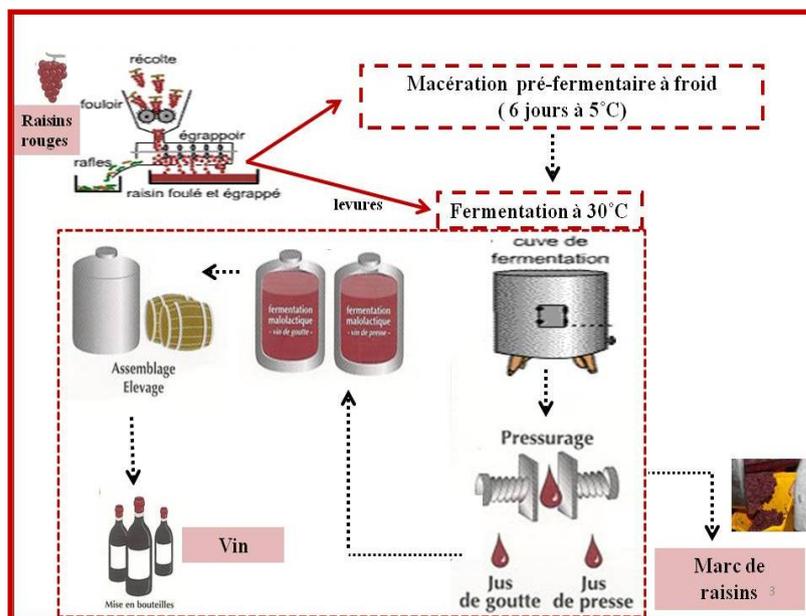


Par **Nada EL DARRA**

Les composés phénoliques des raisins : étude du potentiel qualitatif et des procédés émergents d'extraction

Thèse présentée
 pour l'obtention du grade
 de Docteur de l'UTC



Soutenue le 21 janvier 2013
Spécialité : Génie des Procédés Industriels et
 développement durable

D2060

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé dans le Laboratoire de Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable du Département de Génie des Procédés Industriels à l'Université de Technologie de Compiègne (UTC) et le laboratoire de Biochimie cellulaire du Centre d'Analyse et de Recherche (CAR) de la Faculté des sciences de l'Université Saint Joseph de Beyrouth (USJ). Au terme de ce mémoire, je tiens à remercier tous ceux qui, par leur aide, leur compétence et leur disponibilité, ont contribué à son aboutissement. L'expérience acquise, tant sur le plan technique que sur le plan humain, m'a été très précieuse.

Je tiens à remercier dans un premier temps le conseil de la recherche de l'Université Saint Joseph et la société Château KSARA S.A.L pour avoir financé ce projet de thèse. Je remercie également l'Université de technologie de Compiègne pour avoir contribué dans une partie du financement et m'avoir accueillie durant ces trois années de thèse. Un grand merci à l'Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV), spécialement, **Dr. Marie-Agnès DUCASSE** pour avoir accepté d'initier une collaboration avec l'UTC dans le cadre de ma thèse. Je te remercie Marie pour toutes les informations précieuses sur les polyphénols que tu m'as communiquée et surtout pour ta gentillesse et ta passion pour la recherche.

Je remercie le **Pr. Toufik RIZK**, doyen de la faculté des Sciences de l'USJ pour son accueil à la faculté et pour accepter d'être président de jury. Je tiens à remercier **Pr. Jean-louis LANOISELLÉ**, Professeur à l'Université de Bretagne-Sud ainsi que **Pr. Leila GEAGEA**, vice-présidente du centre supérieur de la recherche à l'Université Saint-Esprit de Kaslik qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et m'ont fait l'honneur de juger ce travail. Les conseils qu'ils m'ont prodigués m'aideront assurément dans mes travaux à venir. De même, je voudrais exprimer tous mes sincères remerciements à **Pr. Jihad ATIYE**, doyen de la faculté des Sciences à l'Université de Balamand, qui m'a fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail. Finalement, je remercie énormément **Monsieur Charles GHOSTINE**, l'avocat de la société Château KSARA S.A.L et membre invité dans mon jury pour accepter d'assister à la soutenance de ma thèse.

