

Valeur alimentaire des marcs de raisin. VI. Extraction, fractionnement et quantification des tanins condensés

A Larwence

avec la collaboration de S Abada

Institut National Agronomique, département de zootechnie, 16200 El-Harrach, Algérie

(Reçu le 16 novembre 1990; accepté le 28 mai 1991)

Résumé — Les tanins des marcs de raisin (cépage rouge Cinsau) ont été fractionnés et quantifiés à l'aide d'une méthode présentée au tableau I. La méthode est précise et reproductible puisque le coefficient de variation de 246 analyses (marcs de raisin des années 1977 à 1982) ne dépasse pas 9%. Son application permet d'isoler des marcs de raisin 6 fractions de tanins (tableau II) 3 extraites au méthanol absolu acidifié (MeOH_1 ; MeOH_2 et MeOH_3), 3 extraites par un mélange acétone-eau (A-E_1 ; A-E_2 et A-E_3). Ces 3 fractions de tanins présentent des caractéristiques distinctes. Ainsi, elles diffèrent :

– par leur capacité à libérer des anthocyanes (LA) en milieu acide chaud (tableau III). Les valeurs enregistrées sont plus élevées pour les tanins A-E ($0,245 \pm 0,049$) que pour les tanins MeOH ($0,141 \pm 0,077$);

– par leur capacité à précipiter la gélatine (tableau IV) : 59% en moyenne pour les tanins A-E contre 38% pour les tanins MeOH. Cette aptitude à précipiter la gélatine est en corrélation significative d'une part avec le rapport V/LA ($R = 0,87$; $P < 0,05$) et d'autre part avec la masse moléculaire des fractions (fig 2);

– par les variations de leur masse moléculaire, entre 1 080 (MeOH_3) et 2 443 (A-E_1). Les masses moléculaires moyennes sont plus élevées pour les fractions A-E (2 122) que pour les fractions MeOH (1 574).

La masse moléculaire des différentes fractions de tanins explique 96% des variations du pouvoir tannant (fig 2) et 72% de la diminution du rapport V/LA (fig 1). L'ensemble des 6 fractions représente 5 g de tanin (64% de tanins A-E; 36% de tanins MeOH) par 100 g de matière sèche de marc; cette forte teneur en tanins est probablement responsable de la faible valeur nutritive du produit chez l'animal.

tanin condensé / marc de raisin / masse moléculaire / tanin

Summary — **Feeding value of grape marc.** Tannins from grape marcs (red wine variety Cinsau) were fractionated and quantified using the method presented in table I. This method is accurate and reproducible since the coefficient of variation of 246 analyses (grape marcs of years 1977–1982) did not exceed 9%. Using this method, 6 tannin fractions were isolated from grape marcs (table II). Three were extracted by absolute acidified methanol (MeOH , MeOH_2 and MeOH_3) and the others by an acetone – water mixture (A-E_1 , A-E_2 and A-E_3). These 6 tannin fractions differed in the following characteristics:

– their capacity to release anthocyanes (LA) in warm acid medium (table III). The values obtained were higher for tannins A–E ($0.245 = 0.049$) than for tannins MeOH ($0.141 = 0.077$);

– their capacity to precipitate gelatin (table IV): on average 59% for tannins A–E versus 38% for tannins MeOH. This capacity to precipitate gelatin was significantly correlated with the V/LA ratio ($R = 0.87$; $P < 0.05$) and with the molecular weight of fractions (fig 2);

– the variations in their molecular weight, between 1 080 (MeOH₂) and 2 443 (A–E₁). The mean molecular weights were higher for fractions A–E (2 122) than for fractions MeOH (1 574). The molecular weight of the different tannin fractions explained 96% of the variations in tanning capacity (fig 2) and 72% of the decrease in the V/LA ratio (fig 1). All these fractions represented 5 g of tannin (64% of tannins A–E, 36% of tannins MeOH) per 100 g of marc DM. This high tannin content is probably responsible for the low nutritional value of this product in animal feeding.

condensed tannin / grape marc / molecular weight / tannin

INTRODUCTION

Dans une revue bien documentée, Burns (1963) présente les méthodes classiquement employées pour évaluer la teneur en tanins des aliments et des fourrages. La plupart d'entre elles dosent l'ensemble des substances phénoliques, qui n'ont pas toutes une action dépressive sur l'utilisation de l'aliment par l'animal (Masquelier *et al*, 1979). Pour étudier le rôle antinutritionnel de ces substances, il est nécessaire de les isoler avec le maximum de pureté.

