Connaissance Vigne Vin, 1988, **22,** N° 2, 135-158.

NOUVELLES ACQUISITIONS STRUCTURALES SUR LES SUBSTANCES PECTIQUES DE LA PULPE DE RAISIN

L. SAULNIER, J.-M. BRILLOUET et M. MOUTOUNET

Institut National de la Recherche Agronomique,
Institut des Produits de la Vigne,
Laboratoire des Polymères et Techniques Physico-Chimiques,
9, place Viala, 34060 Montpellier Cedex (France).

INTRODUCTION

Les polyosides posent en œnologie un certain nombre de problèmes plus ou moins bien résolus tant au niveau de la clarification des moûts et des vins (colmatage des surfaces filtrantes, prévention de la sédimentation des bourbes, etc...), que de la stabilité physico-chimique des vins (rôle vis-à-vis de la précipitation des sels peu solubles, colloïdes protecteurs...). De plus ils pourraient jouer un rôle favorable dans les qualités organoleptiques des produits finis (VILLETTAZ, 1988). Les travaux consacrés à ces substances (pour revue bibliographique USSEGLIO-TOMASSET, 1978; MOURGUES, 1979) ont permis de préciser leur origine endogène (raisin) ou exogène (*Botrytis,* levures) dans les moûts et les vins. Ainsi on connaît bien le β-glucane sécrété par *Botrytis cinerea* et son influence négative sur la filtration (DUBOURDIEU, 1982); de même les mannanes cédés par les levures au cours de la fermentation ont été étudiés (VILLETTAZ et *al.,* 1980: LLAUBERES et *al.,* 1987).

Par contre les polyosides provenant du raisin sont mal connus en dépit de leur importance pondérale (de l'ordre de 50 p. 100 à 60 p. 100 des polyosides totaux) dans les vins. Ceux-ci sont exclusivement issus de la paroi pecto-cellulosique ou paroi primaire, que l'on observe dans les fruits, et qui est constituée à 90 p. 100 de polyosides, les 10 p. 100 restants étant des protéines (Mc NEIL et *al.,* 1984). Ce sont principalement les substances pectiques, qui représentent au moins 35 p. 100 des polyosides totaux, qui vont être solubilisées au cours des opérations technologiques, la cellulose et les hémicelluloses restant pratiquement insolubles dans les conditions utilisées. Il apparaît donc intéressant d'étudier l'ensemble des substances pectiques du raisin et de connaître leur structure, afin de mieux comprendre l'influence des différents procédés technologiques sur leur solubilisation et leur devenir au cours de l'élaboration des vins.

Toutefois avant de présenter les nouveaux résultats acquis sur la structure des substances pectiques du raisin, il nous paraît indispensable dans un premier temps de définir le terme de substances pectiques, et dans un second temps de préciser la méthodologie utilisée dans ce type d'étude.

LES SUBSTANCES PECTIQUES

Le terme de substances pectiques désigne un ensemble extrêmement complexe de polyosides, étroitement associés entre eux et localisés au niveau de la lamelle moyenne et de la paroi primaire des végétaux (figure 1). Ces polyosides peuvent être extraits par différents procédés plus ou moins sélectifs, et il est préférable de les classer sur une base chimique (structurale) plutôt que d'après leur mode d'isolement (Mc NEIL et *al.*, 1984). Pour clarifier l'exposé et rattacher les fractions définies à des notions connues en œnologie nous avons distingué d'une part les substances pectiques neutres et d'autre part les substances pectiques acides.

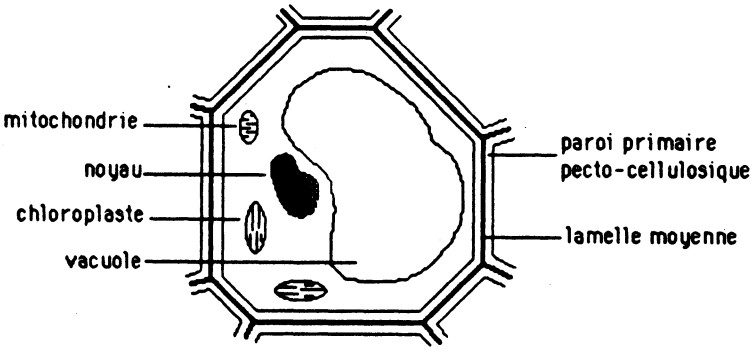


Fig. 1. — Schéma d'une cellule végétale indifférenciée.

I — LES SUBSTANCES PECTIQUES NEUTRES

Ces polyosides sont toujours extraits (eau, chélatants, bases) en association avec les substances pectiques acides, dont ils peuvent être séparés ensuite par des méthodes douces (précipitation sélective, chromatographie d'interaction ionique...). Le terme de «gommes» habituellement utilisé en œnologie recouvre cette classe de polyosides pectiques. On distingue parmi ces substances trois types de structure.

1°) *Les arabinanes*

Ce sont des polymères de faible masse moléculaire constitués d'une chaîne principale d'unités arabinose liées en α (1 → 5) pouvant être ramifiée par des résidus arabinose en situation terminale (figure 2). Un arabinane non précipitable à l'éthanol (80 p. 100) a été isolé d'un moût de Pinot noir (VILLETTAZ et *al.*, 1981).

2°) *Les galactanes et arabinogalactanes de type I*

Ces substances sont caractérisées par un squelette d'unités galactose liées en β (1 → 4) contenant des proportions variables d'arabinose (de 0 à 40 p. 100) sous forme de chaînes latérales (figure 2).

3°) *Les arabinogalactanes de type II*

Ces polyosides sont très largement répandus et ont été extraits de la plupart des tissus végétaux (FINCHER et *al.*, 1983). Ils sont constitués essentiellement d'arabinose et de galactose mais peuvent également contenir des proportions variables de rhamnose et d'acides uroniques (acide galacturonique et / ou glucuronique) et des quantités mineures de glucose, mannose et xylose. De plus ces arabinogalactanes sont souvent associés de manière covalente à des protéines représentant 2 p. 100 à 10 p. 100 de la masse (FINCHER et *al.*, 1983). Le point commun essentiel de ces arabinogalactanes est la présence d'un squelette de galactane en α (1 → 3) / (1 → 6) sur lequel des unités terminales ou de courtes chaînes d'arabinose sont branchées (figure 2). Leur organisation générale n'est toutefois pas encore totalement résolue (FINCHER et *al.*, 1988).

II — LES SUBSTANCES PECTIQUES ACIDES

Ces polyosides sont communément appelés pectines bien que du point de vue plus rigoureux d'une classification chimique il convient de parler d'homogalacturonanes et de rhamnogalacturonanes (Mc NEIL et *al.*, 1984). Ils sont extraits de la paroi des végétaux par diverses méthodes (eau, chélatants, acides et bases dilués, enzymes) et sont caractérisés par une forte teneur en acide galacturonique. Toutefois quel que soit le procédé d'extraction utilisé et l'origine des pectines, des oses neutres (en particulier du rhamnose, du galactose et de l'arabinose) sont toujours associés à l'acide galacturonique. Ce caractère hétéropolymérique s'explique parfaitement sur la base de la structure de ces macromolécules.

1°) *Homogalacturonane*

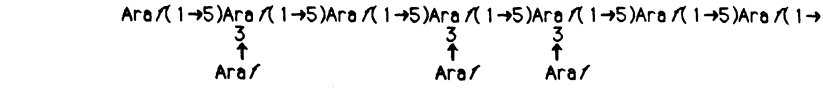
La caractéristique principale des pectines est la présence d'un squelette d'acide galacturonique lié en α (1 → 4) (figure 2) dont la fonction carboxylique peut être estérifiée par du méthanol. Des homogalacturonanes purs n'ont été isolés que dans de rares exceptions et dans des conditions drastiques entraînant des dégradations.

2°) *Rhamnogalacturonane*

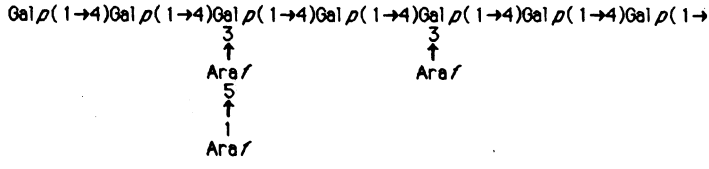
Des rhamnogalacturonanes ont été extraits de la plupart des parois primaires des végétaux (Mc NEIL et *al.*, 1984). Ces polyosides sont constitués d'alternance de rhamnose et d'acide galacturonique (figure 2) et des chaînes latérales d'oses neutres présentant des motifs structuraux similaires à ceux rencontrés dans les substances pectiques neutres sont portées au niveau du C_4 du rhamnose. La présence de la molécule de rhamnose induit un angle de 90° dans l'enchaînement acide galacturonique-rhamnose-acide galacturonique (coude pectique).