J'exprime toute ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse Professeur **Eugène VOROBIEV** qui a su partager et me communiquer son expertise, ses compétences et sa passion pour la recherche ainsi que me guider avec beaucoup de pédagogie par ses nombreux conseils. Je le remercie de m'avoir conseillée, encouragée, soutenue avec une disponibilité de tout instant et toujours avec bonne humeur tout au long de ces années,

sans oublier sa participation à la réalisation des publications. Sa disponibilité, ses qualités humaines et intellectuelles ont contribué à l'achèvement de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à mon directeur de thèse, Professeur **Nicolas LOUKA**, pour la confiance qu'il m'a témoignée et pour le temps qu'il a consacré pour diriger ce mémoire, mais surtout, pour avoir cru en mes capacités. Ce travail n'a pu être mené à bonne fin que grâce à sa collaboration de tout instant. Son esprit de synthèse et son érudition restent pour moi un exemple à suivre. Sa rigueur, son exigence et son soutien permanent sont pour beaucoup dans l'achèvement de ce travail.

J'exprime toute ma gratitude au Professeur **Richard MAROUN** pour m'avoir sélectionnée pour initier ce projet de thèse, pour m'avoir appris l'enthousiasme de la recherche scientifique. Merci pour m'avoir donnée l'occasion de continuer. Merci parce que j'ai senti dans chaque regard un encouragement et une grande confiance. Je te remercie pour ta sincérité et ton esprit large, pour le temps que tu m'as consacré tout au long de cette période, sachant répondre à toutes mes interrogations, sans oublier ta participation à la réalisation du manuscrit de cette thèse et des publications. Merci pour toute cette énergie positive que tu m'as transférée dans les moments d'incertitude et avant chaque grand combat.

Je voudrais remercier l'enseignant-chercheur **Dr. Nabil GRIMI** pour m'avoir aidée pendant la réalisation de cette thèse. La route de la thèse aurait été dure sans tes conseils, tes corrections et tes directives. Merci Nabil pour toutes les discussions sur le travail, les manipulations. Merci d'avoir consacré du temps pour rédiger les publications, pour avoir corrigé le manuscrit, merci pour ta patience et pour la présentation finale de ce travail. T'étais toujours là quand j'étais déprimée, tu me motivais et c'est grâce à toi que j'arrivais à poursuivre mon travail.

Un grand Merci à **Dr. Nadia BOUSSETTA** et **Dr. Mohammad TURK** pour leurs aides et leurs précieux conseils scientifiques. Je n'oublierai jamais vos soutiens pendant les moments difficiles, qui ne manquaient jamais.

Je remercie vivement **Mme Paulette CHLELA** de la cave de KSARA à Zahlé pour sa collaboration dans ce projet.

Je remercie également **Professeur Jean-louis ESCUDIER** pour le temps consacré pour corriger le manuscrit, pour son esprit ouvert, sa gentillesse et sa passion pour la recherche.

Un grand merci à **Monsieur Joseph YAGHI** pour son aide, sa disponibilité, sa gentillesse et sa confiance.

Un merci tout particulier à **Madame Mireille KALLASSY AWAD** qui m'a soutenue et encouragée pendant toutes ces années académiques. Pendant les baisses de moral, elle a toujours été présente. Merci pour son aide précieuse et ses conseils.

Pour mes très chers amis en France je vous remercie pour avoir été ma famille : **Nemer EL HAJJ, Audrey WRESZCYNski, Hoda DANDACH, Suzie, Rim, Sawsan, Michel, Ayman** ... pour tous vos supports administratif, moral et technique ainsi que pour les inoubliables moments de décompression, vos conseils, votre humour, vous étiez toujours là dans les moments les plus difficiles. Audrey je te remercie pour ton bon cœur sans limite, toi et Nemer vous étiez ma famille, je vous aime et je n'oublierai jamais nos soirées, nos voyages et nos fous rires.