De nombreux auteurs ont proposé des méthodes d'isolement de ces tanins. Ainsi Masquelier et Michaud (1965) utilisent la saturation par les sels, en particulier le chlorure de sodium, pour précipiter les tanins dont le degré de polymérisation est compris entre l'hexamère et le décimère. Peri et Pompei (1971) séparent les composés phénoliques ayant une fonction tanante de ceux qui ne la possèdent pas par précipitation avec du sulfate de cinchonine; Mitjavila *et al* (1971) séparent la fraction polyphénolique astringente de l'ensemble des composés phénoliques des boissons par addition de polyvinylpyrrolidone et d'acide trichloroacétique; Marigo (1973) remplace le sulfate de cinchonine par de la gélatine et les tanins condensés

sont ensuite isolés par addition de formaldéhyde; Strumeyer et Malin (1975) isolent les tanins du sorgho après extraction par de l'éthanol à 95° et absorption sur séphadex LH20; Martin-Tanguy *et al* (1976, 1978) utilisent de l'éther éthylique pour précipiter les tanins de la graine de sorgho et des téguments de la graine de féverole, tandis que Glories (1978) après élution sélective des différentes formes de tanins du vin, les sépare par un mélange de méthanol et de chloroforme. Quant à la méthode de Oh et Hoff (1979), elle consiste à immobiliser les tanins sur matrice de sépharose, à l'aide de sérum albumine bovine; les tanins ainsi liés sont ensuite dissociés par des solvants de polarités différentes. Néanmoins, les fractions de tanins obtenues ne sont pas pures à cause des phénomènes de polymérisation et d'oxydoréduction qui accompagnent leur extraction.

Par ailleurs, dans la plupart des cas, chaque méthode est propre à une catégorie d'aliments. Ainsi, celle de Martin-Tanguy *et al* (1976), qui donne de bons résultats avec des graines de sorgho ou les téguments des graines de féverole, s'applique difficilement à la gousse de caroube et aux marcs de raisin. Nous avons donc été amenés pour doser les tanins des marcs de raisin à mettre au point une méthode de fractionnement.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Fractionnement des tanins des marcs de raisin

Le marc utilisé (raisin rouge Cinsau) est un marc fermenté et égrappé qui a subi une extraction d'alcool par la vapeur, il est dit alors épuisé.

Après délipidation de l'échantillon à l'éther de pétrole, les tanins de masse moléculaire moyenne à faible sont extraits avec du méthanol acidifié (Glories, 1978). Le résidu est repris par une solution d'acétone-eau pour extraire les formes fortement polymérisées (Martin-Tanguy *et al*, 1976). Les tanins des extraits méthanoliques et des extraits acétone-eau sont précipités de façon sélective par l'éther éthylique (qui précipite les formes moyennement et fortement polymérisées), l'acétate d'éthyle et le chloroforme (qui précipitent les formes moyennement à faiblement polymérisées) selon le protocole du tableau I. Tous les réactifs sont de marque Merck.

Mise en évidence du caractère tanins des fractions isolées

Réaction de BATE-SMITH (valeur LA)

Les flavanediols 3-4, ou leucoanthocyanidines (LA) des tanins condensés sont transformés en anthocyanidines par chauffage en milieu acide et en présence d'oxygène; la couleur rose développée est d'autant plus forte que la quantité d'anthocyanidines libérées est élevée.

Réaction du noyau phloroglucinol (valeur V)

Le noyau phloroglucinol des tanins condensés présente la propriété de réagir avec les aldéhydes vanilliques (valeur V) pour donner des complexes colorés (Swain et Hillis, 1959). La mesure de LA et de V est effectuée selon Ribereau-Gayon et Stronestreet (1966) respectivement à 550 et 500 nm. Le rapport V/LA mesure,

selon Goldstein et Swain (1963), le degré de polymérisation des molécules de tanins condensés : la molécule est d'autant plus polymérisée que la valeur de ce rapport est faible.

