

INTÉRÊT DE L'UTILISATION DE CHITINE, CHITOSANE ET DE LEURS DÉRIVÉS EN ŒNOLOGIE

APPLICATIONS AND INTEREST OF CHITIN, CHITOSAN AND THEIR DERIVATIVES IN ENOLOGY

Aurélié BORNET^{1,2} et P.-L. TEISSEDRE^{1,*}

1 : Université Montpellier I, UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, Centre d'œnologie, Faculté de Pharmacie, 15, avenue Charles Flahault, BP 14491 Université Montpellier I, 34093 Montpellier cedex 5, France

2 : KITOZYME, Parc industriel des Hauts-Sarts, Zone 2, rue Haute Claire, 4, BE-4040 Herstal, Belgium

Summary : This review treats of the possible use interest of chitin, chitosan and derivatives in enology. Chitosan and chitin are polysaccharide polymers containing more than 5 000 glucosamine and acetylglucosamine units, respectively, and their molecular weights are over one million Daltons. Chitin is found in fungi, arthropods and marine invertebrates. Commercially, chitin is derived from the exoskeletons of crustaceans (shrimp, crab and other shellfish). Chitosan is obtained from chitin by a deacetylation process. An alternative can be the obtention of chitin and chitosane derivatives from fungi source and has been developed by Kitozyme Firm.

Chitin, the polysaccharide polymer from which chitosan is derived, is a cellulose-like polymer consisting mainly of unbranched chains of N-acetyl-D-glucosamine. Deacetylated chitin, or chitosan, is comprised of chains of D-glucosamine. When ingested, chitosan can be considered as a dietary fiber.

The use of chitin, chitosan and derivatives should be favorable for different aspects of wine production, in particular for : stabilization, clarification, deacidification, removal of heavy metals (lead, cadmium) or major metals (iron, copper), elimination of ochratoxin A, enzymes and pesticides.

Résumé : Cette revue bibliographique traite de l'intérêt possible de l'utilisation de chitine, chitosane et de leurs dérivés en œnologie. Le chitosane et la chitine sont des polymères polysaccharides contenant plus de 5 000 unités glucosamine et acetylglucosamine, respectivement, et leurs poids moléculaires sont supérieurs à un million de Daltons. La chitine se retrouve dans les produits fongiques comme les champignons, les arthropodes et invertébrés marins. Commercialement, la chitine est obtenue à partir de carapaces de crustacés (crevettes, crabes et autres mollusques). La chitine permet, par un procédé de déacetylation d'obtenir le chitosane. Une alternative réside dans l'obtention de chitine et de dérivés chitosanes à partir de sources fongiques et a été développée par la société Kitozyme.

La chitine est un polysaccharide polymère à partir duquel le chitosane est dérivé, il s'agit d'un polymère analogue de cellulose représenté couramment par des chaînes débranchées de N-acetyl-D-glucosamine. La chitine déacétylée, ou le chitosane, est constituée de chaînes de D-glucosamine. Quand il est ingéré, le chitosane peut être considéré comme une fibre alimentaire.

L'utilisation de chitine, chitosane et dérivés, pour différents aspects de la production de vin peut être d'un intérêt majeur, en particulier pour : la stabilisation, la clarification, la désacidification, l'élimination de métaux lourds (plomb, cadmium) ou de métaux majeurs (fer, cuivre), ainsi que l'élimination d'ochratoxine A, d'enzymes et de pesticides.

Mots clefs : chitosane, chitine, β Glucan, œnologie, vin, stabilisation, clarification, déacidification, chélation, métaux, ochratoxine A, enzymes, pesticides

Keywords : chitosan, chitin, β Glucan, enology, wine, stabilization, clarification, deacidification, chelation, metals, ochratoxin A, enzymes, pesticides

INTRODUCTION

La chitine a été découverte après isolement à partir de champignons supérieurs en 1811 par BRACONNOT (SKAUGRUD, 1990). Le chitosane a été évoqué pour la première fois en 1859 par ROUGET lorsqu'il a porté à ébullition une solution de chitine avec de l'hydroxyde de potassium concentré. Mais ce n'est qu'en 1970 que ces polymères ont suscité un réel intérêt. En effet, les conserveries de crustacés produisaient de grandes quantités de déchets et les gouvernements (américains et japonais) cherchaient à valoriser ces déchets. La chitine et ses dérivés, dont le chitosane, font partie de la grande famille des polymères naturels qui comprend la cellulose, l'amidon, le collagène, etc. La chitine est un polysaccharide linéaire dont les unités de répétition 2-acétamido-2-deoxy-D-glucopyranose ou N-acetyl-D-glu-cosamide sont enchaînées par des liaisons osidiques 1-4. Il existe plusieurs sources de chitines animales (crevettes, crabes), fongiques (parois de mycélium) ou végétales (algues).

STRUCTURES

La plupart des sources de chitine (invertébrés marins et terrestres, zooplanctons, algues, protozoaires chrysoflagelles, champignons inférieurs) conduisent à la retrouver sous forme β . Dans les mycéliums tels que les *Aspergillus*, la chitine se trouve fortement associée à un polysaccharide constitué de molécules de D-glucose, appelé β -glucan. Les polymères de chitine-glucan et de chitine sont insolubles dans beaucoup de solvants, mais ils sont capables de gonfler dans des milieux aqueux. Ils sont biodégradables en présence de certaines enzymes. Les chitines-glucans possèdent les propriétés de la chitine et des β -glucans, notamment un pouvoir cicatrisant, immunostimulant. Le chitosane, dérivé désacétylé de la chitine, est un copolymère linéaire β 1-4 de N-acétyl D-glucosamine et de D-glucosamine. Il se trouve plus rarement dans la nature et n'est présent que dans la paroi d'une classe particulière de champignons les zygomycètes et chez quelques insectes. Le conjugué chitosane-glucan est un copolymère de chitosane et de β -glucan, obtenu par une déacétylation partielle de chitine-glucan. Il est caractérisé par le rapport chitosane/glucan, la quantité de groupes amines et la pureté.

