

Influence des protéines et polysaccharides sur la stabilité colloïdale des tanins de raisin

Cédric Saucier

Introduction

Les tanins jouent un rôle fondamental pour le goût et la longévité du vin rouge. Au niveau visuel, ils renforcent la couleur du vin en s'associant de manière covalente ou non avec les anthocyanes. Les produits issus de leur oxydation sont jaune-orangés voire marrons et sont responsables de la nuance tuilée que prennent les vins en vieillissant (Ribéreau-Gayon 1973). Mais la propriété qui nous intéresse le plus dans le cadre de notre travail, est la faculté qu'ont ces composés à interagir avec des macromolécules de type polysaccharides ou protéines. Cette propriété va avoir une influence sur le goût (astringence) et la stabilité chimique et colloïdale qui est liée à la capacité de vieillissement du vin.

Les tanins du vin, qui ont pour origine les parties solides (pellicules et pépins) du raisin, sont des proanthocyanidines (Prieur *et al.* 94, Souquet *et al.* 96). Il s'agit de polymères de catéchine ou d'épicatéchine liés par des liaisons C4-C6 ou C4-C8 (Fig.1). Ces tanins font partie de la famille des tanins condensés.

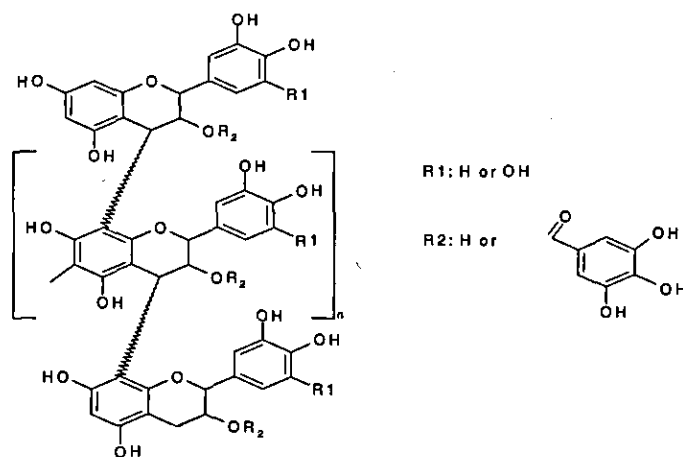


Fig. 1. Structure des tanins condensés ou proanthocyanidines des raisins (*Vitis vinifera*).

La caractéristique commune aux tanins est une présence importante de groupes hydroxyles de type phénolique. Il semble que les molécules doivent posséder un nombre suffisant de ces groupements et une masse importante pour posséder le caractère de tanin c'est à dire la capacité de complexation avec les protéines et les polysaccharides.

Les interactions tanins-protéines ont été beaucoup plus étudiées que celles concernant les polysaccharides. Le mécanisme généralement décrit est un processus d'adsorption des molécules de tanin sur la surface des protéines : celles-ci formeraient une mono-couche hydrophobe autour de la protéine en la rendant hydrophobe (Haslam 1981). Reprenant cette hypothèse, d'autres auteurs (Kawamoto *et al.* 1997) ont proposé un mécanisme de précipitation comprenant deux phases : formation du complexe tanin-protéine dans un premier temps, puis association des complexes formés dans un second temps (fig 2).

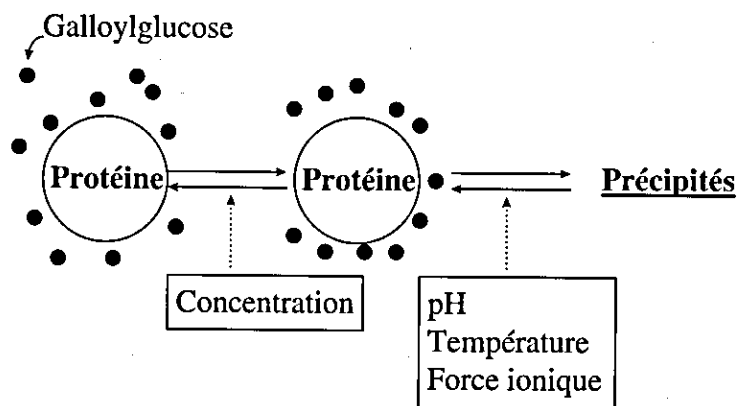


Fig. 2. Mécanisme de précipitation des protéines par les tanins en deux étapes. Influence des conditions physico-chimiques (Kawamoto *et al.* 1997).