Ces 2 valeurs sont exprimées en densité optique comme le préconisent Martin-Tanguy *et al* (1976).

Réaction à la gélatine

50 mg de chaque fraction de tanins sont dissous dans 50 ml d'eau; 1 ml d'une solution de gélatine à 1% est ajouté goutte à goutte.

Le précipité formé est séparé par centrifugation et l'azote résiduel du surnageant est dosé. «Le pouvoir tannant» des fractions est considéré comme d'autant plus fort que le surnageant est pauvre en azote.

Détermination de la masse moléculaire des fractions de tanins

Elle est effectuée par la méthode microcryométrique préconisée par Glories (1971).

RÉSULTATS

Teneur en tanins des marcs de raisin

Les résultats rapportés dans le tableau II représentent la moyenne de 46 analyses effectuées sur des marcs de raisin de 1977 à 1982.

Les tanins des marcs sont séparés en 6 fractions : 3 extraites au méthanol acidifié (MeOH) (dont l'une est peu importante) et 3 extraites avec le solvant acétone-eau (A-E). La fraction principale A-E₁ représente 54% de l'ensemble. Les tanins totaux s'élèvent à 47 mg/g de marc sec délipidé.

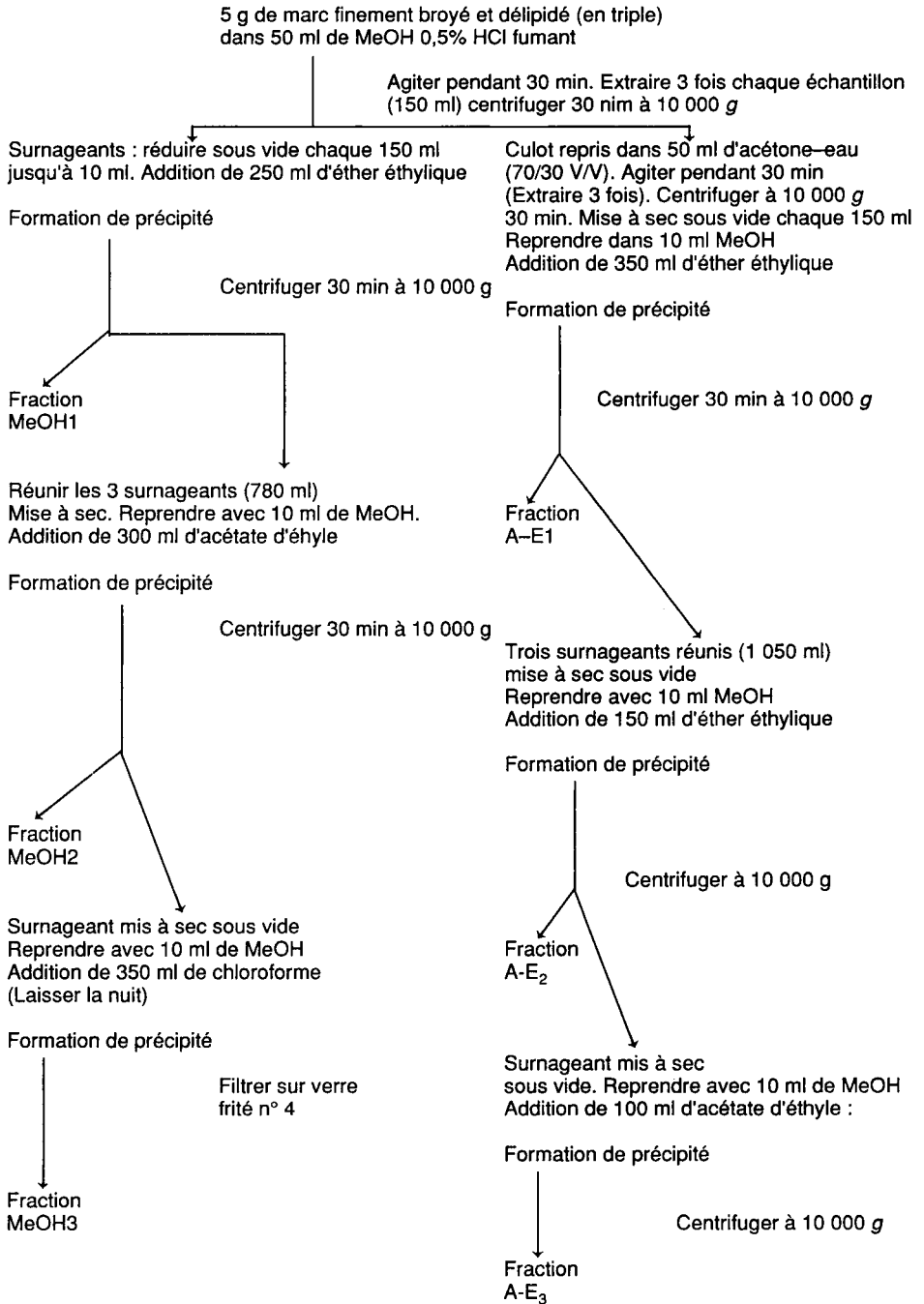
Tableau I. Fractionnement des tanins condensés des marcs de raisin.