Le procédé traditionnel de transformation de la chitine d'origine animale en chitosane repose sur l'hydrolyse des liaisons amides des groupes N-acétylglucosamine en milieu très basique (figure 1). Ce procédé a fait l'objet d'un brevet déposé par RIGBT en 1934. Une innovation apportée par Kitozyme réside dans l'utilisation et la transformation de chitine non animale d'origine fongique. Le procédé de transformation utilisé par Kitozyme pour l'obtention de chitosane fait appel à des réactifs non polluants (enzymes) et en l'absence d'utilisation de solvants orga-

niques. Par leur structure, ces polysaccharides (figure 2) peuvent présenter un intérêt dans le domaine de l'œnologie.

SOURCE ET PRODUCTION

La chitine est largement répandue dans la nature et va donc constituer la principale source de chitosane. Ce biopolymère se trouve chez (RUDAIL, 1969) :

- la plupart des invertébrés marins (sauf les éponges, les cestodes, les échinodermes et les trématodes) dans la structure cellulaire. Par exemple chez les crustacés, la chitine représente 14 à 27 % du poids sec des crevettes et 13-15% de celui des crabes ;
- les zooplanctons, elle représente 2 à 12 % du poids sec total suivant l'espèce ;
- les invertébrés terrestres (araignées et myriapodes ou la chitine peut représenter de 20 à 80 %) ;
- certains organismes unicellulaires tels que les algues, les protozoaires et les chrysoflagelles ;
- les champignons inférieurs tels que *Aspergillus Niger*, *Penicillium notatum* ou *Mucor rouxii*.

La production de chitine et de chitosane se situe principalement au Japon, aux États-Unis, en Inde, en France et en Chine. En effet au Japon, on estime la production annuelle de chitine à 2 000 tonnes/an. En 1986, la production de chitine était de 1 270 tonnes/an. Près de 1 170 tonnes, c'est-à-dire 60 % étaient consommées pour produire du chitosane, 60 tonnes pour produire de la D-glucosamine et des oligosaccharides et seulement

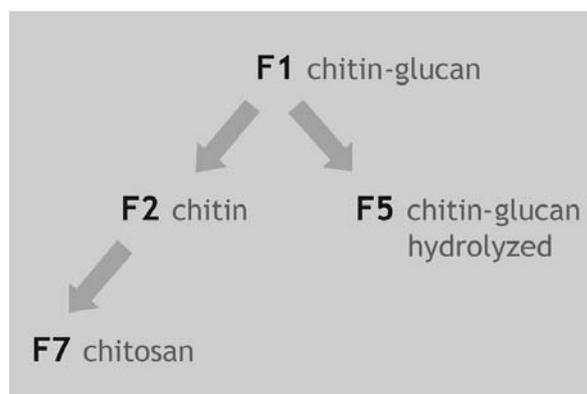


Figure 1 - Chitin glucan et dérivés obtenus par hydrolyse

Chitin glucan and derivatives obtained by hydrolysis

- F1, F2 : Polysaccharides non ioniques
 F5 : Polysaccharides légèrement ioniques
 F7 : Polysaccharides cationiques

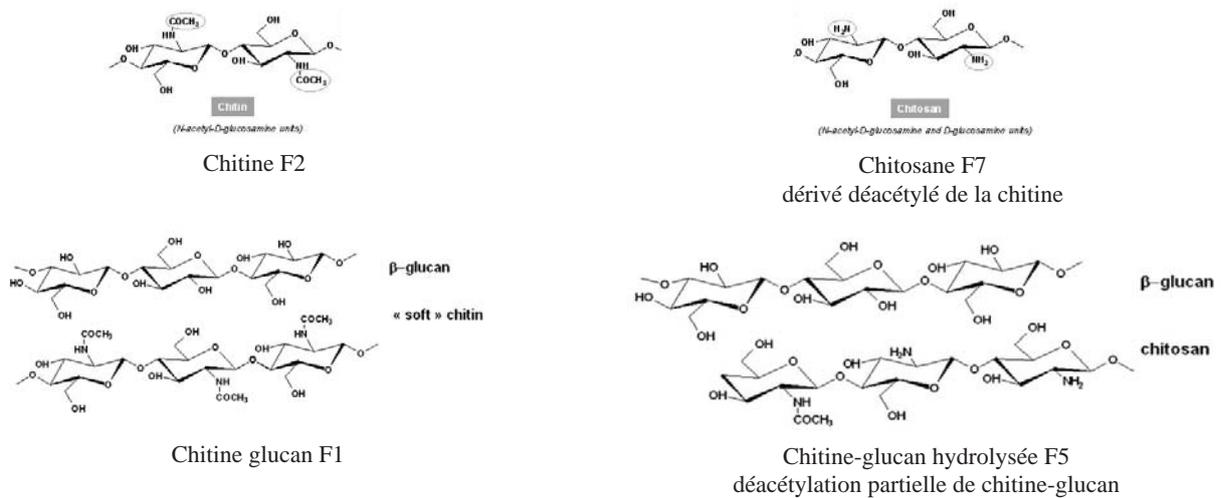


Figure 2 - Structures de polysaccharides : chitine et chitosane

Structures of polysaccharides : chitin and chitosan

40 tonnes étaient utilisées telles quelles, c'est-à-dire sous forme chitine.