Ces structures sont en fait associées de manière covalente définissant des zones homogalacturoniques et rhamnogalacturoniques au sein d'une même macromolécule pectique (figure 3). Les propriétés physico-chimiques des pectines sont étroitement liées à leurs particularités structurales ; par exemple, le degré d'estérification de l'acide

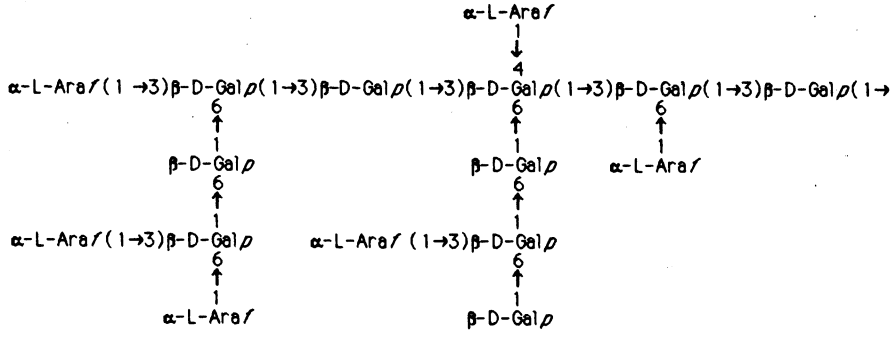
SUBSTANCES PECTIQUES NEUTRES



Arabinane

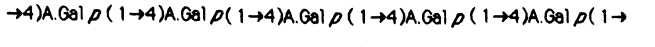


Arabinogalactane de type I

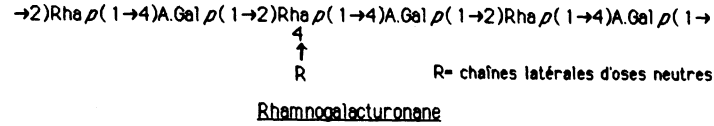


Arabinogalactane de type II

SUBSTANCES PECTIQUES ACIDES



Homogalacturonane



Rhamnogalacturonane

Fig. 2. — Structure des substances pectiques.

galacturonique ainsi que la présence des zones rhamnogalacturoniques porteuses de chaînes latérales d'oses neutres modifient les propriétés gélifiantes de ces macromolécules.

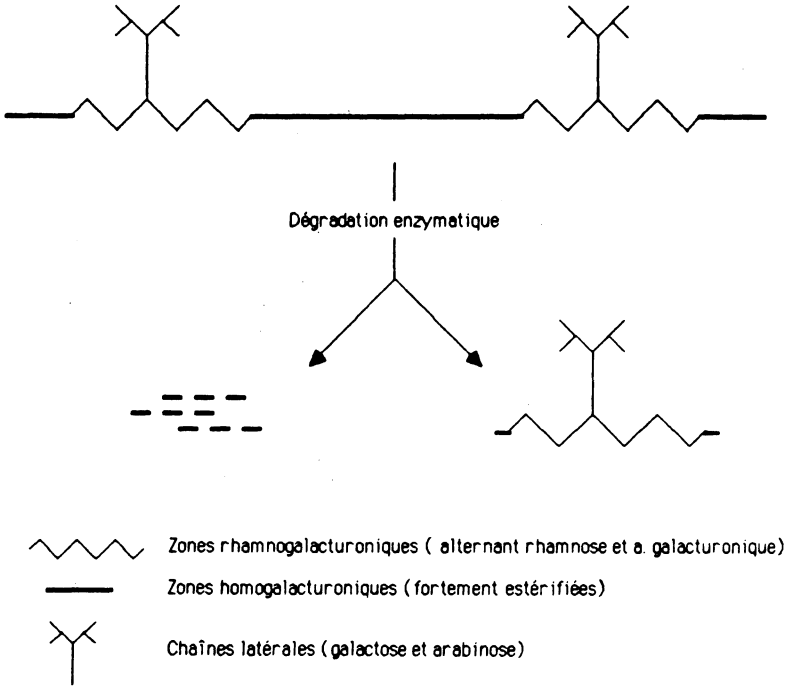


Fig. 3. — Schéma des pectines et de l'action des enzymes (endopolygalacturonase ou endopectine-lyase).

Les substances pectiques participent avec les autres constituants pariétaux à la création d'un réseau tridimensionnel à base d'interactions covalentes, ioniques et mécaniques, englobant les fibres de cellulose. Elles contribuent ainsi d'une manière fondamentale à la structure de la paroi primaire et à la cohésion des tissus végétaux. Toutefois le degré d'interconnection des arabinanes, arabinogalactanes, homogalacturonanes et rhamnogalacturonanes entre eux et avec les autres constituants pariétaux reste à préciser et il n'existe actuellement aucun modèle satisfaisant de l'organisation des polyosides au sein de la paroi primaire (Mc NEIL et *al.,* 1984). De même la solubilisation de matériel pectique au cours de la maturation et les relations de ces fractions avec les polyosides pariétaux insolubles restent mal compris (LABAVITCH, 1981).

MÉTHODES D'ÉTUDE

L'étude d'un polyoside comprend l'extraction et la purification à partir du matériel végétal choisi, suivies d'une caractérisation globale (composition chimique, caracté-

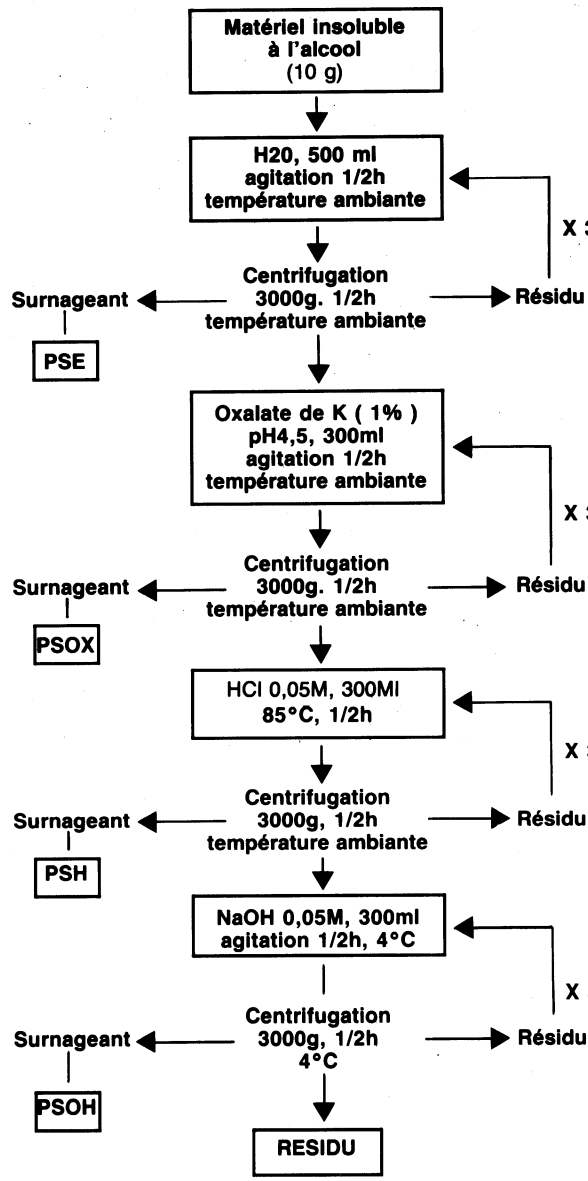


Fig. 4. — Extraction fractionnée du matériel insoluble à l'alcool

ristiques physico-chimiques...) du composé isolé. Après ces étapes préliminaires, qui permettent d'apprécier l'état d'homogénéité du polyoside isolé, une analyse structurale fine à l'aide de méthodes spécifiques chimiques et enzymatiques est possible. Cette démarche très générale a été suivie dans l'étude des polyosides pectiques du raisin.

I — CHOIX ET FIXATION DU MATÉRIEL VÉGÉTAL

Le Carignan noir a été choisi en raison de sa richesse en substances pectiques relativement à d'autres cépages et de son implantation dominante dans le Languedoc-Roussillon. Pour des raisons d'homogénéité nous nous sommes limités à l'étude de la pulpe. Les raisins ont été récoltés à maturité technologique.