Tableau II. Teneur en tanins des marcs de raisin : importance des différentes fractions

Fractions	mg/g de marc sec	Pourcentage
MeOH ₁	11,0 ± 3,4	23,3
MeOH ₂	5,4 ± 1,2	11,4
MeOH ₃	0,6 ± 0,5	1,3
A-E ₁	25,4 ± 3,6	53,8
A-E ₂	3,8 ± 1,6	8,0
A-E ₃	1,0 ± 0,2	2,2
Total	47,2	100

Formation d'anthocyanidines en milieu acide chaud et valeur du rapport V/LA des fractions

La valeur LA et le rapport V/LA des différentes fractions de tanins sont consignés dans le tableau III. Il apparaît que la formation d'anthocyanidines est plus importante avec les tanins A-E qu'avec les tanins MeOH (respectivement $0,245 \pm 0,049$ et $0,141 \pm 0,077$ en moyenne).

Compte tenu de la faible variation de la valeur V des fractions (car probablement très oxydées), le rapport V/LA est plus élevé pour les fractions MeOH ($1,045 \pm 0,764$ contre $0,489 \pm 0,113$ en moyenne). Les molécules de tanins extraites à l'aide du solvant acétone-eau seraient donc plus polymérisées.

Tableau III. Valeur LA et degré de condensation (V/LA) des différentes fractions de tanins.

Fractions	V	LA	V/LA
MeOH ₁	0,111 ± 0,01	0,231 ± 0,03	0,478 ± 0,03
MeOH ₂	0,083 ± 0,06	0,150 ± 0,05	0,553 ± 0,03
MeOH ₃	0,085 ± 0,04	0,042 ± 0,01	2,125 ± 0,17
A-E ₁	0,105 ± 0,09	0,285 ± 0,06	0,379 ± 0,04
A-E ₂	0,085 ± 0,02	0,175 ± 0,04	0,443 ± 0,06
A-E ₃	0,183 ± 0,01	0,275 ± 0,04	0,645 ± 0,08

Degré de précipitation de la gélatine par les différentes fractions de tanins

Les quantités de gélatine précipitées par chaque fraction de tanins (pouvoir tannant) sont présentées dans le tableau IV. Il ressort que, à l'exception de MeOH₃, toutes les fractions de tanins extraites des marcs de raisin précipitent les protéines (propriété fondamentale des tanins).

Toutefois, les fractions A-E possèdent un «pouvoir tannant» plus élevé (59% en moyenne) que les fractions MeOH (38% en moyenne). Il est à remarquer par ailleurs que les fractions obtenues par addition d'acétate d'éthyle (MeOH₂ et A-E₃) ont un «pouvoir tannant» plus faible. Ce résultat est en accord avec celui de Glories (1978), selon lequel ce solvant précipite seulement les catéchines et les pro-cyanidines peu condensées.

Masse moléculaire moyenne des fractions de tanins extraites des marcs de raisin

Le tableau IV rapporte les masses moléculaires de chaque fraction de tanins et le nombre approximatif de molécules de flavanes qui les constituent (en prenant comme base, une molécule de leucocyanidine de masse moléculaire égale à 306).

Tableau IV. Masse moléculaire des différentes fractions de tanins et quantité de gélatine précipitée.