Enfin, sur 700 tonnes de chitosane, 500 tonnes sont utilisées en tant que floculant, 100 tonnes dans la cosmétique et l'alimentaire et 100 tonnes seulement restent en excès (HIRANO, 1989). Ceci laisse à penser que le Japon est très en avance dans la commercialisation de cette technologie. Aux États-Unis, où la commercialisation a débuté à la fin des années 1980 les prévisions de marché sont fortement liées à l'approbation de vente des produits à base de chitine par la Food Drug Administration (FDA) Toutefois, une évaluation effectuée en 1987 montre que le marché potentiel global de la chitine et de ses dérivés s'élèverait à 335 millions de dollars dont 21 millions pour l'alimentation et 54 millions pour l'agriculture. Ce sont à long terme les médicaments anticholestérolémiants qui représentent la plus grande composante de ce marché (SENG, 1988). Aux États-Unis, certaines sociétés telles que Syntro Corp et Chitin Co utilisent une chitine ayant une autre origine. Elle provient des industries de fermentation des champignons. Avec ce type de biomasse, on estime avoir une disponibilité de 800 000 tonnes/an qui correspond à 10 000 tonnes de chitine.

Le prix de vente de ce polysaccharide dépend de trois paramètres : son taux d'acétylation résiduel (moins le degré d'acétylation est élevé et plus le prix de vente sera élevé), sa masse moléculaire (plus la masse moléculaire est élevée et plus son prix de vente sera élevé sauf pour les valeurs les plus faibles), sa qualité (le prix croît dans l'ordre technique). Ainsi la gamme de prix se situe dans une fourchette très étendue allant de 23 à 9 160 euros/kg. Le chitosane est un produit obtenu à partir d'une matière première peu chère, c'est donc un produit à forte valeur ajoutée (KAPALA, 1994).

INTÉRÊT DANS LE SECTEUR VITI-VINICOLE DE L'UTILISATION DES CHITINES, CHITOSANES ET LEURS DÉRIVÉS

1 - EFFET CLARIFIANT

La limpidité est une qualité essentielle exigée par le consommateur. Il n'est pas suffisant que le vin soit limpide au moment de la mise en bouteilles ; il faut qu'il le reste au cours de sa conservation quelles que soient les conditions de temps et de température. En dehors des accidents microbiens et des précipitations tartriques, traités par ailleurs, les troubles qui peuvent dénaturer un vin limpide (précipitation des matières colorantes, casses métalliques) mettent en jeu des phénomènes colloïdaux.

On connaît bien aujourd'hui les mécanismes chimiques et biologiques qui peuvent engendrer un trouble ou un dépôt, on sait aussi les prévoir par des tests de laboratoire et les traiter efficacement par des opérations de collage.

L'opération de collage consiste à incorporer dans un vin plus ou moins trouble ou présentant une instabilité colloïdale une substance capable de floculer et de sédimenter en entraînant les particules responsables du trouble et/ou de l'instabilité, le vin est ainsi clarifié et stabilisé (CAILLET, 1974).

Il existe deux grands groupes de colles :

- Les colles organiques : qui regroupent tanins, PVPP, charbons œnologiques ainsi que des colles d'origines animales (gélatine, albumine, caséines, colle de poisson) ;

- Les colles minérales : bentonites, dioxyde de silice, ferrocyanure de potassium ;

Cependant, face aux risques allergènes de certaines colles d'origine animale, certains chercheurs ont testé différentes colles protéiques d'origine végétale non encore autorisées sur le marché et donnant des résultats comparables à ceux obtenus avec les colles d'origine animale. De plus, des évolutions réglementaires concernant l'étiquetage des ingrédients alimentaires montrent que l'utilisation de certaines colles protéiques pourrait être limitée. En effet, suite à une action de l'ONIVINS incluant l'UOEF et l'ITTV, un compromis du 2 juillet 2003 a prévu d'exclure provisoirement à partir de 2005, certains ingrédients pour lesquels des études d'allergénicité sont en cours (LATASTE, 2003). Des solutions alternatives au collage sont aujourd'hui recherchées, mais aucun procédé physique ne permet de remplacer à la fois la clarification et la stabilisation durable des vins en améliorant ses qualités organoleptiques.

Une alternative serait peut-être d'utiliser la chitine, le chitosane ou l'un de leurs dérivés d'origine fongique comme produits de collage pour éviter tout risque d'allergénicité. En effet, des études de l'effet clarifiant des chitosanes ont déjà été menées sur des jus de fruit. Ainsi CHARTTERJEE *et al.* (2004) ont démontré qu'en traitant 50 mL de jus de raisin avec 100 mg de chitosane soluble, on obtenait un effet clarifiant très significatif. La diminution de turbidité est plus importante avec le chitosane qu'avec la bentonite ou la gélatine. De plus, il a été constaté par SOTO-PARALTA *et al.* (1989) que ce traitement n'avait aucun impact sur les paramètres biochimiques et améliorait les propriétés organoleptiques (saveur, apparence, couleur). Une étude similaire sur les jus de pomme a abouti à la même conclusion que l'étude précédente.

II - EFFET STABILISATEUR

Le brunissement et la madérisation représentent deux problèmes importants de la stabilité des vins blancs entraînant l'altération de la couleur et des arômes du vin. Les composés phénoliques sont les principaux constituants impliqués dans les phénomènes d'oxydation. La réactivité de ce type de molécule est en partie liée à la présence de la fonction phénol. L'oxydation de ces composés phénoliques peut s'effectuer soit par un processus biochimique, soit par un processus chimique. Le processus biochimique généralement désigné par le terme de brunissement enzymatique est très bien connu. En présence d'oxygène moléculaire et de substrats phénoliques, ce processus biochimique est initié par une métalloenzyme, la polyphénoloxydase (PPO) qui affecte la couleur et les arômes du fruit, du légume ou bien encore du vin (LATTANZIO, 1994). Ainsi de nombreux composés phénoliques monophénols sont hydroxylés en o-diphénols.

