RECHERCHES SUR LA STRUCTURE ET LES PROPRIETES DES COMPOSES PHENOLIQUES POLYMERISES DES VINS ROUGES

II. — Précipitation et extraction en présence de sels minéraux. Action des protéines.

Y. GLORIES
Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération, 33405 Talence (France)

INTRODUCTION

Dans une précédente publication (GLORIES, 1974), nous avons montré la réactivité des molécules de flavanes vis-à-vis de l'aldéhyde formique et leur instabilité en milieu acide chlorhydrique très concentré. Dans ce nouveau travail, nous étudions la contribution des sels minéraux et des protéines, au fractionnement et à la connaissance de la structure des tanins condensés.

Les tanins du vin sont un mélange d'oligomères de flavanes ou flavolanes, possédant un encombrement stérique important, sans être de véritables macromolécules. Par analogie avec d'autres grosses molécules nous pouvons considérer que la solubilité de ces flavolanes en solution aqueuse, dépend entre autre de la concentration ionique de la solution. On peut espérer ainsi provoquer la précipitation de certaines de ces molécules et par conséquent effectuer un fractionnement par l'augmentation ou la diminution de cette concentration.

Le sel généralement mis en œuvre pour augmenter la force ionique est le sulfate d'ammonium en raison de sa grande solubilité en solution aqueuse. MASQUELIER et **al.** (1959) ont fait appel à cette technique pour éliminer les composés phénoliques les plus condensés des extraits végétaux et du vin avant d'extraire par l'acétate d'éthyle les formes peu polymérisées ; ces auteurs utilisent dans ce cas le chlorure de sodium.

On pouvait espérer que l'étude comparative de l'effet des deux sels sur différents vins, permettrait une précipitation sélective de flavolanes, fonction de l'encombrement moléculaire donc du degré de polymérisation.

D'autre part, la saturation en sels d'une solution hydroalcoolique, provoque dans certaines conditions, la démixtion de l'alcool qui a, vis-à-vis des composés phénoliques, un grand pouvoir solvant. Une extraction et une purification de l'ensemble des composés phénoliques permettant une étude ultérieure de leur structure, paraissent donc possibles.

Enfin par définition, les tanins sont des molécules de nature phénolique capables de former des liaisons stables avec les protéines. Il est donc intéressant d'étudier, parmi les composés phénoliques polymérisés du vin rouge, les molécules réagissant avec les protéines en général et celles utilisées en œnologie comme colles, en particulier.

Ces techniques étaient donc susceptibles d'apporter une contribution au problème que nous étudions.

I. — PRECIPITATION DES COMPOSES PHENOLIQUES EN PRESENCE DE SELS MINERAUX.

1) Influence de l'alcool sur la précipitation.

MASQUELIER et **al.** (1959) considèrent que les polymères de leucocyanidine sont insolubles en solutions aqueuses saturées de NaCl. Cette technique a été utilisée pour isoler les leucoanthocyanes de l'arachide, du pin maritime, de la vigne et du vin. Ces auteurs précisent que la précipitation des polymères exige l'absence totale d'alcool dans le milieu. Dans le cas du vin, cette condition méritait d'être vérifiée.

Conditions opératoires.

Afin de ne pas trop modifier les équilibres chimiques existant dans le vin entre les composés phénoliques, la désalcoolisation a été conduite en diluant le vin au demi et en évaporant cette solution jusqu'au volume initial ; l'élimination de l'alcool nécessite deux opérations successives.

Suivant le taux de saturation désiré (tableau II) la quantité de sel correspondante est ajoutée à 50 ml de vin. Ce dernier est agité jusqu'à dissolution complète et placé au repos pendant 24 heures ; toutes ces opérations sont effectuées au bain-marie à 25 °C. Le précipité est séparé du surnageant par centrifugation et les composés phénoliques sont extraits du culot de centrifugation par quelques millilitres de méthanol à 0,1 p. 100 d'acide chlorhydrique.

Le volume des composés phénoliques précipités est ramené au volume de départ à l'aide d'une solution modèle de vin contenant 10 p. 100 d'éthanol et 5 g par litre d'acide tartrique neutralisé au tiers.

Les dosages suivants ont été effectués sur cette solution, préférentiellement au vin résiduel, qu'il aurait fallu au préalable désalifier :

— détermination de l'indice de phénols totaux par la mesure de la densité optique à 280 nm (RIBÉREAU-GAYON, 1970).

— dosage des anthocyanes par la méthode utilisant l'anhydride sulfureux (RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET, 1966).

— détermination des caractéristiques chromatiques (SUDRAUD, 1958).

Résultats.