Fractions	Masse moléculaire	Nombre de molécules de flavanes	Gélatine précipitée (% Poids tanins)
MeOH ₁	1 980 ± 238	6 - 8	41 ± 5
MeOH ₂	1 660 ± 204	5 - 6	35 ± 7
MeOH ₃	1 080 ± 133	3 - 4	5 ± 3
A-E ₁	2 443 ± 314	7 - 9	76 ± 14
A-E ₂	2 052 ± 217	6 - 8	52 ± 9
A-E ₃	1 870 ± 220	6 - 7	48 ± 11

La masse moléculaire des fractions est en moyenne de 1 574 (1080 à 1 980) pour les fractions MeOH et de 2 122 (1 870 à 2 443) pour les fractions A-E.

La masse moléculaire plus élevée des fractions A-E est en corrélation significative ($R = -0,854$; $P < 0,05$) avec les valeurs du rapport V/LA (fig 1); il en est de même pour ce qui concerne la masse moléculaire et le «pouvoir tannant» des fractions ($R = 0,983$; $P < 0,01$) (fig 2).

DISCUSSION

La méthode de fractionnement des tanins que nous proposons, permet d'isoler des marcs de raisin, 6 fractions de tanins ayant des propriétés distinctes (valeur LA; V; V/LA; masse moléculaire; aptitude à précipiter la gélatine); elle est précise et reproductible. Ainsi, pour les 2 fractions MeOH₁ et A-E₁ (qui représentent 77% de l'ensemble) et sur 246 analyses, le coefficient

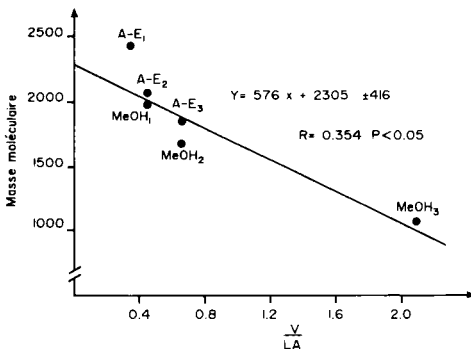


Fig 1. Relation entre la masse moléculaire des différentes fractions de tanins et la valeur du rapport V/LA.

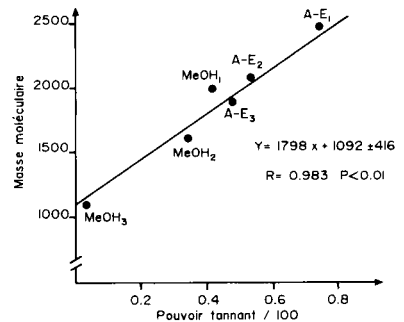


Fig 2. Relation entre la masse moléculaire des différentes fractions de tanins et leur pouvoir tannant.

de variation n'a pas dépassé 9% (3,1–8,7%). L'ensemble de ces fractions représente une teneur en tanins des marcs de raisin se situant à 5% de la matière sèche. À ce taux, si nous nous reportons aux teneurs des aliments en tanins indiquées par Mitjavila (1979), seuls le foin de *Sericea l'espedeza* (7% de la matière sèche) et les glands (9% de la matière sèche) parmi les aliments susceptibles d'être distribués aux ruminants présentent des teneurs en tanins plus élevées.

Ceux-ci sont des tanins condensés, probablement du même type que ceux rencontrés dans le raisin (Oh et Hoff, 1979) ou dans le vin (Glories, 1978); il n'est pas possible de les extraire complètement par le méthanol absolu car ils sont énergiquement liés aux protéines des marcs avec qui ils forment des complexes peu solubles. Pour rompre ces liaisons, une hydrolyse acide est nécessaire; les meilleurs résultats sont obtenus avec 0,5 ml d'acide chlorhydrique 12 N par l de méthanol absolu.

À cette dose, les propriétés des différentes fractions ne sont pas modifiées.

La fraction A-E₁ la plus abondante représente 54% de l'ensemble; Martin-Tanguy *et al* (1978) rapportent pour des tégments de graines de féverole des proportions comparables (56%). L'étude des caractéristiques des différentes fractions de tanins (MeOH et A-E) montre qu'elles diffèrent par les propriétés énumérées ci-dessous.

