



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**2011/2012**

**Master FAGE**

**Biologie et Ecologie pour la Forêt, l'Agronomie et L'Environnement**

**Spécialité**

**Master II: Bois, Fibres, Energie et Environnement (BF2E)**

**Rapport de stage, soutenu à Nancy le 03/09/2012**

## **Extraction et Analyse de polyphénols de marcs de raisin**

**Youcef KIRECHE**

**Union Nationale de Groupements de Distillateurs d'Alcool**



**Responsable de stage : Professeur Nicolas BROSSE**

**Laboratoire d'Etudes et de Recherche sur le Matériau Bois (LERMAB)**

## **Etudes précédentes**

Une étude préliminaire menée au LERMAB en collaboration avec l'UNGDA avait pour objectif de trouver une utilisation possible aux coproduits de la filière vitivinicole, plus particulièrement les marcs de raisin, produits en grandes quantités.

Une méthode d'extraction des tanins condensés contenus dans les marcs a été mise au point selon un procédé respectueux de l'environnement. Ainsi, des extraits riches en tanins ont été isolés. Un premier panneau de particules dont l'adhésif était principalement constitué de tanins de raisin a été conçu (Gambier F., 2011).

Ces résultats ont encouragé l'UNGDA et LERMAB à continuer leur collaboration, afin d'optimiser encore plus, le procédé d'extraction, dans le but d'une valorisation des marcs à l'échelle industrielle. Cet objectif nécessite une optimisation du procédé ainsi qu'une meilleure compréhension des mécanismes d'extraction et une meilleure connaissance concernant la composition des extraits isolés

## **Remerciements**

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement Monsieur Nicolas BROSSE, Professeur à l'université Henri Poincaré Nancy I, responsable du groupe de recherche «Valorisation Chimique de la Biomasse» du LERMAB, pour m'avoir proposé ce stage, pour sa disponibilité et pour le suivi et la mise au point des différentes parties du stage. Je lui suis reconnaissant également pour ses conseils, ses multiples corrections qui ont permis à ce travail de prendre forme.

Je remercie l'UNGDA pour leur soutien financier et pour l'intérêt qu'ils ont porté à nos recherches.

Un grand merci à François GAMBIER, thésard à LERMAB, pour ses bons et précieux conseils, notamment pour sa contribution à l'interprétation de certains résultats, et pour sa disponibilité tout au long de mon stage.

Merci à Lyne DESHARNAIS, ingénieur d'études au LERMAB pour ces attentions quotidiennes et pour avoir contribué à la partie Chromatographie d'Exclusion Stérique et l'analyse des sucres.

Je tiens également à remercier toute l'équipe du LERMAB pour leur sympathie, leur aide et leur bonne humeur.

Enfin, j'adresse mes profonds remerciements à mes parents; sans eux, cela n'aurait pas été possible, à mes deux frères (Tarek et Sofiane) et mes deux sœurs (Fatima et Mejda), à mon oncle Omar KIRECHE, à Muriele, et à tous mes amis pour leur soutien ainsi que pour tous leurs encouragements.

## *Sommaire*

<b>1. GENERALITES.....</b>	<b>4</b>
1.1 Introduction .....	4
1.2 Objectifs de l'étude .....	4
1.3 Organismes.....	5
1.3.1 UNGDA .....	5
1.3.2 LERMAB .....	5
1.4 Rappels bibliographiques .....	6
<b>2 MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>10</b>
2.1 Matière première .....	10
2.2 Extraction des Tanins .....	10
2.3 Lignine de Klason .....	12
2.4 Temps de gel .....	13
2.5 Spectrophotométrie Ultraviolet (UV) .....	14
2.6 Dosage des Sucres par : HPAEC-PAD analyses.....	15
2.7 Spectre <sup>13</sup> C-RMN .....	15
2.8 Analyse des Tanins par Chromatographie d'Exclusion Stérique après l'acétylation en solvant organique (THF).....	16
<b>3 RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>17</b>
3.1 Composition .....	17
3.2 Extraction des tanins.....	18
3.3 Spectrophotométrie Ultraviolet (UV) .....	19
3.4 Spectre RMN <sup>13</sup> C.....	20
3.5 Analyse par SEC .....	21
<b>4 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>25</b>
<b>5 BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>26</b>
<b>6 TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX.....</b>	<b>28</b>
<b>7 RESUME.....</b>	<b>29</b>
<b>8 ABSTRACT.....</b>	<b>29</b>

## Liste des abréviations

**pH** : Potentiel hydrogène

**LERMAB** : Laboratoire d'Études et de Recherche sur le MATériau Bois

**UNGDA** : Union Nationale des Groupements de Distillateurs d'Alcool

**MPa** : Mega pascal

**nm** : Nanomètre

**UV** : Ultra Violet

**<sup>13</sup>C** : carbone 13

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**p-MDI** : Polyméthylènediisocyanate, résine commerciale

**ppm** : Partie par million

**HPAEC-PAD** : Chromatographique Haute Performance Echangeuse d'Anions avec  
Détection Ampérométrique Pulsée

**SEC** : Chromatographie d'Exclusion Stérique

**THF** : Tetrahydrofuranne

**UDM** : Union de la distillerie de la méditerranée

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DMF** : Diméthylformamide

# 1. Généralités

## 1.1 Introduction

L'agriculture génère des quantités importantes de sous-produits qui ne sont généralement pas intrinsèquement dangereux, mais la forte teneur en matière organique, et le fait que la production soit concentrée dans une période particulière de l'année pose des problèmes potentiels de pollution. Ainsi l'utilisation efficace des déchets de l'industrie agro-alimentaire est d'une grande importance non seulement pour minimiser l'impact environnemental, mais aussi pour une meilleure rentabilité (Ping et al., 2011).

L'industrie du vin constitue un élément important de l'économie en plusieurs régions du monde, et la vigne est l'une des plus importantes cultures de fruits, avec plus de 60 millions de tonnes produites chaque année (FAO STAT base de données).

Le marc de raisin est constitué de peau, de pulpe, de pépins et de rafles et est obtenu après pressurage du raisin. Il représente environ 20% en masse du raisin récolté (Laufenberg et al., 2003). La production annuelle de marc de raisin en France est actuellement d'environ 700 000 tonnes. Les voies de valorisation actuelles des marcs (alimentation animale et fertilisant) ne sont pas satisfaisantes et posent des problèmes économiques et environnementaux. En effet, les taux élevés de polyphénols (Torres et al., 2002 ; Kammerer et al., 2004) de cette ressource sont un désavantage pour leur utilisation en alimentation animale et entraînent une inhibition de la germination des plantes (Morthup et al., 1998).

Le développement et l'utilisation des matières renouvelables suscitent actuellement un intérêt important. De nombreuses recherches menées sur l'intégration de produits naturels dans les procédés industriels ont vu le jour. Ce fût le cas notamment dans l'industrie du panneau de bois avec un objectif précis de diminuer voire de remplacer intégralement les résines à base de dérivés pétroliers utilisées actuellement (Pizzi, A., 2006).

Malgré des recherches qui se développent de jour en jour autour de cette thématique de «colles vertes», les applications industrielles restent peu développées pour plusieurs raisons: les coûts qui doivent défier la rude concurrence de ceux engendrés par l'utilisation de colles synthétiques, l'aspect technique pour obtenir des performances au moins égale à celles utilisées actuellement (Navarrete Fuentes, 2011), et la disponibilité des matières premières.

## 1.2 Objectifs de l'étude

Suite à une étude préliminaire réalisée à l'échelle laboratoire au LERMAB, il a été mis au point une méthode d'extraction des tanins en vue d'une application « adhésif vert » pour l'industrie du bois, et plus particulièrement des panneaux de particules. L'utilisation d'adhésifs verts, notamment à base de tanins condensés, a déjà été mise au point pour certaines écorces d'arbres comme le mimosa ou le quebracho (Gambier, 2011).

Bien que de nombreuses méthodes d'extraction des tanins de matière végétale puissent être employées au laboratoire, les techniques industrielles sont des procédures simples, utilisant de l'eau en tant que solvant, à température comprise entre 70 °C et 100 °C, généralement en

présence d'une base (carbonate, bicarbonate) et de sulfite de sodium ou métabisulfite (Pizzi, 2003).

Le but de notre projet est double :

- Optimiser les conditions d'extraction dans l'optique d'un développement industrie.
- Définir une méthode de suivi chromatographique du procédé d'extraction permettant de mieux caractériser les extraits.

Dans ce travail, nous nous proposons d'agir sur trois (3) facteurs :

- 1° faire varier les proportions de base afin de déterminer les quantités optimales;
- 2° remplacer  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  par  $\text{NaOH}$ , une base plus facilement accessible au niveau industriel;
- 3° étudier l'effet de l'ajout d'urée dans le milieu réactionnel.

Les extraits seront ensuite analysés par des techniques utilisées au laboratoire (Temps de gel, RMN...). Nous nous intéresserons également au développement d'une méthode d'analyse par Chromatographie d'Exclusion Stérique.

## **1.3 Organismes**

### **1.3.1 UNGDA**

L'Union Nationale des Groupements de Distillateurs d'Alcool a été créée le 10 juillet 1946 par les professionnels impliqués dans la production d'éthanol agricole par distillation. Aujourd'hui, l'UNGDA représente l'ensemble des producteurs français d'éthanol utilisant comme matières premières la betterave, les céréales, des produits viniques ou encore de la canne à sucre pour les territoires d'outre mer.

L'UNGDA, centre technique de la profession, est impliquée dans les programmes de R&D stratégiques pour la filière sous le contrôle d'un Conseil Scientifique et d'un Comité de Pilotage. Une activité de contrôle des produits sortant des distilleries ou contenant de l'éthanol est également réalisée en routine par le laboratoire.

Enfin, des missions de services (études, conseils, formation, Kamoran...) sont réalisées auprès de la profession mais également avec ses clients et ce dans le monde entier.