La saturation par les deux sels a été réalisée sur un vin jeune de presse alcoolisé et désalcoolisé ; ce vin est particulièrement riche en composés phénoliques.

TABLEAU I

Précipitation des composés phénoliques après saturation d'un vin de presse par deux sels en présence (+) et en l'absence (—) d'alcool

	Phénols totaux		Tanins		Anthocyanes	
	Indice	Pourcentage précipité	g par l	Pourcentage précipité	mg par l	Pourcentage précipité
Teneur initiale dans le vin témoin	107		7,32		580	
Quantité précipitée						
Saturation par NaCl						
Alcool (+)	2	2	0,16	2	30	5
Alcool (—)	48	45	2,68	37	243	42
Saturation par $(NH_4)_2SO_4$						
Alcool (+)	10	9	0,84	11	34	6
Alcool (—)	21	20	1,66	23	138	24

Nous constatons (tableau I) que l'action d'un sel dépend de la richesse alcoolique du milieu réactionnel. Le chlorure de sodium est le plus

sensible à la présence d'alcool ce qui confirme les résultats de MASQUELIER et **al.** (1959) ; cette opération est donc indispensable à la reproductibilité de la méthode.

Les deux sels placés dans les mêmes conditions ne provoquent pas les mêmes précipitations. Bien qu'ils soient tous les deux issus de base forte et d'acide fort, les pH de leur solution sont différents ; la solution saturée en NaCl possède un pH de 6,6 tandis que celle saturée par $(NH_4)_2 SO_4$, a un pH de 5,1 (SINGLETON, 1961). Cette différence contribue probablement à expliquer la précipitation plus importante avec NaCl.

Les précipités provoqués par les deux sels ne sont pas uniquement constitués par les tanins condensés mais également par les anthocyanes qui sont de plus petites molécules ; les pourcentages de précipitation par rapport au vin de départ, sont du même ordre pour ces deux polyphénols. Comme dans le cas de l'aldéhyde formique (GLORIES, 1974), deux hypothèses peuvent expliquer ce fait.

— les anthocyanes ne sont plus solubles dans un milieu saturé en sels.

— les anthocyanes sont liées aux tanins et précipitent avec eux.

Donc la présence d'alcool dans un milieu saturé en sels diminue la précipitation des composés phénoliques ; la désalcoolisation du vin devra toujours être la première opération à réaliser quel que soit le sel utilisé.

TABLEAU II

Quantité de sel ajouté pour obtenir différents degrés de saturation du milieu.

Pourcentage de saturation en sel du milieu	Poids de sel ajouté g pour 50 ml		Molarité de la solution	
	NaCl	$(NH_4)_2SO_4$	NaCl	$(NH_4)_2SO_4$
25 p. 100	4,4	7,2	1,5	1,1
50 p. 100	8,9	15,7	3,0	3,4
75 p. 100	13,3	25,8	4,5	3,9
100 p. 100	17,8	38,1	6,1	5,8

Nous avons ajouté à deux vins jeunes désalcoolisés des quantités croissantes de sels (Tableau II) correspondant chaque fois à un certain pourcentage de saturation du milieu (nous considérons le pouvoir de solubilité du vin désalcoolisé égal à celui de l'eau pure).

TABLEAU III

Précipitation des composés phénoliques d'un vin de presse jeune désalcoolisé après addition de différentes quantités de sels.

		Phénols totaux précipités		Tanins précipités		Anthocyanes précipitées	
		Indice	Pourcentage	g par l	Pourcentage	mg par l	Pourcentage
Teneur intiale dans le vin témoin		107		7,32		580	
Quantité précipitée par	NaCl avec 25 p. 100 de saturation en sel	9	8	0,12	2	58	10
	NaCl avec 50 p. 100 de satutration en sel	22	20	1,72	23	126	22
	NaCl avec 75 p. 100 de saturation en sel	32	30	2,36	32	222	38
	NaCl avec 100 p. 100 de saturation en sel	48	45	2,68	37	243	42
	$(NH_4)_2 SO_4$ avec 25 p. 100 de saturation en sel	0	0	0,18	2	8	1
	$(NH_4)_2 SO_4$ avec 50 p. 100 de satutration en sel	4	4	0,22	3	26	4
	$(NH_4)_2 SO_4$ avec 75 p. 100 de saturation en sel	17	16	1,15	16	80	14
	$(NH_4)_2 SO_4$ avec 100 p. 100 de saturation en sel	21	20	1,66	23	138	24

TABLEAU IV

Précipitation des composés phénoliques d'un vin de goutte jeune désalcoolisé après addition de différentes quantités de sels.