Capacité à former des anthocyanidines en milieu acide chaud et à réagir avec la vanilline

Nous avons observé comme le rapportent Creasy et Swain (1965) une diminution de la quantité de cyanidine formée lorsque la

polymérisation des tanins augmente; ces résultats sont probablement dus au fait que le nombre de monomères constitutifs des fractions varie entre 3 et 9 (tableau IV). En effet, selon Ribereau-Gayon et Stonestreet (1966), la valeur LA varie peu entre le trimère et le décamère; dans nos essais, le coefficient de variation de LA représente 24% contre 33% pour la valeur V. Comme V diminue plus rapidement que LA, ce rapport V/LA diminue avec la condensation des molécules donc avec la masse moléculaire qui explique 72% (R²) de la diminution du rapport V/LA.

Capacité à précipiter les protéines

Le pouvoir des fractions à précipiter la gélatine est différent : ainsi, le coefficient de variation des quantités de gélatine précipitées se situe à 55%. Une fraction (MeOH₃) ne précipite que très faiblement la gélatine. Oh et Hoff (1979) observent également que sur 9 fractions de tanins isolées du raisin, 3 ne précipitent pas les protéines; mais leur masse moléculaire est inférieure à 900 contre 1 080 dans la présente étude. Notons cependant que notre méthode d'estimation de la masse molaire est différente de celle (filtration sur sephadex G 50) utilisées par ces derniers auteurs.

Dans nos expériences, nous avons apporté 10 mg de gélatine pour 50 mg de tanins; compte tenu de la proportion de protéines précipitées par chaque fraction, les calculs montrent que 6,5; 12,2 et 14,3 mg de tanins sont utilisés précipiter 1 mg de gélatine respectivement pour les fractions A-E₁; A-E₂; MeOH₁ contre 2,1 à 4 mg d'acide tannique dans l'étude de Caldero *et al* (1969) et 3,7 mg dans le cas des tanins de raisin dans l'étude de Oh et Hoff (1979). Ces résultats suggèreraient que l'acide tannique et les tanins du raisin seraient plus réactifs que les différentes fractions de ta-

nins isolées de marcs de raisin. Outre la pureté des fractions qu'il faut incriminer, il convient de signaler que les conditions de pH entraînant une précipitation maximale de protéines n'ont pas été étudiées, mais ce facteur interviendrait peu dans la mesure où près de 80% de la fraction A-E₁ précipite (tableau IV). Cette dernière fraction, soluble dans l'eau (extraite à l'aide du solvant acétone-eau) est donc particulièrement réactive vis-à-vis de la gélatine. Elle pourrait jouer un rôle déterminant dans le tractus digestif, compte tenu de la nature protéique des enzymes digestives.

Tamir et Alumot (1969) observent une telle action sur l'amylase, la lipase et la trypsine; Benoît et Starkey (1968) sur la cellulase; Larwence (1983) sur l'uréase.

Par les variations de la masse moléculaire

La précision de la méthode utilisée pour déterminer la masse moléculaire diffère selon la valeur de la masse à mesurer. Glories (1978) estime l'erreur à 3% pour les masses moléculaires faibles et à 20% dans le cas de masse moléculaire élevée (supérieure à 4 000).

Dans notre cas, les masses moléculaires sont comprises entre 1 080 et 2 443; la précision de la mesure est donc correcte. La masse moléculaire plus élevée des fractions A-E est en accord avec les observations de Ribereau-Gayon (1964) selon lesquelles l'eau extrait des formes de tanins plus polymérisées que l'alcool.

Les tanins de masse moléculaire d'environ 2 000 sont les plus aptes à précipiter la gélatine (respectivement 41; 52 et 76% pour des masses moléculaires de 1 980; 2 052 et 2 443); ces résultats corroborent ceux de Oh et Hoff (1979) qui indiquent la plus forte précipitation de gélatine par

l'une des fractions de tanins de raisin ayant une masse molaire de 2 100. Dans ces conditions, nous comprenons que 96% (R²) des variations du pouvoir tannant des 6 fractions de tanins extraites des marcs de raisin soient expliquées par leur masse molaire. Ces résultats confirment des données déjà anciennes selon lesquelles l'activité des tanins est en relation directe avec leur masse moléculaire, le maximum d'activité étant enregistré dans la plage de masse moléculaire située entre 1 000 et 3 000.