Ces o-diphénols étant eux ensuite oxydés en o-quinones. Les o-quinones ainsi formés sont généralement de couleur jaune tendant parfois vers le brun ou le rouge brique. Ce sont des espèces très instables à la fois oxydants très puissants et fortement électrophiles conduisant rapidement à une grande diversité de produits colorés ou non ; ceci se traduisant par un brunissement important qui dans le cas des solutions anthocyaniques s'accompagne de la perte de la couleur rouge (MAYER, 1979 ; VAMOS-VIGYAZO, 1981). ZHANG *et al.* (1997) ont démontré que l'application d'un film de chitosane permettait de diminuer le phénomène de brunissement sur le litchi. En effet, ils ont pu constater que la présence de chitosane entraîne le retardement de l'augmentation de l'activité polyphénoloxydase et inhibe partiellement l'activité peroxidase. Ce même constat a été fait par SAPERS *et al.* (1987) sur les jus de poire et brut de pomme. Au niveau œnologique, pour réduire ce phénomène, des produits œnologiques traditionnels sont déjà utilisés tels que le caséinate de potassium, la gélatine, la bentonite ou bien encore la PVPP. Ces adjuvants fixent sélectivement les composés phénoliques de petites tailles catéchine, leucoanthocyanes responsables en partie du brunissement des vins.

Les études de SPAGNA *et al.* (1996 ; 2000) ont proposé l'utilisation de nouveaux types de produits pas encore employés en œnologie la chitine et le chitosane sur une grande variété de vins blancs et ainsi de comparer leurs efficacités par rapport aux produits œnologiques traditionnels. En conclusion, ils ont pu démontrer que le chitosane avait une très bonne affinité pour tous les composés phénoliques plus particulièrement pour les acides cinnamiques et à moins grande échelle pour les flavones et les proanthocyanidines. La capacité de stabilisation du chitosane sur les vins est comparable à celle obtenue avec le caséinate de potassium sans altérer les qualités organoleptiques.

III - EFFET DÉSACIDIFIANT

Dans certains cas, les vins doivent subir une désacidification. Le moyen qui nous vient immédiatement à l'esprit est une neutralisation des acides par addition d'un agent alcalin alimentaire tels que la soude ou les bicarbonates. C'est d'ailleurs ce type d'adjuvant qui est autorisé pour la désacidification des vins. Le bicarbonate de potassium et le carbonate de calcium donnent l'un et l'autre, avec l'acide tartrique, un sel insoluble et l'acidité correspondante est éliminée sous forme d'acide carbonique qui se décompose en CO₂ et H₂O. Toutefois, ce mode de désacidification demande une certaine prudence. En effet, il ne faut pas chercher une correction trop importante de l'acidité compte tenu du fait que ce mode de désacidification porte exclusivement sur l'acide tartrique (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1998). Cela peut donc créer

un déséquilibre du rapport des concentrations de l'acide tartrique à l'acide malique. Toutefois il existe pour ces vins un moyen de les désacidifier tout en respectant ce rapport, il s'agit du procédé « Dicalcic : précipitation du tartré-malate » plus connu sous le nom de méthode double-sel (VIALATTE, 1982) qui permet à partir d'une équation de calculer le volume de carbonate de calcium à ajouter au vin pour entraîner la désacidification souhaitée.

D'après le brevet de Nestlé déposé en 1980, (HORMAN, 1980), le chitosane au sens large du terme présente des propriétés désacidifiantes des jus de fruit. Des travaux indiquent une perte d'acidité totale de 52,6 % lors d'un traitement à 0,015 g de chitosanes /mL pour le jus de pamplemousse. Lors de ces essais, on constate une réduction des teneurs en acide citrique (56 %), acide tartrique (41 %), acide malique (38,8 %), acide oxalique (36,8 %), acide ascorbique (6,5 %) (HORMAN, 1980). Le chitosane est un absorbant très sélectif des substances acides, il a été constaté des variations de pH comprises entre 0.3 et 2 unités en fonction des doses de traitement. Utiliser le chitosane dans le vin permettrait d'obtenir les mêmes résultats qu'avec les traitements chimiques alcalins, mais sans en avoir les inconvénients. En effet, le chitosane est un matériau naturel qui ne présente pas les inconvénients des produits chimiques, il est naturel et effectue une absorption sélective des acides ; de plus c'est un matériau bon marché qui peut être recyclé et réutilisé jusqu'à 50 fois avec la même efficacité. On peut donc imaginer que le chitosane puisse être utilisé comme un nouveau mode de désacidification du vin.

IV - EFFET CHÉLATEUR DE MÉTAUX LOURDS : PLOMB ET CADMIUM

Les propriétés physico-chimiques du chitosane sont dues à son origine, sa structure polysaccharidique et la présence de la fonction polyamine. La fonction polyamine lui permet d'avoir un caractère polyampholyte. Sous forme $-NH_3^+$, il s'associe sélectivement avec les anions alors que sous forme $-NH_2$, il a d'excellentes propriétés chélatantes à l'égard de certains ions et des métaux lourds (mercure, plomb, etc.) (KAPALA, 1994). Cette fonction de chélation est déjà très utilisée pour le traitement des eaux usées. D'après l'étude de MARUCA (1982), la complexation du cuivre et du chrome est provoquée par la formation de liaisons de coordination qui ont lieu entre les groupements $-OH$ et $-NH_2$ de la molécule de chitosane. Par ailleurs, suivant le métal complexé, les liaisons peuvent être datives ou électrostatiques (GUIBAL, 2003). La capacité d'absorption des ions métalliques dépend de la concentration des groupements amines accessibles et non de la concentration totale des groupements amines (DEBBAUDT, 2004). Le plomb est le métal le plus lourd des métaux usuels. Les effets pathologiques du plomb

concernent principalement les organes suivants : le système nerveux, le système sanguin et le système cardiovasculaire. L'apport alimentaire constitue la part prépondérante (environ 80 %) de l'exposition au plomb. En 1960, une étude de JAULMES *et al.* (1960) portant sur 500 échantillons de vins montrait que les vins français contenaient en moyenne 180 $\mu\text{g/L}$ de plomb. En 1990, l'ONIVINS (Office National Interprofessionnel des vins) conclut à partir d'une étude portant sur 2 733 échantillons à une valeur moyenne de 68 $\mu\text{g/L}$ de plomb (TEISSEDDRE, 1993). En mars 1996, suite aux travaux de TEISSEDDRE (1993), l'OIV s'est prononcé pour un abaissement de la teneur en plomb à 200 $\mu\text{g/L}$. Dès 1960, JAULMES *et al.* avaient attiré l'attention sur cette source de contamination. De part les études faites sur les eaux, on est en droit de penser que le chitosane aurait les mêmes effets chélatants sur le plomb dans le vin.

