimés en mg/L a permis de calculer les concentrations en mannoprotéines (MPs), en polysaccharides riches en arabinose et galactose (PRAGs) et en rhamnogalacturonane type II (RG-II) présents dans chaque vin, calcul décrit dans de précédents travaux (Doco *et al.*, 1999; Vidal *et al.*, 2001).



a- Exemple d'hydrolyse d'un polysaccharide



b - Réduction et acétylation d'un monosaccharide

Figure 36. Hydrolyse acide des polysaccharides et libération des monosaccharides constitutifs analysés sous forme d'acétates d'alditols.

2. Caractérisation des oligosaccharides des vins

a. Préparation de la fraction d'oligosaccharides

La fraction d'oligosaccharides a été isolée à partir des vins. 5 mL de vin ont été décolorés sur colonne (volume 3,5 mL) de polyamide CC6 (grosseur grains 0,05-0,16 mm) par élution de 4 mL de NaCl 1M. L'éluat a ensuite été concentré à l'évaporateur rotatif jusqu'à un volume de 2 mL. Ces 2 mL ont été injectés sur un système de chromatographie liquide moyenne pression d'exclusion stérique équipé d'une colonne Superdex 30 (1,6 cm x 60 cm, domaine de fractionnement $5 \cdot 10^2$ à 10^4 , Amersham Biosciences). Cette colonne a été équilibrée par du formiate d'ammonium 30mM à pH=5,6 à un débit de 1mL/min. L'élution d'une durée de 120 min a été suivie sur un réfractomètre (Erma, Japan). La fraction d'oligosaccharides est collectée de 60 à 93 min (Figure 37) puis congelée et lyophilisée.

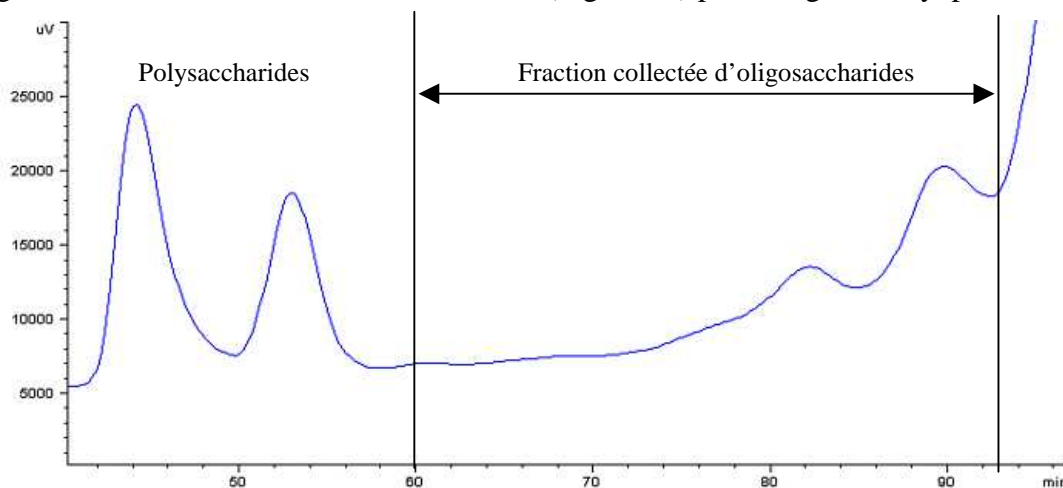


Figure 37. Profil chromatographique de la fraction collectée d'oligosaccharides.

b. Analyse des oses neutres et acides par triméthylsilylation

Les oligosaccharides ont été méthanolysés en milieu acide parfaitement anhydre pour éviter toute réaction d'hydrolyse. Les fonctions hydroxyles des oses sont triméthylsilylées afin de les rendre volatiles pour l'analyse en chromatographie en phase gazeuse (Doco, O'Neill & Pellerin, 2001).

Méthanolyse

La fraction d'oligosaccharides a été reprise par 0,5 mL d'eau milliQ. 200 μ L ont été prélevés et 50 μ L de solution standard d'inositol à 1 mg/mL ont été ajoutés. Après lyophilisation, l'échantillon a été préalablement séché sous vide à 50°C en présence de P₂O₅.

durant deux heures minimum. Puis, 500 μL d'un mélange méthanol-HCl à 0,5 N ont été ajoutés. Le mélange est préparé extemporanément en ajoutant 140 μL de chlorure d'acétyle (CH_3COCl à 99 %) à 1 mL de méthanol anhydre dans de la glace fondante. L'ensemble échantillon/mélange méthanol-HCl est placé à 80°C pendant 16 h. A ce stade, l'oligosaccharide a été méthanolysé : un groupement *O*-méthyl apporté par le méthanol est fixé par substitution nucléophile au niveau du carbocation.

Après refroidissement, les échantillons ont été évaporés à sec sous courant d'air à 40 °C afin d'éliminer l'excès de méthanol-HCl. Un second lavage a été effectué en ajoutant du méthanol et en séchant à nouveau sous air.

Silylation

Le résidu obtenu a été repris dans 330 μL de réactif de triméthylsilylation qui est alors en excès (ampoule Tri-Sil[®] Reagent, Pierce). L'ensemble est placé à 80 °C pendant 20 minutes. Après refroidissement, les tubes sont séchés à 40 °C sous flux d'air puis 0,5 mL de *n*-hexane ont été additionnés afin d'extraire les dérivés triméthylsilylés.

Injection en chromatographie en phase gazeuse

Les dérivés ont alors été injectés sur une colonne capillaire en silice fondue greffée à 100% par du diméthylpolysiloxane (DB-1) (L = 30 m, ID = 0,25 mm, film = 0,25 μm) dans les conditions chromatographiques suivantes :

√ Injection de 1 μL d'échantillon

√ Gaz : hydrogène à un débit de 2 mL/min

√ Fuite 20 mL/min injection en split/splitless

√ Gradient de la température du four :

Température initiale : 120 °C

Gradient 1 de 120 à 145°C avec une montée en température de 1,5 °C/min.

Gradient 2 de 145 à 180°C avec une montée en température de 0,9 °C/min.

Gradient 3 de 180 à 230°C avec une montée en température de 50 °C/min.

√ Température de l'injecteur et du détecteur : 250 °C

√ Temps d'acquisition : 65 minutes

√ Température de la ligne de transfert vers le spectromètre de masse : 280 °C

Au niveau du spectromètre de masse à filtre quadripolaire, la fragmentation des molécules est obtenue par impact électronique :

√ Courant d'émission et énergie d'ionisation : 34,6 μA et 70 eV

√ Température du quadripôle : 106 °C

√ Température de la source : 230 °C

√ Mode scan : de 50 à 650 à 2,5 scans/s

L'analyse des données a été réalisée avec le logiciel HP Productivity Chemstation.

c. Analyse des liaisons glycosidiques par perméthylation

L'analyse de structure par perméthylation permet de déterminer la nature des liaisons osidiques des oses constitutifs des oligosaccharides. Dans un premier temps, les hydroxyles libres (ou engagés dans une liaison de type ester, labile en milieu alcalin) des oligosaccharides ont été méthylés (Figure 38). Dans un deuxième temps, l'oligosaccharide a été hydrolysé, libérant ainsi des oses partiellement méthylés. Après réduction et acétylation, les composés ont été séparés et identifiés par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse.

Méthylation

La fraction d'oligosaccharides a été reprise par 0,5 mL d'eau milliQ. 200 µL ont été prélevés, lyophilisés et placés à 50°C sous P₂O₅ sous vide pendant 24h, puis placés dans des piluliers purgés à l'argon. La méthylation a été réalisée selon des travaux précédents (Hakomori, 1964; Harris *et al.*, 1984). On a alors ajouté 0,5 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO) sous agitation et éventuellement placé le pilulier à 80°C pour permettre une bonne dissolution des produits. Puis 0,5 mL d'anion diméthylsulfinyl de sodium ont été ajoutés et le milieu a été maintenu sous agitation pendant 1h. Après saturation des piluliers en argon, ils ont ensuite été refroidis au congélateur. Au milieu réactionnel congelé, 0,5 mL d'iodure de méthyle ont été ajoutés. La réaction exothermique a été laissée sous agitation à température ambiante pendant 1 h. On a alors procédé à l'élimination de l'iodure de méthyle, très volatil, en plaçant les échantillons sous flux d'air pendant 10 min. Les oligosaccharides partiellement méthylés ont été extraits par 2 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (2/1, v/v) et cette phase organique a été lavée par 5 x 5 mL d'H₂O afin d'éliminer le DMSO en excès puis séchée sous air.

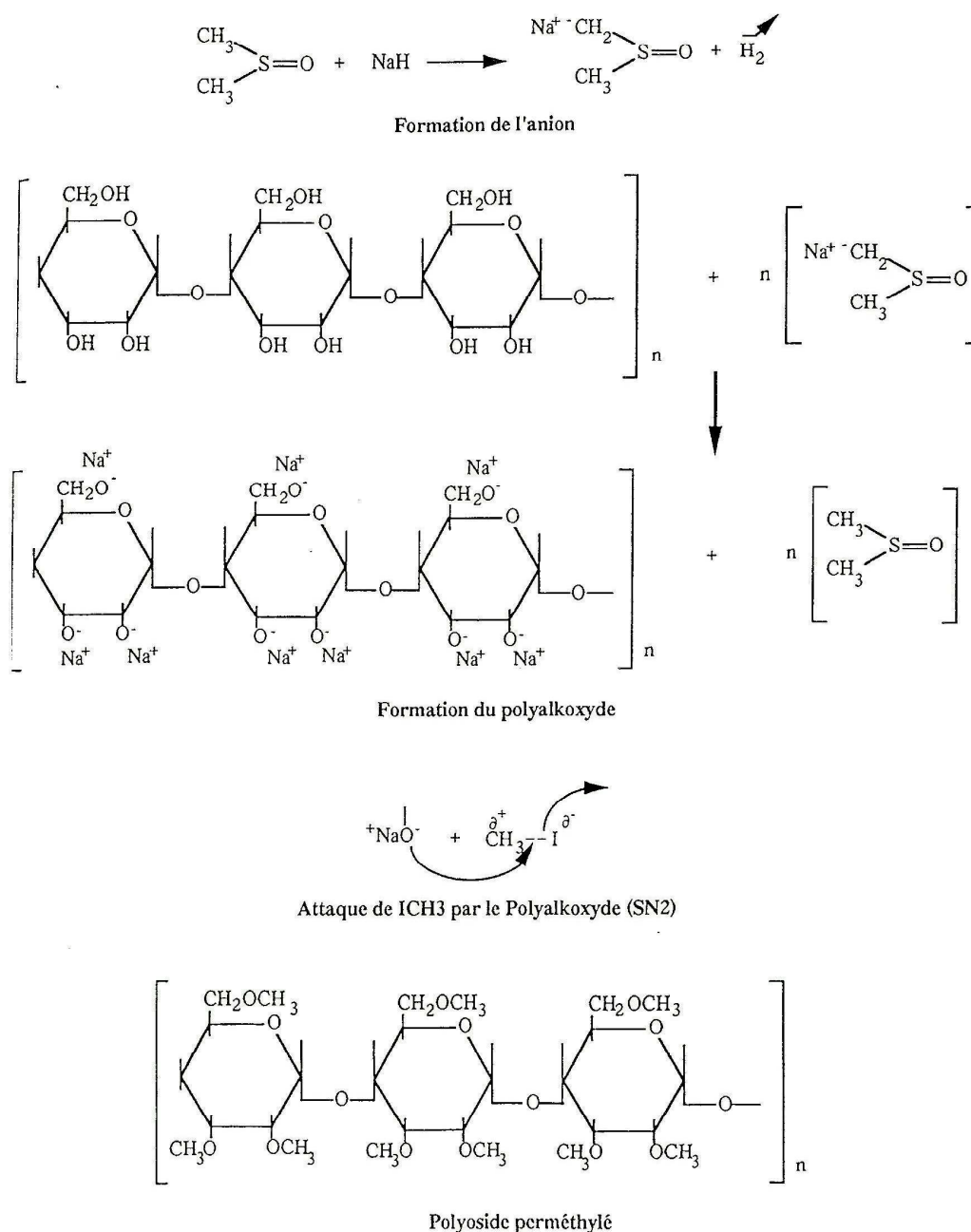


Figure 38. Réaction de perméthylation des polysaccharides et oligosaccharides.

Hydrolyse, réduction, acétylation et extraction

La réduction a été réalisée avec une solution de borodéutériure de sodium à 20 mg/mL dans NH_3 1N. La réduction avec du NaBD_4 permet d'orienter le monosaccharide libéré en marquant les substituants du carbone C1. L'hydrolyse, l'acétylation et l'extraction des acétates d'alditols partiellement méthylés ont été faites comme décrit plus haut (cf. II.B.1.c). Une solution d'inositol à 1mg/mL est ajoutée après hydrolyse comme étalon interne.

Injection en chromatographie en phase gazeuse

Les polyols partiellement méthylés et acétylés ont été séparés en CPG sur une colonne capillaire en silice fondue greffée à 100% par du diméthylpolysiloxane (DB-1) (L = 30 m, ID = 0,25 mm, film = 0,25 μm) (température de l'injecteur : 250°C, injecteur splitless : 1/20, gaz vecteur H₂, débit 2 mL/min). Le gradient de température est le suivant : 170°C pendant 15 minutes puis augmentation de 1°C/min jusqu'à 210°C.

La détection s'est faite par ionisation de flamme et par spectrométrie de masse dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (cf.II.B.2.b).

Les pics identifiés grâce à leur spectre de masse ont alors été intégrés. Les pourcentages molaires ont été calculés par rapport à la surface totale des pics ainsi que par familles d'oses en utilisant les surfaces corrigées par les facteurs de réponse établis par Sweet (Sweet, Shapiro & Albersheim, 1975).

En cas de coélutions, les échantillons ont été injectés sur une colonne capillaire en silice fondue greffée à 50 % par du diméthylpolysiloxane et à 50 % par du cyanopropylsiloxane (DB-225) (L = 30 m, ID = 0,32 mm, film = 0,5 μm) (température de l'injecteur : 250°C, injecteur split : 1/10, gaz vecteur H₂, débit 1 mL/min).

d. Analyse par spectrométrie de masse

➤ Analyse par ESI-IT

1 mg de la fraction d'oligosaccharides de chaque vin a été dissout dans 0,1 mL de MeOH/H₂O (50/50). Les spectres de masse haute résolution ont été obtenus par injection automatique de 5 μL d'échantillon au sein d'un flux de phase mobile à l'aide d'un passeur d'échantillons automatique (appartenant à un système HPLC, sans séparation préalable) couplé à un spectromètre de masse équipé d'une source electrospray et d'un analyseur à temps de vol (ESI-TOF-MS) AccuTOF (JMS-T100LC, JEOL, Tokyo). Les solvants de la phase mobile (solvant A : eau, solvant B : méthanol) ont été élués isocratiquement, 50% de A et 50% B. Le système de masse est équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI) et d'un analyseur à temps de vol (TOF). Les spectres ont été enregistrés dans les conditions suivantes :

- conditions de la source :

√ Mode : négatif

√ Tension de l'aiguille : -2000V

√ Tension de l'orifice 1 : -45V

- √ Tension de l'orifice 2 : -8V
- √ Température de la chambre de désolvatation : 250°C
- √ Température de l'orifice 1 : 80°C
 - condition de l'analyseur :
- √ Tension du guide d'ion : 2400V
 - conditions du détecteur :
- √ Tension du détecteur : 2300V
- √ Plage d'acquisition m/z : 200-4000

L'analyse des spectres a été réalisée avec le logiciel Mass Center (JEOL, Tokyo).

➤ Analyse par fragmentation

Les structures des oligosaccharides ont été déterminées par fragmentation (MSⁿ). Les analyses ont été réalisées avec un spectromètre de masse Thermo Finnigan LCQ Advantage équipé d'une source electrospray et d'une trappe ionique (permettant de réaliser de la fragmentation MSⁿ) contrôlées par le logiciel LCQ suivant les conditions suivantes :

- √ Mode : négatif
- √ Tension de source : 4500V
- √ Tension du capillaire : 31V
- √ Température du capillaire : 200°C
- √ Gamme de masse : 150-1200

Les conditions d'analyses telles que l'énergie de collision pour la fragmentation ont été ajustées suivant les structures.

3. Analyse de la couleur par spectrophotométrie UV-visible des vins et des solutions modèles

L'analyse de la couleur des vins et des solutions modèles par spectrophotométrie UV-visible a été réalisée selon le protocole adapté de Labarbe (Labarbe, 2000). Les mesures d'absorbance ont été effectuées avec un spectrophotomètre SAFAS® UV (Monaco).

a. Réactifs

Les réactifs utilisés ont été :

- une solution de SO₂ préparée à partir de 1g de Na₂S₂O₅ dans 5 mL d'H₂O.
- une solution d'HCl 1M
- une solution d'acétaldéhyde (CH₃CHO 12,6% vol.)

b. Mesures

Les échantillons ont été centrifugés (10 min à 13 000 g) avant les mesures. Les spectres des différents échantillons ont été enregistrés dans les conditions suivantes :

- **Condition 1** : échantillon seul, trajet optique de 1 mm
- **Condition 2** : 1 mL d'échantillon + 10 µL de solution d'acétaldéhyde, trajet optique de 1 mm, 30 min de repos avant la mesure. L'ajout d'acétaldéhyde permet de décomposer et de recolorer les anthocyanes impliquées dans des adduits avec le bisulfite.
- **Condition 3** : 1 mL d'échantillon + 15 µL de solution de SO₂, trajet optique de 1mm, 30 min de repos avant la mesure. L'ajout de SO₂ permet de décolorer les anthocyanes natives et certains pigments dérivés (cf. II.B.2.b)
- **Condition 4** : échantillon dilué 100 fois par la solution d'HCl 1M, trajet optique de 10 mm, 4h de repos avant la mesure. La dilution par 100 permet de mesurer l'absorbance à 280 nm et le milieu acide permet de mesurer l'absorbance à 520 nm après la conversion complète des anthocyanes sous la forme flavylium.

c. Calcul des indices de couleur

Les indices de couleur ont été calculés tels que décrit précédemment (Atanasova, Fulcrand *et al.* 2002; Glories, 1984; Somers *et al.*, 1977) à partir des absorbances mesurées exprimées pour une dilution unitaire et un trajet optique de 10 mm. Le calcul de ces indices à partir de ces absorbances est expliqué dans le Tableau 11.

Tableau 11. Calcul des indices de couleur en fonction des absorbances A_λ (exprimées pour une dilution de 1 et un trajet optique de 1 cm).

Conditions de mesure (cf p 80)	Indices	abréviations	Calcul
Condition 1	Intensité colorante	IC	$A_{420}+A_{520}+A_{620}$
	Teinte	T	A_{420}/A_{520}
Condition 2	Intensité colorante corrigé de la décoloration au SO_2	ICcorr	$A_{420}+A_{520}+A_{620}$
	Pigments au pH du vin	PV	A_{520}
Condition 3	Pigments résistants à la décoloration au SO_2	PR_{SO_2}	A_{520}
Condition 4	Indice des polyphénols totaux	IPT	A_{280}
	Pigments totaux à pH < 1	$P_{pH<1}$	A_{520}

4. Caractérisation et dosage des polyphénols

a. Analyse par HPLC-DAD des vins

➤ Conditions d'analyse

L'analyse des polyphénols a été réalisée par injection directe des vins sur un système chromatographie liquide haute pression (HPLC) couplé à un détecteur à barrette de diode (DAD, Waters 996). La chaîne HPLC est une chaîne Waters Alliance équipée d'un système de pompe 2690, d'un injecteur automatique et d'un four pour colonne. Le pilotage de la chaîne est géré par le logiciel Millennium (Waters, Milford, Etats-Unis). La séparation des composés a été réalisée sur une colonne phase inverse Atlantis dC18 (250 mm x 2,1 mm, particules de 5 μ m) protégée par une pré-colonne (20 mm x 2,1 mm, particules de 5 μ m) et d'un pré-filtre constitué d'une cartouche SecurityguardTM C18 (Phenomenex, 4 mm x 2 mm). Le volume injecté est de 5 μ L et le four est thermostaté à 30°C. Les solvants d'élution sont : le solvant A constitué d'eau/acide formique (95/5, v/v) et le solvant B constitué d'acétonitrile/eau/acide formique (80/15/5, v/v/v). Le gradient d'élution utilisé, avec un débit de 0,250 mL/min, est décrit dans le Tableau 12. Il a été suivi d'un lavage et d'une rééquilibration aux conditions initiales de la colonne.

Tableau 12. Gradient d'élution utilisé pour la séparation des composés phénoliques.

Temps (min)	Solvants	
	A (%)	B (%)
5	100	0
25	90	10
40	80	20
55	65	45
70	40	60
75	20	80

➤ **Caractérisation et dosage**

Le dosage des polyphénols a été réalisé par calibration linéaire externe avec des solutions étalons. Les coefficients de réponse ont été déterminés suivant des composés de référence :

- à 280 nm, la catéchine et l'épicatéchine sont exprimés en équivalent catéchine en mg/L
- à 320 nm, les acides phénols sont exprimés en équivalent acide *t*-caftarique (purifié au laboratoire) en mg/L
- à 520 nm, les anthocyanes sont exprimés en équivalent malvidine-3-O-glucoside (Extrasynthèse) en mg/L.

b. Analyse par HPLC-DAD des tanins après phloroglucinolyse des vins et des solutions modèles

Les tanins ont été analysés par HPLC-DAD après clivage en milieu acide en présence de phloroglucinol comme décrit précédemment (Koupai-Abyazani *et al.* 1993, Kennedy & Jones, 2001). Le mode opératoire a été optimisé au laboratoire pour l'analyse des vins rouges.

Le principe de la méthode est une dépolymérisation acido-catalysée par chauffage en milieu méthanolique en présence d'acide et d'un agent nucléophile (Figure 39). Les unités supérieures sont converties en unités monomériques sous forme de dérivés phloroglucinol et les unités terminales telles quelles.

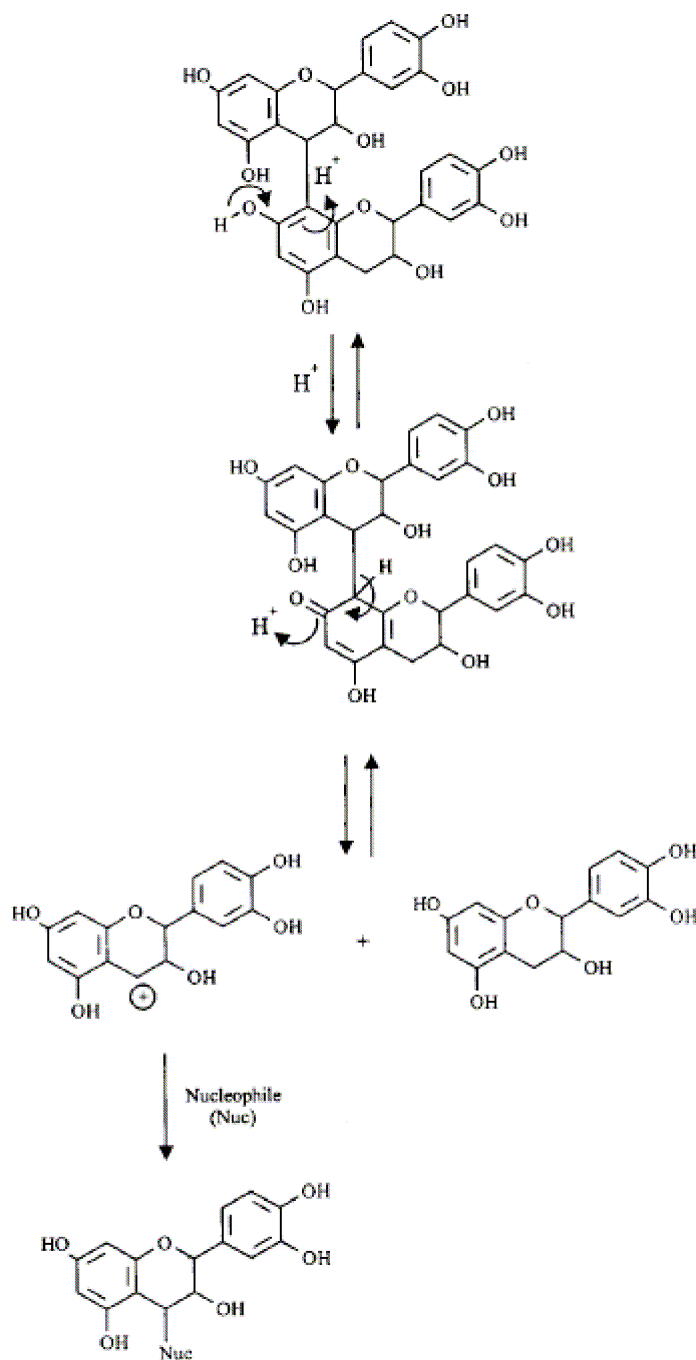


Figure 39. Mécanisme de la dépolymérisation des tanins (Kennedy *et al.*, 2001).

➤ Phloroglucinolyse des vins

4 mL de vin ont été évaporés à sec sous vide (EZ-2, Genevac®). Le résidu sec a ensuite été dissous dans 4 mL d'eau/acide acétique (98/2, v/v) puis homogénéisé par passage au vortex et aux ultrasons. 1 mL a été déposé sur une cartouche d'extraction C18 phase solide (Waters, Vac tC18 3cc) grâce à un robot automatisé (Zymark RapidTrace®SPE workstation). Les sucres et les acides organiques ont été éliminés avec 5 mL d'eau/acide acétique (98/2, v/v) et les composés phénoliques ont été récupérés par 8mL de méthanol. 100 μ L d'une

solution à 2g/L de méthyl parabène ont été ajoutés comme étalon interne. Les 8 mL de solution méthanolique ont ensuite été mis à sec par évaporation sous vide au Genevac® puis dissous dans 200 µL de MeOH contenant 0,2 N d'HCl, 50g/L de phloroglucinol et 10 g/l d'acide ascorbique. La phloroglucinolyse a été réalisée à 50°C pendant 20 min puis stoppée par l'ajout de 200 µL d'acétate de sodium 200mM.

➤ Phloroglucinolyse des solutions modèles

Le mode opératoire est le même que pour le vin mais en partant de 250 µL de solutions modèles évaporés à sec sous vide (EZ-2, Genevac®) puis repris par 2 mL d'eau/acide acétique (98/2, v/v).

➤ Analyse par HPLC-DAD

Les unités libérées après phloroglucinolyse (sous-unités terminales et d'extension) ont été analysées par chromatographie liquide haute pression couplée à un détecteur à barrette de diode (HPLC-DAD). Le système HPLC est une chaîne Waters Alliance équipée d'un système de pompe 2695, d'un injecteur automatique et d'un four pour colonne. Le pilotage de la chaîne est géré par le logiciel Empower Millenium (Waters, Milford, Etats-Unis). La séparation des unités a été réalisée sur une colonne phase inverse Atlantis dC18 (250 mm x 4,6 mm, particules de 5 µm) protégée par une pré-colonne (20 mm x 4,6 mm, particules de 5 µm) et par un pré-filtre constitué d'une cartouche Securityguard™ C18 (Phenomenex, 4,0 mm x 3,0 mm). Le volume injecté est de 10 µL et le four est thermostaté à 30°C. Les solvants d'élution sont : le solvant A constitué d'eau/acide formique (98/2, v/v) et le solvant B constitué d'acétonitrile/eau/acide formique (80/18/2, v/v/v). Le gradient d'élution utilisé dont le débit est de 1 mL/min est décrit dans le Tableau 13.

Tableau 13. Gradient d'élution utilisé pour la séparation des sous-unités de tanins.

Temps (min)	Solvants	
	A (%)	B (%)
5	100	0
35	90	10
70	80	20
75	0	100
80	100	0

Les unités constitutives des tanins obtenues après phloroglucinolyse ont été quantifiées à partir de l'aire des pics détectés à 280 nm calibrés à partir de standards externes : soit commerciaux pour les unités terminales (catéchine, épicatechine, épigallocatechine (%egc), épicatechine-3-O-gallate (%gal)), soit purifiés au laboratoire pour les unités d'extension (dérivés phloroglucinol de ces mêmes unités). La concentration en tanins a été calculée comme étant la somme des concentrations des différentes unités constitutives (terminales et dérivés phloroglucinol). Le degré de polymérisation moyen (DPm) a été calculé à partir des proportions des différentes unités par le ratio :

$$DPm = \frac{\Sigma_{\text{terminal+extension}}}{\Sigma_{\text{terminal}}}$$

c. Analyse par HPLC-DAD-ESI/IT-MS des solutions modèles

Le suivi cinétique des solutions modèles a été réalisé par injection directe sur un système de chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplé à un détecteur à barrette de diode (DAD) ainsi qu'à un spectromètre de masse équipé d'une source électrobulbion et d'une trappe d'ionisation (ESI-IT-MS).

➤ Conditions des analyses HPLC

Le système de séparation est constitué d'une chaîne Waters Alliance équipée d'un système de pompe 2690, d'un injecteur automatique et d'un four pour colonne. Le pilotage de la chaîne est géré par le logiciel Millennium (Waters, Milford, Etats-Unis). La séparation des composés a été réalisée sur une colonne phase inverse Atlantis dC18 (250 mm x 2,1 mm, particules de 5 µm) protégée par une pré-colonne aux caractéristiques identiques (4 mm x 2,1 mm). Le volume injecté est de 10 µL et le four est thermostaté à 38°C. Les solvants d'élution sont : le solvant A constitué d'eau/acide formique (98/2, v/v) et le solvant B constitué d'acétonitrile/eau/acide formique (80/18/2, v/v/v). Le gradient d'élution utilisé dont le débit est de 0,250 mL/min est décrit dans le Tableau 14.

Tableau 14. Gradient d'éluion utilisé pour la séparation des composés des solutions modèles.

Temps (min)	Solvants	
	A (%)	B (%)
0	100	0
2	98	2
12	98	2
15	97	3
25	92	8
40	80	20
45	75	25
55	75	25
70	35	65
75	35	65
77	20	80
82	20	80
85	0	100
95	0	100
98	100	0

➤ Conditions des analyses par spectrométrie de masse

Les analyses ont été réalisées avec un spectromètre de masse ThermoFinnigan LCQ Advantage équipé d'une source electrospray et d'une trappe ionique (permettant de réaliser de la fragmentation MSⁿ) contrôlées par le logiciel LCQ suivant les conditions suivantes :

- conditions de la source :

- ✓ Mode : positif
- ✓ Tension de source : 4000V
- ✓ Tension du capillaire : 31V
- ✓ Température du capillaire : 250°C

Les conditions d'analyses telles que le mode (positif ou négatif) et l'énergie de collision pour la fragmentation de nouveaux produits formés ont été ajustées suivant les composés.

➤ Calibration et suivi des solutions modèles

Les solutions ont été analysées avant et après phloroglucinolyse sur le système décrit précédemment. Pour quantifier les différents composés, une calibration externe a été réalisée. Les coefficients de réponse ont été calculés en utilisant les standards suivants :

- la malvidine-3-Oglucoside pour quantifier les pigments rouges à 520 nm
- la catéchine pour quantifier la catéchine et les tanins à 280 nm
- l'épicatéchine, l'acide gallique, l'acide syringique, l'acide vanillique et l'acide protocatéchique pour quantifier respectivement ces composés à 280nm.

5. Analyse de la stabilité des solutions modèles par diffusion dynamique de la lumière

Pour étudier la stabilité des solutions, l'intensité diffusée exprimée en kilocounts par seconde pour chaque solution a été suivie par diffusion dynamique de lumière (DDL) à $t=0, 3, 6, 10, 14, 21, 31, 45$ jours sur un Zetasizer HS 3000 (Malvern) équipé d'un laser (He-Ne) 35mV. L'angle d'incidence du laser est de 90° et la longueur d'onde à $\lambda = 633$ nm.

6. Analyse des précipités formés dans les solutions modèles après un an

a. Analyse des précipités par IR

L'acquisition des spectres infrarouges des précipités a été réalisée avec un spectromètre Avatar 360 équipé d'une cellule à réflexion totale atténuée (ATR) avec un cristal de germanium (Nicolet) géré par le logiciel Omnic. Les spectres ont été enregistrés de 950 cm^{-1} à 1850 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1} .

b. Analyse des précipités par HPCL-DAD-ESI/IT après phloroglucinolyse

De 1 à 2 mg de précipité a été écrasé au mortier pour le réduire en fine poudre et mis en suspension après passage au vortex et aux ultrasons dans $400\text{ }\mu\text{L}$ de MeOH contenant $0,2\text{ N}$ d'HCl, 50 g/L de phloroglucinol et 10 g/l d'acide ascorbique. La phloroglucinolyse a été réalisée à 50°C pendant 20 min puis stoppée par l'ajout de $400\text{ }\mu\text{L}$ d'acétate de sodium 200 mM . Les précipités après phloroglucinolyse qui deviennent solubles dans le milieu ont été analysés par injection sur le système HPLC-DAD-ESI/IT décrit précédemment (cf II.B.4.c.)

7. Analyse statistique des données

La méthode d'analyse en composantes principales (ACP) a été utilisée pour explorer la variabilité des données. Une ACP est un outil statistique qui permet d'explorer, de simplifier et de mieux visualiser les propriétés d'un ensemble de données. Elle permet de représenter les données d'une matrice complexe (à n dimensions correspondant à n variables) sur un nombre plus restreint de dimensions, appelées composantes principales.

Les données de composition et de couleur obtenues sur les vins ont été centrées et réduites pour pouvoir les explorer par une ACP. Les spectres UV-visible des solutions modèles et les spectres infrarouges ont aussi été traités par analyse en composantes principales grâce au logiciel XLSTAT (Addinsoft).

Pour les spectres de masse, un prétraitement a été réalisé pour obtenir des empreintes spectrales homogènes des fractions d'oligosaccharides de chaque vin. Tout d'abord, les 30 premières secondes du courant ionique total (TIC) ont été utilisées pour avoir un spectre moyen de l'échantillon injecté. Le spectre a ensuite été extrait sous format ASCII et exporté vers le logiciel de traitement Matlab. Pour éviter d'éventuels décalages de masse et avoir des spectres homogènes, les spectres ont été lissés, alignés, ré-échantillonnés et normalisés. La plage d'acquisition (m/z) a été réduite de 200 à 1200. L'ACP a été réalisée avec le logiciel Matlab sur les spectres de masse obtenus en mode négatif (cf II.B.2.d) préalablement traités.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I. EFFET DES ENZYMES DE MACERATION SUR LA COMPOSITION EN POLYSACCHARIDES ET EN POLYPHENOLS DES VINS ROUGES.

Au cours de la vinification, la rupture de l'intégrité des cellules de la baie de raisin entraîne la libération des polysaccharides pectiques et le transfert des composés phénoliques dans le moût. L'utilisation des enzymes de macération conduit à une dégradation accrue des parois cellulaires de la baie. Cependant, l'effet de ce traitement sur l'extraction des différents groupes de composés et la composition des vins demeure controversé. Son efficacité dépend vraisemblablement de la qualité et de la maturité de la vendange, des conditions de vinification et des préparations enzymatiques utilisées, ce qui pourrait expliquer ces résultats divergents.

Dans ce chapitre, l'effet des enzymes sur la couleur et la composition en polysaccharides et en polyphénols de vins obtenus à partir de raisins de Merlot récoltés sur la même parcelle expérimentale a été analysé sur trois millésimes (2004, 2005, 2006). Les oligosaccharides ont été pour la première fois isolés et caractérisés pour les essais 2006. La modulation de l'impact de l'enzymage par l'effet millésime sera discutée.

I. RAPPEL DES ESSAIS ET CARACTERISATION DES VENDANGES

Les différents essais sont récapitulés dans (Tableau 7, p 62). Les enzymes A et AB ont été testées en 2004, 2005 et 2006, l'enzyme C en 2004 et 2005, l'enzyme D en 2004 et 2006 et l'enzyme E en 2006. Les enzymes A, B, C, D, E sont des enzymes commerciales issues d'*Aspergillus niger* à l'exception de l'enzyme B qui provient de *Trichoderma harzianum*. Des modalités ont également été testées avec ou sans macération préfermentaire à froid (MPF) en 2005 et suivant des durées différentes de MPF (12h ou 24h) en 2004. En 2006, des préparations non commerciales issues de souches différentes ont été utilisées. Leur origine ne sera pas divulguée.

La caractérisation des vendanges 2004, 2005, 2006 a été réalisée par le laboratoire SARCO (laboratoire de recherche de Laffort œnologie). Les données œnologiques de chaque

millésime sont présentées dans le Tableau 15. La vendange 2004 a été récoltée particulièrement tard par rapport aux deux autres. La vendange 2005 est la plus acide et le poids des baies est plus faible pour ce millésime. Les indices d'extractibilité des anthocyanes (A pH=3,2) ainsi que des polyphénols (DO280) sont plus élevés en 2005 qu'en 2006 et plus faibles en 2004. Ces données vont permettre de discuter de l'effet de l'enzymage suivant la maturité de la vendange.

Tableau 15. Données oenologiques des vendanges 2004, 2005, 2006.

Millésime	date de vendanges	SR ¹ (g/L)	AT ² (H ₂ SO ₄ g/L)	Poids de 200 baies (g)	pH	A ³ pH=3,2 (mg/L)	DO280 ⁴
2004	29/09/2004	215	2.8	379	3.5	852	57
2005	19/09/2005	222	3.64	312	3.34	1017	65
2006	21/09/2006	232	3.54	350	3.47	963	62

1 : Sucres réducteurs, **2** : Acidité totale, **3** : Anthocyanes à pH=3,2 déterminées par la méthode de Glories, **4** :

Absorbance à 280nm.

II. LES POLYSACCHARIDES ET LES OLIGOSACCHARIDES DES VINS

A. PROFIL DE DISTRIBUTION EN MASSES MOLAIRES DES POLYSACCHARIDES ISOLÉS A PARTIR DES VINS ROUGES DE MERLOT

1. Effet des préparations enzymatiques commerciales

Les profils de distribution en masses molaires apparentes des fractions polysaccharidiques de chaque échantillon de vins ont été analysés par chromatographie d'exclusion stérique liquide haute performance sur colonne Shodex (cf. II.B.1.b, p 68) pour les trois millésimes 2004, 2005 et 2006. Les profils des masses molaires obtenus pour les polysaccharides isolés à partir des vins de Merlot témoins ou enzymés correspondent à ceux décrits précédemment dans la littérature (Ayestaran *et al.*, 2004; Doco *et al.*, 1999). Ils sont constitués de trois pics majoritaires (Figure 40) :

- un premier pic entre 14 et 16,5 minutes contient essentiellement des mannoprotéines de hautes masses molaires (MP).

- un second pic élué entre 16,5 et 18 minutes contient principalement les polysaccharides riches en arabinose et galactose (les PRAG sont composés d'un mélange d'AGP et d'arabinanes) et ainsi que des MP.

- le troisième pic avec un temps d'éluion entre 18 et 19 minutes correspond pour environ 50 à 60 % des polysaccharides de ce pic au rhamnogalacturonane II (RG-II) avec quelques des traces de PRAG et de MPs de faible masse moléculaire.

Pour les trois millésimes, 2004, 2005 et 2006, les profils de distribution en masse des polysaccharides des vins enzymés sont différents de ceux des vins témoins (en rouge, Figure 40). Nous pouvons observer une augmentation du troisième pic qui correspond majoritairement au RG-II de 40, 24 et 75 % en moyenne pour les vins enzymés en 2004, 2005 et 2006 respectivement. Cette augmentation du RG-II a déjà été décrite précédemment (Doco *et al.*, 2007). On constate également une modification du temps de rétention ($\Delta T_{\text{rétention}} = 0,3$ min.) du pic des PRAG qui correspond à un déplacement d'environ 50 Kda vers les plus basses masses, ce déplacement de masse moléculaire apparente est calculé par l'équation suivante : $\log M_w = 28.321 - 1.04x T_{\text{rétention}}$ obtenu par calibration de la colonne d'exclusion stérique avec des pullulanes standards. Toutes les enzymes testées ont le même impact sur le profil des masses des polysaccharides des vins des trois millésimes, avec cependant un effet nettement moins marqué en 2005, à l'exception de l'enzyme E. Cette dernière préparation enzymatique, qui n'a été testée qu'en 2006, augmente la fraction riche en RG-II, comme les autres préparations, mais elle ne modifie pas le profil de distribution en masse du pic des PRAG. Ces résultats confirment que l'ajout d'enzymes a entraîné une plus forte dégradation des parois cellulaires du raisin durant la vinification, libérant ainsi des polysaccharides de plus petites masses et probablement du RG-II, comme cela a été montré précédemment (Doco *et al.*, 2007). Cet effet est plus prononcé en 2004 et 2006. En 2005, peu de différences sont observées entre le pic des PRAG du vin témoin et des vins enzymés et l'augmentation du dernier pic est également plus modérée que pour les autres millésimes. Par conséquent, l'effet des enzymes est dépendant du millésime. Ce phénomène peut être expliqué par une différence de maturité et de qualité de la vendange comme l'indiquent les données œnologiques des vendanges (Tableau 15).

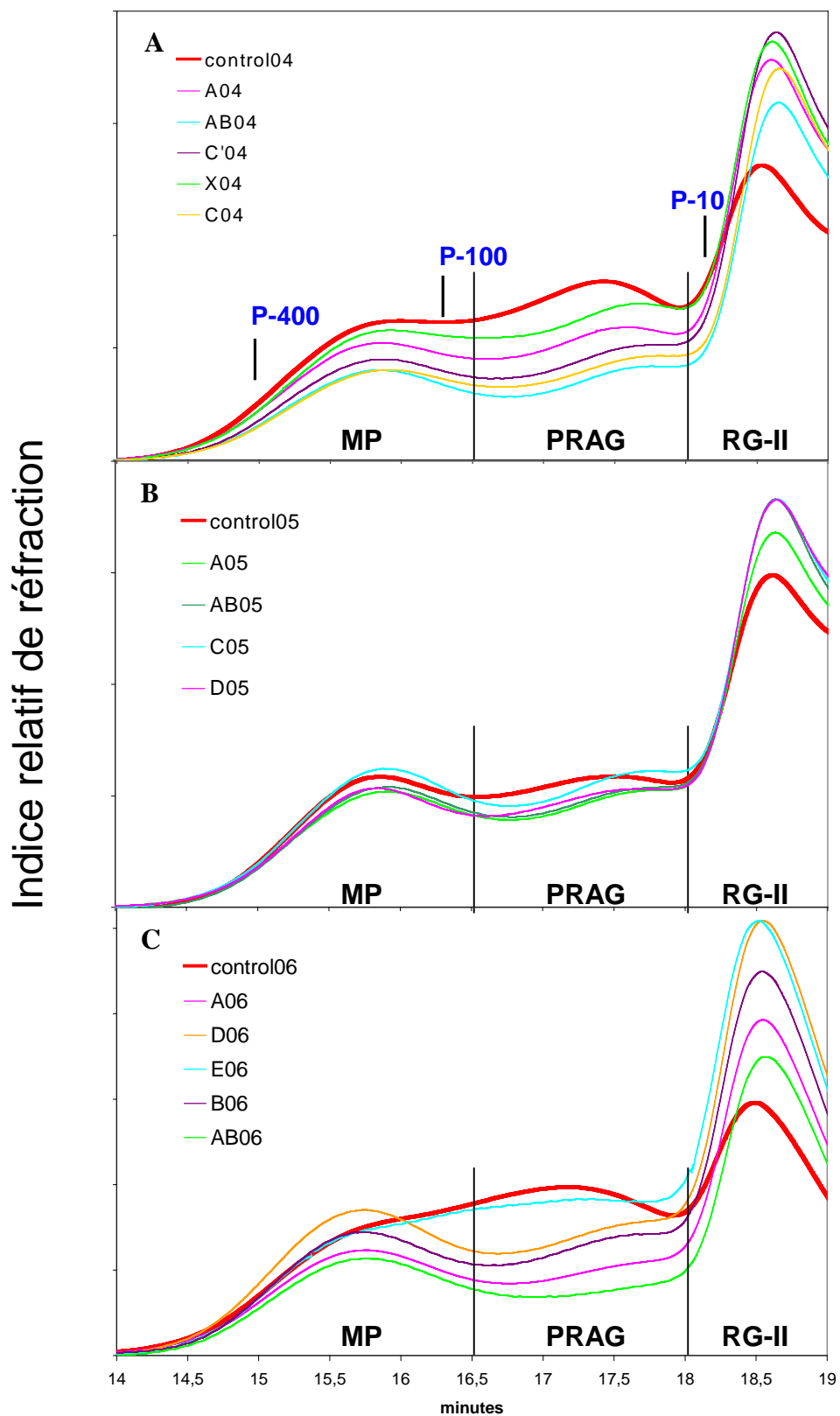


Figure 40. Profils de distribution des masses molaires apparentes des polysaccharides des vins 2004 (A), 2005 (B), 2006 (C). Les masses molaires apparentes ont été déduites d'une calibration faite à partir de pullulanes (P-400, PM = 380 kDa ; P-1 00, PM=100 kDa ; P-10, PM= 12,2 kDa).

2. Effet de préparations non commerciales

En 2006, des enzymes non commerciales (Figure 41) ont été testées (I06 et J06) ainsi que des activités enzymatiques isolées à partir de souches différentes (F06 et G06). Un essai complémentaire dans lequel une activité cellulase a été utilisée en combinaison avec l'enzyme A a également été réalisé (Acx06).

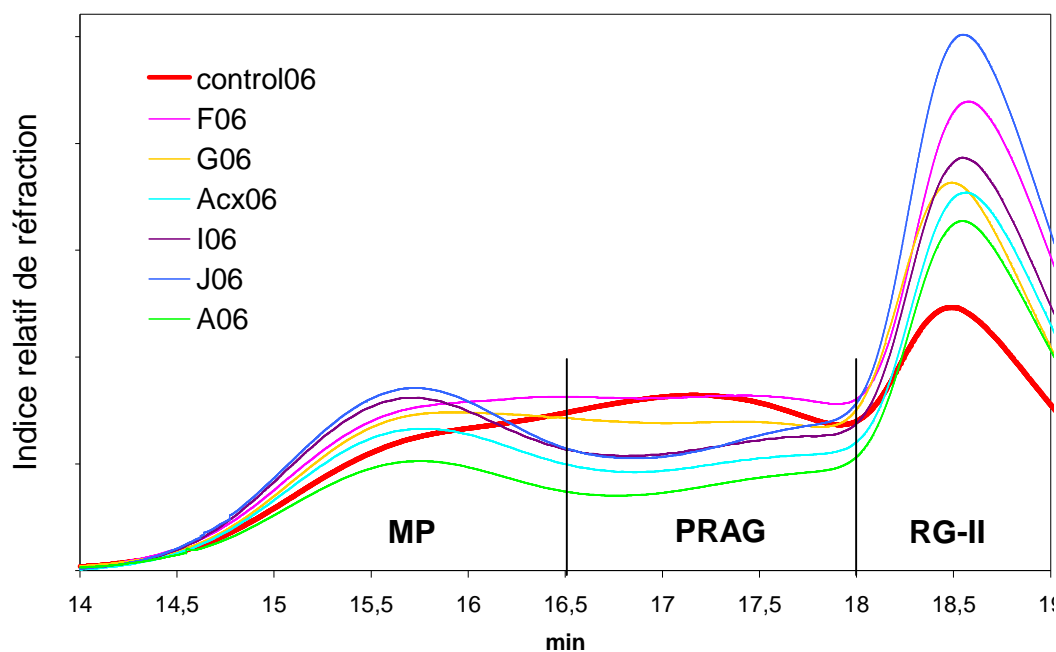


Figure 41. Profils de distribution des masses molaires apparentes des polysaccharides des vins 2006 traités par des préparations non commerciales

Toutes les enzymes non commerciales conduisent à une augmentation du pic de RG-II. L'allure du pic des PRAG est modifiée par ces préparations. L'ajout de cellulase à l'enzyme A n'induit pas de modifications particulières du profil.

3. Effet du temps de macération pré fermentaire à froid (MPF)

En 2004, l'effet de l'enzyme C (Lafase HE grand cru) a été testé avec et sans macération préfermentaire à froid (C04 et C'04, respectivement). En 2005, la modalité témoin et l'enzyme A (Vinozym Vintage FCE) ont été testées avec 12h et 24h de MPF (control05, A05 et controlc05, Ac05).

Sur la Figure 42, nous observons que la MPF ne modifie pas le profil des masses des polysaccharides du vin, lorsqu'elle est associée à l'enzyme C : la modification du pic des PRAG et l'augmentation du pic riche en RG-II par rapport au vin témoin obtenu sans MPF sont les mêmes avec ou sans MPF.

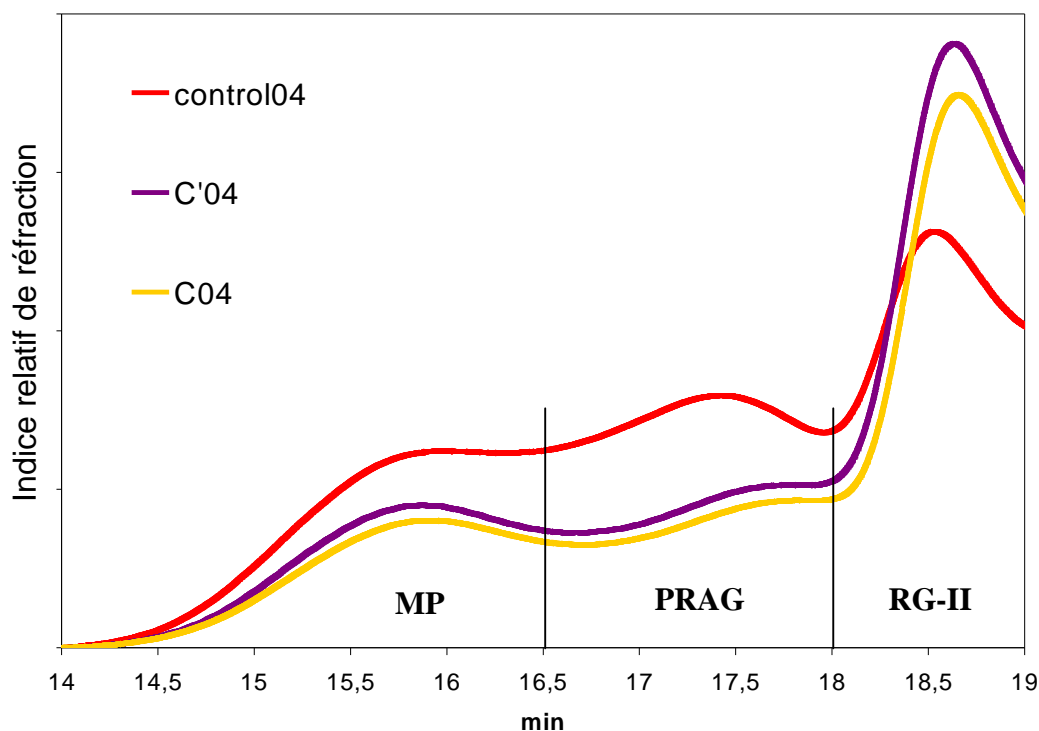


Figure 42. Effet de la macération pré fermentaire à froid, associée à un traitement par l'enzyme C, sur le profil de distribution des masses molaires apparentes des polysaccharides des vins 2004.

La Figure 43 montre des profils de distribution en masse des polysaccharides différents pour les deux vins témoins : le témoin ayant subi 24h de MPF (codé c05) présente un pic de RG-II plus faible et une quantité supérieure de MP et de PRAG. La macération plus longue favorise la diffusion de métabolites utilisés par la levure au cours de la fermentation, ce qui se traduit par une libération plus importante de mannoprotéines au final. Cette macération plus longue des parties solides de la baie de raisin conduit également à une augmentation dans les vins des polysaccharides présents dans les parois cellulaires (Vidal *et al.* 2000a). L'effet de l'enzyme est le même après 12 h ou 24h de MPF.

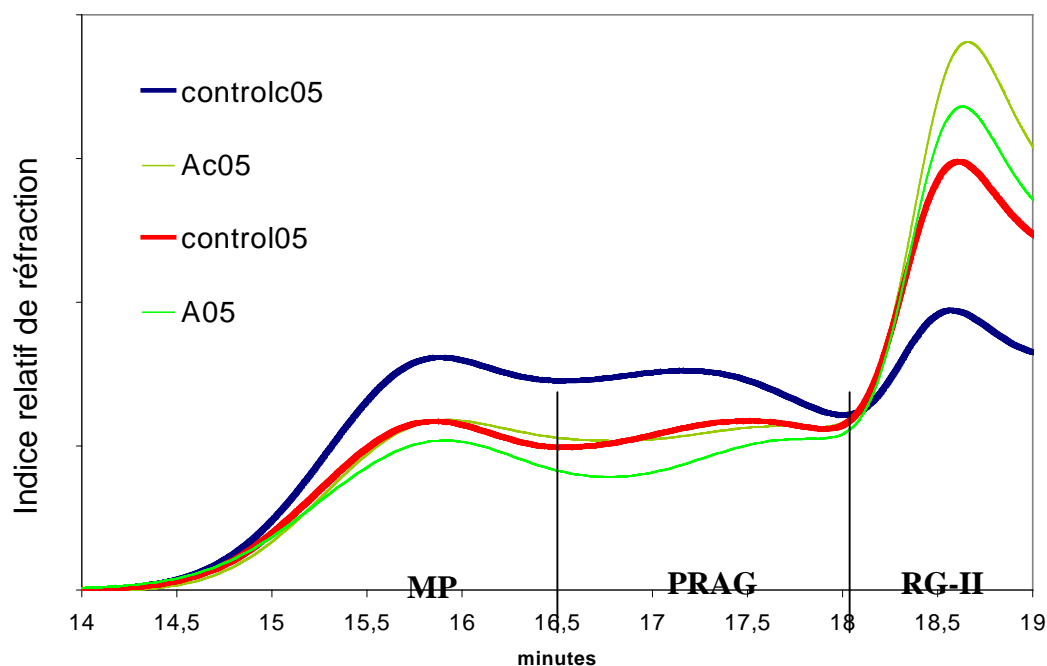


Figure 43. Effet du temps de macération préfermentaire à froid sur le profil des masses des polysaccharides des vins témoins et traités par l'enzyme A en 2005.

B. EFFET DES ENZYMES SUR LA COMPOSITION EN POLYSACCHARIDES

La composition en oses constitutifs des polysaccharides donne des informations complémentaires par rapport aux profils de distribution en masse et permet de déterminer la concentration en polysaccharides majoritaires des vins (Doco *et al.*, 1999). Les concentrations en mannoprotéines (MP), en polysaccharides riche en arabinose et galactose (PRAG) et en rhamnogalacturonane II (RG-II) des vins des trois millésimes (Figure 44) ont été déduites à partir des concentrations en monosaccharides constitutifs de leurs polysaccharides (Tableau 16). Tout le mannose est attribué aux mannoprotéines de levure (Waters, Pellerin & Brillouet, 1994). Les PRAG, représentant principalement les arabinogalactanes, les arabinogalactane-protéines et les arabinanes des vins, sont estimés à partir de la somme des résidus de galactose et d'arabinose (Francioli *et al.* 1999; Pellerin *et al.*, 1995; Vidal *et al.*, 2003b), et en tenant compte du rendement d'hydrolyse (Doco *et al.*, 1999). La concentration en RG-II des vins est calculée à partir de la somme de ses sucres caractéristiques : apiose, 2 O-Me-fucose et 2 O-Me-xylose. Pour un résidu de 2 O-Me-fucose, le RG-II contient un résidu de 2 O-Me-xylose, un résidu de fucose, 2 résidus d'apiose, 4 résidus d'arabinose, 2 résidus de galactose, et 4 résidus de rhamnose. Il est ainsi possible d'estimer sa concentration dans les vins (Doco *et al.*, 1999; Pellerin *et al.*, 1996). Les polysaccharides des vins correspondent à la somme des trois familles des polysaccharides MP, PRAG et RG-II identifiés dans les vins.

Le mannose, le rhamnose, l'arabinose et le galactose sont les principaux sucres des polysaccharides des vins de Merlot analysés (Tableau 16). Les résultats (Figure 44) montrent que les vins enzymés ont une concentration supérieure de 60 % en moyenne en RG-II par rapport aux vins témoins pour les trois millésimes analysés, ce qui est en accord avec les résultats des analyses de profils de distribution en masse. Le RG-II s'accumule dans le vin au cours de la vinification en rouge par macération des parties solides (Doco *et al.*, 1996). Il est libéré par hydrolyse enzymatique des pectines des parois cellulaires de la baie de raisin et il n'est pas dégradé par les enzymes pectinolytiques (Doco *et al.* 1997).

L'effet des enzymes sur la concentration en PRAG est dépendant du millésime : en 2004, l'ajout d'enzymes conduit à une diminution des PRAG (entre 20 à 30 %), en 2005, ils sont peu modifiés et pour le millésime 2006, ils subissent une chute importante d'environ 75 % par rapport aux PRAG du vin témoin, excepté pour l'enzyme E. Cette diminution est caractérisée par une perte en arabinose pour les PRAG des vins enzymés, mais également, à un degré moindre, par une perte de galactose. On observe une augmentation de la concentration en rhamnose dans les polysaccharides des vins enzymés corrélée avec une augmentation du rapport arabinose/galactose (Tableau 17). Ce rapport Ara/Gal est caractéristique des polysaccharides riches en arabinose et en galactose et permet de décrire les modifications des PRAG résultant de l'action des enzymes ajoutées au cours du procédé de vinification.

L'enzyme E a un comportement différent, elle augmente le rapport Ara/Gal d'un facteur 2, indiquant des mécanismes enzymatiques différents des autres préparations. La préparation E libère des polysaccharides deux fois plus riches en arabinose que ceux du vin témoin, alors que la concentration en galactose ne change pas. Ces résultats indiquent que les enzymes pectinolytiques des préparations testées hydrolysent dans un premier temps les zones homogalacturonanes des pectines et libèrent dans le moût des zones hérissées de manière plus importante que lors d'une vinification sans ajout d'enzymes (cas des vins témoins). De manière concomitante ou séquentielle, les chaînes latérales de ces zones hérissées riches en arabinanes, galactanes et arabinogalactanes subissent des dégradations conduisant à la formation de structures de plus faible masse dans les vins. Cette modification des PRAG est modulée en fonction du millésime. En effet la diminution de l'arabinose et du galactose est plus importante dans le millésime 2006 que dans les autres millésimes. Le rapport Ara/Gal est augmenté de 15 à 25 % dans les PRAG isolés à partir des vins enzymés par rapport aux vins témoins. L'augmentation de ce rapport est encore plus marquée dans le cas du traitement par l'enzyme E bien que ce traitement ne modifie pas le profil de distribution en masse des PRAGs.

Tableau 16. Analyse de la composition en oses des polysaccharides des vins 2004, 2005, 2006 (mg/L).

	2-OMe-Fuc ^{a,c} ± ^b		Rha ^{a,c} ± ^b		Fuc ^{a,c} ± ^b		2-OMe-Xyl ^{a,c} ± ^b		Ara ^{a,c} ± ^b		Api/ xyl ^{a,c} ± ^b		Man ^{a,c} ± ^b		Gal ^{a,c} ± ^b		Glc ^{a,c} ± ^b		
essais 2004																			
control04	2,3	0,8	32,1	10,9	3,0	1,3	1,3	0,2	36,9	9,8	11,0	3,3	167,6	40,5	75,3	18,2	23,0	11,5	
A04	3,6	1,7	49,3	7,5	3,8	1,2	2,7	0,9	37,2	8,4	13,3	1,9	130,5	26,7	68,0	14,2	24,3	9,0	
AB04	3,6	0,9	46,5	9,7	4,3	1,3	2,7	0,6	35,3	9,4	15,1	4,3	132,9	27,1	58,2	15,3	24,7	10,5	
C'04	3,3	0,6	54,5	13,7	4,5	1,7	2,6	0,4	38,4	9,7	16,1	5,1	123,7	23,9	59,7	12,5	25,1	12,1	
X04	3,4	0,1	53,9	7,3	4,0	1,0	2,9	0,8	47,8	7,0	14,6	1,7	147,4	21,9	73,1	9,6	23,5	9,3	
C04	3,3	0,2	47,8	8,1	3,9	1,1	2,6	0,4	33,9	4,4	14,1	2,7	126,6	9,5	56,1	4,7	22,0	9,7	
essais 2005																			
control05	2,2	0,1	39,1	7,6	3,3	1,5	1,5	0,1	27,1	4,6	13,9	0,9	125,4	11,2	61,9	6,5	26,3	1,2	
A05	3,0	0,2	45,9	0,9	3,1	0,1	2,2	0,1	30,4	2,9	14,0	1,8	121,1	12,9	50,8	6,7	21,5	3,1	
AB05	3,0	0,1	41,1	8,0	3,4	0,7	2,2	0,1	31,9	3,4	14,7	3,0	125,2	7,8	53,2	5,2	24,2	3,7	
C05	2,7	0,5	36,9	4,2	4,6	3,9	2,0	0,9	27,5	3,9	13,1	1,1	99,5	13,8	45,9	5,7	18,0	0,7	
D05	3,0	0,2	53,3	11,6	3,9	1,4	2,3	0,3	39,1	4,0	17,3	2,7	129,7	21,9	69,2	8,8	28,0	4,1	
controlc05	1,1	0,1	21,9	2,1	1,7	0,3	1,2	0,7	44,6	5,6	13,3	1,6	172,9	11,9	75,9	9,9	25,0	1,8	
Ac05	3,0	0,1	46,6	5,9	3,7	0,6	2,5	0,6	38,2	4,1	14,6	2,7	106,3	11,4	53,6	3,2	20,8	3,2	
essais 2006																			
control06	1,8	0,1	12,1	0,0	1,3	0,1	1,6	0,4	29,1	0,7	3,5	0,4	100,9	1,0	60,0	0,8	9,6	2,0	
A06	2,8	0,1	14,0	1,0	1,9	0,3	2,1	0,3	12,9	1,1	4,2	0,4	84,2	19,0	22,0	1,0	7,3	1,4	
B06	2,9	0,0	14,9	0,4	2,2	0,6	2,4	0,2	14,6	0,3	4,4	0,3	103,2	2,2	32,3	0,9	8,0	0,9	
E06	2,7	0,1	15,9	0,4	1,6	0,1	2,2	0,0	60,2	1,5	4,3	0,4	95,5	0,5	54,3	0,6	9,7	0,9	
D05	3,0	0,2	15,4	1,7	1,9	0,3	2,3	0,2	15,9	0,7	4,6	0,3	101,3	9,2	33,1	1,2	6,7	0,5	
AB06	2,8	0,3	13,6	0,4	1,7	0,1	2,4	0,4	12,3	0,2	4,4	0,2	94,9	3,2	17,3	2,0	6,4	1,5	
F06	3,1	0,2	17,3	0,6	1,8	0,1	2,4	0,1	25,4	1,1	4,7	0,3	105,4	2,4	49,2	1,9	3,6	0,9	
G06	2,7	0,2	15,4	0,9	1,7	0,2	2,0	0,1	22,4	1,3	4,5	0,2	118,2	1,5	46,9	2,6	3,2	1,7	
Acx06	3,4	0,1	15,5	1,7	1,9	0,2	2,5	0,3	15,0	1,8	4,9	0,3	117,4	6,2	26,5	3,0	3,1	0,9	
I06	3,0	0,4	15,0	2,1	2,2	0,3	2,8	0,2	16,6	2,6	4,4	0,4	118,8	7,6	29,5	3,8	3,6	0,7	
J06	4,0	0,3	17,4	1,3	1,9	0,3	2,9	0,1	16,4	0,8	5,9	0,5	123,4	8,3	21,4	0,4	3,2	0,3	

a : Moyenne sur 3 mesures, b : écart-type ; c : 2-O-CH₃-Fuc, 2-O-CH₃-Fucose; Rha : Rhamnose; Fuc : Fucose; 2-OmeXyl : 2-O-CH₃-Xylose; Ara : Arabinose; Api : Apiose; Xyl : Xylose; Man : Mannose; Gal : Galactose; Glc : Glucose.

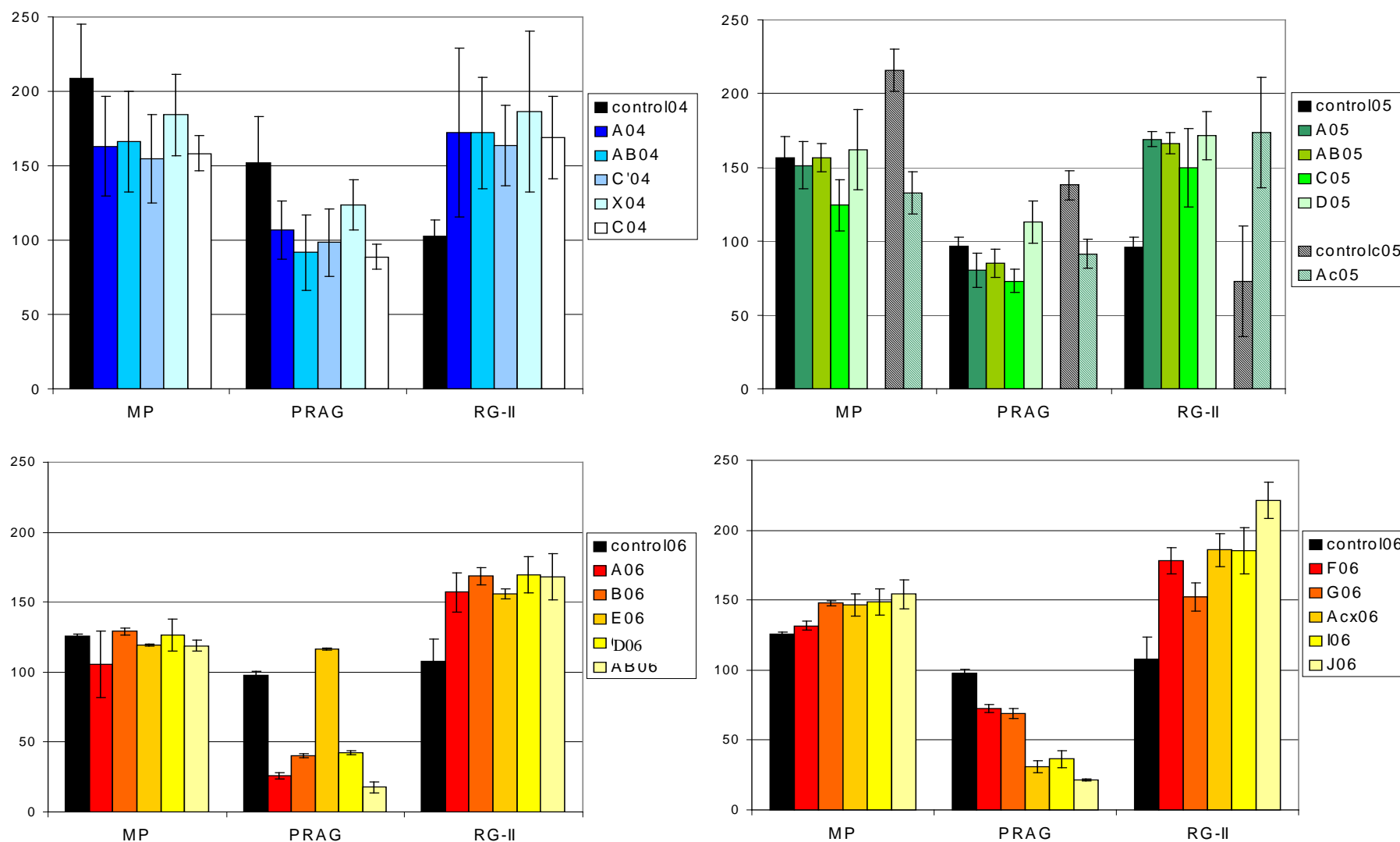


Figure 44. Concentrations (mg/L) des vins 2004 (A), 2005 (B), 2006 (C1, enzymes commerciales, C2, enzymes non commerciales) en mannoprotéines (MP), en polysaccharides riches en arabinose et galactose (PRAG) et en rhamnogalacturonane II (RG-II).