		Phénols totaux		Tanins précipités		Anthocyanes précipitées	
		Indice	Pourcentage	g par l	Pourcentage	mg par l	Pourcentage
Teneur intiale dans le vin témoin		32		2,24		220	
Quantité précipitée par	NaCl avec 25 p. 100 de saturation en sel	3	9	0	0	0	0
	NaCl avec 50 p. 100 de satutration en sel	6	19	0	0	10	4
	NaCl avec 75 p. 100 de saturation en sel	8	25	0,54	24	18	8
	NaCl avec 100 p. 100 de saturation en sel	9	28	0,80	36	34	15
	$(NH_4)_2 SO_4$ avec 25 p. 100 de saturation en sel	3	9	0	0	0	0
	$(NH_4)_2 SO_4$ avec 50 p. 100 de satutration en sel	4	12	0	0	0	0
	$(NH_4)_2 SO_4$ avec 75 p. 100 de saturation en sel	7	22	0,32	14	20	9
	$(NH_4)_2 SO_4$ avec 100 p. 100 de saturation en sel	8	25	0,54	24	44	20

2) **Influence de la nature et de la quantité de sels.**

En se basant sur l'hypothèse de l'insolubilité des grosses molécules dans un milieu de force ionique élevée, on peut espérer que l'addition croissante de sels provoquera une précipitation de molécules de grosseur décroissante.

Nous constatons (Tableaux III et IV) la même différence que précédemment entre les deux sels. Le sulfate d'ammonium provoque moins de précipitation que le chlorure de sodium à concentration égale et quelle que soit cette concentration. Même en tenant compte des différences de molarités (Tableau II), la précipitation est plus faible avec le sulfate d'ammonium. Cette différence de comportement des deux sels peut donc être attribuée à leur nature ; comme nous l'avons vu, le pH de leur solution est sans doute un facteur déterminant.

La précipitation des anthocyanes par NaCl est inférieure à celle des tanins dans le cas du vin de goutte, elle est identique et même supérieure dans le cas de vin de presse. Or, nous savons que ce dernier vin est plus riche en composés phénoliques polymérisés (GLORIES, 1971) ; on montre en outre que la fraction des anthocyanes liées à d'autres molécules phénoliques (JURD et WAISS, 1965, SOMERS, 1971) est plus importante dans le cas du vin de presse.

Mais, en fonction des quantités croissantes de sels nous ne constatons pas de fractionnement défini ; plus la quantité de sel ajouté augmente, plus la précipitation est importante. En effet, on aurait pu espérer avoir un palier correspondant à la précipitation d'un type de molécules particulier, bien défini.

Cependant, il était intéressant de voir si la précipitation des phénols totaux, pour une quantité donnée de sel, était la même ou variait avec des vins présentant des caractéristiques différentes ; en outre, la nature des molécules qui précipitent était également un point important à étudier. Ces questions sont envisagées dans les paragraphes suivants.

3) **Composition des précipités et des surnageants.**

Nous avons repris, sur deux vins jeunes, l'expérience précédente comportant le dosage des composés phénoliques précipités en présence de sels. En outre, une fraction aliquote des surnageants et des solutions obtenues après redissolution des précipités, est évaporée et reprise par