Les baies congelées ont été pelées et épépinées puis plongées dans de l'éthanol à 95 p. 100 bouillant (pulpe / éthanol : 1/5 en poids, soit une concentration finale en éthanol de 80 p. 100) pendant 10 minutes avant d'être broyées au polytron pendant 3 minutes. Le précipité a été ensuite centrifugé, lavé avec de l'éthanol à 95 p. 100 et finalement séché (SAULNIER et THIBAULT, 1987a). La préparation d'un matériel insoluble à l'alcool assure la précipitation des polyosides, à l'exception de certains arabinanes (VILLETTAZ et *al.,* 1981), l'élimination des substances alcoolo-solubles (sucres, glycosides, acides aminés, pigments...), et surtout permet d'inactiver efficacement les enzymes, précaution essentielle en raison des activités pectinestérases et endopolygalacturonases présentes dans les raisins (MARTEAU, 1978). Ce procédé a toutefois l'inconvénient de coprécipiter les protéines cytoplasmiques, les polyphénols et les sels, conduisant à l'isolement de parois impures (SELVENDRAN, 1975).

II — EXTRACTION ET PURIFICATION

Les substances pectiques sont présentes dans la lamelle moyenne et la paroi primaire sous des formes solubles qui peuvent être facilement extraites dans des conditions douces par de l'eau ou des agents chélatants. Toutefois, la plus grande partie des polyosides pectiques est généralement insoluble dans ces conditions, en raison de liaisons (covalentes, ioniques, hydrogènes, mécaniques) avec les autres constituants pariétaux. Pour les solubiliser, des traitements chimiques (action d'acide ou de base) plus ou moins dégradants, ou des enzymes pectolytiques (endopolygalacturonase ou endopectine-lyase) doivent être employés.

Une extraction fractionnée du matériel insoluble à l'alcool (figure 4) (SAULNIER et THIBAULT, 1987a) a permis d'isoler des fractions solubles, à l'eau (PSE) et l'oxalate (PSOX), ainsi que des fractions solubilisées par l'acide (PSH) et la soude (PSOH). Une chromatographie d'interaction ionique sur DEAE-Sephacel a été réalisée sur les fractions solubles à l'eau, à l'oxalate et à l'acide afin de les purifier et de séparer les populations neutres des acides. Les fractions solubilisées par la soude ont été purifiées par précipitation au cuivre.

Une endopectine-lyase (VAN HOUDENOVEN, 1975) a également été utilisée pour extraire le matériel pectique insoluble à l'eau et à l'oxalate (SAULNIER et THIBAULT, 1987b).

III — CARACTÉRISATION GLOBALE

La détermination des oses constitutifs est effectuée après hydrolyse acide des pectines en monomères en utilisant la méthode colorimétrique au métahydroxydiphényle pour les acides uroniques (THIBAULT, 1981) et en effectuant une dérivation sous formes d'acétates d'alditol pour le dosage par chromatographie en phase gazeuse des oses neutres (ALBERSHEIM et *al.,* 1967). Le degré d'estérification de l'acide galacturonique a été évalué par dosage du méthanol (WOOD et SIDDIQUI, 1967). Les protéines ont été dosées par la méthode de LOWRY (POTTY, 1969) et leur constitution en acides aminés a été analysée (SAULNIER et *al.,* 1988).

Les pectines sont caractérisées par leur polymolécularité et leur polydispersité ; on ne peut donc atteindre qu'une masse moléculaire moyenne qui peut être estimée par chromatographie de tamisage moléculaire (Sepharose 2B CL) et viscosimétrie. Les conditions opératoires utilisées ont été décrites par ailleurs (SAULNIER et THIBAULT, 1987a).

IV — ANALYSE FINE DE LA STRUCTURE

Elle repose d'une part sur l'utilisation de méthodes enzymatiques permettant d'étudier la répartition des substituants sur la chaîne principale, et d'autre part sur des méthodes chimique (perméthylation) et physique (résonance magnétique nucléaire du ^{13}C) qui donnent accès aux types de liaisons entre monomères.

1°) *Dégradations enzymatiques*

Une endopolygalacturonase (endoPG) (THIBAULT et MERCIER, 1979) hydrolysant la liaison (1 → 4) entre résidus d'acide α-D-galacturonique non estérifiés et une endopectine-lyase (VAN HOUDENOVEN, 1975) catalysant une réaction de β-élimination entre résidus d'acide galacturonique méthylestérifiés ont été utilisées. Ces deux endo-enzymes dégradent le squelette polygalacturonique des pectines permettant d'étudier la répartition des chaînes latérales d'oses neutres. Une désestérification préalable des pectines est toutefois nécessaire pour obtenir une action optimale de l'endopolygalacturonase. Les conditions opératoires ont été décrites par ailleurs (SAULNIER et THIBAULT, 1987b).

Une arabinofuranosidase (BRILLOUET et *al.,* 1985) a également été utilisée. Cette exo-enzyme qui hydrolyse spécifiquement l'arabinose en situation terminale permet d'étudier finement la localisation de cet ose dans les arabinogalactanes, en association avec les techniques de perméthylation et de résonance magnétique nucléaire du ^{13}C (SAULNIER et *al.,* 1988).

2°) *Méthodes chimiques et physiques*

L'élucidation de la structure des polyosides implique la détermination des types de liaison entre monomères constitutifs (structure primaire) ; la perméthylation est la méthode la plus ancienne mais toujours la plus utilisée dans ce type d'étude. Elle implique la méthylation de tous les groupements hydroxyles libres du polyoside et ensuite son hydrolyse en un mélange d'oses partiellement méthylés et leur séparation et esti-

mation quantitative par chromatographie en phase gazeuse (BJORNDALL et *al.*, 1970). Les substances pectiques ont donc été méthylées selon la technique d'HAKOMORI (1964) et ensuite analysées dans des conditions décrites par ailleurs (SAULNIER, et *al.*, 1988).

La résonance magnétique nucléaire du ^{13}C permet également d'accéder à la structure primaire des polyosides, confirmant les résultats acquis en méthylation. Cette technique a été utilisée sur certaines fractions pectiques de la pulpe de raisin (SAULNIER et *al.*, 1988).

ÉTUDE DE LA STRUCTURE DES SUBSTANCES PECTIQUES DE LA PULPE DE RAISIN

I — PRÉPARATION DU MATÉRIEL INSOLUBLE A L'ALCOOL ET EXTRACTION FRACTIONNÉE

Les sels (tartrate) sont précipités pendant le traitement à l'éthanol bouillant et représentent une forte proportion du matériel insoluble à l'alcool (65 p. 100 en poids, déterminé après dialyse exhaustive) qui, corrigé de cette teneur en sels, représente environ 0,5 p. 100 en poids de la pulpe (matière fraîche). Dans ce matériel insoluble à l'alcool les polyosides ne prennent part que pour 1/3 de la masse (Tableau I), ce qui indique une préparation de paroi fortement contaminée par des polyphénols et des protéines.

TABLEAU I

Composition du matériel insoluble à l'alcool et du résidu d'extraction.

Les chiffres représentent les teneurs en % de poids sec.
Les valeurs entre parenthèses correspondent au % en poids de sucres du matériel insoluble à l'alcool retenu dans le résidu.

	Matériel insoluble à l'alcool	Résidu
A. galacturonique	11,6	2,1 (8)
Rhamnose	0,7	0,4 (27)
Arabinose	1,7	1,9 (53)
Xylose	2,3	6,2 (129)
Mannose	0,9	2,1 (96)
Galactose	2,3	1,7 (37)
Glucose	15,9	30,6 (93)

L'extraction fractionnée utilisée présente une bonne sélectivité vis-à-vis des substances pectiques puisque 92 p. 100 des acides uroniques, 75 p. 100 du rhamnose, 63 p. 100 du galactose et 47 p. 100 de l'arabinose sont extraits par cette méthode alors

que le xylose, le mannose et le glucose, constitutifs des hémicelluloses et de la cellulose, sont peu affectés (Tableau I). Il apparaît (figure 5) que les fractions solubles à l'eau (PSE) et celles solubilisées par l'acide (PSH) représentent l'essentiel du matériel pectique extrait; par la suite seuls les résultats concernant ces fractions seront exposés.