Concernant l'influence de la masse moléculaire des protéines, il semble que les protéines hydrophobes ayant une masse relativement élevée favorisent la précipitation des tanins (Hagerman et Butler, 1981). Concernant celle des tanins, l'augmentation de leur poids moléculaire favorise la complexation avec les protéines (Okuda *et al.*, 1985). Cependant, des études effectuées sur des procyanidines montrent qu'au delà d'un P.M de 2500 environ, les interactions ont plutôt tendance à diminuer (Lea 1992, Freitas 1995).

Un paramètre important et peu étudié concerne les propriétés d'auto-association des polyphénols. L'étude par RMN de solution de tanins galliques montre que le déplacement chimique des protons varie avec la concentration en tanin. Un équilibre entre forme libre et forme associée a été envisagé (Charlton *et al.* 1996). Le résultat le plus remarquable obtenu par ces auteurs est que la présence de protéines ne perturbe pas le décalage de déplacement chimique observé quand on augmente la quantité de tanins.

Un autre point également très intéressant et fort peu étudié concerne les interactions entre tanins et polysaccharides. Dans le cas du vin, une grande partie des polysaccharides proviennent du raisin : parmi les structures identifiées dans le moût et le vin, on peut citer les arabino-galactanes protéines (AGP) et le rhamnogalacturonane II (RGII). Les AGP représentent une famille de molécules dont les poids moléculaires sont compris entre 20 et 100 kDa, alors que le RGII a un poids moléculaire plutôt faible, avec une distribution très fine centrée autour de 4700 Da environ (Doco *et al.* 1997). Un autre groupe important de polysaccharides du vin est constitué des mannoprotéines provenant de la dégradation des parois cellulaires des levures (Llauberes *et al.* 1987). Celles-ci ont des masses comprises entre 20 et 400 kDa environ.

1 Etude des procyanidines seules en solution synthétique

1.1 diagramme de phase

Les procyanidines sont des polymères de flavanols tels que la catéchine. Nous avons utilisé des procyanidines extraites de pépins de raisin. Contrairement au cas de la catéchine, il ne s'agit pas d'une molécule pure mais d'un mélange de polymères ayant un degré de polymérisation moyen de 6. Comme pour la catéchine, nous avons établi un diagramme de phase (Concentration, Température) en procédant par dissolution des polymères en solution hydroalcoolique par élévation de la température. La zone notée '1 Phase' correspond à l'absence de dépôt à l'oeil nu, alors que celle notée '2 phases' correspond à l'observation d'un dépôt et d'un surnageant. Les résultats obtenus (fig.3) semblent indiquer une remarquable solubilité de ces composés. A 20°C, on a une solubilité supérieure à 50 g/l (tous les tubes sont limpides).

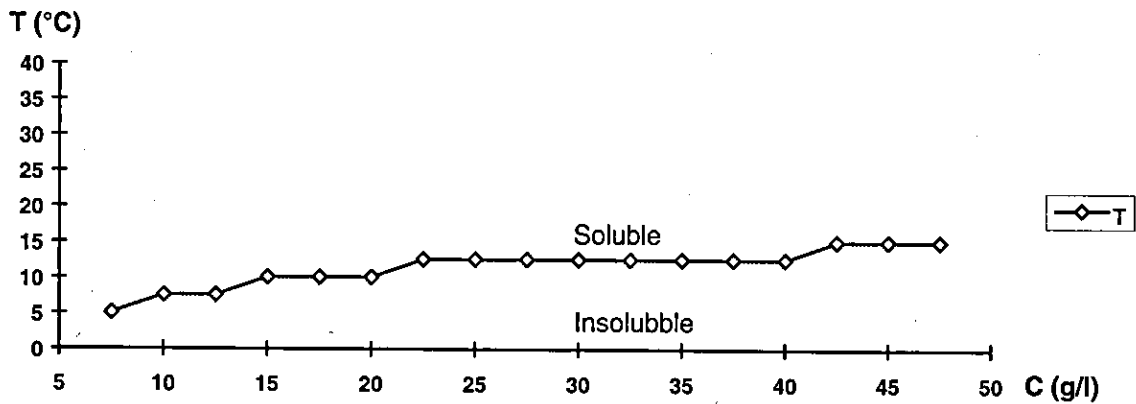


Fig. 3. Diagramme de phase des procyanidines.