L'UNGDA est également l'interface de la profession auprès des instances administratives françaises ou européennes pour tous les problèmes d'ordre technique, sécuritaire, réglementaire ou normatif liés à l'éthanol.

### **1.3.2 LERMAB**

Créé en 1993, le LERMAB EA4370 est un laboratoire pluridisciplinaire localisé en partie à la Faculté des Sciences et Techniques à Vandoeuvre en partie à L'Ecole Nationale Supérieure des Technologies et Industries du Bois (ENSTIB) à Epinal. Misant sur une approche cognitive basée sur des compétences scientifiques dans des domaines très variés tels que la biologie, la chimie, la physicochimie, la physique, le génie des procédés, la mécanique ou le génie civil, le laboratoire développe des recherches fondamentales et appliquées en relation avec le bois et les fibres naturelles impliquant de considérer le matériau de l'échelle macroscopique jusqu'au niveau moléculaire. De par son positionnement particulier lié à la nature de son objet d'étude,

le laboratoire joue un rôle privilégié d'interface entre la recherche et les industries de la filière bois au travers de collaborations avec différents centres de transfert technologique.

D'une manière générale, les recherches menées au laboratoire ont pour but de développer l'utilisation de la ressource lignocellulosique en tant que matériau d'une part, et en tant que source de matières premières pour des applications dans les domaines de la chimie et de l'énergie au travers du développement d'écoproduits ou procédés s'inscrivant dans une démarche de développement durable, d'autre part.

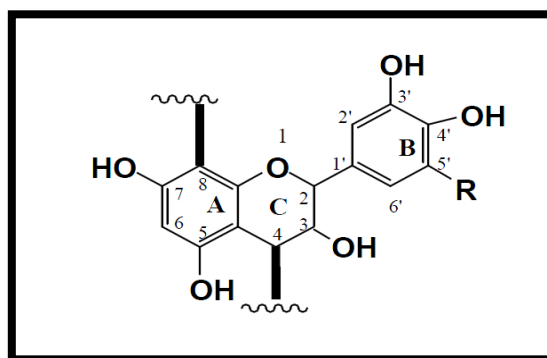
Le laboratoire compte un peu plus d'une quarantaine de permanents dont une trentaine d'enseignants-chercheurs et une trentaine d'étudiants en moyenne, selon les années inscrits en Master ou Doctorat. Il joue un rôle important tant au niveau de la formation par la recherche, qu'au niveau de la formation initiale en participant activement aux enseignements dans le domaine du bois dispensés à l'ENSTIB ou dans le cadre de la spécialité Bois Fibres Énergie Environnement (BF2E) du master FAGE. L'implication du laboratoire est également importante dans des disciplines plus traditionnelles comme la chimie, la chimie physique ou le génie des procédés au niveau Licence comme au niveau Master.

Ce stage s'est déroulé dans les locaux du groupe « valorisation chimique de la biomasse » de l'axe de recherche Matériau dirigé par le professeur Nicolas Brosse au sein de la Faculté des Sciences et Technologies de Vandœuvre-lès-Nancy. Les travaux menés par ce groupe de recherche visent à la valorisation des ressources lignocellulosiques à travers la notion de bioraffinerie. Le but est donc de trouver des procédés de fractionnement des composants de la biomasse pour pouvoir la valoriser dans son ensemble. Ces recherches font appel à des notions dans les domaines de l'énergie, des matériaux, de l'agro-alimentaire, de la chimie ou de la biochimie.

## 1.4 Rappels bibliographiques

Les tanins de marc de raisin sont principalement composés de proanthocyanidines ou tanins catéchiques. Ce sont des composés formés à partir d'unités monomériques ou polymériques de flavan-3-ols (*figure 1*) (Haslam, 1980 ; Escribo-Bailon et al., 1992).

Les proanthocyanidines sont composées d'unités procyanidine et prodelphinidine qui sont reliées entre elles par une liaison C4-C8 (Pizzi, 1993, voir *figure 1*). Ce contenu polyphénolique élevé constitue un inconvénient pour une utilisation des marcs comme aliments pour animaux. Ils pose des problèmes de pollution potentielle lorsque il est utilisé comme engrais pour le sol (Morthup et al., 1998).



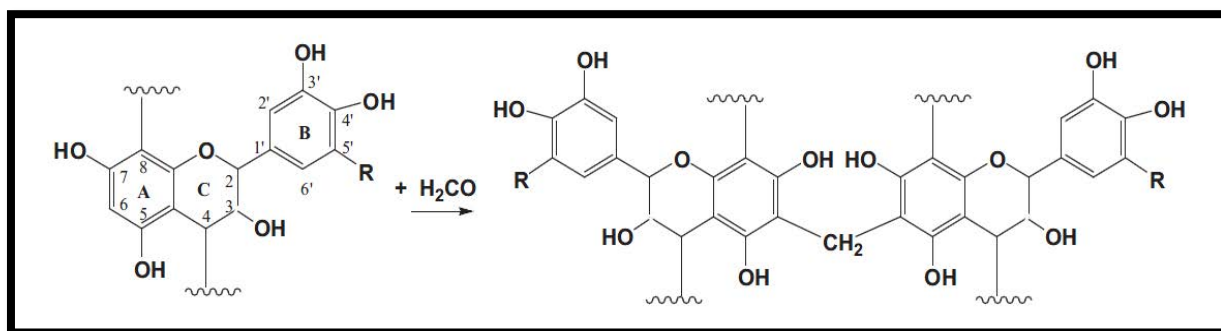
$R=H$  : procyanidine ;  $R=OH$  : prodelphinidine  
**Figure 1** : Structure chimique de proanthocyanidines  
 (Pizzi, 1993).



Les colles de bois issues de tanins condensés-formaldéhyde ont été utilisées industriellement depuis les années 1970, pour le collage du bois intérieur et extérieur tels que les panneaux de particules et de contreplaqué (Pizzi, 2003). Elles sont obtenues par durcissement des polymères flavonoïdes par polycondensation avec le formaldéhyde impliquant leurs cycles réactifs comme le montre la figure 2.

Ainsi, il a été démontré que les tanins condensés sont à la fois chimiquement et économiquement intéressants pour la préparation d'adhésifs. Ils peuvent être correctement utilisés en tant que substituts pour le phénol dans la production de résines. Les tanins condensés utilisés dans les études précédentes sont généralement extraits de l'écorce de divers arbres comme le mimosa, le quebracho ou le pin (Panamgama, 2007).

Les techniques industrielles d'extraction sont des procédés simples, utilisant de l'eau comme solvant, à une température comprise entre 70 °C et 100 °C, généralement en présence d'une base (carbonate, bicarbonate) et de sulfite de sodium ou métabisulfite (Tondi and Pizzi., 2009; Lei et al., 2008; Pichelin et al., 2006, Pizzi, 2003).



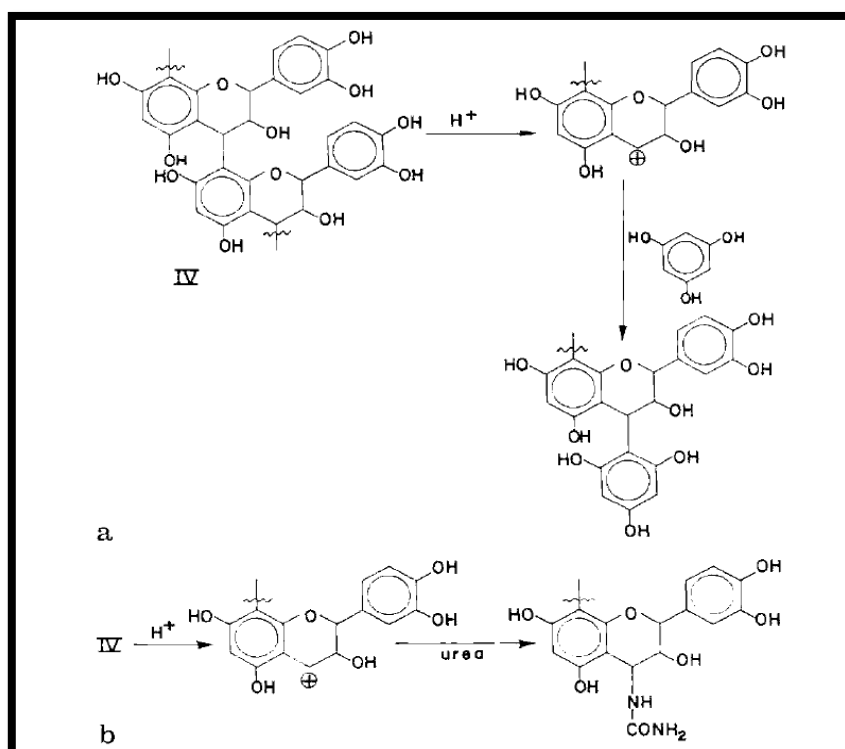
*R=H : procyanidine ; R=OH : prodelphinidine*

**Figure 2 :** Structure chimique de proanthocyanidines et sa réaction avec le formaldéhyde. (Ping et al., 2011).

A chaud, et en présence d'acides minéraux forts, les tanins sont susceptibles de réagir de deux manières différentes :

- Une réaction de dégradation des polymères qui mène à la formation de catéchine et d'anthocyanidines (Navarrete Fuentes, 2011).
- Une condensation résultant de l'hydrolyse des hétérocycles (liaisons p-hydroxybenzyléther). Les ions p-hydroxybenzylcarbonium créés se condensent alors avec les sites nucléophiles d'autres unités de tanin pour former les phlobaphènes (Navarrete Fuentes, 2011).

Le rendement du tanin de pin extrait pour une utilisation comme adhésif pour le bois peut être considérablement augmenté en réduisant au minimum l'autocondensation des tanins en phlobaphènes ce par l'addition de petites quantités d'un nucléophile (figure 3) l'urée (Sealy-Fisher et Pizzi., 1992).