Tableau 17. Rapport arabinose/galactose (ara/gal) des polysaccharides des vins 2004, 2005, 2006.

essais 2004	ara/gal	±
control04	0,49	0,02
A04	0,55	0,00
AB04	0,61	0,03
C'04	0,64	0,05
X04	0,65	0,04
C04	0,60	0,02
essais 2005		
control05	0,44	0,10
A05	0,60	0,01
AB05	0,60	0,02
C05	0,60	0,05
D05	0,57	0,01
controlc05	0,59	0,03
Ac05	0,71	0,09
essais 2006		
control06	0,48	0,01
A06	0,59	0,05
B06	0,45	0,02
E06	1,11	0,04
D05	0,48	0,01
AB06	0,71	0,08
F06	0,52	0,01
G06	0,48	0,00
Acx06	0,57	0,01
I06	0,56	0,04
J06	0,77	0,05

En conclusion, l'ajout d'enzyme lors de la vinification modifie le contenu polysaccharidique des vins, ce qui peut présenter un intérêt pour le produit final. En effet, les polysaccharides interviennent dans l'équilibre des vins, et une modification de cet équilibre peut avoir des conséquences sur les propriétés et la perception organoleptique des vins traités par les enzymes.

C. EFFET DES ENZYMES SUR LES OLIGOSACCHARIDES

La préparation et la caractérisation des oligosaccharides des vins témoins décrites dans ce chapitre fait l'objet d'une publication soumise à Carbohydrate Polymers et donnée en annexe 1.

1. Effet des enzymes sur le profil des masses des oligosaccharides

La fraction des oligosaccharides a été collectée dans les vins 2004 (témoin et enzymes A et AB) ainsi que sur tous les essais 2006, millésimes où l'effet des enzymes sur les polysaccharides a été le plus marqué. La purification des oligosaccharides s'effectue sur une

colonne préparative d'exclusion stérique Superdex 30 permettant d'exclure au V0 les polysaccharides et d'obtenir une séparation des oligosaccharides. Le profil de distribution des masses des molécules glucidiques présentes dans les vins (Figure 45) comporte trois zones dans ces nouvelles conditions chromatographiques :

- élution entre 40 et 50 min : pic exclu des MP et des PRAG
- élution entre 50 et 60 min : RG-II
- élution entre 60 et 93 min : fraction d'oligosaccharides collectée pour l'analyse.

L'analyse des profils confirme les effets des enzymes constatés précédemment pour les millésimes 2004 et 2006 sur les PRAG et le RG-II : diminution des PRAG et augmentation du RG-II. L'allure du profil de la fraction d'oligosaccharides du vin témoin est également différente de celles des vins enzymés A et AB pour les deux millésimes.

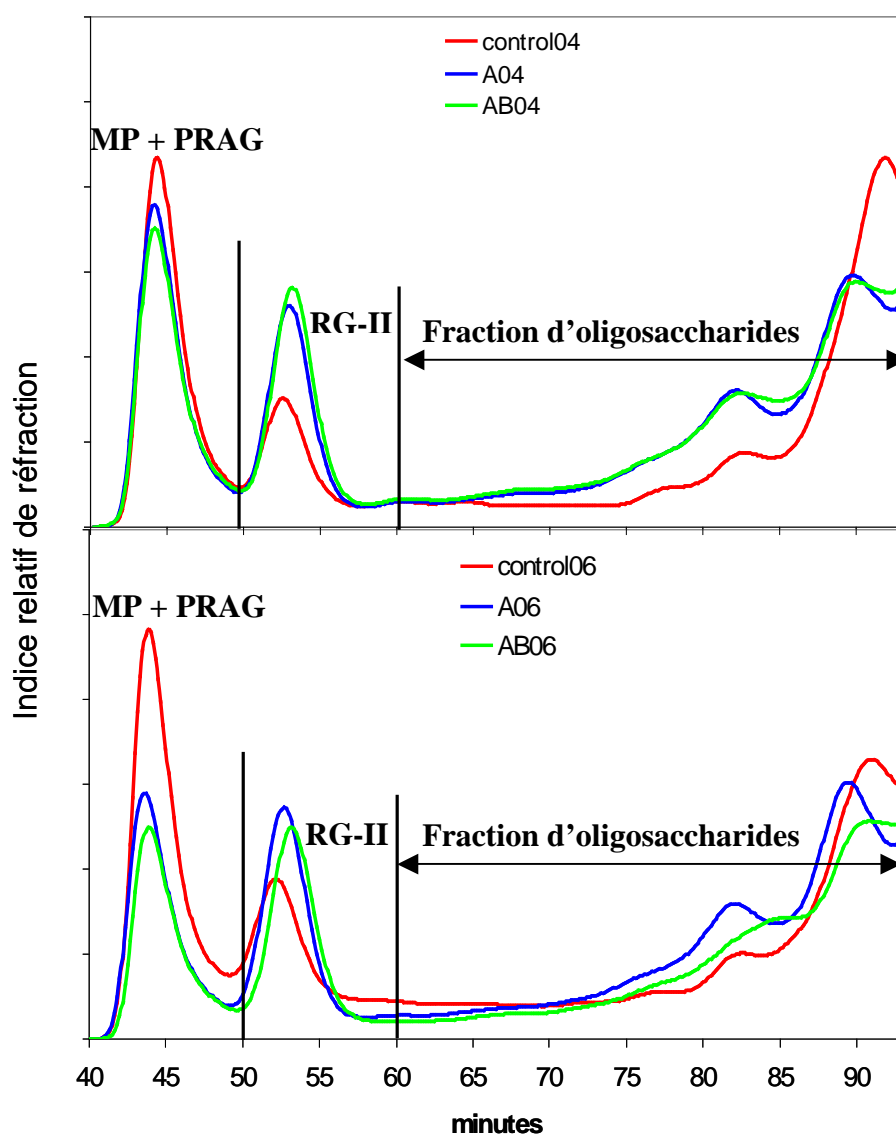


Figure 45. Profils de distribution des masses des polysaccharides et des oligosaccharides des vins 2004 et 2006 (témoin, enzymes A et AB).

2. Effet des enzymes sur la composition en monosaccharides des oligosaccharides

Les oses constitutifs des oligosaccharides des vins 2006 ont été quantifiés par analyse GC-MS des dérivés triméthylsilylés (TMS) formés après méthanolyse. La composition en oses de la fraction d'oligosaccharides est donnée dans le Tableau 18 en mg/L de vin pour chaque essai 2006. Cette fraction oligosaccharidique est non négligeable dans les vins puisque la teneur moyenne dans les vins analysés est de 213 mg/L. La concentration en oligosaccharides est équivalente à celle des autres familles de sucres déjà identifiés dans les vins rouges : 150 mg/l pour les MP, 150 à 450 mg/l pour les PRAG et 250 mg/l pour le RG II en moyenne dans les vins (Flanzy, 1998). Les oligosaccharides sont constitués des oses classiquement retrouvés dans la composition des polysaccharides isolés à partir des vins : le rhamnose, l'arabinose, le galactose, le xylose et les acides galacturoniques et glucuroniques qui proviennent de la dégradation des parois des cellules de la baie et le mannose et le glucose issus des parois des levures. Leur identification confirme la présence de résidus de structures d'arabinogalactanes, de rhamnogalacturonanes et de mannanes dans les oligosaccharides. L'identification de xylose et de l'acide 4-O-Me-glucuronique indique la présence de traces d'hémicelluloses de type xylanes qui ont pu être solubilisées par la dégradation de la paroi de la baie. L'absence des sucres caractéristiques du RGII dans la composition des oligosaccharides confirme l'exceptionnelle résistance de cette structure à la dégradation enzymatique.

Tableau 18. Concentration en mg/L des oses constitutifs des oligosaccharides des vins 2006.

	control06	A06	B06	E06	D06	AB06	F06	G06	Acx06	I06	J06
Rha^a	22	22	44	42	26	11	37	33	37	34	31
Fuc	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
Ara	47	11	22	67	13	6	33	24	19	24	13
Gal	19	28	31	23	20	23	21	23	22	21	18
Glc	33	36	37	33	29	29	19	27	27	21	24
Man	24	23	27	22	19	20	22	21	22	23	18
Xyl	21	13	18	20	14	9	14	16	17	13	15
Gal A	62	62	56	54	46	45	52	53	49	56	40
Glc A	4	7	6	8	5	5	4	5	6	6	4
4-O-MeGlc A	9	7	7	9	7	7	8	6	7	8	7
Xylitol	3	2	3	2	2	2	1	1	2	1	1
Total mg/L	245	212	253	279	181	157	214	210	210	209	173

^a Rha, Rhamnose ; Fuc, Fucose ; Ara, Arabinose ; Gal, Galactose ; Glc, Glucose ; Man, Mannose ; Xyl, Xylose ; Gal A, Acide Galacturonique ; Glc A, Glucuronic acid ; 4-O-MeGlc A, Acide 4 O methyl Glucuronique.

Excepté l'enzyme E, toutes les enzymes entraînent une chute de l'arabinose. Ce phénomène déjà observé sur les polysaccharides peut être expliqué par une dégradation des PRAG par les enzymes. A partir du tableau de composition en monosaccharides, il est possible d'établir un certain nombre de rapports : Ara/Gal, Rha/Gal A et (Ara+Gal)/Gal A. L'analyse de ces rapports (Tableau 19) va nous permettre de discuter de l'impact des enzymes sur les différentes structures libérées :

- le rapport Ara/Gal, comme pour les polysaccharides, est caractéristique des oligosaccharides riches en arabinose et en galactose et permet d'identifier les modifications résultant de l'action des enzymes sur les AGP et les arabinanes au cours du procédé de vinification.
- le rapport Rha/Gal A permet d'estimer la richesse relative des oligosaccharides de vin en structures de type rhamnogalacturonane (répétition du disaccharide [\rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow)] provenant des zones hérissées (ZH) par rapport aux structures homogalacturonanes des zones lisses (ZL) des pectines.
- le rapport (Ara+Gal)/Gal A permet d'estimer l'importance relative des chaînes latérales (CL) substituant les zones rhamnogalacturonanes libérées dans le milieu par les enzymes pectolytiques.

Tableau 19. Rapports déduits à partir de l'analyse de composition en oses des oligosaccharides.

	control06	A06	B06	E06	D06	AB06	F06	G06	Acx06	I06	J06
Ara/Gal (PRAG)	2,42	0,41	0,73	2,87	0,67	0,27	1,54	1,06	0,87	1,15	0,73
Rha/Gal A (ZH/ZL)	0,35	0,35	0,78	0,78	0,55	0,23	0,71	0,62	0,75	0,61	0,79
(Ara+Gal)/Gal A (CL)	1,06	0,63	0,94	1,67	0,72	0,63	1,04	0,90	0,85	0,79	0,77

On constate une diminution du rapport Ara/Gal dans tous les oligosaccharides des vins enzymés excepté pour la préparation E. La diminution du rapport est liée majoritairement à la perte d'arabinose (Tableau 18), elle est d'environ 80% dans les vins traités avec les préparations commerciales, alors que dans les vins qui ont été traités avec des préparations « non purifiées », la diminution du rapport Ara sur Gal est seulement de 50 %. Dans les oligosaccharides isolés du vin traité par la préparation enzymatique E, on constate une augmentation du rapport Ara/Gal et du rapport (Ara+Gal)/Gal A lié à une quantité plus importante d'arabinose provenant des chaînes latérales des polysaccharides de type RG-I. L'augmentation du rapport Rha/Gal A, excepté pour les préparations A et AB, indique une plus grande libération d'oligosaccharides de type rhamnogalacturane provenant des zones hérissées par les enzymes utilisées. L'utilisation de préparations enzymatiques avec des

spectres d'activités légèrement différents (par exemple PG + ou – purifiés) conduit à l'obtention d'oligosaccharides de natures différentes. Ces oligosaccharides de structures différentes pourraient avoir un rôle et des propriétés différentes dans les vins.

3. Effet des enzymes sur la structure des oligosaccharides

L'analyse des liaisons glycosidiques par perméthylation (cf. p 77), nous a permis de déterminer la structure des oligosaccharides qui sont libérés pendant la vinification des vins témoins ou enzymés (Tableau 20). Le mannose est lié en position $\rightarrow 2$, en $\rightarrow 3$, en $\rightarrow 3,6$ et en position terminale non-réductrice. Ces liaisons correspondent à celles typiquement trouvées dans les mannoprotéines de levure constituées de petites chaînes de un à quatre résidus de mannose liés en $-(1 \rightarrow 2)$ ou $(1 \rightarrow 3)$ (Saulnier *et al.* 1991; Waters *et al.*, 1994). Les oligosaccharides (tableau 6) contiennent de l'arabinose lié en -5 et $-3,5$ caractéristique des arabinanes des chaînes latérales des rhamnogalacturonanes (RG) des pectines. La présence des RG est confirmée par l'identification de 2 et de 2,4-Rha dans le tableau de méthylation (Vidal *et al.*, 2003b). L'arabinose en position terminale non réductrice, qui substitue les chaînes de β -(1 \rightarrow 6)-galactanes des AGPs, a été également identifié. Les oligosaccharides contiennent également tous les éthers méthyliques correspondant au galactose lié en $\rightarrow 3$; $\rightarrow 6$; $\rightarrow 3,6$; $\rightarrow 4,6$ et $\rightarrow 3,4,6$, des chaînes de galactose en β -(1 \rightarrow 3) et en β -(1 \rightarrow 6) des AGPs (Pellerin *et al.*, 1995; Vidal *et al.*, 2001). La présence de 2,3-di-*O*-méthyl- et 3,4-di-*O*-méthyl-xylopyranose dans l'analyse de méthylation des oligosaccharides des vins montre que les oligosaccharides contiennent des structures de type xylane, provenant de chaînes de xyloses liés en $(1 \rightarrow 4)$ et $(1 \rightarrow 2)$.

Pour les oligosaccharides des vins control06 et E06, l'ose majoritaire est l'arabinose (29,5% et 37,1% respectivement) alors que pour les autres oligosaccharides isolés à partir des vins enzymés A06, AB06, B06, Acx06, F06, G06, I06, et J06, le rhamnose est dominant. Ceci indique une plus grande libération des zones rhamnogalacturonanes et une dégradation de l'arabinose des PRAG par les enzymes utilisées pendant la vinification. Plus précisément, l'analyse des éthers méthyliques montre que ce sont les arabinoses liés en $1 \rightarrow 5$ et en $1 \rightarrow 3,5$ qui diminuent le plus dans les essais enzymés. La présence de xylose lié en $1 \rightarrow 4$ et l'identification de l'acide 4-*O*-Me-glucuronique confirment que les oligosaccharides des vins contiennent des structures de type 4-*O*-Me-glucuronoxylanes (Ebringerova & Heinze, 2000).

Tableau 20. Analyse structurale par perméthylation des oligosaccharides des vins 2006 (% molaire relatif).

Méthyl éther	liaisons	control06	A06	B06	E06	D06	AB06	F06	G06	Acx06	I06	J06
234 Rhamnose	T ^a -Rhap	3,2	6,2	9,6	5,1	5,8	6,9	7,4	4,9	9,7	8,2	6
34 Rhamnose ^b	1→2	14,5	23,3	20,4	14,7	23,3	21,6	17,5	19,5	17,7	20,9	24
3 Rhamnose	1→2,4	2,5	3,7	2,0	2,3	3	1,9	2,4	3,3	1,8	2,4	3,2
Total Rhamnose		20,2	33,2	32,0	22,1	32,1	30,4	27,3	27,7	29,2	31,5	33,2
2,3,4 Fucose	T-Fuc	0,6	0,9	0,8	0,4	0,8	1,3	0,9	1,1	1,7	0,8	0,8
235 Arabinose	T-Araf	6,3	4,9	8,2	8,7	4	5,5	11,2	6,4	9,6	11,0	4,1
234 Arabinose	T-Arap	2,2	2,4	2,7	2,3	2,7	4,3	3,3	2,7	3,9	3,0	2,7
25 Arabinose	1→3	0,7	2	2,2	0,9	1,8	2,4	2,3	1,9	2,2	1,7	1
35 Arabinose	1→2	0,5	0,4	0,9	0,5	0,5	0,5	1,0	0,6	1,0	1,2	0,5
23 Arabinose	1→5	17,4	1,5	1,4	23,6	1,4	1,5	2,0	1,8	1,3	1,6	0,6
2 Arabinose	1→3,5	2,4	0,5	0,8	1,1	0	0	1,9	1,2	0,8	0,7	0
Total Arabinose		29,5	11,7	16,1	37,1	10,4	14,2	21,7	14,6	18,8	19,2	8,9
23 et 34 xylose	1→2 et 1→4	10,8	8,2	7,1	8,9	9,4	11,8	8,2	8,2	10,8	8,5	10,2
2346 Galactose	T-Galp	0,7	1,8	3,4	0,6	1,1	1,8	2,8	1,2	4,0	2,8	1
234 Galactose	1→6	1,1	2,1	2,5	1,1	2,1	2,2	1,9	2,1	2,5	2,1	2,1
246 Galactose	1→3	3,1	2,8	2,0	3,3	4,5	2,5	3,1	5	2,3	5,1	5,2
236 Galactose	1→4	2,3	5,3	5,3	2,9	4,5	4,6	4,7	4,9	5,8	4,2	4,8
24 Galactose	1→3,6	1,3	1,7	1,1	0,5	1,1	0	0,8	1,2	3,2	0,6	1,4
2 Galactose	1→3,4,6	1,3	0,8	1,6	1	0,9	0,4	1,4	1,5	1,0	1,2	0,9
Total Galactose		9,8	14,5	15,9	9,4	14,2	11,5	14,7	15,9	18,8	16,0	15,4
2346 Glucose	T-Glcp	1,5	1,9	1,8	1,2	2	2,4	1,8	1,7	1,9	1,7	1,5
234 Glucose	1→6	5	5,1	3,8	2	5,3	2,9	3,9	3,1	2,5	3,2	4,5
236 Glucose	1→4	2,4	2,8	2,4	2,2	2,9	3,1	2,5	2,9	2,2	2,6	2,6
24 Glucose	1→3,6	1,7	2,4	2,3	1,4	1,8	3,1	1,0	2,5	1,5	2,8	3,6
26 Glucose	1→3,4	1,5	2,1	0,0	3,5	1,6	0,8	0,0	4,2	0,0	0,0	2,2
23 Glucose	1→4,6	0	1,0	0,9	0,9	1,3	0,6	1,4	1,6	1,5	0,8	1
Total Glucose		12,1	15,1	11,2	11,2	14,9	12,9	10,5	16	9,5	11,1	15,4
2346 Mannose	T-Manp	5,7	5,5	6,2	4	6,6	7,8	4,4	6	5,2	5,1	6
346 Mannose	1→2	6,8	5,3	4,3	3,7	6,7	6	3,7	5,8	2,8	3,6	5,8
246 Mannose	1→3	2,4	2,7	2,4	2,2	2,9	3,1	4,1	2,9	2,2	2,6	2,6
24 Mannose	1→3,6	2,1	1,7	1,6	1,2	2,3	1,6	1,0	2	0,9	0,9	2,6
Total Mannose		17	15,2	14,6	11,1	18,5	18,5	13,2	16,7	11,2	12,2	17
Rapport Term/Branchés^c		1,44	1,49	2,34	1,77	1,81	3,76	2,00	1,28	3,12	2,2	1,43

^a T : terminal ; ^b 34 Rhamnose : 1,2,5-tri-acétyle-3,4-di-O-méthyl-rhamnitol, etc... ; rapport term/branchés : rapport des oses terminaux sur les oses branchés.

La proportion des différentes familles de polysaccharides pariétaux d'où proviennent les oligosaccharides (Tableau 21) a pu être déterminée par l'attribution des liaisons osidiques. Ces calculs sont basés sur la contribution des différents résidus caractéristiques des familles de polysaccharides définies. Ces estimations sont issues d'un certain nombre d'hypothèses structurales et sont employées comme indicateurs des profils des contenus de chaque famille de polysaccharides (Gorshkova *et al.*, 1996; Nunan *et al.*, 1998; Nunan *et al.*, 1997; Vicens *et al.*, 2009). Le contenu en xyloglucanes est estimé à partir de l'addition du glucose lié en 1,4,6, et en 1,4 (équivalent à un tiers de 4,6-glucose) et du fucose terminal. Les AG II ont été obtenus par addition du galactose lié en 1,3 et en 1,3,6 et d'une proportion d'arabinose équivalente à celle du galactose lié en 1,3,6. Les proportions d'AG I ont été déduites de l'addition de galactose lié en 1,4 et du galactose terminal. Le contenu en arabinanes a été estimé à partir de l'arabinose lié en 1,5 et 1,3,5. Les mannanes issus principalement de levures ont été calculés à partir du mannose lié en 1→6, 1→2, et 1→3,6, les xylanes à partir du xylose lié en 1→2 et 1→4. La cellulose est estimée à partir du glucose lié en 1→4, les glucanes à partir du glucose lié en 1→3,6 et 1→6. Les zones rhamnogalacturoniques (zones RG) sont calculées à partir du rhamnose lié en 1→2 et 1→2,4.

Tableau 21. Estimation des familles de polysaccharides présents dans la fraction d'oligosaccharides des vins 2006 en % molaire relatif.

	control06	A06	B06	E06	D06	AB06	F06	G06	Acx06	I06	J06
xyloglucane	3,0	4,0	3,5	2,9	4,1	4,6	3,9	4,5	4,4	3,6	3,7
AG type II	5,7	6,2	4,1	4,3	6,7	2,5	4,8	7,4	8,7	6,4	8,0
AG type I	3,0	7,1	8,7	3,5	5,6	6,4	7,5	6,1	9,8	7,1	5,8
arabinanes	19,8	2,0	2,1	24,7	1,4	1,5	3,9	3,0	2,1	2,2	0,6
mannanes	11,3	9,7	8,3	7,1	11,9	10,7	8,8	10,7	6,0	7,1	11,0
xylanes	0,6	0,9	0,8	0,4	0,8	1,3	0,9	1,1	1,7	0,8	0,8
cellulose	1,6	1,0	0,7	1,2	1,4	1,6	0,9	1,3	0,3	1,2	1,0
glucane	6,7	7,4	6,1	3,4	7,1	6,0	4,8	5,6	3,9	6,1	8,1
zones RG	17,0	27,0	22,4	17,0	26,3	23,5	19,9	22,8	19,5	23,3	27,2
Total	68,7	65,2	56,7	64,5	65,3	58,1	55,4	62,5	56,4	57,8	66,2

Les oligosaccharides des vins enzymés sont constitués par des fragments d'AG de type I, et surtout de fragments de rhamnogalacturonanes de type I. Par contre les activités enzymatiques présentes conduisent à une perte de 90 % des arabinanes dans les oligosaccharides des vins enzymés par rapport au vin témoin. La modalité qui a été traitée avec la préparation enzymatique E (base USP concentrée FCE) présente un profil oligosaccharidique complètement différent avec plus d'arabinanes (+25%) par rapport à la modalité témoin, et la même proportion des autres types de structures.

4. Analyse de la fraction des oligosaccharides par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est un outil puissant utilisé pour identifier et déterminer la structure des polysaccharides et des oligosaccharides et notamment ceux provenant des pectines (Ralet *et al.* 2008). L'utilisation de la spectrométrie de masse nous a permis d'identifier les différentes structures d'oligosaccharides présentes dans les fractions isolées à partir des vins. Nous avons suivi l'effet de différentes préparations enzymatiques sur la répartition en masse et donc sur le degré de polymérisation et les structures des oligosaccharides pectiques présent dans les vins. La comparaison directe entre les spectres ESI-MS permet notamment de déterminer l'effet d'un traitement par une préparation enzymatique commerciale sur le profil oligosaccharidique d'un vin.

a. Identification des ions

Les spectres ESI-TOF-MS obtenus à partir des vins traités (A06, AB06, B06, Acx06, E06, F06, G06, I06, et J06) montrent les structures oligosaccharidiques résultant de l'action des enzymes commerciales. Ils sont présentés en annexe 2.

Les ions prédominants $[M-H]^-$ présents dans les vins 2006 sont détectés à m/z : 545, 559, 605, 661, 737, 749, 807, 837 et 983. Les structures de ces ions ont pu être déterminées par fragmentation à l'aide d'un spectromètre de masse ESI-IT.

Les schémas de fragmentation pour des oligosaccharides pectiques ont été décrits précédemment (Ralet *et al.*, 2008) suivant la nomenclature établie par (Domon *et al.* 1988). Pour illustrer la détermination des structures présentes dans la fraction d'oligosaccharides, les fragmentations de trois ions ont été prises pour exemple :

l'ion m/z 559 (

- Figure 46) est un acide trigalacturonique méthylé sur le second acide. La fragmentation MS^2 montre un ion fragment à m/z 383 correspondant à la perte d'un acide galacturonique (GalA, -176). La perte d'un fragment à 190 à partir de l'ion 383 correspond à la perte d'un acide galacturonique méthylé. Ceci est confirmé par le fragment 351 qui est dû à la perte d'un groupement méthoxy par l'ion 383 (OMe, -32, (Ralet *et al.*, 2008). Cette structure est typique des zones homogalacturoniques. Dans le spectre, on trouve également les ions $[M-H]^-$ à m/z 545 et 573 qui

correspondent respectivement à un acide trigalacturonique non méthylé ou méthylé deux fois.

- l'ion m/z 837 (Figure 48) correspond au pentasaccharide [GalA-Rha]₂-GalA. Les fragmentations jusqu'à MS⁵ montrent successivement la perte d'acide galacturonique et de rhamnose (-176 et -146, respectivement), l'extrémité réductrice étant pour cet ion un acide galacturonique. Cette structure est typique des zones RG constituées par la répétition du disaccharide [\rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow)].
- l'ion 605 (Figure 49) possède une structure particulière. La présence des fragments à m/z 573 et 415 correspond à une perte d'un groupe méthoxyle (-32) et d'un acide uronique méthylé (-190). La perte de deux pentoses (-132) donne deux fragments à m/z 283 et 151. L'ion 151 correspond à un pentitol. La corrélation de la fragmentation de l'ion 605 avec l'analyse de composition et de structure a permis de proposer une hypothèse de structure pour cet ion. Il serait ainsi constitué par de l'acide 4-OMe-glucuronique (4-OMe-GlcA), deux résidus de xylose (Xyl) lié en 1 \rightarrow 4, et un résidu xylitol. La fragmentation du xylitol (MS²) commercial et la fragmentation MS⁴ de l'ion 605 correspondent (Figure 50), ce qui corroborerait la présence de ce pentitol. Ce type de structure a été précédemment décrit par (Reis, Coimbra, Domingues, Ferrer-Correia & Domingues, 2004) dans les olives et elle est caractéristique des xylanes, plus précisément des 4-OMe-glucuronoxylanes.

La structure proposée pour cet oligosaccharide est basée sur le schéma de fragmentation en masse et nécessitera une confirmation par RMN. Néanmoins, le faisceau de données analytiques obtenues (analyse de composition, des liaisons, spectrométrie de masse,...) donne à penser que cet oligosaccharide est bien présent dans tous les vins analysés pour cette étude ou sur d'autres vins provenant de diverses origines.

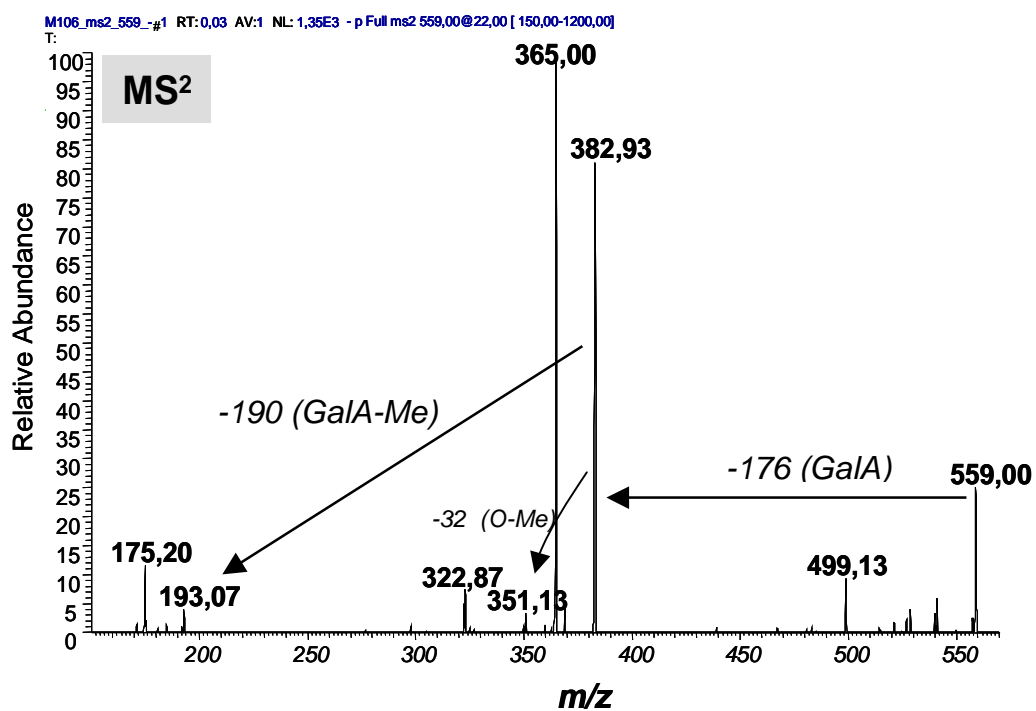
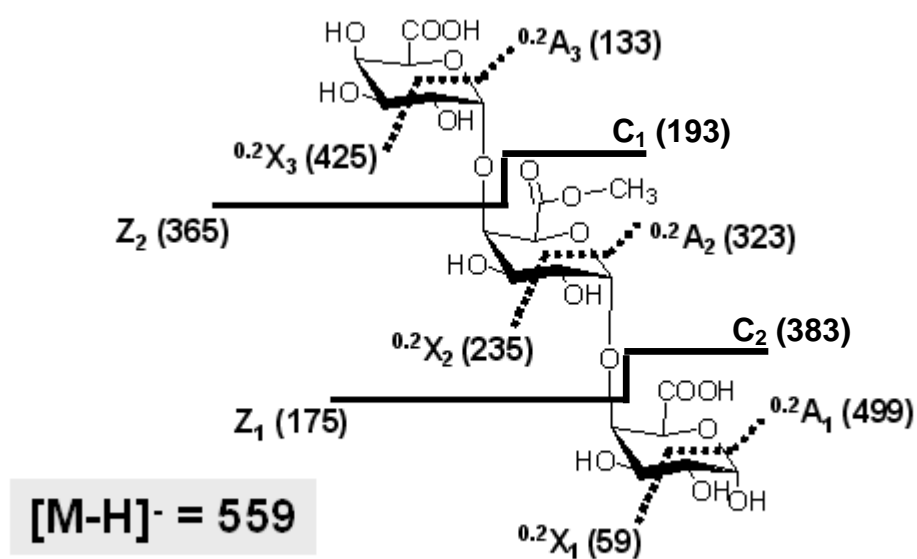


Figure 46. Structure et fragmentation (MS²) de l'ion 559 par ESI-IT en mode négatif.

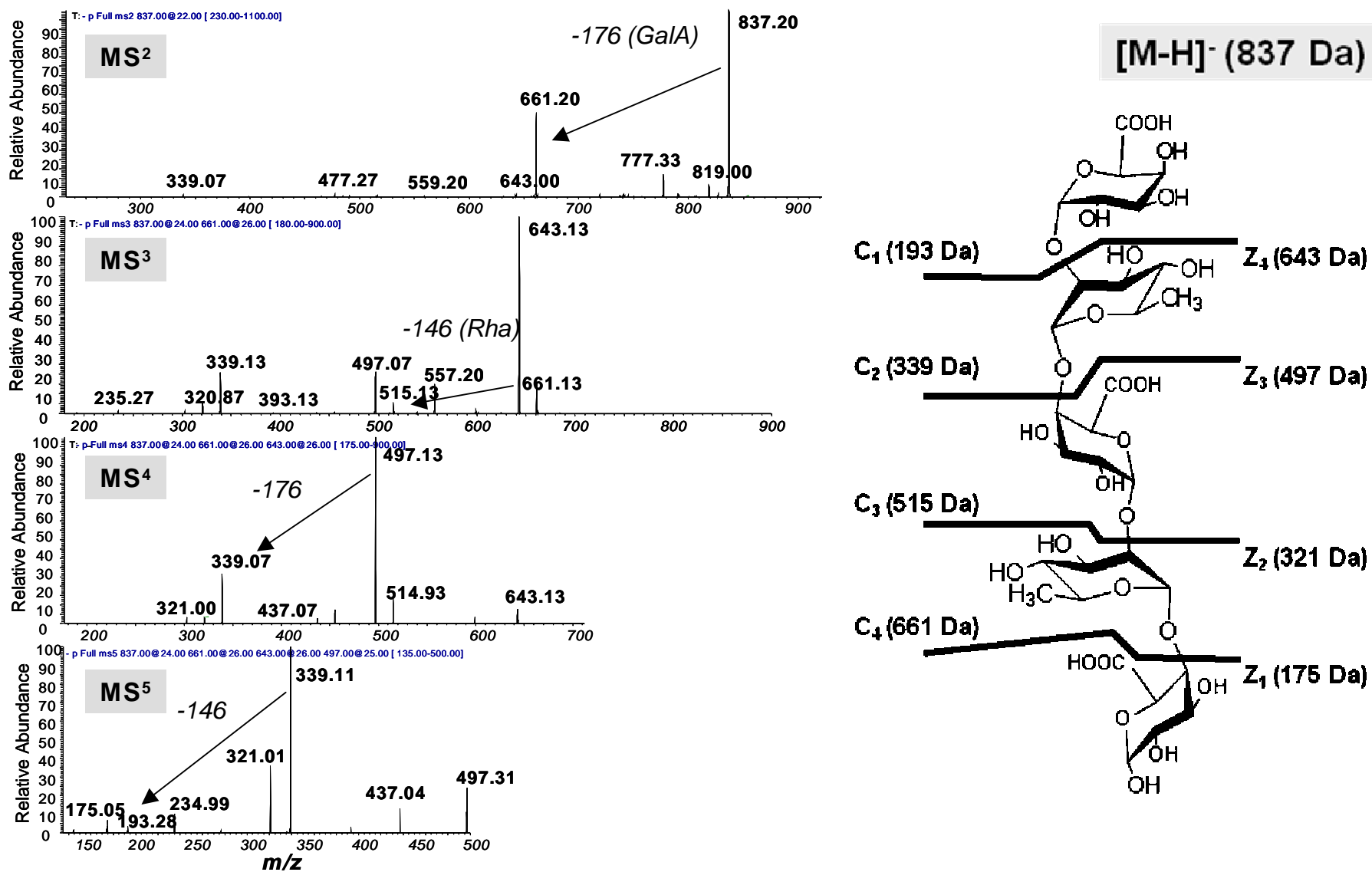


Figure 48. Structure et fragmentation (MS⁵) de l'ion 837 par ESI-IT en mode négatif.

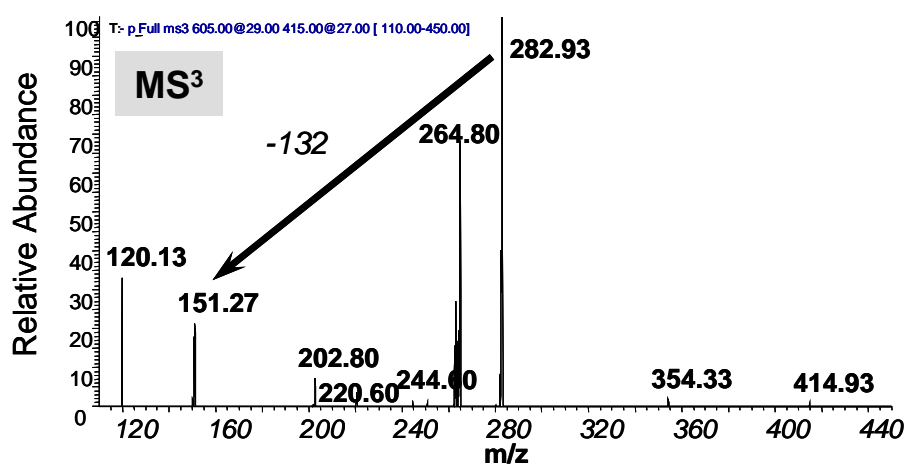
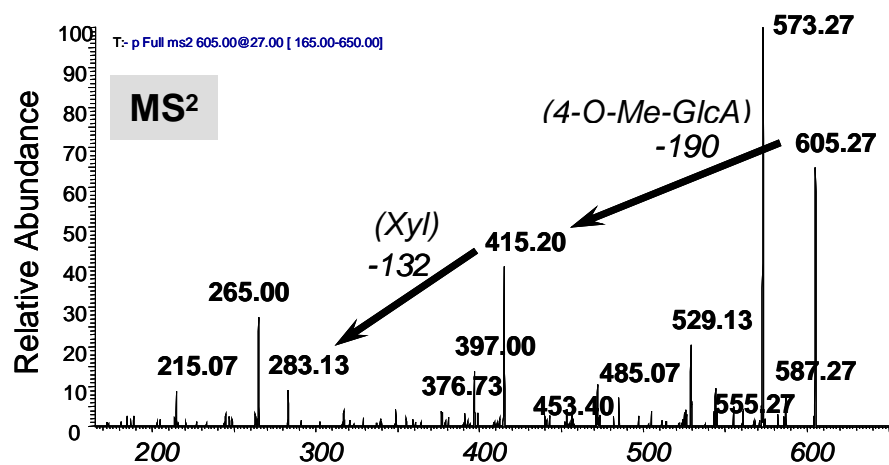
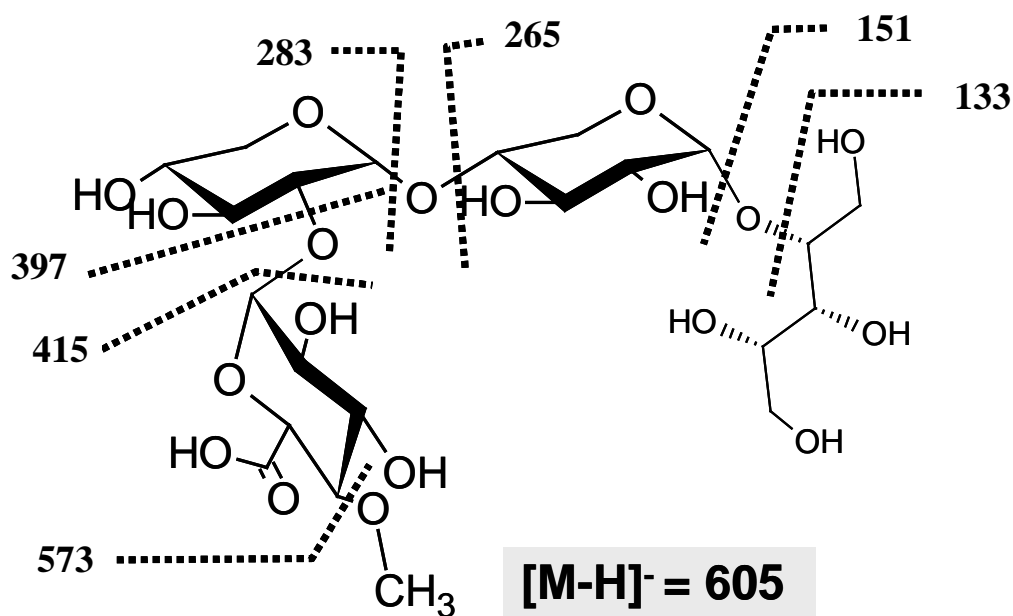


Figure 49. Structure et fragmentation (MS³) de l'ion 605 par ESI-IT en mode négatif.

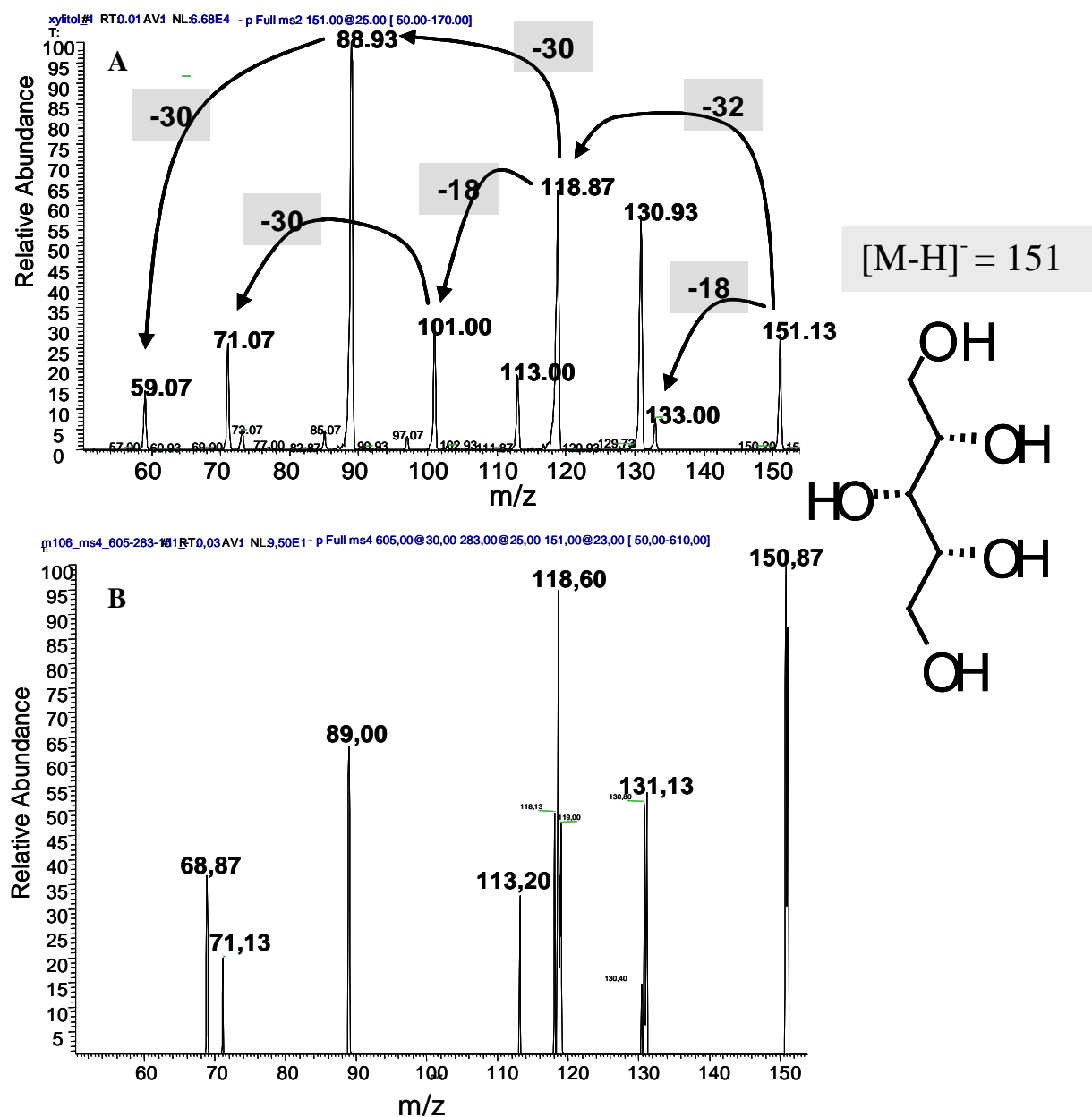


Figure 50. Fragmentation MS² du xylitol commercial (A) et MS⁴ de l'ion 605 (B).

Les ions pseudomoléculaires et les structures correspondantes identifiées dans les oligosaccharides des vins sont récapitulés dans le Tableau 22.

Tableau 22. Récapitulatif des principales structures présentes dans les oligosaccharides des vins.

M	[M-H]⁻	Structures
516	515	[GalA-Rha]-GalA ^a
546	545	[GalA] ₃
560	559	[GalA] ₃ Me ₁
574	573	[GalA] ₃ Me ₂
606	605	[4-OMe-GlcA-[Xyl] ₂ -Xylitol]
661	661	[Rha-GalA] ₂
738	737	[4-OMe-GlcA-[Xyl] ₃ -Xylitol]
750	749	[GalA] ₄ Me ₂
808	807	[Rha-GalA] ₂ -Rha
838	837	[GalA-Rha] ₂ -GalA
984	983	[Rha-GalA] ₃

^a: GalA, acide galacturonique ; Rha, rhamnose ; Me, méthyle ; 4-Ome-GlcA, acide 4-O-CH₃-glucuronique ; Xyl, xylose.

Le bilan de l'identification des oligosaccharides par MS montre qu'ils sont majoritairement acides alors que l'analyse de composition et de méthylation indique que les oligosaccharides contiennent aussi des structures neutres qui ne sont pas détectées par la MS. Il est donc nécessaire de dériver ces oligosaccharides neutres par une molécule permettant d'obtenir une réponse et ainsi de les détecter par ESI-MS. La dérivation des oligosaccharides par le 2-amino-benzamide devrait permettre d'obtenir un profil d'oligosaccharides contenant à la fois les acides et les neutres (Ishii *et al.* 2002 ; Konishi, *et al.* 2006).

b. Analyse en composante principale (ACP) des spectres de masse des oligosaccharides des vins

Les spectres de masse des fractions d'oligosaccharides isolées à partir des vins 2004 (control04, A04 et AB04) et des vins 2006 ont été acquis par ESI-TOF. L'ensemble des spectres a été traité par analyse en composantes principales pour explorer et mieux visualiser l'impact d'un traitement enzymatique sur les oligosaccharides libérés ou présents dans les

vins. Les deux premières composantes principales (CP1 et CP2) expliquent 80,1% de la variabilité de l'ensemble des spectres. L'axe 1 (CP1) sépare les vins témoins des vins enzymés et représente 63,5% de la variabilité. Cet axe (Figure 51B) est défini positivement par des masses représentant les zones rhamnogalacturoniques (zones RG) et négativement par des masses représentant des structures des zones homogalacturoniques (zones HG). Les ions correspondant à des acides galacturoniques méthylés (m/z 545, 559, 749) sont plus abondants dans les vins témoins tandis que les ions correspondant à des fragments de rhamnogalacturonanes (m/z 661, 837, et 983) sont associés aux oligosaccharides des vins enzymés. Ceci confirme que les préparations enzymatiques entraînent une plus grande libération des zones hérissées et qu'elles dégradent les zones lisses. En outre, la nature des oligosaccharides associés à la discrimination le long de l'axe 1 indique que des activités pectine-méthylestérase et polygalacturonase présentes dans les préparations enzymatiques déméthylent et dégradent les oligosaccharides libérés à partir des zones lisses des parois des cellules de la baie au cours des étapes de vinification. L'axe 2 (CP2), représentant 16,6% de la variabilité, différencie les millésimes 2004 et 2006 (Figure 51A). L'axe 2 est défini négativement par les structures contenant le xylitol (Figure 51C, $[M-H]^-$ à m/z 605 et 737), plus abondantes dans les vins 2006. Ce type de structure correspondant à des glucuronoxylanes est libéré dans tous les vins enzymés ou non et ils ne semblent pas spécifiques d'un traitement enzymatique.

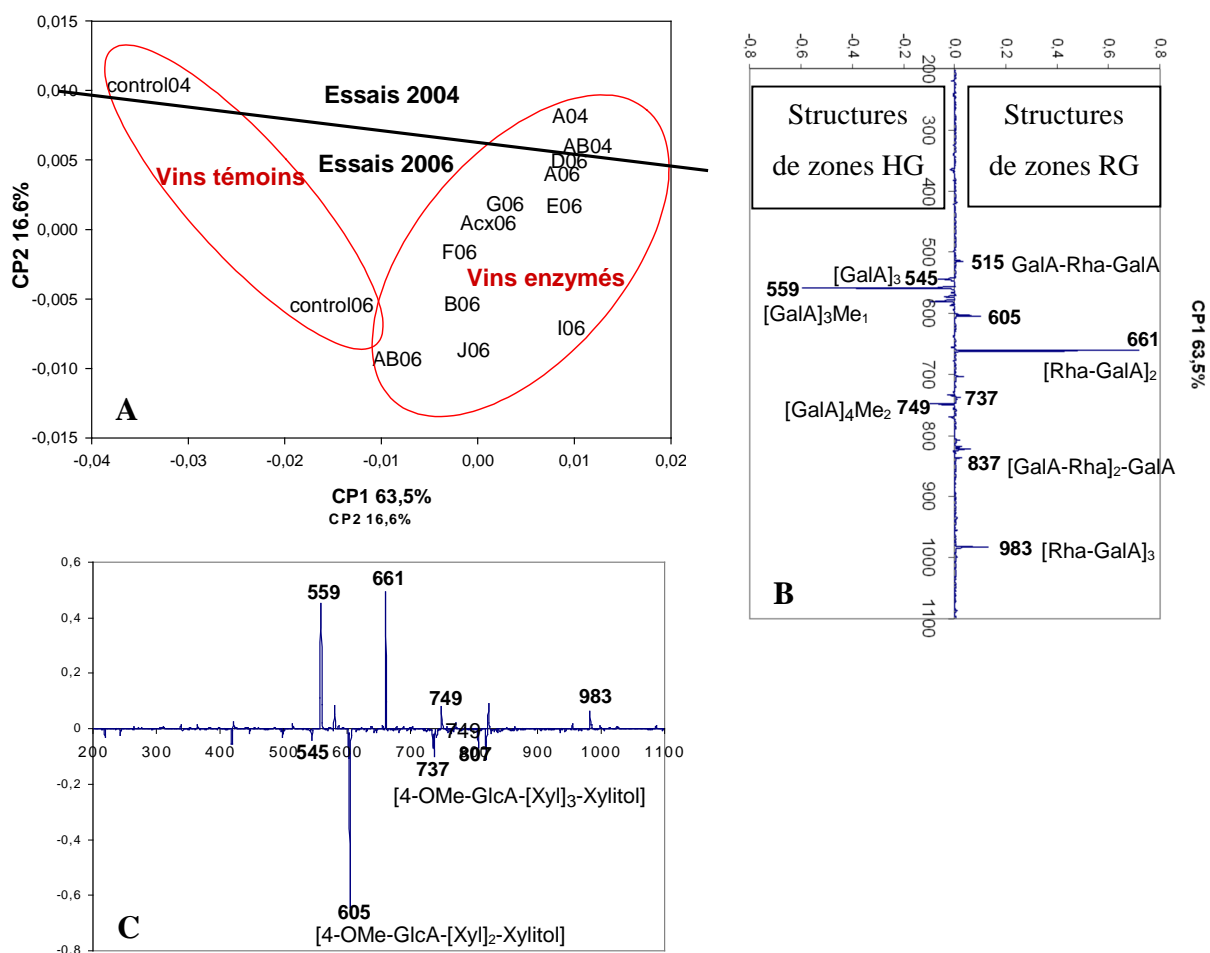


Figure 51. Analyse en composantes principales des spectres de masse des oligosaccharides des vins 2004 et 2006 (A) projection des vins sur le plan formé par les deux premières composantes principales ; contribution des variables à (B) la composante principale 1 (CP1 63,5%) et (C) la composante principale 2 (CP2 16,6%).

Les composantes principales 3 et 4 (CP3 et CP4) expliquent 15,8% de la variabilité de l'ensemble des spectres. Elles séparent les essais 2004 et 2006 ayant subi le double traitement enzymatique AB (Vinozym Vintage FCE et Vinoflow FCE) de l'ensemble des autres vins (Figure 52)

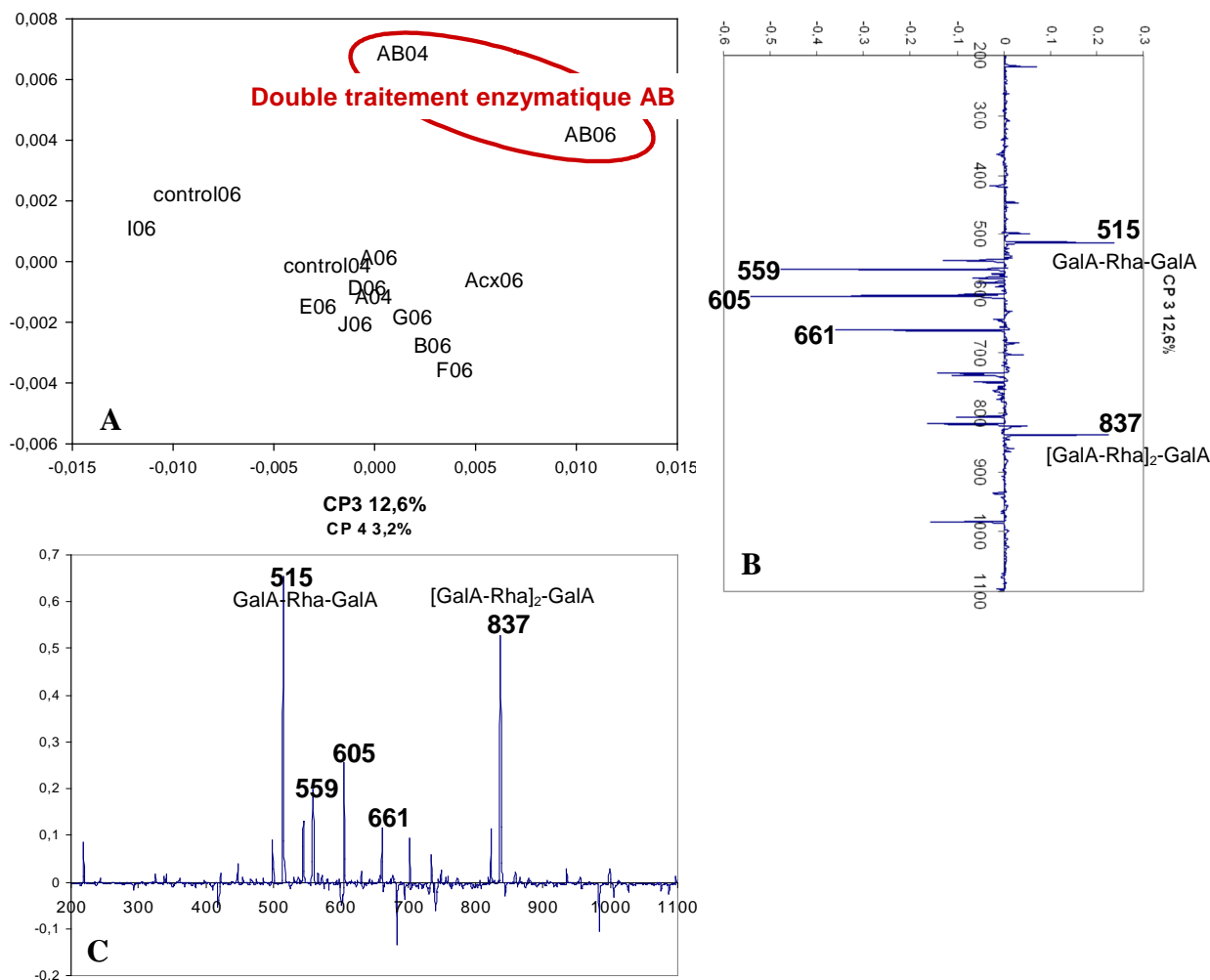


Figure 52. Analyse en composantes principales des spectres de masse des oligosaccharides des vins 2004 et 2006 (A) projection des vins sur le plan formé par les composantes principales 3 et 4 ; contribution des variables à (B) la composante principale 3 (CP3 12,6%) et (C) la composante principale 4 (CP4 3,2%).

Les composantes principales 3 et 4 (Figure 52.B et C) sont définies en positif par des masses représentant des structures de zones hérissées et ayant un acide galacturonique en unité terminale ([M-H]⁻ m/z 515, [GalA-Rha]-GalA et m/z 837, [GalA-Rha]₂-GalA). Ce résultat indique une spécificité des activités enzymatiques des préparations A et B utilisées ensemble. Les oligosaccharides des vins enzymés par F, G, I et J contiennent également des structures de zones RG mais possédant le rhamnose en unité terminale ([M-H]⁻ m/z 807, [Rha-GalA]₂-Rha), ce qui indique un mécanisme de clivage des zones hérissées différents des préparations enzymatiques A et B. Les oligosaccharides du vin E06 n'ont ni [GalA-Rha]-GalA, ni [GalA-Rha]₂-GalA, ni [Rha-GalA]₂-Rha ; ils ne contiennent que des structures de type [Rha-GalA]_{2n}. L'analyse en détail des différentes structures présentes dans les oligosaccharides des vins laisse supposer que les oligosaccharides sont des marqueurs des activités et des

mécanismes de dégradation des pectines. Ainsi on peut déduire que toutes les préparations enzymatiques testées possèdent une activité rhamnogalacturonase, mais avec un site de clivage du substrat différent. Les oligosaccharides obtenus ont des structures différentes après action de l'enzyme (Figure 53) présente dans la préparation testée. Ainsi les préparations A, AB et D possèdent vraisemblablement une rhamnogalacturonase qui hydrolyse entre un résidu d'acide galacturonique et de rhamnose et libère un oligosaccharide avec un acide galacturonique terminal alors que les préparations F, G, I et J ont le même site de reconnaissance mais libèrent un oligosaccharide avec un rhamnose terminal.

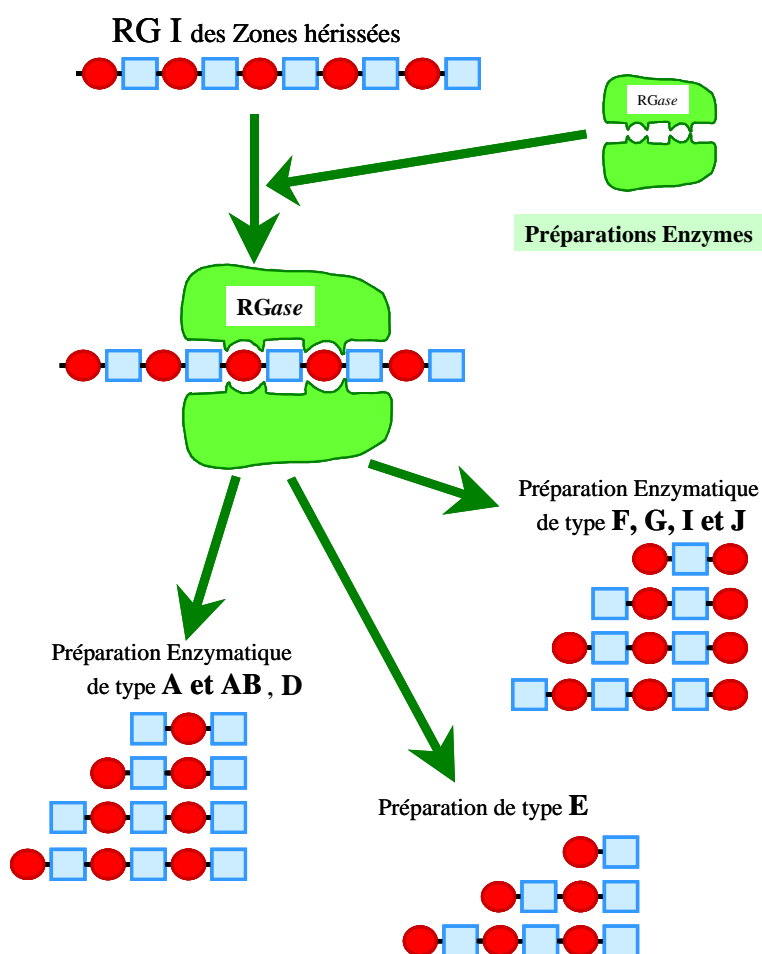


Figure 53. Libération des oligosaccharides pectiques (● □ [Rha-GalA]) dans les vins par des préparations enzymatiques contenant une activité RGase différente.

D. BILAN

Dans cette partie, les principaux effets des traitements enzymatiques sur les polysaccharides ont pu être identifiés. Les enzymes en augmentant la dégradation de la paroi des cellules de la baie induisent une importante libération de RG-II dans les vins. L'influence des préparations enzymatiques sur les PRAG semble être conditionnée par le millésime. En 2004 et 2006, une diminution des PRAG est observée alors qu'en 2005, ils sont peu modifiés.

Pour la première fois, la fraction des oligosaccharides des vins a pu être isolée et caractérisée par trois méthodes complémentaires : l'analyse des dérivés triméthylsilylés a permis de déduire la composition en oses de cette fraction, l'analyse par perméthylation a conduit à la détermination des types de liaison entre les oses et l'analyse par spectrométrie de masse à l'identification des principales structures des oligosaccharides présents dans les vins. L'identification d'oligosaccharides riches en xylose et plus particulièrement de glucuronoxylanes tels que [4-OMe-GlcA-[Xyl]₂-Xylitol] et [4-OMe-GlcA-[Xyl]₃-Xylitol] permet d'expliquer la présence de xylose dans les vins et de proposer une hypothèse de structure pour la première fois pour ce type d'oligosaccharide contenant des résidus de xylose. La présence de ce type d'oligosaccharide provenant des structures hémicellulosiques des parois montre que ces polysaccharides de type xylane sont modifiés et/ou hydrolysés soit pendant la maturation de la baie soit pendant la vinification. Les hémicelluloses ne sont pas identifiées dans les polysaccharides du vin et seuls des fragments de 4-Ome-oligo-glucuronoxylane sont présents. Concernant la présence de xylitol dans ces structures, aucun phénomène connu à ce jour ne peut l'expliquer.

L'analyse des oligosaccharides des essais 2004 et 2006 a mis en évidence qu'ils sont des marqueurs des activités enzymatiques dégradant la paroi. Les enzymes utilisées déméthylent et hydrolysent les zones lisses (zones HG) des pectines. Excepté la préparation E, elles entraînent la solubilisation et la libération de fragments de type AG I, dégradent les chaînes latérales des arabinanes et libèrent les zones hérissées (zones RG). L'identification par masse de structures de type RG, terminées par du rhamnose ou de l'acide galacturonique suivant les préparations, a démontré qu'elles sont caractéristiques des mécanismes impliqués dans la dégradation des pectines.

III. LA COULEUR DES VINS ROUGES ET LES POLYPHENOLS

A. EFFET DES ENZYMES SUR LA COULEUR DES VINS

Les principaux indices de couleur pour les essais 2004, 2005, 2006 âgés de 20 mois ont été calculés à partir des mesures d'absorbance (Glories, 1984; Somers *et al.*, 1977) (Tableau 23). L'intensité colorante (IC_{corr}) est la somme des absorbances à 420, 520 et 620 nm et l'indice des pigments rouges au pH du vin (PV_{corr}) correspond à la valeur de l'absorbance à 520 nm. Ces valeurs dites corrigées (corr) sont mesurées après addition d'acétaldéhyde qui combine le sulfite et libère les cations flavylum qui étaient présents sous forme d'adduits incolores avec le sulfite (Atanasova *et al.*, 2002). Des différences importantes sont observées entre les millésimes. L'indice des polyphénols totaux (IPT) et l'intensité colorante (IC_{corr}) sont plus élevés en 2005 (IPT~42 et IC~14) qu'en 2004 et 2006 (IPT~40 et IC~10). Les données d'absorbance montrent, comme les analyses œnologiques et les analyses de polysaccharides, des différences entre les millésimes.

L'IPT est plus élevé dans les vins enzymés que dans les témoins excepté pour certains échantillons où il est équivalent (C05, Ac05, A06, D06, E06, B06). Cette augmentation suggère que la dégradation des parois cellulaires de la baie par les préparations enzymatiques conduit à une extraction plus importante des composés phénoliques. Un gain en intensité colorante (IC_{corr}) et en pigments rouges au pH du vin (PV_{corr}) est également observé dans les vins enzymés des millésimes 2004 et 2006. Ce phénomène peut être imputé à une plus grande extraction des pigments du raisin ou/et à une plus importante conversion des anthocyanes en pigments dérivés dans les vins traités par les préparations enzymatiques. Cette dernière hypothèse est confirmée par l'augmentation des pigments résistants à la décoloration au bisulfite (PR_{SO₂}) dans les vins enzymés. Les anthocyanes natives du raisin sont en effet décolorées par le bisulfite alors que certains pigments dérivés issus des réactions entre les anthocyanes et les autres composés du vin ne le sont pas. Ceci n'est pas observé dans les essais 2005. Il semble que l'addition d'enzymes n'ait pas d'impact sur la couleur pour une vendange plus concentrée initialement en anthocyanes et en polyphénols totaux. L'indice des pigments rouges à pH acide < 1 (P_{pH<1}, condition où toutes les anthocyanes et dérivées sont converties en forme rouge flavylum) représente les pigments totaux. Il est constant pour les trois millésimes et peu affecté par les traitements enzymatiques. Pour une teneur en pigments totaux identique, la proportion de formes colorées au pH du vin est plus forte dans les vins 2005 : cela peut être dû à une teneur supérieure en pigments dérivés présents sous forme

colorée au pH du vin et/ou à une copigmentation plus importante Les pigments résistants à la décoloration par les sulfites contribuent à 50% de la couleur rouge des vins 2005 et seulement à 40% de la couleur rouge des vins 2004 et 2006, en accord avec la première de ces hypothèses. La teinte (T) est plus élevée dans les essais 2006 que dans les autres mais ne semble pas modifiée par l'utilisation d'enzymes.

Tableau 23. Indices de couleur des vins 2004, 2005, 2006 âgés de 20 mois.

Essais	ICcorr¹	±	T¹	±	IPT¹	±	PVcorr¹	±	PR_{SO2}¹	±	P_{pH<1}¹	±
Essais 2004												
control04	10,07	0,02	0,574	0,001	36,9	1,6	5,78	0,02	2,31	0,03	12,4	0,5
A04	10,98	0,02	0,572	0,001	43,8	1,6	6,33	0,02	2,58	0,03	12,6	0,5
AB04	11,4	0,02	0,572	0,001	40,3	1,6	6,49	0,02	2,7	0,03	11,7	0,5
C'04	11,36	0,02	0,599	0,001	44,7	1,6	6,42	0,02	2,75	0,03	13,5	0,5
X04	11,28	0,02	0,595	0,001	42,8	1,6	6,38	0,02	2,61	0,03	13,2	0,5
C04	10,54	0,02	0,615	0,001	42,1	1,6	5,92	0,02	2,56	0,03	12	0,5
Essais 2005												
control05	14,8	0,2	0,581	0,003	40,49	0,6	8,09	0,05	4,41	0,12	12,5	0,4
A05	13,5	0,2	0,579	0,003	44,26	0,6	7,64	0,05	3,75	0,12	13,6	0,4
AB05	14,3	0,2	0,588	0,003	41,84	0,6	8,01	0,05	3,8	0,12	13,5	0,4
C05	13,4	0,2	0,618	0,003	40,43	0,6	7,23	0,05	4,01	0,12	10,8	0,4
D05	14,2	0,2	0,602	0,003	44,85	0,6	7,79	0,05	3,64	0,12	14,7	0,4
controlc05	15,4	0,2	0,611	0,003	52,1	0,6	8,3	0,05	3,73	0,12	16,4	0,4
Ac05	15	0,2	0,592	0,003	50,8	0,6	8,15	0,05	4,2	0,12	14,8	0,4
Essais 2006												
control06	9,62	0,03	0,636	0,005	36,74	0,6	5,49	0,04	2,02	0,01	12,8	0,2
A06	10,8	0,03	0,613	0,005	36,61	0,6	5,97	0,04	2,41	0,01	12,1	0,2
D06	9,83	0,03	0,651	0,005	36,29	0,6	5,58	0,04	2,07	0,01	12,5	0,2
E06	11,18	0,03	0,606	0,005	37,66	0,6	6,22	0,04	2,44	0,01	13,3	0,2
B06	10,41	0,03	0,651	0,005	37,55	0,6	5,83	0,04	2,23	0,01	12,8	0,2
AB06	10,32	0,03	0,647	0,005	39,06	0,6	5,86	0,04	2,28	0,01	13,1	0,2
F06	10,74	0,03	0,651	0,005	40,49	0,6	6,13	0,04	2,53	0,01	13,4	0,2
G06	9,44	0,03	0,657	0,005	38,53	0,6	5,32	0,04	2,55	0,01	10,6	0,2
Acx06	10,4	0,03	0,642	0,005	38,41	0,6	5,86	0,04	2,58	0,01	12,2	0,2
I06	10,3	0,03	0,641	0,005	39,86	0,6	5,95	0,04	2,25	0,01	13,6	0,2
J06	11,48	0,03	0,62	0,005	39,59	0,6	6,32	0,04	2,8	0,01	12,9	0,2

I : moyenne de trois mesures ; **±** : écart-type ; **ICcorr** : intensité colorante corrigée de la décoloration au bisulfite ; **T** : teinte ; **IPT** : indice des polyphénols totaux ; **PVcorr** : indice pigments rouges au pH du vin corrigé de la décoloration au bisulfite ; **PR_{SO2}** : indice des pigments rouges résistants à la décoloration au bisulfite ; **P_{pH<1}** : indice des pigments rouges à pH acide < 1.