Merci à la grande famille du département de génie des procédés industriels et plus particulièrement ceux qui ont contribué de près ou de loin par leur aide ou leur appui au bon déroulement de cette thèse: **Elisabeth VAN HECKE, Luhui DING, Jérémie CASTELLO, Bruno DAUZAT, Olivier BALS, Raphaëlle SAVOIRE, Maurice NONUS, Jihène BEN AMMAR, Maksym LOGINOVA, Morgane CITEAU, Natacha ROMBAUT, Houcine MHEMDI, Zhenzhou ZHU, Jessica MATAR....** Une pensée très chaleureuse à toute l'équipe, l'esprit qui nous rassemblait était unique. Les moments passés ensembles resteront gravés dans ma mémoire pour toujours.

Mes amis et collègues, à l'USJ je tiens à vous remercier pour m'avoir donné tout votre support moral et technique, vous vous êtes aussi montrés disponibles et m'avez permis l'accès au matériel et services dont j'avais besoin : **Dominique SALAMEH, Charbel AFIF, André KHOURY, Farah ABDEL SAMAD, Nour ABDEL SAMAD, Joyce KHEIR, Joanna TANNOUS, Hiba RAJHA, Rachelle KHOURY, Joelle, Majd ...** Je n'oublie surtout pas **Dr. Chadi MOHANNA** pour son soutien durant les moments difficiles. Je n'oublie pas non plus de remercier mes collègues de Conserves Moderne Chtaura, **Khodor KAROUT, Eizeddine CHERIF, Omar, Nadim, Hussein, Saad, Sanaa, Maya, ...** Mon directeur **Gilbert BOUEIZ** dont je suis très reconnaissante, je n'oublierai jamais ton soutien durant les moments difficiles.

Je n'oublierai pas non plus de remercier tous mes amis au Liban avec qui j'ai partagé les plaisirs et les désagréments de ma vie. **Roua, Jinane, Sarah, Naamat, Maryam...** Je vous remercie de tout mon cœur. Je n'oublierai surtout pas de remercier mon amie d'enfance **Farah AMMAR**. Ton soutien indéfectible et ton encouragement m'ont été indispensables au cours de ces années. Tous les excellents moments que nous avons passés ensemble en France seront de bons souvenirs inoubliables pour moi. Je te remercie également pour avoir m'aidée dans la correction de mon manuscrit. Tu es adorable Toura.

Enfin, aucune phrase ne pourrait remercier suffisamment ceux qui m'ont tout donnée... Ceux à qui toute ma vie ne suffirait pas pour leur rendre une part de leur amour. Merci mes très chers parents, *Nazir et Magida*, mes sœurs, *Dania et Mirvat*, mon frère, *Samer* et mes beaux-frères, *Ibrahim et Hani*, mes neveux : *Ahmad, Omar et Akram* et mes nièces : *Maryam et Ghiya*, il n'y aura jamais de mots qui suffiront à vous dire combien je vous suis reconnaissant. Merci pour tout ce support moral, mental, émotionnel, financier... tout mon cursus académique ainsi que cette thèse n'auraient pu être possible sans votre soutien. Je vous aime.....