CONCLUSION

La méthode de fractionnement et de dosage des tanins des marcs de raisin, précise et reproductible, permet de mettre en évidence, dans les marcs de raisin, 6 fractions de tanins; 3 extraites à l'aide du solvant acétone-eau, 3 extraites avec le méthanol absolu acidifié; ces 2 catégories de tanins représentent respectivement 64 et 36% du total. Chaque fraction de tanins présente des caractéristiques distinctes : capacité à libérer des anthocyanidines en milieu acide chaud; capacité à précipiter la gélatine; masse moléculaire.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Madame Martin-Tanguy de la station de physiopathologie végétale INRA de Dijon-Époisses pour son aide et ses conseils.

RÉFÉRENCES

- Benoit RE, Starkey RL (1968) Enzyme inactivation as a factor in the inhibition of decomposition of organic matter by tannins. *Agron J* 12, 418-423

- Burns RE (1963) Methods of tannins analysis for forage crop evaluation. *Ga Agric Exp St Tech* 32, 14 p
- Caldero P, Van-Buren J, Robinson WB (1969) Factors influencing the formation of precipitates and hazes gelatin and condensed and hydrolyzable tannins. *J Agric Food Chem* 16, 479-482
- Creazy LL, Swain T (1965) Structure of condensed tannins. *Nature* 208, 151-153
- Glories Y (1971) Essais de détermination de l'état de condensation des tanins du vin rouge. Thèse de Doctorat de 3^e cycle, Université de Bordeaux, 107 p
- Glories Y (1978) Recherches sur les matières colorantes du vin. Thèse de doctorat es sciences naturelles, université de Bordeaux, 195 p
- Goldstein JC, Swain T (1963) Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry* 2, 371-383
- Larwence A (1983) Recherches sur les facteurs limitants de la faible valeur nutritive des marcs de raisin pour le ruminant : Procédé d'amélioration. Thèse de Doctorat es Sciences Naturelles, université de Dijon, 248 p
- Marigo G (1973) Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux. *Analysis* 2, 106-110
- Martin-Tanguy J, Vermorel D, Lenoble M, Martin C (1976) Les tanins des graines de sorghos : Importance dans l'utilisation digestive de l'azote chez le rat en croissance. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 6, 879-891
- Martin-Tanguy J, Guillaume J, Kossa A (1978) Condensed tannins in horse bean seeds: Chemical structure and apparent effect on poultry. *J Sci Food Agric* 28, 757-765
- Masquelier J, Michaud J (1965) État des Leucoanthocyanes dans le Rhytidome de *Pinus maritima* Lamk. *Bull Soc Pharm Bord* 104, 33-36
- Masquelier J, Michaud J, Laparra J, Dumon MC (1979) Un nouvel essor thérapeutique des dérivés catéchiques. *Bull Groupe Polyphénol*, 8, 247-256
- Mitjavila S, Schiavon M, Derache R (1971) Teneur en tanins des boissons : Séparation et dosage colorimétrique de la fraction polyphénol astringente. *Ann Technol Agric* 20, 335-346
- Mitjavila S (1979) Problèmes nutritionnels liés à la présence de tanins dans les aliments. *Bull Groupe Polyphénol* 8, 5-14
- Oh HI, Hoff JE (1979) Fractionation of grape tannins by affinity chromatography and partial characterization of the fractions. *J Food Sci* 44, 87-97
- Peri C, Pompei C (1971) Estimation of different phenolic groups in vegetable extracts. *Phytochemistry* 10, 2187-2189
- Ribereau-Gayon P (1964) Les composés phénoliques du raisin et du vin. III. Les tanins. *Ann Physiol Veg* 6, 259-281
- Ribereau-Gayon P, Stonestreet T (1966) Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim Anal* 48, 188-196
- Strumeyer H, Malin T (1975) Condensed tannins in grain sorghum isolation, fractionation and characterization. *J Agric Food Chem* 23, 909-914
- Swain T, Hillis WE (1959) The phenolic constituents of *Prunus domestica*: I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* 63-68
- Tamir M, Alumot E (1969) Inhibition of digestive enzymes by condensed from green and ripe carobs. *J Sci Food Agric* 20, 200-209