Le cadmium se rencontre naturellement à l'état de sulfure qui est un sel insoluble. Le cadmium est toxique pour l'homme. En effet, ce métal inhibe une enzyme de l'organisme humain ce qui entraîne des troubles du fonctionnement rénal et du métabolisme phosphocalcique. Les sources principales de contamination sont l'eau, l'air et les aliments (TEISSEDDRE *et al.*, 1994). En 1981, l'OIV s'est prononcé pour une teneur limite pour les vins de 10 $\mu\text{g/L}$.

DEBBAUDT *et al.* (2004) ont étudié l'effet du chitosane sur une solution de cadmium. Ils se sont aperçus que 75 % du cadmium présent dans la solution initiale était fixé par le chitosane après seulement 60 mn de contact. Ils ont aussi constaté que 0,0045 g de cadmium était fixé par 1 g de chitosane. De plus, il a été constaté que l'absorption du cadmium ainsi que les autres métaux lourds par le chitosane est pH dépendant (JHA *et al.*, 1988 et MUZZARELLI *et al.*, 1989). Ces études nous permettent donc de penser que le chitosane pourrait être utilisé dans le vin comme un chélateur du cadmium et ainsi amener le vin à une teneur acceptable en cet élément ou à son élimination totale.

V - EFFET CHÉLATEUR DE MÉTAUX MAJEURS : CUIVRE ET FER

Le cuivre et le fer sont des métaux présents en faible quantité, mais ils jouent un rôle particulier dans l'instabilité des vins (casse ferrique et casse cuivrique). Le moût de raisin renferme toujours des taux relativement importants de cuivre (5 mg/L); quelques dixièmes de mg/L proviennent de l'absorption du cuivre édaphique par la vigne mais la majeure partie est issue des traitements cupriques contre le mildiou. Il est bien connu que cet excès de cuivre est éliminé au cours de la fermentation. En effet, celui-ci est réduit en sulfures insolubles qui seront ainsi éliminés avec les levures et les lies. Au final, la teneur en cuivre dans le vin est de 0,3 à 0,4 mg/L. Toutefois, cette teneur peut être augmentée au contact de matériel en cuivre, en

laiton ou en bronze au cours de sa conservation et dépasser la concentration autorisée par l'OIV de 1 mg/L. Cela entraîne donc un risque important de casse. Cette casse est un accident grave, car elle se produit après une longue conservation du vin en bouteille. Par conséquent, les bouteilles défectueuses devront obligatoirement être débouchées pour pouvoir effectuer un nouveau traitement. À l'heure actuelle, le traitement au ferrocyanure de potassium est le moyen le plus efficace de protection de la casse cuivrique, avec un contrôle obligatoire par un œnologue. On peut aussi traiter avec de la bentonite ou bien encore de la gomme arabique. Cependant, ces produits peuvent présenter des problèmes de relargage de métaux voire d'allergénicité en cas de non respect de pureté. Par conséquent, la chitine et le chitosane pourraient être utilisés pour éliminer le cuivre en évitant ce risque potentiel d'allergénicité pour l'homme. L'étude d'OYRTON *et al.* (1999) a permis de démontrer que la chitine et le chitosane sont de très bon chélateurs de cations. De plus, ils ont démontré que le chitosane a une meilleure interaction avec le cuivre.

Le vin contient toujours quelques mg/L de fer. Une faible partie provient du raisin et le reste est apporté par la terre qui souille le raisin, le matériel métallique de vinification, etc. Dans le vin, le fer se trouve sous deux degrés d'oxydation (états ferreux et ferrique). Le rapport (Fe^{3+}/Fe^{2+}) du vin dépend de ses conditions de stockage, de sa teneur en dioxyde de soufre et de la présence d'oxygène. Par exemple, en aérant simplement le vin, on constate une augmentation de Fe^{3+} qui en réagissant avec l'acide phosphorique provoque la casse ferrique.

La complexation et l'élimination du fer en excès peuvent se faire par différents traitements : traitement avec l'acide citrique, traitement avec l'acide ascorbique, traitement avec le ferrocyanure de potassium (vins blanc, rosé et doux), traitement avec le phytate de calcium (vin rouge).

Là encore, le traitement au ferrocyanure de potassium est sous le contrôle obligatoire d'un œnologue.

On pourrait aussi envisager d'éliminer le fer avec la chitine ou le chitosane ou bien encore leurs dérivés. Par exemple WELTOWSKI *et al.* (1996) ont démontré que le chitosane N-benzyl disulphonate est un très bon absorbant du fer Fe^{3+} . MORI *et al.* (1999) ont démontré que le N-chloroacetyl chitosane avait une très bonne affinité pour le fer Fe^{3+} .

VI - EFFET CHÉLATEUR DE L'OTA (OCHRATOXINE A)

Sur le raisin, plusieurs moisissures peuvent se développer. Certaines peuvent être à l'origine de toxines. C'est le cas pour *Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus niger*.