Résumé

Ce travail porte sur l'amélioration de l'extraction des composés phénoliques à partir des raisins tout au long de la chaîne de la vinification en rouge. La qualité des vins rouges est en grande partie déterminée par les composés phénoliques. Parmi les composés phénoliques, les anthocyanes, qui sont responsables de la couleur, et les tanins, à l'origine de la sensation d'astringence. Pour augmenter la quantité des composés phénoliques présents dans le vin, un développement des procédés permettant d'améliorer la diffusion des composés phénoliques durant la vinification en rouge doit être mis en jeu. Nous avons entamé notre étude par un suivi de la maturité phénolique des raisins rouges appartenant à différentes parcelles de la société château KSARA localisées dans la vallée de la Békaa tout en se servant des méthodes Glories (1&2) et ITV. Quant à l'amélioration de l'extractibilité des composés phénoliques durant la vinification en rouge, différents prétraitements ont été appliqués dans le but d'améliorer la diffusion de ces composés. Parmi ces procédés, les technologies suivantes ont été abordées dans notre étude: les électrotechnologies (CEP), les ultrasons, le chauffage modéré, le traitement enzymatique, la macération préfermentaire à froid et la thermovinification. Ces techniques permettent d'endommager ou de fragiliser les membranes et/ou parois cellulaires facilitant ainsi la libération du contenu cellulaire vers le milieu extérieur. Les cinétiques d'extraction des composés phénoliques ont pu être modélisées par le modèle empirique de Peleg et le modèle cinétique simplifié afin d'estimer les rendements d'extraction. De plus, dans ce travail, l'accent a été mis sur les propriétés antiradicalaires et antimicrobiennes des composés phénoliques extraits de différentes variétés de raisins fournis par la société Château KSARA. Pour valoriser les co-produits de la vinification, le chauffage ohmique pulsé (COP) a été appliqué sur le marc de raisin dans le but d'améliorer l'extraction de ses composés phénoliques. L'optimisation du choix de la date des vendanges et l'amélioration des procédés d'extractions des composés phénoliques durant la vinification en rouge, pourraient nous conduire à élaborer un vin d'une meilleure qualité. Ce travail étant effectué, il sera intéressant comme projet à venir de valider ces différents prétraitements à grande échelle pour une perspective d'application industrielle.

Mots-clés : raisins, maturité, composés phénoliques, champs électriques pulsés, extraction, vinification, marc de raisin.

Summary

This study focuses on improving the extraction of phenolic compounds from grapes throughout the chain of red winemaking. The quality of wine is mainly determined by the phenolic compounds. From these phenolic compounds, the anthocyanins, which are responsible of the color and tannins, the responsible of the astringency. In order to increase the amount of phenolic compounds present in wine, a development of methods used to improve the extraction of phenolic compounds during the red vinification should be discussed. We began our study by using two methods Glories (1&2) and ITV to monitor the phenolic maturity of red grapes grown in the vineyards in the province of Bekaa-Château KSARA S.A.L. Whereas for the improvement of the extractibility of phenolic compounds during the vinification, different pre-treatments were applied in order to ameliorate the diffusion of these compounds. Among these process, the following technologies were discussed in our study: the electrotechnologies (PEF), the ultrasound, the moderate heat treatment, the enzymatic treatment, the cold maceration and the thermovinification. These techniques are able to weaken the cell walls and facilitate the diffusion of grape's phenolic compounds during vinification. Peleg's equation and the simplified kinetic model were shown to be suitable for describing the extraction kinetics for phenolic compounds and for the estimation of the extraction yield of polyphenols. Furthermore, in this study, the antiradical and antimicrobial activities of phenolic compounds extracted from grapevine varieties of Château KSARA-Bekaa-Lebanon were analyzed. To valorize the by-products of the vinification, the pulsed ohmic heating (POH) was applied on the grape pomace in order to ameliorate the extraction of the phenolic compounds. The optimization of the choice of the harvesting date and the amelioration of the extraction of phenolic compounds during the red vinification, will conduce to elaborate a high quality of wine. After this study, it will be interesting to validate the different pre-treatments at large scale for a perspective of an industrial application.

Keywords: maturity, polyphenols, pulsed electric field, extraction, vinification, grape pomace.