1.2 Mise en évidence de particules colloïdales de procyanidine en solution

L'estimation de la turbidité en fonction de la concentration en procyanidines à 20°C est rapportée sur la figure 4. Pour toutes les concentrations étudiées dans cette expérience, les solutions ne présentent aucun dépôt et paraissent limpides à l'œil nu. Tout comme la catéchine, on voit que l'évolution de la turbidité de la solution comporte deux phases : Jusqu'à une concentration C^* de 10^{-1} g/l, la turbidité de la solution est très faible et relativement constante. Au delà de cette concentration, la turbidité augmente de plus en plus avec l'augmentation de la concentration en procyanidines.

Ceci semble indiquer que la phase soluble à l'œil nu peut à partir d'une certaine concentration, contenir des particules colloïdales susceptibles de diffuser la lumière.

Les résultats confirment la taille moyenne et montrent que la distribution des particules est effectivement assez fine. Il faut préciser ici que la technique ne permet pas de visualiser les procyanidines non associées car leur taille est très faible (de l'ordre du nanomètre) et diffusent donc très peu la lumière. Il semble donc y avoir un équilibre entre les polyphénols à l'état dissocié et sous forme de particules colloïdales de diamètre proche de 350 nm.

Afin de vérifier qu'il ne s'agissait pas d'impuretés de type protéines ou polysaccharides résiduelles de l'extraction des pépins, nous avons analysé un échantillon contenant la même concentration en procyanidines dans le méthanol pur : nous n'avons alors pas observé de précipité, et aucune particule n'était détectable avec notre dispositif de diffusion de la lumière.

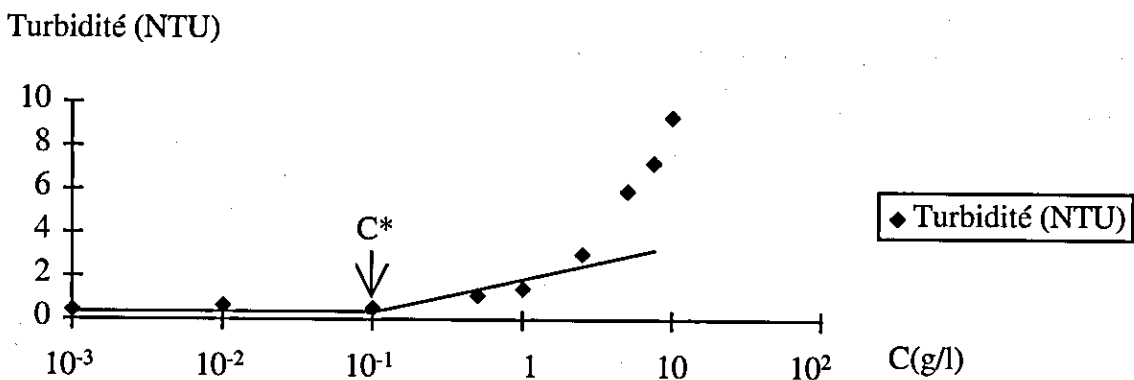


Fig. 4. Turbidité de solutions synthétiques de procyanidines à différentes concentrations.

Ceci signifie que les particules colloïdales précédemment observées sont bien dues à l'agrégation des procyanidines. Ces colloïdes peuvent être dissociés en présence de méthanol.

Les diagrammes de phase de la figure 3 correspond donc à la solubilité des particules colloïdales et non des molécules de procyanidines. La phase notée soluble contient en fait de nombreuses particules colloïdales qui sont stables au dessus d'une certaine température.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons effectué des mesures de tailles de particules par diffusion dynamique de la lumière en prenant une solution concentrée (20 g/l) mais relativement limpide à l'œil nu. Les mesures obtenues à 20 °C montrent qu'il existe des particules ayant un diamètre moyen proche de 350 nm (365 ± 50 nm) avec une polydispersité étonnamment faible ($p = 0.2$). Nous avons alors pu effectuer une analyse de distribution en taille (Fig.5).