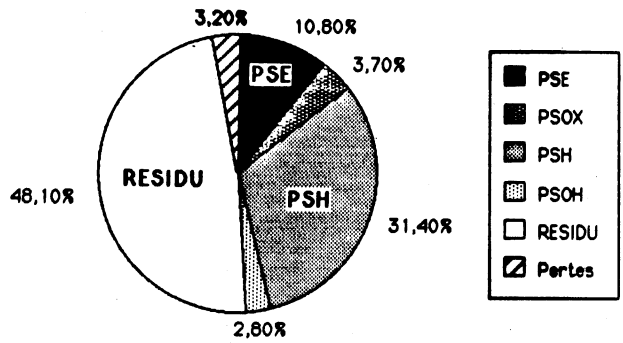


Fig. 5. — Répartition des fractions pectiques extraites du matériel insoluble à l'alcool (% en poids).

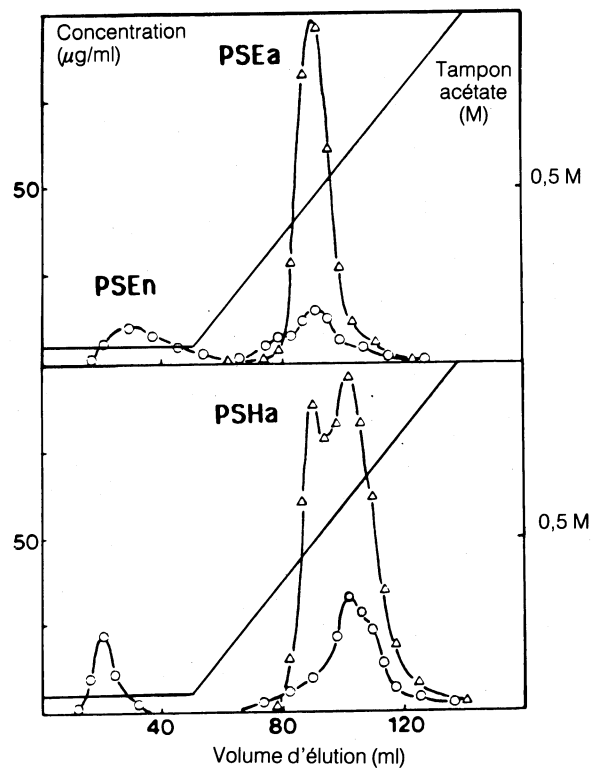


Fig. 6. — Chromatographie d'interaction ionique sur DEAE-Sephacel des pectines brutes.

II — PURIFICATION ET CARACTÉRISATION

Les PSE et PSH extraites étant relativement impures (teneur en oses : PSE 65 p. 100, PSH 40 p. 100), une étape de purification par chromatographie d'échange d'ions s'est révélée nécessaire. Les profils d'élution sur DEAE-Sephacel des PSE et PSH brutes sont présentées figure 6. Un matériel composé exclusivement d'oses neutres (PSEn et PSHn ; n = neutre) est élué au lavage de la colonne et représente respectivement 43 p. 100 et 21 p. 100 des oses neutres totaux pour les PSE et les PSH. La plus grande partie du matériel, riche en acide galacturonique (PSEa et PSHa ; a = acide), se fixe sur le gel et en est élué par l'application d'un gradient de force ionique en tampon acétate (0,05 M - 1M). Les PSEa sont décrochées par le tampon 0,5 M en un pic étroit tandis que les PSHa présentent deux populations éluées respectivement par le tampon 0,4 M et 0,7 M. Dans les deux cas l'acide galacturonique est coélué avec des oses neutres ce qui suggère l'existence de liaisons covalentes entre ces populations. L'hétérogénéité constatée au niveau de l'évolution des PSHa reflète vraisemblablement des variations dans l'estérification du squelette polygalacturonique.

TABLEAU II

Composition des substances pectiques purifiées.

	PSEn	PSEa	PSHa
	RENDEMENT % en poids du matériel insoluble à l'alcool ( ) % des substances pectiques purifiées		
	1,0 (4,6)	6,6 (30)	12,0 (55)
	COMPOSITION (% en poids)		
Acides uroniques (1)	2,0	63,3	53,3
Rhamnose	0,3	2,7	5,5
Fucose	0,4	0,3	0,3
Arabinose	19,7	10,4	7,7
Xylose	1,0	2,1	0,6
Mannose	2,3	0,1	0,1
Galactose	36,4	12,2	4,4
Glucose	5,2	0,6	0,6
Méthanol (2)	—	8,5 (77)	6,4 (68)
Protéines	8,0	2,5	10,4

(1) a. glucuronique (PSEn), a. galacturonique (PSEa et PSH)
(2) ( ) degré d'estérification

Les rendements chromatographiques sont de 100 p. 100 en oses neutres et seulement de 80 p. 100 en acide galacturonique; les tentatives effectuées pour éluer les fractions acides résiduelles ont échoué.

La composition chimique des PSEn, PSEa et PSHa a été déterminée (Tableau II). Les acides uroniques sont largement prédominants dans les fractions acides (acide galacturonique) et détectés à l'état de traces dans les fractions neutres (acide glucuronique), tandis que des oses neutres de même nature (majoritairement arabinose, galactose et rhamnose) sont détectés dans les PSEn, PSEa et PSHa mais dans des proportions différentes. Des protéines sont associées aux trois fractions; leur composition en acides aminés (Tableau III) est très différente de celle des protéines du matériel insoluble à l'alcool et se rapproche de celle des arabinogalactanes-protéines (FINCHER et *al.*, 1983).

TABLEAU III

Composition en acides aminés des protéines associées aux substances pectiques de la pulpe de raisin.

Les chiffres représentent le % molaire.

Acides aminés	MIA	PSEn	PSEa	ZH-PSE	PSHa	ZH-PSH	ZH-MIA
Acide aspartique	10.1	3.4	6.6	5.5	6.1	4.6	7.0
Hydroxyproline	0.5	10.8	17.1	2.9	12.9	18.6	6.3
Thréonine	6.7	6.6	8.8	5.3	7.0	6.1	4.8
Sérine	7.5	17.4	15.5	21.4	6.0	12.4	14.4
Acide glutamique	11.6	5.4	7.2	13.0	7.5	9.3	11.0
Proline	2.2	4.9	1.9	2.5	11.2	8.5	4.6
Glycine	10.7	10.2	9.6	16.5	10.2	9.6	13.5
Alanine	8.9	21.3	15.3	9.7	5.8	6.9	8.7
Méthionine	1.3	0.2	—	—	—	—	—
Valine	5.8	—	4.3	3.5	5.3	5.4	4.2
Isoleucine	4.5	2.7	2.2	1.9	2.8	1.6	2.5
Leucine	7.2	4.0	4.6	2.9	4.5	3.1	4.1
Tyrosine	3.1	0.5	1.0	0.6	2.8	1.6	2.3
Aminobutyrate	-	3.2	—	—	—	—	—
Phénylalanine	5.2	1.5	1.6	1.4	3.3	1.1	2.3
Ornithine	0.1	1.3	0.9	8.0	0.6	2.8	4.4
Lysine	7.5	4.9	2.5	2.2	6.0	6.9	5.4
Histidine	3.3	0.6	0.9	2.1	4.6	1.5	2.5
Arginine	3.8	1.0	0.0	0.6	3.4	0.0	2.0

Les PSEa et PSHa sont éluées dans le domaine de fractionnement d'un gel de Sepharose 2B CL (figure 7); toutefois en l'absence d'étalonnage avec des molécules de masse connue et de structure équivalente aux pectines, la masse moléculaire ne

peut être évaluée correctement. Il apparaît que les deux fractions sont très polydispersées et hétérogènes. La viscosité intrinsèque des PSEa et PSHa est de l'ordre de 2 dl/g ce qui est identique à celle des pectines de pulpe de betterave (ROMBOUTS et THIBAULT, 1986), mais très inférieure à celles du jus de pomme (6 dl/g) (ROUAU et THIBAULT, 1984) ou des cerises (5 dl/g) (BARBIER et THIBAULT, 1982).

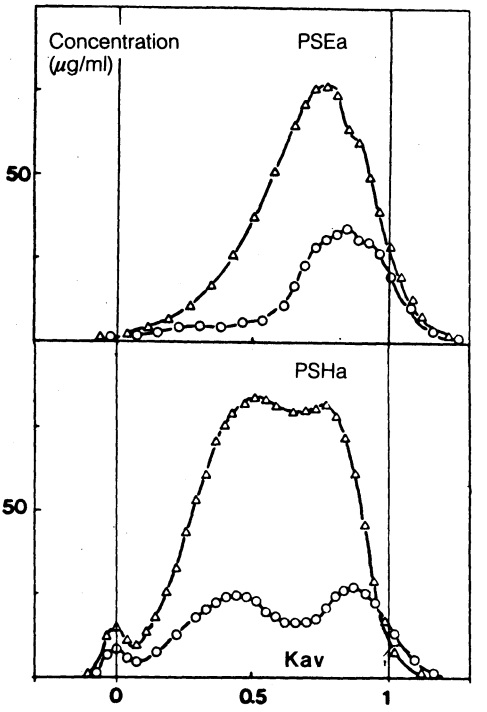


Fig. 7. — Chromatographie de tamisage moléculaire sur Sepharose 2B CL des substances pectiques acides.