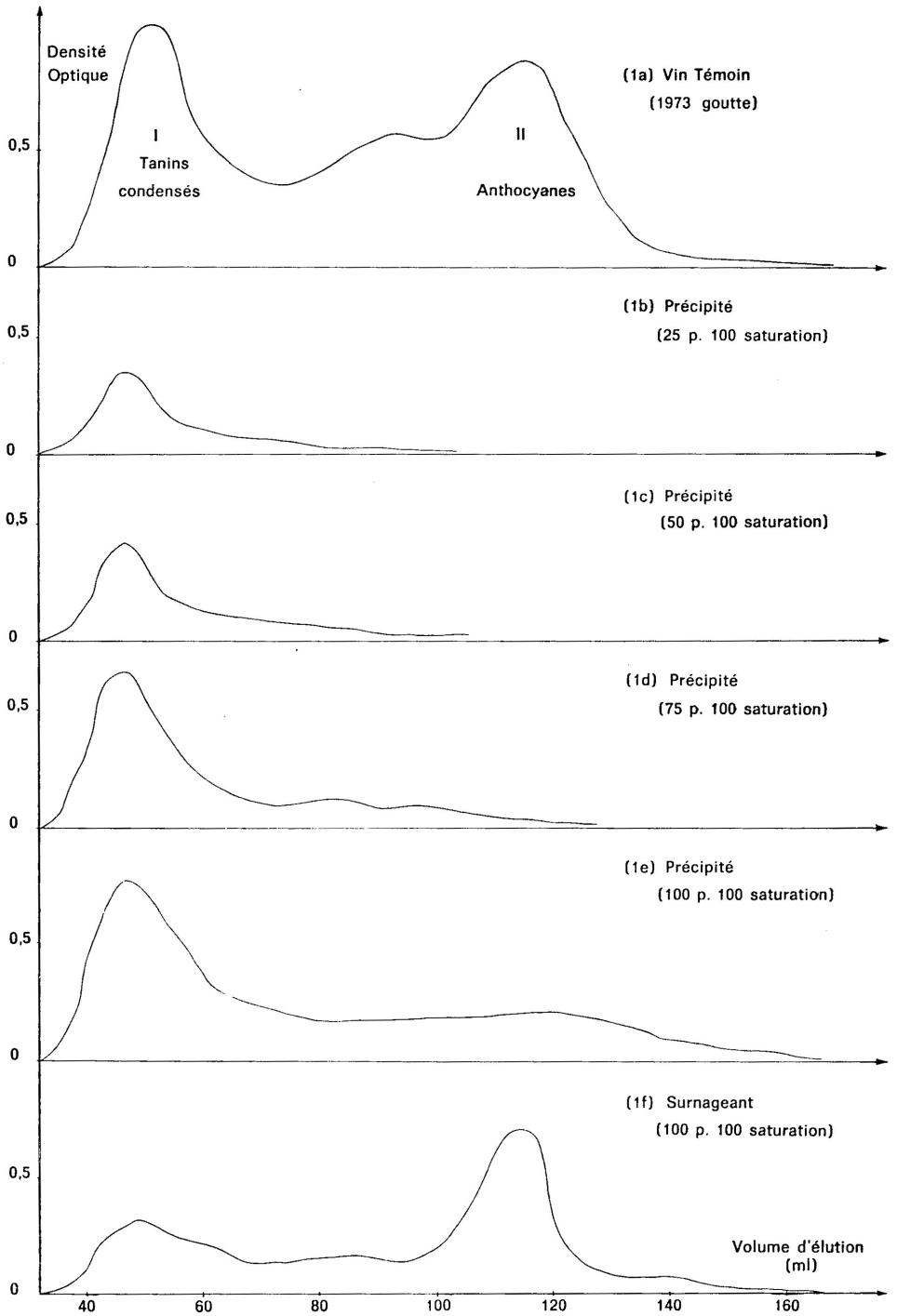


Fig. 1. — Courbes d'élution du vin, des précipités et surnageants (d.o. 520 nm), après addition de $(NH_4)_2\ SO_4$ (Sephadex G25 $_F$ Colonne 2,5 x 45 cm).

du méthanol à 0,1 p. 100 HCl, afin d'éliminer la majorité des sels. Les extraits ainsi obtenus sont chromatographiés sur gel Sephadex gonflé avec le mélange Eau - Acétone - HCl (70 - 30 - 0,1), (SOMERS, 1968 ; GLORIES, 1971).

Les courbes d'élution des précipités et surnageants obtenues avec les deux sels sont du même type ; nous avons représenté (fig. 1) celles correspondant à l'action du sulfate d'ammonium.

Conformément à l'hypothèse qui a guidé notre expérimentation, les molécules qui précipitent sont polymérisées et correspondent à une partie des tanins condensés. En effet, la courbe d'élution du surnageant lorsque le milieu est saturé à 100 p. 100 (fig. 1 f), présente toujours les deux pics caractéristiques des tanins condensés et des anthocyanes (GLORIES, 1971) avec cependant le pic des tanins condensés beaucoup plus petit par rapport au vin de départ. Celui des anthocyanes est également plus faible, mais on ne retrouve pas le pic correspondant à ces molécules sur les courbes d'élution des trois premiers précipités (fig. 1 b, 1 c, 1 d) car les quantités sont très faibles par rapport aux tanins. Par contre, la courbe d'élution du précipité lors de la saturation complète (fig. 1 e) présente un petit épaulement correspondant aux anthocyanes entraînées par la précipitation des autres composés phénoliques. Ces résultats sont confirmés par la chromatographie sur papier, des surnageants et des précipités correspondant aux deux sels.

Après fractionnement sur Sephadex, les éluats sont séparés en deux fractions (fig. 1 a), puis concentrés et chromatographiés sur papier dans le Butanol-1 - Acide acétique - Eau (4 - 1 - 5).

Les précipités sont des tanins condensés qui ne migrent pas sur le papier ; celui correspondant à 100 p. 100 de saturation possède une tache très légère, montrant la présence de faibles traces d'anthocyanes.