**Figure 3 : a - Mécanisme de clivage de la liaison du tanin de pin inter-flavonoïde dans l'acide et du blocage de la réaction de l'autocondensation du tanin de phloroglucinol ou de résorcinol.**

**b - Mécanisme suggéré de l'action de l'urée dans le blocage dans la forme de carbocation par le clivage de liaisons inter-flavonoïde et de son blocage de l'autocondensation de tannin. (Sealy-Fisher et Pizzi., 1992).**

En outre, la sulfitation des tanins est l'une des réactions les plus anciennes et les plus utiles en chimie des flavonoïdes et peut être particulièrement utile dans la préparation des adhésifs à base de tanin. La sulfitation offre généralement une viscosité des tanins plus faible et augmente la solubilité (Pizzi, 1989).

Les deux effets sont dus aux quatre (4) facteurs ci-dessous décrits.

- L'élimination du groupe éther étherocyclique, qui est hydrofuge. En effet, les solutions de tanins extraits dans l'eau ne sont pas de vraies solutions, mais des suspensions hydrocolloïdes.
- L'introduction d'un groupe sulfonique et un autre groupe hydroxyle, tous deux hydrophiles.
- La diminution de rigidité de polymère, et une liaison hydrogène intermoléculaire obtenue par l'ouverture de l'hétérocycle.
- Hydrolyse acide des gommages hydrocolloïdes et de la liaison entre des motifs flavonoïdes.

Les études antérieures effectuées au LERMAB à partir de marcs de raisin ont démontré que l'utilisation d'ions sulfites pouvait permettre d'une part d'augmenter les rendements d'extraction et d'autre part, d'améliorer les propriétés adhésives des extraits de tanins. Les conditions réactionnelles retenues étaient de 2.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.5% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>.

De nombreuses méthodes chromatographiques ont été décrites dans la littérature pour analyser les proanthocyanidines (Nonier et al., 2004). La méthode d'HPLC phase normale et en phase inverse peut être utilisée pour séparer les proanthocyanidines. Cependant, ces méthodes sont limitées dans leur capacité à fournir toutes les informations concernant les distributions de masses moléculaires.

La Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC) est la méthode couramment employée pour déterminer la masse moléculaire des polymères (Nonier et al., 2004);

Cependant, la présence de groupes hydroxyles dans les molécules de tanin peut favoriser les interactions par adsorption sur le gel de la phase stationnaire ou la formation de liaisons intermoléculaires par liaison hydrogène, ce qui conduirait à l'estimation incorrecte de la masse moléculaire (Nonier et al., 2004). Ces phénomènes peuvent être minimisés par l'utilisation de phases mobiles très polaires, telles que le diméthylsulfoxyde (DMSO), diméthylformamide (DMF), ou le tétrahydrofurane (THF). Une autre procédure consiste à protéger les groupes hydroxyles en tant que dérivés acétylés, dérivés méthylés ou dérivés silylés. L'utilisation simultanée d'un éluant tel que le THF et de tanins acétylés donne de meilleurs résultats pour l'étude des distributions de masses moléculaires des tanins et d'autres biopolymères (Cadahia et al., 1996).

Dans le cadre du présent travail, des expériences ont été menées, afin d'analyser l'influence des concentrations des réactifs et des variations de pH ainsi que l'ajout de l'urée sur le taux d'extraction des tanins.

Les extraits obtenus ont notamment été analysés par Chromatographie d'Exclusion Stérique.

## 2 Matériels et méthodes

Dans un premier temps, suite à la mise au point des différentes conditions d'extraction des tanins, nous avons procédé à la séparation des tanins à partir des marcs de raisin puis dans un second temps nous avons caractérisé les tanins par différentes techniques expérimentales telles que la spectrométrie ultra violet (UV), la résonance magnétique nucléaire du carbone 13, le dosage des sucres par (HPAEC-PAD), et enfin l'analyse des tanins par Chromatographie d'Exclusion Stérique.

### 2.1 Matière première

Trois types de marcs on été utilisés :

Des marcs de raisins provenant de la vendange de l'année 2011, fournis par la distillerie vinicole du Blayais, située dans le Bordelais en Gironde. Issus du vin rouge, les marcs sont frais, non broyés, avec une humidité d'environ 70 %, composés d'un mélange de cépages.

Les marcs de raisins provenant de la vendange de l'année 2011 également, fournis par la distillerie vinicole « UDM - Union de la Distillerie de la Méditerranée », située à Vauvert dans le département du Gard. Issus du vin rouge, les marcs sont secs et broyés, avec une humidité d'environ 10 %.

Et enfin, les marcs de raisins provenant de la vendange de l'année 2010, fournis par la distillerie Jean Goyard, située à Ay dans le département de la Marne. Issus du vin blanc, les marcs sont secs et broyés, avec une humidité d'environ 8 %.

### 2.2 Extraction des Tanins

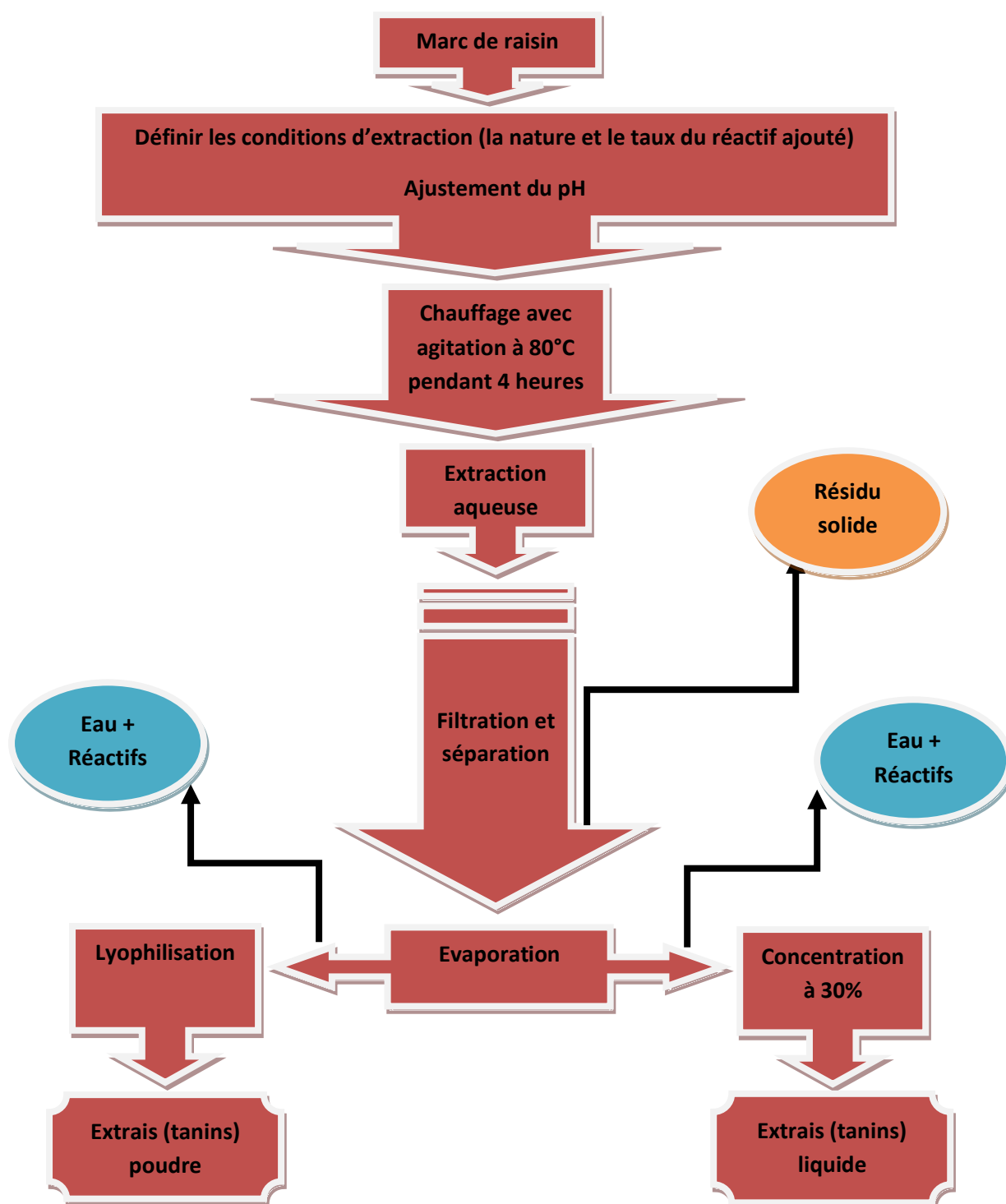
On a utilisé dans cette partie d'étude, des marcs de raisins fournis par la distillerie Blayais (*figure 4*). L'étude a été menée sur un seul type de marc pour éviter les variations dues aux différences d'humidité, de masse sèche, et de caractéristiques de biomasse.



**Figure 4 :** Marcs de raisin frais et après lyophilisation.

La *figure 5* montre le procédé d'extraction des tanins étudiés : on a utilisé de l'hydroxyde de sodium (NaOH), du sulfite de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), du bisulfite de sodium (NaHSO<sub>3</sub>), et du

carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) comme réactifs, selon les conditions données dans le *tableau 2*. Pour certains essais de l'urée a été ajoutée (*voir tableau 2*).



*Figure 5 : Schéma du procédé d'extraction des tanins de marc de raisin*

Dans un ballon de 2 L, on introduit 150 g de marc de raisin, puis une solution aqueuse contenant les réactifs d'extraction dont le volume d'eau est égal à 6 fois le volume de marc

utilisé calculé sur la masse sèche; la solution est mise dans un bain marie chauffé à 80 °C avec agitation pendant 4 heures.

On procède ensuite à la séparation et la filtration qui se fait à l'aide d'un Büchner sous vide. On a utilisé un entonnoir de Büchner avec une rondelle de papier filtre et une fiole à vide reliée à une source de vide. On obtient alors un filtrat liquide noir rougeâtre et un résidu solide.