B. EFFET DES ENZYMES SUR LES POLYPHENOLS

1. Identification et dosage des polyphénols par HPLC-DAD

Le profil chromatographique des vins extrait à 320 nm permet de visualiser les acides phénols (Figure 54). Parmi les acides phénols annotés sur la Figure 54, l'injection de standard et/ou l'analyse des spectres UV-visible permet d'attribuer les pics (Tableau 24). Ils sont dosés dans les vins en équivalent acide caftarique.

Les anthocyanes ont été identifiées à 520 nm (Figure 55). Leur temps de rétention et maximum d'absorption sont donnés dans le Tableau 25. Les pigments dérivés (adduits tanins-anthocyanes et phenylpyrano-anthocyanes provenant de la réaction avec le vinylphénol) ont été identifiés par HPLC-DAD couplée à la spectrométrie de masse. Les anthocyanes et les pigments dérivés ont été dosés à partir des surfaces de pics à 520 nm et sont exprimés en équivalent malvidine-3-O-glucoside.

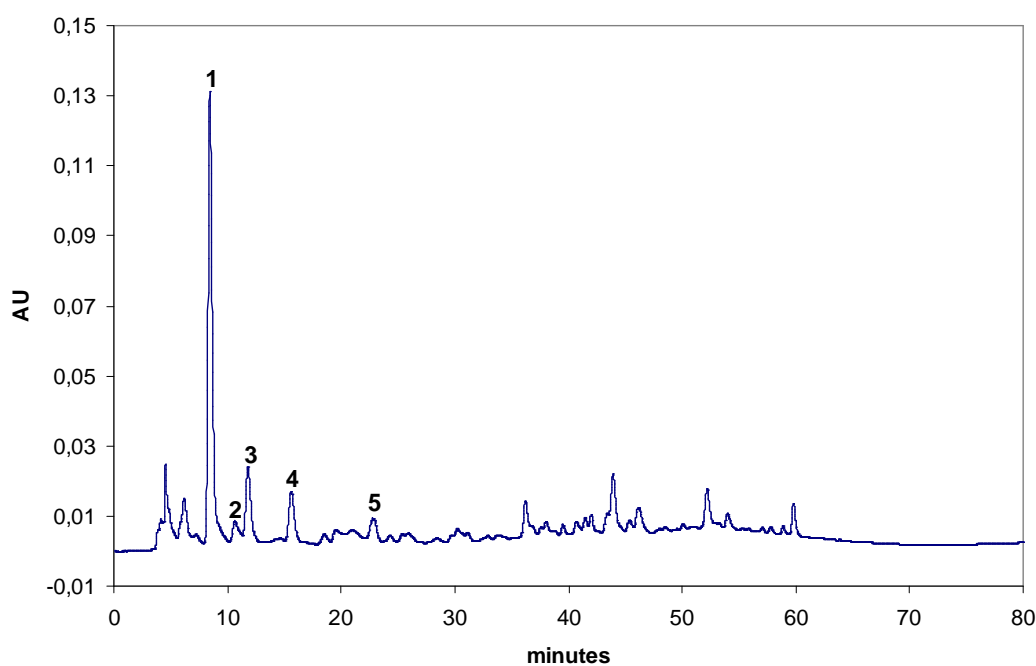


Figure 54. Profil chromatographique du témoin 2006 à 320 nm.

Tableau 24. Acides phénols présents dans les vins.

pics	composés	temps de rétention (min)	λ max (nm)
1	acide trans-caftarique	8,5	328
2	acide cis-coutarique	10,6	312
3	acide trans coutarique	11,8	312
4	acide caféique	15,6	324
5	acide p-coumarique	22,8	309

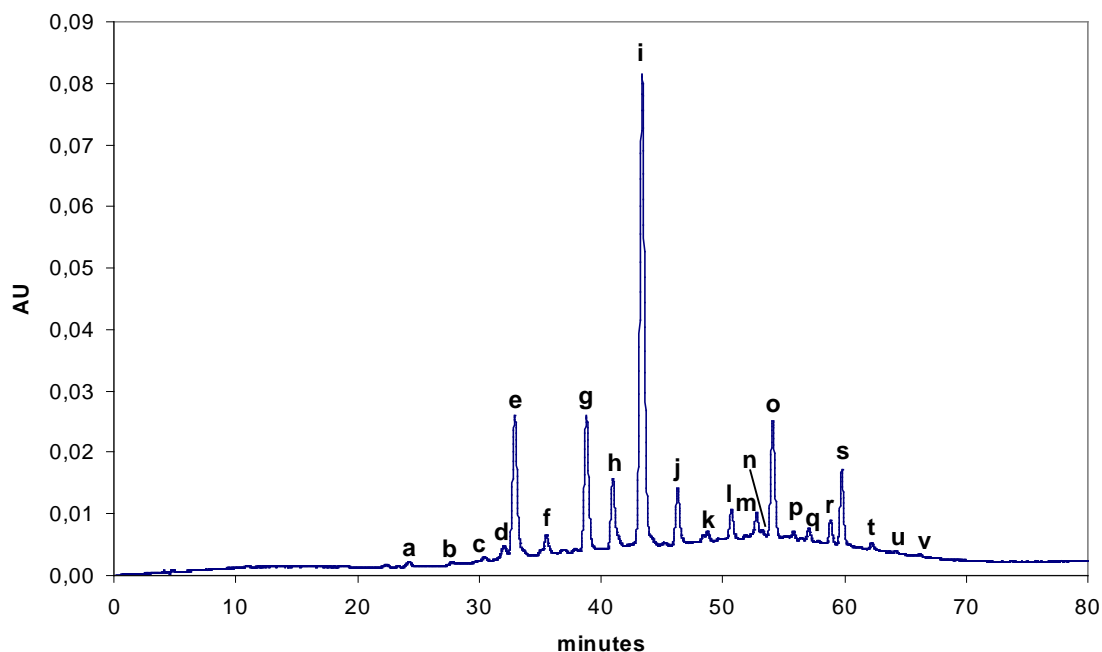


Figure 55. Profil chromatographique du témoin 2006 à 520 nm.

Tableau 25. Anthocyanes natives et pigments dérivés présents dans les vins.

pics	composés	temps de rétention (min)	λ max (nm)
a	adduit (épi)catéchine-delphinidine-3-O-glucoside	24,2	530
b	adduits (épi)catéchine-pétunidine-3-O-glucoside	27,7	528
c	adduits (épi)catéchine-péonidine-3-O-glucoside	30,4	530
d	adduits (épi)catéchine- malvidine-3-O-glucoside	32,0	535
e	delphinidine-3-O-glucoside	32,9	523
f	cyanidine-3-O-glucoside	35,5	516
g	pétunidine-3-O-glucoside	38,8	525
h	péonidine-3-O-glucoside	41,0	521
i	malvidine-3-O-glucoside	43,4	528
j	delphinidine-3-O-acétylglucoside	46,3	528
k	cyanidine-3-O-acétylglucoside	48,7	518
l	pétunidine-3-O-acétylglucoside	50,7	528
m	péonidine-3-O-acétylglucoside	52,8	516
n	delphinidine-3-O-6-p-coumaroyl-glucoside	53,2	530
o	malvidine-3-O-acétylglucoside	54,1	521
p	cyanidine-3-O-6-p-coumaroyl-glucoside	55,8	528
q	pétunidine-3-O-6-p-coumaroyl-glucoside	57,1	526
r	péonidine-3-O-6-p-coumaroyl-glucoside	58,9	526
s	malvidine-3-O-6-p-coumaroyl-glucoside	59,8	530
t	4-hydroxy-phenylpyrano-malvidine-3-O-glucoside	62,2	503
u	4-hydroxy-phenylpyrano-malvidine-3-O-acétylglucoside	64,2	505
v	4-hydroxy-phenylpyrano-malvidine-3-O-6-p-coumaroyl-glucoside	66,1	505

La concentration et la composition qualitative (degré moyen de polymérisation (DPM), % des unités épicatechine 3-Ogallate (%gal) et des unités épigallocatechine (%egc)) des tanins des vins ont été déterminées par dosage des unités constitutives libérées après phloroglucinolyse par HPLC à 280 nm (Figure 56 et Tableau 26). Le profil des vins à 280 nm après phloroglucinolyse présente de nombreux pics correspondant aux acides phénols, aux anthocyanes et à de nombreuses molécules issues des réactions entre les composés.

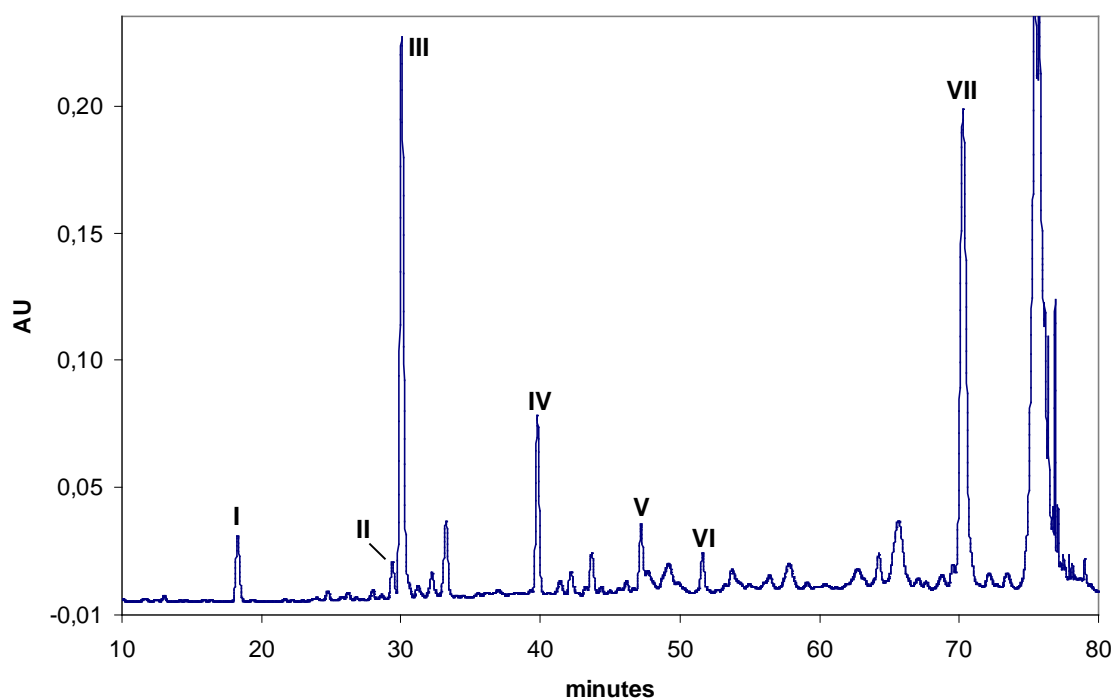


Figure 56. Profil chromatographique du témoin 2006 à 280 nm après phloroglucinolyse.

Tableau 26. Unités constitutives des tanins détectées à 280nm après phloroglucinolyse des vins.

pics	unités	temps de rétention (min)	λ max (nm)
I	épigallocatechine (unité supérieure)	18,3	271
II	catéchine (unité supérieure)	29,3	278,1
III	épicatechine (unité supérieure)	30,0	278,1
IV	catéchine (unité terminale)	39,6	278,1
V	épicate-3-O-gallate (unité supérieure)	47,0	275,7
VI	épicatechine (unité terminale)	51,3	278,1
VII	méthylparabène (étalon interne)	71,1	254

2. Effet des enzymes sur les tanins et les anthocyanes

Les vins ont été analysés au même stade d'élevage, à 20 mois. La concentration en tanins, leur composition qualitative (DPM, %gal, %egc), la concentration en anthocyanes (ACN : somme des quinze anthocyanes détectées) et en adduits tanins-anthocyanes (TA : somme des quatre adduits détectés) pour les trois millésimes sont récapitulés dans le Tableau 27.

Les vins enzymés contiennent une plus grande quantité de tanins que les vins témoins dans les trois millésimes. La composition des tanins est également modifiée par les traitements enzymatiques. Le degré moyen de polymérisation des tanins (DPM) des vins enzymés est légèrement plus élevé que celui des témoins. Ce phénomène peut être dû à une extraction plus importante des tanins de plus haut poids moléculaire facilitée par une augmentation de la dégradation des parois cellulaires du raisin induite par les enzymes. Dans tous les cas, les % d'unités épigallocatechine et épicatechine 3-gallate montrent que les tanins extraits sont principalement issus de la pellicule ou de la pulpe du raisin. Les valeurs des % d'unités épicatechine-3-O-gallate et d'épigallocatechine mesurées dans les vins sont caractéristiques des tanins de ces compartiments (Mane *et al.*, 2007; Souquet *et al.*, 1996) et ne sont pas modifiées par les enzymes en 2005 et peu en 2004 et 2006.

Les teneurs en anthocyanes libres (ACN) et en adduits tanins-anthocyanes (TA) sont variables pour les trois millésimes. La concentration en ACN est généralement supérieure dans les vins du millésime 2006 et particulièrement faible pour C05 et le témoin 2005. En 2004, les vins enzymés sont moins riches en anthocyanes libres que le témoin (sauf X04), ainsi que certains vins en 2006 (A06, E06, G06 et Acx06) par rapport au témoin 2006. Aucune différence qualitative n'a été observée sur les profils d'anthocyanes libres ce qui indique que les préparations enzymatiques testées sont dépourvues d'activités anthocyanase et anthocyanecinnamoyl estérase. La concentration en anthocyanes natives est conditionnée à la fois par leur extraction à partir des baies et par leur implication dans de nombreuses réactions chimiques. La couleur des vins, particulièrement intense dans les échantillons 2005, n'est donc pas corrélée à la concentration en anthocyanes mais dépend d'une part de la nature et de la proportion des anthocyanes et de leurs dérivés formés au cours de la vinification et d'autre part du phénomène de copigmentation. Les dérivés d'anthocyanes contribuant à la couleur du vin incluent les adduits TA que nous arrivons à doser par HPLC mais aussi d'autres pigments non dosés mais détectés par les mesures d'absorbance effectuées directement sur le vin (IC et

PV) et les mesures de pigments résistant à la décoloration au bisulfite (PR_{SO_2}). Les quantités de ces divers composés dépendent de la concentration en tanins et en anthocyanes ainsi que de leur rapport qui peut être modifié par l'utilisation d'enzymes. Il a été montré, dans une étude antérieure, que les concentrations des adduits TA augmentent avec le rapport tanins/anthocyanes, pour une variété donnée, mais des valeurs supérieures ont été dosées dans les vins issus de variétés plus riches en anthocyanes (Morel-Salmi *et al.* 2006). Par ailleurs, une corrélation négative de ces concentrations avec la résistance des pigments du vin à la décoloration par les sulfites a été observée, suggérant une compétition entre la formation de ces composés sensibles à la décoloration et celle d'autres molécules résistantes comme les pyranoanthocyanes (Morel-Salmi *et al.*, 2006). Les teneurs des vins enzymés en adduits TA sont supérieures à celles des témoins en 2004 et surtout en 2005, ce qui est peut être lié à une extraction accrue des tanins, mais ce résultat n'est pas confirmé en 2006. Les concentrations de ces molécules restent très faibles dans tous les vins mais elles peuvent être considérées comme des marqueurs d'une large famille de pigments résultant du même mécanisme réactionnel.

L'augmentation de l'intensité colorante dans les vins enzymés ne reflète pas une concentration plus importante en anthocyanes natives dans ces vins. Cette augmentation est probablement due à d'autres phénomènes comme une plus grande quantité de pigments dérivés ou une plus forte incidence de la copigmentation due à une meilleure extraction des tanins (Fulcrand, *et al.* 2004; Salas *et al.*, 2003). Il a été montré que la couleur d'une solution de malvidine-3-O-glucoside était augmentée en présence de tanins, ainsi que sa stabilité lorsque le DPM de ces tanins augmentait (Malien-Aubert *et al.* 2002).

Tableau 27. Composition en tanins, en anthocyanes et en adduits tanins-anthocyanes des vins 2004, 2005, 2006.

Essais	Tanins ¹ (mg/L)	±	DPm ¹	±	%gal ¹	±	%egc ¹	±	ACN ¹ (mg/L)	±	TA ¹ (mg/L)	±
Essais 2004												
control04	425	20	4,65	0,11	2,38	0,07	17,90	1,06	63,3	1,6	1,35	0,08
A04	504	9	5,17	0,05	3,10	0,12	18,89	1,05	59,6	1,3	1,44	0,18
AB04	524	29	5,12	0,13	3,33	0,14	18,78	0,45	55,4	2,6	1,42	0,10
C'04	525	10	5,29	0,06	3,20	0,16	18,96	0,91	60,8	2,3	1,49	0,25
X04	554	9	4,88	0,28	3,05	0,39	18,34	1,43	67,0	3,9	1,48	0,14
C04	476	11	5,01	0,18	2,53	1,01	17,86	2,22	55,0	3,7	1,64	0,43
Essais 2005												
control05	447	34	5,41	0,17	2,42	0,16	22,53	0,39	25,1	0,2	1,18	0,08
A05	558	37	5,84	0,31	3,16	0,33	22,31	0,34	52,9	0,9	2,25	0,49
AB05	520	50	5,67	0,02	1,35	0,18	23,43	1,22	58,4	0,6	1,89	0,17
C05	440	71	5,68	0,36	1,49	0,37	23,66	1,33	24,6	0,7	1,36	0,19
D05	501	35	5,68	0,36	1,31	0,40	23,50	0,27	64,6	1,4	2,43	0,25
controlc05	669	66	5,34	0,17	1,85	0,50	21,12	1,25	64,6	1,0	2,09	0,11
Ac05	716	18	5,85	0,16	1,59	0,13	21,53	0,16	54,9	0,4	2,06	0,29
Essais 2006												
control06	572	8	4,96	0,06	1,68	0,03	24,35	0,05	85,2	2,1	1,63	0,09
A06	583	6	5,18	0,01	2,10	0,01	24,02	0,23	57,6	0,8	1,31	0,06
D06	581	5	5,06	0,08	2,04	0,02	24,29	0,17	85,6	0,9	1,46	0,08
E06	622	8	5,07	0,04	2,00	0,04	24,02	0,09	70,5	1,2	1,37	0,10
B06	640	15	5,28	0,04	1,98	0,02	24,18	0,11	81,9	1,0	1,50	0,06
AB06	648	3	5,11	0,03	2,18	0,00	23,39	0,05	83,3	1,7	1,46	0,04
F06	727	16	5,40	0,02	2,24	0,04	24,03	0,13	87,4	0,7	1,63	0,10
G06	716	20	5,07	0,03	2,02	0,02	23,64	0,06	57,8	0,8	1,33	0,12
Acx06	671	16	5,12	0,02	2,28	0,02	23,35	0,22	67,1	0,8	1,53	0,14
I06	657	12	5,16	0,04	2,23	0,01	23,49	0,13	92,6	0,6	1,60	0,07
J06	701	13	5,32	0,04	2,30	0,02	24,11	0,10	54,3	0,9	1,39	0,08

I : moyenne de trois mesures ; ± : écart-type ; **Tanins** : concentration en tanins en mg/L déduites des unités constitutives après phloroglucinyse ; **DPm** : degré moyen de polymérisation ; **%gal** : % d'unité épi-3-O-gallate ; **%egc** : % d'unité épigallocatechine ; **ACN** : concentration en anthocyanes en mg/L déduites de la somme des 15 anthocyanes détectés dans les vins ; **TA** : concentration en adduits tanins-anthocyanes en mg/L.

3. Effet des enzymes sur les acides phénols

Les acides phénols ont été dosés pour les trois millésimes (Tableau 28). Les enzymes commerciales purifiées dépourvues d'activité cinnamoyl estérase n'ont pas d'effet sur les acides phénols. En 2004 et en 2006, des enzymes non purifiées ont été testées : X04, F06, G06, Acx06, I06, J06. L'essai X04 présente une plus forte concentration en acide caféique

que le vin témoin et les autres vins enzymés. Dans les essais 2006 ayant été traités par les préparations non commerciales, une augmentation de la concentration en acide caféique et en acide *p*-coumarique est observée, indiquant une hydrolyse de l'acide caftarique en acide caféique et de l'acide coutarique en acide *p*-coumarique. L'effet est notamment très marqué dans l'échantillon G06 où la quasi-totalité de l'acide caftarique et de l'acide *t*-coutarique ont été convertis en acide caféique et en acide *p*-coumarique, respectivement. En 2004, 2005 et 2006, l'utilisation de l'enzyme A n'a pas conduit à une augmentation d'acide caféique et d'acide *p*-coumarique. Ceci indique que dans l'échantillon Acx06, c'est la préparation à base de cellulase qui contient une activité cinnamoyl estérase.

Tableau 28. Composition en acides hydroxycinnamiques des vins 2004, 2005, 2006.

Essais	Acide ¹ <i>t</i> -caftarique	±	Acide ¹ <i>cis</i> - coutarique	±	Acide ¹ <i>t</i> -coutarique	±	Acide ¹ caféique	±	Acide ¹ <i>p</i> - coumarique	±
Essais 2004										
control04	97,3	2,0	5,0	0,6	28,3	1,9	6,1	0,3	n.d	
A04	98,9	3,0	5,5	0,6	31,6	2,3	5,2	0,8	n.d	
AB04	92,7	3,3	5,2	0,5	29,9	2,5	5,2	0,5	n.d	
C'04	97,4	3,7	5,0	0,4	27,9	1,8	5,4	0,7	n.d	
X04	97,1	2,9	4,6	0,3	24,0	1,4	9,2	0,9	n.d	
C04	97,9	2,7	5,2	0,4	28,4	1,8	5,8	0,7	n.d	
Essais 2005										
control05	132,3	1,6	6,0	0,4	33,5	1,0	9,4	0,4	n.d	
A05	121,7	3,1	5,8	0,2	32,4	1,9	8,8	0,2	n.d	
AB05	119,8	1,5	6,1	0,0	30,6	1,5	9,0	0,1	n.d	
C05	117,5	3,1	6,1	0,1	30,7	1,7	9,6	0,1	n.d	
D05	124,2	3,0	5,9	0,2	29,9	1,7	8,8	0,1	n.d	
controlc05	135,6	2,9	5,8	0,2	31,0	1,4	10,9	0,3	n.d	
Ac05	129,1	1,8	6,0	0,2	29,9	1,4	9,1	0,3	n.d	
Essais 2006										
control06	115,3	0,8	5,4	0,2	23,8	1,6	17,5	2,9	3,8	0,3
A06	102,5	2,6	5,2	0,1	19,6	0,7	14,6	0,4	3,6	0,2
D06	100,1	1,0	4,8	0,2	19,7	0,0	16,3	0,3	3,4	0,1
E06	106,1	0,7	4,9	0,2	21,4	0,4	15,5	0,2	3,9	0,3
B06	109,6	0,9	4,9	0,2	21,6	0,3	15,2	0,6	3,8	0,2
AB06	107,0	1,1	4,8	0,2	20,6	0,2	16,9	0,2	4,2	0,1
F06	68,1	0,7	4,5	0,1	5,5	0,6	47,1	0,1	7,1	0,7
G06	10,5	0,1	3,5	0,3	0,4	0,2	96,6	1,5	10,1	1,3
Acx06	60,6	0,5	4,2	0,2	4,2	0,4	46,3	0,4	7,5	0,4
I06	76,2	0,1	4,0	0,6	9,8	0,7	33,4	0,1	5,1	0,2
J06	84,4	0,5	3,9	0,2	11,6	0,5	32,6	0,5	5,5	0,7

1 : moyenne de trois mesures ; ± : écart-type ; n.d : non détecté.

Les dérivés anthocyane-vinylphénol ont été dosés dans les essais 2004 et certains essais 2006 pour montrer l'effet de préparations non purifiées sur la formation de ces composés. Dans ces échantillons, l'augmentation de l'acide *p*-coumarique conduit aussi à l'augmentation de la concentration en dérivés 4,hydroxy-phenylpyrano-anthocyanes – (Figure 57 et Figure 58). L'acide *p*-coumarique peut en effet être transformé par décarboxylation en vinyl-4-phénol qui réagit avec les anthocyanes pour former ces produits orangés (Figure 22, p 40).

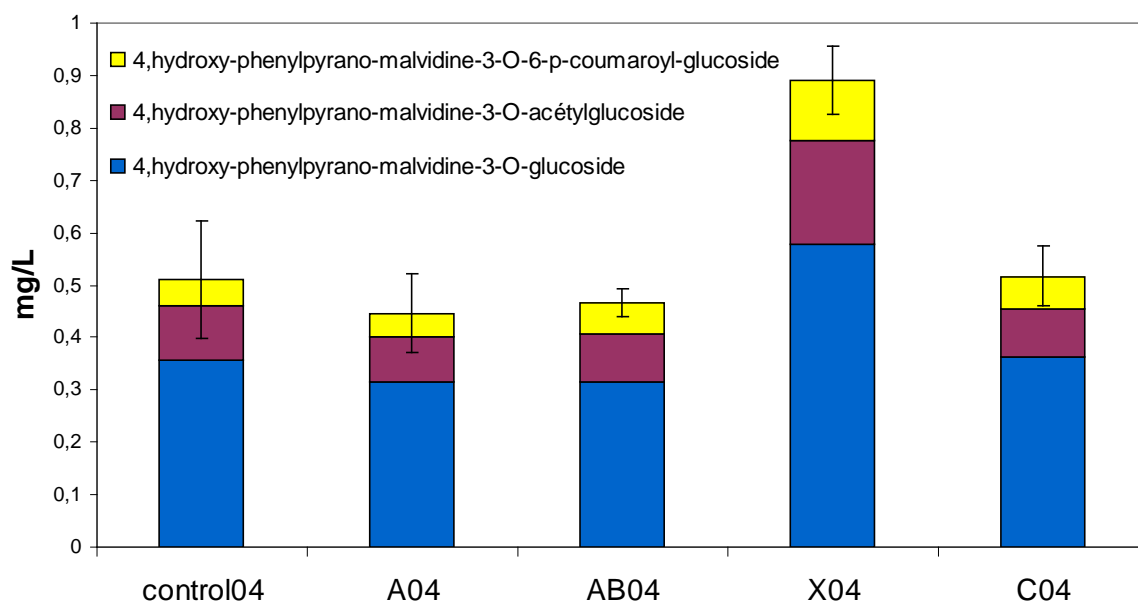


Figure 57. Concentration en mg/L (éq. malvidin 3-glucoside) en 4,hydroxy-phenylpyrano-anthocyanes des vins 2004.

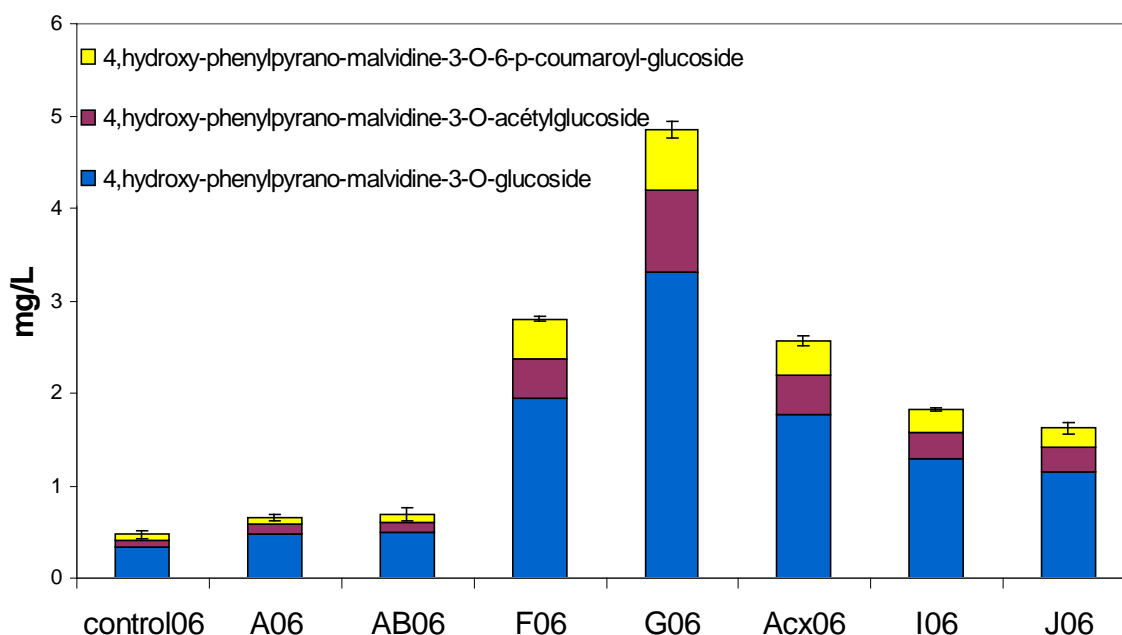


Figure 58. Concentration en mg/L (éq. malvidin 3-glucoside) en 4,hydroxy-phenylpyrano-anthocyanes des vins 2006.

C. MODULATION DE L'EFFET ENZYME PAR L'EFFET MILLESIME

L'analyse des variations liées au millésime sur l'effet du traitement enzymatique a été approfondie en comparant les essais témoin, enzyme A et enzyme AB effectués en 2004, 2005 et 2006. Cette partie a donné lieu à une publication dans Food Chemistry (annexe 3).

Une analyse en composantes principales a été réalisée à partir de toutes les données analytiques concernant les polysaccharides (MP, PRAG, RG-II), les polyphénols (ACN, adduits TA, Tanins, %gal, %egc, DPm), et les indices de couleur (IC, IPT, T, PV, PR_{SO2}, P_{pH<1}) obtenues sur ces vins après 20 mois de conservation (Figure 59).

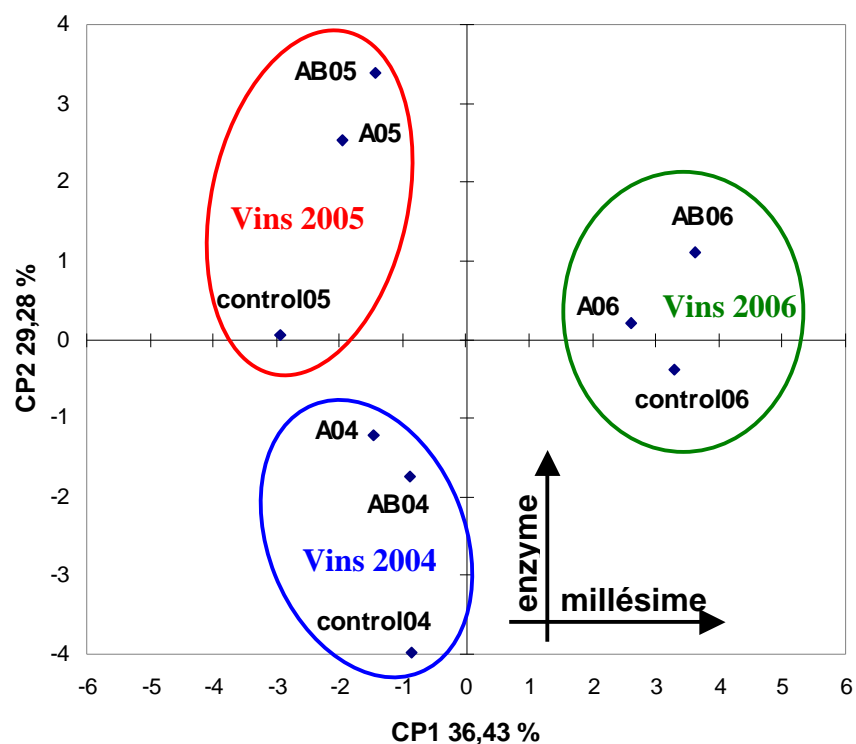


Figure 59. Analyse en composantes principales des données analytiques des vins 2004, 2005, 2006 : projection des vins sur les deux premières composantes principales CP1 (36,43%) et CP2 (29,28%).

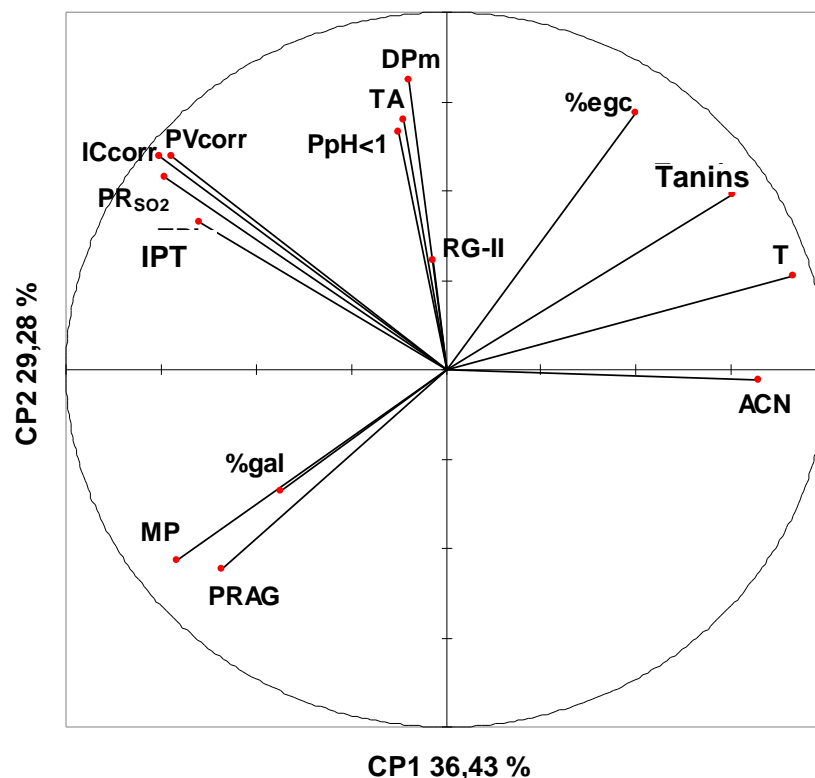


Figure 60. Cercle de corrélation des données analytiques sur les deux premières composantes CP 1 et 2 :
ICcorr : intensité colorante corrigée, **IPT** : indice des polyphénols totaux, **PV corr** : pigments rouges au pH du vin, **PR_{SO2}** : pigments résistants à la décoloration au bisulfite, **P_{pH<1}** : pigments rouges totaux à pH acide <1, **TA** : adduits tanins-anthocyanes, **DPm** : degré moyen de polymérisation, **RG-II** : rhamnogalacturonane type II, **%egc** : pourcentage d'unités épigallocatechines, **%gal** : pourcentage d'unités galloylées, **T** : teinte, **ACN** : anthocyanes, **MP** : mannoprotéines, **PRAG** : polysaccharides riches en arabinose et galactose.

Les deux premières composantes principales expliquent 65,71% (CP1 36,43% et CP2 29,28%) de la variabilité de l'ensemble des données. La projection des vins sur ces deux premiers axes montre (Figure 59) que :

- l'axe 1 est avant tout un axe millésime puisqu'il sépare 2006 des deux autres millésimes.
- l'axe 2 sépare 2004 de 2005 et au sein des trois millésimes, les témoins des enzymes.

La composante principale 1 (CP1) est définie positivement par les anthocyanes (ACN), la teinte (T), la concentration en tanins et négativement par les mannoprotéines (MP), les polysaccharides riches en arabinose et galactose (PRAG), l'intensité colorante (ICcorr), les pigments rouges du vin (PVcorr), l'indice des polyphénols totaux (IPT) et les pigments résistants à la décoloration par le bisulfite (PR_{SO2}) (Figure 60). Cet axe fait ressortir les vins 2006 qui contiennent plus d'anthocyanes et de tanins, ont une teinte plus élevée, moins de polysaccharides et un indice de polyphénols totaux plus bas par rapport aux vins 2005 et, dans

une moindre mesure, aux vins 2004 qui présentent des indices de couleur plus élevés. La concentration en anthocyanes est anti-corrélée avec l'ICcorr ($R = -0,76$), avec PVcorr ($R = -0,74$) et PR_{SO2} ($R = -0,78$), ces trois valeurs étant fortement corrélées entre elles. Ceci indique que la couleur des vins est principalement due aux pigments dérivés (Fulcrand *et al.*, 2004; Salas *et al.* 2004). L'indice des polyphénols totaux est corrélé avec les indices de couleur excepté avec P_{pH<1}. Cette décorrélation des anthocyanes libres avec les pigments et des tanins dosés par HPLC avec l'IPT reflète une forte proportion de molécules dérivées (pigments ou non) qui ne sont pas dosées par ces méthodes. La composante principale 2 est définie positivement par le D_{Pm}, P_{pH<1}, TA, %egc et, dans une moindre mesure, par les tanins et les indices de couleur. Elle est associée négativement avec les PRAG et les MP (Figure 60). Cet axe distingue les vins enzymés par A et AB des vins témoins, d'une part, par leur concentration élevée en RG-II et faible en PRAG, témoin d'une dégradation accrue des parois cellulaires, et d'autre part par une concentration en tanins plus élevée et un plus haut D_{Pm}, indiquant une meilleure extraction de tanins. Les adduits TA et P_{pH<1} sont corrélés ($R = +0,72$), suggérant que les dimères TA sont des marqueurs d'une plus large classe d'adduits TA qui représente la majorité des pigments rouges à pH < 1. Ces adduits, comme les anthocyanes natives, sont en effet colorés à pH acide mais se trouvent majoritairement sous forme incolore au pH des vins (Salas *et al.*, 2004). Ils peuvent cependant être impliqués, comme les anthocyanes libres, dans des phénomènes de copigmentation.

III. CONCLUSION

L'objectif de ce travail était d'identifier l'effet des enzymes de macération sur la couleur et sur la composition des vins en polysaccharides et en polyphénols.

L'effet des enzymes s'est traduit pour la plupart des essais de chaque millésime par une augmentation des concentrations de RG-II et de tanins. Cet effet est plus ou moins marqué sur la couleur et la concentration en PRAG suivant le millésime. En particulier, l'augmentation de l'intensité colorante et la dégradation des PRAG (plus précisément des arabinanes) ne sont pas observés en 2005, ce qui pourrait s'expliquer par une différence de maturité des baies par rapport aux millésimes 2004 et 2006. La concentration en anthocyanes mesurée par analyse HPLC est soit plus faible, notamment en 2004 et dans certains des vins enzymés 2006, soit non modifiée par le traitement enzymatique. Cependant, en 2004 et 2006, les indices de couleur des vins enzymés sont plus élevés que dans les vins témoins. Il est possible qu'une extraction plus importante d'anthocyanes et/ou de tanins ait favorisé la conversion des

anthocyanes en d'autres pigments contribuant à la couleur des vins mais ceci n'a pas été vérifié au stade moût. Cette hypothèse est cependant plausible compte tenu de l'augmentation des pigments résistants à la décoloration par les sulfites dans les vins enzymés.

Concernant les mécanismes de dégradation de la paroi engendrée par les enzymes, l'analyse des polysaccharides des vins des trois millésimes a montré que les préparations enzymatiques dégradent les pectines, conduisant à la libération de leurs chaînes latérales. L'analyse des oligosaccharides des essais 2004 et 2006 a mis en évidence qu'ils sont des marqueurs des activités enzymatiques dégradant la paroi. En effet, les oligosaccharides ont des structures différentes suivant les préparations enzymatiques qui libèrent des structures de type RG, terminées, soit par du rhamnose, soit par de l'acide galacturonique.

Cette étude montre que l'utilisation des enzymes de macération entraîne une modification de la composition des vins en polysaccharides, en oligosaccharides et en polyphénols. Ces changements pourraient avoir un impact sur la stabilité colloïdale et sur les propriétés organoleptiques des vins. Pour mieux comprendre les conséquences de ces modifications, une étude de l'évolution de ces différents groupes de composés, séparément ou en mélange, en solution modèle vin a été réalisée dans la suite de la thèse et est décrite dans le chapitre II.

CHAPITRE II. ETUDE DES POLYSACCHARIDES ET DES POLYPHENOLS EN MILIEU MODELE VIN.

Dans ce chapitre, nous avons cherché à identifier le comportement des tanins et des anthocyanes pris séparément ou en mélange, en présence ou non de sucres en solution modèle vin (solution aqueuse à 12% d'éthanol, contenant 2g/l d'hydrogénotartrate de potassium). Nous avons choisi de fixer le pH à 3,4, valeur qui correspond au pH des vins analysés précédemment. Les fractions de polyphénols utilisées pour cette étude sont des tanins de pépins ayant un degré moyen de polymérisation de 7, une fraction d'anthocyanes contenant principalement de la malvidine-3-O-glucoside (anthocyane majoritaire dans les vins). Les polysaccharides testés sont l'AGP3 (deuxième type d'AGP le plus présent dans les vins), le RG-II (polysaccharide le plus libéré par la dégradation des pectines par les enzymes) et une fraction d'oligosaccharides correspondant à des fragments des zones lisses des pectines (type d'oligosaccharides présents dans un vin non enzymé).

I. CARACTERISATION DES FRACTIONS ET PLAN D'EXPERIENCE

A. LES FRACTIONS DE POLYSACCHARIDES

1. La fraction d'AGP (G)

Les caractéristiques de la fraction d'AGP3 préparée lors d'une précédente étude au laboratoire (Vidal *et al.*, 2003b) sont données dans le Tableau 29. Elle a un rapport arabinose/galactose de 1, contient du rhamnose, des oses acides. La Figure 61 montre son profil de distribution en masse. Au maximum du pic, la masse moléculaire apparente de la fraction est de 67 kDa. Cette fraction (notée G) a été utilisée à une concentration initiale de 200mg/L.

Tableau 29. Caractéristiques de la fraction d'AGP3.

oses	AGP3
<i>neutres</i>	% molaire
arabinose	36,9
rhamnose	9,2
fucose	nd
xylose	nd
mannose	3,8
galactose	36,4
glucose	0,6
<i>acides</i>	
acide galacturonique	5,6
acide glucuronique	7,8
masse molaire apparente (kDa)	15<MM<118

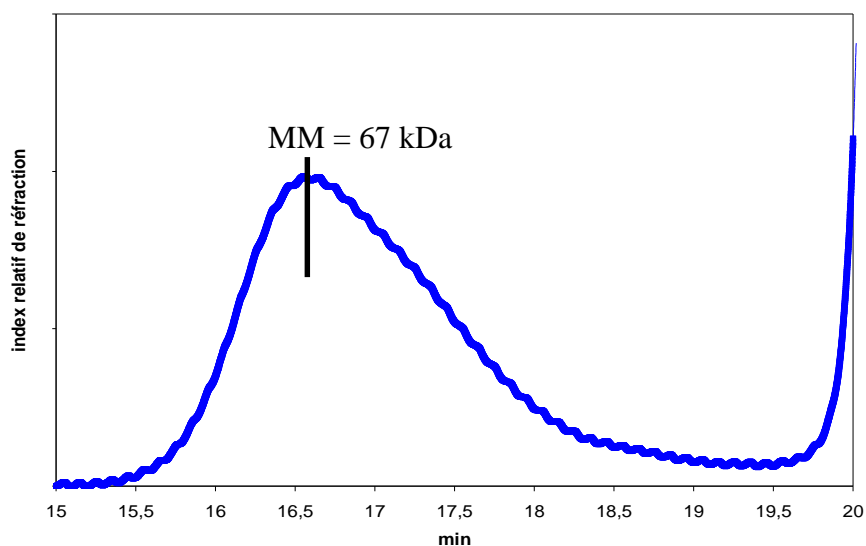


Figure 61. Profil de distribution en masse obtenu par HPSEC de la fraction d'AGP3.

2. La fraction de RG-II (R)

Les caractéristiques de la fraction de RG-II préparée lors d'une précédente étude au laboratoire (fraction RG-II 3, Vidal *et al.*, 2003b) sont données dans le Tableau 30. Elle est principalement composée de RG-II sous forme dimère (87%), majoritaire dans le vin. La Figure 62 montre son profil de masse. Au maximum du pic, la masse moléculaire apparente de la fraction est de 6,3 kDa. La concentration initiale de R dans les solutions est de 200mg/L.

Tableau 30. Caractéristiques de la fraction de RG-II.

oses	RG-II
<i>neutres</i>	% molaire
arabinose	8,4
rhamnose	15,5
fucose	4,1
xylose	nd
mannose	0,2
galactose	5,3
2-O-Me-Xylose	5,8
2-O-Me-Fucose	5,7
apiose	5,0
<i>acides</i>	
acide galacturonique	33,6
acide glucuronique	3,3
acide acérique	8,5
DHA	2,5
KDO	3,0
masse molaire apparente (kDa)	3<MM<15

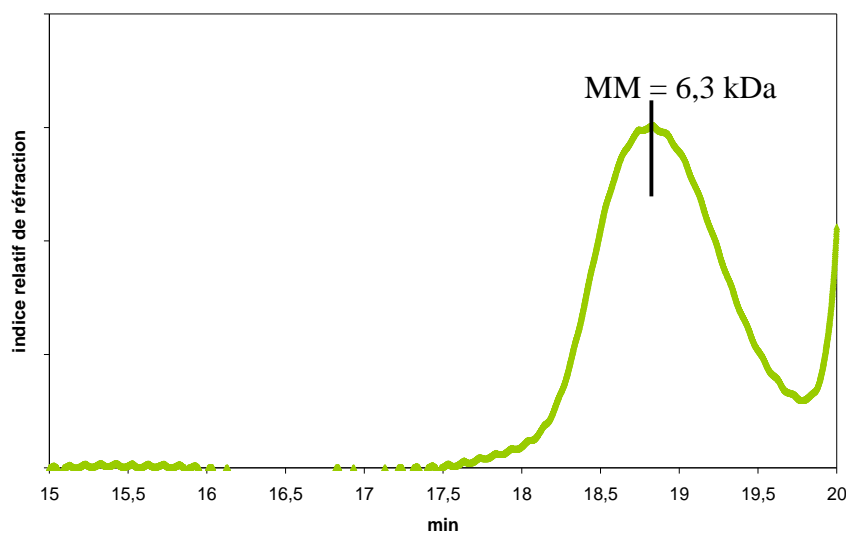


Figure 62. Profil de distribution en masse obtenu par HPSEC de la fraction de RG-II.

3. La fraction d'oligosaccharides (O)

La fraction d'oligosaccharides a été obtenue à partir de la dégradation d'acide pectique par une polygalacturonase (cf I.B.1.e). Après purification par chromatographie d'exclusion stérique, la fraction a été caractérisée par spectrométrie de masse (ESI-TOF, Figure 63). Elle est composée d'acides galacturoniques de DP 2 à 5. Au maximum du pic, la masse moléculaire apparente de la fraction est de 2,3 kDa (Figure 64).

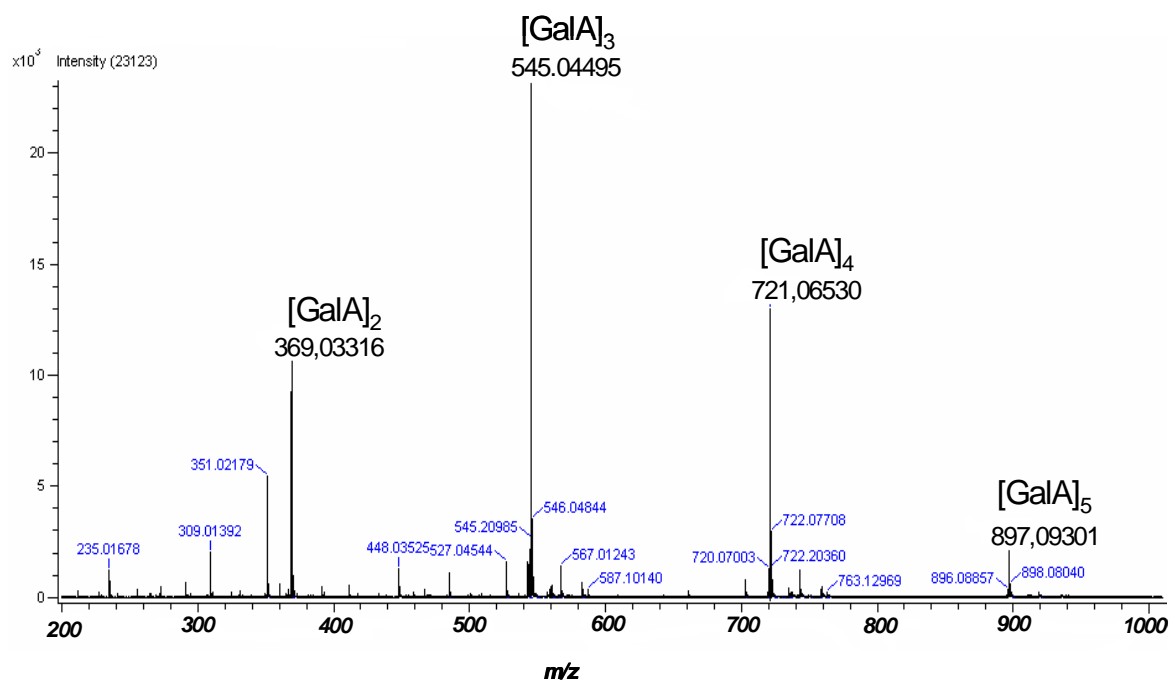


Figure 63. Spectre de masse ESI-TI de la fraction d'oligosaccharide.

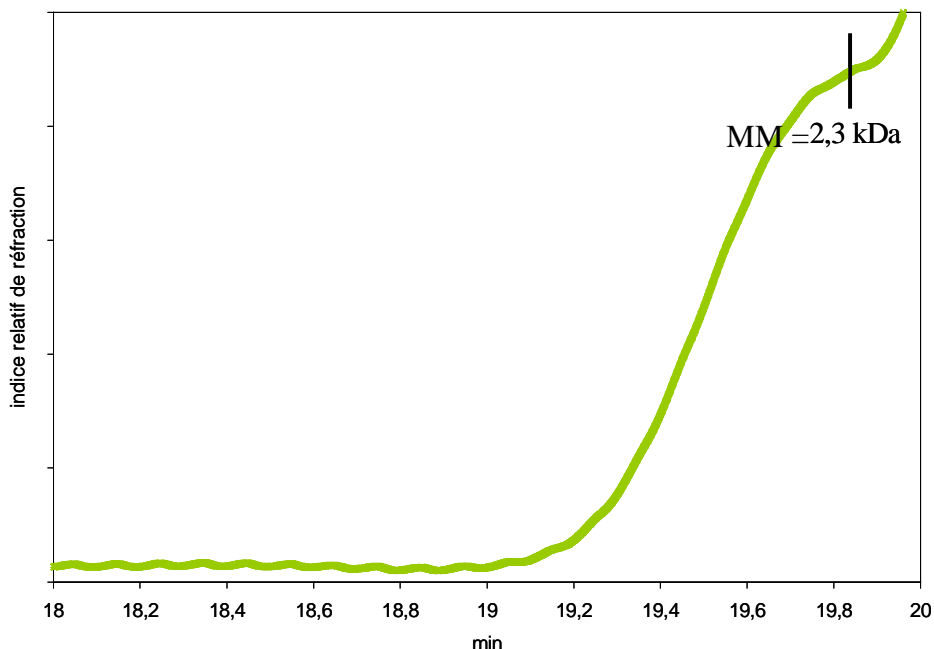


Figure 64. Profil de distribution en masse obtenu par HPSEC de la fraction d'oligosaccharides.

Cette fraction correspond à des oligosaccharides issus de la dégradation des zones lisses des pectines tels que ceux présents dans un vin témoin non enzymé. La concentration initiale de O dans les solutions est de 200mg/L.

B. LES FRACTIONS D'ANTHOCYANES ET DE TANINS

1. La fraction d'anthocyanes (A)

La fraction d'anthocyanes a été purifiée au laboratoire à partir de pellicules d'Alicante Bouschet (cf. I.B.1.b). Elle contient majoritairement de la malvidine-3-O-glucoside, principale anthocyane des vins rouges, (I : 79,3% de la surface totale à 520 nm), de la péonidine-3-O-glucoside (II : 15,9%) et des traces de pétunidine -3-O-glucoside et de malvidine 3,5 diglucoside (III : 4,8%) (Figure 65). On y détecte également des traces d'acide vanillique et d'acide syringique, marqueurs d'un début de dégradation de la fraction. La malvidine-3-O-glucoside représente 780 mg par gramme de cette fraction.. La concentration initiale de A dans les solutions sera de 500 mg/L.

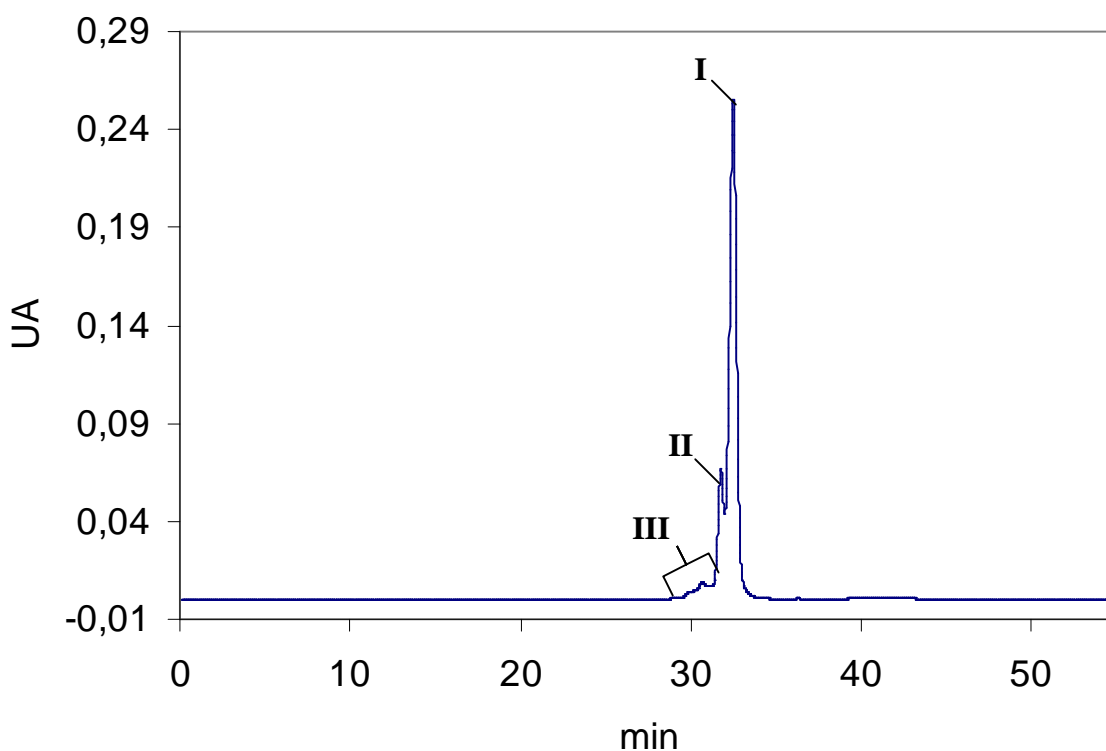


Figure 65. Chromatogramme à 520 nm de la fraction d'anthocyanes.

2. La fraction de tanins (T)

La fraction de tanins a été purifiée au laboratoire à partir de pépins de Carignan (cf. IB.1.a). Le profil chromatographique obtenu à 280 nm (Figure 66) montre deux pics non résolus, la première qui représente 84,3% de la surface totale donne une réponse en masse (Figure 67) mais pas la seconde (15,7%). Les structures identifiées dans le premier pic non résolu par spectrométrie de masse sont données dans le Tableau 31. L'analyse de la composition de la

fraction par phloroglucinolyse est donnée dans le Tableau 32. Le DPM du pic 1 a été calculé à partir de l'intensité des différents pics présents dans le spectre de masse. Il est de 5,9, valeur inférieure à celle obtenue par phloroglucinolyse pour la totalité de la fraction (7,6). Ceci suggère que le second pic est constitué d'une fraction plus polydisperse de tanins plus polymérisés, ces deux paramètres étant connus pour affecter la détection des tanins en spectrométrie de masse (Fulcrand *et al.*, 2008). Le pourcentage d'unités galloylées (%gal) a également été calculé à partir du spectre de masse de ce premier pic. La valeur obtenue (53%) est très supérieure à celle obtenue par phloroglucinolyse sur l'ensemble de la fraction : 19%. Ceci peut être expliqué par un rendement de phloroglucinolyse faible sur des tanins galloylés ou ramifiés ou par une meilleure réponse des esters galliques en spectrométrie de masse. La concentration initiale de T dosée dans les solutions est de 1800 mg/L.

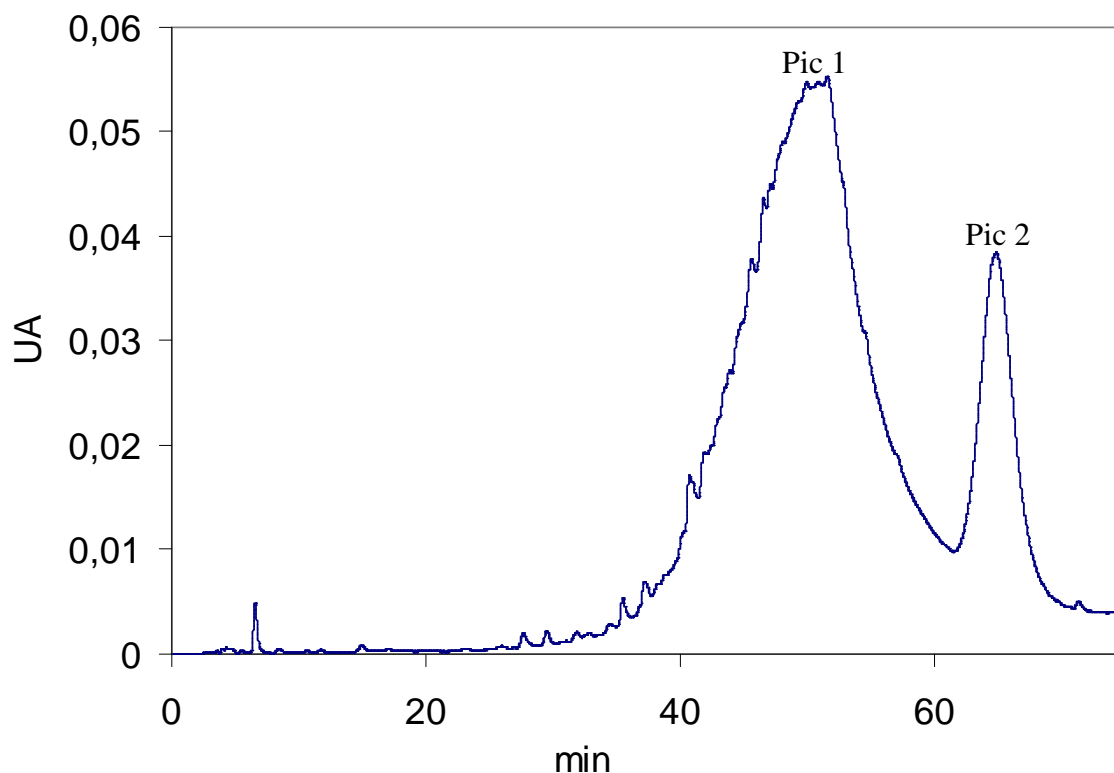


Figure 66. Chromatogramme à 280 nm de la fraction de tanins.

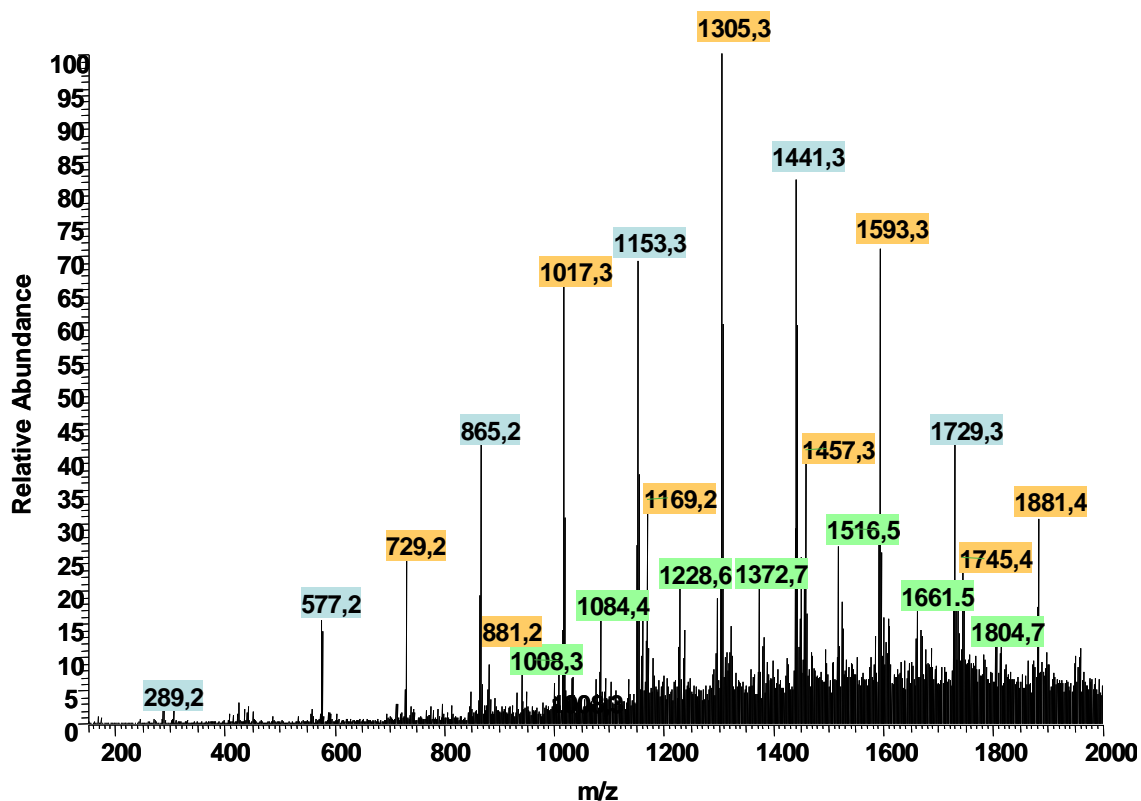


Figure 67. Spectre de masse du premier pic.

Tableau 31. Identification des flavanols présents dans la fraction de tanins.

Structures	m/z	M
flavanols non galloylés	[M-H]⁻	
DP1	289	290
DP2	577	578
DP3	865	866
DP4	1153	1154
DP5	1441	1442
DP6	1729	1730
flavanols galloylés	[M-H]⁻	
DP2 galloylé	729	730
DP2 digalloylé	881	882
DP3 galloylé	1017	1018
DP3 digalloylé	1169	1170
DP4 galloylé	1305	1306
DP4 digalloylé	1457	1458
DP5 galloylé	1593	1594
DP5 digalloylé	1745	1746
DP6 galloylé	1881	1882
Flavanols de plus haut DP	[M-H]²⁻	
DP7	1008	2018
DP7 galloylé	1084	2170
DP8 galloylé	1228	2458
DP9 galloylé	1372	2746
DP10 galloylé	1516	3034
DP11 galloylé	1661	3324
DP12 galloylé	1804	3610

Tableau 32. Caractérisation de la fraction de tanins par phloroglucinolyse.

	teneurs en mg/g	%gal	DPm
Fraction de tanins (T)	628 ± 13	19 ± 3	7,6 ± 0,6

C. RAPPEL DU PLAN D'EXPERIENCE

Ces cinq fractions ont été mélangées (à des concentrations analogues aux concentrations rencontrées dans les vins rouges) suivant le plan d'expérience rappelé dans le (Tableau 33). Elles ont été analysées à t= 0, 3, 6, 10, 14, 21, 35, 45 et 365 jours.

Tableau 33. Plan d'expérience des solutions modèles.

code des solutions	fraction A	fraction T	fraction G	fraction R	fraction O
	d'anthocyanes C=500mg/L	de tanins C=1,8g/L	d'AGP3 C=200mg/L	de RG-II C=200mg/L	d'oligosaccharides C=200mg/l
A	1	0	0	0	0
AG	1	0	1	0	0
AR	1	0	0	1	0
AO	1	0	0	0	1
T	0	1	0	0	0
TG	0	1	1	0	0
TR	0	1	0	1	0
TO	0	1	0	0	1
AT	1	1	0	0	0
ATG	1	1	1	0	0
ATR	1	1	0	1	0
ATO	1	1	0	0	1
GRO	0	0	1	1	1
ATGRO	1	1	1	1	1

1 : présence ; 0 : absence.

II. ETUDE DES POLYSACCHARIDES

Après un an d'évolution, un important précipité s'est formé dans les solutions contenant les tanins. Ces précipités n'ont pas pu être dissous. Par conséquent, le profil des polysaccharides a été réalisé à t=0 jours sur toutes les solutions et à 1 an sur les surnageants des solutions (Figure 68).

L'analyse des profils des solutions montre des évolutions. Après un an, le pic d'AGP (G) a diminué et nous pouvons observer un déplacement du maximum du pic dans les

solutions contenant des tanins. Il n'est pas modifié au bout d'un an en présence d'anthocyanes (Figure 68, I). Ces observations traduisent probablement que la fraction d'AGP3 et surtout les polysaccharides de plus haute masse présents dans cette fraction interagissent et co-précipitent avec les tanins. La présence des anthocyanes (ATG, Figure 68, II) et des deux autres fractions de sucres (ATGRO, Figure 68, IV) ne modifie pas ce comportement. Une légère perte d'AGP3 est observée dans la solution qui ne contient que les trois fractions de sucres bien qu'elle reste parfaitement limpide (GRO, Figure 68, IV).

Le pic de RG-II (R) a été modifié dans toutes les solutions. Ceci peut être expliqué par trois hypothèses :

- le RG-II s'est dégradé
- il n'est plus sous forme dimère mais monomère
- il a changé de conformation et son volume hydrodynamique a diminué.

Le pic des oligosaccharides disparaît dans les solutions de GRO mais il n'a pas évolué dans ATGRO (Figure 68, IV).

Ce suivi sommaire de l'évolution des polysaccharides engendre des questions sur leur comportement vis-à-vis des tanins, des anthocyanes et de la synergie des sucres entre eux. Plusieurs observations peuvent être faites : les sucres évoluent en présence de tanins, les AGP (surtout les plus gros) précipitent mais pas les oligosaccharides ; le RG-II évolue dans toutes les solutions mais la perte est plus importante dans les solutions contenant les tanins ce qui laisse supposer qu'il est lui aussi co-précipité avec les tanins (Riou *et al.*, 2002). Des analyses plus approfondies devront être mises en place, notamment un suivi de l'évolution des sucres. Plus particulièrement, il faudrait réaliser des analyses de composition pour savoir exactement comment ont évolué les fractions de sucres en fonction de la présence de tanins et/ou d'anthocyanes ainsi que pour suivre les modifications du RG-II.