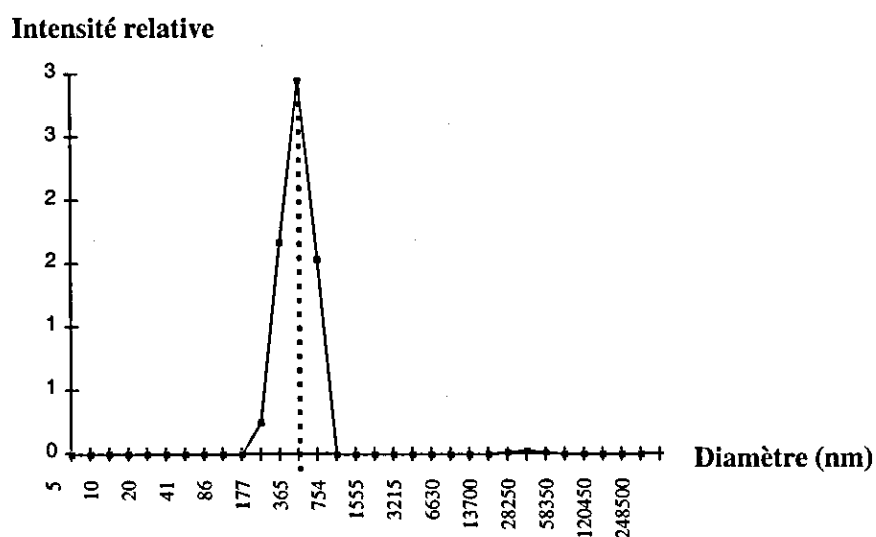


Fig.5. Etude de la distribution en taille des particules en solution.

2 Etude de solutions de procyanidines en présence de macromolécules

Dans la partie précédente, nous avons montré que les procyanidines possédaient des propriétés d'auto-association, dépendantes de leur concentration : au delà de leur limite de solubilité, ces composés sont en effet capables de s'associer en très grand nombre pour former des particules ayant une taille inférieure au micron. Par ailleurs, la température a une forte influence sur la stabilité de ces particules. Dans cette partie, on étudie l'effet des macromolécules sur la stabilité des solutions. Dans un premier temps, on étudie l'effet des polysaccharides lors d'un refroidissement des solutions de procyanidines. Dans un second temps, l'effet de protéines sur des solutions de procyanidines à l'équilibre est étudié.

2.1 Effet des polysaccharides

On procède à une série d'expériences similaires à celle effectuée précédemment (1-3), mais en présence de différents polysaccharides (fig.6). A nouveau, on observe que toutes les solutions commencent à se troubler au même moment, mais les vitesses d'apparition du trouble diminuent fortement en présence de polysaccharides. A partir d'une certaine concentration en polysaccharide, le trouble est fortement diminué par rapport au témoin et

on assiste alors à une véritable stabilisation. Etant donné l'allure des courbes, il semble qu'il s'agit d'une véritable stabilisation colloïdale par adsorption des polysaccharides autour des particules colloïdales de procyanidines. L'amélioration de la stabilisation par l'augmentation de la concentration en polysaccharide correspond à un phénomène de surface : la stabilisation est optimum lorsque les polysaccharides recouvrent complètement les particules.