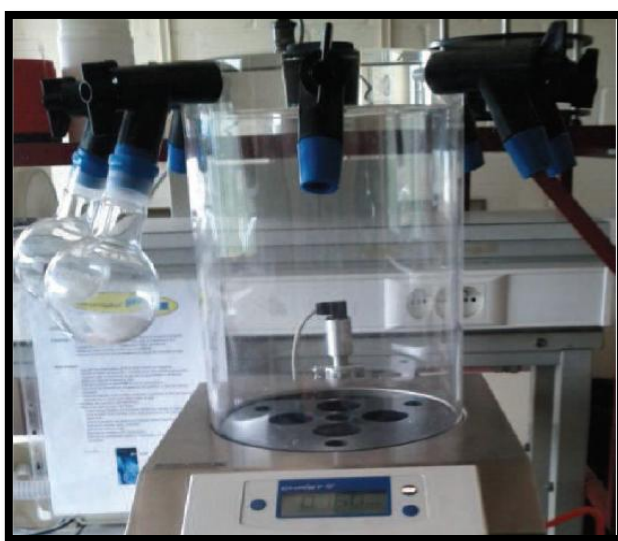
La fraction liquide récupérée est ensuite concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 60 °C.

Deux procédés ont été adoptés pour le conditionnement du filtrat :

- 1°/ la fraction liquide a été congelée à l'azote liquide et lyophilisée (l'eau est sublimée à basse température et très basse pression) à l'aide du lyophilisateur présenté sur la *figure 6*; une poudre de tanins a donc été obtenue, plus facile à utiliser pour les analyses et conservable sans variation des propriétés.

Le rendement de l'extraction a été calculé avec la formule :

$$\text{Rendement} = (\text{masse lyophilisée} / \text{masse de marc sec}) * 100$$



**Figure 6 :** *Lyophilisateur.*

- 2°/ Concentration à 30 % de la fraction liquide au niveau de l'évaporateur rotatif. L'avantage de cette technique est le gain de temps permettant de faire les analyses de temps de gel et l'analyse des tanins par SEC en phase aqueuse sans rajout d'eau.

$$\text{Rendement} = (\text{Masse sèche} * \text{Masse totale} / \text{Masse de marc initial}) * 100$$

## 2.3 Lignine de Klason

0,175 g de matière à analyser (calculée sur masse sèche) a été traitée avec 1,5 mL d'acide sulfurique à 72 % pendant une heure dans un bain à 30 °C afin d'hydrolyser totalement les polysaccharides. Le mélange a ensuite été dilué jusqu'à une concentration en acide de 3 % (par ajout d'eau distillée) afin de précipiter les composés insolubles (polyphénols). Cette réaction a eu lieu dans un autoclave porté à 121 °C et 1,5 bar pendant une heure.

Les échantillons ont été refroidis à l'aide d'eau fraîche puis filtrés. Une fraction solide et une fraction liquide ont alors été obtenues :

**La fraction solide** donne le taux de lignine de Klason, calculé en pourcentage de matière sèche. Pour cela, la fraction solide est pesée après une nuit passée à l'étuve à 105 °C. Cette fraction contient les composés qui ne sont pas dissous avec une attaque acide (comme les tanins). Il n'est pas judicieux d'utiliser cette méthode pour déterminer le taux de tanins de nos échantillons, d'autres composés phénoliques ou non phénoliques (protéines, inorganiques) pouvant être présents.

**La fraction liquide** contient les sucres hydrolysés sous forme de monomères. Elle renseigne donc le taux de polysaccharides (cellulose, hémicelluloses et pectines) contenu dans la matière via analyse de ces monomères par chromatographie ionique (*figure 7*).



*Figure 7 : Chromatographie ionique.*

## 2.4 Temps de gel

Le temps de gel est défini comme l'intervalle de temps entre l'introduction du catalyseur dans un adhésif liquide et la formation d'un gel. La solution de base de l'adhésif (une solution aqueuse à 30 % de tanin en masse) a été placée dans un tube à essai. Après ajout de 5 % de paraformaldéhyde par rapport à la masse de tanin, ce tube a été maintenu dans un bain d'eau à une température de 100 °C et le mélange a été agité de manière régulière à l'aide d'un fil torsadé (*figure 8*). Le temps de gel représente le temps nécessaire pour coller à compter du moment où l'ensemble a été placé dans le bain.

Cette analyse se fait à pH donné, celui-ci peut être ajusté afin d'optimiser le temps de gel. Il est ajusté à l'aide d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 33 % et d'acide chlorhydrique (HCl) à 4M.

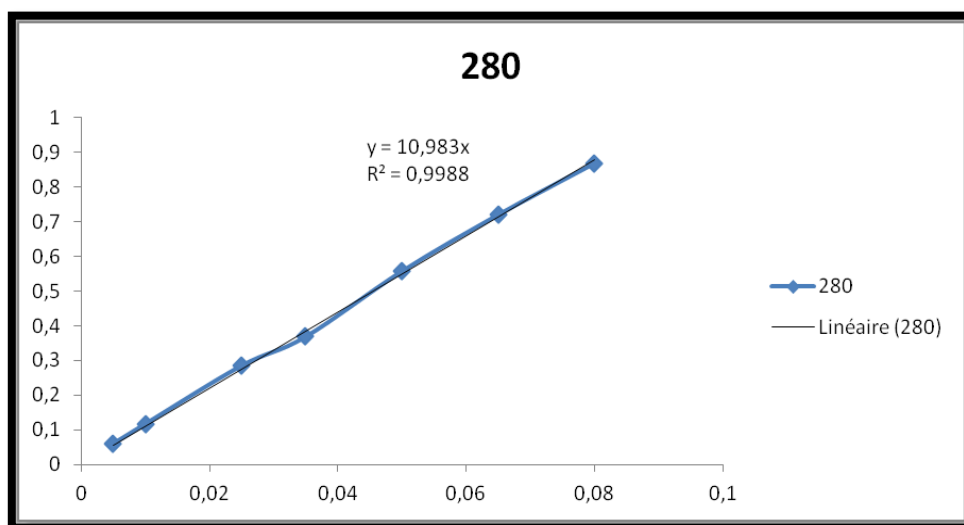


**Figure 8 :** Fil utilisé pour la mesure du temps de gel.

Pour chaque série, deux essais ont été effectués. Le but de l'étude était d'obtenir un temps de gel de moins de 300 secondes.

## 2.5 Spectrophotométrie Ultraviolet (UV)

Une courbe standard a été préparée à partir d'une série de solutions de tanin de marc de raisin de concentrations connues à l'aide d'un Varian 2550 UV-vis de numérisation spectrophotomètre (*Figure 9*). Cette méthode a été étendue afin de déterminer la teneur en matière polyphénolique des tanins extraits obéissant à la loi de Beer-Lambert. Dans une cuve en quartz de 1 cm de largeur, on introduit environ 1 ml de la solution de tanin à analyser (0,5 mg d'extrait de tanin brute dilué dans 10 ml d'eau distillée), après quelques minutes l'absorbance est lue à une longueur d'onde à 280 nm au spectrophotomètre UV-visible 2550.



**Figure 9 :** Courbe étalon avec la catéchine hydrate



## 2.6 Dosage des Sucres par : HPAEC-PAD analyses

Les sucres sont dosés et identifiés par HPAEC-PAD. Les analyses sont effectuées sur une chaîne chromatographique du type DIONEX ICS-3000 équipée de colonne Carbowax PA20 DIONEX. (3x150 mm) avec une colonne de garde (3x50mm) comme phase stationnaire permettant de séparer et d'identifier les sucres selon leurs tailles. La phase mobile est préparée par dilution d'une solution NaOH 46-48 % dans l'eau ultra-pure.

Monosaccharides et acides uroniques sont séparés respectivement en utilisant des conditions isocratiques et un gradient d'élution linéaire.

Tous les éluants ont été dégazés avant utilisation à l'hélium pendant 20 minutes, ils ont ensuite été maintenus sous une pression constante d'hélium (éluant module de dégazage, DIONEX). La colonne a été lavée avant le dosage pendant 10 min avec 250 mM de NaOH dans le but de rééquilibrer le système de dosage.

Les échantillons ont été injectés dans une boucle complète de 25  $\mu$ L et les séparations ont été effectuées à 35 °C à une vitesse de 0.4 mL/min. La séquence d'impulsions pour la détection ampérométrique pulsée est composée d'un potentiel de +100 mV (0-200ms), +100 mV (200-400 ms), -2000mV (410-420 ms), + 600 mV (430ms), et -100mV (440 -500ms).

Les étalons sont le rhamnose, le galactose, l'arabinose, le glucose, le mannose, le xylose, l'acide galacturonique et l'acide glucuronique.

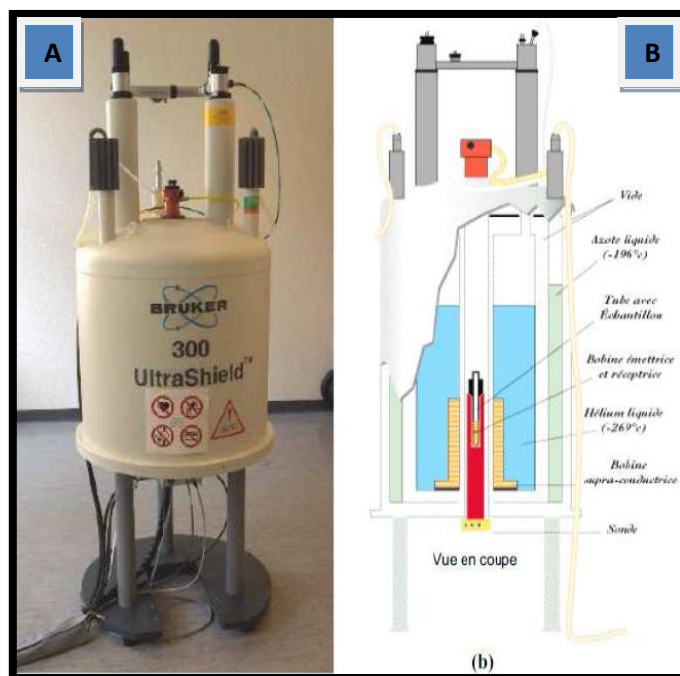
## 2.7 Spectre $^{13}\text{C}$ -RMN

Méthode utile pour déterminer la structure des composés, la spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (*figure 10*) permet de préciser la formule développée, la stéréochimie et dans certains cas la conformation du composé étudié (Navarrete Fuentes, 2011).