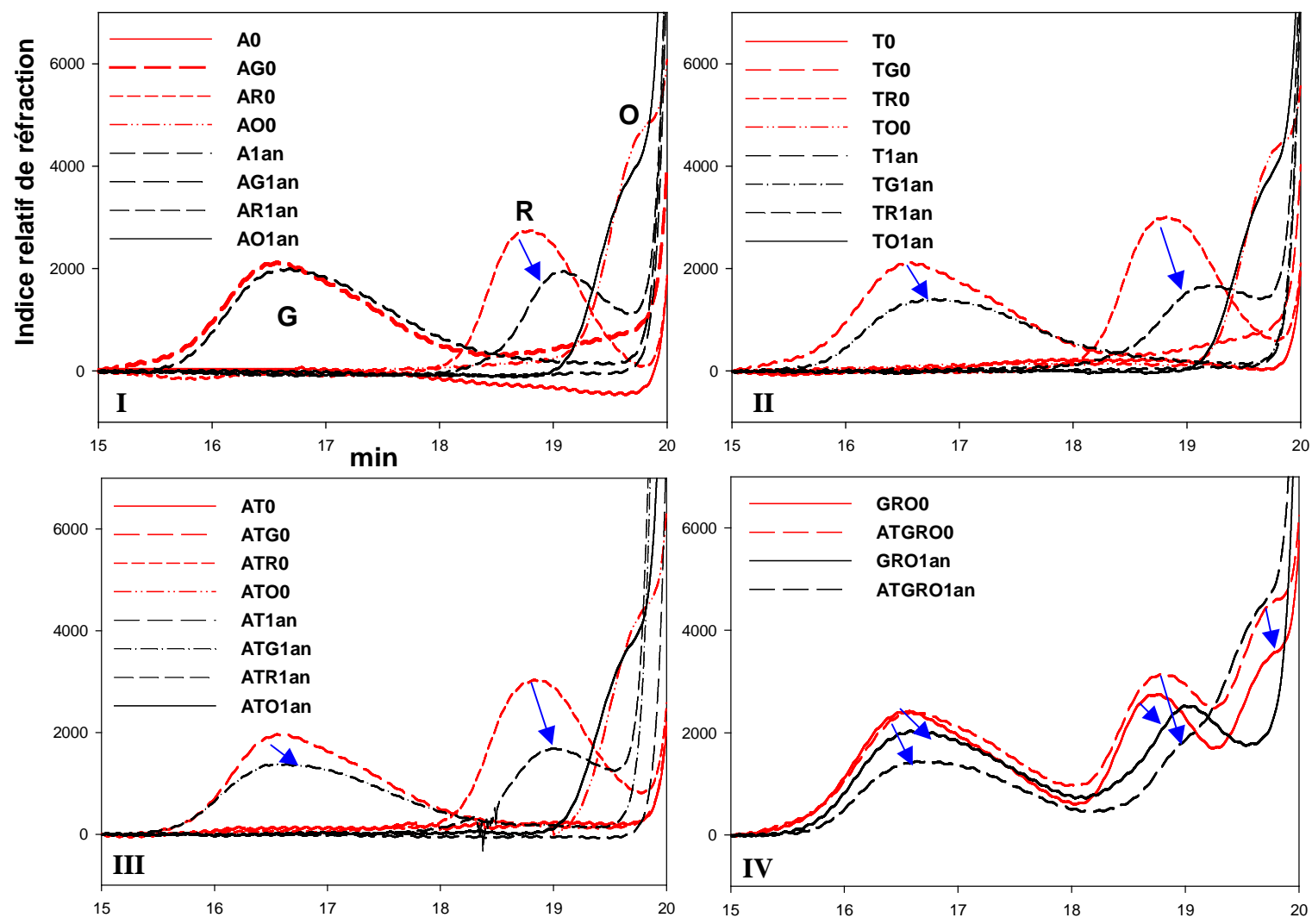


Figure 68. Evolution des profils moléculaires des solutions modèles (en rouge t=0, en noir t=1an) : (I) solutions contenant la fraction d'anthocyanes A, (II) solutions contenant la fraction de tanins T, (III) solutions contenant A et T, (IV) solutions contenant les trois sucres AGP (G), RG-II (R), oligosaccharides (O).

III. ETUDE DE LA COULEUR

Après un an d'incubation, un important précipité s'est formé dans toutes les solutions contenant les tanins (Figure 69). Les précipités des solutions contenant les tanins sont de couleur orange-brun (Figure 69.I) alors que les précipités de celles contenant à la fois les tanins et les anthocyanes sont rouges (Figure 69.II). Les analyses de couleur ont été réalisées de 0 à 45 jours. Aucun solvant n'ayant été trouvé pour dissoudre les précipités formés à 1 an, seule la couleur des surnageants a été analysée à 1 an.

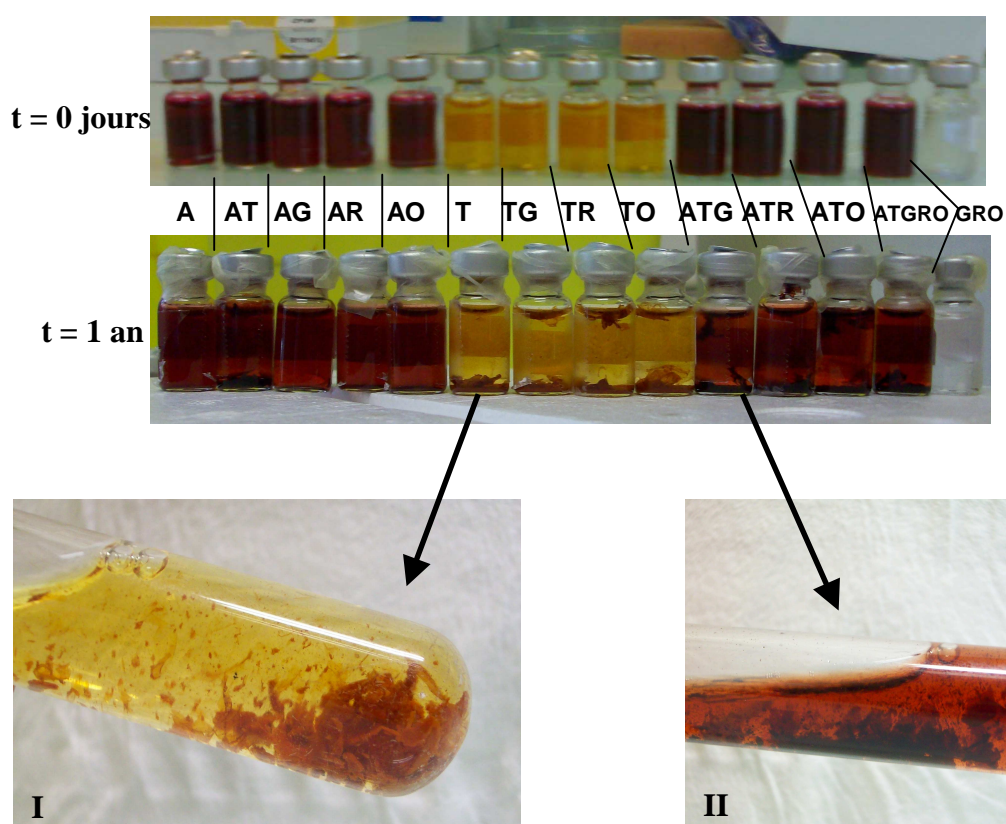


Figure 69. Photographies des solutions à t = 0 jours et t = 1 an : formation d'un précipité dans les solutions contenant T (I) et dans les solutions contenant A et T (II) après 1 an.

Pour analyser la couleur et son évolution dans les solutions modèles, nous avons utilisé trois approches complémentaires :

- le suivi des principaux indices de couleur
- l'analyse en composantes principales des spectres d'absorbance des solutions
- la représentation dans l'espace CIELAB des différents mélanges.

A. CINÉTIQUE DES PRINCIPAUX INDICES DE COULEUR

Le suivi de 0 à 45 jours de l'intensité colorante (IC) et de l'indice des polyphénols totaux (IPT) de toutes les solutions est représenté sur la Figure 70 (A et B). La présence de polysaccharides n'a pas d'influence significative sur la couleur et son évolution. L'indice des polyphénols totaux reste stable durant les 45 premiers jours d'incubation. L'IC des solutions contenant A et AT diminue au cours des 30 premiers jours puis se stabilise. Les solutions contenant A perdent en moyenne 35% ($\pm 2\%$) d'intensité colorante en 45 jours, tandis que celles contenant AT ne perdent que 17% ($\pm 4\%$), montrant que les tanins contribuent à la stabilisation de la couleur. De plus, on observe que l'intensité colorante des solutions contenant les tanins augmente de 10% ($\pm 4\%$) en 45 jours. Les pigments rouges résistants à la décoloration par le bisulfite (Figure 70C) dans les solutions contenant A et AT augmentent au cours du temps : de 0 à 0,4 pour celles contenant A et de 0,2 à 1,7 pour celles contenant AT. Ce phénomène reflète la conversion des anthocyanes en pigments résistants à la décoloration par les sulfites, bien connue en œnologie. Il est également observé dans les solutions contenant uniquement A, ce qui indique que les anthocyanes natives réagissent non seulement avec les tanins mais aussi entre elles pour former des pigments non décolorables par le SO_2 . A pH acide < 1 , toutes les anthocyanes natives et dérivées se trouvent sous forme flavylium. L'indice des pigments à pH <1 (Figure 70D) est équivalent dans toutes les solutions contenant A et AT et diminue fortement au cours du temps. Ceci indique que toutes les solutions subissent la même perte de pigments détectés à pH 1 mais que les produits formés dans les solutions AT se trouvent sous une plus forte proportion de formes colorées à pH 3,4 que ceux formés dans les solutions A. Ce phénomène peut être expliqué soit par une nature différente (et des pK d'hydratation différents) de ces pigments, soit par un phénomène de copigmentation renforçant la couleur des pigments anthocyaniques dans les solutions contenant les tanins (Brouillard *et al.*, 1989, Boulton, 2001). Ce phénomène de copigmentation est clairement démontré par l'examen des valeurs de IC mesurées dans les solutions de A, de T et de AT à t_0 . En effet, la comparaison de la somme de l'IC de A et de T avec l'IC de AT (Tableau 34) montre un excédent de 1,76 d'IC pour la solution contenant le mélange. Cette augmentation de l'IC due à de la copigmentation est principalement liée à une augmentation de l'absorbance à 520 nm.

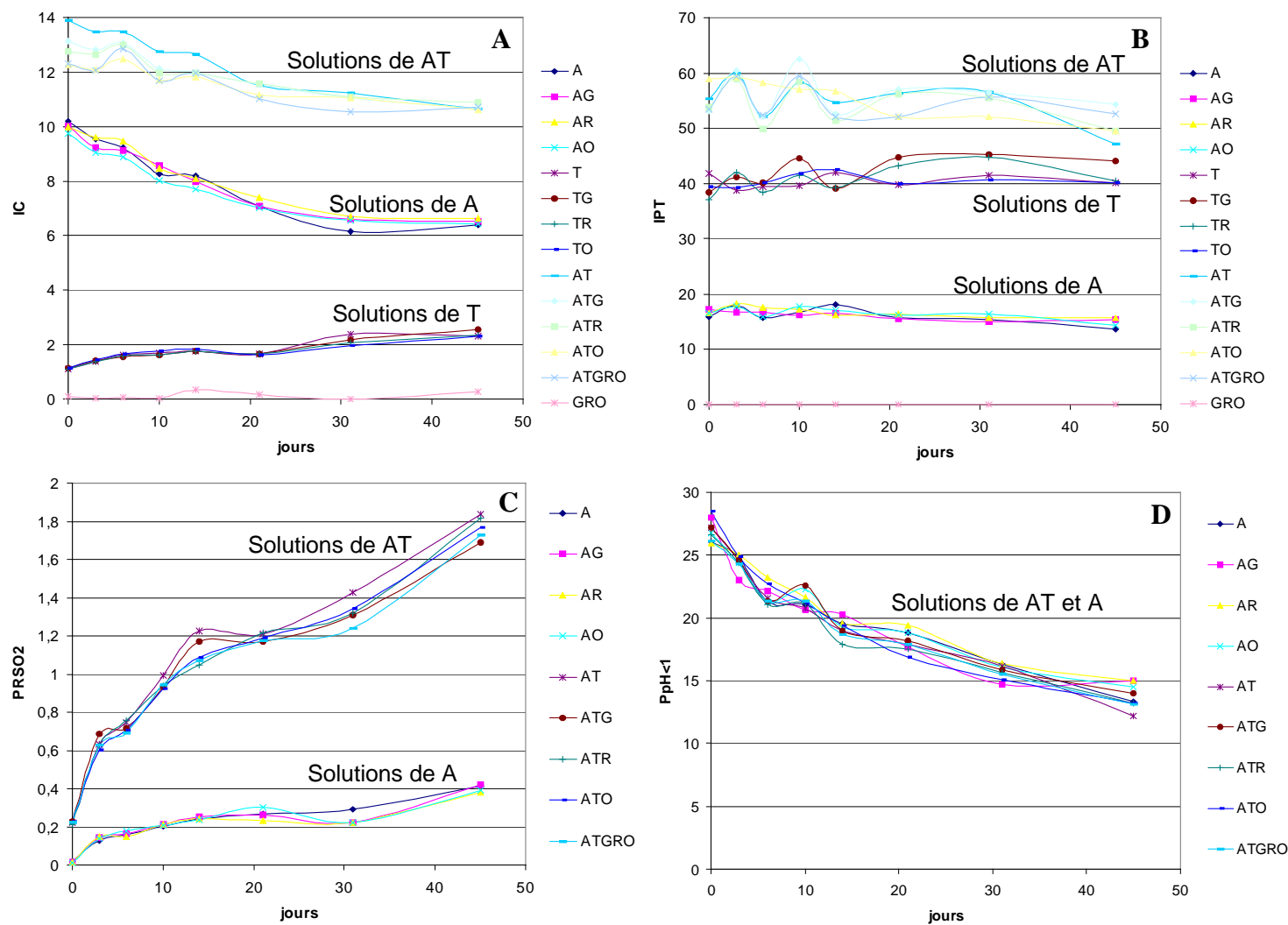


Figure 70. Evolution des principaux indices de couleur des solutions modèles de t=0 à t= 45 jours : (A) intensité colorante, (B) indice des polyphénols totaux, (C) pigments résistants à la décoloration au bisulfite, (D) pigments à pH acide <1.

Tableau 34. Evaluation de la copigmentation dans les solutions contenant AT.

jours	t=0
IC dans les solutions de A	9,99 ± 0,18
IC dans les solutions de T	1,13 ± 0,02
IC dans les solutions de AT	12,88 ± 0,67
somme des IC des solutions de A et de T	11,12 ± 0,18
IC due à la copigmentation dans les solutions de AT	1,76 ± 0,25
Abs 520nm due à la copigmentation dans les solution de AT	1,19 ± 0,37

Pour évaluer qualitativement l'évolution de l'intensité colorante, la part des absorbances (420, 520, 620 nm) contribuant à l'IC a été calculée à 0 et 45 jours (Tableau 35). En 45 jours, la contribution de l'absorbance à 420 nm à l'IC augmente de 9,9% dans les solutions de A, de 9,2% dans les solutions de AT et diminue de 3,6% dans les solutions de tanins. La contribution de l'absorbance à 520 nm diminue de 11,5% dans les solutions de A, de 13,2% dans les solutions de AT et de 1,4% dans les solutions de tanins. La contribution de l'absorbance à 620 nm augmente de 1,5% dans les solutions de A, de 4,1% dans les solutions de AT et de 5% dans les solutions de tanins. A 45 jours, les solutions contenant A et AT deviennent donc plus brun-jaune, ceci pouvant être expliqué par la formation de produits de dégradation des anthocyanes et des tanins. L'augmentation de la part de l'absorbance à 620 nm dans les solutions contenant T et AT peut être expliquée par des phénomènes de diffusion à cette longueur d'onde dus à l'agrégation des tanins.

Tableau 35. Contribution des composantes de l'intensité colorante (420, 520, 620 nm) à 0 et 45 jours.

	%420 nm	%520 nm	%620 nm
solutions de A à 0 jours	23,3 ± 0,2	71,7 ± 0,3	5,1 ± 0,1
solutions de A à 45 jours	33,2 ± 0,3	60,2 ± 0,3	6,6 ± 0,1
solutions de AT à 0 jours	27,0 ± 0,4	67,6 ± 0,5	5,4 ± 0,1
solutions de AT à 45 jours	36,2 ± 0,4	54,4 ± 0,7	9,5 ± 0,3
solutions de T à 0 jours	67,2 ± 0,6	32,2 ± 0,7	0,6 ± 0,2
solutions de T à 45 jours	63,6 ± 0,9	30,8 ± 0,7	5,6 ± 0,7

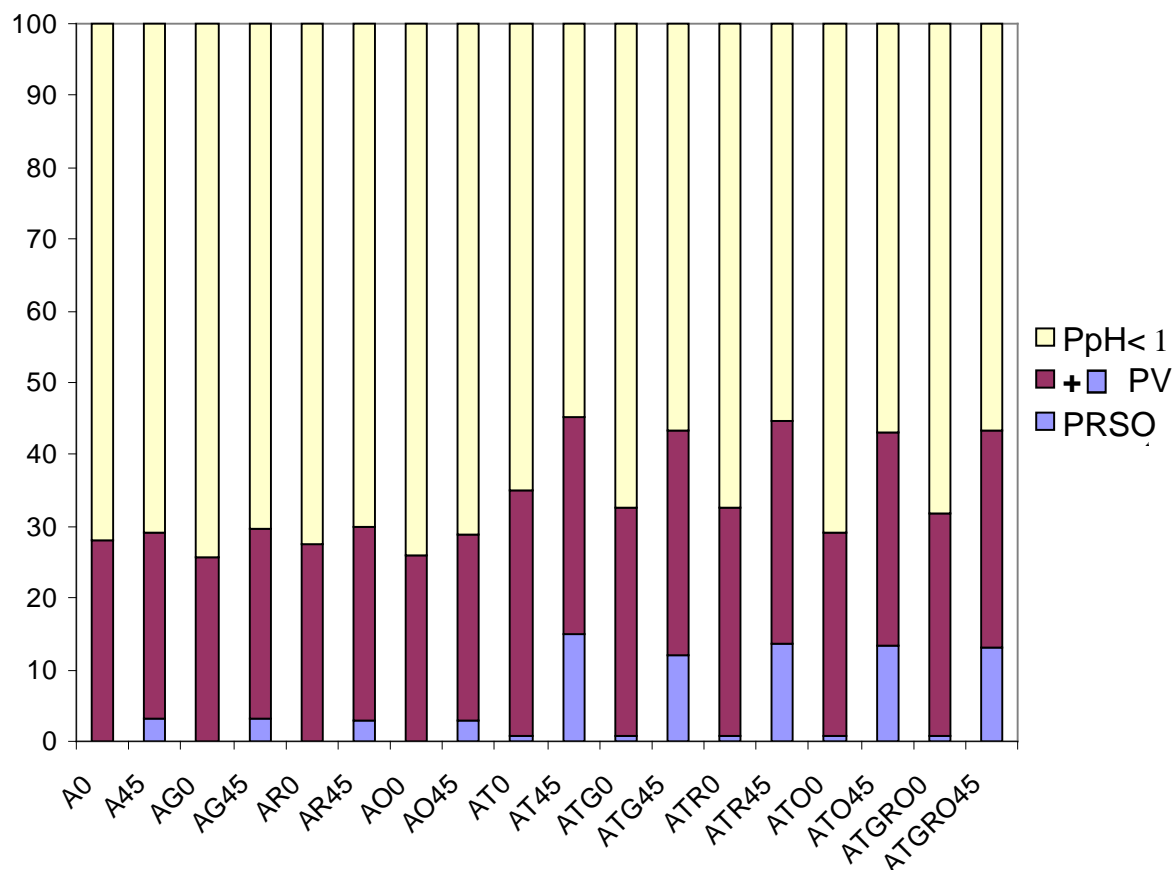


Figure 71. Evolution de la part des pigments rouges des solutions à t=0 et t=45 jours : PpH<1: pigments rouges à pH acide, PV : pigments rouges au pH du vin, PRSO₂ : pigments rouges résistants à la décoloration au bisulfite.

L'indice des pigments à pH acide (PpH<1, Figure 71) représente la totalité des pigments. Il a été ramené à 100 pour estimer le pourcentage des pigments rouges au pH des solutions (PV) et celui des pigments résistants à la décoloration (PRSO₂) à t = 0 et 45 jours. Sur la Figure 71, la part des pigments rouges au pH des solutions contenant A et AT à t = 0 jours est différente de celle à t = 45 jours. En effet, à t = 0, les pigments rouges au pH du vin (PV) contribuent à 27% en moyenne ($\pm 1\%$) de la totalité des pigments dans les solutions contenant A et à 32% ($\pm 2\%$) dans les solutions contenant A et T. Cette plus forte proportion d'anthocyanes sous forme rouge dans les solutions AT, alors qu'il s'agit des mêmes molécules dans les deux solutions, confirme l'existence d'un phénomène de copigmentation avec les tanins. A t = 45 jours, la part des PV passe à 29% ($\pm 1\%$) dans les solutions de A et à 44% ($\pm 1\%$) dans les solutions de AT. Ce phénomène est dû essentiellement à l'augmentation de pigments résistants à la décoloration au bisulfite (PRSO₂) :

- de 0% à t = 0 jours à 3% de PRSO₂ à t = 45 jours pour les solutions de A
- de 1% à t = 0 jours à 14% de PRSO₂ à t = 45 jours pour les solutions de AT.

Ceci démontre qu'au bout de 45 jours, une part plus importante de la couleur rouge des solutions contenant A et T est due à la formation de pigments dérivés par réactions entre anthocyanes et tanins. Dans la mesure où les pigments résistants à la décoloration par les sulfites ne sont pas majoritairement impliqués dans les phénomènes de copigmentation, ce phénomène peut être considéré comme mineur à ce stade.

L'analyse à 1 an des principaux indices de couleur des solutions contenant A et des surnageants des solutions contenant des tanins est donnée dans le Tableau 36. L'IC, l'IPT, les PpH<1, et les PV ont fortement chuté au bout d'un an. L'IC est plus basse dans les solutions contenant à la fois A et T (~2,8) que dans celles contenant A (~3,5). La chute des indices dans les solutions d'anthocyanes est due à leur dégradation alors que, pour les solutions contenant A et T, elle est due à la fois à la dégradation des anthocyanes et des tanins mais aussi à la précipitation de la matière colorante. Les pigments résistants à la décoloration ont augmenté par rapport à t = 45 jours dans les solutions de A et chuté dans les solutions de AT, ce qui suggère que les pigments résistants aux sulfites formés par réaction des anthocyanes avec les tanins précipitent plus facilement que d'autres pigments (anthocyanes libres ou pigments dérivés non résistants) tandis que les pigments résistants formés à partir des anthocyanes seules restent solubles.

Tableau 36. Principaux indices de couleur des solutions à t = 1an.

	IC	IPT	PRSO ₂	PpH<1	PV
A1an	3,50	10,44	0,84	2,52	1,53
AG1an	3,58	9,90	0,82	2,45	1,55
AR1an	3,43	10,38	0,80	2,56	1,49
AO1an	3,46	10,49	0,80	2,36	1,45
T1an	0,63	8,66	-	0,46	0,18
TG1an	0,68	9,89	-	0,48	0,19
TR1an	0,65	9,24	-	0,75	0,18
TO1an	0,69	10,60	-	0,55	0,20
AT1an	2,96	22,21	0,90	2,37	1,31
ATG1an	2,63	20,21	0,82	2,06	1,13
ATR1an	2,80	20,50	0,84	2,13	1,22
ATO1an	2,69	19,84	0,80	2,10	1,15
ATGRO1an	2,96	21,93	0,89	2,34	1,29

B. EVOLUTION DES SPECTRES D'ABSORPTION

Pour analyser l'ensemble des spectres UV-visible des solutions à $t = 0$ et 45 jours, une analyse en composantes principales a été réalisée (Figure 72) sur les spectres d'absorption des solutions mesurés directement. L'axe 1 (CP1) représente 95,53% de la variabilité des spectres. Il sépare principalement les solutions contenant T, A et AT. La projection des spectres sur CP1 est caractéristique d'un spectre de pigments anthocyaniques avec des λ_{\max} à 526 nm (CP1, Figure 72). Les spectres des solutions de AT sont les plus forts en absorbance, suivis par ceux des solutions de A puis de T. L'axe 2 représente 3,83% de la variabilité des spectres. Il sépare les solutions à $t = 0$ jours de celles à $t = 45$ jours, principalement celles contenant T et AT et, dans une moindre mesure, celles contenant A. L'évolution entre 0 et 45 jours se traduit en particulier par une perte d'absorbance entre 484 et 558 nm et une augmentation d'absorbance entre 350 et 484 nm. Au vue de ces observations, l'intensité colorante ne paraît pas forcément un bon indice pour évaluer la couleur des solutions évoluées puisqu'elle englobe les trois absorbances 420, 520 et 620 nm et qu'on perd ainsi la notion qualitative sur la couleur qui évolue. Ceci indique une perte des composés de couleur rouge et une augmentation de composés de couleur orangé-brun. L'augmentation de la bande d'absorbance entre 558 et 700 nm peut être expliquée par deux phénomènes : la formation de composés de couleur violet-bleu ou le fait que les solutions diffusent à cause de la présence de particules en suspension.

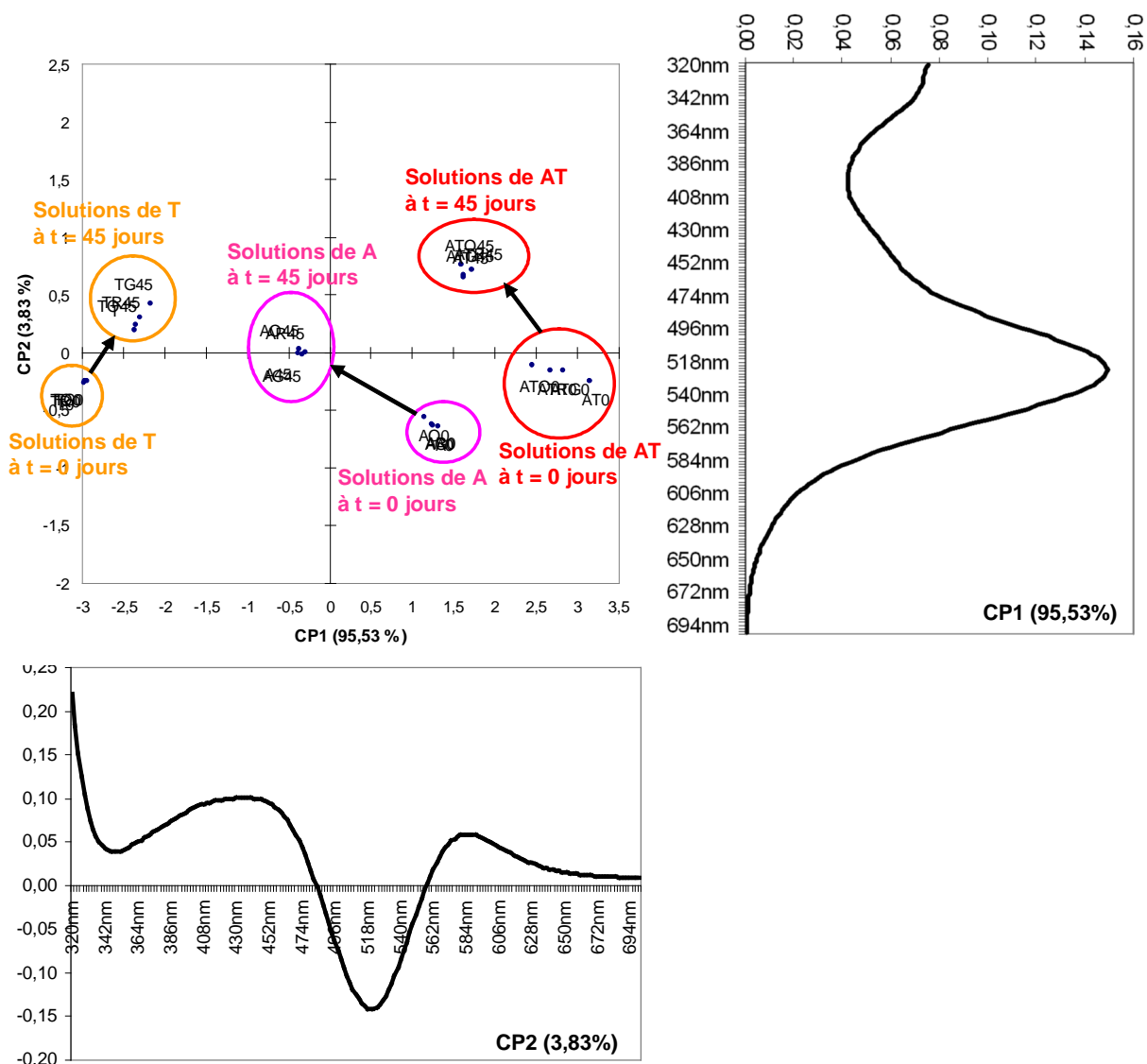


Figure 72. Analyse par composante principales des spectres UV-visible des solutions : CP1, composante principale 1 (95,53%), CP2 composante principale 2 (3,83%).

C. EVOLUTION DE LA COULEUR DANS L'ESPACE CIELAB

Les composantes L^* , a^* , b^* de chaque solution ont été calculées (Tableau 37) à partir des spectres d'absorbance et chaque solution à $t = 0$, 45 jours et 1 an a été représentée dans le plan a^*b^* de l'espace CIELAB (Figure 73). Cette technique reflète au plus près la perception de l'œil humain (Hernandez, *et al.* 2009) et est couramment utilisée pour analyser l'évolution de la couleur des vins et de solutions modèles (Gil-Munoz *et al.* 1997; Gomez-Miguez, *et al.* 2007; Jordao *et al.* 2006; Main & Morris, 2007). La composante L^* varie de 0 à 100, du noir

au blanc, la composante a* de -60 à 60, du vert au rouge et la composante b* de -60 à 60, du bleu au jaune.

Tableau 37. Composante L*, a*, b* des solutions à 0, 45 jours et 1an.

solutions	L*	a*	b*
A0	71,2	48,7	-5,1
A45	80,8	26,8	2,0
A1an	90,2	8,1	7,1
AG0	71,5	48,2	-5,2
AG45	80,5	27,2	2,0
AG1an	90,0	8,2	7,1
AR0	71,6	48,0	-5,1
AR45	80,3	27,2	2,2
AR1an	90,4	7,8	7,1
AO0	72,1	46,7	-5,2
AO45	80,9	26,3	2,3
AO1an	90,7	7,0	8,0
T0	98,2	-0,7	7,9
T45	96,1	-1,1	13,7
T1an	99,1	-0,7	4,3
TG0	98,0	-0,4	7,9
TG45	95,8	-1,5	14,8
TG1an	99,0	-0,8	4,7
TR0	98,2	-0,7	8,0
TR45	96,3	-1,5	14,3
TR1an	99,1	-0,8	4,4
TO0	98,2	-0,7	8,1
TO45	96,1	-1,3	13,3
TO1an	99,0	-0,8	4,8
AT0	63,8	57,7	0,1
AT45	70,1	36,5	7,7
AT1an	92,4	5,5	9,0
ATG0	65,2	55,3	-0,3
ATG45	70,2	36,2	7,5
ATG1an	93,4	4,4	8,7
ATR0	65,9	54,5	-0,4
ATR45	69,8	36,4	8,0
ATR1an	93,0	4,9	8,9
ATO0	66,7	52,8	-0,8
ATO45	70,4	34,6	8,1
ATO1an	93,3	4,4	8,9
ATGRO0	66,7	52,7	-0,6
ATGRO45	70,3	34,8	8,7
ATGRO1an	92,6	5,1	9,3
GRO0	99,7	0,0	0,0
GRO45	99,3	0,0	0,5
GRO1an	100,0	-0,1	0,0

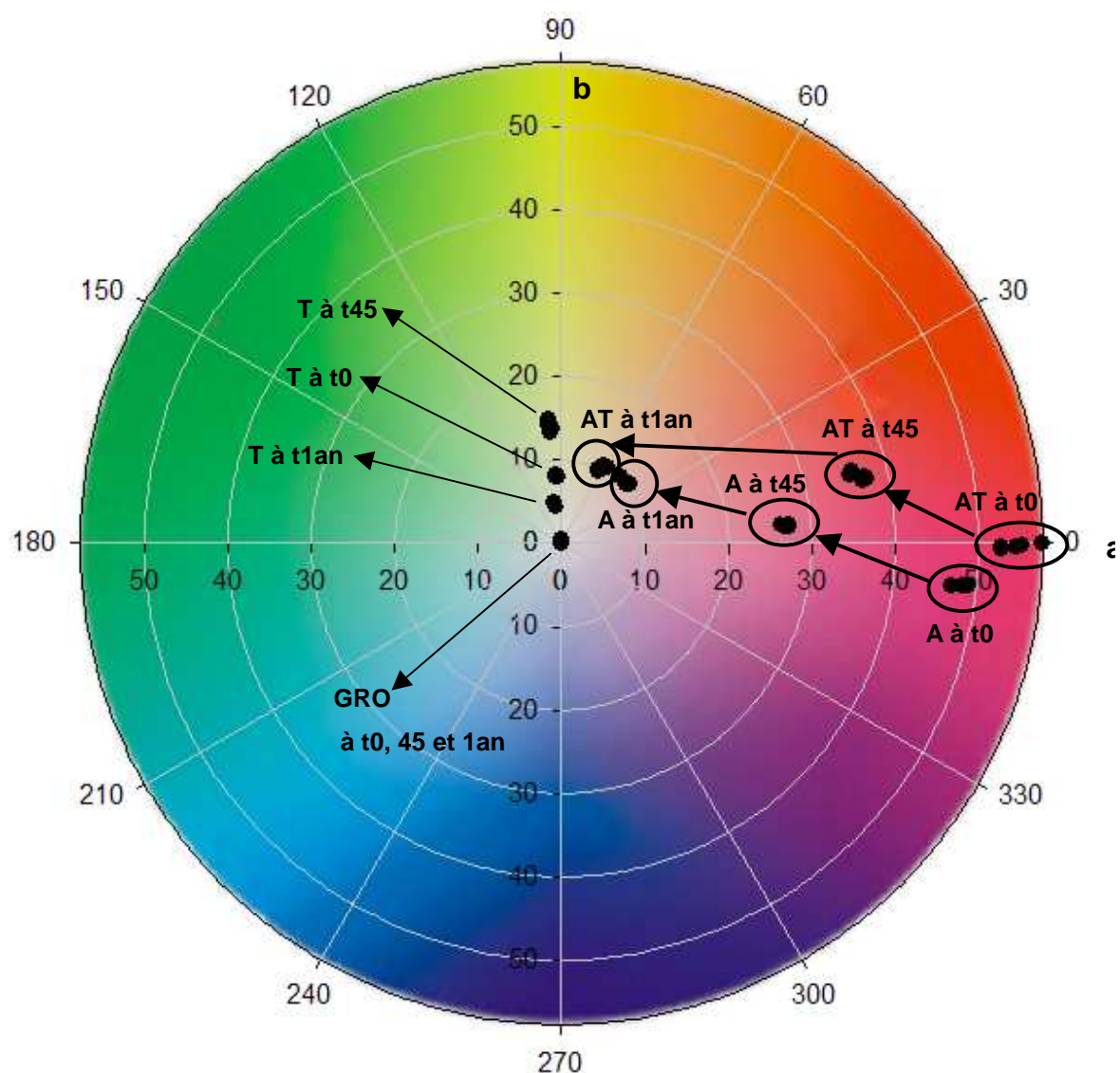


Figure 73. Représentation de l'évolution des solutions dans le plan a^*b^* de l'espace CIELAB : a en abscisse, b en ordonnée.

A $t = 0$ et 45 jours, la composante a^* est plus élevée dans les solutions contenant AT que dans celles contenant A. Ceci indique que la présence de tanins entraîne d'une part une augmentation de la couleur rouge due à de la copigmentation (surtout à t_0), d'autre part la formation d'autres types de pigments par réaction des tanins avec les anthocyanes (à 45 jours), comme cela a été expliqué plus haut. Au bout d'un an, les solutions de A ont une composante a^* supérieure à celle des solutions de AT. Globalement, cette composante diminue au cours du temps dans les solutions contenant A et AT, ce qui correspond à une chute de couleur rouge. La composante b^* dans les solutions de AT est plus élevée que dans les solutions de A. La présence de tanins oxydés conduit à l'augmentation de la couleur jaune. Concrètement, les solutions contenant AT sont plus rouges et plus jaunes que celles contenant

A. Ces différences se maintiennent de 0 à 45 jours puis, après un an, la perte est plus grande dans les solutions de AT du fait de la précipitation. Les solutions de T sont principalement définies par la composante b^* . De 0 à 45 jours, cette composante augmente, les solutions sont plus jaunes à cause de l'accumulation de tanins oxydés. Au bout d'un an, elle diminue fortement, phénomène probablement expliqué par la précipitation des tanins. La solution contenant les trois sucres (GRO) est au centre de l'espace CIELAB, démontrant qu'elles restent incolores au cours du temps.

A $t = 0$ et 45 jours, la clarté (L^* , Tableau 37) des solutions contenant A est supérieure à celle des solutions de AT. La présence de tanins conduit à une diminution de la clarté par rapport aux solutions contenant les anthocyanes seules. Pourtant, les solutions contenant uniquement T ont une clarté très élevée démontrant que c'est le mélange de tanins et d'anthocyanes qui diminue la clarté. Une étude a montré que le phénomène de copigmentation diminuait la clarté et augmentait a^* et b^* (Gonzalez-Manzano *et al.*, 2009). De 0 à 45 jours, la clarté des solutions de T diminue puis elle augmente à 1 an à cause de la précipitation.

IV. ETUDE DE LA STABILITE COLLOIDALE : CINETIQUE D'AGREGATION

L'intensité diffusée par les solutions a été suivie par diffusion dynamique de la lumière (DDL) (cf. p 89) à $t = 0, 3, 6, 10, 14, 21, 31$ et 45 jours. Cette technique permet d'étudier la stabilité des solutions. Une augmentation de l'intensité diffusée par les solutions à t_0 indique un changement des équilibres colloïdaux, une agrégation. Dans ce suivi, la taille de ces agrégats dans les solutions n'a pas pu être calculée du fait de leur forte polydispersité. La Figure 74 montre la cinétique d'agrégation des solutions. L'intensité diffusée par la solution contenant les trois sucres (GRO, Figure 74.I) reste constante ; il n'y a pas d'agrégation au cours des 45 jours. L'intensité diffusée par les solutions d'anthocyanes augmente progressivement. L'agrégation n'est pas modifiée par la présence des oligosaccharides (AO) ou du RGII (AR) mais elle est plus rapide et plus importante dans la solution contenant l'AGP3 (AG). Les solutions contenant les tanins (AT et T, Figure 74.II et III) présentent une diffusion plus élevée à t_0 que les solutions ne contenant pas de tanins, ce qui n'est pas attribuable à la présence d'agrégats car les tanins en eux même diffusent. Cette intensité reste constante ou diminue légèrement pendant les 21 premiers jours sauf dans la solution contenant l'AGP3 (TG) où elle augmente fortement puis diminue. Cette cinétique particulière

s'explique par une forte agrégation des tanins avec l'AGP3. Cette agrégation entraîne une précipitation (observée dès 31 jours), qui se traduit par une diminution de l'intensité diffusée ensuite. Une augmentation de l'intensité diffusée des tanins est également observée dans la solution de tanins seuls, où elle se produit nettement plus tard, entre 21 et 45 jours. En présence des deux autres fractions de sucre (GO et GR), l'agrégation est retardée. Aucune précipitation n'a été observée au cours de la période d'analyse excepté pour la solution TG. Les mêmes phénomènes sont observés dans les solutions AT mais l'agrégation y semble plus rapide que dans les solutions ne contenant pas d'anthocyanes. Les cinétiques d'agrégation dans les solutions AT ne sont que très peu modifiées par la présence des fractions O et R. La présence de l'AGP3 dans les solutions ATG et ATGRO entraîne également une augmentation de l'intensité diffusée dès les premiers jours par rapport aux autres solutions de AT mais ne conduisant pas à la formation de précipités, décelables à l'oeil. Par conséquent, l'AGP3 semble jouer un rôle sur la stabilité des solutions contenant les anthocyanes, les tanins ou les deux en mélange. (Riou *et al.*, 2002) a déjà montré l'influence des AGP et du RG-II sur l'agrégation des tanins :

- l'AGP0 et le RG-II sous forme monomère n'augmentent pas la taille des agrégats des tanins
- l'AGP4 en diminue la taille
- le RG-II sous forme dimère l'augmente.

Les différents types d'AGP n'ont donc pas le même comportement vis-à-vis de l'agrégation des tanins. Ces AGP se différencient structurellement par leur acidité, leur taille et la proportion du résidu protéique. Ce dernier paramètre pourrait être un facteur important compte tenu de l'affinité des tanins pour les protéines, notamment riches en hydroxyproline. Dans les conditions de notre étude, nous n'avons pas observé une augmentation de la taille des agrégats en présence du RG-II ou d'oligosaccharides, n'ayant pas pu la mesurer.

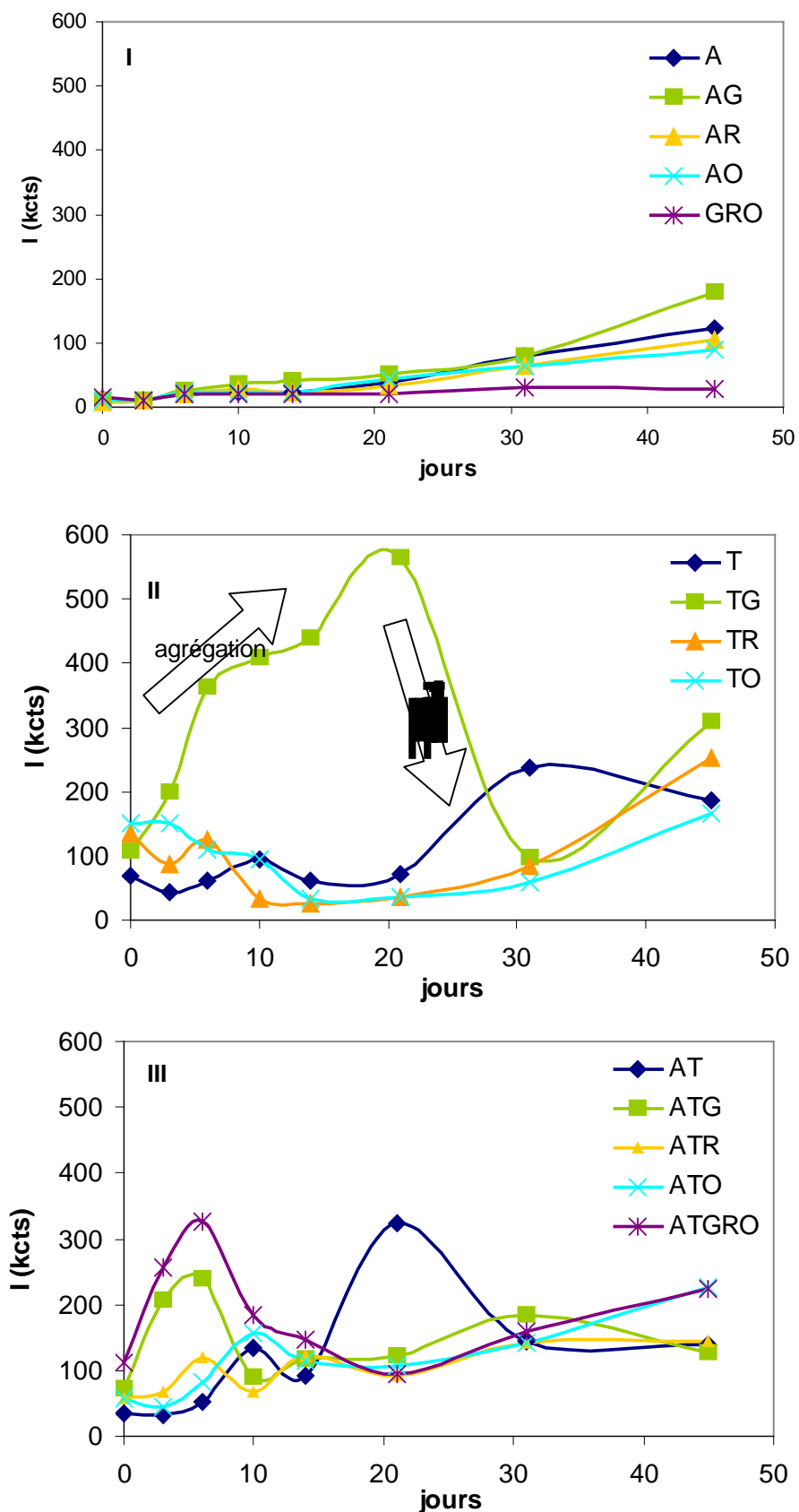


Figure 74. Suivi par diffusion dynamique de lumière de la cinétique d’agrégation des solutions : (I) solutions contenant les anthocyanes A et solutions contenant les trois sucres (GRO), (II) solutions contenant les tanins T, (III) solutions contenant A et T.

V. ETUDE DES POLYPHENOLS

A. SUIVI DE LA DISPARITION DE LA MALVIDINE-3-O-GLUCOSIDE

La composition phénolique des solutions a été analysée par HPLC-DAD de $t = 0$ jours à $t = 45$ jours. Les cinétiques de disparition de la malvidine-3-O-glucoside dans les solutions de A et AT sont présentées dans la Figure 75. I). L'acide syringique, produit caractéristique de la dégradation de la malvidine-3-O-glucoside (Hrazdina *et al.*, 1974; Lopes *et al.* 2007) formé par la rupture de l'hétérocycle, a également été dosé (Figure 75. II). A $t = 45$ jours, 57% de la malvidine-3-O-glucoside initiale a disparu dont 16 % a été dégradée en acide syringique alors que dans la solution de AT la concentration initiale d'anthocyane a chuté de 75% dont 12,5 % a été convertie en acide syringique. Par conséquent, la présence de tanins semble accélérer la cinétique de disparition de l'anthocyane, non pas dans la voie de dégradation vers la formation d'acide syringique mais dans des voies de réactions concurrentes, vraisemblablement associant les tanins. Ces résultats avaient été déjà observés dans les travaux de Salas (Salas *et al.*, 2003).

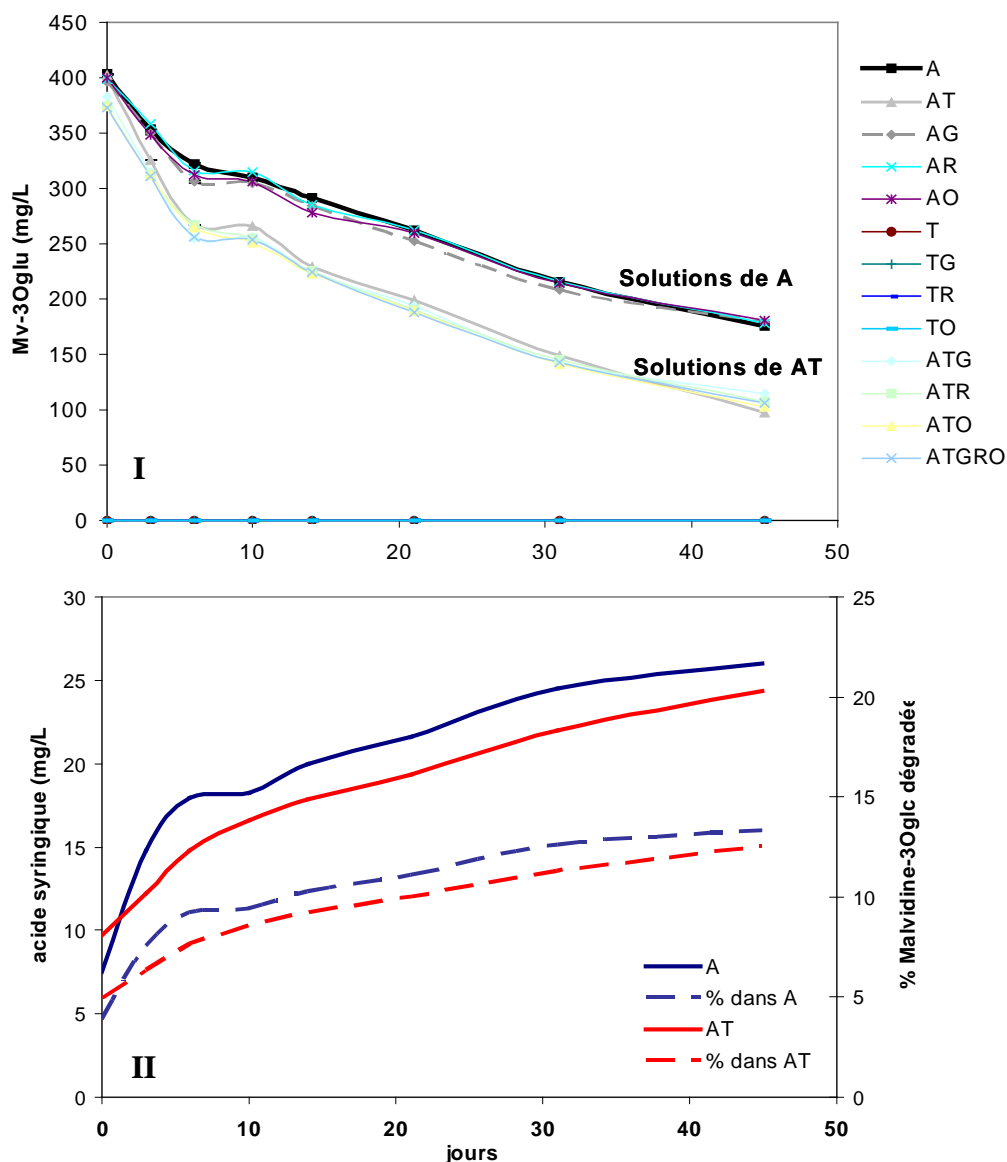


Figure 75. Suivi de la disparition de la malvidine-3-O-glucoside (I) et de la formation de l'acide syringique (II).

B. IDENTIFICATION DES PRODUITS FORMES

La Figure 76 montre les profils à 280 nm de la solution T à 0 et 45 jours. Après 45 jours, la concentration de l'acide gallique, provenant de l'hydrolyse des esters galliques a augmenté ainsi que celle de l'acide protocatéchique, caractéristique de la dégradation des tanins par l'ouverture de l'hétérocycle central. A t=0 jours, le pic 1 représente 83,4 % de l'absorbance totale à 280 nm et le pic 2, représente 16,6%. Après 45 jours, le pic 1 passe à 71,4 % de l'absorbance totale à 280 nm et le pic 2, à 27,6%, indiquant une évolution des tanins vers des structures plus polymérisées ou moins polaires. Après 45 jours, ces pics absorbent légèrement

dans le visible ($\lambda_{\max} = 450$ nm). A t_0 , le rapport des absorbances entre 450 nm et 280 nm est 1,8 fois plus élevé dans le pic 2 que dans le pic 1. A 45 jours, ce rapport augmente de 25,9% dans le pic 1 et de 22,5% dans le pic 2. Cette longueur d'onde est caractéristique de produits d'oxydation des tanins et notamment de pigments de type xanthylum, dont les formes connues n'ont pas été détectées dans ces solutions avant ou après dépolymérisation. On observe simultanément une accumulation de monomères et de dimères résultant du clivage des liaisons interflavoniques des tanins (Haslam, 1980; Vidal *et al.*, 2002). Ce phénomène concerne tout particulièrement un composé donnant un signal à m/z 731, qui correspond à une procyanidine dimère galloylée (Figure 80). Les autres s'accumulent aussi mais celui-ci semble particulièrement abondant.

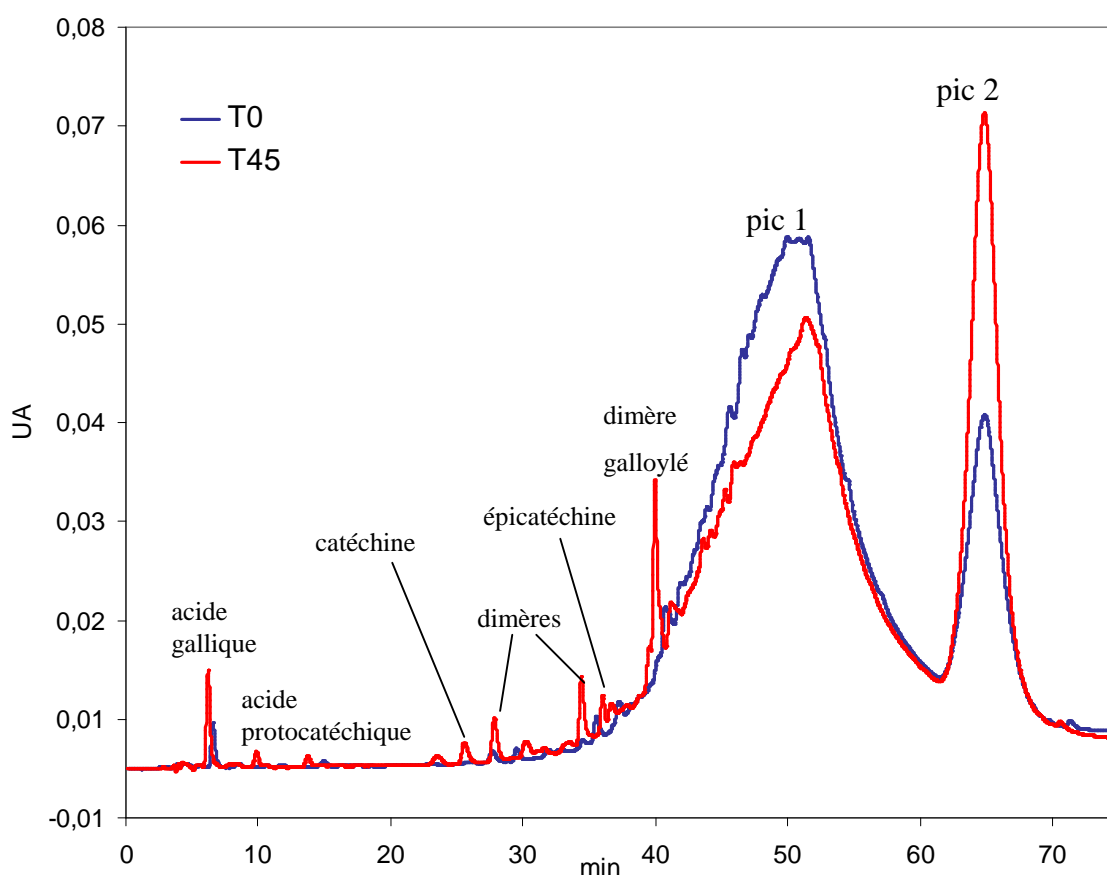


Figure 76. Profil chromatographique à 280 nm de la solution de T à 0 et 45 jours.

Les profils chromatographiques à 280 nm et à 520 nm de la solution A à 0 jours et 45 jours sont présentés sur la Figure 76. Les produits qui apparaissent sont caractéristiques de la dégradation de la malvidine-3-O-glucoside ainsi que des autres anthocyanes présentes dans la fraction initiale (comme l'acide vanillique issu de la dégradation de la péonidine-3-O-

glucoside). Après 45 jours, deux pics (1 et 2) non résolus apparaissent sur le profil à 280 nm, ils absorbent aussi à 520 et contiennent donc des pigments dérivés.

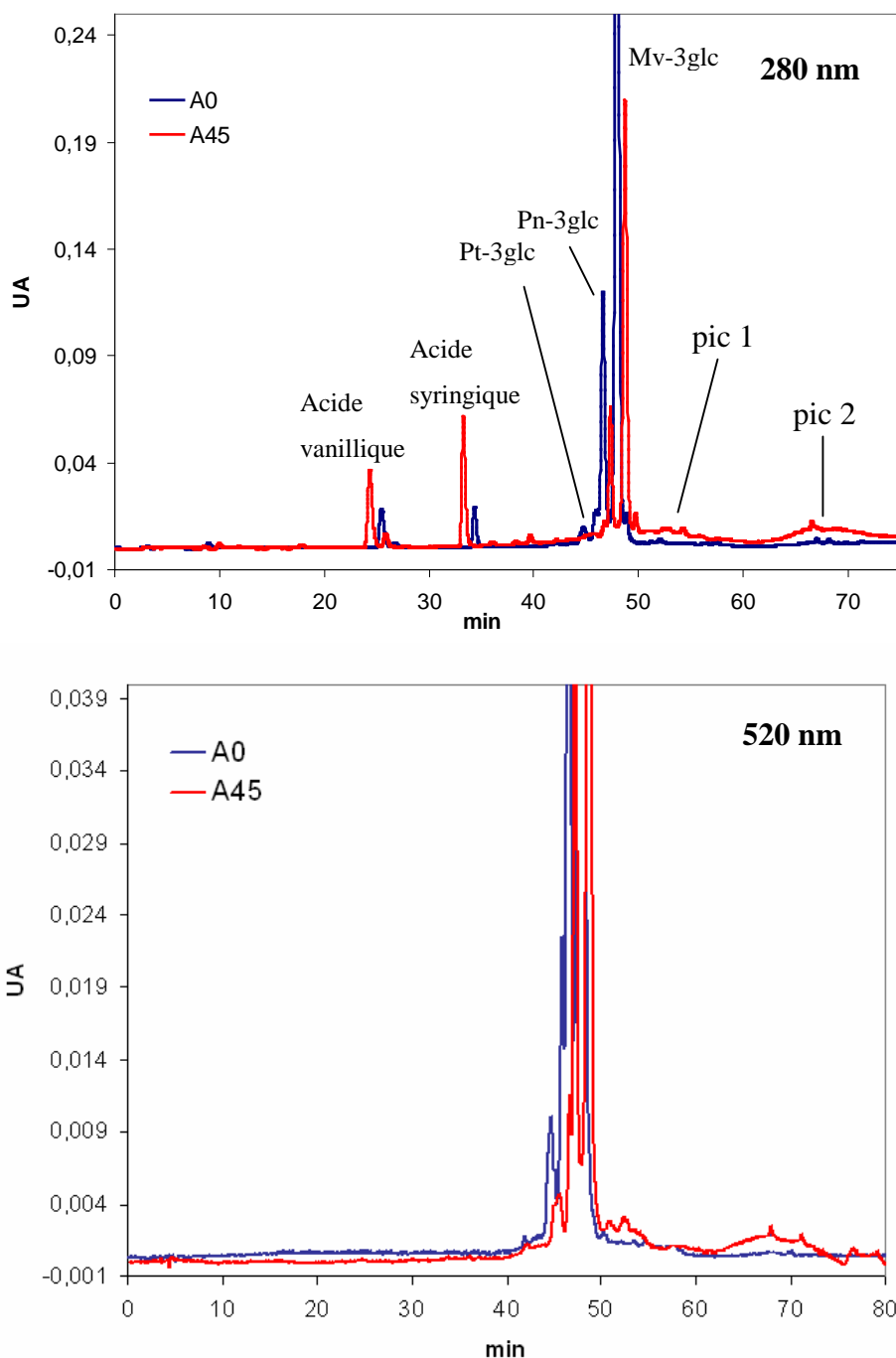


Figure 76. Profils chromatographiques à 280 et 520 nm de la solution de A à 0 et 45 jours.

L'extraction d'ions de certains dérivés d'anthocyanes ($m/z = 1047, 1001, 839, 809$) montre la présence de dimères d'anthocyanes déjà détectés dans de précédentes études (Atanasova, 2003; Salas, 2005)(Figure 77). Ces composés colorés (excepté le composé détecté à $m/z 1047$ dont les deux unités malvidine sont sous forme hydratée incolore)

apparaissent dans premier pic. Ils sont marqueurs de la polymérisation des anthocyanes par un mécanisme de substitution aromatique électrophile (SAE) sur les formes hydratées des anthocyanes. Dans ce mécanisme, l'électrophile est soit la forme protonée de l'acétaldéhyde, soit la forme flavylium d'une autre anthocyane. Dans le premier cas, on observe des polymères d'anthocyanes ($m/z = 1047$) dont les unités sont reliées par des liaisons éthyliques, provenant de l'acétaldéhyde, entre les noyaux A de chaque unité (C8-C8, C8-C6). Dans le deuxième cas, on observe la formation de polymères d'anthocyanes ($m/z = 1001$) dont les unités sont reliées par des liaisons C4-C8 comme pour les tanins. La structure correspondant au signal détecté à 839 uma a été attribuée au même type de pigment ayant perdu un résidu glucose sur une des deux unités anthocyaniques, suggérant une instabilité de la liaison glucosidique. Toutefois, cette attribution nécessite une confirmation par l'étude du schéma de fragmentation de cette molécule. Le signal détecté à 809 peut être attribué au même type de structure dans laquelle une unité malvidine est remplacée par une unité péonidine. Le deuxième pic ne donne pas de réponse en masse ; il pourrait correspondre à des polymères d'anthocyanes de plus haut degré de polymérisation et/ ou à des produits présentant une forte polydispersité.

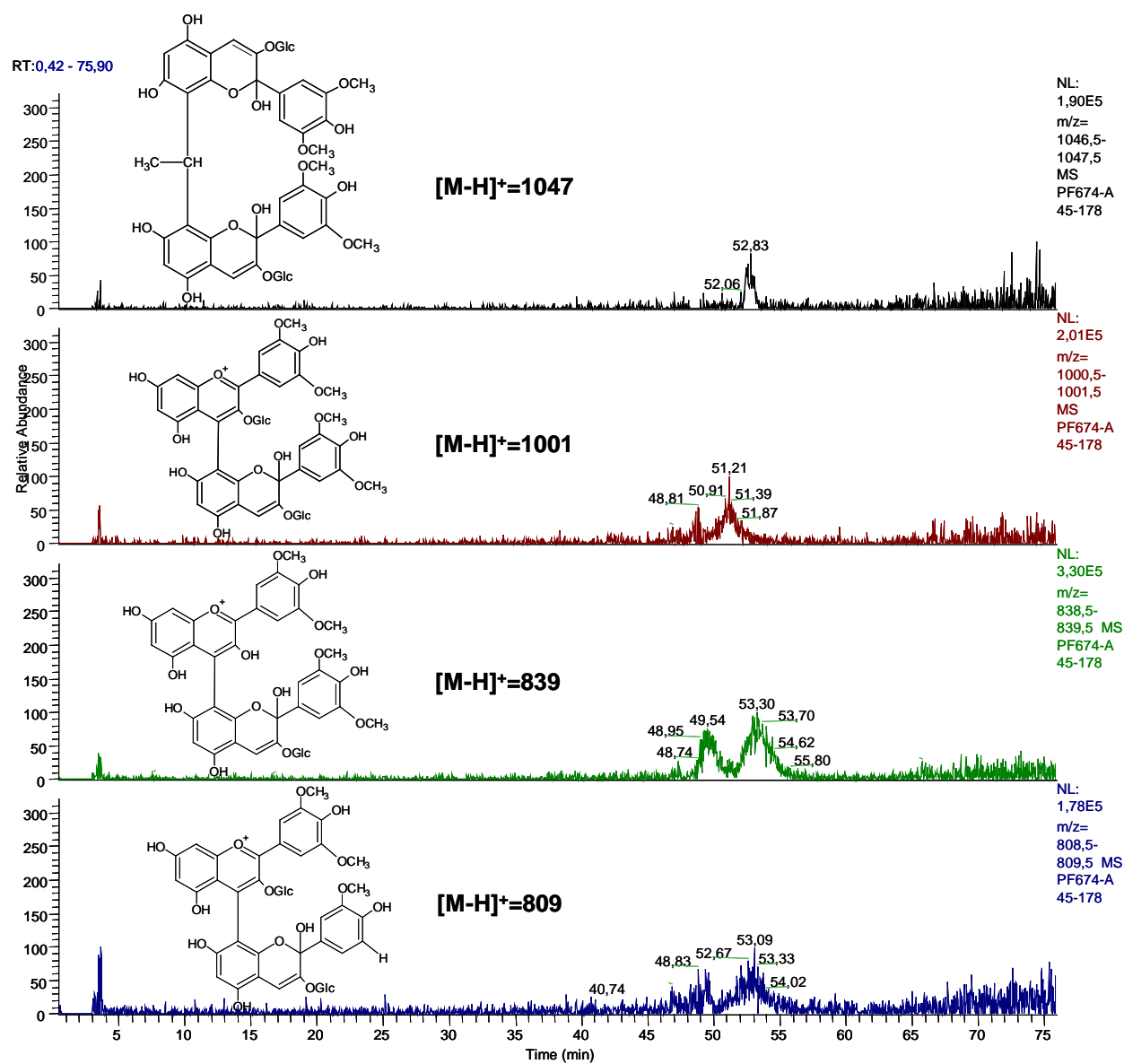


Figure 77. Extraction des ions en mode positif présents dans la solution A à 45 jours : m/z 1047 (Mv3glc-OH-ethyl- Mv3glc-OH), 1001 (Mv3glc-Mv3glc-OH), 839 (Mv-Mv3glc-OH), 809 (Pn-Mv3glc-OH)

De façon plus générale, toutes les structures proposées pour les ions détectés devront être confirmées par fragmentation (MSn).

La Figure 78 montre les profils à 280 nm et à 520 nm de la solution AT, à 0 et 45 jours. Comme dans T, l'acide gallique et l'acide protocatéchique proviennent de la dégradation des tanins. Comme dans la solution A, les acides syringique et vanillique provenant de la dégradation des anthocyanes sont présents. En revanche, les pigments dimériques d'anthocyanes identifiés dans la solution de A à 45 jours à m/z 1047, 1001, 839 ne sont pas détectés dans la solution AT. Dans cette solution, l'extraction d'ions à m/z 781, 751 correspondants à des dimères épicatechine-malvidine-3-O-glucoside et épicatechine-péonidine-3-O-glucoside respectivement, montre la présence de ces dérivés dans la solution, et suggère que les produits formés résultent préférentiellement des réactions entre anthocyanes et tanins (Figure 80). L'ion 809 est donc attribué à un dimère épicatechine-éthyl-malvidine-3-O-glucoside. Par conséquent, tous les pigments dérivés identifiés dans la solution AT, correspondant à des structures de type T-A et A-ethyl-T, sont formés selon le même mécanisme (SAE) que ceux identifiés dans la solution A. Ces dimères peuvent être marqueurs de pigments plus polymérisés, non détectés en spectrométrie de masse. Après 45 jours, sur les profils chromatographiques enregistrés à 280 nm, nous pouvons aussi observer une diminution du pic 1 de la solution de AT, et une augmentation importante du second pic, par rapport au profil à t_0 . Ces pics, à t_0 n'absorbaient pas dans le visible ; à 45 jours, ils présentent deux λ_{max} : 470 et 525 nm ce qui indique qu'ils contiennent des nouveaux pigments issus de tanins et d'anthocyanes.

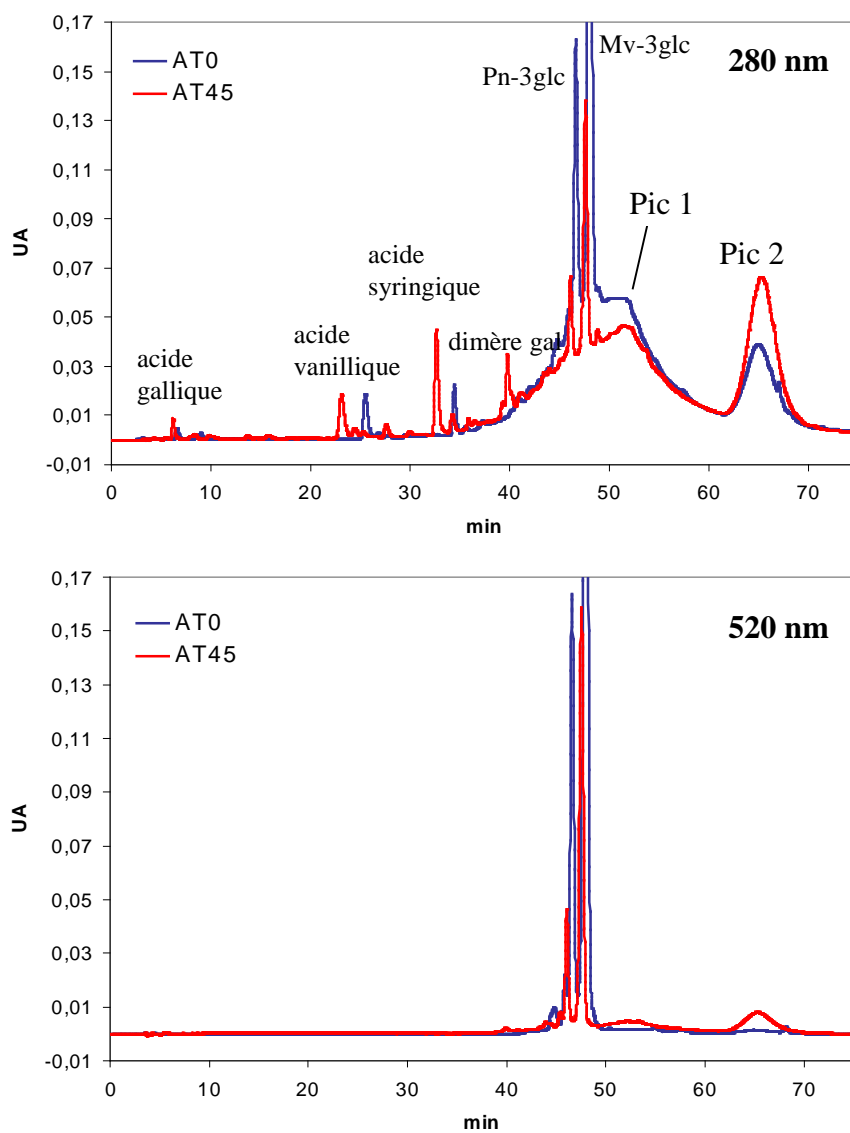


Figure 78. Profils chromatographiques à 280 et 520 nm de la solution de AT à 0 et 45 jours.