La fraction I des surnageants correspond également à des tanins condensés ; son intensité diminue avec la quantité de sel ajouté.

La fraction II peu riche en composés phénoliques condensés, présente beaucoup d'anthocyanes dans le surnageant correspondant à 25 p. 100 de saturation, et beaucoup moins dans celui correspondant à 100 p. 100.

Cette étude confirme la précipitation en présence de sels d'une partie des composés phénoliques polymérisés ; mais cette précipitation est

accompagnée par l'élimination d'une partie des anthocyanes libres, c'est-à-dire non engagées dans des structures complexes.

4) Précipitation des composés phénoliques en fonction de l'âge du vin.

La saturation à 100 p. 100 par les deux sels a été réalisée sur des vins d'âges et d'origines différents (Tableau V). Nous ne constatons pas de différence importante dans la proportion de phénols totaux et de tanins précipités. Sauf dans un cas (1ères Côtes de Bordeaux 1966), tous les vins étudiés possèdent 20 à 30 p. 100 de tanins précipitables par le chlorure de sodium, les pourcentages fluctuent un peu plus avec le sulfate d'ammonium.

TABLEAU V

Pourcentage des composés phénoliques précipités par saturation en sels de différents vins désalcollisés.

	Pourcentage de phénols totaux précipités par		Pourcentage de tanins précipités par		Pourcentage d'anthocyanes précipitées par	
	NaCl	$(NH_4)_2SO_4$	NaCl	$(NH_4)_2SO_4$	NaCl	$(NH_4)_2SO_4$
Médoc 1962	23	20	28	30	40	43
Médoc 1963	21	23	28	31	38	41
Médoc 1964	23	26	28	30	58	64
1res Côtes de Bordeaux 1966	23	14	45	45	43	45
Médoc 1970	28	30	32	35	49	53
1res Côtes de Bordeaux 1972	18	13	21	17	20	18
1973 (1)	26	16	28	24	15	10
1973 (2)	25	15	26	21	15	8

En ce qui concerne les anthocyanes, leur teneur diminue au cours du vieillissement (STONESTREET, 1965). Mais les chiffres du tableau VI montrent en outre, que la fraction qui précipite en présence de sels augmente au cours du vieillissement. Nous avons ici une confirmation de la complexité de la structure de ces molécules dans le vin.

A partir de ces résultats nous avons déterminé un indice capable de caractériser le vieillissement d'un vin. Cet indice est obtenu en multipliant par 10 le rapport de la quantité d'anthocyanes présents dans le vin et du pourcentage précipité par les sels (Tableau VI). Il a pour expression :

$$I = 10 \times \frac{C}{\frac{Cp \times 100}{C}} = \frac{C^2}{Cp} \times 10^{-1}$$

où C est la concentration en mg par litre des anthocyanes dans le vin
Cp est la concentration en mg par litre des anthocyanes qui ont précipité.

Nous obtenons ainsi une valeur plus commode à manipuler que le pourcentage, les différences entre les vins étant amplifiées.

TABLEAU VI

Comparaison entre la teinte et l'indice de vieillissement de vins d'âges et d'origines différents.

	Intensité colorante	Teinte	Anthocyanes mg par l	Anthocyanes précipitées par NaCl		Indice de vieillissement
				mg par l	Pourcentage précipité	
1962	1,20	1,13	86	35	40	21
1963	0,90	1,13	97	37	38	25
1964	—	—	75	44	58	13
1966	0,75	1,08	85	37	43	20
1970	0,90	0,87	145	71	49	37
1972	0,41	0,88	100	20	20	50
1973 (1)	0,59	0,70	235	37	15	150
1973 (2)	0,56	0,74	245	37	15	160

Le Tableau VI montre que la teinte et cet indice de vieillissement sont complémentaires ; en effet, la teinte caractérise la couleur dominante du vin tandis que l'indice renseigne sur l'état moléculaire des anthocyanes dans le vin.

Donc au cours du vieillissement, une partie des anthocyanes disparaît (diminution de la densité optique à 520 nm) tandis que l'autre se condense avec les tanins (pourcentage de précipitation élevé pour le vin vieux) ; la teinte augmente, l'indice de vieillissement diminue. Il y a une bonne correspondance entre la teinte et l'indice.

Les résultats sont valables pour les vins de la région bordelaise riches en composés phénoliques, mais doivent être vérifiés pour les vins issus d'autres régions viticoles.

II. — APPLICATION DE LA SATURATION EN SELS POUR L'EXTRACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES PAR DEMIXTION.

