

## NOTE

### ESTIMATION RAPIDE DES CONSTITUANTS MACROMOLECULAIRES DES MOÛTS ET DES VINS PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION (CLHP) DE TAMISAGE MOLECULAIRE

D. DUBOURDIEU, Rose-Marie LLAUBERES\*, C. OLLIVIER\*\*

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II  
351, cours de la Libération, 334045 Talence Cedex (France)

Les macromolécules ou « colloïdes » des moûts et des vins sont essentiellement représentées par les polysaccharides et les protéines. Ces constituants ne peuvent pas être dosés directement dans les moûts ou dans les vins par les méthodes chimiques classiques. En effet, mono- et oligosaccharides interfèrent sur les dosages colorimétriques des polysaccharides neutres et acides (phénol-sulfurique, métaphénylphénol sulfurique) (DUBOURDIEU et *al.*, 1981). De même, en présence de composés phénoliques, le dosage des protéines par la méthode de LOWRY (1951) est impossible. L'analyse chimique des constituants macromoléculaires des moûts et des vins suppose donc leur séparation préalable. La plupart des auteurs utilisent la précipitation à l'éthanol (USSEGLIO-TOMASSET, 1976) pour isoler les polysaccharides et le sulfate d'ammonium (RADOLA, 1972) ou l'acide trichloroacétique (YOKUTSUKA, 1977) pour précipiter les protéines. Ces techniques sont longues et nécessitent plusieurs centrifugations pour récupérer et laver les précipités obtenus. Par ailleurs, les macromolécules ainsi isolées sont souvent difficiles à redissoudre dans l'eau. Enfin, les dosages colorimétriques effectués sur les solutions de « colloïdes » sont délicats et se prêtent mal à l'analyse en série.

Nous proposons dans cette note une méthode originale de dosage simultané des polysaccharides et des protéines des moûts et des vins, par chromatographie liquide haute pression de tamisage moléculaire. L'application de la chromatographie liquide haute pression pour le dosage global des protéines solubles des moûts et des vins a déjà été signalé par P.-J. TYSON (1981) qui opère par chromatographie d'exclusion.

---

\* Stagiaire de recherche Novo Ferments (Suisse) S.A., Vogesenstrasse 132, CH 4013, Bâle (Suisse).

\*\* Stagiaire de recherche Rémy-Martin, 20, rue de la Société Vinicole, 16100 Cognac (France).

La technique mise au point autorise l'injection directe dans le chromatographe du moût ou du vin à analyser, sans purification préalable des constituants macromoléculaires.

## I. — DESCRIPTION DE LA METHODE.

Les constituants macromoléculaires du moût ou du vin sont séparés par chromatographie liquide haute pression de tamisage moléculaire sur deux colonnes en acier, montées en série :

— la première colonne (0,75 x 7,5 cm) conditionnée par nos soins avec du gel de polyacrylamide Trisacryl GF05 permet de séparer les molécules par chromatographie d'exclusion. Ce gel (poids moléculaire d'exclusion 3 000) est habituellement utilisé pour le dessalage en chromatographie liquide basse pression. Sa bonne résistance mécanique lui permet cependant de supporter sans dommage des pressions de l'ordre de 10 bar.

— la deuxième colonne (0,75 x 60 cm), contenant le gel TSK G 2 000 SW, est une colonne analytique de tamisage moléculaire utilisée en chromatographie liquide haute pression. Les poids moléculaires d'exclusion de ce gel sont de 70 000 pour les protéines globulaires et de 20 000 pour les polysaccharides linéaires. Ainsi les macromolécules (polysaccharides et protéines) sont séparées des autres constituants du vin par chromatographie d'exclusion sur la première colonne (Trisacryl GF05) puis fractionnées selon leurs poids moléculaires sur la deuxième colonne (TSK G 2 000 SW).

Le chromatographe (« 2150 HPLC Pump ») et les détecteurs sont de marque LKB (Bromma, Suède). Les conditions d'analyse sur les colonnes montées en série sont les suivantes : volume injecté, 200  $\mu$ l de moût ou de vin ; éluant, NaCl 0,1 M dans de l'eau ; débit, 0,6 ml/mn ; vitesse d'enregistrement (« 2210 Recorder »), 1 mm/mn.

Les polysaccharides sont détectés par réfractométrie (« 2142 Refractive Index Dedector »), l'atténuation choisie est 2 ; les protéines sont détectées par spectrophotométrie (« 2150 Uvicord SD ») dans l'ultraviolet à 225 nm.

L'étalonnage de la colonne TSK G 2 000 SW pour le tamisage moléculaire des polysaccharides et des protéines est réalisé, selon les techniques classiques (GRANATH et KWIST, 1967) par injection de dextranses et de protéines globulaires de poids moléculaires connus. L'injection de Bleu Dextrane 2 000 permet de déterminer le volume d'exclusion ou volume vide ( $V_0$ ) et l'injection de Tyrosine, le volume total ( $V_t$ ) de la colonne.

La majeure partie des polysaccharides du moût et du vin ont des poids moléculaires supérieurs à 20 000 (USSEGLIO-TOMASSET, 1976) ; ils sont donc exclus du gel TSK G 2 000 SW. La plupart des protéines ont des

poids moléculaires inférieurs à 60 000 (FEUILLAT, 1974) ; elles sont donc fractionnées par le gel utilisé.