La RMN tire des informations de l'interaction qui naît entre les noyaux des atomes et certains éléments présents dans l'échantillon étudié et le champ magnétique intense et constant, produit par un aimant, auquel on le soumet. Le document de base fourni par tous les appareils est le spectre RMN.

Le spectre RMN correspond à l'absorption par certains atomes de l'échantillon, de certaines des fréquences présentes dans la source électromagnétique. L'interprétation de ces signaux (position, aspect, intensité) conduit à un ensemble d'informations d'où l'on déduit des détails de structure concernant l'échantillon. Ces essais peuvent être effectués en phase liquide ou solide (Navarrete Fuentes, 2011).

Les spectres de RMN ont été réalisés sur un appareil Bruker 300 à une fréquence de 300 MHz au service commun de RMN à l'Université de Nancy 1. Environ 1 (g) de tanins sont versés dans un tube à essais additionnées de 0,5 ml de l'eau lourde, Deutérium oxyde ( $\text{D}_2\text{O}$ ). On a utilisé un échantillon de tanin issu de marcs de Blayais pour les analyses.



**Figure 10 :** Appareil (A) et Schéma de RMN (B).  
(Navarrete Fuentes, 2011).

## 2.8 Analyse des Tanins par Chromatographie d'Exclusion Stérique après l'acétylation en solvant organique (THF)

Les échantillons de tanins lyophilisés ont été acétylés (5-10 mg) dans un mélange pyridine - l'anhydride acétique (1:1, 2 ml) pendant une nuit à température ambiante. Le précipité obtenu en versant ce mélange dans de l'eau distillée a été récupéré par filtration sous vide ou, pour les échantillons pour lesquels aucun précipité n'était visible, par trois extractions successives avec du diéthyle éther suivies d'une filtration.

L'analyse, en utilisant un solvant organique (THF) comme phase mobile a été envisagée après l'acétylation, (2-5 mg/mL) ont été ajoutés à chaque échantillon pour les analyser par Chromatographie d'Exclusion Stérique de type (UltiMate 3000, Dionex) qui contient différents modules :

Une pompe isocratique qui assure le débit et la pression. Des passeurs d'échantillons qui garantissent des injections fiables, précises et exactes, les échantillons sont dissous dans 20mg/ml de solvant et le débit a été fixé à 1ml/min). Un four à colonne formé d'une colonne de garde et deux colonnes P4000 et P3000 (Polysep-GFC-P). Pendant l'analyse la température du four à colonne était fixé à 40 °C. Et enfin, des détecteurs qui sont disponibles pour la détection d'une large gamme de composés, en UV 280\_nm; et en indice de réfraction (IOTA2).

Pour l'exploitation des données, le logiciel Chromeleon version 6.8 (Dionex corp, USA) a été utilisé, une courbe d'étalon a été réalisée avec 1,5 ml de THF ajouté à 4 à 5 mg de polystyrène. Le mélange a ensuite été soumis à ultra sons pendant 5 min à 4000 RPM, à partir de 5 poids moléculaires différents de : PS162, PS820, PS1920, PS3700, PS8620.

## 3 Résultats et discussion

### 3.1 Composition

La composition chimique des marcs utilisés dans cette étude a été définie en utilisant les méthodes utilisées au laboratoire (Lignine de Klason, Dosage des sucres). Deux échantillons de marcs issus de 3 distilleries (Blayais, Goyard et UDM) ont été analysés. Le *tableau 1* donné ci-dessous présente les résultats des analyses

	KL	Rhamn- ose	Arabinose	Galactose	Glucose	Xylose	Mannose	Acide Galactu- ronique %	Acide Glucu- ronique %
	%	%	%	%	%	%	%	%	%
BLAYAIS 1	41,86	0,2	0,57	0,71	7,14	3,05	1,17	1,26	0,18
BLAYAIS 2	44,27	0,1	0,44	0,6	6,03	2,23	1,03	0,97	0,15
GOYARD 1	54,34	0,43	1,01	1,46	14,09	3,19	1,13	3,40	0,3
GOYARD 2	56,34	0,42	1,04	1,48	14,25	3,43	1,13	3,37	0,3
UDM 1	54,34	0,3	0,99	1,22	11,93	4,32	1,24	2,5	0,25
UDM 2	54,97	0,31	1,06	1,3	12,66	4,55	1,3	2,63	0,27

*Tableau 1 : Taux de Lignine de Klason et des sucres des trois types de marc (Blayais, Goyard, et UDM)*

La fraction de lignine de Klason représente le taux en composés insolubles dans l'acide, elle contient les tanins condensés ainsi qu'une grande quantité d'autres polyphénols, les protéines et les composés inorganiques.

On note que, la reproductibilité pour une même distillerie est assez bonne, avec de faibles écarts obtenus. Par contre, on observe des différences assez importantes entre les distilleries.

On remarque que pour les tanins de Blayais (marcs frais et non broyés avec une humidité de 50 %), il n'y a pas uniquement des lignines de Klason et des sucres (taux de lignine de Klason + l'ensemble des sucres identifiés < 100 % de masse totale). Cela peut s'expliquer par la forte présence des polyphénols, des extractibles ou encore des huiles qui ne sont pas identifiables par notre technique d'analyse.

Le taux de lignine de Klason présente dans les marcs de Goyard et d'UDM est presque similaire de l'ordre de (54±2 %), par contre, elle est beaucoup plus faible dans les marcs de Blayais avec (41±3 %).

Le taux de lignine de Klason assez faible au niveau des marcs de Blayais, peut s'expliquer par une extraction des polyphénols et des tanins plus importante en amont au cours de la

vinification. En effet, les marcs traités dans la distillerie du Blayais proviennent essentiellement du vignoble bordelais qui produit des vins rouges plus tanniques.

Les teneurs en sucres dans les marcs de Blayais sont assez faibles, et représentent ( $11,50 \pm 3\%$ ) d'extrait de tanins. Les glucanes (issus essentiellement de la cellulose) sont majoritaires ( $6 \pm 1\%$ ). On observe également une teneur importante en xylane (hémicelluloses) et en acide galacturonique, et acide glucuronique due à la présence de pectines.

Les taux de cellulose et d'hémicelluloses sont quant à eux remarquablement plus importants au niveau des marcs de Goyard et UDM, de l'ordre de 21 % avec toujours, les glucanes majoritaires ( $12 \pm 2\%$ ). Cette composition est en accord avec les travaux précédents (Gambier, 2011).

La faible teneur en sucres au niveau du marc de Blayais peut s'expliquer par une hydrolyse partielle plus importante des polysaccharides durant les étapes de vinification.

### 3.2 Extraction des tanins

L'extraction des tanins a été étudiée en se basant sur les conditions préalablement définies au laboratoire à partir des marcs issus de la distillerie du Blayais. Nous nous sommes intéressés à faire varier la nature de la base (NaOH ou  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), le pH d'extraction, et la présence ou non d'urée.

Le *tableau 2* donné ci-dessous rassemble les conditions utilisées ainsi que les rendements d'extraction et les temps de gel des extraits.

Echantillon	Condition utilisée	Masse sèche / rendement	Temps de gel
1	Ratio 1:6 masse sèche : Eau 2 % $\text{NaHSO}_3$ (3 g) pH 8 / NaOH (0,33 gr - 0,22 %)	MS = 0,61 % Rendement = 2,32 %	20 s
2	Ratio 1:6 masse sèche : Eau 2 % $\text{NaHSO}_3$ (3 g) pH 8 / $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (0,78 g - 0,52 %)	MS = 0,69 % Rendement = 2,39 %	15 s
3	Ratio 1:6 masse sèche : Eau + 2 % d'Urée 2 % $\text{NaHSO}_3$ (3 g) pH 8 / NaOH (0,28 g - 0,18 %)	MS = 0,86 % Rendement = 2,69 %	Pas de temps de gel
4	Ratio 1:6 masse sèche : Eau + 2 % d'Urée Base : 2 % $\text{NaHSO}_3$ (3 g) pH 8 / $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (0,78 g - 0,52 %)	MS = 1,1 % Rendement = 3,25 %	12 s
5	Ratio 1:6 masse sèche : Eau 2 % $\text{NaHSO}_3$ (3 g) pH 11,44 / NaOH (0,5 g - 0,33 %)	MS = 0,77 % Rendement = 2,58 %	10 s
6	Ratio 1:6 masse sèche : Eau 2 % $\text{NaHSO}_3$ (3 g) pH 10 / $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (9,5 g - 14,25 %)	MS = 2,36 % Rendement = 8,18 %	9 s

7	Ratio 1:6 masse sèche : Eau 2 % NaHSO <sub>3</sub> (3 g) pH 10 / NaOH (0,4 g - 0,6 %)	MS = 0,76 % Rendement = 2,12 %	8 s
8	Ratio 1 :6 masse sèche : Eau 2 % NaHSO <sub>3</sub> (3 g) pH 9,16 / Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,1 g - 1,65 %)	MS = 0,88 % Rendement = 2,76 %	6 s
9	Ratio 1:6 masse sèche : Eau + 2 % d'Urée 2 % NaHSO <sub>3</sub> (3 g) pH 11 / NaOH (0,7 g - 1,05 %)	MS = 1,04 % Rendement = 3,69 %	Pas de temps de gel
10	Ratio 1:6 masse sèche : Eau + 2 % d'Urée 2 % NaHSO <sub>3</sub> (3 g) pH 10.30 / Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (4 g - 6 %)	MS = 1,84 % Rendement = 5,81 %	80 s

**Tableau 2 : Récapitulatif des rendements et temps de gel issus de différentes conditions d'extraction.**

On note que les rendements d'extraction de l'ordre de 2,5 % sont faibles comparés aux études antérieures « 5 % ±1 (Haoua, 2010), 10 % ±5 (Gambier, 2011) ».