Le raisin est pauvre en substances pectiques (0,26 p. 100 du poids frais) en comparaison d'autres fruits (0,5 p. 100 en moyenne; MOURGUES, 1979). De plus les pectines de la pulpe de raisin se distinguent par leur faible masse moléculaire, une proportion importante d'oses neutres et particulièrement de rhamnose, et un fort degré d'estérification.

III — DÉGRADATION ENZYMATIQUE PAR L'ENDOPOLYGALACTURONASE ET L'ENDOPECTINE-LYASE

1°) *Action sur les pectines purifiées*

Après désestérification douce, les pectines ont été soumises à l'action de l'endopolygalacturonase. Les produits de dégradation sont séparés par chromatographie de tamisage moléculaire sur un gel de Sephadex G100 (figure 8) d'une part en des populations de masse moléculaire importante exclues du gel et riches en oses neutres, et

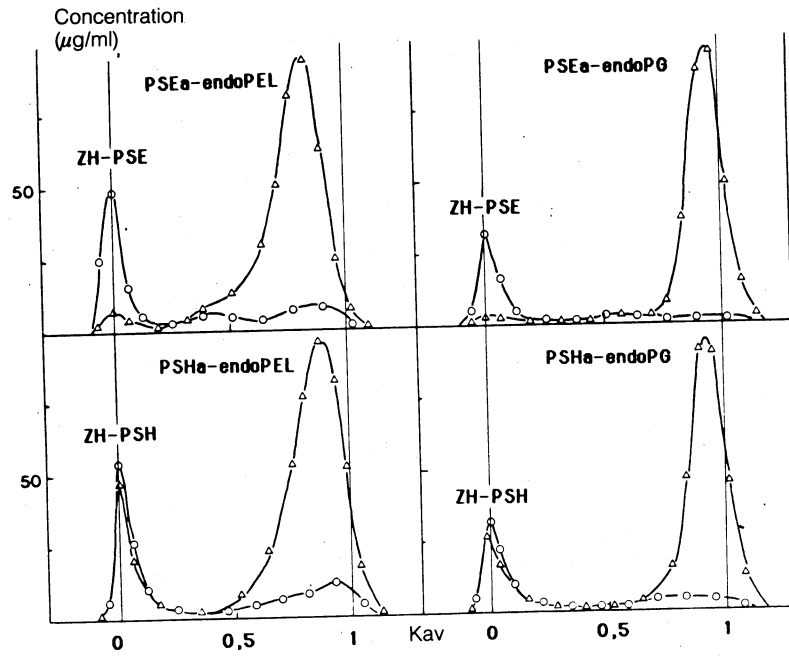


Fig. 8. — Chromatographie de tamisage moléculaire sur Séhadex G 100 des substances pectiques acides dégradées par l'endopolygalacturonase et l'endopectine-lyase.

△ acide galacturonique (m-phénylphénol)
○ oses neutres (orcinol)

TABLEAU IV

Composition des zones «hérissées».

	ZH-PSE	ZH-PSH	ZH-MIA
	RENDEMENT (% des pectines initiales)		
A. galacturonique	4	15	20
Oses neutres	82	80	70
	COMPOSITION (% en poids)		
A. galacturonique	6,5	19,8	24,2
Rhamnose	4,9	15	16,1
Fucose	0,3	tr.	0,3
Arabinose	24,2	16,2	33,5
Xylose	2,9	tr.	0,7
Mannose	2,5	tr.	0,3
Galactose	29,5	10,2	7,3
Glucose	4,9	5,3	1,5
Protéines	5,5	4,4	11,8

d'autre part en des populations de faible masse moléculaire constituées d'oligomères d'acide galacturonique (mono-, di-, et trimère). On observe un comportement similaire après action de l'endopectine-lyase. Ces résultats s'interprètent par l'existence de zones homogalacturoniques «lisses» dégradées par les enzymes et de zones de chaînes latérales d'oses neutres «hérissées» résistantes à l'attaque enzymatique.

Les zones «hérissées» des PSEa (ZH-PSE) et des PSHa (ZH-PSH) ont été isolées et leur composition chimique déterminée (Tableau IV). Les ZH-PSE, comme les ZH-PSH rassemblent 80 p. 100 des oses neutres contenues dans les pectines initiales, avec une composition molaire équivalente à ces dernières. Les rapports oses neutres/acides des ZH-PSE et des ZH-PSH sont très différents; de plus, un degré de polymérisation des chaînes latérales de 10 dans les ZH-PSE et de 2 dans les ZH-PSH peut être calculé, en admettant qu'elles sont exclusivement fixées sur le rhamnose du squelette rhamnogalacturonique. Ces différences se reflètent en chromatographie d'échanges d'ions ou les ZH-PSE sont séparées en trois populations (figure 9), tandis que les ZH-PSH sont globalement chromatographiées en un pic unique. Ces résultats indiquent des différences structurales qui sont schématisées en première approximation figure 10.

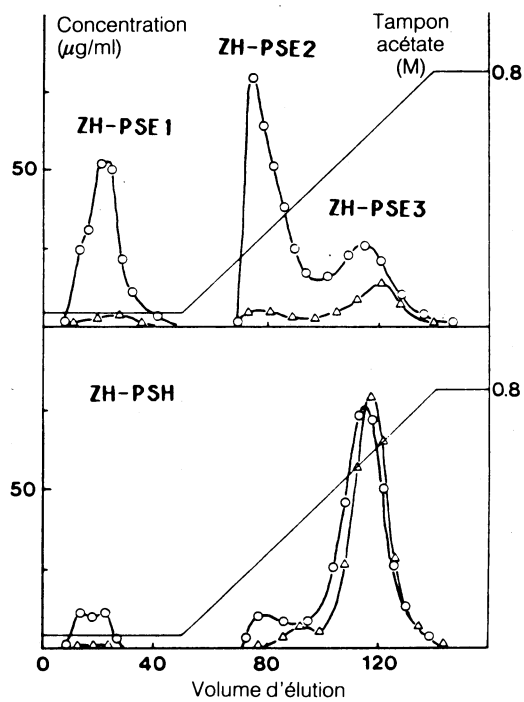


Fig. 9. — Chromatographie d'interaction ionique sur DEAE-Sephacel des zones «hérissées».

△ acide galacturonique (m-phénylphénol)
○ oses neutres (orcinol)

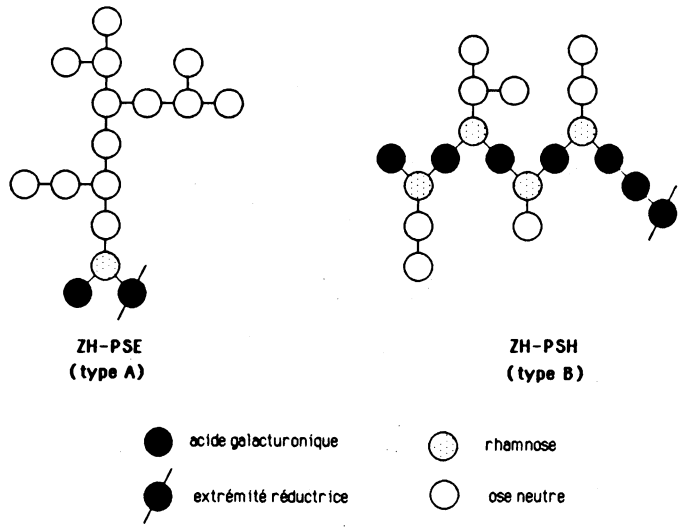


Fig. 10. — Structure présumée des zones «hérissées» des substances pectiques acides.

TABLEAU V

Extraction des substances pectiques insolubles par HCl ou l'endopectine-lyase.