Ces deux espèces colonisent le raisin très tôt souvent avant la véraison et pénètrent à l'intérieur de la baie par l'intermédiaire de blessures (choc, perforation par des insectes, éclatement de la baie). Une fois en contact avec la pulpe ou le jus de raisin, elles peuvent produire de l'ochratoxine A. L'ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine qui a été mise en évidence dans les vins et les jus de raisin au milieu des années 90 par un équipe suisse (ZIMMERLI, 1996). Depuis, les pays producteurs du bassin méditerranéen comme la France (OSPITAL *et al.*, 1998), l'Italie (PIETRI *et al.*, 2001), l'Espagne (BURDASPAL, 1999), le Maroc (FILALI *et al.*, 2001), mais également plusieurs pays de l'hémisphère sud comme l'Afrique du Sud (STANDER, 2002) et l'Australie (RUEDIGER, 2002), ont détecté de l'OTA en quantités variables dans certains de leurs vins. L'OTA est une molécule associant dans sa structure un acide aminé (la phényl-alanine) à la coumarine ; elle est stable dans le temps et à la chaleur. Le centre de recherche sur le cancer (CIRC-OMS) a établi que l'OTA peut être considérée comme cancérigène chez les animaux de laboratoire, ce qui nécessite une réduction de ces teneurs dans les aliments et les boissons. L'OTA a aussi un effet néphrotoxique ainsi que des effets immunodépresseurs et neurotoxiques (DROUILLARD, 2003). Il présente donc un risque évident pour la santé si l'exposition à cette molécule dépasse le niveau de tolérance qui est compris entre 0,3 et 0,9 µg/jour. L'ONIVINS a réalisé deux enquêtes pour évaluer l'importance de l'OTA dans les vins français : l'une en 1998 sur 265 vins et l'autre en 2001 sur 982 vins. Il en ressort les résultats suivants : 75 % des vins français ne présentent pas d'OTA et 17 % sont à moins de 0,5 µg/L.

L'OTA est cependant présent dans tous les types de vins : AOC, vins de pays, etc. Il y a généralement plus d'OTA dans les vins rouges que dans les vins blancs ou rosés. C'est en région méditerranéenne que l'on trouve le plus de vins à teneurs élevées en OTA (ICV, 2000). La réglementation européenne ne fixe pas pour l'instant de limites maximales de teneur en OTA dans les vins et dans les raisins. En 2001, une directive européenne a fixé des normes pour les céréales (5 µg/L), les dérivés des céréales (3 µg/L) et les raisins secs (10 µg/kg). La limite maximale autorisée sur le vin devait être fixée le 31 décembre 2003, mais l'OIV a proposé en juin 2002 de reporter la fixation de ce seuil en 2005, et a adopté la valeur de 2 µg/L. L'Union européenne propose une norme pour l'instant autour de 2 µg/L. À ce jour, aucun traitement préventif ni curatif n'a été proposé. Les travaux de DUMEAU *et al.* (2000) et de BLAYTEYRON *et al.* (2001) ont eu pour but de déterminer dans quelles proportions les adjuvants œnologiques traditionnels pouvaient se révéler efficaces dans la diminution des concentrations en OTA des vins contaminés. Ils ont pu constater que le siligel et le charbon supra 4 associés, complétés par un collage à la gélatine Gécoll supra peu-

vent éliminer jusqu'à 90 % de l'OTA présent dans les vins. Toutefois, l'addition de charbon aux vins rouges entraîne des modifications organoleptiques importantes (perte de couleur, goût...).

Par conséquent, le problème de la contamination du vin par l'OTA reste un problème entier d'actualité. Il serait par conséquent très intéressant de tester l'effet de la chitine, du chitosane et de leurs dérivés dans la diminution des concentrations en OTA dans des vins contaminés.

VII - ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE

Bien des cépages blancs sont sensibles à la pourriture grise due au développement de *Botrytis cinerea* sur le raisin. À partir de contaminations précoces des grappes, demeurées latentes depuis la floraison, *Botrytis* peut connaître un développement explosif à une date plus ou moins proche des vendanges. Ce fléau tant redouté par les producteurs est déclenché par des pluies abondantes au moment de la véraison ou pendant la maturation. Ce champignon contamine alors les baies encore vertes ou éclatées dégradant ainsi la pellicule, siège des arômes et de leurs précurseurs. On appelle cela la « pourriture grise ». Toutefois si le champignon touche le raisin parfaitement mûr, on parle alors de « pourriture noble » ce qui donne naissance à des vins liquoreux de grande classe tels que le Sauternes. La pourriture grise des raisins blancs entraîne à la fois un affaiblissement de l'arôme variétal, une grande instabilité des arômes fermentaires et l'apparition de défauts olfactifs. Cette pourriture peut aussi affecter l'état sanitaire des vendanges. La parcelle de vigne touchée par la pourriture n'est donc pas exploitable, ce qui est très dommageable pour les producteurs. À l'heure actuelle, il existe uniquement des traitements chimiques pour lutter contre cette pourriture grise. Il a été démontré que le chitosane avait une activité antifongique contre une multitude de champignons. L'optimisation de cette action est dépendante du type de chitosane ainsi que de son degré de polymérisation (RABEA, 2003). CHEN *et al.* ont démontré que le chitosane avait un effet antifongique contre *Botrytis cinerea*. Cette activité est optimale à pH 6 et avec des chitosanes oligomères constitués d'au moins 7 unités chitosane F7 (figure 2) (LIU, 2001) Le chitosane pourrait donc être appliqué directement sur le raisin soit en tant que traitement de prévention, soit en tant que traitement curatif.