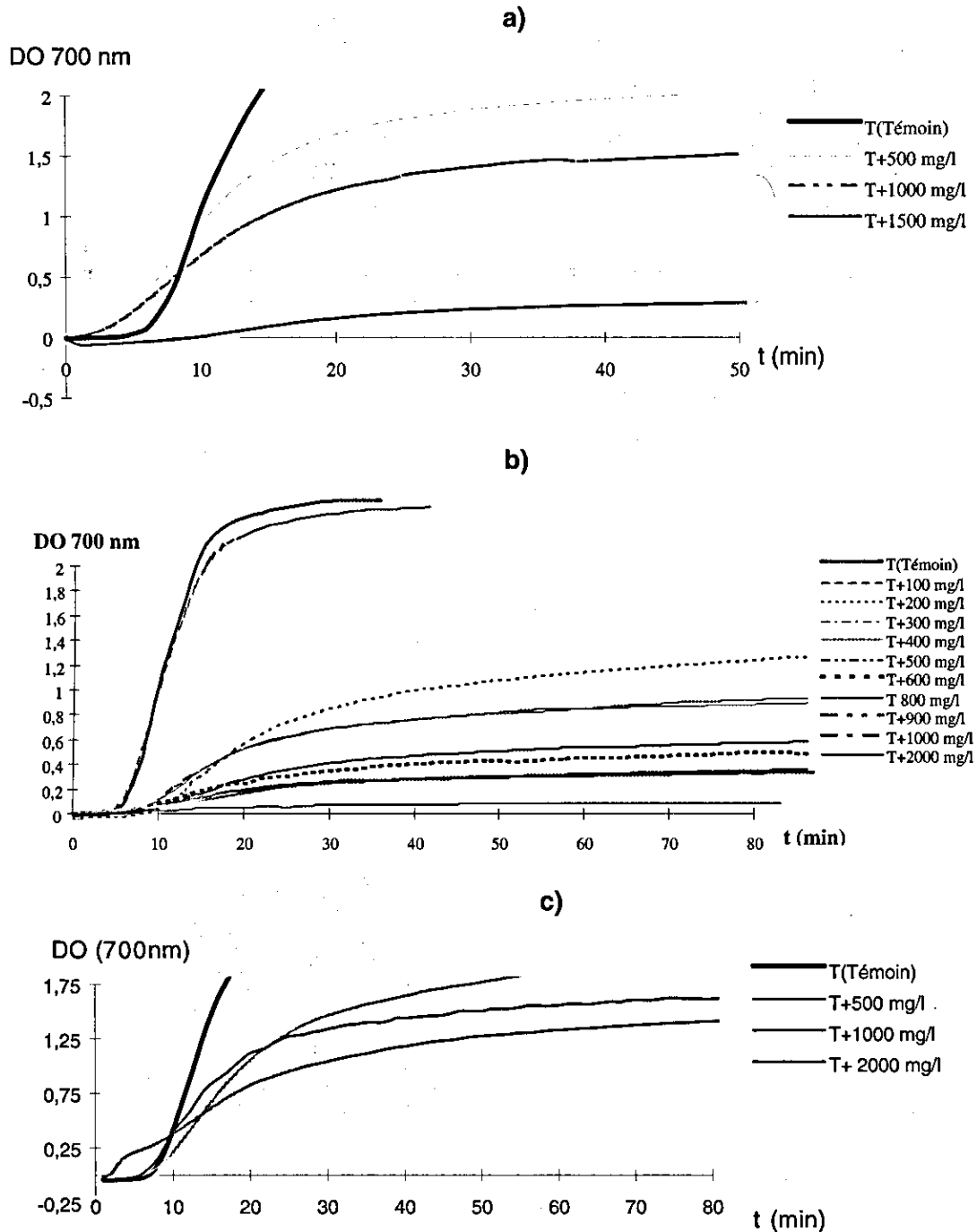


Fig.6. Evolution de la turbidité de solutions contenant une quantité fixe de procyanidine et des quantités variables de polysaccharides: a) pectine b) gomme arabique c) mannoprotéines. T= 5°C.

Par ailleurs, on voit que l'efficacité de la stabilisation dépend de la nature du polymère. La gomme arabique stabilise efficacement les particules, ainsi que les pectines (à forte concentration). L'effet des mannoprotéines est par contre assez faible. Deux phénomènes interviennent :

- de manière générale, la stabilisation est plus favorable avec des polysaccharides ayant un poids moléculaire élevé, car cela leur permet d'occuper un espace plus important autour de la particule . Ceci explique en partie les résultats observés dans la mesure où la gomme est un mélange complexe contenant notamment des polymères ayant un poids moléculaire proche de 10^6 Da. Les mannoprotéines et les pectines utilisées contiennent des polymères ayant un poids moléculaire majoritairement inférieur à 10^5 Da.
- de façon plus spécifique, un paramètre très important est l'affinité du polysaccharide pour la particule, ce qui dépend fortement de la structure du polysaccharide. Les forces mises en jeu sont des forces à courtes portées qu'il est difficile de prévoir ou de calculer à priori.

Les différences observées lors de nos essais sont dues aux deux phénomènes puisque la nature et la masse moléculaire des polysaccharides étaient différentes. Il n'est pas possible de connaître à priori l'affinité que peut avoir un polysaccharide pour les particules de procyanidines car des interactions électrostatiques à courte portée sont en jeu. On peut constater que des polysaccharides neutres (gomme arabique) ou acides (pectines) peuvent s'adsorber sur les particules de procyanidines et être des éléments de stabilité.

