

FRACTIONNEMENT SUR ECHANGEUR ANIONIQUE DES COLLOIDES GLUCIDIQUES SOLUBLES (gommes et pectines) DU JUS DE RAISIN SAIN

D. DUBOURDIEU * et P. RIBÉREAU-GAYON

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération, 33405 Talence Cédex

INTRODUCTION

La structure chimique des colloïdes glucidiques secrétés par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin a été décrite dans de précédents travaux qui ont débouché sur une interprétation précise des difficultés de clarification des vins issus de raisins pourris (DUBOURDIEU, 1978 ; DUBOURDIEU *et al.*, 1978).

Nous abordons maintenant l'étude de colloïdes glucidiques solubles des moûts et des vins de raisins sains. On englobe sous cette expression l'ensemble des constituants connus sous le nom de gommes et pectines ; en première approximation les pectines sont des polysaccharides constitués exclusivement d'acide galacturonique ; les gommes contiennent essentiellement des oses neutres et la présence éventuelle d'acide galacturonique permet de les différencier en gommes neutres et gommes acides.

Indépendamment de l'intérêt théorique de cette étude, la connaissance détaillée de la nature chimique de ces substances et des facteurs de leur présence dans les moûts ou dans les vins doit permettre d'expliquer les difficultés de clarification précoce des vins blancs survenant certaines années (par exemple 1978) pourtant caractérisées par le parfait état sanitaire des raisins récoltés.

Les travaux les plus récents sur les colloïdes glucidiques du moût sont ceux d'USSEGLIO-TOMASSET (1976-1977) ; ils portent sur la fraction hydrosoluble du précipité obtenu par addition de 5 volumes d'éthanol à un volume de moût acidifié. Reprenant la technique de séparation des pectines décrite par BUCHI et DEUEL (1954), USSEGLIO-TOMASSET divise les colloïdes glucidiques du moût en deux catégories de substances :

* Ingénieur de recherche, Société Seitz Filter Werke (Bad Kreuznach, R.F.A.), détaché à l'Institut d'Œnologie de Bordeaux.

a) La pectine.

Par saponification de la solution des colloïdes glucidiques totaux, la pectine est transformée en méthanol et acide pectique ; ce dernier est précipité par addition de chlorure de calcium. Le pectate de calcium obtenu, insoluble dans l'eau contient plus de 60 p. 100 d'acide galacturonique, mais aussi de l'arabinose, du rhamnose et du galactose. L'auteur considère que la présence de ces oses neutres dans le précipité est le résultat de phénomènes, de coprécipitation ; en effet si on soumet à l'électrophorèse sur fibre de verre le précipité, préalablement solubilisé par agitation en présence de résine cationique sous forme sodique, on obtient un composant mobile constitué d'acide galacturonique pur.

b) Un autre groupe de colloïdes.

L'acide galacturonique est encore présent, mais ils contiennent aussi arabinose, rhamnose, mannose, galactose. L'électrophorèse sur fibre de verre et le tamisage moléculaire montrent qu'il ne s'agit pas d'une substance homogène, mais d'un mélange de polysaccharides. L'électrophorèse sur fibre de verre donne deux composants ; la fraction la plus mobile présente de fortes teneurs en acide galacturonique et rhamnose, mais contient aussi une notable quantité de galactose et arabinose ; la fraction la plus lente est plus riche en galactose et arabinose mais contient aussi de l'acide galacturonique. La chromatographie par tamisage moléculaire sur Sepharose 6B des polysaccharides du moût après élimination des pectines donne des diagrammes d'éluion avec une composition centésimale en monomères très variable. Ce résultat confirme l'hétérogénéité de ces colloïdes.

Afin d'approfondir la connaissance de la structure chimique de ces substances, nous avons cherché à améliorer leur fractionnement par chromatographie d'échange d'ions, en fonction de leur charge électrique liée à la présence éventuelle d'acide galacturonique. Nous présentons dans ce mémoire les premiers résultats obtenus sur échangeur anionique D.E.A.E. Sephadex A25.

MATERIELS ET METHODES

1°) Isolement des colloïdes glucidiques solubles totaux.

La méthode utilisée est la précipitation par l'éthanol (USSEGLIO-TOMASSET, 1976). A 300 ml de moût clarifié par centrifugation (15 minutes à 10.000 tours/minute), on ajoute 15 ml HCl (N) et 1.500 ml d'éthanol à 95 °GL. Après complet dépôt des colloïdes précipités, on siphonne la majeure partie du surnageant et on recueille les colloïdes par centrifugation ; le précipité est lavé à l'éthanol à 95 °GL.

Le culot repris par 100 ml d'eau à 40 °C est solubilisé par agitation à grande vitesse ; les substances insolubles sont séparées par centrifugation (10 minutes à 10.000 tours/minute).