VIII - ACTIVITÉ INHIBITRICE SPÉCIFIQUE DE CERTAINES ENZYMES

L'action bénéfique des diverses enzymes d'hydrolyse provenant du raisin est souvent limitée en raison du pH du moût ou d'une activité insuffisante, compte tenu de la durée limitée des traitements préfermentaires. Les industriels ont par conséquent développé des préparations enzymatiques mieux adaptées, essentiellement à partir de

diverses espèces fongiques. Ainsi par exemple, les glycosidases contenues dans les préparations industrielles d'enzymes pectolytiques permettent l'hydrolyse partielle des glycosides terpéniques et de ce fait le développement d'une partie du bouquet aromatique du vin. Ces préparations industrielles peuvent dans certains cas ne pas être pures et ainsi contenir à la fois des glycosidases et aussi des enzymes contaminantes, telle la cinamate décarboxylase qui entraîne l'apparition d'éthyl-phénols à l'odeur animale fort désagréable. Il faut donc purifier ces préparations, plusieurs techniques existent déjà.

Ainsi, par exemple, SPAGNA *et al.* (1998) ont développé une technique de purification de glycosidases α -L-arabinofuranosidase et la β -D-gluco-pyranosidase enzymes importantes pour le développement aromatique des vins. Ce procédé de purification s'effectue en plusieurs étapes : une précipitation dans l'éthanol, suivie d'une ultrafiltration, puis d'une absorption sur de la bentonite, suivie d'une ultrafiltration.

L'activité des enzymes est respectivement de 70 % pour l' α -L-arabinofuranosidase et de 116 % pour la α -D-gluco-pyranosidase. Grâce aux chitosanes, le procédé de purification s'effectue en une seule et unique étape. Il s'agit d'une séparation par chromatographie sur chitosane. Ainsi l'activité de l' α -L-arabinofuranosidase est de 90 % et de la α -D-gluco-pyranosidase de 74 %. Cette technique présente l'avantage de permettre aux enzymes d'atteindre une excellente activité au pH du vin (MARTINO, 2000).

IX - EFFET CHÉLATEUR DES PESTICIDES

Divers pesticides utilisés en traitement de la vigne peuvent être détectés à des doses non négligeables ultérieurement dans les moûts. Les voies de dégradation de certains pesticides par les levures peuvent conduire à des mauvaises odeurs de composés soufrés (CANTARELLI, 1964). Il serait intéressant d'éliminer ce type de pesticides. YOSHIZUKA *et al.* (2000) ont étudié l'élimination d'un pesticide particulier, le Methyl parathion, à l'aide de chitosane lié avec de l'épichlorohydrine. Ils ont constaté que ce type de chitosane était un très bon fixateur pour ce pesticide. Au vu de cette étude, on pourrait penser développer un chitosane susceptible de fixer les pesticides de la vigne tel que le béalaxyl servant à lutter contre le mildiou.

CONCLUSIONS

L'utilisation de chitine, de chitosane et des dérivés (polysaccharides), pour différents aspects de la production de vin peut être d'un intérêt majeur, en particulier pour : la stabilisation, la clarification, la désacidification, l'élimination de métaux lourds ou de métaux majeurs, ainsi que l'élimination d'ochratoxine A, d'enzymes et de