2.2 Effet des protéines

Dans une expérience analogue à celle effectuée avec la catéchine, on additionne de la BSA à des solutions contenant des quantités croissantes de procyanidines oligomères. On attend ensuite 12 heures afin de laisser les éventuels précipités se former. La présence de précipités est alors comparée visuellement par rapport aux témoins n'ayant pas subi d'additions de BSA. Les résultats sont rapportés dans la figure 7. Aucun des témoins ne présente de précipité, alors que les solutions ayant une concentration en tanin supérieure à 10^{-1} g/l ont toutes des dépôts. On met donc en évidence qu'il existe une concentration en procyanidines seuil conduisant à la formation de précipités.

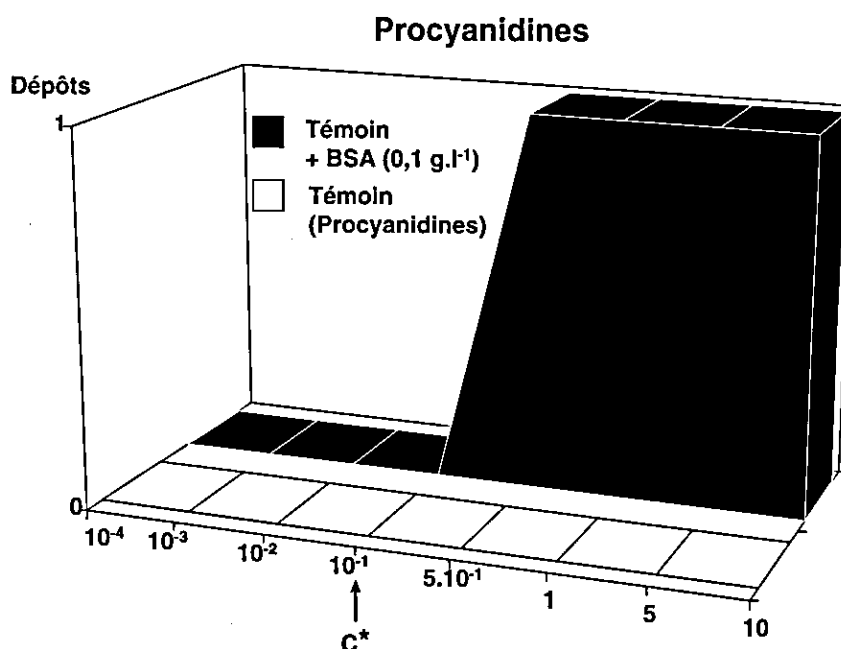


Fig. 7. Dépôts observés dans des solutions de procyanidines (12 % Ethanol, pH 3.2) avec ou sans BSA: présence (1) ou absence (0) de dépôt.

Cette notion de seuil avait déjà été mise en évidence dans des expériences utilisant plusieurs tanins en présence de β -galactosidase (Haslam 1974). On constate dans notre expérience que la valeur de ce seuil correspond exactement à la valeur de C^* , caractéristique de la présence de particules colloïdales en solution (c.f fig.4). Il semble donc que la BSA interagisse avec les procyanidines sous forme colloïdale.

Conclusion

La stabilité de la catéchine et des procyanidines en solution hydroalcoolique a été étudiée. La catéchine en solution concentrée donne naissance à des particules colloïdales instables qui précipitent sous forme cristalline. La précipitation est favorisée par la diminution de température et la présence de protéines. Ces phénomènes ne s'observent que pour des solutions dont la concentration est supérieure à 15 g/l environ. On comprend donc pourquoi la catéchine n'est généralement pas considérée comme un tanin : dans les concentrations rencontrées dans les vins ou étudiées dans les expériences de la littérature, celle-ci se trouve sous forme complètement dissoute.

Les procyanidines oligomères étudiées peuvent se trouver sous forme colloïdale relativement stable (solution limpide) dès que leur concentration dépasse 100 mg/l. La stabilité de ces particules dépend fortement de la température et de la présence de macromolécules en solution : celles-ci peuvent en effet être déstabilisées par un abaissement de température ou par la présence de protéines en solution. L'effet de la concentration en procyanidines ainsi que l'observation des dépôts par microscopie optique montrent que ce sont les particules colloïdales de procyanidines qui interagissent avec les protéines et non les molécules de procyanidines à l'état dissocié. Cette interprétation des phénomènes diffère de tous les modèles généralement admis qui considèrent que la première partie des phénomènes consiste en une « reconnaissance » mutuelle des polyphénols libres avec les molécules de protéines (Kawamoto *et al.* 1997-fig.2, Haslam 1981). Nos résultats nous permettent de conclure que les interactions tanin-protéines sont en fait un phénomène colloïdal peu spécifique, même si la taille des protéines (Hagerman et Butler, 1981) ou celle des polyphénols (Lea 1992) vont fortement influencer l'amplitude des phénomènes observés. Le modèle de comportement colloïdal des tanins que nous proposons est illustré dans la figure 8.