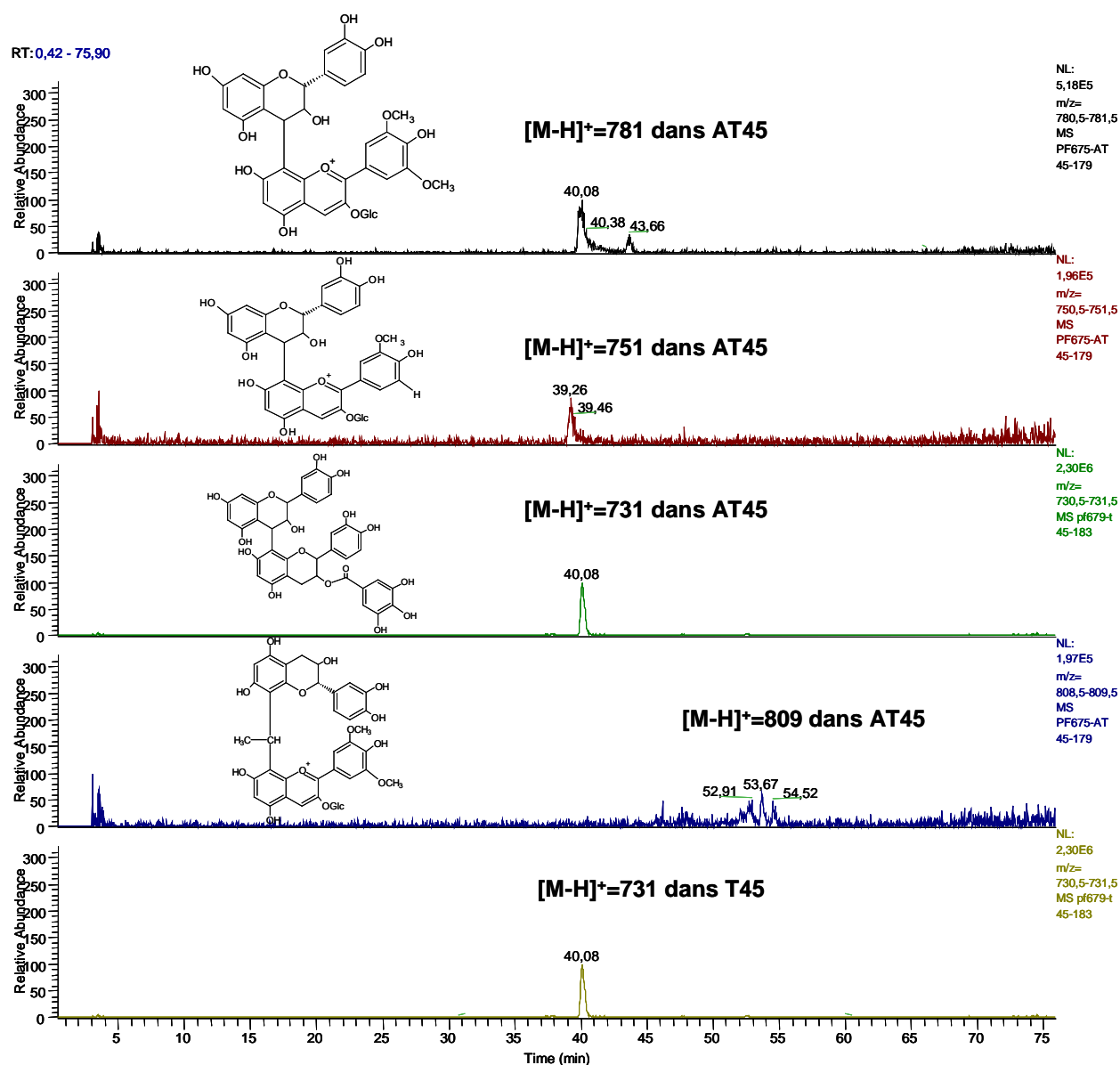


Figure 80. Extraction des ions présents dans la solution AT à 45 jours et T45 jours : m/z 781 (Ec-Mv3glc), 751 (Ec-Pn3glc), 809 (Ec-éthyl-Mv3glc), 731 (dimère galloylé).

B. ANALYSE DES STRUCTURES POLYMERIQUES PAR PHLOROGLUCINOLYSE

Les profils chromatographiques à 280 nm obtenus après phloroglucinolyse des solutions T et AT à 0 et 45 jours sont présentés sur la Figure 80. Après 45 jours, les surfaces des pics correspondants aux unités constitutives des tanins habituellement dosées ont diminué. Parallèlement, nous pouvons observer une augmentation des pics pouvant correspondre à des tanins dérivés résistants, au moins partiellement, à la réaction de dépolymérisation. Les tanins dans les solutions contenant AT et T ont été quantifiés après phloroglucinolyse à 0 et 45 jours (Tableau 38). Sur la base de ce dosage, la concentration des unités constitutives des tanins chute après 45 jours, ce qui indique une conversion des tanins natifs en d'autres structures. Ce résultat est reflété par une chute du rendement de phloroglucinolyse que l'on calcule par le rapport de la quantité de toutes les unités libérées après phloroglucinolyse sur la quantité de fraction de tanins mise au départ. Le % d'unités natives, calculé par le rapport des unités natives dosées à t45 et à t0, traduit le remplacement d'unités constitutives des tanins natifs, libérées par la phloroglucinolyse, en unités de nature différentes et/ ou dont certaines liaisons sont devenues résistantes à la phloroglucinolyse (Tableau 38). Par exemple, des unités anthocyaniques sont incorporées dans les tanins et les liaisons par lesquelles elles sont rattachées aux chaînes polymériques des tanins ne sont plus rompues dans les conditions de la réaction de dépolymérisation, résultats démontrés dans des travaux antérieurs (Es-Safi, *et al.* 1999a). De même, les liaisons créées par oxydation des tanins se révèlent résistantes au clivage, comme l'ont montré les travaux de Guyot (Guyot, 1994). La chute de rendement de phloroglucinolyse est particulièrement importante dans la solution contenant les tanins en présence d'AGP3 (TG), ce qui correspond probablement au phénomène de précipitation observé dans cette solution. Cette diminution est également plus marquée dans les solutions contenant les tanins par rapport aux solutions contenant à la fois les anthocyanes et les tanins. Ceci suggère que les anthocyanes protègent les tanins de certaines réactions et/ou de la précipitation. Le DPm reste constant après 45 jours dans les solutions, malgré l'accumulation de monomères et dimères signalée plus haut, ce qui indique une augmentation de la polydispersité des DP. Par ailleurs, nous pouvons remarquer une augmentation du % d'unités galloylées dans les solutions contenant A et T après 45 jours. Ceci peut être expliqué par une moins grande réactivité des unités galloylées par rapport aux unités non galloylées, peut-être en raison d'une implication plus forte de ces unités dans des mécanismes d'association,

d'interaction non covalente. Une autre hypothèse serait une précipitation préférentielle des unités non galloylées qui conduit à une augmentation dans le surnageant des unités galloylées.

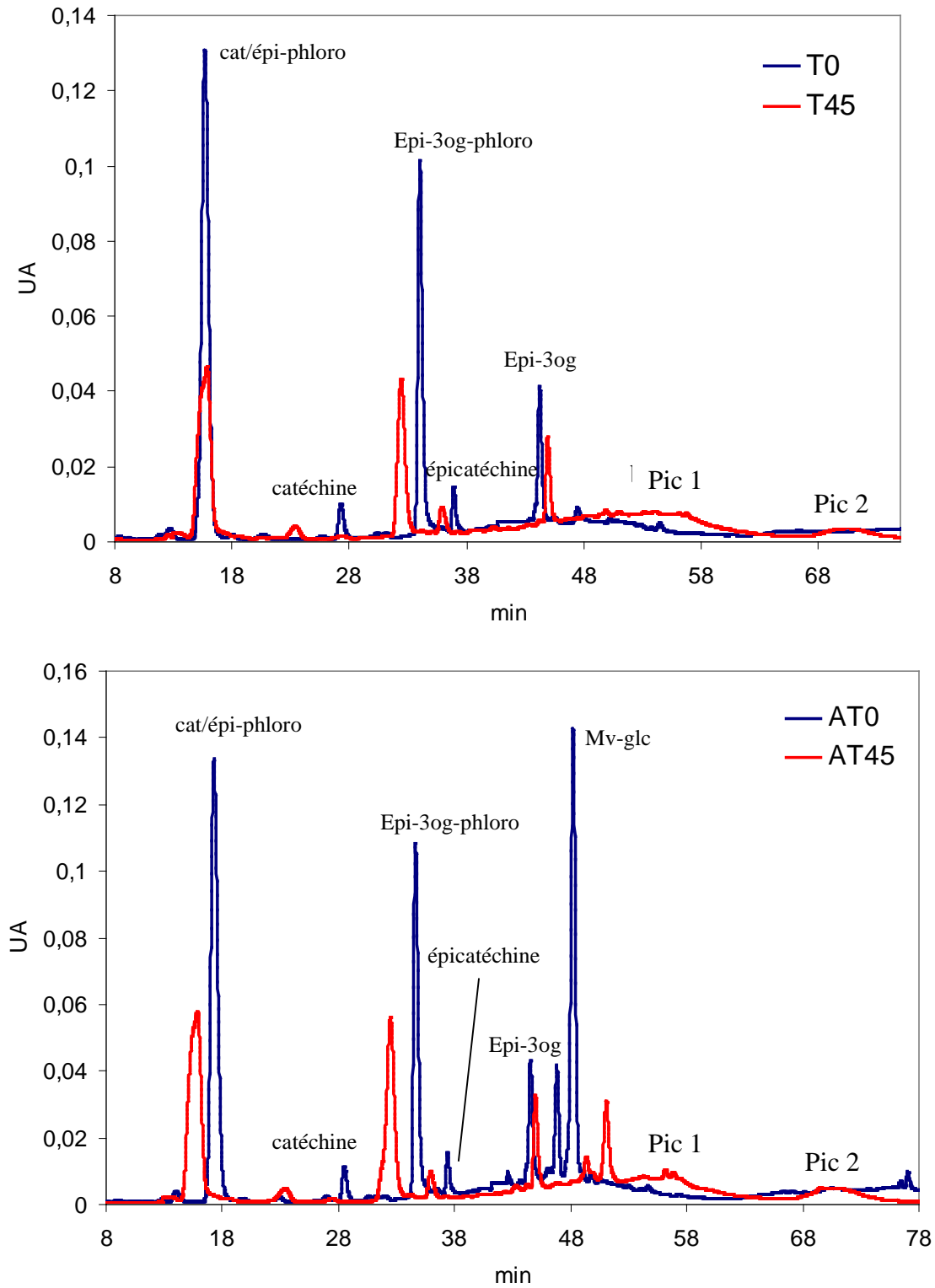


Figure 80. Chromatogrammes des solutions T et AT à 280 nm après phloroglucinolyse à 0 et 45 jours.

Tableau 38. Analyse des tanins à 0 et 45 jours dans les solutions contenant T.

	T0	TG0	TR0	TO0	AT0	ATG0	ATR0	ATO0	ATGRO0
C ¹ (mg/L)	1706	1752	1752	1788	1808	1764	1744	1769	1709
DPm ²	8,7	8,8	8,6	8,7	8,8	8,5	8,6	8,6	8,5
%gal ³	15,9	16,0	16,0	15,9	16,3	16,3	16,4	16,4	16,4
	T45	TG45	TR45	TO45	AT45	ATG45	ATR45	ATO45	ATGRO45
C (mg/L)	1263	1014	1173	1255	1307	1292	1302	1329	1299
DPm	8,3	7,9	8,0	8,2	8,2	8,6	8,2	8,2	8,1
%gal	15,3	14,8	15,2	15,2	17,2	17,3	17,1	17,3	17,3
% unités									
« natives »	74,0	57,9	67,0	70,2	72,3	73,2	74,7	75,1	76,0

1 : concentration en tanins, 2 : degré moyen de polymérisation, 3 : pourcentage d'unité épi-3-O-gallate.

Dans la solution contenant AT, l'extraction de l'ion à m/z 933 pouvant correspondre à un dérivé phloroglucinol de l'adduit (épi)catéchine-éthyl-malvidine-3-O-glucoside, marque la présence de pigments de plus hauts degrés de polymérisation issus des réactions entre anthocyanes et tanins via l'acétaldéhyde (Figure 82, Figure 83). De nouveaux ions détectés à m/z 577, 701, 989 peuvent être interprétés comme des dimères et trimères de tanins oxydés non clivés (- 2 uma par rapport aux tanins natifs) dans la mesure où les liaisons formées par oxydation des flavanols sont résistantes aux conditions de la réaction de dépolymérisation comme cela a été évoqué précédemment. Ces dimères et trimères d'oxydation sont soit en position terminale ($m/z = 577$) soit en position supérieure puisqu'on en trouve sous forme de dérivés phloroglucinol ($m/z = 701, 989$). L'étude du schéma de fragmentation de ces ions permettrait de connaître la nature des mécanismes d'oxydation. En effet, un mécanisme d'oxydation intramoléculaire (entre deux unités d'une même chaîne polymérique) conduirait à la formation d'une liaison supplémentaire de type éther entre l'hydroxyle en C7 de l'unité inférieure et le C2 de l'unité supérieure. Les tanins doublement liés en C4-C8 et C7-O-C2 existent dans certains végétaux et sont communément appelés tanins de type A (Figure 83) ; la fragmentation de ces structures est bien connue.

D'un autre côté, un mécanisme d'oxydation intermoléculaire (entre deux unités appartenant à deux chaînes polymériques distinctes) conduirait à la formation de liaison bi-aryle ou biaryle éther entre les noyaux aromatiques (A et B) des unités de tanins dont la fragmentation mène aussi à des ions fragments caractéristiques (Guyot *et al.* 1996). Toutefois, même en l'absence d'étude de schémas de fragmentation, il semblerait que le mécanisme soit plutôt intramoléculaire (liaison de type A) du fait que l'on n'ait pas pu mettre en évidence des

unités supérieures doublement substituées par des noyaux phloroglucinol. En effet, un mécanisme intermoléculaire devrait impliquer soit deux unités supérieures (S, S), soit une unité supérieure et une unité terminale (S, T), soit deux unités terminales (T, T) (Figure 81.I). La proportion des dimères biaryl libérés par phloroglucinolyse S-S, S-T et T-T (Figure 81.II) dépend de la longueur des chaînes entrant en réaction; plus le DP est grand, plus la proportion de dimères formés à partir de deux unités supérieures S-S est élevée. Compte tenu du DPM de la fraction initiale de tanins, le fait de ne pas détecter du tout de S-S avec deux noyaux phloroglucinol laisse penser que ce mécanisme est minoritaire.

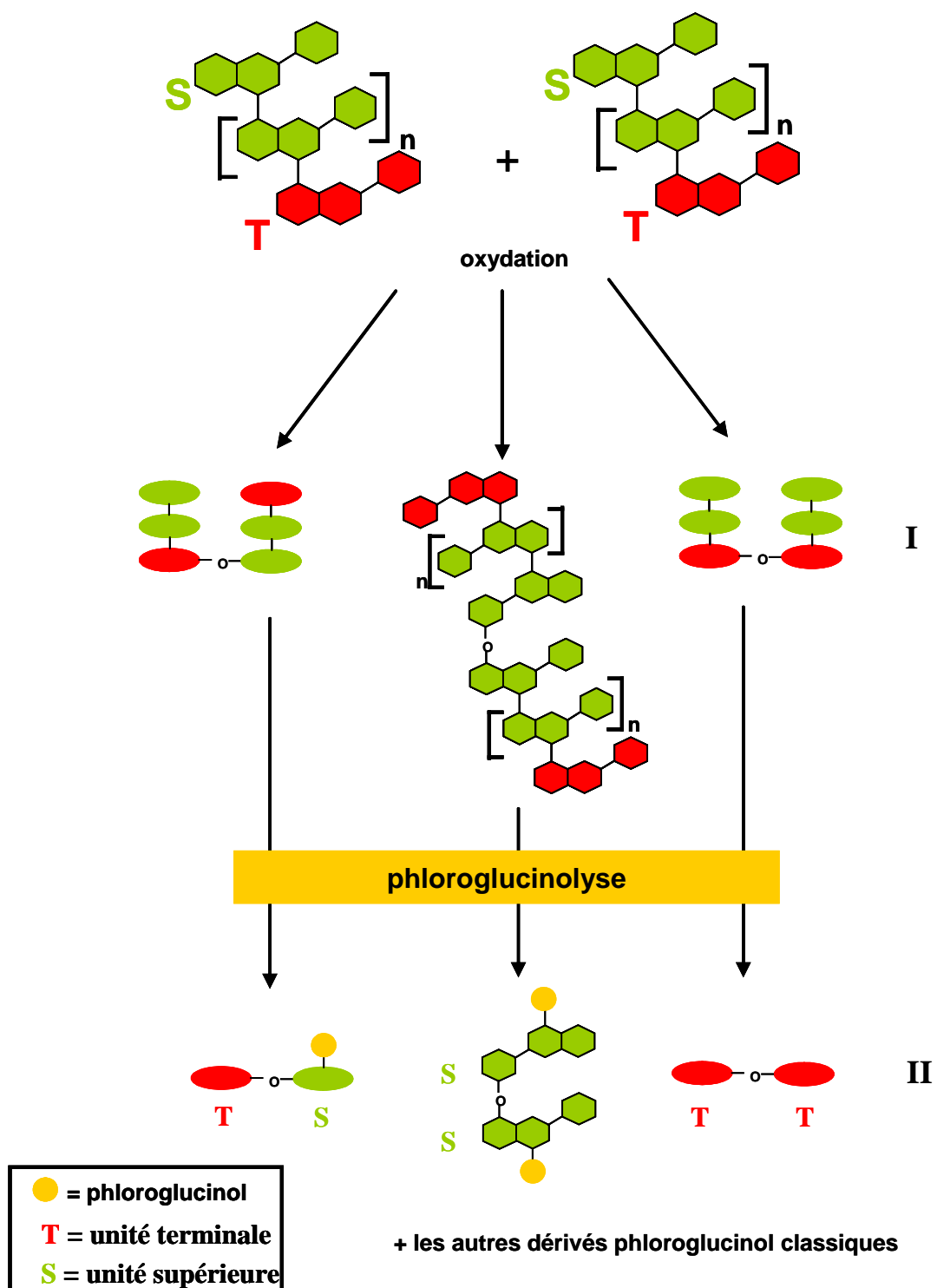


Figure 81. Schéma de la formation des liaisons biaryles par oxydation entre deux chaînes polymériques (I) et unités libérées par phloroglucinolyse de ces types de structures (II)

La présence de l'ion 989 démontre que les tanins ayant ce type de liaison sont difficiles à dépolymériser par phloroglucinolyse. Ceci conduirait donc à une diminution du rendement de phloroglucinolyse puisque seules les unités originelles sont prises en compte et expliquerait l'augmentation des pics après 45 jours.

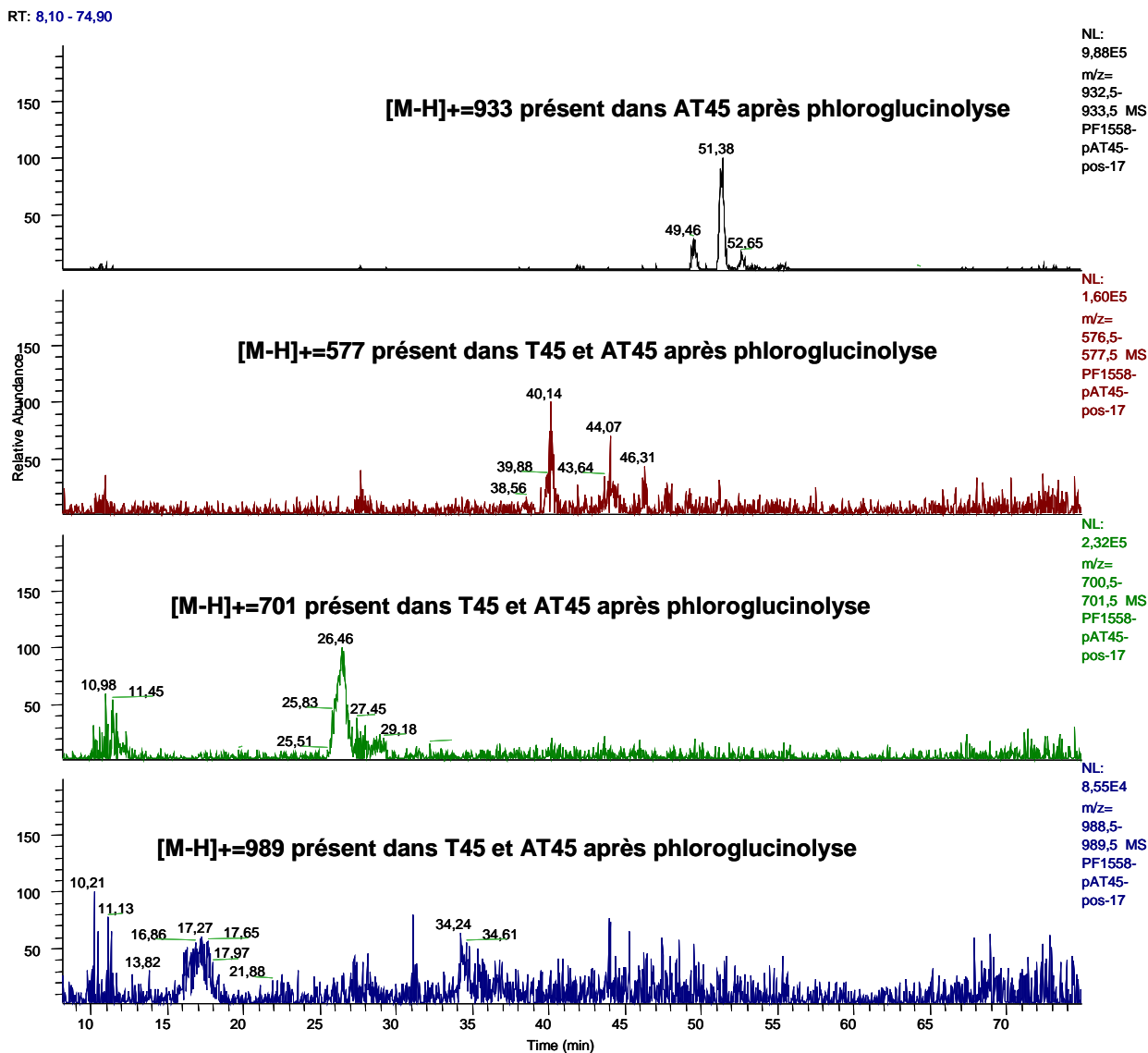


Figure 82. Extraction des ions dans les solutions T45 et AT45 après phloroglucinolyse : m/z 933 (Mv-glc-éthyl-Ec-phloro), 577 (dimère de flavanol oxydé ou type A), 701 (dimère de flavanol oxydé ou type A - phloro), 989 (trimère comportant un dimère de flavanol oxydé ou type A)

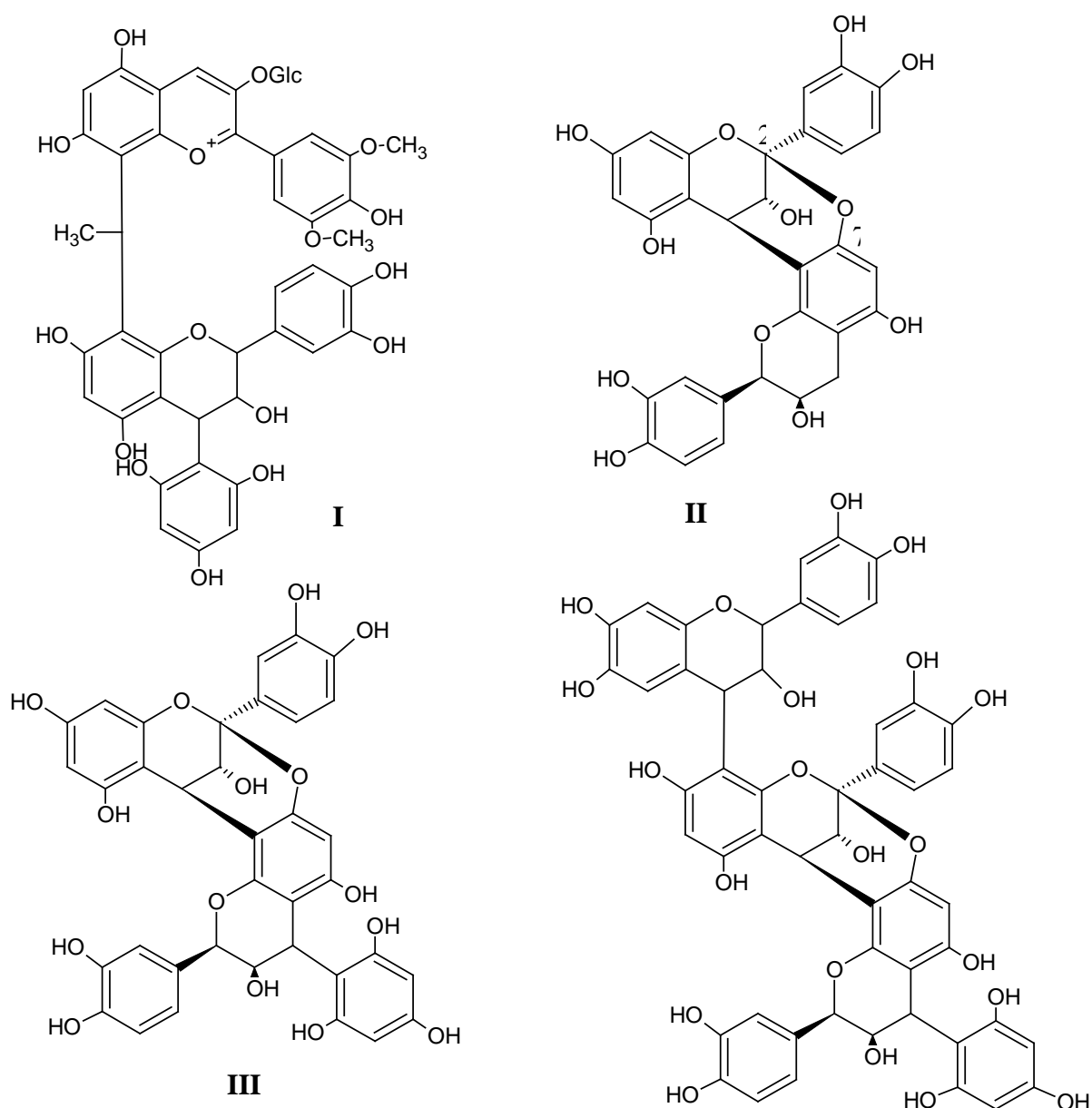


Figure 83. Exemples de structures pouvant correspondre à m/z 933 (I : Mv-glc-éthyl-Ec-phloro), à 577 (II : procyanidine A2), à 701 (III : A2-phloro), à 989 (IV : Ec-A2-phloro).

C. ANALYSE DES SOLUTIONS APRES UN AN D'EVOLUTION

1. Analyse des surnageants des solutions après un an

La Figure 84 illustre les profils chromatographiques des surnageants des solutions A, AT et T après un an. Nous nous sommes intéressés tout d'abord aux pics des anthocyanes de départ et aux produits de dégradation déjà connus comme marqueurs de la dégradation, soit

des tanins soit des anthocyanes : acide gallique provenant de l'hydrolyse des esters galliques, acides protocatéchique, syringique et vanillique provenant du noyau B des tanins, de la malvidine et de la péonidine, respectivement (Tableau 39).

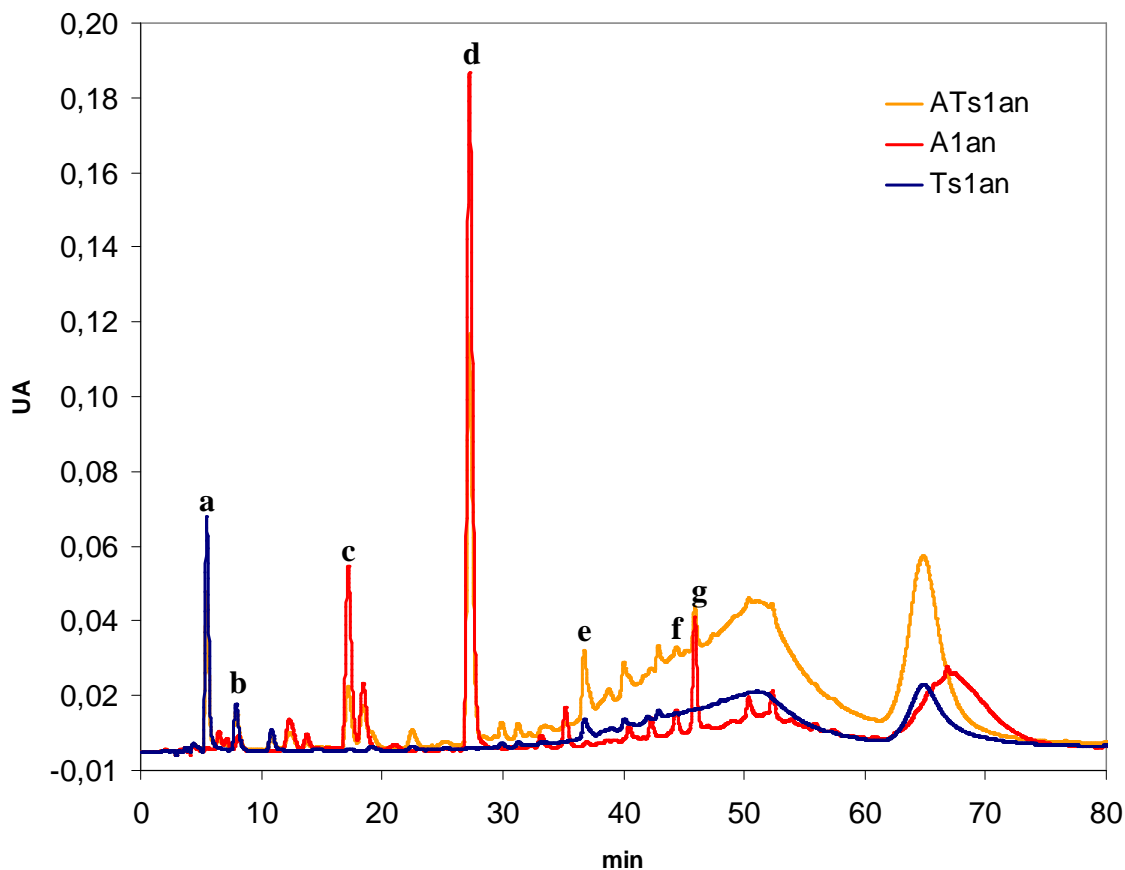


Figure 84. Profils chromatographiques à 280 nm des surnageants (s) des solutions A, AT et T après un an.

Tableau 39. Caractérisation des composés présents dans les solutions As, ATs, Ts après 1an.

pics	composés	tr (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻	présent dans les solutions contenant
a	acide gallique	5,5	270	169	T/AT
b	acide protocatéchique	7,9	258 ; 294	153	T/AT
c	acide vanillique	18,4	261 ; 291	167	A/AT
d	acide syringique	27,3	275	197	A/AT
e	dimère galloylé	36,7	277	729	T/AT
f	péonidine -3-Oglucoside	44,3	278 ; 518	461	A/AT
g	malvidine -3-Oglucoside	45,9	279 ; 528	491	A/AT

L'acide gallique et l'acide protocatéchique, produits de dégradation des tanins, ont été détectés après un an dans les solutions contenant T et AT, et l'acide syringique, produit de dégradation de la malvidine 3-glucoside, dans les solutions contenant A et AT (Tableau 40).

Tableau 40. Dégradation des solutions contenant A, AT et T après 1an en acide syringique, en acide gallique et acide protocatéchuque.

type des solutions	solutions	ac. syr. ¹ (mg/L)	%Mv ² dégradée en ac. syr.	ac. gal. ³ (mg/l)	% d'unités épi-3-Og ⁴ degradées	ac.protocat. ⁵ (mg/L)	% d'unités de tanins dégradées en ac. protocat.
contenant A	As	102,3	62,6	-	-	-	-
	AGs	100,4	62,5	-	-	-	-
	ARs	102,0	63,6	-	-	-	-
	AOs	106,8	66,5	-	-	-	-
contenant AT	ATs	60,2	37,1	6,3	12,2	2,7	0,9
	ATGs	61,0	39,6	6,7	13,8	3,1	1,1
	ATRs	59,1	39,7	6,4	13,3	2,8	1,1
	ATOs	61,0	40,8	6,6	13,4	2,6	1,0
	ATGROs	60,6	40,8	6,3	13,3	2,5	1,0
contenant T	Ts	-	-	9,6	21,0	3,4	1,3
	TGs	-	-	11,6	24,5	3,9	1,4
	TRs	-	-	10,4	22,0	3,3	1,2
	TOs	-	-	10,9	22,6	3,5	1,3

1 : acide syringique, 2 : malvidine-3-O-glucoside, 3 : acide gallique, 4 : (épi)catéchine-3-O-gallate, 5 : acide protocatéchuque.

Dans les solutions contenant seulement l'anthocyane, 63,8% en moyenne ($\pm 1,8\%$) de la malvidine-3-O-glucoside de départ se sont dégradés en acide syringique. En se basant sur la quantité d'anthocyane dégradée à 45 jours, soit 57% dont 16% seulement en acide syringique, cela signifie que les produits de réaction de l'anthocyane formés à 45 jours ne sont pas stables au cours du temps et qu'ils sont capables de suivre la voie de dégradation vers l'acide syringique. Comparativement, la quantité d'acide syringique dosée dans les solutions AT ne représente que 39,6% ($\pm 1,5\%$) de la quantité de malvidine 3-glucoside de départ. Cette différence importante montre que les anthocyanes ont réagi préférentiellement avec les tanins plutôt que de suivre la voie de dégradation vers l'acide syringique dans les solutions de AT, comme nous l'avons vu à 45 jours, et que l'évolution de ces produits génère relativement peu d'acide syringique. Dans les solutions contenant T, 22,5 % en moyenne ($\pm 1,5\%$) des unités galloylées ont perdu leur groupement galloyle (dosé par libération d'acide gallique) alors que 13,2% ($\pm 0,6\%$) ont suivi cette même voie dans les solutions de AT. Ceci suggère soit que les anthocyanes protègent les tanins de l'hydrolyse des liaisons galloyles par des mécanismes d'interaction, soit que les produits formés dans AT sont plus résistants à l'hydrolyse que les tanins eux mêmes ou encore que l'acide gallique libéré est impliqué dans des réactions en présence d'anthocyanes. Le dosage de l'acide protocatéchuque, originaire de la partie

contenant le noyau B de l'unité flavanol, permet d'évaluer la dégradation des tanins. Très peu d'unités de tanins sont dégradées en acide protocatéchique. Cependant, nous pouvons remarquer que dans les solutions de T, légèrement plus de tanins sont dégradés que dans les solutions contenant AT ($1,30\% \pm 0,08$ pour les T contre $1,02 \pm 0,08$ pour les AT). Globalement, les anthocyanes et les tanins en mélange se protégeraient mutuellement de la dégradation en réagissant préférentiellement entre eux.

2. Analyse des tanins

L'analyse des tanins par phloroglucinolyse a été réalisée sur les surnageants et les précipités (Tableau 41).

Tableau 41. Analyse des tanins des surnageants (s) et des précipités (p) des solutions contenant T et AT après 1 an.

surnageants	Ts	TGs	TRs	TOs	ATs	ATGs	ATRs	ATOs	ATGROs
Ctanins (mg/L)	102	72	104	96	452	370	400	361	431
D _P m	3,8	3,6	3,7	3,6	5,3	5,3	5,5	5,4	5,5
% gal	20,4	20,9	20,4	20,6	26,6	28,9	28,3	28,4	26,5
% unités « natives »	6,0	4,1	5,9	5,4	25,0	21,0	22,9	20,4	25,2
précipités	Tp	TGp	TRp	Top	ATp	ATGp	ATRp	ATOp	ATGROp
Ctanins (mg/L)	116	117	142	120	169	168	165	171	174
D _P m	8,8	8,0	8,5	8,3	10,9	10,8	10,7	10,9	10,6
% gal	15,1	15,1	14,9	15,4	16,0	15,9	15,8	15,8	16,3
poids (mg)	11,1	10,6	11,8	10,7	10,4	10,5	10,3	10,2	11,2
% unités « natives »	6,8	6,7	8,1	6,7	9,3	9,5	9,5	9,7	10,2
% unités « natives » (S+P)	12,8	10,8	14,0	12,1	34,9	30,5	32,4	30,1	35,4

La concentration dosée en mg/g de tanins dans les précipités a été convertie en mg/l de solution à 1 an. Les concentrations d'unités constitutives de tanins, dosées, d'une part dans les surnageants, d'autre part dans les culots, ont été ramenées aux concentrations d'unités « natives » dosées dans la solution à t₀ pour estimer la proportion d'unités natives conservée au bout d'un an d'incubation. Le pourcentage d'unités natives résiduelles est extrêmement faible, ce qui indique de profondes modifications dans la structure des tanins après un an de conservation. Il est de 12 % environ dans les solutions contenant les tanins seuls contre plus de 30% dans les solutions AT, ce qui confirme un rôle protecteur des anthocyanes sur la

dégradation des tanins. Les quantités d'unités natives dosées dans les culots et dans les surnageants sont équivalentes dans les solutions T alors qu'une majorité d'unités natives se retrouvent dans les surnageants des solutions AT, ce qui indique une meilleure solubilité des produits formés par réaction des tanins avec les anthocyanes. La quantité d'unités de tanins dosées dans le surnageant de la solution TG est particulièrement faible. Ce résultat peut être lié à la précipitation importante observée dans cette solution. Cependant, la perte dans le surnageant n'est pas compensée par un gain dans le culot. Ceci suggère soit que les tanins ont davantage évolué en présence d'AGP, soit que leur récupération à partir des complexes tanins-AGP3 précipités est très difficile. Le pourcentage d'unités galloylées mesuré par la phloroglucinolyse, initialement de 19, est de 17 en moyenne dans les tanins des surnageants et des culots des solutions T et de 24 dans ceux des solutions AT. Comme cela a été dit précédemment, ceci suggère une protection particulière des unités galloylées dans les solutions contenant les anthocyanes. Le degré de polymérisation moyen calculé à partir des données de phloroglucinolyse est très inférieur après un an dans les solutions T (de 3,6 à 3,8) un peu plus élevé dans les solutions AT (de 5,3 à 5,5) mais dans tous les cas, inférieur au DPm initial (7,6). Le taux de réaction doit donc être plus élevé pour les unités supérieures que pour les unités terminales, surtout dans les solutions T. Les tanins ayant précipité sont de plus haut DPm et moins galloylés que ceux présents dans les surnageants. Ceci indique que les tanins de haut DPm et les moins galloylés précipitent préférentiellement ou que la réactivité des tanins galloylés est modulée par la présence des anthocyanes, ce qui limite leur précipitation. Aucune différence n'est observée sur les poids des précipités formés dans toutes les solutions.

3. Analyse des surnageants et des précipités par HPLC-MS après phloroglucinolyse

Ces précipités sont très difficiles à analyser compte tenu de leur insolubilité quasi totale dans tous les solvants testés. Après phloroglucinolyse, les produits d'acidolyse deviennent solubles. Les profils chromatographiques à 280 nm des précipités des solutions T et AT après phloroglucinolyse sont rassemblés sur la Figure 85. Ces profils présentent deux pics non résolus d'allure différente de celle des tanins de départ. La surface de ces pics a été ramenée en mg/L en équivalent catéchine présents dans les solutions avant et après phloroglucinolyse (Tableau 42). Globalement, les composés présents dans les pics 1 et 2 sont résistants à la phloroglucinolyse. Dans les surnageants des solutions AT et T, 60% et 62%,

respectivement, de ces composés ne sont pas phloroglucinolysés. Plus précisément, les composés présents dans le pic 1 semblent plus résistants à l'acidolyse que ceux dans le pic 2. En effet, dans la solution AT, on retrouve 69% du pic 1 contre 35% du pic 2 et de la même manière, dans la solution T, 67% du pic 1 contre 44% du pic 2. Les deux pics des précipités après phloroglucinolyse restent également très importants.

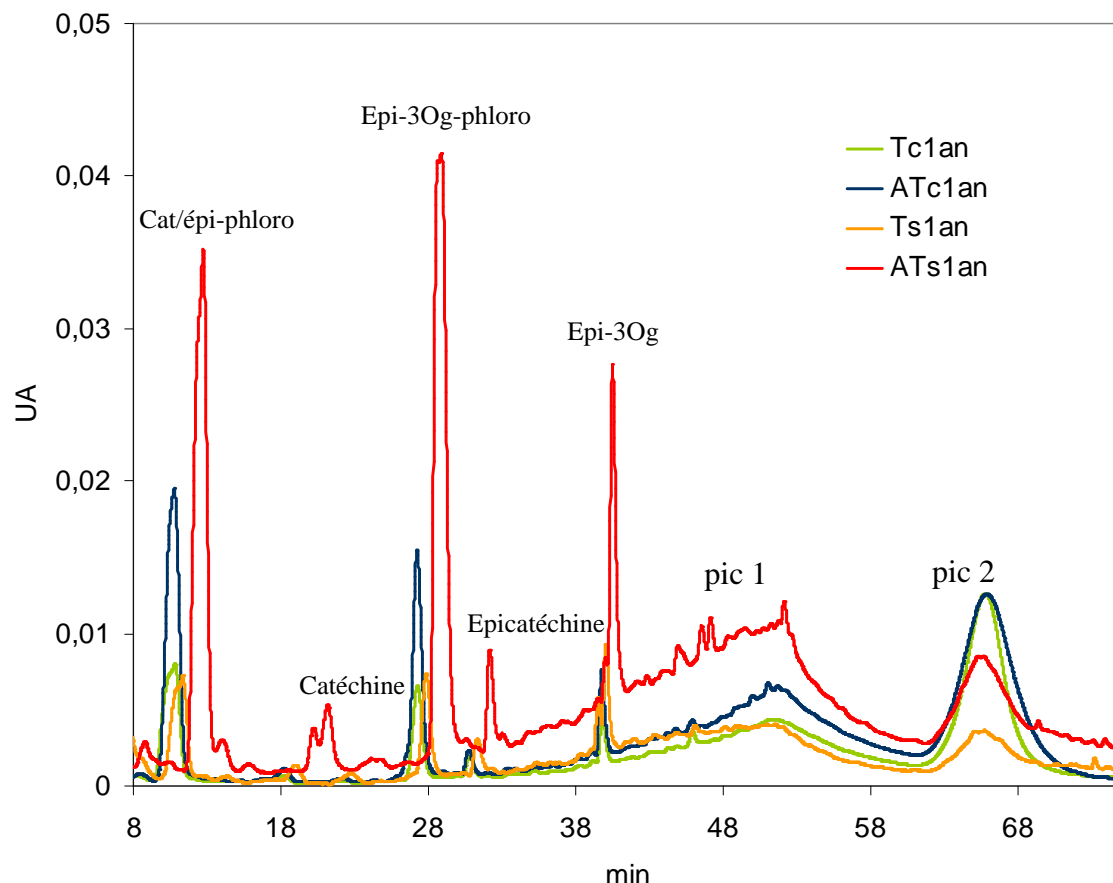


Figure 85. Profils chromatographiques à 280 nm après phloroglucinolyse des surnageants et des précipités des solutions T et AT. Tc1an : précipité de la solution T après 1 an, **ATc1an** : précipité de la solution AT après 1an, **Ts1an** : surnageant de la solution T après 1 an, **ATs1an** : surnageant de la solution AT après 1 an.

Tableau 42. Estimation de la concentration en mg/L (équivalent catéchine) des pics 1 et 2 présentes avant et après phloroglucinolyse.

mg/L équivalent catéchine	pic 1	pic 2
surnageant de AT	943	313
surnageants de AT après phloroglucinolyse	647	109
surnageant de T	373	114
surnageant de T après phloroglucinolyse	250	51
précipités de AT après phloroglucinolyse	821	591
précipités de T après phloroglucinolyse	820	675

Nous avons cherché des marqueurs de structures de tanins modifiés après phloroglucinyse dans les précipités et les surnageants des solutions de T et AT par spectrométrie de masse. L'extraction des ions $m/z= 577, 701$ et 989 dans le précipité de la solution de T indique la présence de tanins oxydés, vraisemblablement de type A (Figure 86) dont les hypothèses de structures sont rappelées dans la Figure 83. Il en est de même dans la solution de AT (Figure 87). En plus de ce type de structures, le précipité de AT contient un marqueur des réactions de polycondensation via l'acétaldéhyde entre tanins et anthocyanes : l'ion à $m/z 933$ (Figure 87). Ces structures avaient déjà été identifiées à 45 jours. Cependant, après un an d'évolution, la comparaison de l'extraction de ces ions dans les précipités et les surnageants montre que ces types de structures de tanins modifiés sont principalement présentes dans les précipités. Plusieurs modifications (type A et liaison alkyle) peuvent se produire successivement dans la même chaîne polymérique entraînant des changements des propriétés physico-chimiques très importants favorisant la précipitation.

RT:13,76 - 59,06

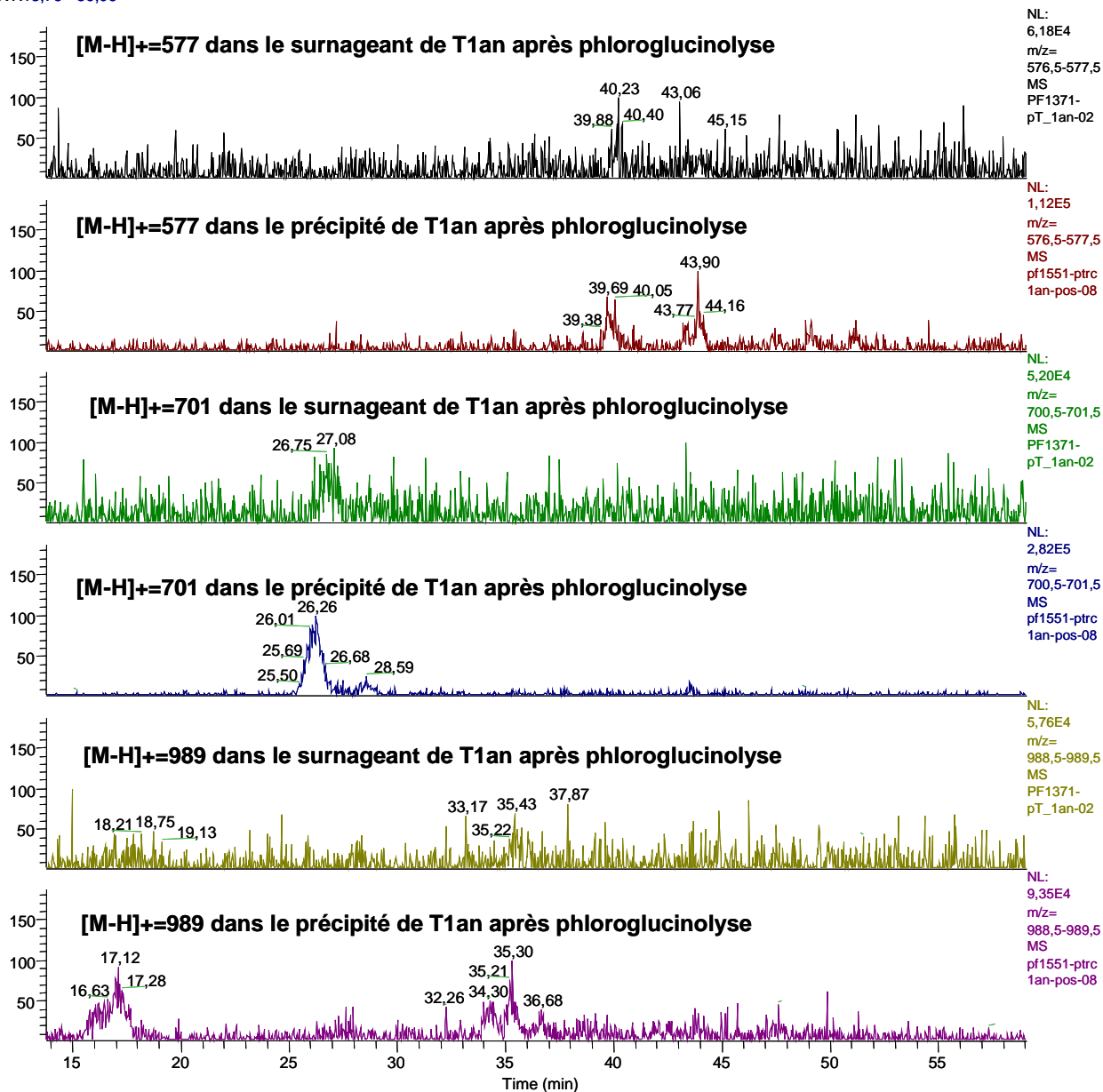


Figure 86.Extractions des ions à m/z : 577 (flavanol dimère oxydé), à 701 (flavanol dimère oxydé -phloro), à 989 (flavanol trimère oxydé-phloro) dans les précipités et les surngeants des solutions T après phloroglucinylation.

RT:13,76 - 59,06

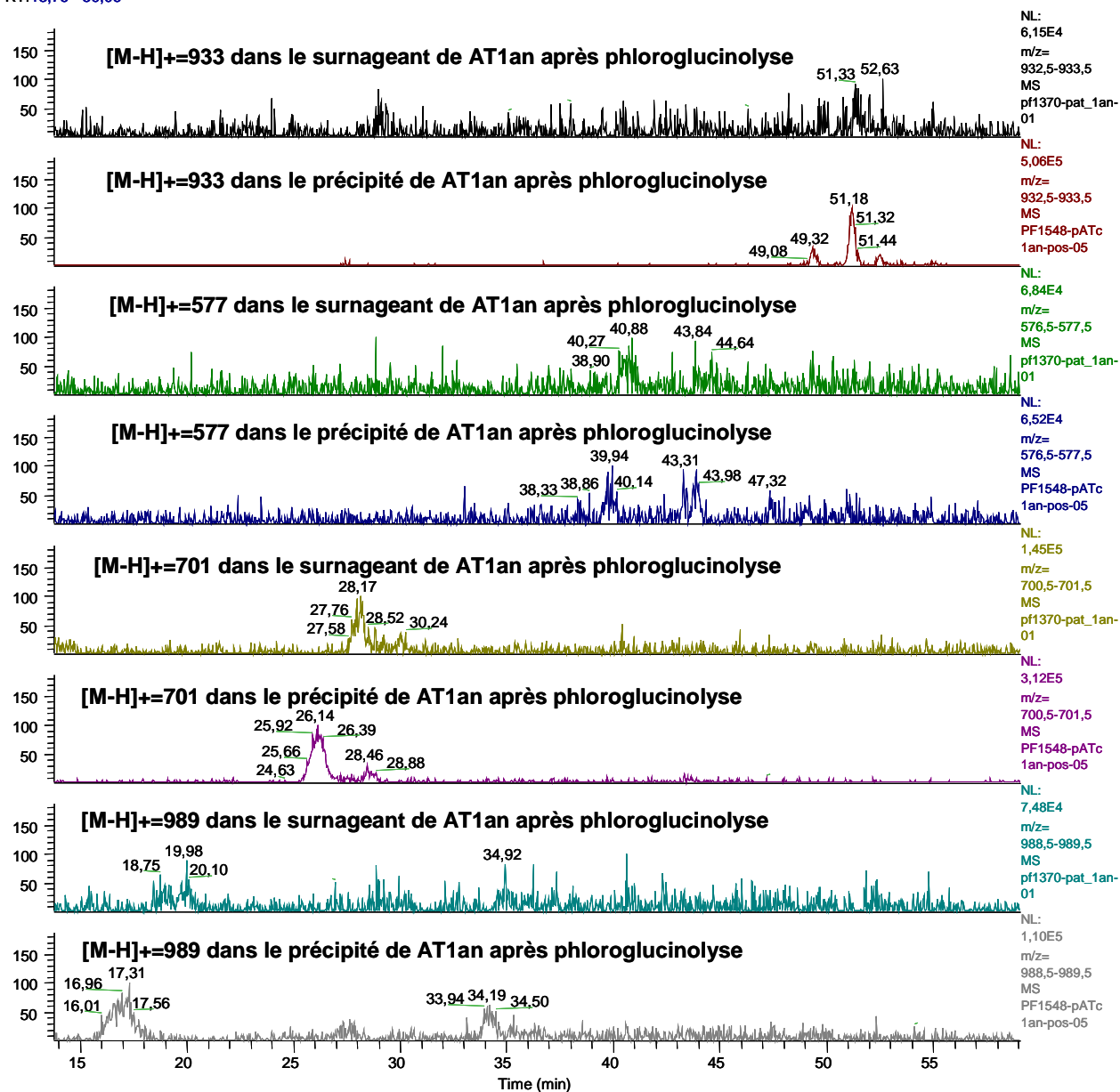


Figure 87.Extractions des ions à m/z : 933 (Mv-glc-éthyl-Ec-phloro), à 577 (flavanol dimère oxydé), à 701 (flavanol dimère oxydé -phloro), à 989 (flavanol trimère oxydé-phloro) dans les précipités et les surnageants des solutions AT après phloroglucinolyse.

4. Analyse des précipités par RMN ¹³C du solide

Les spectres RMN ¹³C des précipités ont été réalisés par RMN du solide à la Plateforme BIBS de l'INRA de Nantes. Pour pouvoir déterminer le type des structures présentes

dans les précipités, les spectres des fractions initiales de tanins T_{ini} (Figure 89.I) et d'anthocyanes A_{ini} (Figure 89.I) ont été attribués à partir des déplacements chimiques décrits dans de précédentes études (Czochanska *et al.* 1980; Guyot, 1994; Jordheim *et al.* 2006; Tarascou *et al.*, 2007). Les signaux RMN enregistrés pour la fraction A_{ini} montre qu'elle renferme un mélange de formes flavylum et hémiacétal. Les spectres RMN ^{13}C ont ensuite été réalisés sur les précipités de T (Figure 89.II) et de AT (Figure 89.III) formés après un an. Les pics fins à 181, 176, 75 et 73 ppm sont caractéristiques de l'acide tartrique présent dans le milieu modèle vin utilisé. Les spectres RMN du précipité de T1an (Figure 89.II) et de AT1an (Figure 89.III) présentent les mêmes déplacements chimiques que T_{ini} (Figure 88, Figure 89.I). Ils sont constitués principalement de tanins. Le déplacement chimique des carbones présents dans les groupements méthoxyles à $\delta = 56$ ppm (Figure 90) est caractéristique des anthocyanes et tout particulièrement de leur noyau B. Cependant, il est peu intense dans le précipité de AT1an (Figure 89.III). Ceci peut être expliqué par la dégradation de la malvidine-O-glucoside en acide syringique, qui est retrouvé en quantité importante dans le surnageant de AT1an. Le dosage du glucose par la méthode des acétates d'alditol (cf. II.B.1.c, 166) dans le précipité AT1an donne une concentration glucose de 25,2 mg/g de précipité, ce qui correspond à une précipitation de 143 mg/L d'anthocyanes soit plus d'un quart de la quantité initiale. Etant donné la quantité d'acide syringique présent dans le surnageant et la quantité de glucose présent dans le précipité, nous pouvons faire l'hypothèse que des produits formés par la dégradation de la malvidine-3-O-glucoside (perte du noyau B) précipitent directement ou après réaction avec les tanins, ou encore, que les unités anthocyaniques incorporées dans les tanins sont susceptibles de se dégrader.

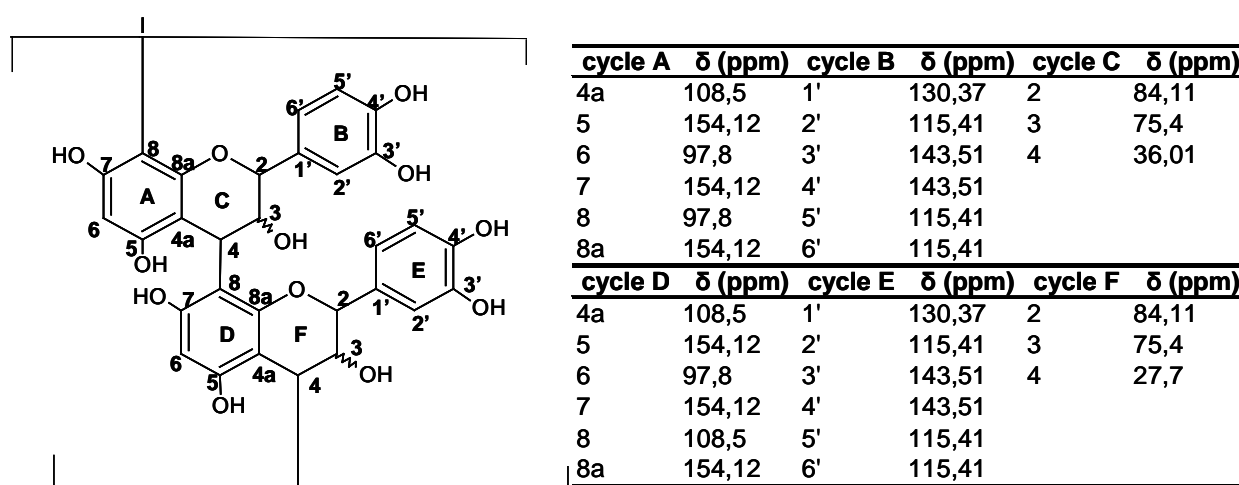


Figure 88. Attribution des déplacements chimiques des ^{13}C de la fraction Tini.

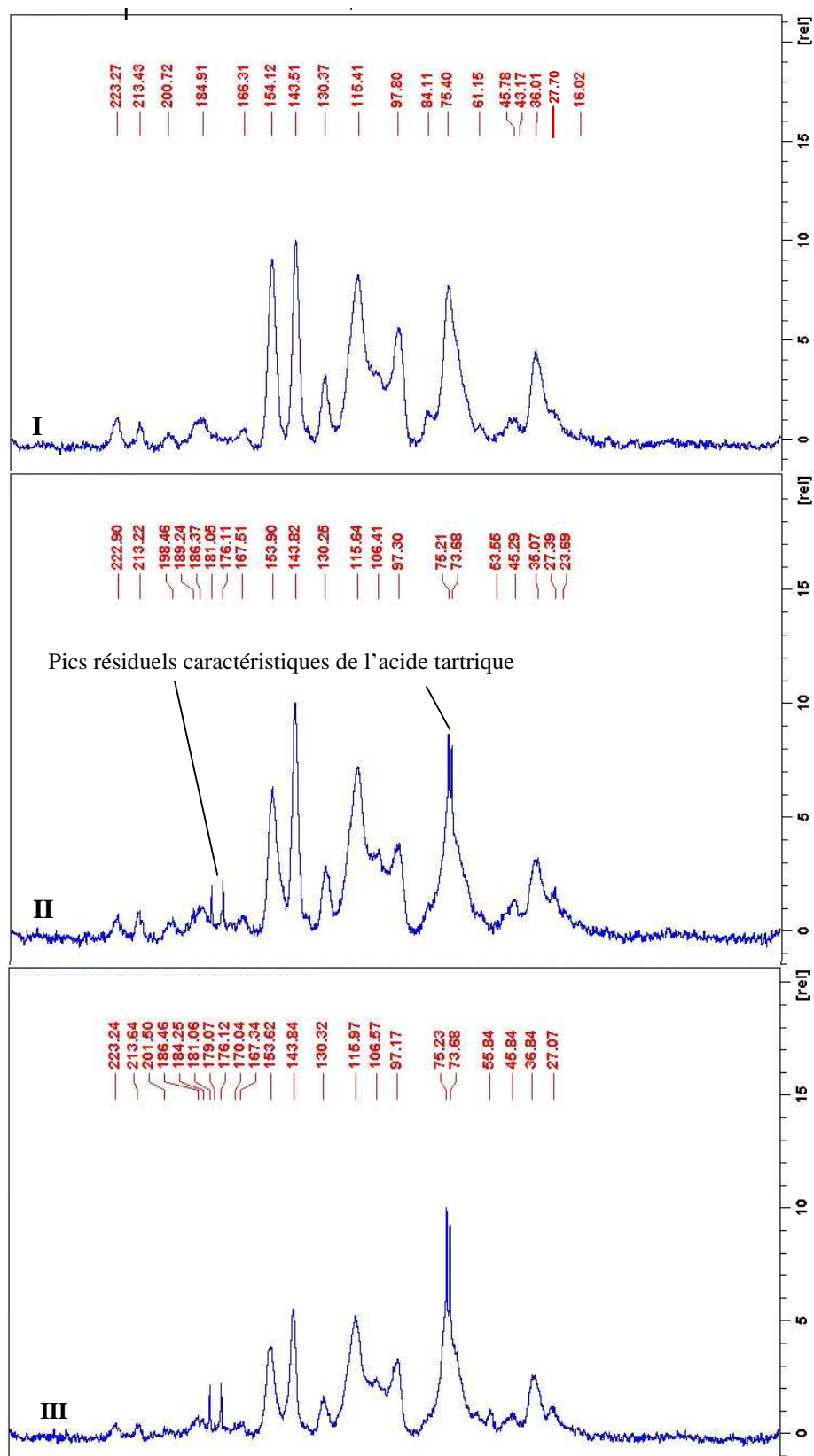


Figure 89. Spectres RMN ^{13}C du solide de la fraction initiale Tini (I) et du précipité formé après un an dans la solution T1an (II) et AT1an (III).

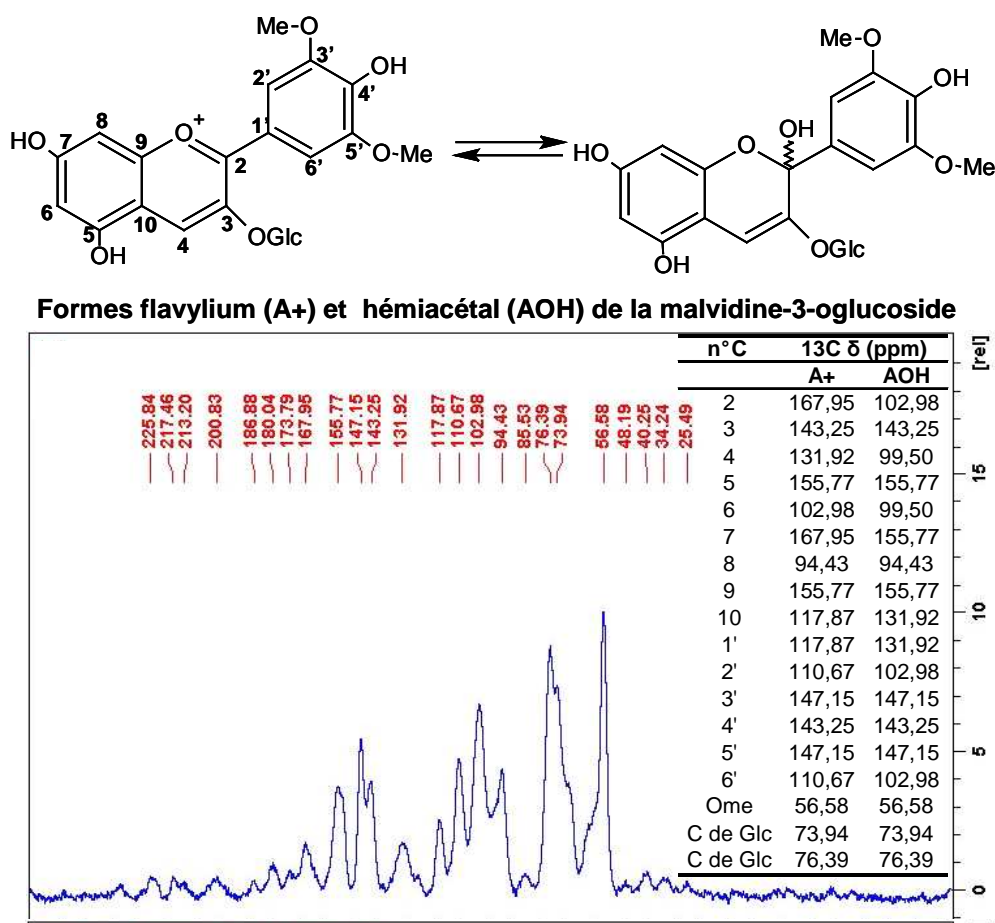


Figure 90. Spectres et attributions RMN 13C de la fraction initiale d'anthocyanes Aini.

Pour essayer de déterminer les modifications des structures des tanins présents dans les précipités, la soustraction des spectres RMN de T1an et de Tini a été réalisée (Figure 91). Les pics résiduels de l'acide tartrique sont retrouvés à 181, 176, 75 et 73 ppm. Le pic du C7 des tanins de la fractions Tini à 154,12 ppm est déplacé à 150,25 ppm après soustraction de T1an. Ce type de déplacement chimique est caractéristique des carbones 7 des tanins de type A (Figure 83) lorsqu'ils sont impliqués dans des liaisons de type éther cyclique (Le Roux, 1999). Le pic résiduel à 106,41 ppm pourrait aussi correspondre au déplacement du carbone 2 impliqué dans les liaisons de type A alors qu'il est à 84,11 ppm dans la fraction Tini. L'évolution des tanins au cours du temps aurait donc conduit à la formation de précipités de tanins comportant des liaisons de type A, comme démontré précédemment. Le pic à 144,18 ppm caractéristique des carbones aromatiques portant un OH peut aussi laisser penser à une augmentation des groupements hydroxyles sur les structures présentes dans le précipité de tanins par un phénomène oxydatif.

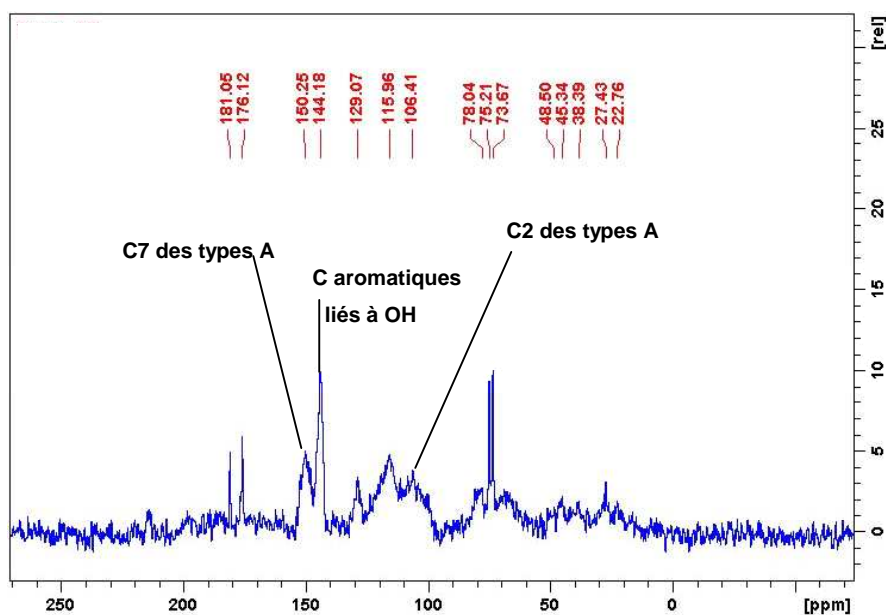


Figure 91. Différence des spectres RMN ^{13}C : T1an - Tini.

5. Analyse des précipités par infrarouge

Les spectres IR des précipités des solutions ont été comparés aux spectres de Tini (Figure 92). Les principales bandes observées ont été attribuées aux différents types de liaisons présents dans les structures et sont caractéristiques des structures de tanins (Edelmann & Lendl, 2002 ; Socrates, 2008, Pena *et al.* 2006, Fernandez *et al.* 2007, Jensen, *et al.* 2008).