Sommaire

<i>Nomenclature</i>	7
<i>Liste des Figures</i>	10
<i>Liste des tableaux</i>	14
<i>Introduction Générale</i>	19
CHAPITRE 1 : Synthèse Bibliographique	25
1. Les raisins	25
1.1. Généralités	25
1.2. Le vignoble au Liban	25
1.3. La structure du raisin	26
1.4. La rafle	26
1.5. La baie de raisin	27
1.5.1. La pellicule.....	27
1.5.2. La pulpe	28
1.5.3. Les pépins	29
1.6. Cytologie.....	29
1.6.1. La paroi cellulaire	30
1.6.2. La membrane plasmique	31
2. Les phases de developpement d'une baie de raisin	32
3. La maturité du raisin	33
3.1. La maturité technologique	34
3.2. La maturité phénolique	35

3.2.1. Méthodologies utilisées pour l'étude de la maturité phénolique	37
4. Les composés phénoliques du raisin.....	38
4.1. Classification des composés phénoliques	38
4.1.1. Les composés non-flavonoides	38
4.1.2. Les composés flavonoides	40
4.2. Localisation des composés phénoliques	45
4.2.1. Répartition cellulaire.....	45
4.2.2. Répartition tissulaire	45
4.3. Propriétés des composés phénoliques	46
5. La vinification en rouge.....	47
5.1. Le procédé global de la vinification en rouge.....	47
5.2. Etapes générales de la vinification.....	48
5.3. Les marcs de raisins : sous produits de la vinification	52
6. Procédé usuel d'extraction des polyphénols.....	53
6.1. Extraction par solvant	54
7. Nouvelles technologies utilisées pour l'intensification de l'extraction des polyphénols durant la vinification en rouge.....	57
7.1. Extraction assistée par enzymes pectolytiques	57
7.2. Extraction assistée par ultrasons	59
7.3. Extraction assistée par microondes	62
7.4. La thermovinification	63
7.5. La macération pré-fermentaire à chaud	64
7.6. La Flash-détente.....	65
7.7. La thermo détente	68
7.8. La macération pré-fermentaire à froid	69
7.9. Les décharges électriques de haute tension	69
7.10. Pré-traitement par champs électriques pulsés	72
8. Conclusions et positionnement du sujet.....	82
 <i>CHAPITRE 2 : Matériels et méthodes.....</i>	 85

2.1. Matières premières	85
a. Les raisins : cépages	85
b. Le marquage des parcelles	86
c. Echantillonnage des grappes de raisin	87
d. Echantillonnage des baies de raisin	88
2.2. Suivi de l'évolution de la maturité phénolique.....	88
A) Estimation du potentiel polyphénolique de la vendange par la méthode ITV	89
B) Estimation de la maturité phénolique par la méthode Glories	90
2.3. Intensification de l'extraction durant la vinification en rouge	92
2.3.1. Macération pré-fermentaire à froid	92
2.3.2. Vinification en rouge	93
2.3.3. Procédés d'intensification de l'extraction.....	94
2.3.3.1. Traitements par champs électriques pulsés (CEP).....	94
a) Traitements de faible intensité (400 V, 28 A)	95
b) Traitements de forte intensité	97
1. Générateur (5000 V, 1000 A)	97
2. Générateur (40000 V, 10000 A)	99
2.3.3.2. Les ultrasons	101
2.3.3.3. Traitement thermique modéré.....	102
2.3.3.4. Thermovinification	103
2.3.3.5. Traitement enzymatique.....	103
2.3.3.6. Consommation énergétique	103
2.4. Analyses physico-chimiques des extraits (moûts + vins)	105
2.4.1. Mesure du pH.....	105
2.4.2. Mesure de la conductivité électrique	105
2.4.3. Mesure de l'extrait sec (°Brix).....	106
2.4.4. Spectrophotométrie	107
2.4.5. Quantification des polyphénols.....	107
➤ Estimation globale des composés phénoliques à 280 nm	107
➤ Dosage de Folin-Ciocalteu	107
2.4.6. Etude des propriétés bioactives des composés phénoliques	109

2.4.6.1. Préparation des extraits phénoliques et stockage.....	109
2.4.6.2. Etude des propriétés antiradicalaires.	110
2.4.6.3. Etude des propriétés antimicrobiennes.	111
2.5. Analyses statistiques des résultats	116