Ces résultats confirment les observations précédentes concernant les taux de lignine de Klason relativement faibles pour les marcs du Blayais.

Les temps de gel sont généralement très faibles, inférieurs à 60 secondes, démontrant une réactivité importante des extraits vis-à-vis du formaldéhyde. Ces résultats sont très prometteurs pour des applications de colles.

Les différents traitements avec les bases NaOH et Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pour un même pH donnent des résultats assez proches. Ces résultats permettent d'envisager une substitution des ions carbonates par de la soude, qui est beaucoup moins chère, ce qui permet de faire des économies conséquentes au niveau industriel.

Il apparaît cependant que le temps de gel en utilisant le carbonate de sodium comme base est légèrement plus faible qu'en utilisant la soude. On note également qu'une augmentation du pH semble avoir un effet positif sur le temps de gel.

Enfin, l'ajout d'urée semble avoir un effet négatif quant à la réactivité des extraits (temps de gel élevé).

### 3.3 Spectrophotométrie Ultraviolet (UV)

En se basant sur la courbe étalon, faite sur la catéchine hydratée, nous avons obtenu l'indice d'absorbance  $y$ , avec  $y = 10,983 * x$ . En se basant sur l'équation :

**[Polyphénols g / l] = l'absorbance / 10,983.** A noter, que le taux de polyphénols a été obtenu avec la relation suivante :

**Taux de polyphénols = masse de polyphénols / masse sèche de tanins (0,05 g).**

La concentration des polyphénols des extraits de tanins a été calculée selon leur absorbance UV à 280 nm. Les résultats selon différentes conditions d'extraction sont donnés dans le *tableau 3* qui suit.

Echantillon	Conditions d'extraction	Absorbance	Taux de polyphénols
1	2% NaHSO <sub>3</sub> / pH 8 / 0,22 % NaOH	0,8138	148 %
2	2% NaHSO <sub>3</sub> / pH 8 / 0,52 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,58	105,6 %
3	2% NaHSO <sub>3</sub> / pH 8 / 0,18 % NaOH + 2% d'urée	0,1382	25 %
4	2% NaHSO <sub>3</sub> / pH 8 / 0,52 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 2% d'urée	0,6468	117,6 %
5	2% NaHSO <sub>3</sub> / pH 11,44 / 0,33 % NaOH	0,6329	115,2 %
6	2% NaHSO <sub>3</sub> / pH 10,30 / 6 % NaOH + 2 % d'urée	0,3731	67,8 %

**Tableau 3 :** Taux de polyphénols des extraits de tanins et leurs absorbance par le spectre UV à 280 nm.

On note des taux de polyphénols dépassant parfois les 100 %. Ceci pourrait être dû au fait que la référence utilisée absorbe moins en UV que les polyphénols contenus dans les extraits de tanins analysés.

On remarque que les échantillons traités avec de la soude contiennent, à pH égal, un taux de polyphénols beaucoup plus élevé que ceux traités avec le carbonate de sodium.

De plus, le taux de polyphénols dans les extraits analysés à pH plus basique (11,44) est plus faible qu'un pH de l'ordre de 8 dans le cas de la soude. Ce résultat est en accord avec les travaux précédents (Gambier, 2011). Par contre l'ajout de l'urée au carbonate de sodium semble ne pas avoir un effet sur le taux de polyphénols.

On note également que l'association de la soude avec l'urée donne un taux de polyphénols significativement faible.

Ces résultats confirment les observations précédentes obtenues à partir des temps de gel. Il semble donc y avoir une corrélation entre le temps de gel observé (et donc la réactivité des extraits) et le taux de polyphénols déterminé par dosage UV.

### 3.4 Spectre RMN <sup>13</sup>C

Le spectre RMN <sup>13</sup>C d'une fraction de tanin lyophilisée a été effectué en solution dans l'oxyde de deutérium (D<sub>2</sub>O). Le spectre est donné dans la *figure 11*. L'interprétation est basée sur les études précédentes (Fu et al., 2007; Zhang et al., 2010).

L'échantillon montre des caractéristiques compatibles avec la présence d'unités procyanidine. Plus précisément, C5, C7, et les carbones C8A de procyanidines apparaissent de 160 à 150 ppm. Les signaux à 145,3 et 145,5 appartiennent à C3' et C4' d'unités procyanidine. Une petite quantité de prodelfinidine est aussi détectée sous le pic de sa C4' et apparaît à 131 ppm, qui se chevauchent avec les déplacements chimiques de C1'.

Les attributions des numéros de carbones sont rapportées de la *figure 1*, page 6.

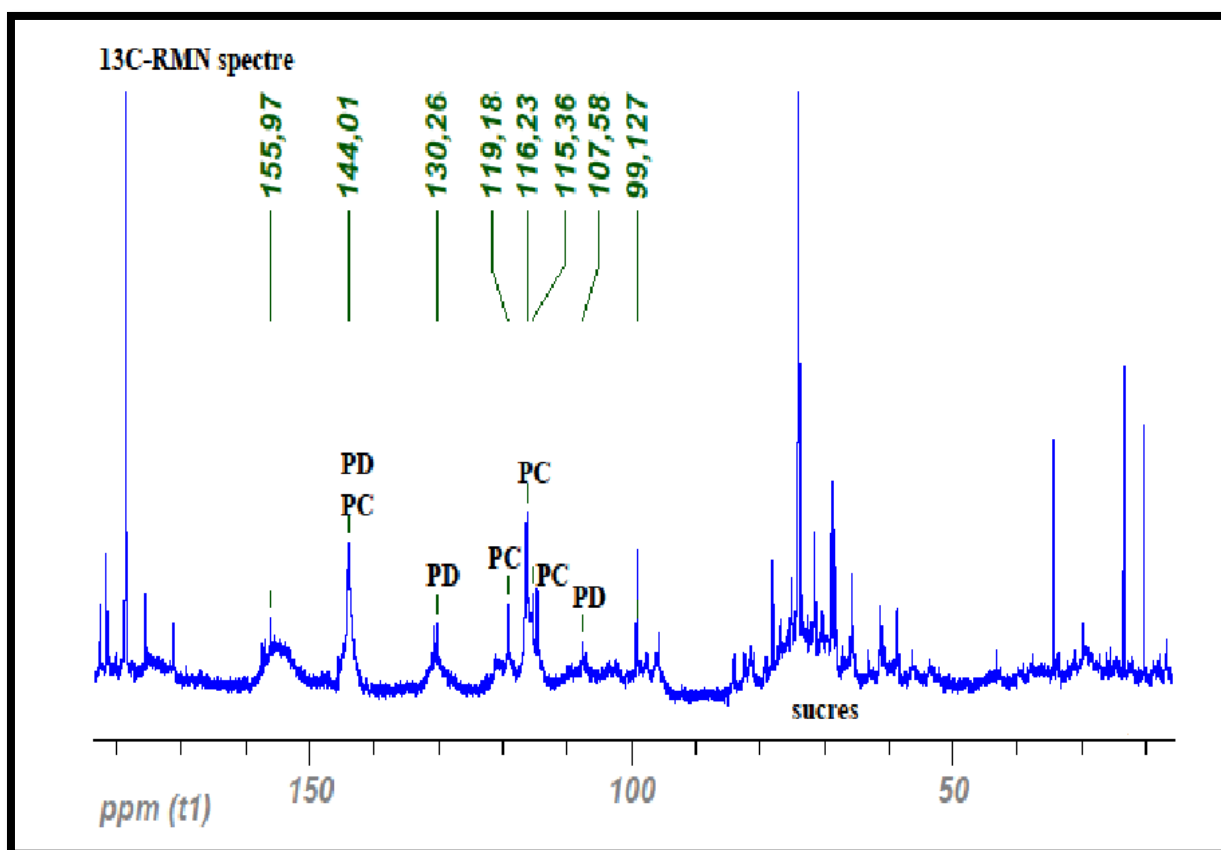


Figure 11 : Spectre  $^{13}\text{C}$ - RMN de tanin de marc de raisin de Blayais.

Le groupe de pics entre 90 et 110 ppm est attribué à C8, C6, C6', et C2' de procyanidines.

Une teneur relativement élevée en hydrates de carbone pourrait également être déduite par la forte intensité des pics à 65-85 ppm, qui est une caractéristique des sucres dans les extraits de tanin. Cette observation confirme les résultats décrits précédemment en ce qui concerne la faible teneur en sucre dans le résidu solide.