L'application de la démixtion à l'extraction des pigments du vin a été étudiée en 1961 par SINGLETON ; il semble que les sels susceptibles de modifier le moins le pH du vin, donc les équilibres, soient le sulfate d'ammonium (pH : 5,1) et le phosphate monosodique (pH : 3,5).

La démixtion consiste dans la formation de deux phases non miscibles à partir d'un mélange d'eau et d'une solution organique par addition d'un sel minéral.

La température de l'expérience est un facteur important du phénomène, par conséquent elle doit rester constante pendant toute la durée de l'opération.

Le sel utilisé dans notre expérimentation est le phosphate monosodique en raison de son pH très voisin de celui du vin. Les solvants sont l'éthanol et l'acétone ; le mode opératoire est le suivant.

Dans une fiole de 50 ml à col long et étroit placée à la fois dans un bain thermostaté à 20 °C et sur un agitateur magnétique, on introduit 35 ml de vin rouge, 31 g de phosphate monosodique, 1 ml d'éthanol absolu et 1 ml d'acétone. Quand le sel est dissous, la phase organique se détache de la phase aqueuse en entraînant la presque totalité des composés phénoliques. Elle se rassemble dans le col de la fiole tandis que la phase inférieure est presque entièrement décolorée.

Après décantation des deux phases, une deuxième addition d'éthanol absolu et d'acétone permet de récupérer encore une petite quantité de composés phénoliques. Au bout de trois extractions la phase aqueuse est incolore, la réaction avec le réactif de Folin-Ciocalteu est négative.

1) **Reproductibilité de la méthode.**

La démixtion a été réalisée suivant le mode opératoire précédent trois fois sur le même vin ; les dosages ont été effectués sur les extraits ramenés au volume initial avec la solution synthétique de vin à pH 3,2 (voir 1er paragraphe).

Les faibles écarts entre les résultats des dosages des différents extraits et des témoins (Tableau VII) proviennent de l'incertitude des méthodes analytiques et d'une petite perte lors de la manipulation de séparation des phases ; on peut admettre que l'extraction est totale dans le cas du vin jeune.

TABLEAU VII

Reproductibilité de la démixtion sur un vin jeune.

	Phénols totaux extraits		Anthocyanes extraites		Tanins extraits	
	Indice	Pourcentage extrait	mg par l	Pourcentage extrait	g par l	Pourcentage extrait
Témoin	46		350		2,15	
1ère démixtion	41	89	342	98	2,05	95
2ème démixtion	41	89	340	97	2,10	98
3ème démixtion	40	86	340	97	1,99	97

Un petit inconvénient de cette méthode est la dissolution d'une très faible quantité de sel dans la phase organique ; cette présence risque perturber les opérations ultérieures.

La même opération réalisée sur un vin vieux a montré la même reproductibilité mais avec cependant un coefficient d'extraction des anthocyanes un peu plus faible.

La démixtion est donc une méthode reproductible qui extrait la presque totalité des tanins et des anthocyanes et qui modifie peu la structure de ces molécules. On intervient juste au niveau des équilibres en diminuant la solubilité de la phase aqueuse et par conséquent en augmentant celle de la phase organique.

2) **Application de la démixtion à différentes solutions de composés phénoliques.**

Nous avons extrait selon le mode opératoire précédent les composés phénoliques de vins d'âges différents et de solutions modèles (tanins + anthocyanes). Les résultats sont rassemblés dans le Tableau VIII.

Nous constatons que, quel que soit l'état des composés phénoliques et la nature de la solution, l'extraction des tanins et des anthocyanes est de l'ordre de 90 à 95 p. 100.

Cette méthode ne permet pas de fractionner les composés phénoliques du vin mais peut être utile comme méthode de purification.

TABLEAU VIII

Extraction des composés phénoliques par démixtion

		Phénols totaux		Anthocyanes		Tanins	
		Indice	Pourcentage extrait	mg par l	Pourcentage extrait	g par l	Pourcentage extrait
Vin de 1973	Témoin	46		350		2,15	
	Extrait	41	89	342	98	2,05	95
Vin de 1966	Témoin	46		85		3,30	
	Extrait	40	86	74	87	3,20	96
Solution modèle	Témoin	39		55		2,25	
	Extrait	35	89	50	91	2,10	94

III. — ACTION DES PROTEINES SUR LES COMPOSES PHENOLIQUES, APPLICATION ANALYTIQUE.

Par définition les composés phénoliques qui sont solubles dans l'eau et qui possèdent la propriété de réagir avec les protéines en formant des combinaisons stables sont appelés tanins. Cette propriété est largement utilisée en œnologie dans le collage des vins.