Du surnageant on reprécipite ensuite les colloïdes par addition de 5 volumes d'éthanol ; ce précipité séparé par centrifugation correspond aux colloïdes glucidiques solubles totaux qui sont repris par l'eau tiède, puis lyophilisés et pesés.

2°) Séparation des pectines et des gommés (BUCHI et DEUEL, 1954).

Les colloïdes totaux sont redissous dans 40 ml d'eau, la solution est ajustée à pH 9,5 avec de la soude ; après 6 heures, on porte le pH à 6,5 avec de l'acide acétique et on ajoute 2 ml d'une solution de CaCl_2 2N. Le précipité de pectate de calcium, recueilli par centrifugation, est lavé à l'eau, lyophilisé et pesé.

A partir de la solution surnageante, on précipite les autres colloïdes par addition de 5 volumes d'éthanol. Ce dernier précipité, repris par l'eau est également lyophilisé et pesé ; par convention, il représente les gommés.

3°) Fractionnement des gommés sur échangeur anionique D.E.A.E Séphadex A25.

Les premiers travaux de NEUKOM et *al.* (1960) ont montré la supériorité de la di-éthyl-amino-éthyl-cellulose (D.E.A.E. cellulose) sur les classiques résines échangeuses d'anions, pour fractionner un mélange de polysaccharides ; par la suite, la mise au point d'échangeurs anioniques de type D.E.A.E. Sephadex d'un emploi plus facile a permis d'affiner la séparation par échange d'ions des polysaccharides. CAPEK et STANEK (1975) donnent une bibliographie des nombreux travaux utilisant ce support.

Pour réaliser le fractionnement des gommés du moût de raisin, nous opérons dans les conditions suivantes : la colonne (12,5 x 2,5 cm) de D.E.A.E. Sephadex A25 est équilibrée par un tampon KH_2PO_4 0,01 M ajusté par KOH à pH 6,5 ; l'élution descendante de la colonne est réalisée par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique (60 ml/heure) ; les fractions recueillies sont de 5 ml.

Les gommés lyophilisées, provenant de 300 ml de moût, sont dissoutes dans 10 ml du tampon de départ et déposées sur la colonne ; les polysaccharides non retenus sont élués par le tampon phosphate, ils correspondent à des gommés neutres. Les polysaccharides fixés par l'échangeur d'ions sont progressivement désorbés par un gradient de chlorure de sodium en fonction de leur caractère acide croissant.

L'analyse est programmée, sur 16 heures, par le formeur de gradient « Utrograd L.K.B. » ; elle comprend trois phases :

- a) Introduction de l'échantillon et lavage par le tampon de départ ; durée 2 heures.
- b) Elution par un gradient NaCl ; durée 10 heures. Le profil du gradient d'élution a été choisi après de nombreux essais de façon à

obtenir la meilleure résolution ; il comporte un palier correspondant à une concentration en NaCl de 0,05M, puis il est linéaire jusqu'à 0,5M.

c) Lavage de la colonne par NaCl (0,5M), durée 2 heures.

La détection des polysaccharides dans les fractions est réalisée par les méthodes au phénol-sulfurique et au carbazol sulfurique qui caractérisent, respectivement, les oses neutres et les acides uroniques (MONTREUIL et SPIK, 1963).

— a) Méthode au phénol sulfurique : A 0,5 ml de la solution à doser on ajoute 0,5 ml de phénol à 5 p. 100, puis 2,5 ml d'acide sulfurique pur. On porte 5 mn au bain marie à 100 °C ; après refroidissement, on mesure la densité optique à 490 nm.

— b) Méthode au carbazol sulfurique : A 0,5 ml de la solution à doser, on ajoute 0,1 ml de carbazol à 0,1 p. 100 en solution dans l'éthanol à 96 °GL, puis 3 ml d'acide sulfurique pur en opérant dans un bain d'eau glacée ; on porte au bain marie à 100 °C pendant 20 mn, puis dans l'eau glacée pendant 5 mn ; on mesure la densité optique à 530 nm.

4°) Détermination de la composition en monomères des polysaccharides isolés.

Dans le cas des gommages, les fractions correspondant à un même pic sont rassemblées ; la solution est concentrée sous vide à l'évaporateur rotatif à un volume de 5 à 10 ml. L'échantillon est ensuite débarrassé de ses sels par tamisage moléculaire sur une colonne de Sephadex G25 « coarse » (1,5 x 60 cm), avec élution par de l'eau distillée ; les polysaccharides passent dans le « volume vide » de la colonne et sont repérés dans les fractions par le test au phénol-sulfurique. La solution de polysaccharides ainsi purifiés est lyophilisée.

La composition en monomères est déterminée à partir des lyophilisats précédents, dans le cas des gommages.

Dans le cas des pectines, le précipité du pectate de calcium est solubilisé par agitation en présence de résine cationique sous forme sodique : la solution obtenue est lyophilisée.