	HCl	Endopectine-lyase
Rendement (% en poids d'oses solubilisés à partir du matériel insoluble par l'alcool)	11,4	9,4
Acide galacturonique Oses neutres (% en poids des oses totaux dans l'extrait)	75 25	61 39
Acide galacturonique dans le résidu (% en poids)	2,1	3,8

2°) *Action de l'endopectine-lyase sur le matériel insoluble à l'alcool*

L'extraction des substances pectiques insolubles par l'action de l'HCl entraîne une hydrolyse partielle de certains polyosides (arabinanes); par contre l'utilisation de l'endopectine-lyase sur le matériel insoluble à l'alcool (débarrassé des formes solubles) permet de préserver la structure des polyosides neutres. Comparativement à l'action de l'acide, l'enzyme libère moins d'acides uroniques du matériel insoluble à l'alcool ce qui se reflète au niveau de la teneur en acide uronique du résidu d'extraction (Tableau V). En revanche une quantité plus importante de polyosides neutres est solubilisée.

Tout comme après l'action des enzymes pectolytiques sur les pectines purifiées,on observe que les produits de dégradation sont séparés en une population de forte masse moléculaire riche en oses neutres exclue du Sephadex G100, tandis que des oligomères d'acide galacturonique sont observés au volume total. Les zones «hérissées» obtenues par l'endopectine-lyase à partir du matériel insoluble à l'alcool (ZH-MIA) ont donc été isolées (Vo du Sephadex G100) et leur composition chimique a été déterminée (Tableau IV).

IV — ÉTUDE STRUCTURALE PAR VOIE CHIMIQUE ET PHYSIQUE

1°) *Méthylation des substances pectiques de pulpe de raisin*

Après méthylation, hydrolyse et dérivation, les substances pectiques du raisin donnent naissance à 24 acétates d'alditol partiellement méthylés qui sont séparés sur des colonnes capillaires d'OV-1 et d'OV-225. Le bon accord obtenu entre la composition en oses neutres déterminée en sommant les éthers méthyliques issus du même sucre et celle obtenue par l'analyse directe ainsi que les rapports unités terminales/substituées voisins de l'unité attestent une réaction de méthylation complète.

Les résultats de méthylation des PSEn, PSEa, PSHa et ZH-MIA sont présentés dans le tableau VI. Dans les conditions de dérivation utilisées les acides uroniques ne sont pas rendus volatils, les résultats obtenus avec les ZH-PSE et ZH-PSH sont donc identiques à ceux des pectines initiales qui sont présentés ici.

Malgré l'extrême complexité des motifs structuraux présents dans les substances pectiques du raisin, il se dégage une certaine homogénéité par famille de composés et l'on peut regrouper d'une part les PSEn et PSEa, et d'autre part les PSHa et les ZH-MIA. En effet dans les PSE prédomine une structure d'arabinogalactane de type II, avec les éthers méthyliques du galactose lié en (1 → 3) et (1 → 6) et la présence de l'arabinose sous forme terminale. On détecte également dans les PSEa des motifs structuraux, absents dans les PSEn, typiques des rhamnogalacturonanes avec du rhamnose lié en (1 → 2) et en (1 → 3,4). Les PSHa et ZH-MIA sont caractérisés par les structures de type arabinanes [(arabinose lié en (1 → 3) et (1 → 3,5)] et rhamnogalacturonanes, tandis que les structures de type arabinogalactanes sont minoritaires et réparties entre les types I et II.

La méthylation des ZH-PSE fractionnées sur DEAE-Sephacel met bien en relief les différences structurales pressenties entre les différentes populations éluées, avec pour les ZH-PSE1 et ZH-PSE2 une structure d'arabinogalactane de type II très proche des PSEn, alors que les ZH-PSE3 sont très voisines des ZH-PSH et ZH-MIA (Tableau VI).

2°) *Résonance magnétique nucléaire du ^{13}C*

Nous illustrons ici la puissance de cette méthode en présentant le spectre des ZH-PSE avant et après dégradation par une arabinosidase (figure 11), mettant en évidence la disparition des résonances dues à l'arabinose et l'apparition à 73,7 ppm d'un signal qui peut être attribué sans ambiguïté au C3 libre du galactose. Ce résultat per-

TABLEAU VI

Méthylation des substances pectiques du raisin.

Les chiffres représentent le % molaire;
entre parenthèses le % molaire est déterminé par analyse directe.

	PSEn	PSEa	PSHa	ZH-MIA	ZH-PSE1	ZH-PSE2	ZH-PSE3
Éther méthylique							
234 Rha	0,4	3	2,1	1,3	0,3	0,8	1,4
34 Rha	—	5,2	22,1	9,9	0,8	0,4	16
3 Rha	—	1,1	6,7	4,2	0,2	tr.	4,6
Rha	—	0,6	1,3	0,3	tr.	tr.	0,3
Total	0,4 (0,5)*	9,9 (10,4)	32,2 (34,7)	15,7 (21,1)	1,3 (1,6)	1,2 (1,6)	22,3 (16,2)
234 Fuc	0,5 (0,6)	1,3	1,3	0,6	0,2	0,2	0,7
235 Ara	26	28	16,2	16,5	30,9	30	14,4
25 Ara	0,5	0,6	1,8	1,7	0,6	0,7	0,8
35 Ara	0,5	0,9	2,6	—	—	—	0,2
23 Ara	3	8,9	11,5	31,8	1,6	3,9	25,7
2 Ara	1	1,8	5,4	11,8	0,3	0,3	6,8
Ara	—	0,8	0,4	0,8	—	—	0,3
Total	31 (35,6)	41 (40,5)	37,9 (38)	62,6 (59,7)	33,4 (30,9)	34,0 (51,6)	48,2 (54,3)
234 Xyl	0,8	1,7	2,2	0,6	0,4	0,8	0,6
23 Xyl	0,6	3,9	—	—	—	—	3,8
Total	1,4 (1,8)	5,6 (8,1)	2,2 (2)	0,6 (1,3)	0,4	0,8 (1,6)	4,4 (4,2)
2346	4,7	4,1	6,4	4,5	3,8	3,6	2,6
246 Gal	15	6,8	3	1,8	13,4	9,8	3,9
234 Gal	4,1	3,4	1,7	0,6	4,6	2,5	1,2
236 Gal	2,6	0,5	2,7	3,3	0,5	0,4	1,8
26 Gal	2,4	2,1	2	2	2,3	4,5	2
23 Gal	—	0,9	0,5	—	0,7	0,8	—
24 Gal	27,5	17,5	6	2	28,8	25,7	8,3
2 Gal	5,5	5,5	1	1,8	6,8	15,5	2
Total	61,8 (53,7)	40,8 (39)	23,3 (22)	16 (12,6)	60,9 (60,6)	62,8 (43,8)	21,8 (20,1)
2346 Gic	0,4	1,4	1	2,1	1,6	0,3	0,9
236 Gic	3,6	—	1,1	0,4	1,4	0,4	1,7
234 Gic	0,5	—	1	2	0,8	0,3	—
Total	4,5 (7,7)	1,4 (1,9)	3,1 (3,3)	4,5 (5,3)	3,8 (6,9)	1 (1,2)	2,6 (5,2)
rapport terminal / branché	0,8	1,1	1,1	1	0,8	0,6	0,7

234 Rha = 2,3,4-tri-O-methyl-1-O-acetyl rhamnitol

met de confirmer que l'arabinose est essentiellement branché au niveau du C3 de galactose lié en (1 → 6) dans les arabinogalactanes de type II des fractions solubles à l'eau (PSE).

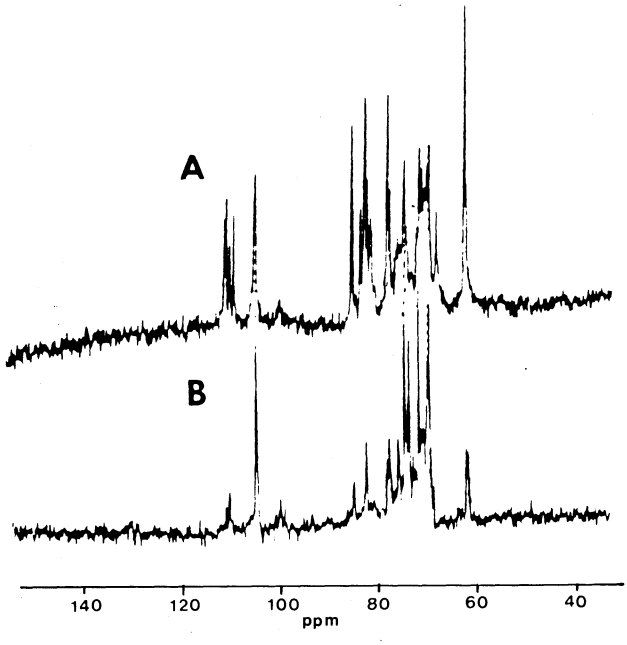


Fig. 11. — Spectre en résonance magnétique nucléaire du ^{13}C (25,18 MHz) des zones «hérissées» des PSEa.