Le dosage quantitatif des polysaccharides et des protéines du moût et du vin, séparés selon cette méthode, est réalisé en chromatographiant dans les conditions expérimentales déjà décrites les solutions de référence suivantes :

— une solution à 0,5 mg par ml de polysaccharides totaux d'un vin blanc, précipités par l'éthanol, dissous dans l'eau et dosés au phénol sulfurique ;

— une solution de sérum albumine bovine à 0,1 mg par ml dissoute dans l'éluant.

Les teneurs en polysaccharides sont exprimées en mg de polysaccharides solubles totaux par litre et les teneurs en protéines en mg d'équivalent sérum albumine bovine par litre.

## II. — APPLICATION : DOSAGE RAPIDE DES CONSTITUANTS MACROMOLECULAIRES DU VIN.

Un exemple de séparation des polysaccharides et des protéines d'un vin blanc sec (avant collage à la bentonite) est présenté sur la figure 1.

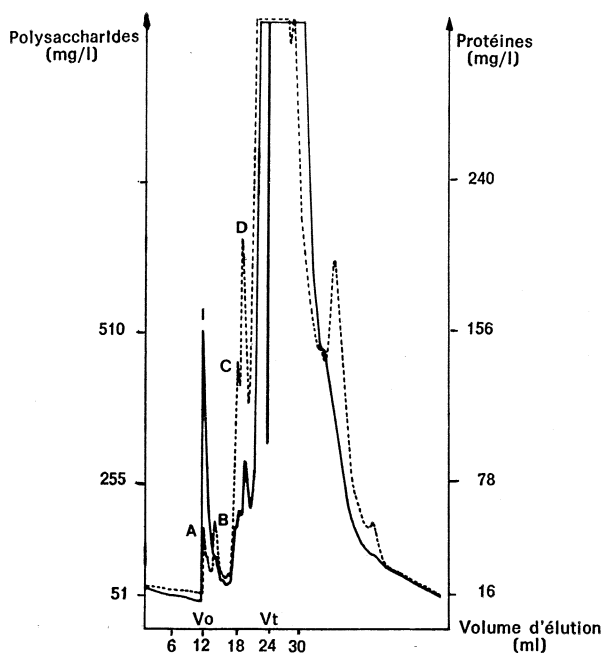


Fig. 1 — Exemple de séparation des constituants macromoléculaires d'un vin blanc sec (vin n° 1) par CLHP.

— réfractométrie      - - - - - spectrophotométrie.

Conformément aux caractéristiques de la colonne TSK G 2 000 SW les polysaccharides (pic I) sont exclus du gel et les protéines fractionnées en quatre pics : A, B, C et D. Le volume d'élu-tion du pic A correspond au volume d'exclusion de la colonne ; ce pic contient donc les protéines de poids moléculaire supérieur à 70 000 et les polysaccharides de poids moléculaire supérieur à 20 000. Le pic B correspond à des protéines dont le poids moléculaire est d'environ 66 000 et les pics C et D, majoritaires et imparfaitement séparés, correspondent à des protéines de poids moléculaires voisins de 29 000 et 25 000.

L'étude de reproductibilité de cette méthode montre que l'écart maximum entre deux mesures n'excède pas deux pour cent.

Le tableau I donne à titre d'exemple les teneurs en polysaccharides et en protéines de trois vins.

**TABLEAU I**

**Teneurs en polysaccharides et en protéines de différents vins ; évaluation par CLHP.**

Les résultats sont exprimés en mg par litre.

Type de vin	Polysaccharides	Protéines				totales
		A	B	C	D	
Vin blanc sec n° 1*	457	33	32	109	172	346
Vin blanc sec n° 2**	244	15	14	—	—	29
Vin rouge	711	30	—	—	—	30

— : traces.

\* n'ayant pas subi un traitement de stabilisation à la bentonite.

\*\* ayant subi un traitement de stabilisation à la bentonite.

Comparée aux autres techniques de dosage des polysaccharides et des protéines utilisées jusqu'à présent en œnologie, la méthode proposée apparaît plus rapide, plus reproductible et se prête aisément aux dosages en série.

Note reçue le 18 juin 1986.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

DUBOURDIEU D., HADJINICOLAOU D., RIBÉREAU-GAYON P, 1981. Les polysaccharides solubles du moût : méthode simple d'appréciation ; évolution au cours de la maturation ; incidences sur les opérations préfermentaires. *Connaissance Vigne Vin*, **15**, N° 1, 29-40.

- FEUILLAT M., 1974. Contribution à l'étude des composés azotés du moût de raisin et du vin. Thèse Doctorat, Dijon.
- GRANATH K.A. et KVIST B.E., 1974. Molecular weight distribution analysis by gel chromatography on sephadex. *J. of Chromatogr.*, **28**, 69-81.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RONDALL R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chim.*, N° 193, 265-275.
- RADOLA B.J. et RICHTER O.H.K., 1972. Physico-chemical studies on soluble grape proteins. I. Charge properties. *Chem. Microbiol. Technol. Lebensm.*, **1**, 41-50.
- TYSON P.J., LUIS E.S., DAY R.W., WALKER B. et LEE T.H., 1981. Estimation of soluble protein in must and wine by high performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.*, **32**, 241-243.
- USSEGLIO-TOMASSET L., 1976. Les colloïdes glucidiques solubles des moûts et des vins. *Connaissance Vigne Vin*, **10**, N° 2, 193-226.
- YOKUTSUKA K., YOSHII M., AIHARA T. et KUSHIDA T., 1977. Isolation and characterization of proteins from juices, musts and wines from Japanese grapes. *J. Ferment. Technol.*, **55**, 510-515.