Par contre son application à des fins analytiques a été étudiée par FREUDENBERG (1932) et mise en œuvre par BOUDET et GADAL (1965) et MARIGO (1973) sur des extraits végétaux. Ces auteurs emploient une solution de gélatine à 1 p. 100 en présence de chlorure de sodium (10 p. 100) dans une zone de pH compris entre 4 et 5 (4,8).

Dans le cas du vin, il était intéressant de préciser parmi les composés phénoliques condensés, la proportion de molécules qui possèdent véritablement les propriétés de tanins et quelles sont les quantités de protéines les mieux adaptées à cette opération.

Nous avons ajouté à différents vins des quantités croissantes de protéines sous forme de solutions de gélatine, d'albumine d'œuf, d'albumine de sang et de caséine. Les doses employées sont comprises entre 0,1 et 10 g par litre et l'expérience a été réalisée aux deux pH limites permettant la meilleure précipitation, c'est-à-dire 4 et 5. La présence de chlorure de sodium n'apportant pas de changement dans les résultats, sa présence ne nous a pas paru indispensable.

Après addition des protéines au vin considéré, la bouteille est bouchée et laissée au repos. Au bout de 24 h., le vin est centrifugé et les dosages ont été effectués sur le vin clair.

Les résultats (Tableau IX) mettent en évidence certains faits concernant la nature des protéines et leur action sur les composés phénoliques.

— les tanins du vin ne sont pas précipités en totalité par les protéines. Il reste encore dans le cas le plus favorable, 37 à 40 p. 100 de tanins qui ne paraissent pas réagir avec les protéines.

— nous constatons cependant que les protéines agissent peu sur les anthocyanes, par rapport à leur action sur les tanins. Celles qui proviennent des albumines d'œuf et de sang réagissent plus que la gélatine et la caséine.

— les résultats sont peu différents à pH 4 et 5. Donc le pH ne paraît pas avoir une importance capitale dans cette réaction.

— la précipitation n'augmente pas régulièrement avec les quantités de protéines. Dans le cas de la gélatine, il semble y avoir une stabilisation de la réaction pour une dose de 3 g par litre. Cette stabilisation est observée pour l'albumine d'œuf à des doses plus élevées de 5

TABLEAU IX

Pourcentages de composés phénoliques de différents vins, non précipités par les protéines.

pH	Protéines ajoutées g par l	Gélatine			Albumine d'œuf			Albumine de sang			Caséine		
		Phénols totaux	Tanins	Anthocyanes	Phénols totaux	Tanins	Anthocyanes	Phénols totaux	Tanins	Anthocyanes	Phénols totaux	Tanins	Anthocyanes
	Vins témoins	I = 43	2,15 g par l	320 mg par l	I = 48	2,80 g par l	106 mg par l	I = 34	1,96 g par l	169 mg par l	I = 44	2,18 g par l	208 mg par l
4,0	0,1	95	88	99	91	92	88	94	100	84	95	95	99
	0,5	90	85	99	85	81	86	97	100	100	97	100	100
	1	76	71	81	85	75	81	88	100	100	97	95	100
	3	69	39	87	70	68	83	76	92	87	93	95	96
	5	67	44	88	62	51	78	67	62	85	93	85	100
	7	63	42	78	64	40	76	67	70	84	93	94	100
	10	67	37	83	62	48	60	50	39	72	88	94	89
	Vins témoins	I = 42	2,28 g par l	278 mg par l	I = 45	2,68 g par l	101 mg par l	I = 33	2,05 g par l	165 mg par l	I = 42	2,15 g par l	204 mg par l
5,0	0,1	92	84	95	97	94	96	100	97	95	100	100	97
	0,5	73	60	93	93	91	86	93	96	100	100	100	93
	1	73	53	88	88	85	82	90	94	91	95	95	97
	3	64	39	81	77	75	79	78	76	71	95	100	91
	5	57	35	80	80	68	69	60	62	69	92	89	91
	7	64	35	79	77	56	65	54	65	63	85	82	86
	10	66	39	78	77	55	63	48	57	60	83	74	81

à 7 g par litre. Les protéines de l'albumine de sang réagissent moins que les précédentes, la précipitation se poursuit jusqu'à 10 g par litre et arrive à peu près à 60 p. 100. Par contre, les protéines de la caséine se combinent très peu aux composés phénoliques du vin.

Ces observations mettent en évidence le rôle des protéines de la gélatine qui précipitent 60 p. 100 des tanins et seulement 15 p. 100 des anthocyanes pour des doses de l'ordre de 3 g par litre.