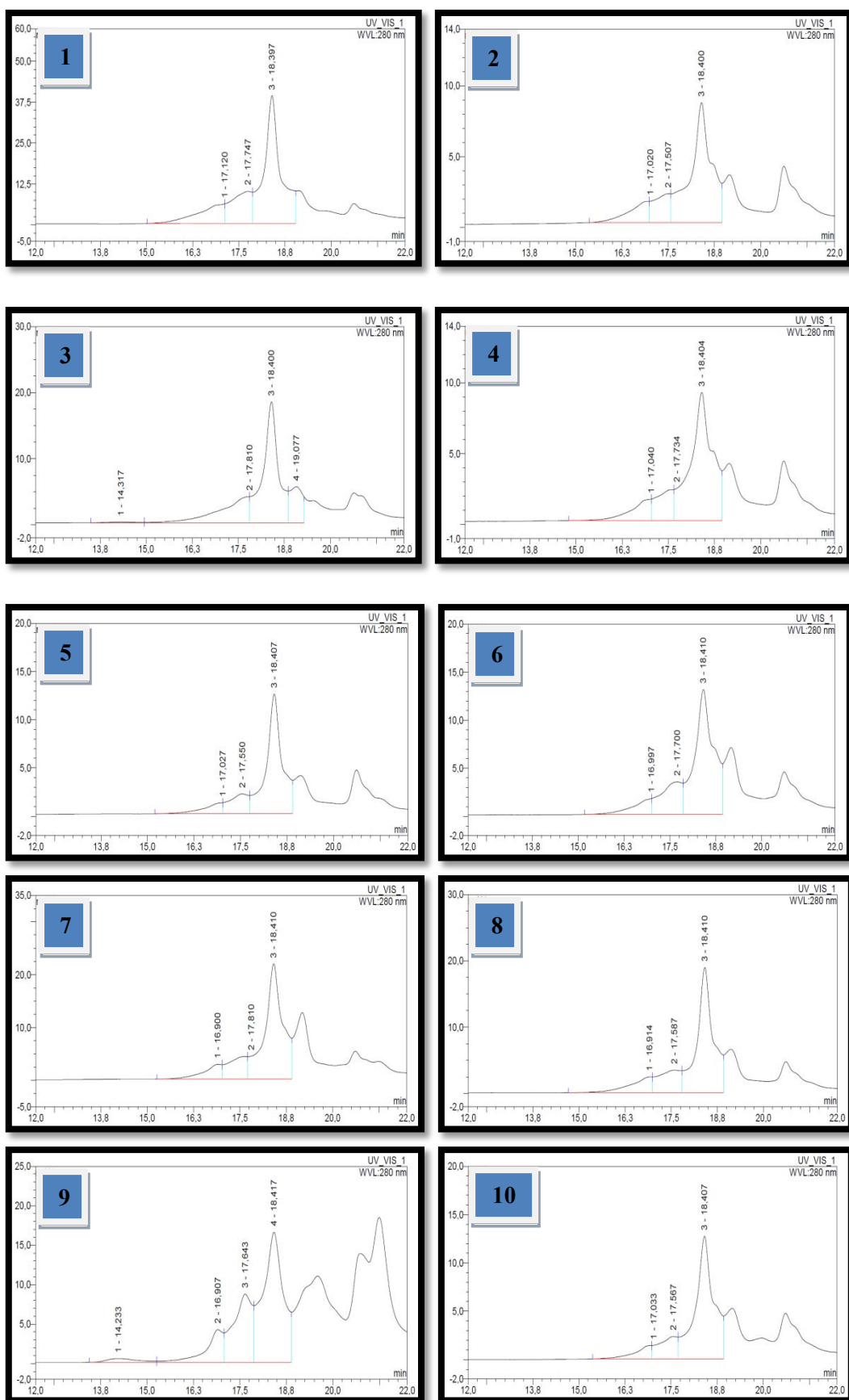
Un large signal de 170 à 182 ppm est observé suggérant la présence des groupes carbonyle qui peut être rationalisés par le réarrangement d'acide catechinique survenant lors du procédé d'extraction (Sears et al., 1974; Kiatgrajai et al., 1982).

La présence des signaux à 30 ppm, affectés au  $\text{CH}_2$  de l'acide catechinique, pourraient soutenir l'idée de la présence de l'acide catechinique dans les extraits de tanin.

### 3.5 Analyse par SEC

Les extraits de tannins ont été analysés par Chromatographie d'Exclusion Stérique après acétylation afin d'éviter les phénomènes d'agrégation, en utilisant le THF comme éluant, avec utilisation d'un étalon.

Les chromatogrammes de la figure 12, représentent les chromatogrammes et le tableau 4 rassemble pour chaque échantillon, le temps de rétention ainsi que la masse molaire calculée (courbe étalon établie avec standard de polystyrène, voir partie expérimentale).



**Figure 12 :** Chromatogrammes de différentes conditions d'extraction de marc de raisin caractérisés par SEC après l'acétylation en solvant organique.



Les signaux à environ 19 mn de temps de rétention correspondent à la catéchine (injectée seule après acétylation, spectre non rapporté ici).

Grâce à la courbe étalon, on peut attribuer les signaux présentant des temps de rétention de 17.02 mn, 17.51 mn, 18.40 mn et 19.16 mn respectivement aux tétramères, trimères, dimères et monomères. La masse molaire de la catéchine étant de  $290 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

On constate que les extraits isolés sont composés de fragments de relativement faibles masses molaires, la fraction dimère étant toujours majoritaire (*tableau 4*).

Echantillon 1	Tétramères	Trimères	Dimères	Monomères
Temps de rétention (min)	17,12	17,87	18,40	19,12
Poids moléculaire (g / mole)	1899	857	472	257
Echantillon 2				
Temps de rétention (min)	17,02	17,51	18,40	19,16
Poids moléculaire (g / mole)	1827	1004	505	248
Echantillon 3				
Temps de rétention (min)	14,32	17,81	18,86	19,08
Poids moléculaire (g / mole)	24916	1309	493	294
Echantillon 4				
Temps de rétention (min)	17,04	17,73	17,64	19,15
Poids moléculaire (g / mole)	1817	959	496	246
Echantillon 5				
Temps de rétention (min)	17,03	17,55	18,41	19,12
Poids moléculaire (g / mole)	1798	921	484	254
Echantillon 6				
Temps de rétention (min)	16,90	17,81	18,41	19,18
Poids moléculaire (g / mole)	1731	939	488	262
Echantillon 7				
Temps de rétention (min)	17	17,70	18,41	19,17
Poids moléculaire (g / mole)	1822	887	472	256
Echantillon 8				
Temps de rétention (min)	16,91	17,59	18,41	19,12
Poids moléculaire (g / mole)	1968	929	479	257
Echantillon 9				
Temps de rétention (min)	14,23	16,91	17,64	18,42
Poids moléculaire (g / mole)	24317	1758	859	487
Echantillon 10				
Temps de rétention (min)	17,03	17,57	18,41	19,16
Poids moléculaire (g / mole)	1761	657	487	276

**Tableau 4 :** Masses des polymères correspondantes aux conditions d'extraction.

La comparaison des échantillons 1 et 2 puis 5 et 6 montre qu'en présence de carbonates, la concentration en monomères est plus importante que celle obtenue en présence de soude. Ce résultat est en accord avec les Temps de gel précédemment décrits (Temps de gel carbonate < Temps de gel NaOH), les monomères présentant toujours une réactivité supérieure aux oligomères vis-à-vis du formaldéhyde.

Les chromatogrammes ne montrent pas de différences significatives au niveau des distributions de masse pour les essais réalisés avec et sans urée. La différence de réactivité observée (temps de gel) ne semble donc pas être liée aux masses molaires des tanins extraits.

L'essai 9 correspond à un chromatogramme présentant une allure différente des autres extraits : un pic correspondant à de très fortes masses molaires (14 mn) accompagnées de molécules de faibles masses molaires 19-20 mn. Compte tenu de la faible réactivité de cet extrait vis-à-vis du formaldéhyde, des réactions de dégradation des tanins dans les conditions fortement basiques utilisées peuvent être évoquées.

## 4 Conclusions et perspectives

Dans un premier temps, nous avons montré, en nous appuyant sur une étude bibliographique ainsi que sur l'expérimentation de différentes conditions d'extraction des tanins de marcs de raisin en milieu basique, respectueuse de l'environnement, qu'il était possible d'envisager une substitution des ions carbonates par de la soude. Des temps de gel très faibles, inférieurs à 60 secondes, ont été obtenus démontrant une réactivité importante des extraits obtenus à partir de marcs de la distillerie du Blayais (qui sont principalement des polyphénols déterminés par dosage UV et confirmé par Spectre RMN  $^{13}\text{C}$ ) vis-à-vis du formaldéhyde. Ces résultats sont très prometteurs pour des applications de colles. L'ajout d'urée semble avoir un effet négatif quant à la réactivité des extraits (temps de gel élevé).

La deuxième partie de notre travail consistait en la détermination de la composition chimique des marcs. Il a été démontré un taux relativement faible de lignine de Klason et de sucre au niveau des marcs de Blayais, cela pouvant s'expliquer par une extraction des polyphénols et des tanins plus importante en amont au cours de la vinification et l'hydrolyse partielle des polysaccharides durant le traitement d'extraction.

La troisième partie de notre travail avait pour but de définir une méthode de suivi chromatographique du procédé d'extraction permettant de mieux caractériser les extraits. Cela a conduit à des résultats préliminaires encourageants qu'il conviendra de confirmer par des études complémentaires. La Chromatographie d'Exclusion Stérique après acétylation en utilisant le THF comme éluant a été utilisée. On a noté, qu'en présence de carbonates, la concentration en monomères est plus importante qu'en présence de soude. Les chromatogrammes ne montrent pas de différences significatives au niveau des distributions de masse pour les essais réalisés avec et sans urée. La différence de réactivité observée (temps de gel) ne semble donc pas être liée aux masses molaires des tanins extraits.

Pour l'avenir, il serait intéressant d'utiliser d'autres techniques d'analyse, notamment la chromatographie liquide haute pression. Il semble également intéressant de poursuivre ce type de recherche sur d'autres types de marcs, l'objectif étant toujours d'optimiser les conditions d'extraction et d'améliorer la caractérisation des extraits.

## 5 Bibliographie

**Escribo-Bailon, M. T., Gutierrez-fernandez, Y., Rivas-gonzalo, J. C., Santos- Buelga, C., 1992.** Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del Pais grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40, 1794-1799.

**Cadahia, E., Garcfa-Vallejo, M.C., Fernfindez, B., 1996.** Gel Permeation Chromatographic Study of the Molecular Weight Distribution of Tannins in the Wood, Bark and Leaves of *Eucalyptus* spp. *Chromatographia*. Vol 42, No 1/2.

FAO STAT Database in [www.fao.org](http://www.fao.org).

**Fu, C., Loo, A.E.K., Chia, F.P.P., Huang, D., 2007.** Oligomeric proanthocyanidins from mangosteen pericarps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 7689–7694.