pesticides. Nous nous intéresserons dans le futur aux effets potentiels de ces composés pour différentes doses et types de vins.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BLATEYRON L. et DELTEIL D., 2001. Essai de réduction de la teneur en OTA par collage sur des vins rouges naturellement riches en cette molécule. ICV, 26^e congrès mondial de la vigne et du vin, OIV Adélaïde, Australie, 10-17 octobre.
- BURDASPAL P.A., 1999. Ocratoxina A en vinos mostos y zumos de uva elaborados en espana y en otros paises europeos. *Alimentaria*, **36**, 107-113.
- CAILLET MM., 1994. Stabilisation et clarification des vins par le collage. *Rev. Œnol.*, **74**, 15-18.
- CANTARELLI D. and MARTINI A., 1964. Chemical and microbiological surveys on the effects of dithiocarbamate fungicides on wine making. *J. Sci. Food. Agric.*, **15**, 186-196.
- CHATTERJEE S., CHATTERJEE B.P. and GUHA A.K., 2004. Clarification of fruit juice with chitosan. *Process Biochemistry*, **39**, 12, 2229-2232.
- DEBBAUDT A.L. and GSCHAIDER M.E., 2004. Theoretical and experimental study of M²⁺ adsorption on biopolymers Comparative kinetic pattern of Pb, Hg and Cd. *Carbohydrate Polymers*, **56**, 321-332.
- DROUILLARD J.B., PLADEAU V. et KALAQUIN D., 2003. OTA dans les vins: un partenariat filière des solutions pratiques au vignoble. *Rev. fr. œnol.*, **202**, 10-14.
- DUMEAU F., 2000. Influence de différents traitements sur la concentration en OTA des vins rouges. *Rev. œnol.*, **95**, 37-38.
- FILALI A., BETBEDER A.M., BAUDRIMONT I., SOULAYMANI R., BENAYADA A., CREPPY E., 2001. Ochratoxin A in beverages from Morocco: A preliminary survey. *Food Additives Contaminants*, **18**, 565-568.
- GUIBAL E., 2003. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. *Separation purification technology*, **38**, 1, 43-74.
- HIRANO S., 1989. *Production and application of chitin and chitosan in Japan*, in *Chitin and chitosan*, G.S. Braek, Editor. Elsevier Applied Science, p. 37-43.
- HORMAN IAN, Brevet : Deacidification of a fruit or vegetable extract. 4/11/1980, Patent number FR2435917
- ICV, 2000. OTA dans le vin. État des connaissances. Document ICV, p 1-9.
- JAULMES P. and ROQUES J., 1960. Le plomb dans les moûts et les vins. *Ann.Tech. Agri.*, **9**, 3, 189.
- JHA IN, PRABHAKARA RAO VS, 1988. Removal of cadmium using chitosan. *J. Environ. Eng.*, **114**, 962-974.
- KAPALA S., 1994. Les applications cosmétiques du chitosane. *Thèse Université Montpellier I*.
- KAPALA S., 1994. Les applications cosmétiques du chitosane. *Thèse de Doctorat, Université Montpellier I*.
- LATASTE C., 2003. *Le collage des vins et la réglementation de l'étiquetage*. in Sitevi 2003. Montpellier.
- LATTANZIO V. and PALMIERI S., 1994. The role of phenolics in the post-harvest physiology of fruit and vegetables: Browning reactions and fungal diseases. *Ital. J. Food. Sci.*, **1**, 3-22.
- LIU XF, YANG DZ, LI Z, YAO KD, 2001. *J. Appl. Polym. Sci.*, **79**, 1324.
- MARTINO A, DI LAZZARO A., FIUME I., SPAGNA G., PIFFERI P.G. and DE ROSA M.D., 2000. Improvement of the flavour of Falanghina white wine using a purified glycosidase preparation from *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, **36**, 93-102.
- MAYER A.M., 1979. Polyphenol Oxidases in Plant. *Phytochemistry*, **18**, 193-196.
- MARUCA R., WIGHTMAN J.P., 1982. Interaction of heavy metals with chitin and chitosan III.chromium. *J. applied polymer sci.*, **27**, 4827-4837.
- MORI T., NISHIHAYAMA Y. and KURITA K., 1999. Kichin, kitosan, kenkyu, **52**, 168-169.
- MUZZARELLI R.A.A., and FILIPPINI O., 1989. Removal of trace metal ions from industrial waters nuclear effluents and drinking water with the aid of cross-linked N-Carboxymethyl chitosan. *Carbohydrate polymers*, **11**, 293-306.
- OYRTON A.C. and AIROLDI C., 1999. Some thermodynamic data on copper-chitin and copper-chitosan biopolymer interactions. *J. colloid interface sci.*, **212**, 212-219.
- OSPITAL M., BETBEDER A.M., TRICARD I., CREPPY E. et MEDINA B., 1998. L'ochratoxine dans les vins. *Rev. Fr. Œnol.*, **169**, 16-18.
- PIETRI A., PALLARONI L. and PIVA G., 2001. Occurrence of ochratoxin A in italian wines. *Food additives contaminants*, **18**, 647-654.
- RABEA EI, STEVENS C, SMAGGHE G. and STEURBAUT W., 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, **4**, 6, 1457-1465.
- RIBÉREAU-GAYON P., MAUJEAN A. et DUBOURDIEU D., 1998. *Traité d'œnologie : 2- Chimie du vin stabilisation et traitements*, Dunod ed. 16-19.
- RUDAIL K.M., 1969. Chitin and its association with other molecules. *J. Polymer. Sci.*, **28**, 83-102.
- RUEDIGER G.A., 2002. Ochratoxin A in wines. Proceeding of the eleventh Australian Wine Industry Technical Conference Adelaide South Australia. in *Wine Industry Technical Conference INC. Australian* p 262.
- RWAN J. and J. WU., 1996. Deacidification of grapefruitjuice with chitosan. *Food Sci. Taiwan*, **23**, 509-519.
- SAPERS G.M., 1987. Measurement of enzymatic browning at cut surfaces and in juices of raw apple and pear fruit. *J. Food Sci.*, **52**, 1258-1262.
- SENG J.M. 1988. Chitine, chitosane et ses dérivés : de nouvelles perspectives pour l'industrie. *Biofutur*, sept., 40-44.
- SPAGNA G., MARTINO A., BIANCHI G., PIFFERI P.G., 1998. A simple method for purifying glycosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of wine. *Enzyme microbial tech-nol.*, **22**, 298-304.
- SPAGNA G., RANGONI C., MATTIVI F., NICOLINI G. and PALMONARI R., 1996. The stabilization of white wines

- by absorption of phenolic compounds on chitin and chitosan. *Food research International*, **29**, 3-4, 241-248.
- SPAGNA G. and PIFFERI PG, 2000. Fining treatments of white wines by means of polymeric adjuvants for their stabilization against browning. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4616-4627.
- STANDER M.A., 2002. Survey of ochratoxin A in South Africa. *J. enol. vitic.*, **23**, 9-13.
- SKAUGRUD O., 1990. Chitin and chitosan. Crustacean Biopolymers with potential. In *International by products conference*, Anchorage Alaska.
- SOTO-PARALTA N. and KNORR D, 1989. Effects of chitosan treatments on the clarity and color of apple juice. *J. food sci.*, **54**, 2, 495-496.
- TEISSEDRE P.-L., 1993. *Thèse de Doctorat : Le plomb du raisin au vin*, in Faculté de Pharmacie. Université Montpellier I.
- TEISSEDRE P.-L., CABANIS, DAUMAS F. et CABANIS J.C., 1994. Évolution de la teneur en cadmium au cours de l'élaboration des vins des côtes du Rhône et de la vallée du Rhône. *Sciences Aliments*, **14**, 741-749.
- VAMOS-VIGYAZO L., 1981. Polyphenol Oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, **15**, 49-127.
- VIALATTE C., 1982. La désacidification des moûts et des vins par formation de sels doubles de tartromalate de calcium - Procédé Dicalcic. *Rev. Fr. œnol.*, **87**, 37-42.
- WELTOWSKI M. and MORCELLET M., 1996. *J. applied polymer science*, **59**, 4, 647-654.
- ZHANG D., 1997. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi fruit. *Postharvest Biology and Technology*, **12**, 195-202.
- ZIMMERLI B., 1996. Ochratoxin A in table wine and grape juice : occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, **13**, 655-668.
- YOSHIZUKA K, L.Z., INOUE K, 2000. Silver complexed chitosan microparticles for pesticides removal. *Reactive and functional polymers*, **44**, 47-54.

Manuscrit reçu le 13 juillet 2005 ; accepté pour publication, après modifications le 5 décembre 2005