La chromatographie sur papier montre que ce sont les tanins condensés qui précipitent surtout, en entraînant quelques molécules peu polymérisées et des anthocyanes. Elle montre également qu'il reste encore dans le surnageant des molécules encombrantes qui ne migrent pas sur le papier.

Donc le développement de cette technique sur des vins présentant des caractéristiques différentes devrait aboutir à une certaine classification des composés phénoliques polymérisés.

CONCLUSIONS

La précipitation des composés phénoliques en présence de sels minéraux est maximum en l'absence totale d'alcool ; elle dépend de la nature du sel et de sa quantité. Elle est d'autant plus importante que l'on approche de la saturation et que l'on utilise le chlorure de sodium.

Les composés phénoliques les plus polymérisés précipitent en entraînant éventuellement des molécules plus simples (anthocyanes). Le pourcentage des tanins totaux précipités varie peu avec l'âge du vin et avec la concentration initiale ; par contre la précipitation des anthocyanes dépend du millésime. On montre ainsi, l'intervention d'une partie de ces molécules dans des structures complexes qui varient pendant la conservation des vins.

A la suite de cette observation nous avons défini un indice de vieillissement caractérisant l'état des anthocyanes dans le vin. Il varie approximativement de 150 à 25 au cours du vieillissement. Il complète la détermination de la teinte qui est une autre mesure du vieillissement.

La saturation en sels d'un vin alcoolisé provoque, dans certaines conditions, la démixtion de l'alcool qui extrait la presque totalité des

composés phénoliques. La méthode est simple et reproductible mais ne permet pas de fractionner les composés phénoliques du vin ; elle peut être une méthode de purification.

L'addition de protéines à un vin dont le pH est amené de 4 à 5, provoque la précipitation d'une partie seulement des tanins et parfois des anthocyanes. Les protéines de la gélatine sont les plus réactives vis-à-vis des tanins condensés et les moins vis-à-vis des anthocyanes. De plus la réaction se stabilise pour une dose de l'ordre de 3 g par litre ; ceci permet d'obtenir un pourcentage de tanins condensés, précipitables par la gélatine, répondant parfaitement à la définition. Les protéines de la caséine ont très peu d'action sur les composés phénoliques du vin rouge.

Manuscrit reçu le 10 septembre 1974.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOUDET A. et GADAL P., 1965. Sur l'inhibition des enzymes par les tanins des feuilles de **Quercus Sessilis Ehrh.** Isolement des tanins. **C.R. Acad. Sc. Paris,** (260), 4057-4060.

FREUDENBERG, 1932. In Klein, Handbuch Der Pflanzenanalyse, Verlag Von Julius Spinger Wien, 344.

GLORIES Y., 1971. Essais de détermination de l'état de condensation des tanins du vin rouge. **Thèse de doctorat 3e cycle,** Bordeaux.

GLORIES Y., 1974. Recherches sur la structure et les propriétés des composés phénoliques polymérisés des vins rouges. I. Précipitation par l'aldéhyde formique et par l'acide chlorhydrique concentré. **Conn. Vigne Vin, 1,** 57-79.

JURD L. et WAISS A.C., 1965. Anthocyanins and related compounds — Flavylium salt. Phloroglucinol condensation products, Tetrahedron Letters, 21, 1471.

MARIGO G., 1973. Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux, **Analusis, 2,** (2), 106-110.

MASQUELIER J., VITTE G. et ORTEGA M., 1959. Dosage colorimétrique des leucoanthocyanes dans les vins rouges. **Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 98,** 145-148.

RIBÉREAU-GAYON P., 1970. Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. **Chim. Anal., 52,** (6), 627-631.

RIBÉREAU-GAYON P. et STONESTREET E., 1965. Le dosage des anthocyanes. **Bull. Soc. Chim., 9,** 2649-2652.

RIBÉREAU-GAYON P. et STONESTREET E., 1966. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. **Chim. Anal., 48,** 188-196.

SINGLETON V.L., 1961. An extraction technique for recovery of flavors, pigments, and other constituents from wines and other aqueous solutions. **Ann. J. Enol. Vitic., 12,** 1-8.

SOMERS T.C., 1968. Pigment profiles of grapes and of wines. **Vitis 7,** 303-320.

SOMERS T.C., 1971. The polymeric nature of wine pigments. **Phytochem., 10,** 2175-2186.

STONESTREET E., 1965. Contribution à l'étude des tanins et de la matière colorante des vins rouges. **Thèse Doctorat 3e cycle,** Bordeaux.

SUDRAUD P., 1958. Interprétation des courbes d'absorption des vins rouges. **Ann. Techn. Agricole, 2,** 203-208.