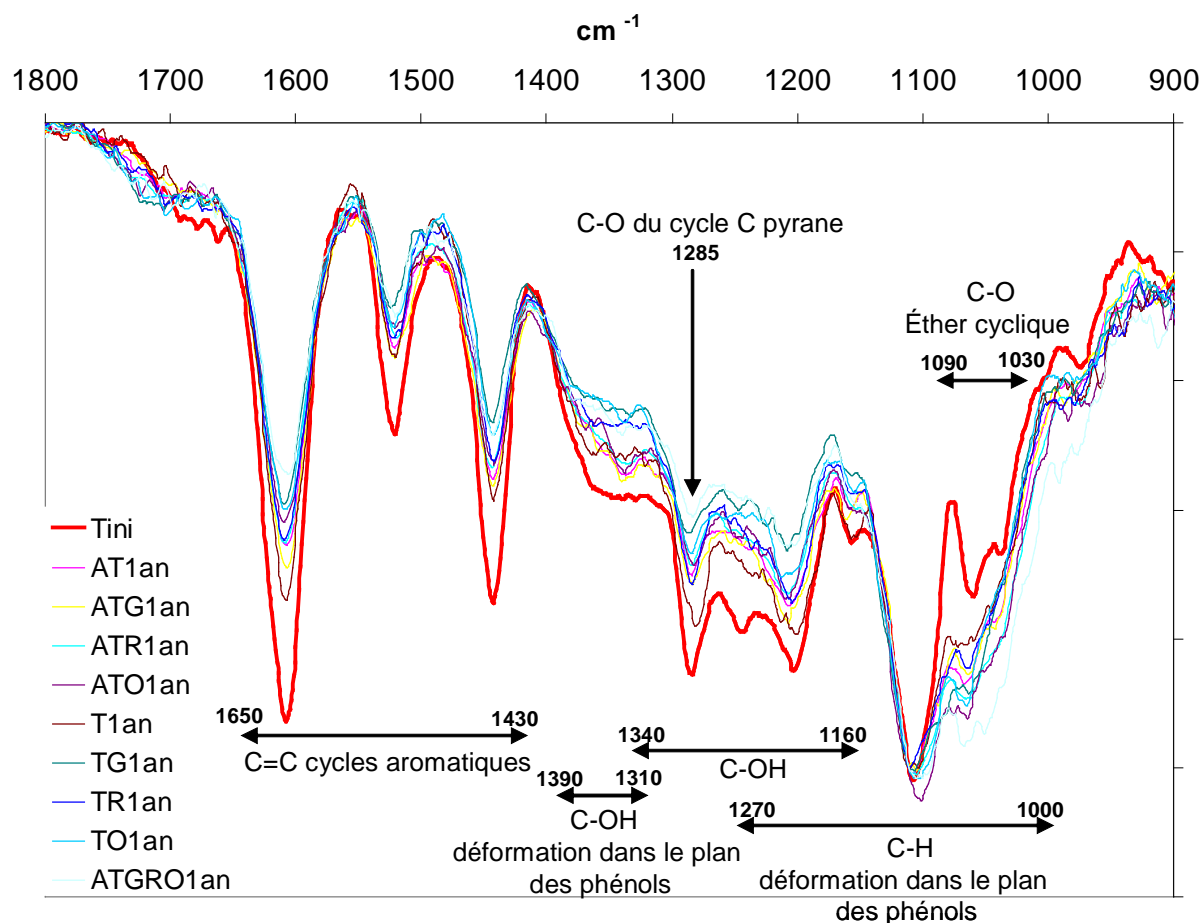


Figure 92. Spectres IR de la fraction de tanins initiales Tini et des précipités des solutions après 1 an.

Les principales bandes des spectres IR des précipités sont moins intenses que celles de la fraction de tanins initiale Tini, excepté la bande entre 1090 et 1030 cm^{-1} . Cette bande correspond aux C-O des éthers cycliques caractéristiques des liaisons de type A. L'analyse infra rouge des précipités confirme également la présence de liaisons de type A.

Sur ces spectres IR, nous ne détectons ni la présence d'acide tartrique ni la présence d'AGP3 qui ont pourtant des spectres caractéristiques. Ils sont probablement en faible quantité.

VI. CONCLUSION

Le travail présenté dans ce chapitre a permis d'aborder plusieurs aspects essentiels à la compréhension des phénomènes observés dans le milieu vin :

- l'implication des composés phénoliques (anthocyanes et tanins) dans la couleur et son évolution
- la stabilité colloïdale des solutions en fonction de leur composition en polyphénols et en polysaccharides.
- la formation de structures dérivées de tanins (tanins oxydés et dérivés tanins-anthocyanes) et leur nature.

La présence de tanins stabilise clairement les anthocyanes et renforce l'intensité colorante. Ce phénomène peut être expliqué tout d'abord par un phénomène de copigmentation renforçant la couleur des pigments anthocyaniques dans les solutions contenant les tanins, puis, avec une importance croissante au cours du vieillissement, par la formation de nombreux pigments issus de réactions entre tanins et anthocyanes (pigments qui ont été identifiés en solution). Nous n'avons pas observé d'influence des sucres sur ces phénomènes. L'analyse fine de chaque composante (420, 520, 620 nm) de l'intensité colorante et des coordonnées L^* , a^* , b^* a été primordiale pour comprendre l'évolution qualitative de la couleur. En effet, nous avons mis en évidence les limites d'un indice global tel que l'IC puisque l'évolution de la composition entraîne une augmentation des absorbances à 420 et 620 nm qui est compensée par une diminution de l'absorbance à 520 nm, modification qui n'est pas traduite par l'indice.

En ce qui concerne la stabilité colloïdale des solutions, les sucres semblent jouer sur la cinétique d'agrégation des tanins. En effet, celle-ci est plus forte dans la solution contenant l'AGP et conduit rapidement à la précipitation des tanins. Elle semble retardée en présence de RG-II et d'oligosaccharides par rapport à la solution contenant uniquement les tanins. Des études plus approfondies sur l'évolution des structures des sucres au cours du temps et en présence de tanins devront être envisagées pour mieux comprendre ces phénomènes. Les solutions d'anthocyanes ne présentent que peu d'agrégation et aucune précipitation n'y a été observée, même après un an d'incubation. L'agrégation des tanins est aussi réduite en présence d'anthocyanes, ce qui indique que les produits résultant des réactions entre anthocyanes et tanins sont plus solubles que ceux issus des réactions des tanins seuls.

L'étude des solutions à un stade très avancé d'évolution a permis de marquer les différences de réactivité des tanins en présence ou non des anthocyanes. Les principales réactions observées dans les solutions de tanins seuls sont des réactions d'oxydation et les produits correspondant se caractériseraient par la formation de liaison de type A. Ces modifications structurales entraînent un changement des propriétés physico-chimiques important, notamment au niveau de leur solubilité. Le peu de structures non modifiées de tanins retrouvés dans les précipités sont de plus haut DPm que celles restants en solution, caractérisées par un plus faible DPm et un pourcentage de galloylation plus élevé. Les anthocyanes subissent d'un part des réactions de dégradation impliquant la rupture de l'hétérocycle, d'autre part, des réactions de polymérisation. Les anthocyanes et les tanins se protègent mutuellement de la dégradation. Les anthocyanes limitent l'hydrolyse des unités galloylées qui se retrouvent en plus grande quantité dans les surnageants. L'analyse des pigments dérivés a montré l'incorporation d'unités d'anthocyanes dans les chaînes de tanins qui pourrait expliquer leur protection mutuelle.

Cette étude montre des évolutions très importantes qui conduisent à des structures formées complexes qui sont difficiles à caractériser malgré le panel de techniques analytiques utilisées.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

L'objectif initial de ce travail était d'analyser l'effet des enzymes de macération sur la composition des vins en polyphénols et en polysaccharides afin de mieux appréhender leur impact sur la qualité des vins rouges.

La démarche adoptée a consisté dans un premier temps à caractériser l'influence des traitements enzymatiques sur la composition chimique des vins au travers de méthodes analytiques de pointe. L'analyse des vins n'expliquant pas complètement les phénomènes, notamment au niveau de la couleur, en raison d'une grande complexité des voies de réactions des anthocyanes et des tanins et de l'impossibilité de déterminer les quantités initialement extraites, une approche en solution modèle a été mise en place dans un second temps.

En ce qui concerne les principaux résultats, les analyses de vins réalisées sur trois millésimes ont permis de mettre en évidence une augmentation systématique de la concentration en tanins et en RG-II. L'impact des enzymes sur la couleur et sur la concentration en polysaccharides riches en arabinose et galactose est modulé par l'effet millésime. Il semble que lorsque la maturité des baies est importante, la dégradation des parois par des enzymes endogènes permet une bonne extraction des composés, de sorte que l'effet des traitements enzymatiques est peu marqué. Lorsque la maturité n'est pas pleinement atteinte, l'utilisation de préparations enzymatiques exogènes permet une extraction accrue de tanins et des anthocyanes, ces dernières étant rapidement converties en pigments dérivés. La couleur n'est pas directement corrélée aux anthocyanes et peut être expliquée par la modification du rapport anthocyanes sur tanins induite par les enzymes dès le début de la vinification lors de l'extraction de ces composés. Le gain de couleur observé dans les vins enzymés est alors dû au phénomène de copigmentation et à la formation de pigments dérivés issus des réactions entre anthocyanes et tanins.

Les oligosaccharides présents dans les vins ont été isolés et caractérisés pour la première fois. Ils sont principalement issus de la dégradation des zones lisses des pectines dans les vins témoins et de celle des zones hérissées des pectines dans les vins enzymés, démontrant des mécanismes de dégradation des pectines spécifiques aux préparations enzymatiques commerciales par rapport aux enzymes endogènes. Cette étude a également

permis de mettre en évidence une structure issue d'un glucuronoxylane qui n'avait jamais été décrite et dont l'identification devra être confirmée.

Au niveau de l'étude des solutions modèles, le plan d'expérience tel qu'il a été réalisé a permis de mettre en évidence :

- une protection mutuelle des anthocyanes et des tanins vis-à-vis des phénomènes de dégradation
- l'influence des sucres sur la stabilité colloïdale qui dépend de leur structure et/ou de leur taille, surtout en ce qui concerne les arabinogalactane-protéines.
- un phénomène de copigmentation induit par les tanins et renforçant la couleur
- la formation de pigments dérivés qui contribuent au maintien de la couleur lors de l'évolution des solutions.

Le niveau de dégradation atteint dans les solutions modèles après 1 an est certainement lié aux vitesses de réaction qui ont été amplifiées par le choix d'une température relativement élevée (25°C) par rapport à la température de vinification puis de conservation des vins. Ce stade d'évolution avancé nous a permis de mettre en évidence les différentes propriétés physico-chimiques des structures formées. Les hypothèses de structures devront être confirmées par l'étude de leur schéma de fragmentation en spectrométrie de masse avant et après dépolymérisation. Leur grande diversité engendre des difficultés au niveau de leur analyse. En particulier, leur résistance à la phloroglucinolyse dans les conditions testées nécessite de développer des méthodes plus drastiques de dépolymérisation. Par ailleurs, des études sur la longueur des chaînes des « tanins pigmentés » devront être envisagées en chromatographie d'exclusion stérique avant et après dépolymérisation pour évaluer d'une façon générale l'évolution des DP. Les analyses réalisées par diffusion dynamique de la lumière ont montré une meilleure solubilité de ces pigments, par rapport aux tanins eux-mêmes et aux produits formés à partir des tanins seuls. Elles ont également établi l'influence des polysaccharides sur les cinétiques d'agrégation et de précipitation. Aussi bien en présence qu'en l'absence d'anthocyanes, la fraction d'AGP testée augmente fortement l'agrégation des tanins, tandis que les fractions d'oligosaccharides et de RGII l'inhibent. La fraction protéique présente dans la structure de l'AGP pourrait jouer un rôle dans ces phénomènes d'agrégation et de précipitation. L'impact de ces différentes fractions sur l'astringence des vins reste à déterminer. Cependant, nos résultats, en accord avec ceux d'études antérieures, suggèrent que la conversion des tanins en adduits tanins-anthocyanes plus solubles que les tanins pourrait jouer un rôle dans la diminution de ce caractère au cours du vieillissement des vins.

D'un point de vue œnologique, les enzymes modifiant la teneur en tanins et en polysaccharides doivent donc avoir un rôle sur la stabilité colloïdale des vins au vu des résultats obtenus en solutions modèles. Il faudrait envisager de tester les fractions de polysaccharides et surtout d'oligosaccharides spécifiques de la dégradation des pectines par les enzymes : fractions pauvres en arabinose, riches en structures issues des zones hérissées des pectines. En enrichissant le vin en tanins dès la vinification, les enzymes de macération peuvent orienter les réactions entre les anthocyanes et les tanins et favoriser la formation de pigments dérivés à la fois des anthocyanes et des tanins. Les solutions modèles ont aussi clairement démontré l'intensification de la couleur par un phénomène de copigmentation impliquant les tanins. Des analyses sensorielles devront être réalisées pour étudier et corrélérer toutes ces données de composition avec les propriétés sensorielles telles que l'astringence et sa modulation en présence de nouveaux polysaccharides.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Albersheim, P., Darvill, A. G., O'Neill, M. A., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (1996). An hypothesis: The same polyasaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. In: *Pectins and Pectinases* (pp. 47-55). Wageningen.

Albersheim, P., Nevins, D. J., English, P. D., & Karr, A. (1967). A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas liquid chromatography. *Carbohydrate Research*, 5, pp. 340-345.

Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailon, M., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. (2007). Identification of dimeric anthocyanins and new oligomeric pigments in red wine by means of HPLC-DAD-ESI/MSn. *Journal of Mass Spectrometry*, 42(6), 735-748.

Amrani Joutei K. (1993). Localisation des anthocyanes et des tanins dans le raisin-Etude de leur extractibilité. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux II, Bordeaux.

Arnous, A., & Meyer, A. (2009). Quantitative Prediction of Cell Wall Polysaccharide Composition in Grape (*Vitis vinifera* L.) and Apple (*Malus domestica*) Skins from Acid Hydrolysis Monosaccharide Profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3611-3619.

Asen, S. (1972). Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*, 11, 1139-1144.

Atanasova, V. (2003). Réactions des composés phénoliques induites dans les vins rouges par la technique de micro-oxygénation. Caractérisation de nouveaux produits de condensation des anthocyanes avec l'acétaldéhyde. *Thèse de doctorat*. Montpellier: Supagro.

Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2002). Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine making. *Analytica Chimica Acta*, 458, 15-27.

Ayestaran, B., Guadalupe, Z., & Leon, D. (2004). Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 29-39.

Bakker, J., & Timberlake, C. F. (1997). Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(1), 35-43.

Barbe, C. (1995). Recherches sur les activités estérases contaminantes des préparations pectolytiques., *Thèse de doctorat*. Bordeaux: Université Bordeaux II.

Barnavon, L. (1999). Etude d'enzymes et de l'expression des gènes correspondants impliqués dans l'évolution des polysaccharides pariétaux au cours du développement de la baie de raisin., *Thèse de doctorat*. Montpellier: Université Montpellier II.

- Barnavon, L., Doco, T., Terrier, N., Ageorges, A., Romieu, C., & Pellerin, P.** (2000). Analysis of cell wall neutral sugar composition, β -galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis vinifera* grape berries. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(4), 289-300.
- Barnavon, L., Doco, T., Terrier, N., Ageorges, A., Romieu, C., & Pellerin, P.** (2001). Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape berries: partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methyl-esterification of cell wall pectins. *Phytochemistry*, 58(5), 693-701.
- Bate-Smith, E. C.** (1954). Astringency in foods. *Food*, 23, 124-135.
- Baumes, R., Cordonnier, R., Nitz, S., & Drawert, F. (1986). Identification and Determination of Volatile Constituents in Wines from Different Vine Cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(9), 927-943.
- Bautista-Ortin, A. B., Martinez-Cutillas, A., Ros-Garcia, J. M., Lopez-Roca, J. M., & Gomez-Plaza, E.** (2005). Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science and Technology*, 40(8), 867-878.
- Belleville, M. P., Brillouet, J. M., Delafuente, B. T., & Moutounet, M.** (1992). Fouling Colloids During Microporous Alumina Membrane Filtration of Wine. *Journal of Food Science*, 57(2), 396-400.
- Belleville, M. P., Williams, P., & Brillouet, J. M.** (1993). A Linear Arabinan from a Red Wine. *Phytochemistry*, 33(1), 227-229.
- BenAbdeljalil, C., Cheynier, V., Fulcrand, H., Hakiki, A., Mosaddak, M., & Moutounet, M.** (2000). Mise en évidence de nouveaux pigments formés par réaction des anthocyanes avec des métabolites de levures. *Sciences des Aliments*, 20, 203-220.
- Berke, B., Chèze, C., Vercauteren, J., & Deffieux, G.** (1998). Bisulfite addition to anthocyanins : revisited structures of colourless adducts. *Tetrahedron Letters*, 39, 5771-5774.
- Boissier, B. (2006). Microfiltration tangentielle des vins: Etude du colmatage et optimisation du procédé. *Thèse de doctorat* (p. 210). Montpellier, France: Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.
- Borie, B., Jeandet, P., Parize, A., Bessis, R., & Adrian, M.** (2004). Resveratrol and stilbene synthase mRNA production in grapevine leaves treated with biotic and abiotic phytoalexin elicitors. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(1), 60-64.
- Boukharta, M., Girardin, M., & Metche, M.** (1988). Procyanidines galloylées du sarment de vigne (*Vitis vinifera*) separation et identification par chromatographie liquide haute performance et chromatographie en phase gazeuse. *Journal of Chromatography*, 455, 406-409.
- Boulton, R.** (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 67-87.

- Bourzeix, M., Weyland, D., & Heredia, N.** (1986). Etude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bulletin de l'OIV*, 669-670, 1171-1253.
- Brossaud, F., Cheynier, V., & Noble, A.** (2001). Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7, 33-39.
- Brouillard, R., & Dangles, O.** (1994). Anthocyanin molecular interactions : the first step in the formation of new pigments during wine aging. *Food Chemistry*, 51, 365-371.
- Brouillard, R., Dangles, O., Jay, M., Biolley, J. P., & Chirol, N.** (1993). Polyphenols and pigmentation in plants. In: A. Scalbert, *Polyphenolic phenomena*, vol. (pp. 41-47).
- Brouillard, R., & Dubois, J.-E.** (1977). Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *Journal of the American Chemical Society*, 99(5), 1359-1364.
- Brouillard, R., Mazza, G., Saad, Z., Albrecht-Gary, A. M., & Cheminat, A.** (1989). The copigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 111, 2604-2610.
- Brown, M. R., & Ough, C. S.** (1982). Effects of 2 Different Pectic Enzyme Preparations, at Several Activity Levels, on 3 Pectin Fractions of a White Must. *American Journal of Enology and Viticulture*, 33(1), 41-43.
- Cai, Y., Lilley, T. H., & Haslam, E.** (1990). Polyphenol-anthocyanin copigmentation. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communication*, 5, 380-383.
- Cameira dos Santos, J. P., Brillouet, J.-M., Cheynier, V., & Moutounet, M.** (1996). Detection and partial characterization of new anthocyanin-derived pigments in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70, 204-208.
- Cameira Dos Santos, P. J.** (1995). Colmatage en microfiltration tangentielle : mise en évidence d'interactions entre les polysaccharides et polyphénols du vin et des membranes polymériques. *Thèse de doctorat*. Montpellier, France: Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.
- Canal-Llaubères, R. M.** (1990). Utilisation des enzymes dans les procédés d'extraction en oenologie. *Revue Française d'Oenologie*, 122, 28-33.
- Canal-Llaubères, R. M.** (2000). Les enzymes et leur application en oenologie. *Produits de traitement et auxiliaires d'élaboration des moûts et des vins* (pp. 43-60). Bordeaux.
- Canal-Llaubères, R. M., & Barbe, C.** (1989). Les enzymes industrielles dans la biotechnologie du vin. *La Revue des Oenologues*, 50, 17-22.
- Canals, R., Llaudy, M., Valls, J., Canals, J., & Zamora, F.** (2005). Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skins and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4019-4025.

- Canon, F., Meudec, E., Marlin, T., Sarni-Manchado, P., & Cheynier, V.** (2008). Basic salivary proline rich proteins involved in astringency studied by mass spectrometry. In: *8th European Symposium on Saliva* (p. 33). Egmond aan Zee, The Netherlands.
- Carpita, N. C., & Gibeaut, D. M.** (1993). Structural Models of Primary-Cell Walls in Flowering Plants - Consistency of Molecular-Structure with the Physical-Properties of the Walls During Growth. *Plant Journal*, *3*(1), 1-30.
- Carvalho, E., Mateus, N., Plet, B., Pianet, I., Dufourc, E., & De Freitas, V.** (2006). Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(23), 8936-8944.
- Cemeroglu, B., Velioglu, S., & Isik, S.** (1994). Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. *Journal of Food Science*, *59*(6), 1216-1218.
- Chanliaud, E., De Silva, J., Strongitharm, B., Jeronimidis, G., & Gidley, M. J.** (2004). Mechanical effects of plant cell wall enzymes on cellulose/xyloglucan composites. *Plant Journal*, *38*(1), 27-37.
- Chatonnet, P., Barbe, C., Boidron, J. N., & Dubourdieu, D.** (1993). Origines et incidences organoleptiques de phénols volatils dans les vins. Application à la maîtrise de la vinification et de l'élevage. *Revue Française d'Oenologie*, 279-287.
- Chatonnet, P., Barbe, C., Canal-Llaubères, R. M., Dubourdieu, D., & Boidron, J. N.** (1992). Incidences de certaines préparations pectolytiques sur la teneur en phénols volatils des vins blancs. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 279-287.
- Cheynier, V., Basire, N., & Rigaud, J.** (1989). Mechanism of *trans*-caffeoyl tartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *37*, 1069-1071.
- Cheynier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.-M., Sarni-Manchado, P., & Fulcrand, H.** (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, *57*(3), 298-305.
- Cheynier, V., Fulcrand, H., Sarni, P., & Moutounet, M.** (1997a). Application des techniques analytiques à l'étude des composés phénoliques et de leurs réactions au cours de la vinification. *Analisis*, *25*(3), M14-M21.
- Cheynier, V., Fulcrand, H., Sarni, P., & Moutounet, M.** (1997b). Reactivity of phenolic compounds in wine : Diversity of mechanisms and resulting products. In: *In Vino analytica scientia*, vol. 1 (pp. 143-154). Bordeaux.
- Coombe, B. G.** (1987). Distribution of Solutes within the Developing Grape Berry in Relation to Its Morphology. *American Journal of Enology and Viticulture*, *38*(2), 120-127.
- Cordonnier, R., Günata, Y. Z., Baumes, R. L., & Bayonove, C. L.** (1989). Recherche d'un matériel enzymatique adapté à l'hydrolyse des précurseurs d'arôme de nature glycosidique du raisin. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, *1*, 7-23.

- Czochanska, Z., Foo, L. Y., Newman, R. H., & Porter, J. L.** (1980). Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, structural units and molecular weight. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions I*, 2278-2286.
- Dangles, O., & Brouillard, R.** (1992a). Polyphenol interactions. The copigmentation case: thermodynamic data from temperature variation and relaxation kinetics. Medium effect. *Canadian Journal Chemistry*, 70, 2174-2189.
- Dangles, O., & Brouillard, R.** (1992b). A spectroscopic method based on the anthocyanin copigmentation interaction and applied to the quantitative study of molecular complexes. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions II*, 247-257.
- Dangles, O., Saito, N., & Brouillard, R.** (1993). Anthocyanin intramolecular copigment effect. *Phytochemistry*, 34(1), 119-124.
- Darvill, A. G., McNeil, M., & Albersheim, P.** (1978). Structure of Plant-Cell Walls .8. New Pectic Polysaccharide. *Plant Physiology*, 62(3), 418-422.
- Doco, T., Brillouet, J. M., & Moutounet, M.** (1996). Evolution of grape (Carignan noir cv) and yeast polysaccharides during fermentation and post-maceration. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(1), 108-110.
- Doco, T., Lecas, M., Pellerin, P., Brillouet, J.-M., & Moutounet, M.** (1995). Les polysaccharides pectiques de la pulpe et de la pellicule de raisin. Quel devenir pendant la phase pré-fermentaire? *Revue Française d'Oenologie*, 153, 16-23.
- Doco, T., O'Neill, M. A., & Pellerin, P.** (2001). Determination of the neutral and acidic glycosyl-residue compositions of plant polysaccharides by GC-EI-MS analysis of the trimethylsilyl methyl glycoside derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 46, 249-259.
- Doco, T., Pellerin, P., & Moutounet, M.** (1997). L'apport de la spectrométrie de masse dans l'analyse des constituants du vin : applications aux glucides complexes. In: *Proceedings In Vino Analytica* (pp. 128-131). Bordeaux.
- Doco, T., Quellec, N., Moutounet, M., & Pellerin, P.** (1999). Polysaccharide patterns during the aging of Carignan noir red wines. *American Journal Enology and Viticulture*, 50(1), 28-32.
- Doco, T., Williams, P., & Cheynier, V.** (2007). Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6643-6649.
- Doco, T., Williams, P., Pauly, M., O'Neill, M. A., & Pellerin, P.** (2003). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 53(3), 253-261.
- Doco, T., Williams, P., Vidal, S., & Pellerin, P.** (1997). Rhamnogalacturonan II, a dominant polysaccharide in juices produced by enzymic liquefaction of fruits and vegetables. *Carbohydrate Research*, 297(2), 181-186.

Domon, B., Costello, C. E. (1988). Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass-spectrometry. *Biochemistry*, 27(5), 1534-1543.

Dubourdiou D. (1978) Etude des polysaccharides secretes par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin. Incidence sur les difficultés de clarification des vins de vendanges pourries. Thèse de doctorat. Bordeaux, France.

du Penhoat, C. H., Gey, C., Pellerin, P., & Perez, S. (1999). An NMR solution study of the mega-oligosaccharide, rhamnogalacturonan II. *Journal of Biomolecular NMR*, 14(3), 253-271.

Duenas, M., Salas, E., Cheynier, V., Dangles, O., & Fulcrand, H. (2006). UV-Visible spectroscopic investigation of the 8-8-methylmethine catechin-malvidin 3-Glucoside pigments in aqueous solution : structural transformations and molecular complexation with chlorogenic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 189-196.

Dupin, I., Günata, Y. Z., Sapis, J. C., Bayonove, C. L., M'bairaroua, O., & Tapiero, C. (1992). Production of β -apiosidase by *Aspergillus niger*. partial purification, properties, and effect on terpenyl apiosylglycosides from grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1886-1891.

Ebringerova, A., & Heinze, T. (2000). Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1 - Naturally occurring xylans structures, procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 21(9), 542-556.

Edelmann, A., & Lendl, B. (2002). Toward the optical tongue: Flow-through sensing of tannin-protein interactions based on FTIR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 124(49), 14741-14747.

Es-Safi, N., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1999a). Competition between (+)-catechin and (-)-epicatechin in acetaldehyde-induced polymerization of flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(5), 2088-2095.

Es-Safi, N., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1999b). Studies on the acetaldehyde-induced condensation of (-)-epicatechin and malvidin 3-O-glucoside in a model solution system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(5), 2096-2102.

Fernandez, K., Labarca, X., Bordeu, E., Guesalaga, A., & Agosin, E. (2007). Comparative study of wine tannin classification using Fourier transform mid-infrared spectrometry and sensory analysis. *Applied Spectroscopy*, 61(11), 1163-1167.

Figueiredo, P., Elhabiri, M., Toki, K., Saito, N., Dangles, O., & Brouillard, R. (1996). New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as means for colour loss? *Phytochemistry*, 41(1), 301-308.

Flanzy, C. (1998). *Oenologie - Fondements scientifiques et technologiques*. Paris: Lavoisier.

- Fougère-Rifot, M., Cholet, C., & Bouard, J.** (1996). Evolution des parois des cellules de l'hypoderme de la baie de raisin lors de leur transformation en cellules de pulpe. *Journal International de la Vigne et du Vin*, 30(2), 47-51.
- Francia-Aricha, E. M., Guerra, M. T., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C.** (1997). New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2262-2266.
- Francioli, S., Buxaderas, S., & Pellerin, P.** (1999). Influence of *Botrytis cinerea* on the polysaccharide composition of xarel.lo musts and cava base wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(4), 456-460.
- Fry, S. C.** (2004). Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist*, 161, 641-675.
- Fry, S. C., York, W. S., Albersheim, P., Darvill, A., Hayashi, T., Joseleau, J.-P., Kato, Y., Lorences, P. E., Maclachlan, G. A., McNeil, M., Mort, A. J., Reid, J. S. G., Seitz, H. U., Selvendran, R. R., Voragen, A. G., & A.R., W.** (1993). An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiologia Plantarum*, 89(1), 1-3.
- Fulcrand, H., Atanasova, V., Salas, E., & Cheynier, V.** (2004). The fate of anthocyanins in wine: are there determining factors? In: A. L. Waterhouse, & J. Kennedy, *Red wine color: revealing the mysteries*, vol. 886 (pp. 68-85). Washington, DC: American Chemical Society Publication.
- Fulcrand, H., Benabdeljalil, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M.** (1998). A new class of wine pigments yielded by reactions between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry*, 47(7), 1401-1407.
- Fulcrand, H., Cameira dos Santos, P. J., Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., & Favre-Bonvin, J.** (1996). Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 7, 735-739.
- Fulcrand, H., Mané, C., Preys, S., Mazerolles, G., Bouchut, C., Mazaauric, J.-P., Souquet, J.-M., Meudec, E., Li, Y., Cole, R. B., & Cheynier, V.** (2008). Direct mass spectrometry approaches to characterize polyphenol composition of complex samples. *Phytochemistry*, 69(18), 3131-3138.
- Gerbaud, V., Gabas, N., Laguerie, C., Blouin, J., Vidal, S., Moutounet, M., & Pellerin, P.** (1996). Effect of wine polysaccharides on the nucleation of potassium hydrogen tartrate in model solutions. *Chemical Engineering Research and Design*, 74(A7), 782-790.
- Gil-Munoz, R., Gomez-Plaza, E., Martinez, A., & Lopez-Roca, J. M.** (1997). Evolution of the CIELAB and other spectrophotometric parameters during wine fermentation. Impact of some pre and postfermentative factors. *Food Research International*, 30(9), 699-705.
- Glories, Y.** (1984). La couleur des vins rouges. 2eme partie. origine et interprétation. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 18, 253-271.

- Glories, Y., Crico, N. S., Vivas, N., & Augustin, M.** (1996). Identification et dosage de la procyanidine A2 dans les raisin et les vins de *Vitis vinifera* L. C. V. merlot noir, cabernet sauvignon et cabernet franc. In: *Polyphenols Communications 96*, vol. 1 (pp. 153-154). Bordeaux.
- Gomez-Miguez, M. J., Gonzalez-Miret, M. L., Hernanz, D., Fernandez, M. A., Vicario, I. M., & Heredia, F. J.** (2007). Effects of prefermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. *Journal of Food Engineering*, 78, 238-245.
- Gonzalez-Manzano, S., Duenas, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Escribano-Bailon, M. T., & Santos-Buelga, C.** (2009). Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food Chemistry*, 114(2), 649-656.
- Gorshkova, T. A., Wyatt, S. E., Salnikov, V. V., Gibeaut, D. M., Ibragimov, M. R., Lozovaya, V. V., & Carpita, N. C.** (1996). Cell-wall polysaccharides of developing flax plants. *Plant Physiology*, 110(3), 721-729.
- Goto, T., & Kondo, T.** (1991). Structure and molecular stacking of anthocyanins. Flower color variation. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 30(1), 17-33.
- Guadalupe, Z., Palacios, A., & Ayestaran, B.** (2007). Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4854-4862.
- Günata, Y. Z., Dugelay, I., Sapis, J. C., Baumes, R., & Bayonove, C. L.** (1993). Role of the enzymes in the use of the flavour potential from grape glycosides in winemaking. In: P. Schreier, & P. Winterhalter, *Progress in flavour precursor studies* (pp. 219-234). Allured Wheaton.
- Guyot, S.** (1994). Obtention et caractérisation de produits d'oxydation enzymatique de la (+)-catéchine et de l'acide caféoyltartrique. Inhibition d'enzymes impliquées dans la dégradation des polysaccharides pariétaux. *Thèse de doctorat*. France: Université de Rennes I.
- Guyot, S., Vercauteren, J., & Cheynier, V.** (1996). Colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin oxidative coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry*, 42, 1279-1288.
- Hakomori, S.-I.** (1964). A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *Journal of Biochemistry*, 55, pp. 205-208
- Harris, P. J., Henri, R. J., Blakeney, A. B., & Stone, B. A.** (1984). An improved method for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 55, 205-208.
- Haslam, E.** (1974). Polyphenol-protein interactions. *Biochemical Journal*, 139, 285-288.
- Haslam, E.** (1980). In vino veritas : oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry*, 19, 2577-2582.

- Haslam, E.** (1998). Anthocyanin copigmentation - fruit and floral pigments. In: E. Haslam, *Practical polyphenolics. from structure to molecular recognition and physiological action* (pp. 265-297). Cambridge: Cambridge University Press.
- Hernandez, B., Saenz, C., de la Hoz, F., Alberdi, C., Alfonso, S., & Dineiro, J. M.** (2009). Assessing the Color of Red Wine Like a Taster's Eye. *Color Research and Application*, 34(2), 153-162.
- Hoshino, T.** (1991). An approximate estimate of self-association constants and the self-stacking conformation of malvin quinonoidal bases studied by ¹H NMR. *Phytochemistry*, 30(6), 2049-2055.
- Hrazdina, G., & Borzell, A. J.** (1971). Xanthylum derivatives in grape extracts. *Phytochemistry*, 10, 2211-2113.
- Hrazdina, G., & Franzese, A. J.** (1974). Oxidation products of acylated anthocyanins under acidic and neutral conditions. *Phytochemistry*, 13, 231-234.
- Huang, X.-M., Huang, H.-B., & Wang, H.-C.** (2005). Cell walls of loosening skin in post-veraison grape berries lose structural polysaccharides and calcium while accumulate structural proteins. *Scientia Horticulturae*, 104(3), 249-263.
- Humbert-Goffard, A., Basque, E., Vatin, L., Canal-Llaubères R-M.** (2003). Rôle des préparations enzymatiques à base de β -glucanases sur la mise au propre et la filtration des vins. *Revue Française d'Oenologie*, 201, 28-31.
- Ishii, T., Ichita, J., Matsue, H., Ono, H., & Maeda, I.** (2002). Fluorescent labeling of pectic oligosaccharides with 2-aminobenzamide and enzyme assay for pectin. *Carbohydrate Research*, 337(11), 1023-1032.
- Ishii, T., & Matsunaga, T.** (2001). Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. *Phytochemistry*, 57(6), 969-974.
- Ishii, T., Matsunaga, T., Pellerin, P., O'Neill, M. A., Darvill, A., & Albersheim, P.** (1999). The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. *Journal Biological Chemistry*, 274(19), 13098-13104.
- Jarvis, M. C., Briggs, S. P. H., & Knox, J. P.** (2003). Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant Cell and Environment*, 26(7), 977-989.
- Jeandet, P., Bessis, R., & Gautheron, B.** (1991). The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystibene) by grape berries in different developmental stages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42(1), 41-46.
- Jensen, J. S., Egebo, M., & Meyer, A. S.** (2008). Identification of spectral regions for the quantification of red wine tannins with Fourier transform mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3493-3499.

- Jordao, A. M., Ricardo-da-Silva, J. M., & Laureano, O.** (2006). Effect of oak constituents and oxygen on the evolution of malvidin-3-glucoside and (+)-catechin in model wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 377-381.
- Jordheim, M., Fossen, T., & Andersen, O. M.** (2006). Characterization of hemiacetal forms of anthocyanidin 3-o-b-glycopyranosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25), 9340-9346.
- Kammerer, D., Claus, A., Schieber, A., & Carle, R.** (2005). A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *Journal of Food Science*, 70(2), C157-C163.
- Kelebek, H., Canbas, A., Cabaroglu, T., & Selli, S.** (2007). Improvement of anthocyanin content in the cv. Okuzgozu wines by using pectolytic enzymes. *Food Chemistry*, 105(1), 334-339.
- Kennedy, J., & Jones, G. P.** (2001). Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1740-1746.
- Konishi, T., Ono, H., Ohnishi-Kameyama, M., Kaneko, S., & Ishii, T.** (2006). Identification of a mung bean arabinofuranosyltransferase that transfers arabinofuranosyl residues onto (1,5)-linked alpha-L-arabino-oligosaccharides. *Plant Physiology*, 141(3), 1098-1105.
- Kotake, T., Dina, S., Konishi, T., Kaneko, S., Igarashi, K., Samejima, M., Watanabe, Y., Kimura, K., & Tsumuraya, Y.** (2005). Molecular cloning of a beta-galactosidase from radish that specifically hydrolyzes beta-(1 -> 3)- and beta-(1 -> 6)-galactosyl residues of arabinogalactan protein. *Plant Physiology*, 138(3), 1563-1576.
- Koupai-Abyazani, M. R., Muir, A. D., Bohm, B. A., Towers, G. H. N., & Gruber, M. Y.** (1993). The proanthocyanidin polymers in some species of *Onobrychis*. *Phytochemistry*, 34(1), 113-117.
- Labarbe, B.** (2000). Le potentiel polyphénolique de la grappe de *Vitis vinifera* var. Gamay noir et son devenir en vinification beaujolaise. *Thèse de doctorat*. Montpellier, France: ENSA-M, UMI, UMII.
- Lao, C., LopezTamames, E., Buxaderas, S., & delaTorreBoronat, M. C.** (1996). Grape pectic enzyme treatment effect on white musts & wines composition. *Journal of Food Science*, 61(3), 553-556.
- Le Roux, E.** (1999). Etude des composés phénoliques et des systèmes enzymatiques impliqués dans le brunissement du péricarpe de litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *Thèse de doctorat*. Aix-Marseille: Université Aix-Marseille III.
- Le Traon-Masson, M.-P., & Pellerin, P.** (1998). Purification and characterization of two β -D-glucosidases from an *Aspergillus niger* enzyme preparation : affinity and specificity toward glucosylated compounds characteristic of the processing of fruits. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 374-382.

- Lea, A.** (1978). The phenolics of cider : oligomeric and polymeric procyanidins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29, 471-477.
- Lecas, M.** (1994). Composition et structure des polymères constitutifs des parois cellulaires de la pellicule de la baie de raisin. Application d'enzymes fongiques liquéfiant les parois à fin d'extraction des substances colorantes., *Thèse de doctorat*. Grenoble: Université Joseph Fourier - Grenoble I.
- Liao, H., Cai, Y., & Haslam, E.** (1992). Polyphenol interactions. Anthocyanins: co-pigmentation and colour changes in red wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59, 299-305.
- Liu, S. Q., & Pilone, G. J.** (2000). An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International Journal of Food Science and Technology*, 35(1), 49-61.
- Llaubères, R. M., Dubourdiou, D., & Villettaz, J. C.** (1987). Exocellular polysaccharides from *Saccharomyces* in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 41, 277-286.
- Llop-Tous, I., Dominguez-Puigjaner, E., Palomer, X., & Vendrell, M.** (1999). Characterization of two divergent endo-beta-1,4-glucanase cDNA clones highly expressed in the nonclimacteric strawberry fruit. *Plant Physiology*, 119(4), 1415-1421.
- Lopes, P., Richard, T., Saucier, C., Teissedre, P. L., Monti, J. P., & Glories, Y.** (2007). Anthocyanone A: A quinone methide derivative resulting from malvidin 3-O-glucoside degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(7), 2698-2704.
- Main, G. L., & Morris, J. R.** (2007). Effect of macerating enzymes and postfermentation grape-seed tannin on the color of cynthiana wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(3), 365-372.
- Malien-Aubert, C., Dangles, O., & Amiot, M. J.** (2002). Influence of procyanidins on the color stability of oenin solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3299-3305.
- Mane, C.** (2007). Phénomènes oxydants et composés phénoliques dans les vins blancs de champagne : développements méthodologiques pour l'analyse des polymères. *Thèse de doctorat*. Montpellier: Supagro.
- Mane, C., Souquet, J. M., Olle, D., Verries, C., Veran, F., Mazerolles, G., Cheynier, V., & Fulcrand, H.** (2007). Optimization of Simultaneous Flavanol, Phenolic Acid, and Anthocyanin Extraction from Grapes Using an Experimental Design: Application to the Characterization of Champagne Grape Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18), 7224-7233.
- Marteau, G.** (1972). L'emploi des enzymes en oenologie. *Annales de Technologie Agricole*, 21, 567-587.

- Marteau, G., Scheur, J., & Olivieri, C.** (1963). Le rôle des enzymes pectolytiques du raisin ou de préparations commerciales dans le processus de la clarification des jus. *Annales de Technologie Agricole*, 12(3), 155-176.
- Mateus, N., & Freitas, V. d.** (2001). Evolution and stability of anthocyanin-derived pigments during Port wine aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5217-5222.
- Mateus, N., Silva, A. M. S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C., & de Freitas, V.** (2002). Identification of anthocyanin-flavanol pigments in red wines by NMR and mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2110-2116.
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., & Velasco, R.** (2006). Metabolite Profiling of Grape: Flavonols and Anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7692 - 7702.
- Maury, C., Sarni-Manchado, P., Lefèbvre, S., Cheynier, V., & Moutounet, M.** (2001). Influence of fining with different molecular weight gelatins on proanthocyanidin composition and perception of wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 140-145.
- Mayen, M., Merida, J., & Medina, M.** (1995). Flavonoid and non-flavonoid compounds during fermentation and post-fermentation standing of musts from Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(2), 255-261.
- Mazza, & Miniati** (1993). Pome fruits. In: G. Mazza, & E. Miniati, *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: CRC Press.
- McCann, M. C., Bush, M., Milioni, D., Sado, P., Stacey, N. J., Catchpole, G., Defernez, M., Carpita, N. C., Hofte, H., Ulvskov, P., Wilson, R. H., & Roberts, K.** (2001). Approaches to understanding the functional architecture of the plant cell wall. *Phytochemistry*, 57(6), 811-821.
- Minic, Z., & Jouanin, L.** (2006). Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(7-9), 435-449.
- Morel-Salmi, C., Souquet, J. M., Bes, M., & Cheynier, V.** (2006). The effect of flash release treatment on phenolic extraction and wine composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4270-4276.
- Noble, A. C., & Shannon, M.** (1987). Profiling Zinfandel wines by sensory and chemical analyses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(1), 1-5.
- Nunan, K. J., Sims, I. M., Bacic, A., Robinson, S. P., & Fincher, G. B.** (1998). Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiology*, 118, 783-792.
- Nunan, K. J., Sims, I. M. B., A., Robinson, S. P., & Fincher, G. B.** (1997). Isolation and characterization of cell walls from mesocarp of mature grape berries (*Vitis vinifera*). *Planta*, 203, 93-100.

- O'Donoghue, E. M., Huber, D. J., Timpa, J. D., Erdos, G. W., & Brecht, J. K.** (1994). Influence of Avocado (*Persea-Americana*) Cx-Cellulase on the Structural Features of Avocado Cellulose. *Planta*, *194*(4), 573-584.
- O'Neill, M. A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A. G., & Albersheim, P.** (1996). Rhamnogalacturonan-II, a Pectic Polysaccharide in the Walls of Growing Plant Cell, Forms a Dimer That Is Covalently Cross-linked by a Borate Ester. In vitro conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(37), 22923-22930.
- Oosterveld, A., Beldman, G., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J.** (2000). Characterization of arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides and hemicelluloses from sugar beet pulp. *Carbohydrate Research*, *328*(2), 185-197.
- Pardo, F., Salinas, M. R., Alonso, G. L., Navarro, G., & Huerta, M. D.** (1999). Effect of diverse enzyme preparations on the extraction and evolution of phenolic compounds in red wines. *Food Chemistry*, *67*(2), 135-142.
- Parley, A.** (1997). The effect of pre-fermentation enzyme maceration on extraction and colour stability in pinot noir wine. *Thèse de doctorat*: Lincoln University.
- Pascal, C., Poncet-Legrand, C., Cabane, B., & Vernhet, A.** (2008). Aggregation of a proline-rich protein induced by epigallocatechin gallate and condensed tannins: Effect of protein glycosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(15), 6724-6732.
- Pellerin, P., Doco, T., Vidal, S., Williams, P., Brillouet, J. M., & O'Neill, M. A.** (1996). Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Research*, *290*(2), 183-197.
- Pellerin, P., O'Neill, M. A., Pierre, C., Cabanis, M. T., Darvill, A., Albersheim, P., & Moutounet, M.** (1997). Le plomb est complexé dans les vins par les dimères de rhamnogalacturonane II, un polysaccharide pectique du raisin. *Journal International de la Vigne et du Vin*, *31*, 1-9.
- Pellerin, P., Vidal, S., Williams, P., & Brillouet, J.-M.** (1995). Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red-wine of increasing uronic acid content. *Carbohydrate Research*, *277*, 135-143.
- Pena, C., Larranaga, M., Gabilondo, N., Tejado, A., Echeverria, J. M., & Mondragon, I.** (2006). Synthesis and characterization of phenolic novolacs modified by chestnut and mimosa tannin extracts. *Journal of Applied Polymer Science*, *100*(6), 4412-4419.
- Pianet, I., Andre, Y., Ducasse, M. A., Tarascou, I., Lartigue, J. C., Pinaud, N., Fouquet, E., Dufourc, E. J., & Laguerre, M.** (2008). Modeling procyanidin self-association processes and understanding their micellar organization: A study by diffusion NMR and molecular mechanics. *Langmuir*, *24*(19), 11027-11035.
- Piffaut, B., Kader, F., Girardin, M., & Metche, M.** (1994). Comparative degradation pathways of malvidin3,5-diglucoside after enzymatic and thermal treatments. *Food Chemistry*, *50*, 115-120.

- Pimenta-Braz, P.N., Ricardo-da-Silva, J.M., Laureano, O.** (1998). Evaluation of pectolytic activities of enological interest in industrial enzyme preparations. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 206, 14-20.
- Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. S.** (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology*, 17(11), 579-590.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M.** (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36, 781-784.
- Puvanesarajah, V., Darvill, A. G., & Albersheim, P.** (1991). Structural Characterization of 2 Oligosaccharide Fragments Formed by the Selective Cleavage of Rhamnogalacturonan-2 - Evidence for the Anomeric Configuration and Attachment Sites of Apiose and 3-Deoxy-2-Heptulosaric Acid. *Carbohydrate Research*, 218, 211-222.
- Ralet, M.-C., Lerouge, P., & Quéméner, B.** (2008). Mass spectrometry for pectin structure analysis. *Carbohydrate Research, In Press, Corrected Proof*.
- Redgwell, R. J., Fischer, M., Kendal, E., & MacRae, E. A.** (1997). Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta*, 203(2), 174-181.
- Rein, M. J., & Heinonen, M.** (2004). Stability and enhancement of berry juice color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 3106-3114.
- Reis, A., Coimbra, M. A., Domingues, P., Ferrer-Correia, A. J., & Domingues, M. R. M.** (2004). Fragmentation pattern of underivatized xylo-oligosaccharides and their alditol derivatives by electrospray tandem mass spectrometry. *Carbohydrate Polymers*, 55(4), 401-409.
- Renard, C., Crepeau, M. J., & Thibault, J. F.** (1999). Glucuronic acid directly linked to galacturonic acid in the rhamnogalacturonan backbone of beet pectins. *European Journal of Biochemistry*, 266(2), 566-574.
- Revilla, I., & Gonzalez-San Jose, M. L.** (2003). Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. *International Journal of Food Science and Technology*, 38(1), 29-36.
- Revilla, I., & Gonzalez-Sanjose, M. L.** (2002). Multivariate evaluation of changes induced in red wine characteristics by the use of-extracting agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4525-4530.
- Revilla, I., Perez-Magarino, S., Gonzalez-SanJose, M. L., & Beltran, S.** (1999). Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr A*, 847, 83-90.

- Ribéreau-Gayon, P.** (1965). Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de *V. Vinifera*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 260, 341.
- Ribéreau-Gayon, P.** (1982). The anthocyanins of grapes and wines. In: P. Markakis, *Anthocyanins as food colors* (pp. 209-244). New York: Academic Press.
- Ricardo da Silva, J.** (1992). Procyanidines du raisin et du vin. Structure et propriétés chimiques. *Thèse de doctorat*. France: Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D.** (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57, 929-967.
- Riou, V., Vernhet, A., Doco, T., & Moutounet, M.** (2002). Aggregation of grape seed tannins in model - effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 16, 17-23.
- Robichaud, J. L., & Noble, A. C.** (1990). Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53, 343-353.
- Rodriguez-Carvajal, M. A., du Penhoat, C. H., Mazeau, K., Doco, T., & Perez, S.** (2003). The three-dimensional structure of the mega-oligosaccharide rhamnogalacturonan II monomer: a combined molecular modeling and NMR investigation. *Carbohydrate Research*, 338(7), 651-671.
- Romero-Cascales, I., Fernández-Fernández, J. I., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E.** (2005). The maceration process during winemaking extraction of anthocyanins from grape skins into wine. *European Food Research and Technology*, 221(1 - 2), 163-167.
- Rose, J. K. C., Braam, J., Fry, S. C., & Nishitani, K.** (2002). The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: Current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant and Cell Physiology*, 43(12), 1421-1435.
- Sacchi, K. L., Bisson, L. F., & Adams, D. O.** (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(3), 197-206.
- Salagoity-Auguste, M.-H., & Bertrand, A.** (1984). Wine phenolics - Analysis of low molecular weight components by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35, 1241-1247.
- Salas, E.** (2005). Les pigments du vin rouge : étude des réactions directes entre anthocyanes et flavanols., *Thèse de doctorat*. Montpellier: Supagro.
- Salas, E., Atanasova, V., Poncet-Legrand, C., Meudec, E., Mazauric, J. P., & Cheynier, V.** (2004). Demonstration of the occurrence of flavanol-anthocyanin adducts in wine and in model solutions. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 325-332.
- Salas, E., Fulcrand, H., Meudec, E., & Cheynier, V.** (2003). Reactions of anthocyanins and tannins in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7951-7961.

- Salinas, M. R., Garijo, J., Pardo, F., Zalacain, A., & Alonso, G. L.** (2003). Color, polyphenol, and aroma compounds in rose wines after prefermentative maceration and enzymatic treatments. *American Journal of Enology and Viticulture*, *54*(3), 195-202.
- Santos-Buelga, C., Bravo-Haro, S., & Rivas-Gonzalo, J.** (1995). Interactions between catechin and malvidin-3-monoglucoside in model solutions. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, *201*.
- Sarni-Manchado, P., & Cheynier, V.** (2002). Study of noncovalent complexation between catechin derivatives and peptide by electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS). *Journal of Mass Spectrometry*, *37*(6), 609-616.
- Sarni-Manchado, P., & Cheynier, V.** (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire*. Londres, Paris, New York: Tec & Doc, Lavoisier.
- Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., & Moutounet, M.** (1999). Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 42-47.
- Sarni-Manchado, P., Fulcrand, H., Souquet, J.-M., Cheynier, V., & Moutounet, M.** (1996). Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments. *Journal of Food Science*, *61*(5), 938-941.
- Saucier, C.** (1997). Les tanins du vins : étude de leur stabilité colloïdale. *Thèse de doctorat*. Bordeaux: Université Bordeaux II.
- Saucier, C., Bourgeois, G., Vitry, C., Roux, D., & Glories, Y.** (1997). Characterization of (+)-Catechin-Acetaldehyde polymers : a model for colloidal state of Wine polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(4), 1045-1049.
- Saucier, C., Little, D., & Glories, Y.** (1997). First evidence of acetaldehyde-flavanol condensation products in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, *48*(3), 370-373.
- Saulnier, L., Mercereau, T., & Vezinhet, F.** (1991). Mannoproteins from Flocculating and Non-Flocculating *Saccharomyces-Cerevisiae* Yeasts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *54*(2), 275-286.
- Saulnier, L., & Thibault, J. F.** (1999). Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *79*(3), 396-402.
- Schols, H. A., Bakx, E. J., Schipper, D., & Voragen, A. G. J.** (1995). A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research*, *279*, 265-279.
- Schroder, R., Atkinson, R. G., Langenkamper, G., & Redgwell, R. J.** (1998). Biochemical and molecular characterisation of xyloglucan endotransglycosylase from ripe kiwifruit. *Planta*, *204*(2), 242-251.

- Simon, C., Barathieu, K., Laguerre, M., Schmitter, J. M., Fouquet, E., Pianet, I., & Dufourc, E. J.** (2003). Three-dimensional structure and dynamics of wine tannin-saliva protein complexes. A multitechnique approach. *Biochemistry*, *42*(35), 10385-10395.
- Socrates, G.** (2008). *Infrared and raman characteristic group frequencies. Tables and charts. Third edition.* Chichester, England.
- Somers, T. C.** (1971). The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry*, *10*, 2175-2186.
- Somers, T. C., & Evans, M. E.** (1977). Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *28*, 279-287.
- Somers, T. C., & Ziemelis, G.** (1985). Flavonol haze in white wines. *Vitis*, *24*, 43-50.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredes, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., & Youngs, H.** (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*, *306*, 2206-2211.
- Souquet, J.-M., Cheynier, V., Brossaud, F., & Moutounet, M.** (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, *43*(2), 509-512.
- Souquet, J.-M., Cheynier, V., & Moutounet, M.** (1998). Phenolic composition of grape stems. In: *XIX emes journées internationales d'études des polyphénols*. Lille, France.
- Souquet, J.-M., Labarbe, B., Le Guernevé, C., Cheynier, V., & Moutounet, M.** (2000). Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(4), 1076-1080.
- Souquet, J. M., Veran, F., Mané, C., & Cheynier, V.** (2006). Optimization of extraction conditions for analyzing flavonoids from the different parts of grape cluster. Application to six varieties. In: X. I. C. o. Polyphenols. Winnipeg.
- Spellman, M. W., McNeil, M., Darvill, A. G., Albersheim, P., & Henrick, K.** (1983). Structure of Plant-Cell Walls .13. Isolation and Characterization of 3-C-Carboxy-5-Deoxy-L-Xylose, a Naturally-Occurring, Branched-Chain, Acidic Monosaccharide. *Carbohydrate Research*, *122*(1), 115-129.
- Stevenson, T. T., Darvill, A. G., & Albersheim, P.** (1988). Structure of Plant-Cell Walls .22. 3-Deoxy-D-Lyx-2-Heptulosaric Acid, a Component of the Plant Cell-Wall Polysaccharide Rhamnogalacturonan-Ii. *Carbohydrate Research*, *179*, 269-288.
- Sweet, D. P., Shapiro, R. H., & Albersheim, P.** (1975). Quantitative analysis by various GLC response factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. *Carbohydrate Research*, *40*, pp. 217-225.
- Taira, S., & Ono, M.** (1997). Reduction of astringency in persimon caused by adhesion of tannins to cell wall fragments. *Acta Horticulturae*, *436*, 235-241.

- Tarascou, I., Ducasse, M. A., Dufourc, E. J., Moskau, D., Fouquet, E., Laguerre, M., & Pianet, I.** (2007). Structural and conformational analysis of two native procyanidin trimers. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 45(2), 157-166.
- Thibault, J. F., Renard, C., Axelos, M. A. V., Roger, P., & Crepeau, M. J.** (1993). Studies of the Length of Homogalacturonic Regions in Pectins by Acid-Hydrolysis. *Carbohydrate Research*, 238, 271-286.
- Timberlake, C., & Bridle, P.** (1967). Flavylium salts, anthocyanidins and anthocyanins. II. Reactions with sulphur dioxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 18, 473-478.
- Timberlake, C. F., & Bridle, P.** (1976). Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27(3), 97-105.
- Verette, E., Noble, A., & Somers, T. C.** (1988). Hydroxycinnamates of *Vitis vinifera* : sensory assessment in relation to bitterness in white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 45, 267-272.
- Vernhet, A., Fulcrand, H., Poncet-Legrand, C., Renard, C., & Cheynier, V.** (2002). Flavan-3-ol self-aggregation in model ethanolic solutions: incidence of polyphenol structure, ethanol content and ionic strength. In: *XXI International Conference on Polyphenols*, vol. 2 (pp. 433-434). Marrakech.
- Vicens, A.** (2007). Etude de l'évolution des composés phénoliques et des polysaccharides pariétaux de la pellicule de raisin pendant la maturation - Impact sur leur extractibilité en milieu hydroalcoolique., *Thèse de doctorat*. Montpellier: Université Montpellier II.
- Vicens, A., Fournand, D., Williams, P., Sidhoum, L., Moutounet, M., & Doco, T.** (2009). Changes in Polysaccharide and Protein Composition of Cell Walls in Grape Berry Skin (Cv. Shiraz) during Ripening and Over-Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2955-2960.
- Vidal, S.** (1999). Dégradation enzymatique du rhamnogalacturonanes II. Contribution à la caractérisation structurale du substrat et aux traitements des jus de fruits et des vins., *Thèse de doctorat*. Grenoble: Université Joesph Fourier.
- Vidal, S., Cartalade, D., Souquet, J., Fulcrand, H., & Cheynier, V.** (2002). Changes in proanthocyanidin chain-length in wine-like model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2261-2266.
- Vidal, S., Courcoux, P., Francis, L., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., Waters, E., & Cheynier, V.** (2004a). Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preference*, 15(3), 209-217.
- Vidal, S., Doco, T., Moutounet, M., & Pellerin, P.** (2000a). Soluble polysaccharide content at initial time of experimental must preparation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(2), 115-121.

- Vidal, S., Doco, T., Williams, P., Pellerin, P., York, W. S., O'Neill, M. A., Glushka, J., Darvill, A. G., & Albersheim, P.** (2000b). Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. *Carbohydrate Research*, 326(4), 277-294.
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., & Waters, E. J.** (2003a). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(6), 564-573.
- Vidal, S., Francis, L., Noble, A., Kwiatkowski, M., Cheynier, V., & Waters, E.** (2004b). Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 57-65.
- Vidal, S., Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., & Waters, E.** (2004c). The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chemistry*, 85(4), 519-525.
- Vidal, S., Meudec, E., Cheynier, V., Skouroumounis, G., & Hayasaka, Y.** (2004d). Mass spectrometric evidence for the existence of oligomeric anthocyanins in grape skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 7144-7151.
- Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M., & Pellerin, P.** (2003b). The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 439-447.
- Vidal, S., Williams, P., O'Neill, M. A., & Pellerin, P.** (2001). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 45, 315-323.
- Villettaz, J. C.** (1990). Les colloïdes colmatants et la filtration des vins. *Revue Française d'Oenologie*, 122, 56-63.
- Villettaz, J. C.** (1996). Utilisation des enzymes en oenologie pour l'extraction de la couleur et pour l'extraction et la révélation des arômes. *Bulletin de l'OIV*, 69(2), 844-860.
- Villettaz, J. C., Amado, R., & Neukom, H.** (1981). Structural investigations of an arabinan from grape juice. *Carbohydrate Polymers*, 1(2), 101-105.
- Villettaz, J. C., Dubourdiou, D., & Lefebvre, A.** (1982). L'emploi des β -glucanases en oenologie. In: P. Dupuy, *Utilisation des enzymes en technologie alimentaire* (pp. 457-462). Paris: Lavoisier.
- Vincken, J. P., Schols, H. A., Oomen, R., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J., & Visser, R. G. F.** (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology*, 132(4), 1781-1789.
- Vincken, J. P., Zabolina, O. A., Beldman, G., & Voragen, A. G. J.** (1998). Xyloglucan endotransglycosylase activity in apples is ripening-related: Implications for fruit juice processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78(1), 46-52.

- Visser, J., & Voragen, A. G.** (1995). Complex pectins. Structure elucidation using enzymes. In: Elsevier, *Pectins and Pectinases*, vol. Progress in biotechnology 14 (pp. 13-19). Wageningen.
- Waterhouse, A. L., & Lamuela-Raventos, R. M.** (1994). The occurrence of piceid, a stilbene glucoside in grape berries. *Phytochemistry*, 37(2), 571-573.
- Waters, E. J., Pellerin, P., & Brillouet, J.-M.** (1994). A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydrate Polymers*, 23(3), 185-191.
- Wightman, J. D., Price, S. F., Watson, B. T., & Wrolstad, R. E.** (1997). Some effects of processing enzymes on anthocyanins and phenolics in Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(1), 39-48.
- Wildenradt, H. L., & Singleton, V. L.** (1974). The production of acetaldehyde as a result of oxidation of phenolic compounds and its relation to wine aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 25, 119-126.
- Willats, W. G. T., McCartney, L., Mackie, W., & Knox, J. P.** (2001a). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, 47(1), 9-27.
- Willats, W. G. T., Orfila, C., Limberg, G., Buchholt, H. C., van Alebeek, G., Voragen, A. G. J., Marcus, S. E., Christensen, T., Mikkelsen, J. D., Murray, B. S., & Knox, J. P.** (2001b). Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls - Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 19404-19413.
- Yamada, M.** (1996). Contribution of pectins on health care. In: J. Visser, & A. G. J. Voragen, *Pectins and Pectinases*, vol. Progress in Biotechnology 14 (pp. 173-190). Amsterdam: Elsevier Science.
- York, W. S., Darvill, A. G., McNeil, M., & Albersheim, P.** (1985). Structure of Plant-Cell Walls .16. 3-Deoxy-D-Manno-2-Octulosonic Acid (Kdo) Is a Component of Rhamnogalacturonan-II, a Pectic Polysaccharide in the Primary-Cell Walls of Plants. *Carbohydrate Research*, 138(1), 109-126.
- Zhan, D. F., Janssen, P., & Mort, A. J.** (1998). Scarcity or complete lack of single rhamnose residues interspersed within the homogalacturonan regions of citrus pectin. *Carbohydrate Research*, 308(3-4), 373-380.

ANNEXE 1. PUBLICATION**Isolation of Carignan and Merlot red wine oligosaccharides and their characterization by ESI-MS.**

Marie-Agnès DUCASSE^{1,2,3}, Pascale WILLIAMS¹, Emmanuelle MEUDEEC¹, Véronique CHEYNIER¹ and Thierry DOCO*¹.

¹ INRA, Joint Research Unit 1083 Sciences for Oenology, 2 Place Viala, F-34060 Montpellier, France

² NOVOZYMES France, La cité Mondiale, 23 Parvis des Chartrons, 33074 Bordeaux Cedex France

³ LAFFORT, 126 quai Souys 33100 Bordeaux Cedex France

*Corresponding author. Tel. : +33 499612697 ; Fax : +33 499612857

E-mail address : thierry.doco@supagro.inra.fr

Abstract

For the first time, we have isolated and characterized the oligosaccharides of Carignan and Merlot wines. In a first step, this fraction was prepared after discoloration of the wines and was collected by elution on a HPSEC system. In a second step, the glycosyl composition and linkages of wine oligosaccharides were determined by several methods. High resolution MS spectra of the Carignan and Merlot oligosaccharide fractions were obtained on an AccuTOF mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) source and a time-of-flight (TOF) mass analyzer.

Oligosaccharides were present at a concentration of 330 and 250 mg/L in Carignan and Merlot red wines, respectively. Glycosyl residue composition analysis showed the presence of mannose, arabinose, galactose, rhamnose, fucose, xylose, glucose, galacturonic acid, and glucuronic acid. We show that oligosaccharides are present in significant amounts in wines, that they result from the degradation of cell wall polysaccharides and that they have an extreme diversity, about thirty peaks in ESI-TOF spectra corresponding each to at least one oligosaccharidic structure. The ESI-TOF spectra in negative mode of the Carignan and Merlot oligosaccharides showed oligosaccharidic structures corresponding to oligogalacturonic acids, partially esterified by methyl group (trigalacturonic acid detected at m/z 545, m/z 559 and m/z 573) or to the repetition of the basic unit [\rightarrow 4)- α -D-GalAp-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)] two (m/z 661), or three (m/z 983) times. These units can be substituted either by a hexose, or by a pentose, or by both, but also by deoxyhexose or uronic acid. The identification of [4-OMe-GlcA-[Xyl]₂-Xylitol] and [4-OMe-GlcA-[Xyl]₃-Xylitol] by MSⁿ fragmentation performed on a mass spectrometer equipped with an ESI source and an ion trap mass analyser makes it possible to explain the presence of xylose in wines.

Keywords: Wines, oligosaccharides, Carignan, Merlot, ESI-TOF, glucuronoxylans, oligogalacturonic acids, oligorhamnogalacturonic acids

Acknowledgments

We thank Claire Bouchut (UMR SPO) for technical assistance for use of the AccuTOF mass spectrometer and all the staff of the wine experimental cellar for assistance with the wine-making experiments at Château Goudichaud, Saint Germain du puch (Bordeaux) and at INRA experimental Unit station (Gruissan, Southern France). The authors thank Rose-Marie CANAL-LLAUBERES from NOVOZYMES France (33074 Bordeaux Cedex France), and LAFFORT for financial support, and for providing the wines. The investigation was supported by a grant (CIFRE n° 989/2005 to Marie-Agnès DUCASSE) from the Association Nationale pour la Recherche Technologique.

Introduction

The macromolecules of wines include polyphenols, proteins and polysaccharides. Polysaccharides have been thoroughly studied because of their technological and sensory properties in wines. They have the ability to interact and aggregate with tannins (Riou, Vernhet, Doco & Moutounet, 2002), to decrease astringency in wine-like model solutions (Vidal, Courcoux, Francis, Kwiatkowski, Gawel, Williams, Waters, & Cheynier, 2004), to inhibit hydrogen tartrate crystallization (Gerbaud, Gabas, Laguerie, Blouin, Vidal, Moutounet, & Pellerin, 1996), to interact with wine aroma compounds (Chalier, Angot, Delteil, Doco, & Gunata, 2007), to prevent the formation of protein haze in white wine (Waters, Pellerin, & Brillouet, 1994), and to form specific coordination complexes with Pb^{2+} ions (O'Neill, Warrenfeltz, Kates, Pellerin, Doco, Darvill, & Albersheim, 1996; Pellerin, O'Neill, Pierre, Cabanis, Darvill, Albersheim, Moutounet, 1997). The structure and amounts of polysaccharides released into the wines depend on the wine-making process and can be modified by enzyme treatment (Ayestaran, Guadalupe & Leon, 2004; Doco, Williams & Cheynier, 2007; Guadalupe, Palacios & Ayestaran, 2007). Unlike wine polysaccharides, which have been the subject of many studies, oligosaccharides have never been isolated and characterized, although their presence in wine is known. Sucrose and various diholosides were identified in wines (Pellerin & Cabanis, 1998), and a global fraction of oligomers of homo- and rhamnogalacturonan was described and shown to decrease during the aging of wines (Doco, Quellec, Moutounet, & Pellerin, 1999). Oligosaccharides can be found in important medicinal, food and agricultural applications (Qiang, YongLie, & QianBing, 2009). These natural molecules play a significant role in the plant physiology and in particular in the initiation of plant defenses responses (Darvill, & Albersheim, 1984), but they are also significant for their physicochemical properties such as chelation of cations (Cescutti, & Rizzo, 2001). It is thus necessary to determine their exact composition in wines and to analyze their molecular structures in order to better understand the technological and organoleptic properties associated with them. Classical structural characterization of oligosaccharides has been obtained by glycosyl and linkage analyses, by NMR or by mass spectrometry techniques (Duarte, Godejohann, Braumann, Spraul, & Gil, 2003; Fernández, 2007). The analysis of oligosaccharides by MS has been made possible by the development of soft ionization techniques such as MALDI (Matrix-assisted laser desorption ionization) and ESI (electrospray ionization). Information in the ESI-MS spectra concerning structural characterization of oligosaccharides can be obtained by analyzing the ion fragmentation patterns thanks to the development of analyzers with MS/MS or MS^n facility (Ralet, Lerouge, & Quémener, 2009).

We describe herein for the first time the purification of oligosaccharides from red Carignan and Merlot wines and their characterization by ESI mass spectrometry using time-of-flight (TOF) and ion trap (IT) analysers. The MS technique proved to be particular efficient for the analysis of mixtures of oligosaccharides and in particular for the fraction isolated from wine, without prior derivatization.

Experimental

Grape samples. — Carignan red wine was made from Grapes of *Vitis vinifera* cv. Carignan grown at the INRA experimental Unit station (Gruissan, Southern France) and harvested in 2004 at commercial maturity (21.8°Brix). 100 kg of grape of variety Carignan was crushed and destemmed using a destemmer-crusher, put in 100-L stainless steel tanks.

— Merlot red wine was made from *Vitis Vinifera* var. Merlot grapes grown in an experimental parcel located near Bordeaux in Southern France (Château Goudichaud, Saint

Germain du puch) and harvested at maturity in 2006. 170kg of Merlot grapes, representative sampling of the parcel, were destemmed and crushed, and distributed into 200L stainless steel tanks.