La détermination des monomères des échantillons est effectuée après méthanolyse et trifluoroacétylation, selon des techniques précédemment décrites (DUBOURDIEU, 1978). On utilise une colonne de verre (3 m x 2 m) remplie de QF1 (7 p. 100) sur chromosorb W.H.M.D.S. (80 — 100 mesh) ; l'analyse est conduite en température programmée de 100 à 180 °C à raison de 1°C/mn. Les réponses massiques relatives des différents oses, susceptibles d'entrer dans la composition des gommages du moût, sont déterminées par rapport au mésoinositol. (Tableau I).

TABLEAU I

Réponses massiques relatives (R.M.R.) par rapport au mesoinositol
des sucres intervenant dans la composition des gommés du moût de raisin

	R.M.R.
Rhamnose	1,65
Arabinose	1,30
Galactose	0,95
Mannose	1,14
Glucose	1,08
Acide galacturonique	0,66
Acide glucuronique	0,51

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats ont été obtenus à partir d'un moût de raisins blancs du cépage Sémillon, indemne de toute attaque de *Botrytis*. L'échantillon a été prélevé avant débouillage, dans le cuveau de réception des jus à la sortie du pressoir ; il a été immédiatement chauffé à 100 °C afin de détruire les enzymes pectolytiques du raisin.

Les colloïdes solubles totaux de ce moût représentent 263 mg par litre ; 70 mg par litre, précipitables sous forme de pectate de calcium constituent la pectine.

L'analyse des monomères par C.P.G. montre qu'elle ne contient que de l'acide galacturonique.

Le diagramme d'éluion des gommés sur D.E.A.E. Sephadex (fig. 1) présente 4 zones :

a) le pic 1 correspond aux gommés non retenues par la colonne et éluées par le tampon de départ.

b) le pic 2 représente les gommés faiblement retenues désorbées par une solution 0,05M de chlorure de sodium.

c) les pics 3 et 4 sont des gommés acides plus fortement retenues par les échangeurs d'ions.

L'analyse de ces 4 fractions (Tableau II) permet de connaître leur composition centésimale en monomères ; elle confirme la distinction entre gommés neutres et gommés acides :

a) les fractions 1 et 2 sont des gommés neutres ; elles ne comportent pas d'acide galacturonique dans leurs molécules ; l'arabinose et le galactose sont les constituants essentiels ; mannose et glucose sont également présents ; xylose et rhamnose sont en faible quantité.

La fraction 2 est plus riche en arabinose et galactose (près de 90 p. 100) que la fraction 1.

b) les fractions 3 et 4 sont des gommages acides ; elles contiennent de l'acide galacturonique. Dans la fraction 4, la plus importante, la teneur

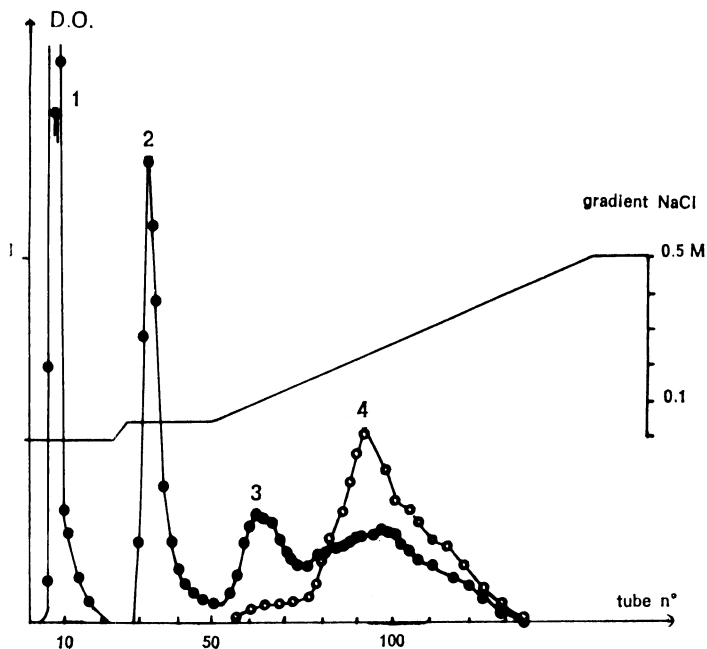


Fig. 1. — Fractionnement des gommages d'un moût de raisin sur colonne D.E.A.E. Sephadex A 25 (2,5 x 12,5 cm)

●—● dosage au phénol
○—○ dosage au carbazol.
(La hauteur du pic 1 est réduite de moitié)

TABLEAU II

Fractionnement des gommages du moût sur D.E.A.E. sephadex A 25 compositions centesimales en oses des fractions obtenues

	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3	Fraction 4
p. 100 des gommages totales	43	17	13	25
Arabinose	22	27	30	19
Rhamnose	1	2	4	12
Xylose	traces	traces	traces	0
Mannose	14	7	2	5
Galactose	54	61	58	23
Glucose	8	2	2	2
Acide galacturonique	0	0	4	39

en acide galacturonique atteint 39 p. 100 ; le rhamnose est relativement important. Par contre le galactose qui constitue plus de 50 p. 100 des autres fractions représente ici seulement 23 p. 100. Arabinose, rhamnose et acide galacturonique atteignent ensemble 70 p. 100 en poids de cette fraction.