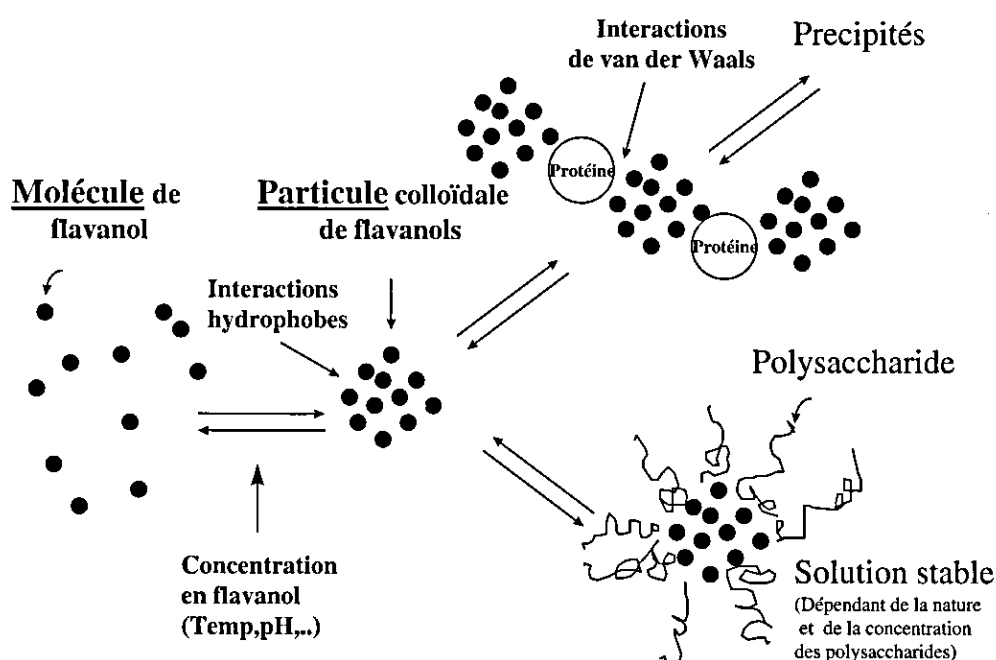


Fig.8. Modèle des propriétés colloïdales des flavanols.

Bibliographie

CHARLTON A.J, Baxter N.J, Lilley T.H., Halsam E., Mc Donald C.J. et Williamson M.P. 1996. *FEBS lett.* 382, 289-292.

DOCO T., Pellerin P. et Moutounet M. 1997. L'apport de la spectrométrie de masse dans l'analyse des constituants du vin : applications aux glucides complexes. *In :In vino analytica scientia.* Soc. Fr. Chim. Anal. Ed.128-131.

FREITAS (De) V. 1995. Recherches sur les tanins condensés : application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines du raisin et du vin. *Thèse de l'Université de Bordeaux II.* N°353.

HAGERMAN A. E. et Butler L. G. 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 256 (9): 4494-4497.

HASLAM E. 1974. Polyphenols-protein interactions. *Biochem. J.*, 139: 285-288.

HASLAM E. 1981. The association of proteins with polyphenols. *J. Chem. Soc. Chem. comm.*: 309-311.

KAWAMOTO H. et Nakatsubo F. 1997. Effects of environmental factors on two stage tannin-protein co-precipitation. *Phytochemistry.* 46, 3, 479-483.

LEA A. G. H. 1992. Flavor, color, and stability in fruit products: The effect of polyphenols. *Plant Polyphenols, edited by HEMINGWAY R. W. and LAKS P. E. New York: Plenum Press:* 827-837.

LLAUBERES R.-M., Dubourdieu D. et Villetaz J.-C. 1987. Exocellular polysaccharides from *Saccharomyces Cerevisiae* in wine. *J. Sci. Food Agric.* 41, 277-286.

RIBÉREAU-GAYON P. 1973. Interprétation chimique de la couleur des vins rouges. *Vitis*, 12 : 119-142.

SOUQUET J.M. Cheynier V. Brossaud F. Moutounet M. 1996. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry.* 43, 509-512.