**Gambier, F., 2011.** Vers une production industrielle de panneaux de particules conçus à partir de pulpe de raisin. Faculté des Science et Technique Nancy 1, Master 2, p 33.

**Haoua, K., 2010.** Extraction et utilisation des Tanins de Marcs de Raisin pour la production d'adhésif pour le Bois. Faculté des Science et Technique Nancy 1, Master 2, p 34.

**Haslam, E., 1980.** In *Vino veritas: Oligomeric procyanidins and ageing of red wines*. *Phytochemistry*. 19, 2577-2582.

**Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., Schieber, A., 2004.** Polyphénol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera*) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 4360-4367.

**Kiatgrajai, P., Wellons, J.D., Gollob, L., White, J.D., 1982.** Kinetics of epimerization of (+)-catechin and its rearrangement to catechinic acid. *Journal of Organic Chemistry*. 47, 2910–2912.

**Laufenberg, G., Kunz, B., Nystroem, M., 2003.** Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology*. 87, 167-198.

**Lei, H., Pizzi, A., Du, G., 2008.** Environmentally friendly mixed tannin/lignin wood resins. *Journal of Applied Polymer Science*. 107 (1), 203–209.

**Morthup, R.R., Dahlgren, R.A., McColl, J.G., 1998.** Polyphenols as regulators of plant-litter-soil interactions in northern California's pygmy forest: a positive feedback? *Biogeochemistry*. 42 (1–2), 189–220.

**Navarrete Fuentes, P., 2011.** Adhésifs naturels à base de tanin, tanin/lignine et tanin/gluten pour la fabrication de panneaux de bois. Faculté des Science et Technique Nancy 1, Thèse, p. 16-44.

**Nonier, M.F., Absalon, C., Vivas, N., Vivas, G.N., 2004.** Application of off-line size-exclusion chromatographic fractionation–matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for proanthocyanidin characterization. *Journal of Chromatography*. 1033, 291–297

**Panamgama, L.A., 2007.** Polyphenolic Extracts of *Pinus radiata* Bark and networking Mechanisms of Additive-Accelerated Polycondensates. *Journal of Applied Polymer Science*. 103, 2487-2493.

**Pichelin, F., Nakatani, M., Pizzi, A., Wieland, S., Despres, A., Rigolet, S., 2006.** Structural beams from thick wood panels bonded industrially with formaldehyde-free tannin adhesives. *Forest Products Journal*. 56 (5), 31–36.

**Ping, L., Brosse, N., Chrusciel, L., Navarrete, P., Pizzi, A., 2011.** Extraction of condensed tannins from grape pomace for use as wood adhesives. *Industrial Crops and Products*. 33, 253-257.

**Ping, L., Pizzi, A., Guo, Z.D., Brosse, N., 2011.** Condensed tannins extraction from grape pomace: Characterization and utilization as wood adhesives for wood particleboard. *Industrial Crops and Products*. 34, 907-914.

**Pizzi, A., 1993.** *Wood Adhesives Chemistry and Technology*. Marcel Dekker, New York. 5, 149-165.

**Pizzi, A., 1989.** Tannin-based wood adhesives in Chemistry and technology. Council for Scientific and Industrial Research, Pretoria. Vol 2, 212-213.

**Pizzi, A., 2003.** Natural phenolic adhesives I: Tannin. In: *Handbook of Adhesive Technology* (2nd Edition., Revised and Expanded). 573–587.

**Pizzi, A., 2006.** Recent developments in eco-efficient bio-based adhesives for wood bonding: opportunities and issues. *Journal of Adhesion Science and Technology*. 20 (8), 829–846.

**Sealy-Fisher, V.J., Pizzi, A., 1992.** Increased pine tannins extraction and wood adhesives development by phlobaphenes minimization. *Holz Roh Werkst*. 50, 212–220.

**Sears, K.D., Casebier, R.L., Hergert, H.L., Stout, G.H., McCandlish, L.E., 1974.** The Structure of catechinic acid. A base rearrangement product of catechin. *The Journal of Organic Chemistry*. 39 (22), 3244–3247.

**Tondi, G., Pizzi, A., 2009.** Tannin-based rigid foams: characterization and modification. *Industrial Crops and Products*. 29 (2–3), 356–363.

**Torres, J.L., Varela, B., García, M.T., Carilla, J., Matito, C., Centelles, J.J., Cascante, M., Sort, X., Bobet, R., 2002.** Valorization of grape (*Vitis vinifera*) by products. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (26), 7548–7555.

**Zhang, L.L., Lin, Y.M., Zhou, H.C., Wie, S.D., Chen, J.H., 2010.** Condensed tannins from mangrove Species *Kandelia candel* and *Rhizophora mangle* and their antioxidant activity. *Molecules* 15, 420–431.

## 6 Table des figures et tableaux

<b>Figure 1 :</b> Structure chimique de proanthocyanidines.....	<b>6</b>
<b>Figure 2 :</b> Structure chimique de proanthocyanidines et sa reaction avec le formaldehyde. ....	<b>7</b>
<b>Figure 3 :</b> a - Mecanisme de clivage de la liaison du tanin de pin inter-flavonoïde dans l'acide et du blocage de la reaction de l'autocondensation du tanin de phloroglucinol ou de resorcinol b - Mecanisme suggeré de l'action de l'uree dans le blocage dans la forme de carbocation par le clivage de liaisons inter-flavonoïde et de son blocage de l'autocondensation de tannin. ....	<b>8</b>
<b>Figure 4 :</b> Marcs de raisin frais et apres lyophilisation. ....	<b>9</b>
<b>Figure 5 :</b> Schema du procede d'extraction des tanins de marc de raisin .....	<b>10</b>
<b>Figure 6 :</b> Lyophilisateur. ....	<b>11</b>
<b>Figure 7 :</b> Chromatographe ionique. ....	<b>12</b>
<b>Figure 8 :</b> Fil utilisee pour la mesure du temps de gel. ....	<b>14</b>
<b>Figure 9 :</b> Courbe etalon avec la catechine hydrate .....	<b>14</b>
<b>Figure 10 :</b> Appareil (a) et schema de RMN (b). ....	<b>16</b>
<b>Figure 11 :</b> Spectre <sup>13</sup> C- RMN de tanin de marc de raisin de Blayais.....	<b>21</b>
<b>Figure 12 :</b> Chromatogrammes de differentes conditions d'extraction de marc de raisin caracterises par sec apres l'acetylation en solvant organique. ....	<b>22</b>
<b>Tableau 1 :</b> Taux de lignine de klason et des sucres des trois types de marc (blayais, goyard, et UDM).....	<b>17</b>
<b>Tableau 2 :</b> Recapitulatif des rendements et temps de gel issus de differentes conditions d'extraction.....	<b>18-19</b>
<b>Tableau 3 :</b> Taux de polyphenols des extraits de tanins et leurs absorbance par le spectre uv a 280 nm. ....	<b>20</b>
<b>Tableau 4 :</b> Masses des polymeres correspondantes aux conditions d'extraction. ....	<b>23</b>

## 7 Résumé

Après une étude préliminaire qui a abouti à la conception d'un premier panneau de particules dont l'adhésif était principalement constitué de tanins de raisin, l'UNGDA et LERMAB ont décidé de continuer leur collaboration, afin d'optimiser le procédé d'extraction, dans le but d'une valorisation des marcs à l'échelle industrielle. Différentes conditions d'extraction ont été expérimentées, et une substitution du  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  par  $\text{NaOH}$  est envisageable, ce qui permet de faire des économies conséquentes au niveau industriel. L'ajout d'urée semble avoir un effet négatif quant à la réactivité des extraits (temps de gel élevé).

Les résultats de Spectrophotométrie Ultraviolette (UV) confirment la corrélation entre le temps de gel observé (et donc la réactivité des extraits) et le taux de polyphénols déterminé par dosage UV. Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  d'une fraction de tanin lyophilisé effectué en solution dans l'oxyde de deutérium ( $\text{D}_2\text{O}$ ), montre des caractéristiques compatibles avec celles des unités de procyanidine.

Une méthode d'analyse par chromatographie d'Exclusion Stérique a été développée, en utilisant le THF comme éluant, avec utilisation d'un étalon pour la caractérisation des extraits isolés. Il apparaît que la fraction dimère est toujours majoritaire; en présence de carbonates, la concentration en monomères est plus importante que celle obtenue en présence de soude.

### Mots clefs :

UNGDA, LERMAB,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaOH}$ , Tanins, Spectrophotométrie Ultraviolette, RMN  $^{13}\text{C}$ , procyanidine,  $\text{D}_2\text{O}$ , chromatographie d'Exclusion Stérique, THF.

## 8 Abstract

After a preliminary study that leads to the production of a first panel of the adhesive particles made primarily of grape tannins, UNGDA and LERMAB decided to continue their collaboration to further optimize the extraction process, in order to increase the value of marks on an industrial scale. Different extraction conditions were tested. It was demonstrated that a substitution of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  by  $\text{NaOH}$  is possible, and allows significant savings at the industry level. The addition of urea seems to have a negative effect on the reactivity of the extracts (high gel time).

Results of Ultraviolet Spectrophotometry (UV) confirmed the correlation between the gel time observed (and thus the reactivity of the extracts) and the rate of polyphenols determined by UV assay. The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of a fraction of lyophilized tannins, dissolved in deuterium oxide ( $\text{D}_2\text{O}$ ), showed characteristics consistent with those of procyanidin units.

A method of analysis by size-exclusion chromatography was developed, using THF as eluent, and using standards. The dimer fraction was found to be the more important. In presence of carbonates, the concentration of monomers is greater than in presence of sodium hydroxide.

### Keywords :

UNGDA, LERMAB,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaOH}$ , Tannins, Ultraviolet Spectrophotometry,  $^{13}\text{C}$  NMR, procyanidin,  $\text{D}_2\text{O}$ , size-exclusion chromatography, THF.