CONCLUSION

La chromatographie d'échange d'ions sur D.E.A.E. Sephadex A25 des gommés du moût permet d'obtenir une séparation supérieure à celles décrites dans les travaux précédents. On caractérise ainsi des gommés neutres qui ne contiennent que des oses neutres et des gommés acides composés d'oses neutres et d'acide galacturonique.

La composition centésimale en monomères de chaque fraction a été déterminée.

Ces premiers résultats montrent la possibilité d'améliorer la connaissance dans ce domaine de la constitution chimique des vins. D'autres méthodes de séparation sont susceptibles d'apporter aussi des résultats intéressants : chromatographie d'affinité et précipitation fractionnée au Cetyltriméthylammoniumbromide (CTAB).

Manuscrit reçu le 27 novembre 1979.

RÉSUMÉ

Les gommés d'un moût de raisins sains sont fractionnés par chromatographie d'échange anionique sur D.E.A.E. Sephadex A 25.

On peut ainsi caractériser des gommés neutres qui ne contiennent que des oses neutres dans leur molécule et des gommés acides qui comportent des oses neutres et de l'acide galacturonique.

SUMMARY

Gums of juice from healthy grapes are fractionated by ion exchange column chromatography on D.E.A.E. Sephadex A 25.

So are separated neutral gums, containing only neutral sugars in their molecules, from acidic gums, that contains neutral sugars and galacturonic acid.

ZUSAMMENFASSUNG

Gummistoffen von gesunden Traubensaft werden an D.E.A.E. Sephadex Anionenaustauschern fractioniert.

Man kann charakterisieren neutrale Gummi, die werden nur von neutrale Ose ausgemacht und saure Gummi die neutrale Ose und Galacturonsäure enthalten.

RESUMEN

Las gomas contenidas en un mosto de uvas sanas son fraccionadas por medio de cromatografía aniónica sobre D.E.A.E. Sephadex A 25.

- Así se pueden caracterizar dos clases de gomas :
- gomas neutras constituidas únicamente de osas neutras,
 - gomas acidas que contienen además ácido galacturónico.

RIASSUNTO

Le gomme d'un mosto d'uva sana sono frazionate con cromatografia di scambio anionico su DEAE Sephadex A 25.

Si puô cosi determinare gomme neutre che contengono soltanto ose neutre dalle loro molecole e gomme acide costituite con ose neutre ed acidi galatturonic.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BUCHI W. et DEUEL H., 1954. Über ein Polysaccharid in Beerensaft von *Vitis Vinifera*. *Helvetica Chimica Acta*, **37**, 1392-1398.
- CAPEK K. et STANEK J. 1975. Polysaccharides. *Journal of Chromatography library*, vol. 3, 523-528.
- DUBOURDIEU D., 1978. Etude des polysaccharides secrétés par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin. Incidence sur les difficultés de clarification des vins de vendanges pourries. *Thèse Docteur Ingénieur*, Université de Bordeaux II.
- DUBOURDIEU D., FOURNET B., BERTRAND A., RIBÉREAU-GAYON P., 1978. Identification d'un glucane secrété dans la baie de raisin par *Botrytis cinerea*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 286 D, 229-231.
- DUBOURDIEU D., PUCHEU-PLANTÉ B., MERCIER M. et RIBÉREAU-GAYON P., 1978. Structure, rôle et localisation du glucane exocellulaire secrété par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin. *C.R. Acad. Sc. Paris* 287 D, 561-573.
- MONTREUIL J. et SPIK G., 1963. Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux. Monographie du laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille.
- NEUKOM H., DEUEL H., HERI W.J., KUNDIG W., 1960. Chromatographische Fraktionierung von Polysacchariden an Cellulose. Anionenaustauschern. *Helv. Chim. Acta*, **43**, 64-71.
- USSEGLIO-TOMASSET L., 1976. Les colloïdes glucidiques solubles des moûts et du vin. *Connaissance Vigne Vin*, **10**, N° 2, 193-226.
- USSEGLIO-TOMASSET L., 1977. Acquisitions récentes sur les phénomènes colloïdaux dans les moûts et les vins, 3^e Symposium international d'œnologie Bordeaux, *Ann. Technol. Agric.*, **27**, 261-274.