CHAPITRE 3 : Optimisation du suivi de la maturité phénolique du raisin du domaine

KSARA-Békaa-Liban.....	117
3.1. Etude de la maturité phénolique des différents cépages par les méthodes Glories et ITV sur les quatres millésimes (2008, 2009, 2010 et 2011).....	118
3.1.1-Suivi du cépage Cabernet Sauvignon	118
3.1.1.1-Maturité anthocyanique	118
3.1.1.2- Les pics phénoliques	120
3.1.1.3- Matrice de corrélation correspondant aux pics d'accumulations anthocyaniques et phénoliques.....	121
3.1.1.4- Comparaison des dates de vendange phénolique et technologique.....	123
3.1.1.5- Classification des parcelles	124
3.1.1.6- Comparaison des vendanges	128
3.1.2-Suivi du cépage Merlot.....	131
3.1.2.1-Maturité anthocyanique	131
3.1.2.2- Les pics phénoliques	132
3.1.2.3- Comparaison des dates de vendange phénolique et technologique.....	133
3.1.2.4- Classification des parcelles	134
3.1.2.5- Comparaison des vendanges	136
3.1.3-Suivi du cépage Cabernet Franc	138
3.1.3.1-Maturité anthocyanique	138
3.1.3.2- Les pics phénoliques	139
3.1.3.3- Comparaison des dates de vendange phénolique et technologique.....	140
3.1.3.4- Classification des parcelles	141
3.1.3.5- Comparaison des vendanges	142
3.1.4-Suivi du cépage Syrah	144
3.1.4.1-Maturité anthocyanique	144

3.1.4.2- Les pics phénoliques	145
3.1.4.3- Comparaison des dates de vendange phénolique et technologique.....	146
3.1.4.4- Classification des parcelles	146
3.1.4.5- Comparaison des vendanges	148
3.1.5-Suivi du cépage Petit Verdot	149
3.1.5.1-Maturité anthocyanique et phénoliques	149
3.1.5.2- Comparaison des dates de vendange phénolique et technologique.....	150
3.1.5.3- Classification des parcelles	151
3.1.5.4- Comparaison des vendanges	152
3.2. Evolution du climat de la région d'étude pour les vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.	154
3.3. Comparaison des meilleures parcelles de chaque cépage.....	157
3.4. Conclusion	157

CHAPITRE 4 : Etude du profil phénolique, des activités antiradicalaires, antioxydantes et

antimicrobiennes des extraits phénoliques de variétés de raisins libanais.....	160
4.1. Résumé de l'article	160
4.2. Article : Polyphenolic content, scavenging and antimicrobial activities of different red grapes extracts varieties grown in bekaa (Lebanon)	163

CHAPITRE 5 : Evaluation de l'effet des traitement par champs électriques pulsés sur

l'extraction phénolique des moûts pendant la macération pré-fermentaire à froid et la fermentation en rouge	176
5.1. Evaluation de l'effet des traitements par champs électriques pulsés sur l'extraction phénolique des moûts pendant la macération pré-fermentaire à froid.....	177
5.1.1. Résumé de l'article	177
5.1.2. Article : Pulsed Electric Fiel Assisted Cold Maceration of Cabernet Franc and Cabernet Sauvignon Grapes.....	182
5.2. Comparaison de différents pré-traitements : Les Champs électriques pulsés, les ultrasons et le chauffage modéré en amont de la vinification en rouge.....	218
5.2.1. Résumé de l'article	218

5.2.2. Article : Pulsed Electric Field, ultrasonic and thermal pretreatments for better phenolic extraction during red fermentation.....	222
5.3. Comparaison de différents pré-traitements : Les Champs électriques pulsés, la thermovinification et l'ajout des enzymes en amont de la vinification en rouge	232
5.3.1. Résumé de l'article	232
5.3.2. Article : Pulsed Electric Field, enzymatic and thermovinified pretreatments prior to red fermentation	236