A) Natives B) Dégradées par l'arabinosidase

CONCLUSIONS

Les substances pectiques de la pulpe de raisin sont donc constituées principalement de fractions solubles à l'eau (PSE) et insolubles qui peuvent être extraites par l'action de l'acide (PSH) ou d'enzymes pectolytiques (ZH-MIA). Leur structure est complexe, et diffère de celle des pectines d'autres fruits (pommes, cerises, citrons).

Les fractions neutres solubles à l'eau (PSEn) sont typiquement des arabinogalactanes-protéines, molécules très ramifiées. Les fractions acides solubles à l'eau (figure 12 PSEa) sont caractérisées par la présence de zones homogalacturoniques «lisses» et de zones «hérissées» où sont concentrées les chaînes latérales d'oses neutres de type A (structure d'arabinogalactane de type II proche des PSEn) ou de type B (structure voisine des zones hérissées des PSH).

Les fractions solubilisées par l'acide sont également constituées d'alternance de zones «lisses» et «hérissées», mais à la différence des PSEa, il n'existe qu'un seul type de chaînes latérales (type B, figure 12) où les structures de type arabinane sont prédominantes. Le matériel solubilisé par l'endopectine-lyase (ZH-MIA) a une structure équivalente aux ZH-PSH confirmant bien le caractère d'arabinane et de rhamnogalacturonane des fractions insolubles.

On considère généralement (KNEE et BARTLEY, 1981) que les pectines solubles dérivent de la lamelle moyenne des fruits, et que leur augmentation au cours de la maturation est liée à une solubilisation progressive des formes insolubles de la paroi primaire. L'existence de structures similaires au niveau des chaînes latérales dans les PSEa et PSHa semble confirmer cette hypothèse. A cet égard, l'état de maturité influe sur la composition et la quantité des polyosides pectiques solubles du raisin (MOURGUES, 1983).

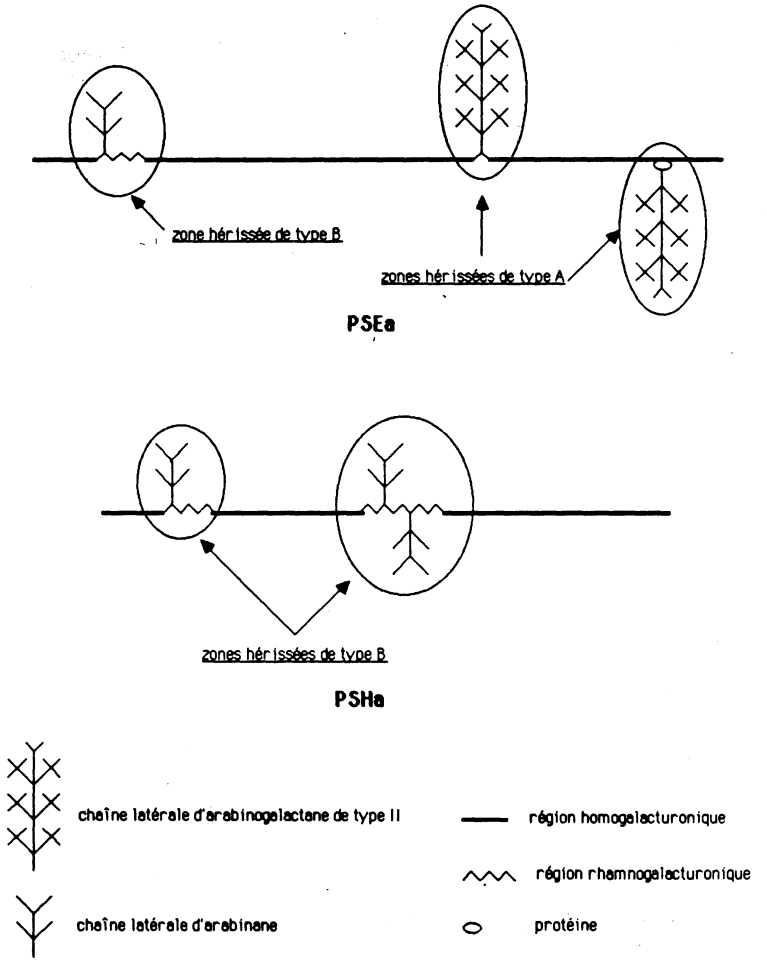


Fig. 12. — Structure possible pour les substances pectiques acides de la pulpe de raisin.

Les fractions solubles à l'eau (PSE) du matériel insoluble à l'alcool de la pulpe sont vraisemblablement proches des polyosides pectiques solubilisés dans les moûts pendant le pressurage du raisin. Toutefois les enzymes pectolytiques endogènes (pecti-

nestérase et endopolygalacturonase) vont pouvoir dégrader très rapidement les fractions acides, d'où la présence dans les moûts de zones hérissées résiduelles et d'arabinogalactane-protéines (VILLETTAZ et AMADO, 1981; BRILLOUET, 1987).

Au cours de l'élaboration des vins, pendant les phases de macération, les formes insolubles des polyosides pectiques vont être extraites à partir des parois de la pulpe et de la pellicule; cette solubilisation va toutefois dépendre du procédé utilisé, ainsi la macération carbonique conduit à une augmentation de la proportion d'arabinanes et de rhamnogalacturonanes dans les vins par rapport à une vinification classique ou une thermovinification.

La quantité de polyosides cédée par les pellicules est difficile à préciser mais augmente avec la dilacération de celles-ci (MOURGUES, 1979); en tout état de cause les polyosides pectiques de la pellicule présentent vraisemblablement les mêmes structures que ceux de la pulpe, des variations de leurs proportions respectives n'étant pas à exclure.

Ce travail a permis de mieux connaître la structure des substances pectiques du raisin. Un important travail de caractérisation reste cependant à accomplir, au niveau des liaisons protéines-polyosides mais aussi des propriétés physico-chimiques de ces molécules, avant de préciser leur rôle dans les vins.

Manuscrit reçu le 28 mars 1988; accepté pour publication le 27 avril 1988.

RÉSUMÉ

Après une mise au point rapide sur les connaissances actuelles des polyosides pectiques dans les végétaux, les résultats acquis sur la structure des substances pectiques de la pulpe de raisin sont exposés, avec un rappel de la méthodologie utilisée.

Un matériel insoluble à l'alcool (MIA) a été préparé à partir de pulpe de raisin. Quatre fractions pectiques en ont été isolées après traitements successifs par l'eau (25° C; PSE), l'oxalate (25° C; PSOX, l'acide (HCl 0.05M, 80° C; PSH) et la soude (0,05M, 4° C; PSOH). Les PSE (35 p. 100) et PSH (55 p. 100) représentent l'essentiel du matériel pectique extrait.

Les PSE sont séparées par chromatographie d'échange d'ions en fractions neutre (PSEn ~13 p. 100) et acide (PSEa ~87 p. 100). Les PSEa et les PSH sont constituées principalement d'acide galacturonique (PSEa 63 p. 100, PSH 53 p. 100), fortement estérifié par du méthanol (degré d'estérification : PSEa 77 p. 100, PSH 68 p. 100), tandis que des quantités faibles d'acide glucuronique sont détectées dans les PSEn (2 p. 100). Les oses neutres (PSEn 65 p. 100, PSEa 28 p. 100, PSH 19 p. 100) sont principalement de l'arabinose et du galactose suivis dans un ordre décroissant du rhamnose, glucose, xylose, mannose et fucose. Des protéines sont également détectées en association avec les polyosides.

L'action d'une endopolygalacturonase et d'une endopectine-lyase sur PSEa et PSH met en évidence des zones «lisses» homogalacturoniques dégradées par les enzymes et des zones «hérissées» rhamnogalacturoniques riches en chaînes latérales d'oses neutres, insensibles à l'attaque enzymatique. Le traitement du MIA par une endopectine-lyase solubilise un matériel pectique (ZH-MIA) riche en oses neutres (56 p. 100) particulièrement en arabinose, et contenant de l'acide galacturonique (23 p. 100) et des protéines (11 p. 100).

La perméthylation associée à l'hydrolyse spécifique de l'arabinose par une α-L-arabinofuranosidase et à la RMN du ^{13}C a permis d'établir la structure des chaînes latérales. Des

(1 → 3) / (1 → 6) arabinogalactanes, où l'arabinose est essentiellement sous forme terminale non réductrice, dominent dans les ZH-PSE, tout comme dans les PSEn confirmant leur caractère d'arabinogalactane-protéine. En revanche ces structures ainsi que les (1 → 4) arabinogalactanes sont minoritaires dans les ZH-PSH et ZH-MIA où les structures de type (1 → 5) arabinanes et rhamnogalacturonanes sont prédominants.