Wine samples. — Alcoholic fermentations were carried out at the INRA experimental Unit (Gruissan, Southern France) and at the cellar located near Bordeaux (Southern France) in tanks equipped with temperature control (28°C) enabling to regulate fermentation kinetics. At the end of alcoholic fermentation, the musts was pressed and the wine was stored in 50 L tanks and added with lactic bacteria to induce malolactic fermentation. At the end of malolactic fermentation, the wine was racked in 30 L inox tank and stored at low temperature (-4°C) to induce tartaric stability. The wines were then bottled and stored in a cellar at 18°C until analysis (Doco, et al., 2007; Ducasse, Canal-Llauberes, Lumley, Williams, Souquet, Fulcrand, Doco, & Cheynier, 2009).

Isolation of oligosaccharide fractions.— Carignan and Merlot wines (5 ml), were partially depigmented by decolourization onto a column of NN Polyamide SC6 (5X1 cm) previously equilibrated with 1 M NaCl. Wine polysaccharides and oligosaccharides not retained on the polyamide column were eluted by 2 bed volumes of 1 M NaCl (Brillouet, Moutounet, & Escudier, 1989). High-resolution size exclusion chromatography was performed by loading 2 ml of the previous concentrated fraction on a Superdex 30-HR column (60 X 1.6 cm, Pharmacia, Sweden) with a precolumn (0.6 X 4 cm), equilibrated at 1 mL/min in 30 mM ammonium formiate pH 5.6. The elution of polysaccharides was followed with an Erma-ERC 7512 (Erma[®], Japan) refractive index detector combined with a Waters Baseline 810-software. One fraction was collected according to elution time between 60 min. and 93 min. The isolated fraction was freeze-dried, re-dissolved in water, and freeze-dried again four times to remove completely the ammonium salt. This fraction corresponds to the wine oligosaccharide fraction.

Neutral sugar composition as alditol acetates.— Neutral sugars were determined as alditol acetates after TFA hydrolysis by GLC (Harris, Henri, Blakeney & Stone, 1984). Separation was carried out on a DB225 column (30mx 0.25 mm ID; 0.25µm film; J&W Scientific) with hydrogen as carrier gas (0.6 bar inlet pressure). Allose was used as internal standard. (Hilz, Williams, Doco, Schols, & Voragen, 2006).

Sugar composition as trimethyl silyl derivatives.— The neutral and acidic sugar composition was determined after solvolysis with anhydrous MeOH containing 0.5M HCL (80°C, 6h), by GC of their per-O-trimethylsilylated methyl glycoside derivatives. The TMS derivatives were separated on a DB-1 (temperature programming 120-200°C at 1.5°C/min) capillary columns (30m x 0.32 mm i.d., 0.25 µm film), coupled to a single injector inlet through a two-holed ferrule, with H₂ as the carrier gas on a Hewlett-Packard Model 5890 gas chromatograph (Doco, O'Neill, & Pellerin, 2001).

Glycosyl-linkage determination.— The glycosyl-linkages composition were determined by GC-MS of the partially methylated alditol acetates. One mg of polysaccharides in 0.5 ml dimethylsulfoxide was methylated using methyl sulfinyl carbanion and methyl iodide (Hakomori, 1964). The methylated materials were then treated with 2M TFA (1 h at 120°C). The released methylated monosaccharides were converted to their corresponding alditols by treatment with NaDH₄ and then acetylated (Harris *et al.*, 1984). Partially methylated alditol acetates were analyzed by GC GC-EI-MS using a DB-1 capillary column (30 m x 0.32 mm

i.d., 0.25 μm film); temperature programming 135°C for 10 min, then 1.2°C/min to 180°C, coupled to a HP5973 MSD (Vidal, Williams, O'Neill, & Pellerin, 2001).

ESI Mass Spectrometry.— Wine oligosaccharide samples (50 μg) in 1:1 MeOH-water (5 μL) were injected directly into an AccuTOF (AccuTOF™ JMS-T100LC, Jeol, Japan) mass spectrometer equipped with an ESI source and a time-of-flight (TOF) mass analyzer in negative ion modes. The source voltage was set at -2000 V (negative ESI), the orifice voltage at -45 V (negative ESI), the desolvating chamber temperature at 250°C, the orifice temperature at 80°C, with the mass range being from 200 to 4000 Da. Mass center software was used for analysis.

Further MS experiments and MS^n fragmentation analysis were performed on a ThermoFinnigan LCQ Advantage (San Jose, CA) mass spectrometer equipped with an ESI source and an ion trap mass analyzer, which were controlled by Xcalibur navigator software. The mass spectrometer was operated in the positive/negative ion mode in the range of m/z 150 to 1200 and under the same following conditions: source voltage, 4.5 kV; capillary voltage, 40 V; capillary temperature, 200 °C; and collision energy for fragmentation, 25% for MS^2 and 30% for MS^3 .

Results and discussion

Wine carbohydrates from Merlot and Carignan were discolored on Polyamide SC6, and then were injected on a Superdex 30 HR column in order to separate polysaccharides from oligosaccharides. The molecular weight distributions of polysaccharides and oligosaccharides of Carignan and Merlot wines are given in figure 1. The first peak eluted on Superdex 30 HR column between 41 to 49 minutes corresponded to the polysaccharide fraction of highest mass and rich in PRAGs (Polysaccharides Rich in Arabinose and Galactose) and mannoproteins (Doco *et al.*, 1999). The second peak eluted between 49 and 58 minutes corresponded to the fraction classically containing mainly RG-II. (Doco *et al.*, 1999). The fraction eluted in the range 60 to 93 minutes contained a complex mixture of small sugars and has been collected as the oligosaccharide fraction from Carignan and Merlot wines.

Notable differences of the total oligosaccharide concentration between these Carignan and Merlot wines could be observed. The amount of isolated fraction indicated that oligosaccharides were present at approximate concentrations of 332 and 252 mg/L respectively, in the Carignan and Merlot wines analysed in this study. The differences of concentration observed between the two wines can be related to differences in maturity stages between the cultivars at the time of the harvest, but also to the different wine making processes. It is known that the state of cell walls and their possible weakening modulates the extraction of various components, and in particular polysaccharides and oligosaccharides (Nunan, Sims, Bacic, Robinson, Fincher, 1998; Vicens, Fournand, Williams, Sidhoum, Moutounet, & Doco, 2009), during wine making.

The glycosyl residue composition of Carignan and Merlot oligosaccharides was analyzed (Table 1). They contain most of the sugars known to take part in the composition of wine carbohydrates (Belleville, Williams, & Brillouet, 1993; Doco, & Brillouet, 1993; Waters, *et al.*, 1994; Pellerin, Vidal, Williams, & Brillouet, 1995; Pellerin, Doco, Vidal, Williams, Brillouet, & O'Neill, 1996; Vidal, Williams, Doco, Moutounet, & Pellerin, 2003; Ayestaran, *et al.*, 2004). They include sugars such as rhamnose, arabinose, galactose, xylose and galacturonic and glucuronic acids coming from the pecto-cellulosic cell walls of grape berries but also mannose and glucose released from yeast polysaccharides. Their identification confirms the presence of mannan-, arabinogalactan-, homogalacturonan- and rhamnogalacturonan-like structures in red wine oligosaccharides. Identification of xylose,

glucuronic and 4-O-Me glucuronic acid residues indicated that traces of hemicelluloses might be solubilized from grape berry cell walls (Carpita, & Gibeaut, 1993; Doco, Williams, Pauly, O'Neill, & Pellerin, 2003) and recovered as oligosaccharide structures in wines.

Analysis of the Ara/Gal ratio obtained for oligosaccharide fractions indicated small differences, 2.2 for Carignan wine and 2.8 for Merlot wine. The Ara/Gal ratio is characteristic of the wine Polysaccharides Rich in Arabinose and Galactose (PRAG) (Vidal, *et al.*, 2003; Doco, Vuchot, Cheyrier, & Moutounet, 2003). The ratio appears two-fold higher than that of red wine polysaccharides, usually close to 1 (Doco, *et al.*, 2007). The increase of this ratio in the oligosaccharide fractions suggests a release of arabinose or oligosaccharides rich in arabinose arising from the pectic framework (Carpita, & Gibeaut, 1993). The relative richness of the wine oligosaccharides in homogalacturonans versus rhamnogalacturonans can be deduced from the rhamnose/galacturonic acid ratio (Arnous, & Meyer, 2009). The low value determined for this ratio in Merlot oligosaccharides (0.4) indicates that homogalacturonan predominate, whereas the ratio close to 1 (0.97) for the Carignan oligosaccharides indicates a majority of rhamnogalacturonan organized with a repeat unit of $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow]$.

As one might presume that most of the Ara and Gal are associated with pectin hairy regions, the ratio of (Ara + Gal) to rhamnose was calculated to estimate the relative importance of the neutral side-chains to the rhamnogalacturonan backbone. These ratios were at 2.8 and 3.1 for carignan and merlot oligosaccharides, respectively. The ratios Rha/GalA and (Ara + Gal)/Rha indicate that the carignan oligosaccharides contains more structures from the hairy regions of pectins (rhamnogalacturonan like structures carrying neutral lateral chains), and were the result of a degradations of grape cell wall berries by pectinases. And, the (Ara + Gal)/Rha ratio of the merlot oligosaccharides indicate that the rhamnogalacturonan oligomers present in this wine carrying more neutral lateral chains.

Analysis of the glycosidic linkages enabled us to determine the structure of oligosaccharides that were released into the must during winemaking (table 2). Mannose was linked in $\rightarrow 2$, in $\rightarrow 3$, in $\rightarrow 3,6$ and in non-reducing terminal position in molar ratios very similar in the two wines. These linkages correspond to those typically found in yeast mannoproteins with consist mainly of many small chains with one-to-four D-mannose residues in $\alpha\text{-(1}\rightarrow 2)$ or $(1\rightarrow 3)$ linked on the protein part (Ballou, 1976; Saulnier, Mercereau, & Vezinhet, 1991; Waters, *et al.*, 1994). The oligosaccharides (Table 2) contained arabinose linked in $\rightarrow 5$ and in $\rightarrow 3,5$ characteristic of branched arabinans on the rhamnogalacturonan chain of the pectins (presence of 2- and 2,4-Rha) (Vidal, *et al.*, 2003), and terminal arabinose which may arise from both AGPs and arabinans. It also contained all methyl ethers corresponding to the galactose linked in -3; -6; -3,6; -4,6 and -3,4,6, linkages that are found in AGPs (Pellerin, *et al.*, 1995; Vidal, *et al.*, 2001). The presence of 2,3-di-O-methyl and 3,4-di-O-methyl-D-xylopyranose in the methylation analysis showed that the wine oligosaccharides contain xylan structures, arising from the $(1\rightarrow 4)$ and $(1\rightarrow 2)$ -linked xylose chain units. Moreover identification in the glycosyl residue analysis of the 4-O-methylated glucuronic acid (table 1), and the presence of 3,4-di-O-methyl-D-xylopyranose (table 2) indicated that the wine oligosaccharides contained 4-O-methyl-D-oligoglucurono-xylan structures (Ebringerova & Heinze, 2000).

The ESI-TOF spectra in the negative ion mode of the Carignan and Merlot oligosaccharides are given in figure 2. The MS spectra showed all oligosaccharide molecules as the deprotonated $[M-H]^-$ ions. The predominant ions observed in the mass spectra were ions at m/z 605, 661, 837 and 983 for Carignan oligosaccharides, and ions at m/z 545, 559, 605, 661, 737 and 983 for Merlot oligosaccharides. The ions observed at m/z 661, 837 and 983 correspond probably to the deprotonated tetrasaccharide: $[(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA}]_2$, to the pentasaccharide: $\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha$

L-Rhap-(1→4)- α -D-GalpA and the hexasaccharide: [(1→2)- α -L-Rhap-(1→4)- α -D-GalpA]₃ respectively. The ions at m/z 545, 559 and 573 correspond to the trigalacturonic acid and to the trigalacturonic acid methylated once or twice respectively (figure 2B) coming from the homogalacturonan backbones of the pectins. These oligogalacturonans are the result of a pectinolytic activity present during the maturation of the grape berry and/or during wine making.

Negative ESI-MSⁿ provides a sensitive means for structural analysis of oligosaccharides. The MSⁿ fragmentations of each oligosaccharide from wine were performed on a mass spectrometer equipped with an ESI source and an ion trap mass analyser. Figure 3 shows, as an example, the MSⁿ spectra of the [M-H]⁻ ion at m/z 837 obtained from the Carignan oligosaccharides. The fragment ions observed in the MSⁿ spectra are usually named according to the nomenclature of Domon & Costello (Domon & Costello, 1988). The fragmentation of oligosaccharides in the negative-ion ESI-MSⁿ condition involves the cleavage of the glycosidic linkage between two monosaccharides, and the fragmentation across the glycosidic bond leading to mainly C- and Z-type ions (Körner, Limberg, Christensen, Mikkelsen, & Roepstorff, 1999; Quéméner, Desire, Lahaye, Debrauwer, & Negroni, 2003).). The MS² fragmentation (figure 3) of the ion at m/z 837 showed the presence of a fragment ion at m/z 661, due to the loss of a galacturonic acid residue (176 uma). The MS³ fragmentation (figure 3) of the ion at m/z 661 gave a fragment ion at m/z 515 corresponding to the loss of the rhamnose residue (146 uma). In the same manner, the MS⁴ and MS⁵ spectra (figure 3) of the ion at m/z 515 showed the presence of a fragment ion at m/z 339, due to the loss of a second galacturonic acid residue (176 uma), followed by the loss of a Rha residue (146 Da), resulting in an ion at m/z 175. All spectra showed the presence of an ion due to loss of a water molecule (18 mass units). For example, the ions at m/z 819 and at m/z 643 corresponded to the loss of 18 mass units by the ion at m/z 837 and by the ion at m/z 661, respectively. Another point of the MSⁿ spectra was the presence of a fragment ion due to the loss of 60 mass units from the parent ion, i.e. ion at m/z 777 for parent ion at m/z 837 (figure 3, MS² spectrum), and this loss was specific of a 1→4 linkage and when a α -D-GalpA residue was at the reducing end of oligosaccharide.

The fragmentation scheme makes it possible to confirm that the ion at m/z 837 have the following structure: α -D-GalpA-(1→2)- α -L-Rhap-(1→4)- α -D-GalpA-(1→2)- α -L-Rhap-(1→4)- α -D-GalpA and corresponds to an oligosaccharide arising from the rhamnagalacturonan regions of pectins as a result of degradation of grape cell wall berries by pectinases during grape maturation and/or wine making.

The MS/MS spectrum obtained for the ion at m/z 605, which was the major ion, observed in the merlot wine oligosaccharide and less abundant in the carignan wine is given in figure 4. The spectrum showed the presence of an ion at m/z 573 due to the loss of a fragment of 32 mass units from the parent ion (m/z 605) that can be assigned to loss of methanol. The ion at m/z 529 must be due to the loss of a carboxyl group from the ion at m/z 573. The presence of an ion at m/z 415 in the spectrum due the loss of 190 mass units can be explained by the loss of a methyluronic acid residue. The MS/MS spectrum of ion at m/z 415 showed the presence of fragment ions at m/z 283 and m/z 265, due to the loss of a pentose residue (-132 uma) or the loss of pentose with H₂O (-150 uma), followed for the ion at m/z 283 by a second loss of pentose residue (-132 uma) to give an ion at m/z 151 (Figure 4, MS³ spectrum). The ion at m/z 151 would correspond to a pentitol. The comparison of the fragmentation of ion m/z 605 with glycosyl and glycosidic-linkage analysis made it possible to propose a structure for this ion found in all the wines. It would thus consist of 4-OMe-glucuronic acid (4-OMe-GlcA), two xylose residues (Xyl) linked in 1→4, and a xylitol residue in non-reducing position. The MS² fragmentation of commercial xylitol (figure 4 B_(a)) (from Sigma) and the MS⁴ fragmentation of the ion at m/z 605 (figure 4 B_(b)) are consistent which corroborates the presence of this

pentitol. This type of structure has been previously described from olive fruit glucuronoxylan (Reis, Coimbra, Domingues, Ferrer-Correia, & Domingues 2004) and it is characteristic of xylan families, more precisely of the 4-OMe-glucuronoxylans. The presence of glucuronoxylan-like structure is consolidated by the presence of an ion at m/z 737 which corresponds to the following structure [4-OMe-GlcA-[Xyl]₃-Xylitol], that is to say one more xylose residue compared to the ion at m/z 605.

The structures (figure 4C) suggested for this oligosaccharide present in wines is an assumption based on the mass fragmentation and will require confirmation by isolating and by characterizing this oligosaccharide. Nevertheless, the beam of analytical data obtained (glycosyl and glycosidic-linkage analysis, mass spectrum...) indicated that this oligosaccharide is present in all the wines analyzed for this study or in other wines coming from various origins (data not show). The characterization of these oligosaccharides (4-OMe-GlcA-[Xyl]₂-Xylitol and 4-OMe-GlcA-[Xyl]₃-Xylitol) rich in xylose residues makes it possible to explain the presence of xylose in wines of the fractions of low molecular weight (Doco *et al.*, 1999). The presence of these of oligosaccharides coming from the hemicellulosic cell wall structures shows that these polysaccharides are modified and/or hydrolyzed either during the maturation of grape berry or/and during wine making. Hemicelluloses are not identified in soluble polysaccharides of the wine and only these fragments of 4-OMe-oligo-glucuronoxylan are present in oligomer fractions.

In conclusion, for the first time, we have isolated and characterized the oligosaccharide fractions of two red wines by three complementary methods: glycosyl composition analysis, glycosidic-linkage and analysis by mass spectrometry. Mass spectrometry is a powerful tool used to identify and determine the structure of the oligosaccharides and in particular those coming from pectins (Ralet, *et al.*, 2008). Its use has enabled us to identify the various structures of oligosaccharides present in the fractions isolated from wines. The identification by ESI-TOF MS of oligoglucurono-xylan make it possible to propose a structure for these oligosaccharides rich in xylose. These molecules and other oligosaccharides identified in wine represent the degraded structures of polysaccharides originated from the grape berry cell wall, as a result of endogenous present in grapes or exogenous enzyme activity, added by the winemakers, present during the various stages of the wine making. The use of mass spectrometry for oligosaccharide analysis will make it possible to study the influence of various techniques of wine making : fermentation off skins, red wine making, skin maceration, enzyme treatment, etc..... on the final contents and composition of oligosaccharides in wine and the properties that could be related to the presence of these molecules in wines.

References

- Arnous, A. & Meyer, A.S. (2009). Quantitative Prediction of Cell Wall Polysaccharide Composition in Grape (*Vitis vinifera* L.) and Apple (*Malus domestica*) Skins from Acid Hydrolysis Monosaccharide Profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3611-3619.
- Ayestaran, B., Guadalupe, Z., & Leon, D. (2004). Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process, *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 29–39.
- Ballou, C.E. The structure and biosynthesis of mannan component of the yeast cell envelope. *Adv. Microbiol. Physiol.* 14:93-158 (1976).
- Belleville, M.P., Williams, P. & Brillouet, J-M. (1993). A linear arabinan from a red wine. *Phytochemistry*. 33, 227-229
- Brillouet, J.-M., Moutounet, M., & Escudier, J.-L. (1989). Fate of yeast and grape pectic polysaccharides of a young red wine in the cross-flow microfiltration process. *Vitis*, 28, 49-63.
- Carpita, N. C., & Gibeaut, D. (1993). M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal*, 3,1-30.
- Cescutti, P. & Rizzo, R. (2001). Divalent cation interactions with oligogalacturonides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3262-3267.
- Chalier, P., Angot, B., Delteil, D., Doco, T., & Gunata. Z. (2007). Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein extract or fractions of mannoproteins isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chemistry*, 100, 22-30.
- Darvill, A.G., & Albersheim, P. (1984). Phytoalexins and their elicitors-A defense against microbial infection in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 155, 507-516.
- Doco, T., Williams, P., & Cheynier, V. (2007). Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6643-6649.
- Doco, T., Williams, P., Pauly, M., O'neill, M. A., & Pellerin, P. (2003). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II : Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 53, 253-261.
- Doco, T., Vuchot, P., Cheynier, V., & Moutounet. M. (2003). Structural modification of arabinogalactan-proteins during aging of red wines on lees. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 150-157.

- Doco, T., O'Neill, M.A., & Pellerin, P. (2001). Determination of the neutral and acidic glycosyl residue compositions of plant cell polysaccharides by GC-EI-MS analysis of the trimethylsilyl methyl glucoside derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 46, 249–259
- Doco, T., Quellec, N., Moutounet, M., & Pellerin, P. (1999). Polysaccharide patterns during the aging of Carignan noir red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 25–32.
- Doco, T. & Brillouet, J.-M. (1993). Isolation and characterization of a rhamnogalacturonan II from red wine. *Carbohydrate Research*, 243, 333-343.
- Domon, B., & Costello, C.E., (1988). Asystematic nomenclature for carbohydrate fragmentation in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal*, 5, 397-409.
- Duarte, F.I., Godejohann, M., Braumann, U., Spraul, M. & Gil, A.M. (2003). Application of NMR Spectroscopy and LC-NMR/MS to the Identification of Carbohydrates in Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 4847–4852.
- Ducasse, M-A., Canal-Llauberes, R-M., Lumley, M.D., Williams, P., Souquet, J-M., Fulcrand, H., Doco, T., Cheynier, V. (2009). Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. *Food Chemistry*, in press doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.130.
- Ebringerova, A. & Heinze, T. (2000). Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties. 1: Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications* 21, 542–556
- Fernández L.E.M., (2007). Introduction to ion trap mass spectrometry: Application to the structural characterization of plant oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 68, 797-807.
- Gerbaud, V., Gabas, N., Laguerie, C., Blouin, J., Vidal, S., Moutounet, M., & Pellerin, P. (1996). Effect of wine polysaccharides on the nucleation of potassium hydrogen tartrate in model solutions. *Trans. I. Chem. E.*, 74, 782-790.
- Guadalupe, Z., Palacios, A., & Ayestaran, B. (2007). Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4854-4862.
- Harris, P.J., Henri, R.J., Blakeney, A.B., & Stone, B.A. (1984). An improved method for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydrate Research* 127(1), 59-73.
- Hakomori, S.I. (1964). A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *Journal of Biochemistry. (Tokyo)*, 55, 205-208.
- Hilz, H., Williams, P., Doco, T., Schols, H.A., & Voragen, A.G.J. (2006). The pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is present as a dimer in pectic populations of bilberries and black currants in muro and in juice. *Carbohydrate Polymers*, 65(4), 521-528.

- Körner, R., Limberg, G., Christensen, T.M.I.E., Mikkelsen, J.D., & Roepstorff P. (1999). Sequencing of Partially Methyl-Esterified Oligogalacturonates by Tandem Mass Spectrometry and Its Use To Determine Pectinase Specificities. *Analytical Chemistry*, 71(7), 1421–1427.
- Nunan, K. J., Sims, I. M., Bacic, A., Robinson, S. P., & Fincher, G. B. (1998). Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiology*, 118, 783-792
- O'Neill, M.A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A.G., & Albersheim, P. (1996). Rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cells, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *Journal of Biological chemistry*, 271, 22923-22930.
- Pellerin, P., O'Neill, M.A., Pierre, C., Cabanis, M.T., Darvill, A., Albersheim, P., & Moutounet, M. (1997). Le plomb est complexé dans les vins par les dimères de rhamnogalacturonane II, un polysaccharide pectique du raisin. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 33-41.
- Pellerin, P. & Cabanis, JC (1998). Les Glucides. In : C. Flanzy, *Elements d'œnologie. Fondements scientifiques et techniques* (pp.40-93).Technique et Documentation. Paris :Lavoisier
- Pellerin, P., Vidal, S., Williams, P., & Brillouet, J.-M. (1995). Characterization of five type II arabinogalactan-protein complexes from red wine with increasing uronic acid content. *Carbohydrate Research*, 190, 183-197.
- Qiang, X., YongLie, C., & QianBing, W. (2009). Health benefit application of functional oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers in press* doi:10.1016/j.carbpol. 2009.03.016.
- Quéméner, B., Desire, C., Lahaye, M., Debrauwer, L., & Negroni, L. (2003). Structural characterisation by both positive- and negative-ion electrospray mass spectrometry of partially methyl-esterified oligogalacturonides purified by semi-preparative high-performance anion-exchange chromatography. *European Journal of Mass Spectrometry*, 9(1), 45-60.
- Ralet, M.-C., Lerouge, P., & Quéméner, B., (2008). Mass spectrometry for pectin structure analysis.. *Carbohydrate Research*; doi:10.1016 /j.carres.2008.08.036
- Reis, A. Coimbra, M.A., Domingues, P., Ferrer-Correia, A.J., & Domingues, M.R.M. (2004). Fragmentation pattern of underivatized xylo-oligosaccharides and their alditol derivatives by electrospray tandem mass spectrometry. *Carbohydrate Polymers* 55, 401–409.
- Riou, V., Vernhet, A., Doco, T., & Moutounet, M. (2002). Aggregation of grape seed tannins in model wine - effect of wine polysaccharides. *Food hydrocolloids*, 16, 17-23.
- Saulnier, L., Mercereau, T., & Vezinhet. F. (1991). Mannoproteins from flocculating and non-flocculating *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 275-286

Vicens, A., Fourmand, D., Williams, P., Sidhoum, L., Moutounet, M. & Doco, T. (2009). Changes in Polysaccharide and Protein Composition of Cell Walls in Grape Berry Skin (Cv. Shiraz) during Ripening and Over-Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2955–2960.

Vidal, S., Courcoux, P., Francis, L., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., Waters, E., & Cheynier, V. (2004). Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception, *Food Quality and Preference*, 15, 209-217.

Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M., & Pellerin, P. (2003). The polysaccharides of red wine: Total fractionation and characterisation. *Carbohydrate Polymers* 54, 439–447.

Vidal, S., Williams, P., O'Neill, M.A., & Pellerin, P. (2001). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 45, 315–323.

Waters, E.J., Pellerin, P. & J.-M. Brillouet. A. (1994). *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydrate Polymers*, 23, 185-191

Table 1

Glycosyl composition (mole percentage) of oligosaccharides isolated from wine

	Carignan	Merlot
Rha ^a	13.5	9.4
Fuc	0.5	0.5
Ara	26.5	21.6
Gal	12.2	7.6
Glc	13.6	13.1
Man	10.1	9.4
Xyl	6.1	9.8
Gal A	13.9	23.0
Glc A	1.5	1.5
4- <i>O</i> -MeGlc A	1.5	2.9
Xylitol	0.7	1.2
Conc mg/L	332.7	252.0
Ratio		
Ara/Gal	2.17	2.84
Rha/Gal A	0.97	0.40
(Ara+Gal)/Rha	2.86	3.10

^a Rha, Rhamnose;; Fuc, Fucose;; Ara, Arabinose;; Gal, Galactose; Glc, Glucose; Man, Mannose;Xyl, Xylose; Gal A, Galacturonic acid; Glc A, Glucuronic acid; 4-*O*-MeGlc A, 4 O methyl Glucuronic acid

Table 2

GLYCOSYL LINKAGE COMPOSITION (MOLE PERCENTAGE) OF OLIGOSACCHARIDES FRACTIONS ISOLATED FROM WINES.

Glycosyl residue	Linkage	Carignan	Merlot
2,3,4-Rhamnose	Terminal ^a	3.6	3.2
3,4-Rhamnose	2-linked	17.0	14.1
3-Rhamnose	2,4-linked	1.7	2.5
2,3,4-Fucose	Terminal	2.0	0.6
2,3,5-Arabinose	Terminal furanose	11.2	6.3
2,3,4-Arabinose	Terminal pyranose	1.7	2.2
2,5-Arabinose	3-linked	1.6	0.7
3,5-Arabinose	2-linked	0.7	0.5
2,3-Arabinose	5-linked	11.2	17.4
2-Arabinose	3,5-linked	3.2	2.4
2,3-Xylose	4-linked	5.7	10.8
2,3,4,6-Galactose	Terminal	-	0.7
2,3,4-Galactose	6-linked	2.1	1.1
2,4,6-Galactose	3-linked	3.4	3.1
2,3,6-Galactose	4-linked	4.1	2.3
2,4-Galactose	3,6-linked	1.7	1.3
2-Galactose	3,4,6-linked	1.5	1.3
2,3,4,6-Glucose	Terminal	1.9	1.5
2,3,4-Glucose	6-linked	4.4	5.0
2,3,6-Glucose	4-linked	1.1	2.4
2,4-Glucose	3,6-linked	2.9	1.7
2,6-Glucose	3,4-linked	2.1	1.5
2,3,4,6-Mannose	Terminal	6.0	5.7
3,4,6-Mannose	2-linked	5.1	6.8
2,4,6-Mannose	3-linked	2.2	2.4
2,4-Mannose	3,6-linked	1.9	2.1

^a 2,3,4-Rhamnose is 1.5di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl rhamnitol, etc....

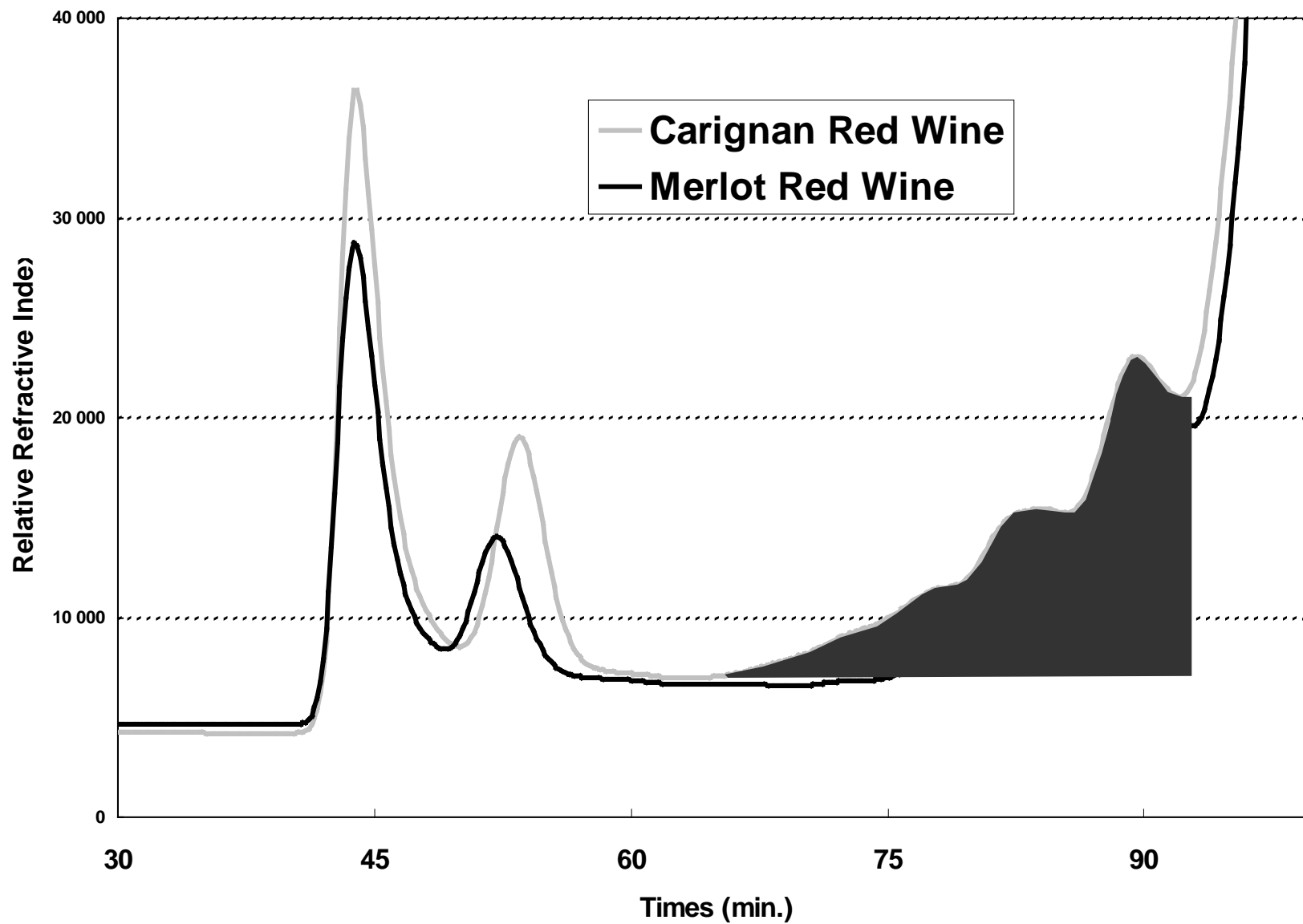
Figure Captions

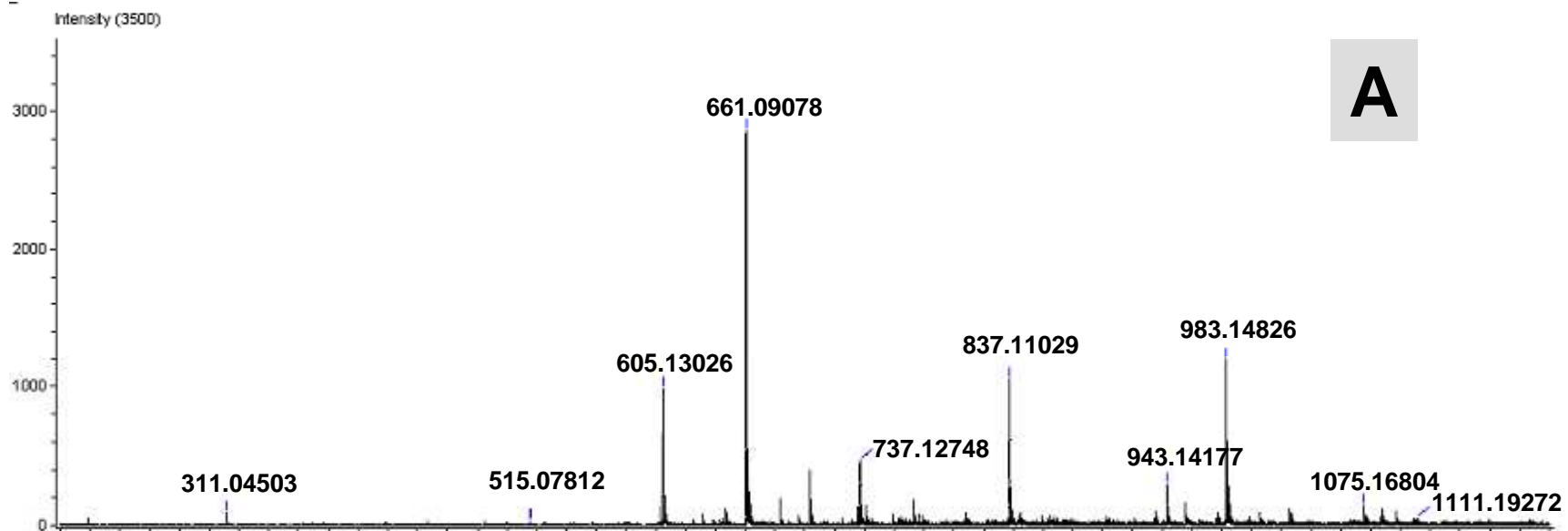
Fig. 1. Purification by high-resolution size-exclusion chromatography of oligosaccharide fractions isolated from Carignan and Merlot red wines on Superdex-30HR column. The hatched area indicates the oligosaccharide fractions that were collected.

Fig. 2. Negative ESI-TOF spectra of the oligosaccharide fraction of Carignan wine (A) and Merlot wine (B).

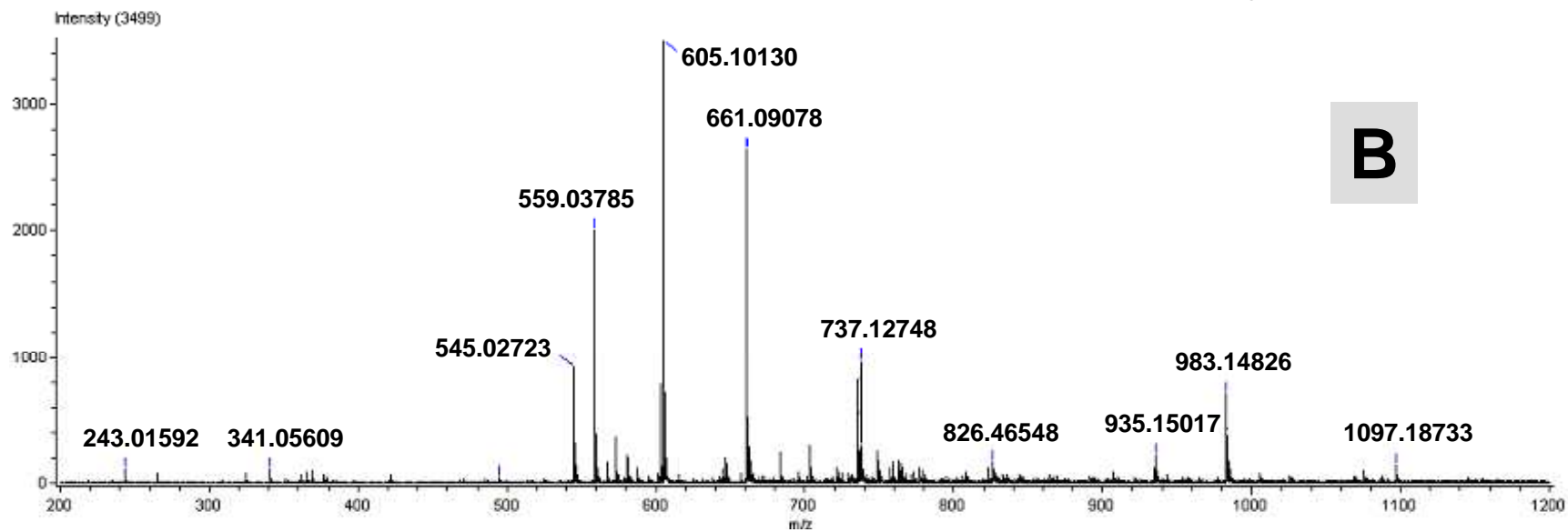
Fig. 3. Structure and spectra of MS⁵ fragmentation by ESI-TI in negative mode of ion at m/z 837. The fragment ions are named according to the nomenclature of Domon & Costello (Domon & Costello, 1988). (a) MS² spectrum of the ion parent at m/z 837 ([M-H]⁻); (b) MS³ spectrum of the ion at m/z 661 from the m/z 837 ion ([M-H]⁻); (c) MS⁴ spectrum of the ion at m/z 497 from the ion at m/z 661 ([M-H]⁻) and (d) MS⁵ spectrum of the ion at m/z 339 from the m/z 497 ion ([M-H]⁻).

Fig. 4. (A) Negative ESI MSⁿ spectra of a deprotonated molecule [M-H]⁻ ion at m/z 605 from wine oligosaccharide fractions. (B_(a)) Negative ESI MS⁴ spectrum of ion at m/z 605 and (B_(b)) Negative ESI MS spectrum of Xylitol. (C_(a) and C_(b)) Possible structure for ion at m/z 605, which corresponds to the following structure 4-OMe-GlcA-[Xylose]₂-Xylitol.

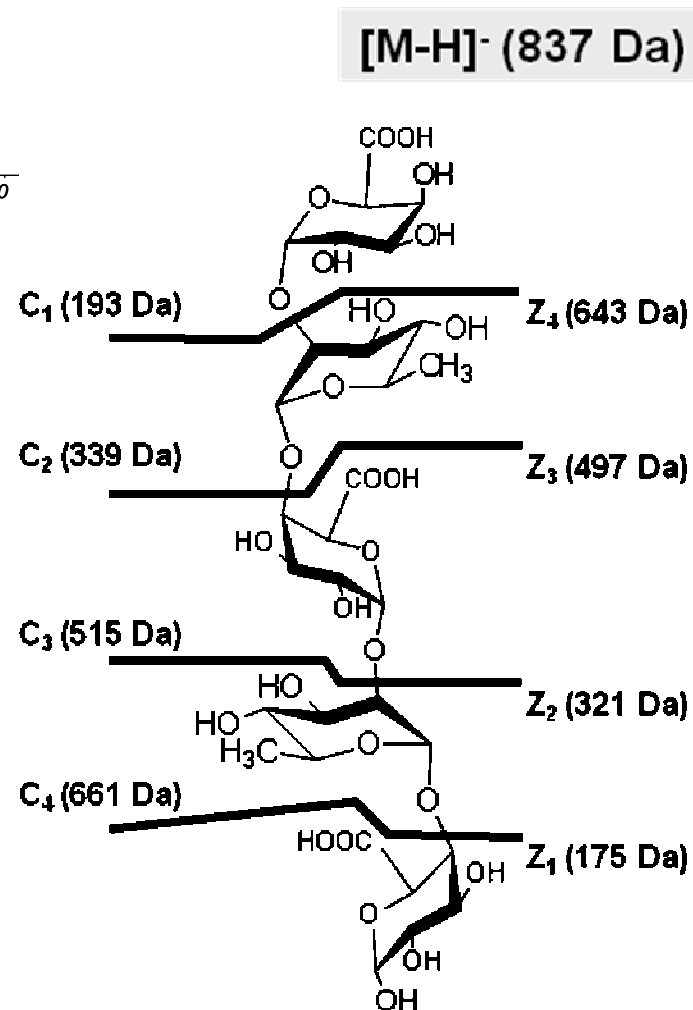
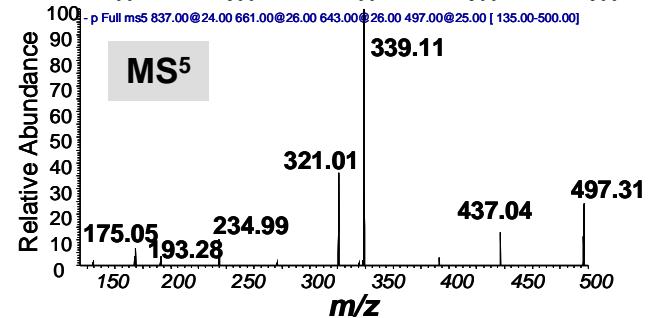
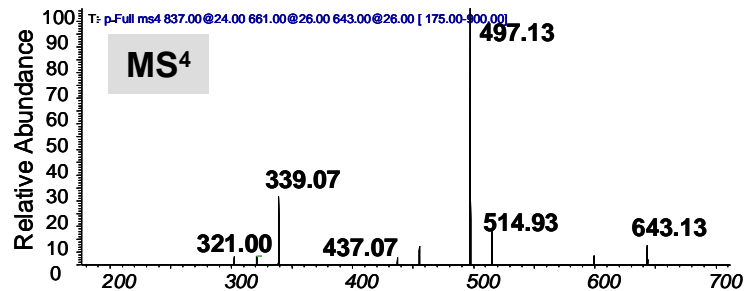
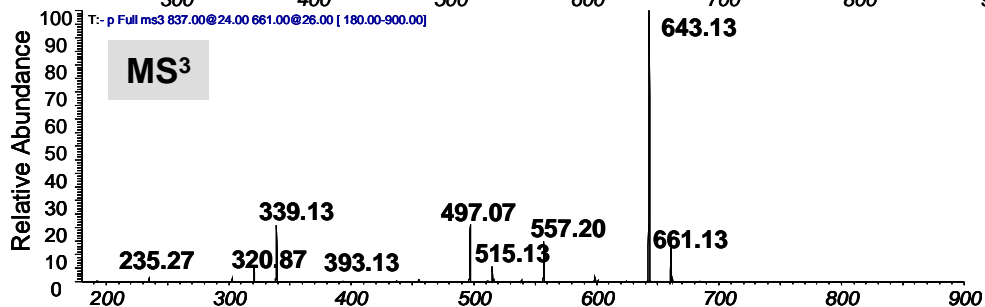
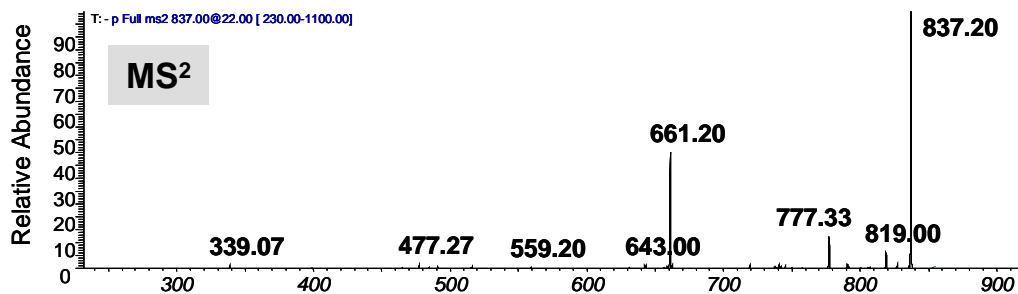


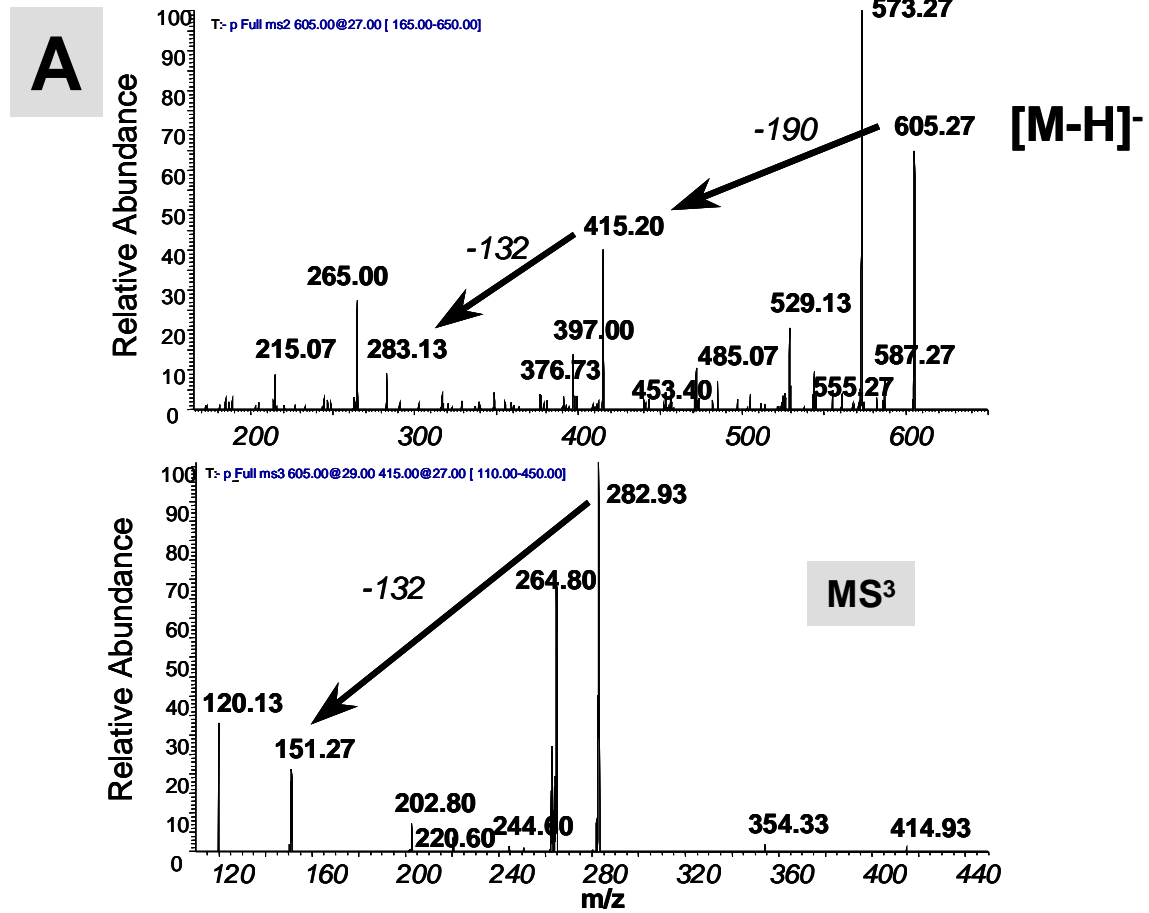


A



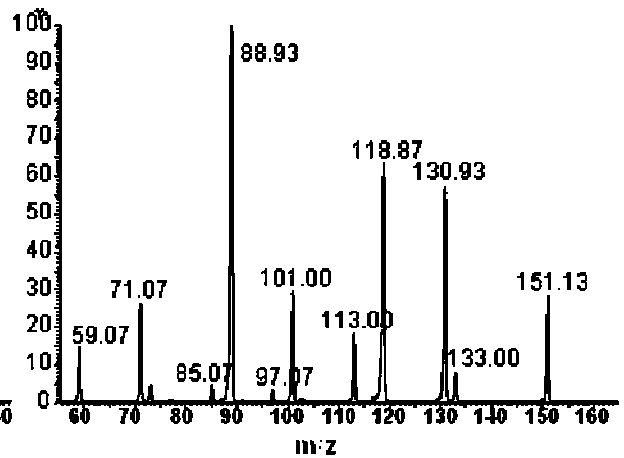
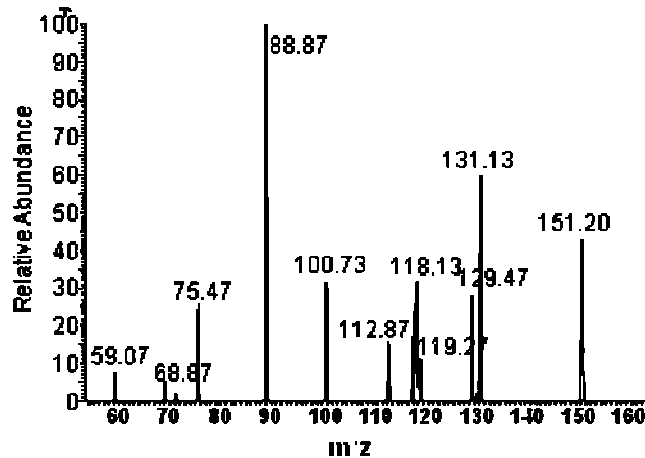
B

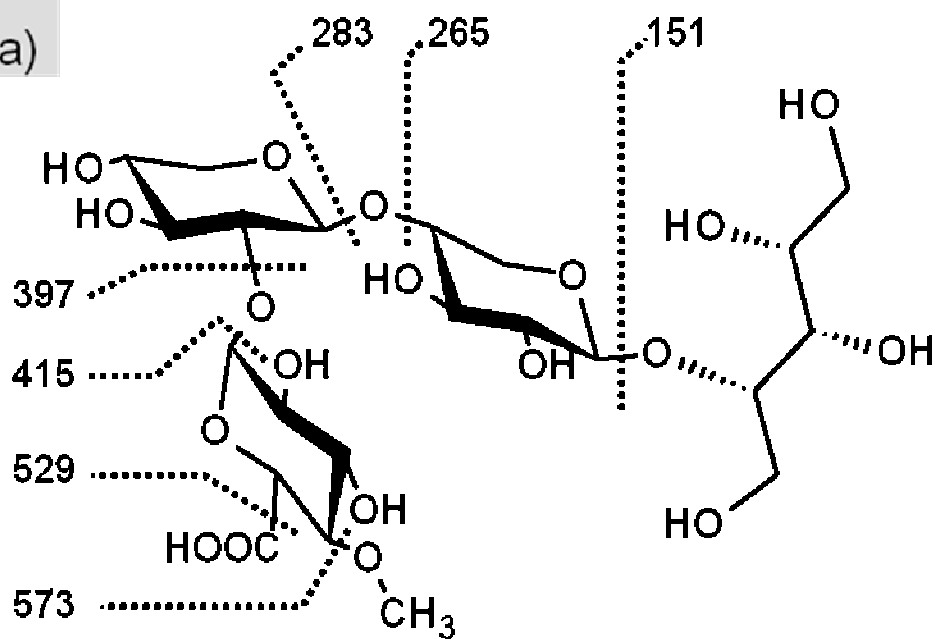
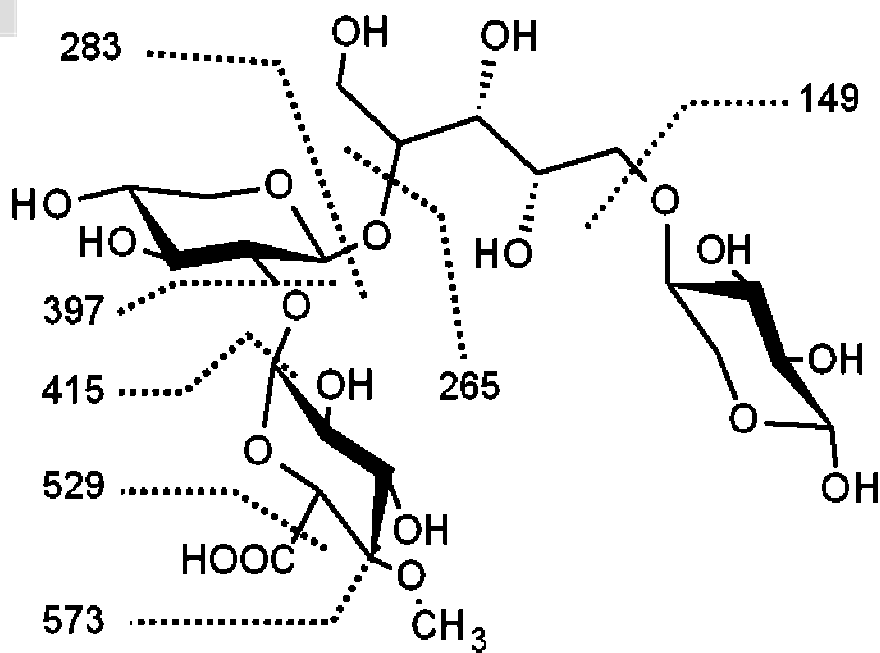




B (a)

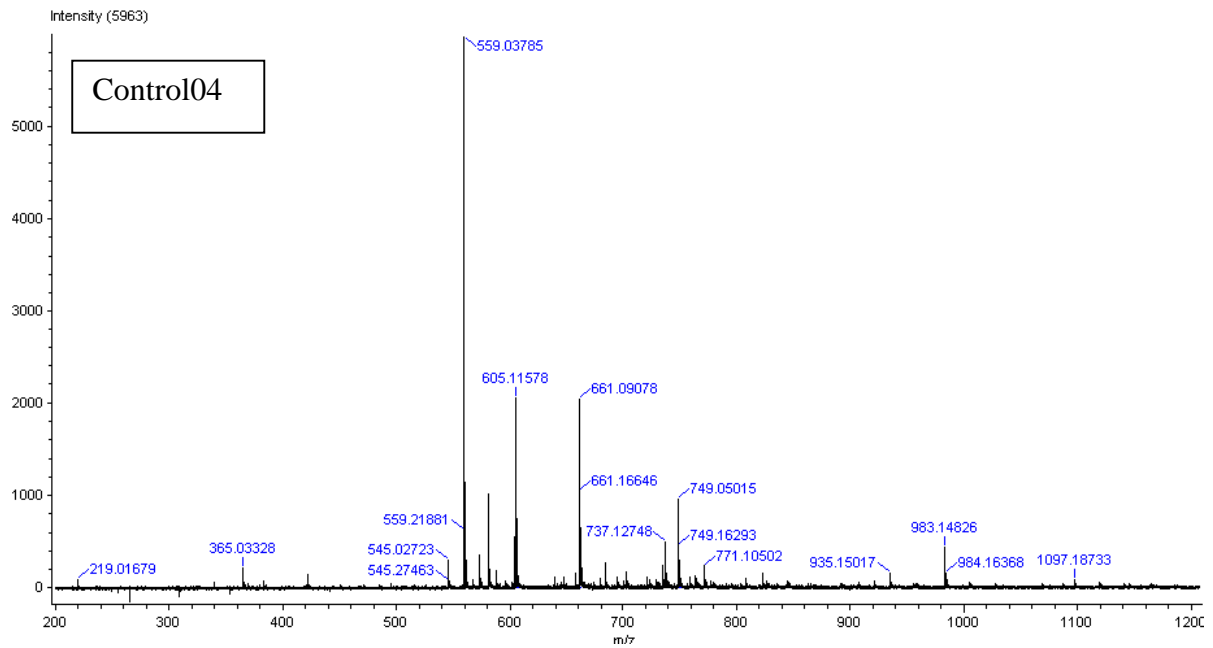
B (b)



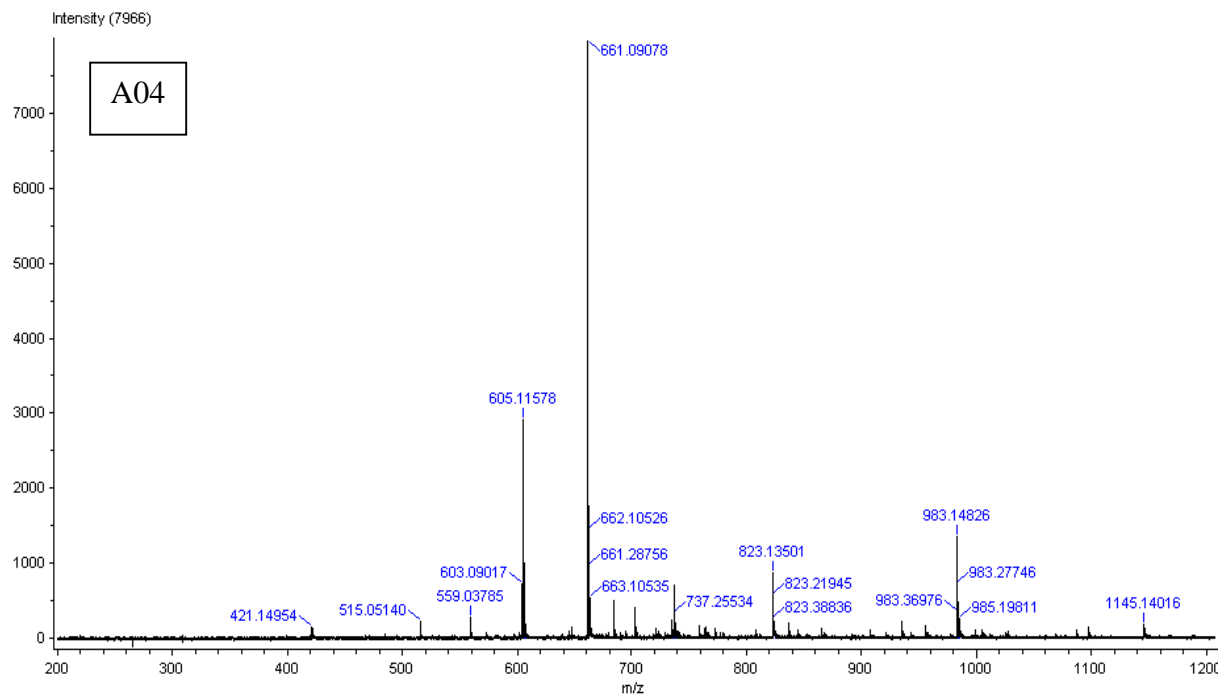
C_(a)**C**_(b)

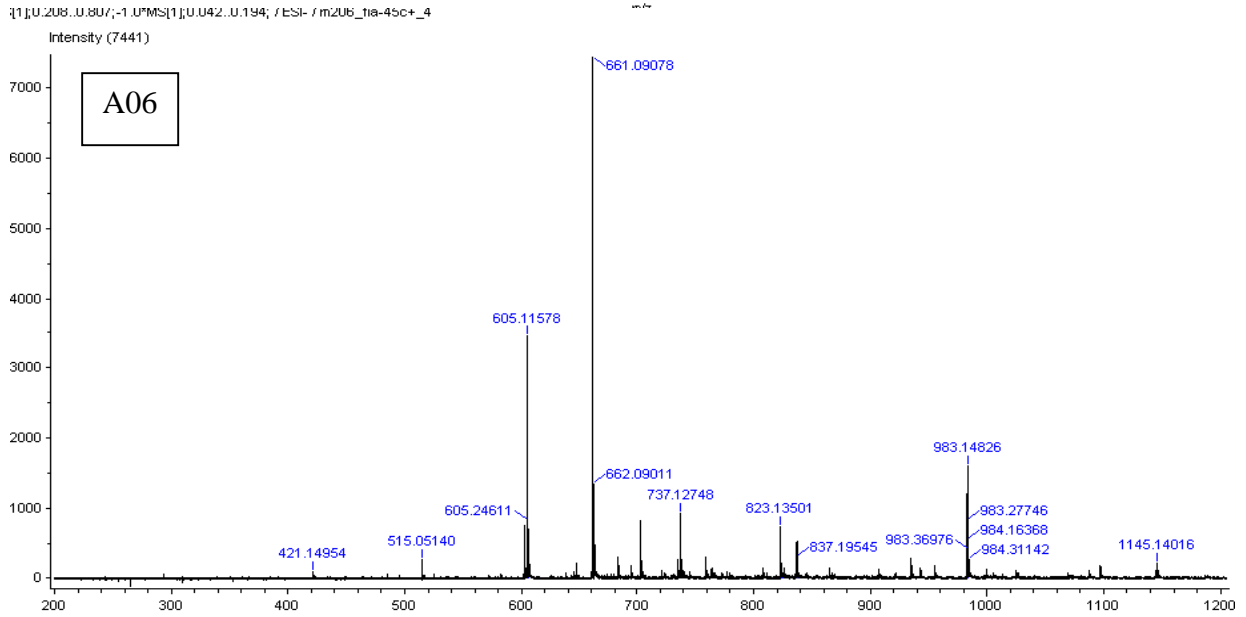
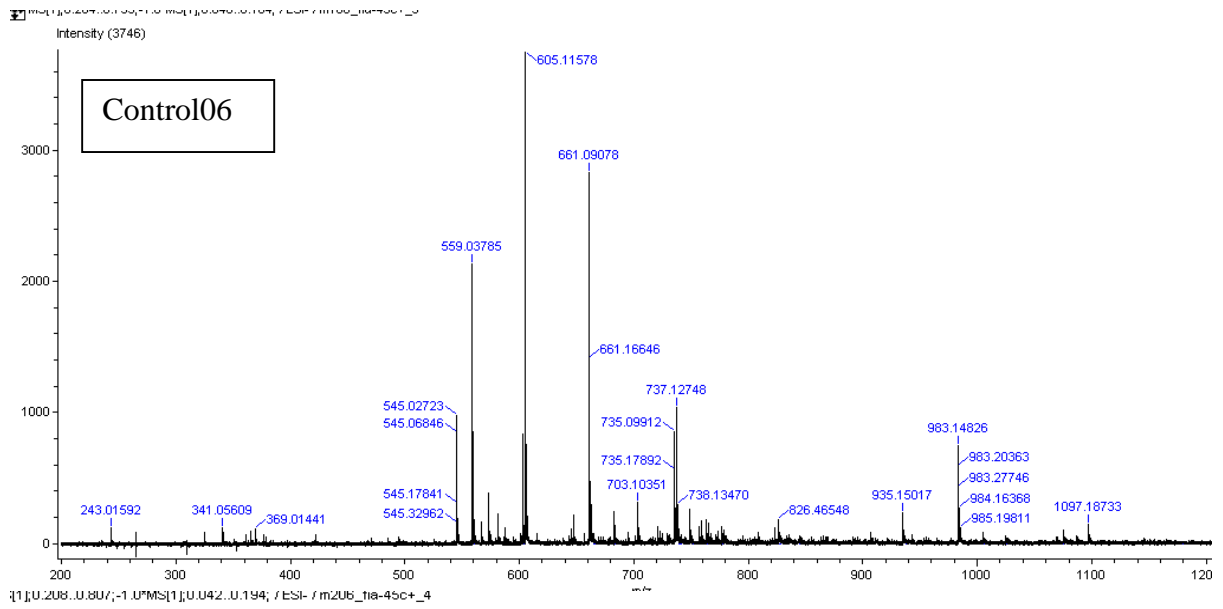
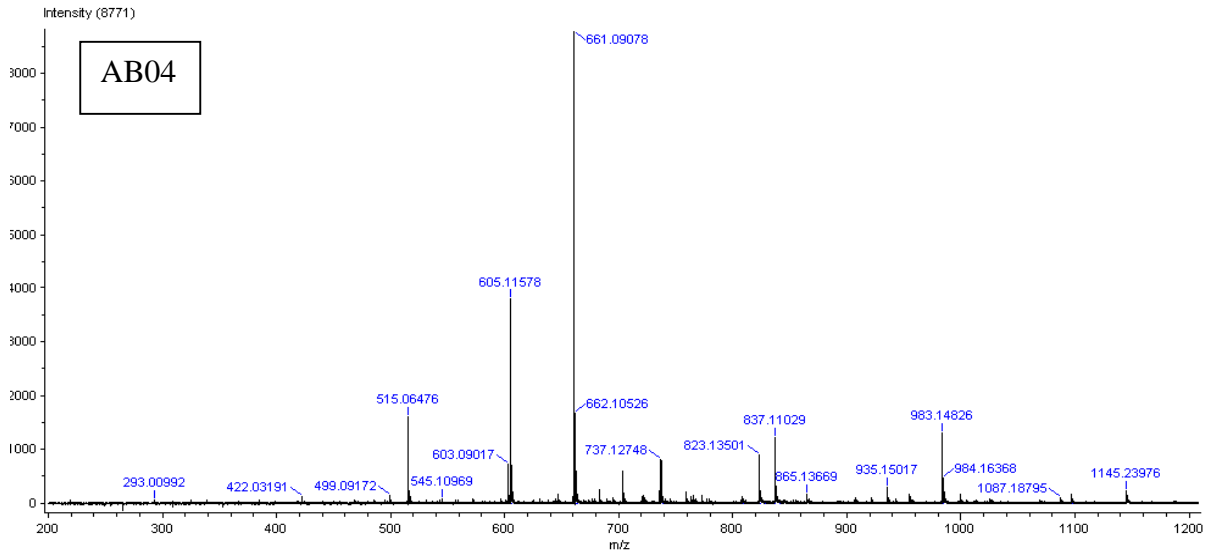
ANNEXE 2. SPECTRES DE MASSE EST-TI DES OLIGOSACCHARIDES DES VINS 2004 ET 2006