<i>CHAPITRE 6: Optimisation de l'extraction des polyphénols du marc du raisin assistée par chauffage ohmique pulsé</i>	<i>266</i>
6.1. Résumé de l'article	266
6.2. Article : Pulsed ohmic heating assisted polyphenols extraction from red grape pomace	270

<i>Conclusions générales et perspectives</i>	<i>280</i>
<i>Références bibliographiques</i>	<i>288</i>
<i>Annexes</i>	<i>319</i>

Nomenclature

DESIGNATION LATINE

q	Vitesse d'extraction initiale	g GAE/100 g MS min
$Brix$	Degré Brix	g/100 g
C	Concentration en solutés dans le liquide	g/L
C_s	Capacité calorifique	kJ/K.kg
d	Distance inter-électrodes	cm
E	Intensité du champ électrique	V/cm ⁻¹
Ec	Energie électrique critique	J
h	Hauteur	m
I	Intensité du courant électrique	A
K_1	Constante de vitesse d'extraction	min 100 g MS/g GAE
K_2	Constante de capacité d'extraction	100 g DM/g GAE
m	Masse	g
$m_{polyphénols}$	Masse de polyphénols totaux	g
MS	Taux de matière sèche soluble	%
n	Nombre d'impulsions	-
N	Nombre de trains	-
N_{tot}	Nombre total d'impulsions	-
P	Teneur en polyphénols	g/L
$\%Inhibition$	Pourcentage d'Inhibition	%
t	Temps	s
t_{CEP}	Durée du traitement par CEP	s
t_i	Durée d'une impulsion	s
Δt	Temps entre deux pulses	ms
ΔT	Ecart entre deux températures	°C
T	Température	°C
U	Tension	V
W	Consommation énergétique totale du traitement électrique	J/kg
Y_0	Rendement en polyphénols au temps 0	G GAE/100 g MS
Y_{max}	Rendement maximal d'extraction de polyphénols	G GAE/100 g MS
Z	Indice de perméabilisation	-
Z_p	Indice d'extraction des polyphénols	

DESIGNATION LATINE

α	Constante	
β	Constante	
ε	Porosité	
ξ	Potentiel zêta (potentiel de bicouche électrique)	V
ρ	Masse volumique du produit	g/cm ³
τ_z	Temps caractéristique de l'endommagement membranaire à 50%	S
σ	Conductivité électrique	S/m ¹

INDICES RAJOUTES AUX DESIGNATIONS PRECEDENTES

i	Initial
d	Dénaturé
max	Maximal
f	Final
t	Au temps t

ABREVIATIONS

AOC	Appellation d'Origine Contrôlée
ApH1	Potentiel total en anthocyanes
ApH3.2	Potentiel en anthocyanes facilement extractibles
CEP	Champs Electriques Pulsé
CF	Cabernet Franc
COP	Chauffage ohmique Pulsé
CM	Chauffage modéré
CS	Cabernet Sauvignon
DO	Densité optique
DEHT	Décharges Electriques de Haute-Tension
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
DPm	Degré de Polymérisation Moyen
FA	Fermentation Alcoolique
FC	Folin Ciocalteu
GAE	Equivalent en Acide Gallique
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance
HCl	Acide chlorhydrique
IC	Intensité Colorante
IPT	Indice Polyphénolique Total
ITV	Institut Technique de la Vigne et du Vin
LSD	Test de Fisher

MP	Maturité des Pépins
MPF	Macération Pré-fermentaire à Froid
MS	Matière Sèche
PV	Petit Verdot
PAE%	Pourcentage d'anthocyanes extractibles
RPT	Richesse Phénolique Totale
SPE	Extraction sur Phase Solide
TV	Thermovinification
TE	Traitement Enzymatique
US	Ultrasons
UTC	Université de Technologie de Compiègne
USJ	Université Saint-Joseph