SUMMARY

After a brief review of available knowledges on plant pectic polysaccharides, structural data on pectic substances from the pulp or grape berries and related analytical techniques are reported.

An alcohol insoluble residue (MIA) was prepared from pulp of grape berries, which was sequentially extracted with water (25° C), oxalate (25° C), acid (0,05N HCl, 80° C) and sodium hydroxide (0,05N 4° C) yielding four pectic fractions, respectively, PSE, PSOX, PSH and PSOH. PSE (35 p. 100) and PSH (55 p. 100) represented the main part of extracted pectic material.

PSE were fractionated by ion-exchange chromatography into neutral (PSEn ~13 p. 100) and acidic (PSEa ~87 p. 100) fractions. PSEa and PSH were constituted mainly of galacturonic acid (PSEa 63 p. 100, PSH 53 p. 100) highly methylesterified (esterification degree : PSEa 77 p. 100, PSH 68 p. 100), whereas PSEn contained minute amounts of glucuronic acid (2 p. 100). Neutral sugars (PSEn 65 p. 100, PSEa 28 p. 100, PSH 19 p. 100) were mainly arabinose and galactose followed by decreasing amounts of rhamnose, xylose, glucose, mannose and fucose. Proteins were also detected along with the polysaccharides.

Degradation of PSEa and PSH by endopolygalacturonase and endopectin-lyase evidenced «smooth» homogalacturonic areas sensitive to enzymatic degradation and «hairy» rhamnogalacturonic zones highly substituted by neutral sugar side-chains and resistant to enzyme action. Treatment of MIA with endopectinlyase released pectic material (ZH-MIA) rich in neutral sugars (56 p. 100), especially arabinose, and containing galacturonic acid (23 p. 100) and proteins (11 p. 100).

Structure of neutral sugar side-chains was investigated using methylation analysis associated with specific hydrolysis of arabinose residues with an α-L-arabinofuranosidase, and ^{13}C NMR spectroscopy. ZH-PSE exhibited a structure of 3,6 -linked arabinogalactan substitued by monomeric terminal arabinose. Similar structures were detected in PSEn which relates them to arabino-3,6-galactan-proteins. Conversely PSH or ZH-MIA showed mainly arabinan-like and rhamnogalacturonan structures associated with minor proportions of 3,6- and 4-linked arabinogalactans.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALBERSHEIM P., NEVINS D.J., ENGLISH P.D. et KARR A., 1967. A method for analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.*, **5,** N° 2, 340-345.

BARBIER M. et THIBAULT J.-F., 1982. Pectic substances of cherry fruits. *Phytochemistry,* **21,** N° 1, 111-115.

BJÖRNDALL H., HELLERQVIST C.G., LINDBERG B. et SVENSSON S., 1970. Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides. *Angew. Chem. Internat. Edit.,* **9,** N° 8, 610-619.

BRILLOUET J.-M., MOULIN J.-C. et AGOSIN E., 1985. Production, purification and properties of an α-L-arabinofuranosidase from *Dichomitus squalens*. *Carbohydr. Res.*, **144,** N° 1, 113-126.

BRILLOUET J.-M., 1987. A study of pectic polysaccharides in musts from various mature grape grown in the Pech Rouge Experimental vineyeards. *Biochimie,* **69,** N° 6-7, 713-721.

DUBOURDIEU D., 1982. Recherches sur les polysaccharides secrétés par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin. *Thèse de Doctorat d'État, Université de Bordeaux II (France).*

FINCHER G.B., STONE B.A. et CLARKE A.E., 1983. Arabinogalactan-proteins : structure, biosynthesis and function. *Ann. Rev. Plant Physiol.,* **34,** 47-70.

HAKOMORI S.-I., 1964. A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharides catalysed by methyl sulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxyde. *J. Biochem.,* **55,** N° 2, 205-208.

KNEE M. et BARTLEY I.M., 1981. Composition and metabolism of cell wall polysaccharides in ripening fruits dans *Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetable,* J. Friend et M.J.C. Rhodes Eds., Academic Press, Londres et New-York, pp. 113-148.

LABAVITCH J.M., 1981. Cell wall turnover in plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol.,* **32,** 385-406.

LLAUBERES R.-M., DUBOURDIEU D. et VILLETTAZ J.C., 1987. Exocellular polysaccharides from *Saccharomyces* in wine. *J. Sci. Food Agric.,* **41,** N° 3, 277-286.

Mc NEIL M., DARVILL A.G., FRY S.C. et ALBERSHEIM P., 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Ann. Rev. Biochem.,* **53,** 625-663.

MARTEAU G., 1978. Maîtrise des activités enzymatiques au cours des phénomènes préfermentaires. *Ann. Technol. Agric.,* **27,** N° 1, 161-171.

MOURGUES J., 1979. Mise au point : polyosides des baies de raisin. *Ann. Technol. Agric.,* **28,** N° 1, 121-149.

MOURGUES J., 1983. Les substances pectiques et les polyosides neutres non cellulosiques des raisins, des moûts concentrés, des vins rouges jeunes et des marcs. *Thèse de Docteur-Ingénieur, Université Paul-Sabatier, Toulouse (France).*

PEYNAUD E., 1951. Sur les matières pectiques des fruits. *Industr. Agric. Alim.,* 609-615.

POTTY V.H., 1969. Determination of proteins in the presence of phenols and pectins, Anal. Biochem., **29,** N° 3, 535-539.

ROMBOUTS F.M. et THIBAULT J.-F., 1986. Feruloyated pectic substances from sugar beet pulp. *Carbohydr. Res.,* **154,** 177-187.

ROUAU X. et THIBAULT J.-F., 1984. Apple juice pectic substances. *Carbohydr. polym.*, **4,** N° 2, 111-125.

SAULNIER L., 1987. Étude structurale des substances pectiques de la pulpe de raisin (Carignan rouge). *Thèse de l'Université Paul Sabatier,* Toulouse (France).

SAULNIER L. et THIBAULT J.-F., 1987a. Extraction and characterization of pectic substances from pulp of grape berries. *Carbohydr. Polym.*, **7,** N° 5, 329-343.

SAULNIER L. et THIBAULT J.-F., 1987b. Enzymatic degradation od isolated pectic substances and cell wall from pulp of grape berries. *Carbohydr.*, **7,** N° 5, 345-360.

SAULNIER L., BRILLOUET J.-M. et JOSELEAU J.-P., 1988. Structural studies on pectic substances from the pulp of grape berries. *Carbohydr. Res.,* sous presse.

SELVENDRAN R.R., 1975. Analysis of cell wall material from plant tissues, extraction and purification. *Phytochemistry,* **14,** N° 5, 1011-1017.

THIBAULT J.-F. et MERCIER C., 1979. *Aspergillus niger* Endopolygalacturonase II. Characterization and some properties. *J. Food Biochem.*, **2,** N° 4, 379-393.

THIBAULT J.-F. 1979. Automatisation du dosage des substances pectiques par la méthode au méta-hydroxydiphényl. *Lebens.-Wiss. u. Technol.,* **12,** N° 5, 247-251.

USSEGLIO-TOMASSET L., 1978. Acquisitions récentes sur les phénomènes colloï daux dans les moûts et les vins. *Ann. Technol. Agric.*, **27,** N° 1, 261-274.

VAN HOUDENOVEN F.E.A., 1975. Studies on pectin-lyase. *Thesis of the Agricultural University of Wageningen,* (Pays-Bas).

VILLETTAZ J.-C., AMADO R., NEUKOM H., HORISBERGER M. et HORMAN I., 1980. Comparative structural studies of the D-mannans from a rosé wine and *Saccharomyces uvarum. Carbohydr. Res.,* **81,** N° 2, 341-344.

VILLETTAZ J.-C., AMADO R. et NEUKOM H., 1981. Structural investigations of an arabinan from grape juice. *Carbohydr. Polym.,* **1,** N° 2, 101-105.

VILLETTAZ J.-C. et AMADO R., 1981. Untersuchung der löslichen neutral Polysaccharidfraktion von Traubensaft und Wein. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.,* **14,** N° 4, 176-181.

VILLETTAZ J.-C., 1988. Les colloïdes du moût et du vin. *Revue Française d'OEnologie,* N° 111, 23-27.

WOOD P.J. et SIDDIQUI I.R., 1971. Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester conten and pectin methyl esterase activity. *Anal. Biochem.,* **39,** N° 2, 418-428.