MS[1];0.194..0.947;-1.0*MS[1];0.040..0.178; /ESI- /m104_fia-45c+_2

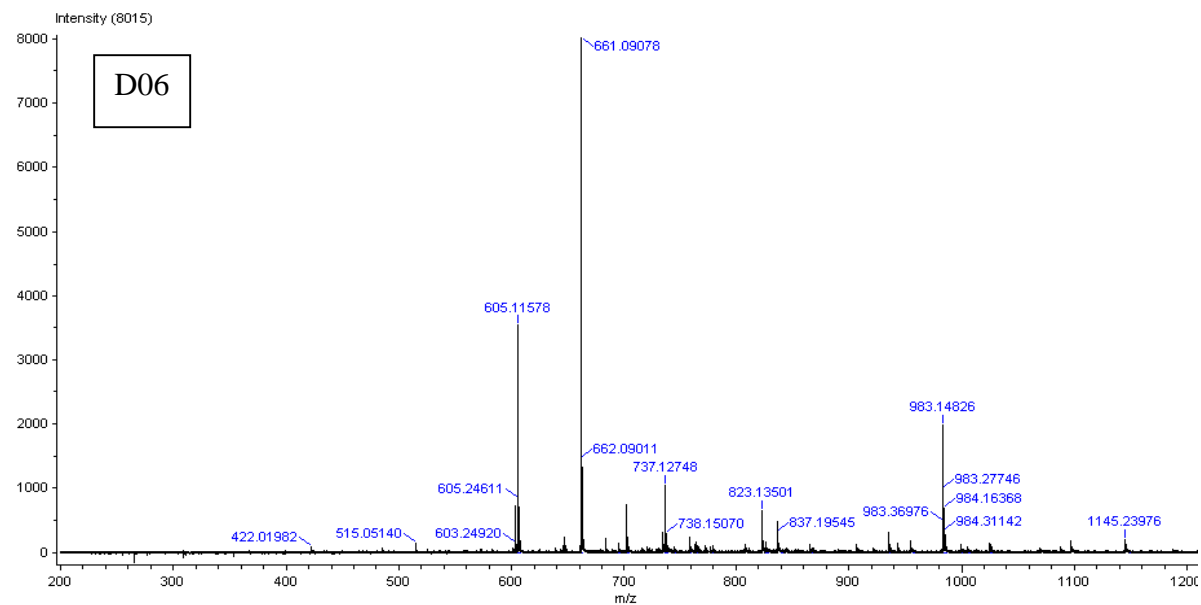


MS[1];0.200..0.839;-1.0*MS[1];0.062..0.186; /ESI- /m304_fia-45c+_2

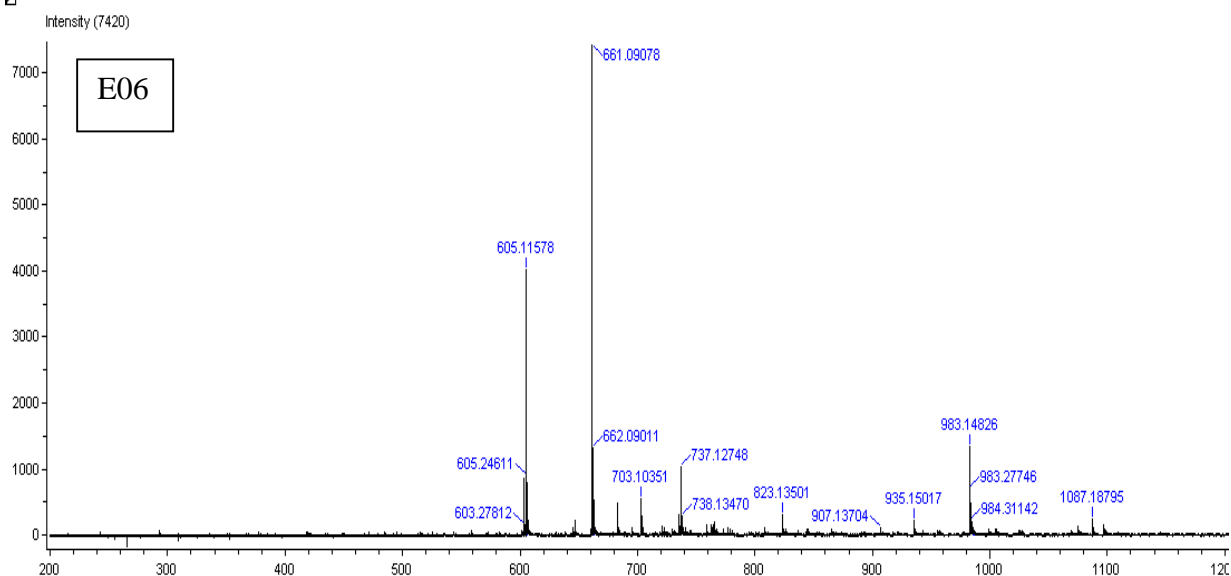




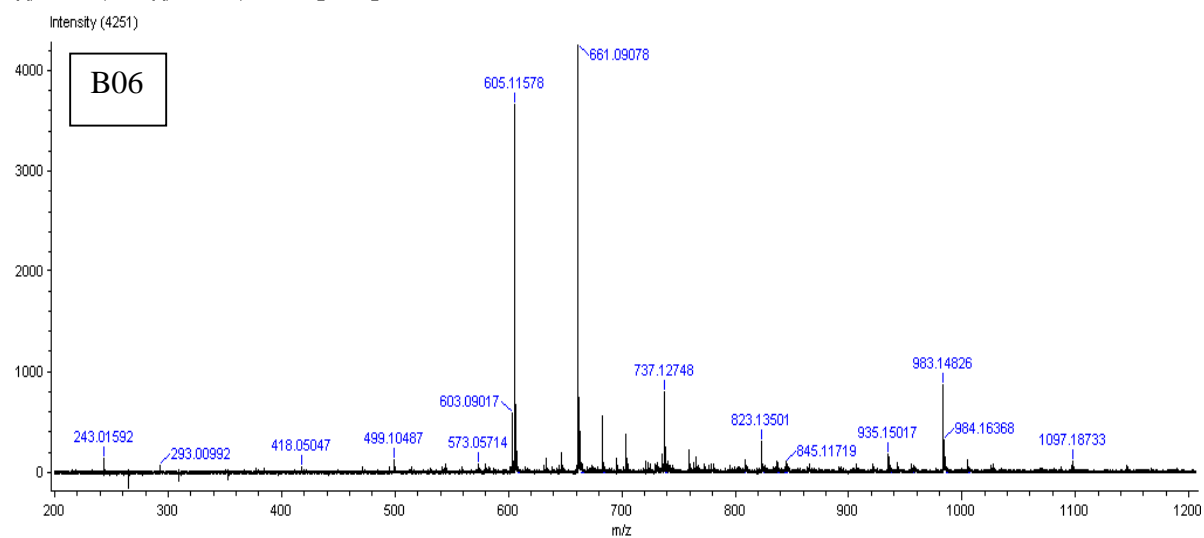
MS[1]:0.198..0.813;-1.0*MS[1]:0.042..0.179; /ESI- /m306_fia-45c+_6

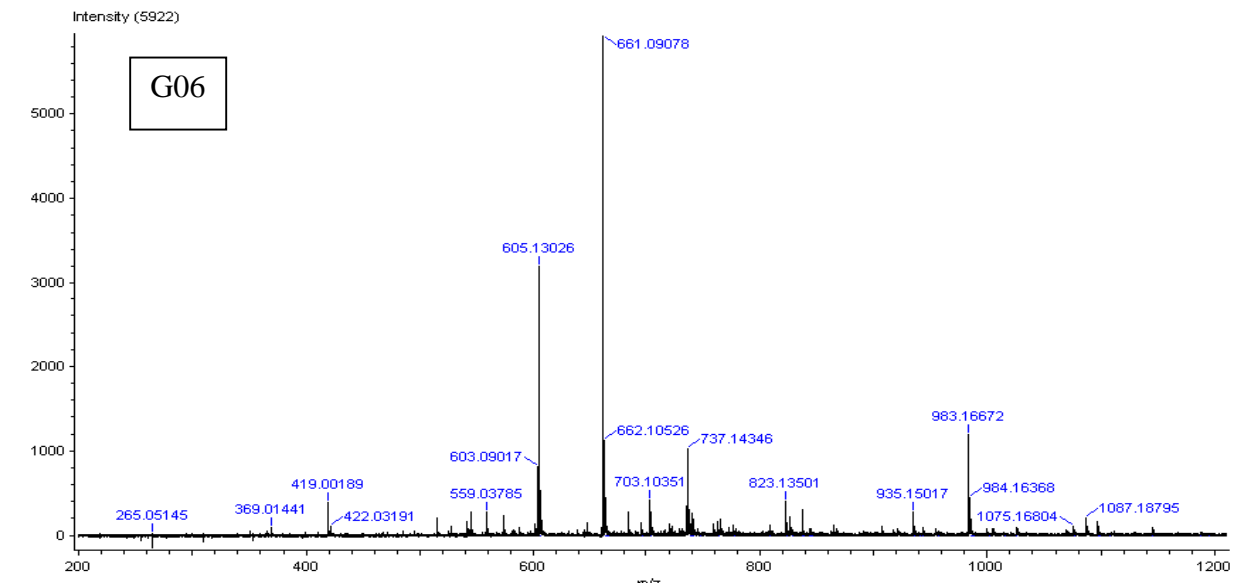
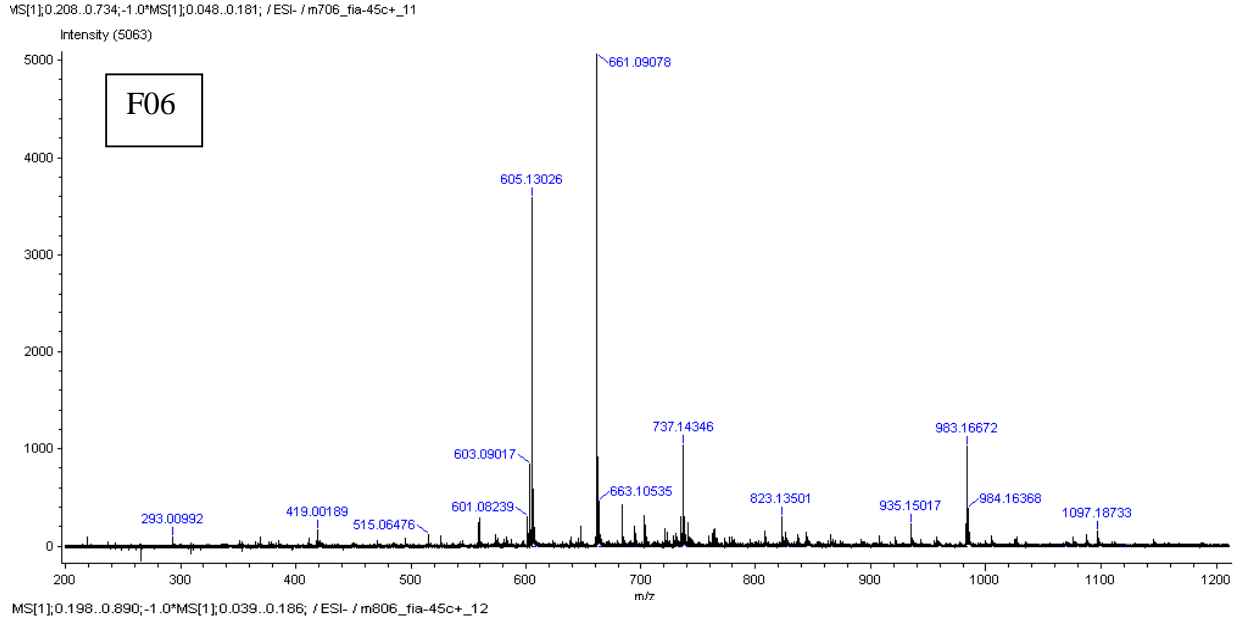
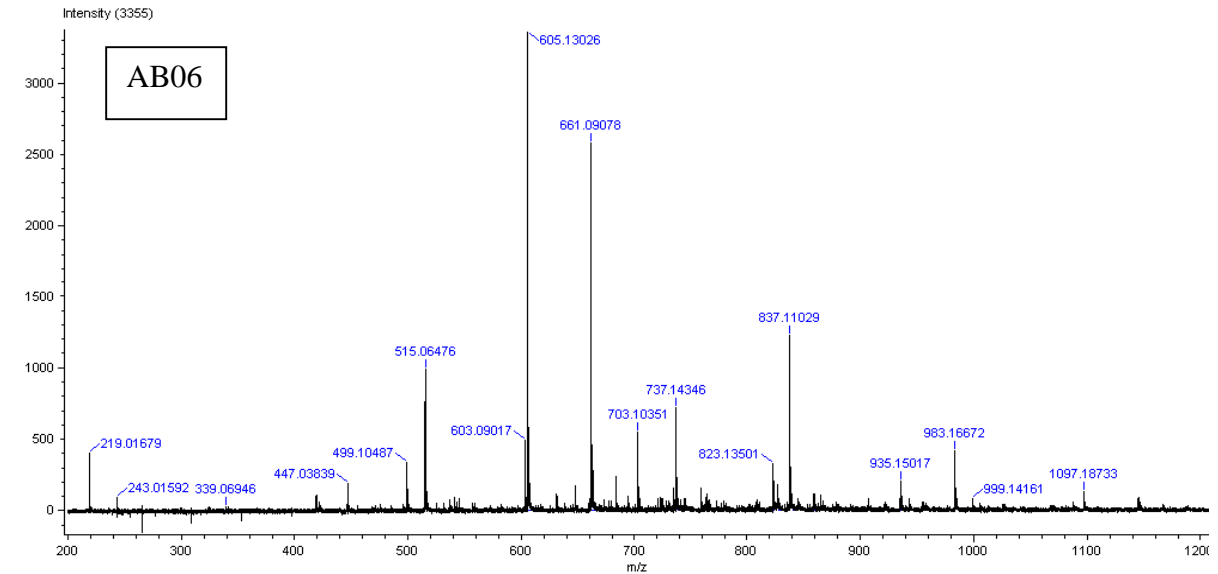


MS[1]:0.203..0.867;-1.0*MS[1]:0.038..0.185; /ESI- /m406_fia-45c+_7

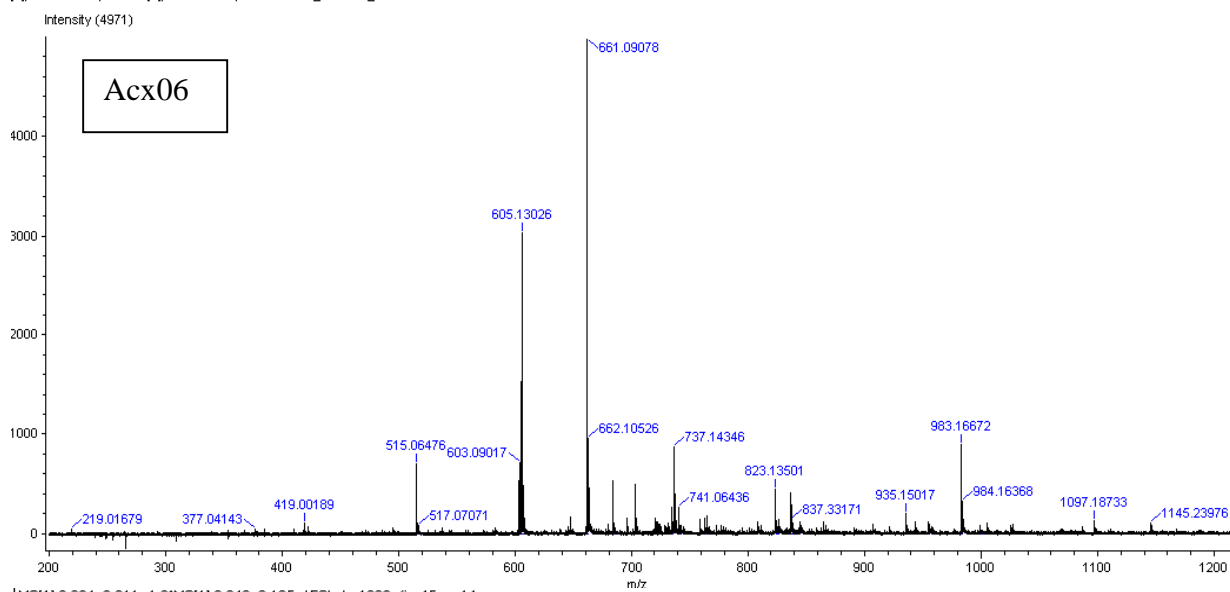


MS[1]:0.210..0.821;-1.0*MS[1]:0.039..0.197; /ESI- /m506_fia-45c+_8

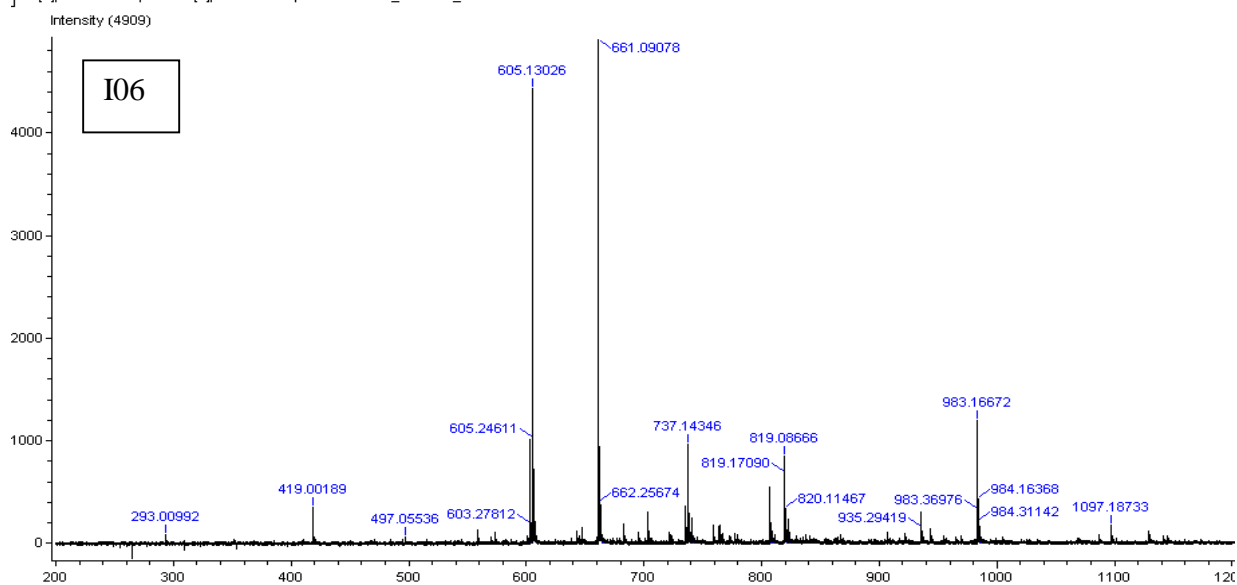




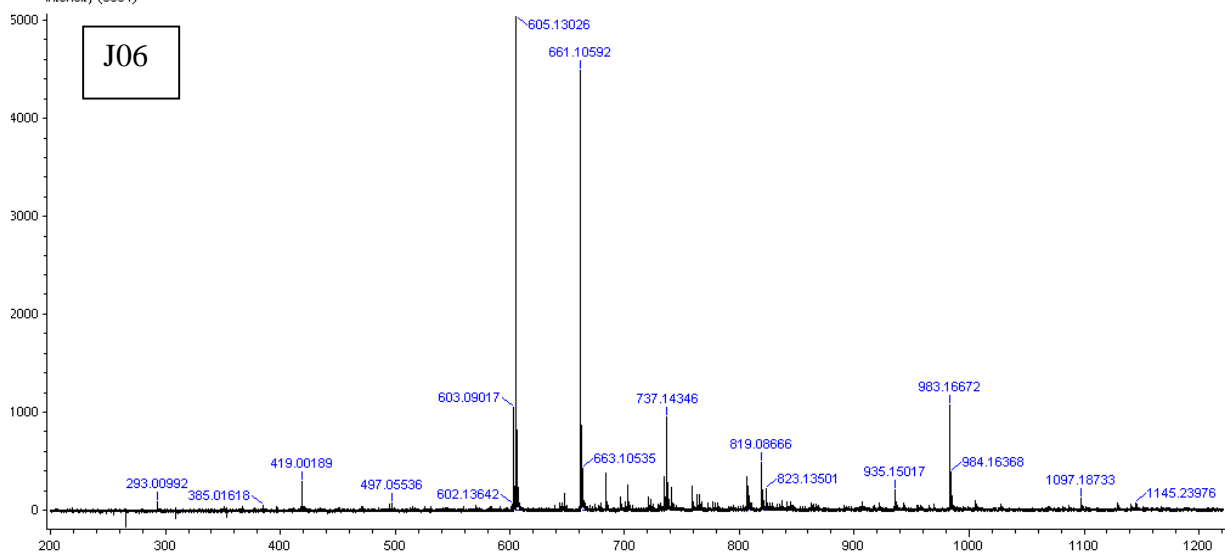
[1]0.200..0.829,-1.0*MS[1],0.038..0.183; /ESI- /m906_fia-45c+_13



[MS[1],0.204..0.811,-1.0*MS[1],0.042..0.185; /ESI- /m1006_fia-45c+_14



Intensity (5034)



ANNEXE 3. PUBLICATION

Food Chemistry 118 (2010) 369–376



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines

Marie-Agnès Ducasse^{a,b,c}, Rose-Marie Canal-Llauberes^b, Marie de Lumley^c, Pascale Williams^a, Jean-Marc Souquet^a, Hélène Fulcrand^a, Thierry Doco^a, Véronique Cheynier^{a,*}^aINRA, Joint Research Unit 1083 Sciences for Oenology, 2 Place Viala, F-34060 Montpellier, France^bNOVOZYMES France, La cité Mondiale, 23 Parvis des Chartrons, 33074 Bordeaux Cedex, France^cLaffort Oenologie, 126 quai Souys, 33100 Bordeaux, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2009

Received in revised form 11 March 2009

Accepted 30 April 2009

Keywords:

Wine

Enzymes

Polyphenols

Tannins

Anthocyanins

Colour

Pectic polysaccharides

RG-II

ABSTRACT

Effect of macerating enzymes on the polyphenol and polysaccharide composition of Merlot wines after 20 months of ageing was studied over three vintages (2004, 2005, 2006). Pectinase rich enzyme preparations, by degrading grape berry cell walls, led to a modification of the molecular weight distribution of polysaccharides released into the wines. Enzyme-treated wines contained more Rhamnogalacturonan II (RG-II) and less polysaccharides rich in arabinose and galactose (PRAGs) over the three vintages. The enzyme treatment also modified wine polyphenol composition. An increase of colour intensity, of derived pigments resistant to sulphite bleaching and of proanthocyanidins (condensed tannins) was observed, modulated by vintage effect. Principal Component Analysis of all the data indicated both vintage and enzyme effects. Beside the vintage effect separating the wine samples, the impact of enzyme treatment on wines was established for each year.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pectinase rich enzyme preparations obtained from *Aspergillus* sp. are commonly used in red wine-making to maximise the extraction of free-run juice during maceration, to aid in clarification and filtration, and to facilitate the processes (Canal-Llaubères, 1993). Pectinases act on the pectic substances which occur as the structural polysaccharides in the middle lamella and primary grape cell wall (Pinelo, Arnous, & Meyer, 2006). The polysaccharidic fraction of wines includes polysaccharides rich in arabinose and galactose (PRAGs) such as type II arabinogalactan-proteins (AGPs) and arabinans, Rhamnogalacturonans (RG-I and RG-II) coming from the pecto-cellulosic cell walls of grape berries (Doco & Brillouet, 1993; Pellerin et al., 1996; Pellerin, Vidal, Williams, & Brillouet, 1995; Vidal, Williams, Doco, Moutounet, & Pellerin, 2003), and mannoproteins (MPs) released by the yeasts during fermentation (Llaubères, Dubourdieu, & Villettaz, 1987; Waters, Wallace, Tate, & Williams, 1993). The structure and amounts of polysaccharides released in wines depend on the wine-making process and can be modified by enzyme treatment (Ayestaran, Guadalupe, & Leon,

2004; Doco, Williams, & Cheynier, 2007; Guadalupe, Palacios, & Ayestaran, 2007). Polysaccharides are one of the main groups of macromolecules of wine. They have been thoroughly studied because of their technological and sensory properties in wines. They play a role in the colloidal stability of wines through their ability to interact and aggregate with tannins. Polysaccharides do not prevent initial tannin aggregation but they influence particle size evolution (Riou, Vernhet, Doco, & Moutounet, 2002). RGII enhances tannin particle size, suggesting co-aggregation between RGII and tannins. It has been shown to decrease astringency in wine-like model solutions (Vidal et al., 2004) and is also known to inhibit hydrogen tartrate crystallisation (Gerbaud et al., 1996). The effect of enzymes on wine polysaccharide composition has been already studied (Doco et al., 2007): an increase of RG-II and a decrease of PRAGs were observed, along with a particular modification of AGPs, with loss of their terminal arabinose residues. Addition of macerating enzymes to the mash is also commonly performed to increase the extraction of phenolic compounds, and especially anthocyanins which are the red pigments of grapes, and thus to enhance wine colour intensity. However, studies on the effect of enzymes on wine colour and anthocyanin content have led to conflicting results (Sacchi, Bisson, & Adams, 2005): some publications have shown an increase of anthocyanins (Kelebek, Canbas,

* Corresponding author. Tel.: +33 4 99 61 22 98; fax: +33 4 99 61 28 57.
E-mail address: cheynier@supagro.inra.fr (V. Cheynier).

Cabaroglu, & Selli, 2007; Revilla & Gonzalez-SanJose, 2003) or an increase of colour (Bakker, Bellworthy, Reader, & Watkins, 1999; Ducruet, An, Canal-Llauberes, & Glories, 1997), while others have reported a decrease of anthocyanins (Wightman, Price, Watson, & Wrolstad, 1997) or of colour (Bautista-Ortin, Martinez-Cutillas, Ros-Garcia, Lopez-Roca, & Gomez-Plaza, 2005). These discrepancies may be due to differences in grape polyphenol compositions, in their extraction rates into the wines, and in their reactions in wine, depending on many parameters, such as the cultivar, the maturity of grape berries, and the wine-making techniques. Indeed, the colour of red wine is not only due to anthocyanins extracted from the grape skins but also to various products formed during wine-making and ageing. In particular, tannins (i.e. proanthocyanidins, which are oligomers and polymers of flavan-3-ols such as catechins) that play a significant role in the taste of wines (Cheynier et al., 2006) and contribute to the colour stability of red wines as they react with anthocyanins to form derived pigments such as tannin–anthocyanin and anthocyanin–tannin adducts (Fulcrand, Atanasova, Salas, & Cheynier, 2004; Salas, Fulcrand, Meudec, & Cheynier, 2003). Tannin extraction is modulated by their interactions between them and with polysaccharides. In particular, it can be impeded by their adsorption on polysaccharides of the cell and vacuole walls (Renard, Baron, Guyot, & Drilleau, 2001). The effect of macerating enzymes on tannin concentration has been evaluated using a precipitation method (Romero-Cascales, Fernandez-Fernandez, Ros-Garcia, Lopez-Roca, & Gomez-Plaza, 2008), and from absorbance measurements at 280 nm performed directly on wines (Kelebek et al., 2007) or after fractionation of wine proanthocyanidins (Bautista-Ortin et al., 2005): an increased extraction of tannins was commonly observed. However, to our knowledge, no information is available on the effect of enzyme treatments on wine proanthocyanidin composition. Methods based on acid-catalysed cleavage in the presence of a nucleophilic agent (thiolysis, phloroglucinolysis), followed by HPLC analysis of the resulting depolymerisation products, have been developed to determine the quantitative and qualitative composition of wine proanthocyanidins. Their application has enabled the characterisation of seed (Prieur, Rigaud, Cheynier, & Moutounet, 1994), skin (Souquet, Cheynier, Brossaud, & Moutounet, 1996) and pulp (Mane et al., 2007) proanthocyanidins, thus making it possible to monitor their extraction into the wine (Morel-Salmi, Souquet, Bes, & Cheynier, 2006) and to establish relationships between tannin composition and astringency (Vidal, Francis et al., 2003). In this study, the effect of macerating enzymes on the polysaccharide and polyphenol composition and the colour of Merlot wines was determined over three vintages. Due to their importance in red wine quality, proanthocyanidin quantitative and qualitative compositions were determined by phloroglucinolysis.

2. Materials and methods

2.1. Grape materials

Raw materials for this study were grapes from *Vitis Vinifera* var. Merlot grown in an experimental parcel located near Bordeaux in Southern France and harvested at maturity (Table 1) over three

vintages (2004, 2005 and 2006). Analyses at harvest [reducing sugars (RS) measured by a colorimetric method (OIV, 2005), total acidity (TA), weight of grape berries (W), pH, anthocyanins at pH 3.2 determined by Glories's method (Ribèreau-Gayon, Glories, Maujean, & Dubourdieu, 2004) (ApH3.2), absorbance at 280 nm (DO280)] were performed by SARCO (Laffort laboratory, France).

2.2. Preparation of trials

One hundred and seventy kilograms of grapes, representative sampling of the parcel, were destemmed and crushed, and distributed into 200 l stainless steel tanks. Bisulphite (6 g/hl) was first added. After homogenisation, different enzymatic preparations were added: enzyme A (Vinozym Vintage FCE, Novozymes, Denmark, a preparation of pectinases, mainly containing polygalacturonase purified from cinnamoyl esterase activity for red wine-making) was applied at 3.5 g/100 kg either alone or together with enzyme B (Vinoflow FCE, Novozymes, Denmark, a purified preparation of pectinases and beta-glucanases for red wine maturation) at 5 g/hl. Abbreviations used for trials are the following: control wine (control); enzyme A (A); enzymes A and B (AB), vintages: 2004 coded 04, 2005 coded 05, 2006 coded 06.

2.3. Wine-making

After 12 h of maceration at 12 °C, all fermentations were started by implanting Excellence SP (commercial yeast, Lamothe-Abiet, Bordeaux, France) at 20 g/hl and were carried out in 200 l stainless steel tanks equipped with temperature control enabling to regulate fermentation kinetics. Alcoholic fermentation started at 15 °C; the temperature was allowed to rise during fermentation and was then maintained at around 24–25 °C. When alcoholic fermentation was finished (11 days), the free-run juice of each trial was transferred to one 200 l tank. After devatting, the young wines were kept at 20–21 °C to favour malolactic fermentation using thermoregulation. Freeze dried bacteria culture was inoculated at 1 g/hl to induce malolactic fermentation. Wines were filtered after 6 months of ageing on clarifying 20 × 20 cm cellulose-Kieselguhr Seitz K200 plates prior to bottling. Wine samples were stored in the wine experimental cellar until analysis. All wines were analysed after the same period of ageing, i.e. 20 months after the end of alcoholic fermentation.

2.4. Preparation of total soluble polysaccharides of wines

The wine polysaccharides were isolated as previously described (Vidal, Williams et al., 2003). Wine (2.5 ml) was evaporated in centrifugal evaporator (EZ-2, Genevac®, Ipswich, UK). The residue was dissolved in 0.5 ml of water to obtain wine concentrated five times. Ethanol (2.66 ml, 95%) containing 0.5% HCl was added to obtain a final concentration of 80% ethanol. After one night at 4 °C, wine polysaccharides were precipitated and the supernatant was eliminated after centrifugation (10 min, 15,000 rpm). The pellet that corresponds to total wine colloids was dissolved in 1 ml of H₂O (Millipore). The oligosaccharides and salts contained in the total colloids were eliminated by retention on a column (4 ml) of an

Table 1
Enological data at harvest of the three vintages.

Vintage	Date of harvest	RS ¹ (g/l)	TA ² (H ₂ SO ₄ g/l)	W ³ (200 grape berries) (g)	pH	A ⁴ pH = 3.2 (mg/l)	DO280 ⁵
2004	09/29/2004	215	2.8	379	3.5	852	57
2005	09/19/2005	222	3.64	312	3.34	1017	65
2006	09/21/2006	232	3.54	350	3.47	963	62

1: Reducing sugars, 2: total acidity, 3: weight of 200 grape berries, 4: anthocyanins at pH = 3.2 determined by Glories method, 5: absorbance at 280 nm.

ion exchange mixed resin (Mix Bed Resin AG 501-X8, Bio Rad); wine polysaccharides, not retained, were eluted by 2.5 bed volumes of H₂O. Total soluble polysaccharides were obtained after the freeze drying of water eluted materials.

2.5. Analysis of polysaccharides

The molecular weight distribution of the wine polysaccharides was determined by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) using a system equipped with a 234-Gilson sampling injector (Roissy, France), a LC-10 AS Shimadzu pump (Kyoto, Japan). HPSEC elution was performed on two serial Shodex Ohpak KB-803 and KB-805 columns (0.8 × 30 cm; Showa Denko, Japan) connected to a ERC-7512 refractometer (Erma, Japan) at 1 ml/min flow rate in 0.1 M LiNO₃. The apparent molecular weights were deduced from the calibration curve established with a pullulan calibration kit (P-400, $M_w = 380,000$; P-200, $M_w = 186,000$; P-100, $M_w = 100,000$; P-50, $M_w = 48,000$; P-20, $M_w = 23,700$; P-10, $M_w = 12,200$; P-5, $M_w = 5800$; Showa Denko K.K., Japan). The calibration equation was $\log M_w = 28.321 - 1.04 \times tR$ (tR = column retention-time at peak maximum, and $r^2 = 0.997$). Neutral monosaccharides were released after hydrolysis of wine polysaccharides with 2 M trifluoroacetic acid (75 min at 120 °C) (Albersheim, Nevins, English, & Karr, 1967). They were then converted to the corresponding alditol acetate derivatives by reduction and acetylation and quantified by GC analysis (Harris, Henry, Blakeney, & Stone, 1984) using a fused silica DB-225 (210 °C) capillary column (30 m × 0.32 mm i.d., 0.25 μm film) with H₂ as the carrier gas on a Hewlett-Packard Model 5890 gas chromatograph. The different alditol acetates were identified on the basis of their retention time by comparison with standard monosaccharides. Neutral sugar amounts were calculated relative to the internal standard (myo-inositol). Polysaccharide composition of each wine was estimated from the concentration of individual glycosyl residues, determined by GC after hydrolysis, reduction, and acetylation, that are characteristic of the known wine polysaccharides as previously described (Vidal, Williams, O'Neill & Pellerin, 2001). The calculation of the wine polysaccharide concentrations takes account of the composition of characteristic monosaccharides as well as hydrolysis yield (Doco, Quellec, Moutounet, & Pellerin, 1999).

2.6. Sample preparation and analysis of wine polyphenols

2.6.1. Analysis of anthocyanins and tannin–anthocyanin dimer adducts

Anthocyanins and tannin–anthocyanin dimer adducts were analysed by direct injection of wines into the HPLC system. HPLC–DAD analyses were performed using a Waters 2690 system equipped with an autosampler system, a Waters 996 photodiode array detector, and a Millennium 32 chromatography manager software (Waters, Milford, MA). Separation was achieved on a reversed-phase Atlantis dC18 column (250 × 2.1 mm i.d., 5 μm packing) protected with a guard column of the same material (20 × 2.1 mm i.d., 3 μm packing) (Waters, Milford, MA). The elution conditions were as follows: 0.250 ml/min flow rate; oven temperature 30 °C; solvent A, water/formic acid (95/5 v/v); solvent B, acetonitrile/water/formic acid (80/15/5 v/v/v); elution began isocratically with 0% B during 5 min, then continued with linear gradients from 0% to 10% B in 20 min, from 10% to 20% B in 15 min, from 20% to 45% B in 15 min, from 45% to 60% B in 15 min, from 60% to 80% B in 5 min, followed by washing and re-equilibration of the column. The injection volume for all samples was 5 μl. A calibration curve was established using malvidin 3-O-glucoside from Extrasynthese (Genay, France) to quantify red pigments at 520 nm as equivalent malvidin 3-O-glucoside.

2.6.2. Analysis of tannins

Tannins were analysed by HPLC after acid-catalysed cleavage in the presence of excess phloroglucinol as previously described (Kennedy & Jones, 2001). The protocol was adapted for analysis of wine tannins as follows. Wine (4 ml) was evaporated in centrifugal evaporator (EZ-2, Genevac[®], Ipswich, UK). The residue was dissolved in 4 ml of water/acetic acid (98/2 v/v) and 1 ml was applied on a C-18 solid phase extraction cartridge (Waters, Vac tC18 3cc) using the RapidTrace[®]SPE workstation (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). Sugars and organic acids were eluted with 5 ml of water/acetic acid (98/2 v/v) and phenolic compounds recovered with 8 ml of methanol. Methyl paraben (2 g/l) was added as an internal standard. An eluent volume of 8 ml was evaporated to dryness under vacuum, redissolved in 200 μl of MeOH containing 0.2 N HCl, 50 g/l phloroglucinol, and 10 g/l ascorbic acid and heated for 20 min at 50 °C. Then, an equivalent volume of aqueous 200 mM sodium acetate was added to stop the reaction. Released terminal subunits and extension subunit-phloroglucinol adducts were analysed by HPLC using a Waters 2690 system with a reversed-phase Atlantis dC18 column (Waters, Milford, MA; 5 μm packing, 250 × 4.6 mm i.d.) protected by a guard column of the same material (20 × 4.6 mm i.d.; Waters, Milford, MA) and with a Security-guard[™] cartridge C18 (Phenomenex, Torrance, CA; 4.0 × 3.0 mm i.d.). The mobile phase was a gradient of water/acetonitrile/formic acid (80/18/2 v/v/v; solvent B) in water/formic acid (98/2 v/v; solvent A), at a flow rate of 1 ml/min at 30 °C. Proportions of solvent B were as follows: 0–5 min with 0% B; 5–35 min, 0–10%; 35–70 min, 10–20%; 70–75 min, 20–100%; and 75–80 min, 100–0%. The injection volume for all samples was 10 μl. The proanthocyanidin units were detected by a Waters 996 photodiode array detector and quantified from peak areas at 280 nm using external calibration with known concentrations of flavan-3-ol monomers from Sigma (Saint Louis, MO) and flavan-3-ol-phloroglucinol adducts, purified in the laboratory. Each analysis was performed in triplicate. These analyses gave access to total proanthocyanidin content, their mean degree of polymerisation (mDP), and the percentage of each constitutive unit (i.e. catechin, epicatechin, epicatechin gallate (%gal), epigallocatechin (%egc)). The mDP was calculated as the ratio between the summed molar concentrations of all released constitutive units and the summed molar concentrations of terminal constitutive units.

2.7. Spectrophotometric measurements

Absorbance measurements were made with a SAFAS[®] UV mc2 spectrophotometer (Monaco) and colour indices were deduced from these absorbance measurements as previously described (Atanasova, Fulcrand, Cheynier, & Moutounet, 2002; Glories, 1984; Somers & Evans, 1977). All the absorbance measurements were converted to a 10-mm light path cell and a dilution of 1 before calculating indices. Absorbance values at 420, 520, and 620 nm were measured, 30 min after addition of acetaldehyde, in a 1-mm light path cell. Hue (H) was calculated as A420/A520 and colour intensity corrected of bisulphite (Clcorr) as A420 + A520 + A620. Wine pigments corrected of bisulphite at wine pH (WPcorr) was defined as the absorbance at 520 nm, 30 min after addition of acetaldehyde. Colour due to derivatives resistant to sulphite bleaching was determined at 520 nm in a 1-mm light path cell, 30 min after addition of a metabisulphite solution, and sulphite bleaching resistant pigments (PR_{SO2}) was calculated. Total pigments at acidic pH (P_{pH<1}) was determined from absorbance at 520 nm with a 10-mm light path, 4 h after a 100-fold dilution in HCl 1 M. Total polyphenol index (TPI) was determined from absorbance at 280 nm with a 10-mm light path after a 100-fold dilution.

2.8. Statistical analysis

Data are expressed as the average of three measurements. ANalysis Of VAriance (ANOVA) and Principal Component Analysis (PCA) were carried out with the software XLSTAT (Addinsoft, Paris, France). The analytical data were centred and normalised before being treated by PCA.

3. Results and discussion

3.1. Effect of enzymes on wine polysaccharide profile

The polysaccharides isolated from Merlot wines have the same molecular weight distribution as previously described in Carignan (Doco et al., 1999) and Tempranillo (Guadalupe & Ayestaran, 2007) wines (Fig. 1). A first peak eluting between 14 and 16.5 min corresponds to mannoproteins (MPs) released from yeast during fermentation; a second peak eluting between 16.5 and 18 min corresponds mainly to a mixture of arabinogalactan-proteins (AGPs), arabinans, and few MPs; and a third peak eluting between 18 and 19.2 min corresponds mainly to Rhamnogalacturonan II

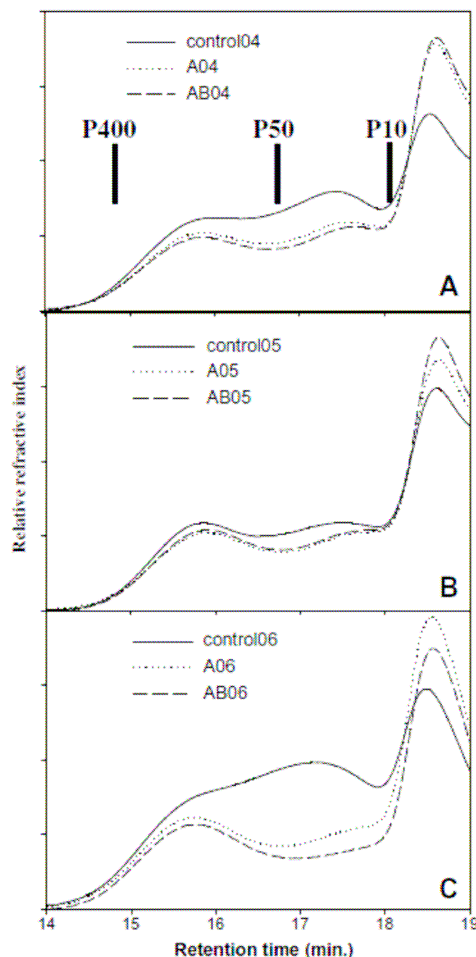


Fig. 1. Molecular weight distribution of polysaccharides isolated from 2004 wines (A), 2005 wines (B), 2006 wines (C).

(RG-II) with AGPs and MPs of lower molecular weight. Pectinase addition leads to a modification of the molecular weight distribution of wine polysaccharides (Fig. 1). A shift from higher to lower molecular weight polysaccharides is observed in enzyme-treated wines; the decrease in the second peak indicates that AGPs and arabinans have been partly degraded to lower molecular weight polysaccharides, while the increase of the third peak may reflect a release of both lower molecular weight polysaccharides and of RGII due to an extended cell wall degradation, as shown earlier (Doco et al., 2007). The enzyme effect on the AGP peak seems to be dependent of vintage. The decrease of the AGP peak in enzyme-treated wines was more pronounced in 2004 and 2006 (Fig. 1A and C, respectively) than in 2005 (Fig. 1B). This phenomenon may be due to a difference of maturity (Table 1) of grape berries between the three vintages.

3.2. Effect of enzymes on polysaccharide composition

Concentrations in MPs, PRAGs and RG-II were estimated from the concentration of individual glycosyl residues (mannose, arabinose, galactose, rhamnose, fucose, xylose, apiose, 2-O-methyl-fucose and 2-O-methyl-xylose) determined by GC after hydrolysis, reduction and acetylation. All the mannose is attributed to yeast MPs. PRAGs, representing mainly arabinogalactan-proteins and arabinans in wines, are estimated from the sum of galactose and arabinose residues. RG-II is calculated from the concentration of apiose, 2-O-methyl-fucose and 2-O-methyl-xylose. Fig. 2 presents the concentrations of MPs, PRAGs and RG-II in mg/l in wines. The data confirms the interpretation of molecular weight distribution profiles. The use of pectolytic enzymes modified the composition of the polysaccharides released from cell walls in wines as shown by a decrease of PRAG concentration and an increase of RG-II concentration. The loss of PRAGs was more pronounced in 2006 than in 2004 (Fig. 2A and C, respectively) and was not observed in 2005 (Fig. 2B). Again, this may be related to differences in grape maturity between the three vintages, as suggested above. As expected, no significant effect of pectolytic enzymes on MPs was observed.

3.3. Effect of enzymes on wine colour

Total polyphenol and wine colour indices (Table 2) were deduced from the absorbance measurements (Glories, 1984; Somers & Evans, 1977). Colour intensity was measured after addition of acetaldehyde to release anthocyanins eventually involved in bisulphite adducts (Atanasova et al., 2002). Large vintage differences were observed in the absorbance values. Thus, the total polyphenol and colour intensity values were higher in 2005 than in 2004 and 2006 at 20 months of ageing, suggesting that higher maturity was reached in this vintage. Indeed, monitoring of colour intensity and total polyphenol index during alcoholic fermentation (Fig. 3) shows a faster increase of these indices during the first days of fermentation in 2005 (Fig. 3B) than in 2004 and 2006 (Fig. 3A and C, respectively). In 2005, the extraction kinetics were identical in enzyme-treated wines and in the control wine. In contrast, in 2004 and 2006, TPI values were significantly higher in the treated wines than in the controls throughout fermentation. The total polyphenol index values after 20 months of ageing were also significantly higher in the enzyme-treated wines than in the control except for enzyme A in 2006. This suggests that the plant cell wall degradation induced by the enzyme treatment resulted in increased phenolic extraction from grapes and/or that changes in the wine polysaccharide composition enhanced the solubility and stability of phenolic compounds during wine ageing. The absorbance at 520 nm (WPcorr) and colour intensity (Clcorr) values were also higher in the enzyme-treated wines, after 20 months of ageing,

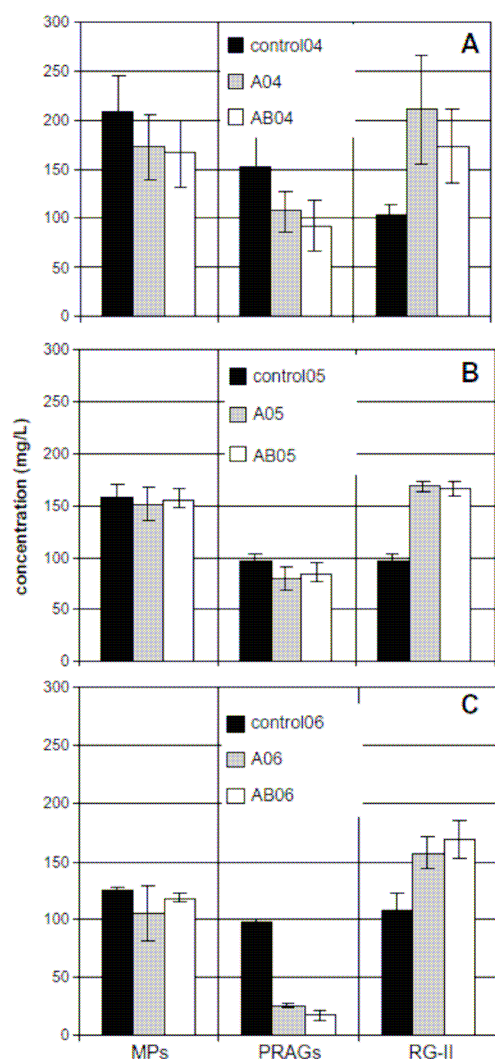


Fig. 2. Concentration (mg/l) of mannoproteins (MPs), polysaccharides rich in arabinose and galactose (PRAGs), and RhamnoGalacturonan II (RG-II) in 2004 wines (A), 2005 wines (B), 2006 wines (B).

for vintages 2004 and 2006, suggesting higher extraction of pigments from the grape berries and/or higher conversion of anthocyanins to derived pigments in wines obtained with enzymatic treatments. The latter hypothesis is confirmed by a higher level of sulphite bleaching resistant pigments (PR_{SO_2}) in the treated wines than in the control wines, as genuine grape anthocyanins are bleached by sulphites while some derived pigments are not. This was not observed for the 2005 wines which showed higher values compared to the others. It seems that enzyme addition has no effect on Total Polyphenol Index (TPI) and Colour Intensity (CI) when using grapes with high initial values of these parameters, as above mentioned and shown by their monitoring of during alcoholic fermentation (Fig. 3B). Finally, the total pigment values measured in acidic conditions (ensuring conversion of all anthocyanins and derivatives to their flavylium pigment forms) were constant

over the three vintages and little affected by the enzyme treatments. This indicates that the higher colour intensities measured in the 2005 wines are due to enhanced stabilisation of the pigments in the wines through formation of derived pigments or copigmentation rather than to a higher concentration of grape anthocyanins. Indeed, the sulphite bleaching resistant pigments contributed about 50% of the red colour in the 2005 wines and only 40% in the other two vintages, confirming that conversion of anthocyanin pigments occurred faster in the 2005 wines. The hue values were higher in the 2006 wines than in the other two series but were not modified by enzyme treatment.

3.4. Effect of enzymes on polyphenol composition

Tannin concentration (T) their qualitative composition (mDP, %gal, %egc), anthocyanin (ACN) concentration and tannin–anthocyanin adduct (TA) concentration are presented in Table 3. The enzyme-treated wines contained larger amounts of tannins than the control wines over the three vintages. Tannin composition was also qualitatively different in the treated wines. Their mDP were slightly higher than in the control wines. This may be due to easier extraction of higher molecular weight tannins as a results of the increased degradation of grape cell walls induced by enzyme addition. In all cases, tannins released into the wines are mainly tannins from skins as evidenced by the %egc. A slight but significant effect of enzymes on %gal was observed in 2004 and 2006. Inconsistent effects of enzyme treatments on the concentrations of anthocyanins and tannin–anthocyanin adducts measured by HPLC were observed (Table 3 ACN, TA). It should be emphasised that the concentration of native anthocyanins reflects both their extraction from the grape and their subsequent reactions in wine. The colour properties are not related to anthocyanin concentrations but depend, on one hand, on the nature and proportions of genuine anthocyanins and derivatives formed from them during wine-making, on the other hand on copigmentation phenomenon. Anthocyanin derivatives include TA adducts which are mostly colourless at wine pH but also other types of pigments that contribute colour in wine. The relative amounts of these various compounds depend on the concentrations of tannins and anthocyanins and on their molar ratio which are modified by enzyme treatment. The increase of colour intensity of enzyme-treated wines was not

Table 2
Wine colour indices over the three vintages.

Trials	Clcorr ^{1,2}	H ^{1,3}	TP ^{1,4}	WPcorr ^{1,5}	PR _{SO₂} ^{1,6}	P _{pH<1} ^{1,7}
2004 vintage						
Control04	10.07 a	0.574 b	36.9 a	5.78 a	2.31 a	12.4 ab
A04	10.86 b	0.567 a	44.7 c	6.27 b	2.58 b	13.0 b
AB04	11.40 c	0.572 b	40.3 b	6.49 c	2.70 c	11.7 a
p-Value	$p < 0.0001$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p < 0.05$
2005 vintage						
Control05	14.79 c	0.581 a	40.5 a	8.09 c	4.41 b	12.5 a
A05	13.51 a	0.579 a	44.3 c	7.64 a	3.75 a	13.6 b
AB05	14.26 b	0.588 b	41.8 b	8.01 b	3.80 a	13.5 b
p-Value	$p < 0.0001$	$p < 0.05$	$p < 0.001$	$p < 0.0001$	$p < 0.001$	$p < 0.05$
2006 vintage						
Control06	9.62 a	0.636 b	36.7 a	5.49 a	2.02 a	12.8 b
A06	10.80 c	0.613 a	36.6 a	5.97 c	2.41 c	12.1 a
AB06	10.32 b	0.647 c	39.1 b	5.86 b	2.28 b	13.1 b
p-Value	$p < 0.0001$	$p < 0.001$	$p < 0.05$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p < 0.05$

1: Average of three measurements, one-factor ANOVA a same letter means no significant difference within each vintage, 2: colour intensity corrected (Abs 420 nm + Abs 520 nm + Abs 620 nm with acetaldehyde), 3: hue (Abs 420 nm/Abs 520 nm without acetaldehyde), 4: Total Polyphenols Index: absorbance at 280 nm, 5: wine pigments corrected (Abs 520 nm with acetaldehyde), 6: pigments resisting to sulphite bleaching (Abs 520 nm with SO_2), 7: pigments at acidic pH < 1 (Abs 520 nm in HCl).

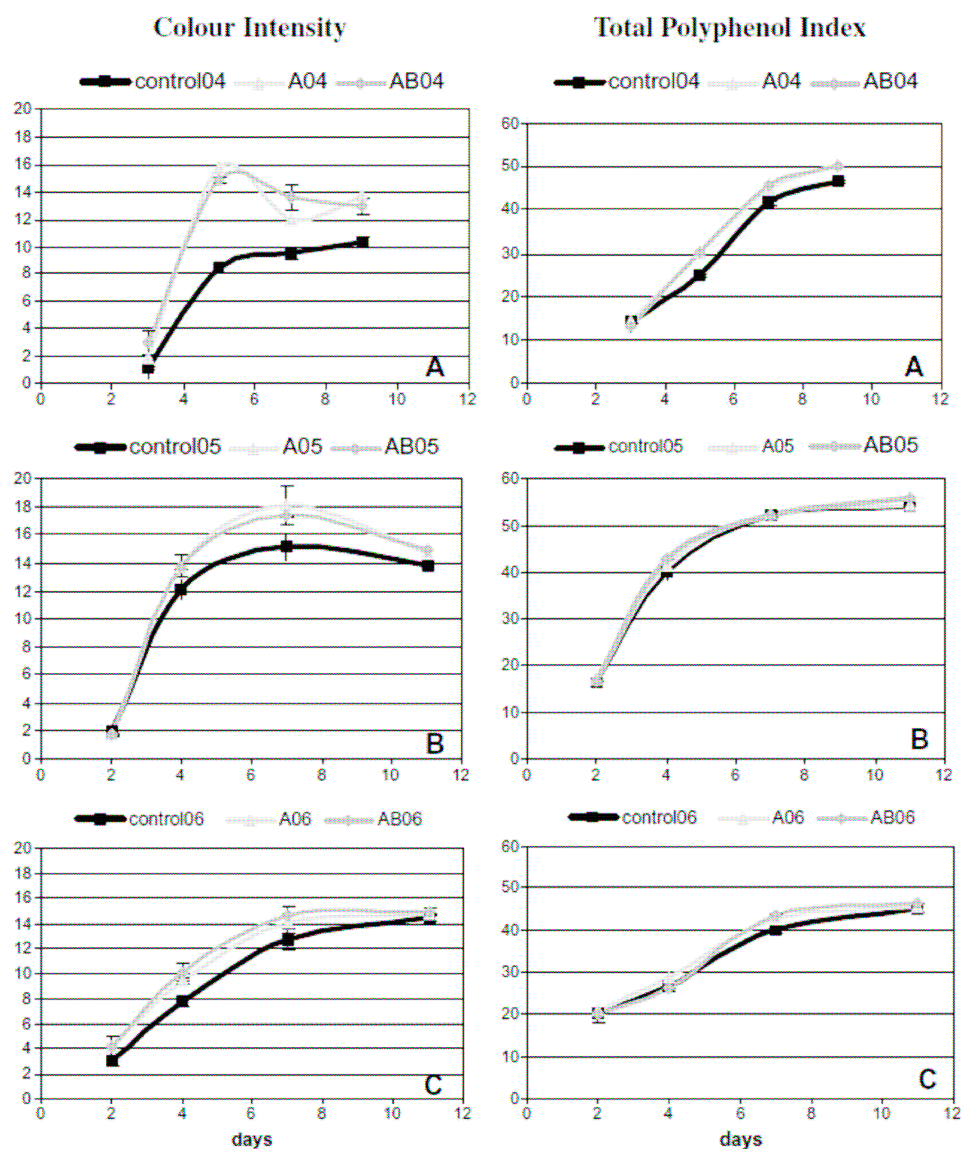


Fig. 3. Evolution of colour intensity (to the left) and total polyphenol index (to the right) during alcoholic fermentation of 2004 wines (A), 2005 wines (B) and 2006 wines (C).

related to a higher concentration of residual native anthocyanins in these wines. Thus, it is presumably due to other phenomena such as increased formation of derived pigments and enhanced copigmentation as a result of increased extraction of tannins (Fulcrand et al., 2004; Salas et al., 2003). It has been shown that the colour stability of malvidin 3-glucoside solutions was decreased in the presence of flavan-3-ol monomers but enhanced in the presence of procyanidin oligomers, especially as their the degree of polymerisation increased (Malien-Aubert, Dangles, & Amiot, 2002).

3.5. Vintage effect versus enzyme effect

Principal Component Analysis was performed on all the data generated from polysaccharide and polyphenol analysis and spec-

trophotometric measurements of the nine wines. The first and second Principal Components explained together 65.71% (PC1 36.43% and PC2 29.28%) of the total variance (Fig. 4). Projection of the wines on the first two PCs (Fig. 4A) shows a separation of the three vintages along the first two axes while control wines and enzyme-treated wines are separated along the second axis. PC1 is mainly associated positively with anthocyanins (ACN), hue (H), and tannins, and negatively with MPs, PRAGs, Clcorr, WPCorr, TPI, and PR₅₀₂ (Fig. 4B). It contrasts 2006 wines, which show higher levels of free anthocyanins, H, and tannins, lower values of polysaccharides, and lower total polyphenol index, with the 2005 and, to a lesser extent, 2004 wines that exhibit higher values for total polyphenol and colour indices. Anthocyanin concentration is anti-correlated with Clcorr ($R = -0.76$), absorbance at 520 nm at wine pH

Table 3
Polyphenol composition of Merlot wines over the three vintages.

Trial	T ^{1,2} (mg/l)	mDP ^{1,3}	%gal ^{1,4}	%egc ^{1,5}	ACN ^{1,6} (mg/l)	TA ^{1,7} (mg/l)
2004 vintage						
Control04	425 a	4.65 a	2.38 a	17.90 a	63.3 b	1.35 a
A04	518 b	4.98 b	3.29 b	18.42 a	55.5 a	1.33 a
AB04	524 b	5.12 b	3.33 b	18.78 a	55.4 a	1.42 a
p-Value	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.001	n.s.	<i>p</i> < 0.05	n.s.
2005 vintage						
Control05	447 a	4.84 a	2.42 b	22.53 a	25.1 a	1.18 a
A05	558 b	5.32 b	3.16 c	22.31 a	52.9 b	2.25 b
AB05	520 ab	6.11 c	1.35 a	23.43 a	58.4 c	1.89 b
p-Value	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.001	n.s.	<i>p</i> < 0.0001	<i>p</i> < 0.05
2006 vintage						
Control06	572 a	4.96 a	1.68 a	24.35 c	85.2 b	1.62 c
A06	583 a	5.18 b	2.10 b	24.02 b	57.6 a	1.31 a
AB06	648 b	5.11 b	2.18 c	23.39 a	83.3 b	1.46 b
p-Value	<i>p</i> < 0.0001	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.0001	<i>p</i> < 0.0001	<i>p</i> < 0.0001	<i>p</i> < 0.01

1: Average of three measurements, one-factor ANOVA a same letter means no significant difference within each vintage, n.s. indicate no significant, 2: tannin concentration, 3: mean degree of depolymerization, 4: % of epicatechin gallate subunits, 5: % of epigallocatechin subunits, 6: anthocyanin concentration, 7: flavanol anthocyanin dimer concentration.

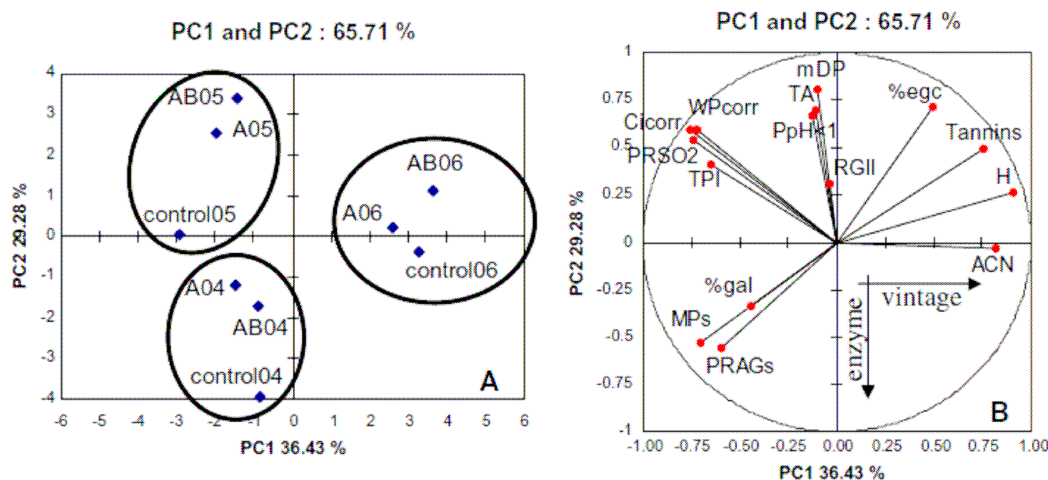


Fig. 4. Principal Component Analysis of the polysaccharide, polyphenol and spectrophotometric data of 2004, 2005, 2006 wines: projection of the wines on principal component 1 (PC1) and principal component 2 (PC2), control wine coded control; enzyme A coded A; enzymes A and B coded AB over three vintages: 2004 coded 04, 2005 coded 05, 2006 coded 06, (B) Correlation scatterplot of the chemical and spectrophotometric variables with PC1 and PC2.

(WPcorr; $R = -0.74$) and PR_{SO_2} ($R = -0.78$), these three values being highly correlated, again meaning that wine colour after 20 months of ageing is mostly due to derived pigments (Fulcrand et al., 2004; Salas et al., 2004). Total polyphenol index appears correlated with colour indices but not with anthocyanins or tannins and thus is mostly contributed by derived pigments. PC2 is associated positively with mDP, $P_{pH<1}$, T-A, %egc, and, to a lesser extent, to tannins and colour indices and negatively with PRAGs and MP concentrations (Fig. 4B). TA and $P_{pH<1}$ are positively correlated ($R = +0.72$), suggesting that the T-A dimers can serve as markers of a large class of T-A adducts which represent the majority of pigments in wine acidified to $pH < 1$. These adducts, like anthocyanins, are coloured at acidic pH but do not contribute much to red colour at the wine pH. Within each vintage, the enzyme-treated wines are distinguished from the control wines along the second axis, on one hand, by their higher contents of RGII and lower levels of PRAGs, related to enzymatic degradation of plant cell walls, on the other hand, by their higher tannin content, higher values of mDP, indicating an in-

creased extraction of tannins as a result of increased cell wall degradation. The 2004 wines are also distinguished from the other two vintages by their higher amounts of PRAGs and MP.

In conclusion, the effect of enzyme treatment has been demonstrated for each vintage, especially with regards to RG-II and tannin concentrations. This effect is more or less marked depending on the vintage. In particular, the increase in colour and degradation of PRAGs was not observed in 2005, possibly due to differences in grape maturity. This should be investigated further. No effect on wine anthocyanin concentration was observed. However, in 2004 and 2006, higher colour indices in the enzyme-treated wines indicate that the enzyme treatment either resulted in higher anthocyanin extraction followed by their conversion to other pigments or favoured reaction mechanisms yielding derivatives that are pigmented in wine. Indeed, the enzyme treatment leads to an increase of pigments resistant to sulphite bleaching which contribute to wine colour. No effect was observed on the concentration of TA adducts which are mostly colourless at wine pH but appeared

correlated to the red colour measured under acidic conditions (pH < 1). Finally, changes in polysaccharide composition induced by enzyme treatments may impact the colloidal structure and the mouth-feel properties of phenolic compounds in wines, as shown earlier in model solutions.

Acknowledgments

We thank Frederic Veran (UMR SPO) for technical assistance and all the staff of the wine experimental cellar for assistance with the wine-making experiments.

References

- Albersheim, P., Nevins, D. J., English, P. D., & Karr, A. (1967). A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid-chromatography. *Carbohydrate Research*, 5, 340–345.
- Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2002). Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine making. *Analytica Chimica Acta*, 458, 15–27.
- Ayestaran, B., Guadalupe, Z., & Leon, D. (2004). Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 29–39.
- Bakker, J., Bellworthy, S. J., Reader, H. P., & Watkins, S. J. (1999). Effect of enzymes during vinification on color and sensory properties of port wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(3), 271–276.
- Bautista-Ortin, A. B., Martinez-Cutillas, A., Ros-Garcia, J. M., Lopez-Roca, J. M., & Gomez-Plaza, E. (2005). Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science and Technology*, 40(8), 867–878.
- Canal-Llaubères, R. M. (1993). Enzymes in winemaking. In F. GH (Ed.), *wine microbiology and biotechnology* (Vol. 886, pp. 477–506). Washington, DC: Hardwood Academic Publishers.
- Cheynier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.-M., Sarni-Manchado, P., et al. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 298–305.
- Doco, T., & Brillouet, J.-M. (1993). Isolation and characterisation of a RhamnoGalacturonan II from red wine. *Carbohydrate Research*, 243(2), 333–343.
- Doco, T., Quéllec, N., Moutounet, M., & Pellerin, P. (1999). Polysaccharide patterns during the aging of Carignan noir red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 28–32.
- Doco, T., Williams, P., & Cheynier, V. (2007). Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6643–6649.
- Ducruet, J., An, D., Canal-Llaubères, R. M., & Glories, Y. (1997). Influence des enzymes pectolytiques sélectionnées pour l'oenologie sur la qualité et la composition des vins rouges. *Revue Française d'Oenologie*, 166, 16–19.
- Fulcrand, H., Atanasova, V., Salas, E., & Cheynier, V. (2004). The fate of anthocyanins in wine: Are there determining factors? In A. L. Waterhouse, & J. Kennedy (Eds.), *Red wine color: Revealing the mysteries* (Vol. 886, pp. 68–85). Washington, DC: American Chemical Society.
- Gerbaud, V., Gabas, N., Laguerie, C., Blouin, J., Vidal, S., Moutounet, M., et al. (1996). Effect of wine polysaccharides on the nucleation of potassium hydrogen tartrate in model solutions. *Chemical Engineering Research and Design*, 74(A7), 782–790.
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 2ème partie. Origine et interprétation. *Connaissance de la vigne et du vin*, 18(25), 3–271.
- Guadalupe, Z., & Ayestaran, B. (2007). Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of Tempranillo red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10720–10728.
- Guadalupe, Z., Palacios, A., & Ayestaran, B. (2007). Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4854–4862.
- Harris, P. J., Henry, R. J., Blakeney, A. B., & Stone, B. A. (1984). An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 127(1), 59–73.
- Kelebek, H., Cambas, A., Cabaroglu, T., & Selli, S. (2007). Improvement of anthocyanin content in the cv. Okuzgozu wines by using pectolytic enzymes. *Food Chemistry*, 105(1), 334–339.
- Kennedy, J., & Jones, G. P. (2001). Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1740–1746.
- Llaubères, R. M., Dubourdieu, D., & Villettaz, J. C. (1987). Exocellular polysaccharides from Saccharomyces in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 41, 277–286.
- Malien-Aubert, C., Dangles, O., & Amiot, M. J. (2002). Influence of procyanidins on the color stability of oenin solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3299–3305.
- Mane, C., Souquet, J. M., Olle, D., Verries, C., Veran, F., Mazerolles, G., et al. (2007). Optimization of simultaneous flavanol, phenolic acid, and anthocyanin extraction from grapes using an experimental design: application to the characterization of champagne grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18), 7224–7233.
- Morel-Salmi, C., Souquet, J. M., Bes, M., & Cheymier, V. (2006). The effect of flash release treatment on phenolic extraction and wine composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4270–4276.
- OIV. (2005). *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts* (Vol. 1). MA-F-AS311-301-SUCRED.
- Pellerin, P., Doco, T., Vidal, S., Williams, P., Brillouet, J. M., & Oneill, M. A. (1996). Structural characterization of red wine RhamnoGalacturonan II. *Carbohydrate Research*, 290(2), 183–197.
- Pellerin, P., Vidal, S., Williams, P., & Brillouet, J.-M. (1995). Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red-wine of increasing uronic acid content. *Carbohydrate Research*, 277, 135–143.
- Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology*, 17(11), 579–590.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36, 781–784.
- Renard, C., Baron, A., Guyot, S., & Drilleau, J.-F. (2001). Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: Quantification and some consequences. *International Journal of Biological Macromolecules*, 29, 115–125.
- Revilla, L., & Gonzalez-SanJose, M. L. (2003). Compositional changes during the storage of red wines treated with pectolytic enzymes: Low molecular-weight phenols and flavan-3-ol derivative levels. *Food Chemistry*, 80(2), 205–214.
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2004). Chimie du vin, stabilisation et traitements. In Dunod (Ed.), *Traité d'Oenologie* (Vol. 2, pp. 240–242). France.
- Riou, V., Vernhet, A., Doco, T., & Moutounet, M. (2002). Aggregation of grape seed tannins in model - Effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 16, 17–23.
- Romero-Cascales, I., Fernandez-Fernandez, J. I., Ros-Garcia, J. M., Lopez-Roca, J. M., & Gomez-Plaza, E. (2008). Characterisation of the main enzymatic activities present in six commercial macerating enzymes and their effects on extracting colour during winemaking of Monastrell grapes. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(7), 1295–1305.
- Sacchi, K. L., Bisson, L. F., & Adams, D. O. (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(3), 197–206.
- Salas, E., Atanasova, V., Poncet-Legrand, C., Meudec, E., Mazauric, J., & Cheynier, V. (2004). Demonstration of the occurrence of flavanol-anthocyanin adducts in wine and in model solutions. *Analytica Chimica Acta*, 513, 325–332.
- Salas, E., Fulcrand, H., Meudec, E., & Cheynier, V. (2003). Reactions of anthocyanins and tannins in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7951–7961.
- Somers, T. C., & Evans, M. E. (1977). Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28, 279–287.
- Souquet, J.-M., Cheynier, V., Brossaud, F., & Moutounet, M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43(2), 509–512.
- Vidal, S., Courcoux, P., Francis, L., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., et al. (2004). Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preference*, 15(3), 209–217.
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., et al. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(6), 564–573.
- Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M., & Pellerin, P. (2003). The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 439–447.
- Vidal, S., Williams, P., O'Neill, M. A., & Pellerin, P. (2001). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: Tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 45, 315–323.
- Waters, E. J., Wallace, W., Tate, M. E., & Williams, P. J. (1993). Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(5), 724–730.
- Wightman, J. D., Price, S. F., Watson, B. T., & Wrolstad, R. E. (1997). Some effects of processing enzymes on anthocyanins and phenolics in Pinot noir and Cabernet sauvignon wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(1), 39–48.