Liste des Figures

Figure I. 1. Production de raisin (1998-2008) FAOSTAT, 2008.....	25
Figure I. 2. Représentation schématique d'une rafle	27
Figure I. 3. Coupe transversale d'une baie de raisins.....	27
Figure I. 4. Coupe schématique de la pellicule de baie de raisin Chardonnay (x400).....	28
Figure I. 5. Coupe longitudinale dans un pépin	29
Figure I. 6. Représentation schématique des parois cellulaires d'une cellule végétale	30
Figure I. 7. Coupe d'une baie et organisation tissulaire. Modèle d'arrangement de la paroi primaire et représentation des structures de principaux polysaccharides qui la constituent.....	31
Figure I. 8. Schéma de la structure de la membrane cellulaire.....	32
Figure I. 9. Développement d'une baie de raisins.. ..	33
Figure I. 10. Le suivi de l'évolution du sucre, de l'acidité et du pH, au cours de la maturation des raisins	34
Figure I. 11. Evolution des tanins et des anthocyanes au cours de la maturation des raisins ..	36
Figure I. 12. Structure de l'acide gallique.....	39
Figure I. 13. Dérivés des acides cinnamiques et de l'acide tartrique.....	39
Figure I. 14. Structure chimique de l'Acide 7-O-β-D- glucosyl -p-coumarique.....	39
Figure I. 15. Structure chimique des stilbènes du raisin	40
Figure I. 16. Dimères de stilbènes	40
Figure I. 17. Squelette de base des flavonoïdes	41
Figure I. 18. Localisation des anthocyanes dans la baie de raisins	42
Figure I. 19. Structures chimiques des anthocyanidines de base chez <i>Vitis</i>	42
Figure I. 20. Localisation des tanins dans la baie de raisins	44
Figure I. 21. Structure aglycone du raisin.....	45
Figure I. 22. Schéma de la vinification en rouge	48
Figure I. 23. Photo de l'égrappoir	49
Figure I. 24. Photo de la machine à fouler des raisins.....	49
Figure I. 25. Moût en fermentation.....	51

Figure I. 26. Procédés de fermentations classiques en rouge	52
Figure I. 27. Stockage de marc de raisin, sous-produit de la vinification en rouge.....	53
Figure I. 28. Mécanisme d'extraction solide liquide et schéma de la diffusion à travers la membrane cellulaire	55
Figure I. 29. Phénomène de cavitation acoustique	61
Figure I. 30. Principe de la Flash détente	66
Figure I. 31. Effet destructurant de la Flash expansion sur la pellicule du raisin	67
Figure I. 32. La chaîne de thermovinification, position du module de la thermo-détente.....	68
Figure I. 33. Géométrie des électrodes.	70
Figure I. 34. Décharges électriques dans l'eau	70
Figure I. 35. Description schématique de l'électroperméabilisation des membranes cellulaires	74
Figure I. 36. Vue macroscopique du moût de Garnacha après 1 heure de macération avec des grappes témoins ou traités par CEP	78
Figure I. 37. Coupes semi-fines de la pellicule de raisin traitée ou non par CEP	78
Figure I. 38. Evolution de l'intensité colorante (A), Concentration en anthocyanes (B), et l'indice polyphénolique total (C) durant la fermentation des raisins de Cabernet Sauvignon	79
Figure II. 1. a. Prélèvement des grappes	87
Figure II. 1. b. Grappes dans le sac en plastique	87
Figure II. 2. Méthodologies utilisées pour le suivi de la maturité phénolique	89
Figure II. 3. Schéma général de l'extraction des polyphénols	92
Figure II. 4. Photographie du générateur (400 V, 28 A)	95
Figure II. 5. Schéma de la forme des impulsions rectangulaires bipolaires	95
Figure II. 6. Photographie de la cellule de traitement	96
Figure II. 7. Photographie du générateur (5000 V, 1000 A)	97
Figure II. 8. Schéma de la forme des impulsions du générateur (5000 V, 1000 A)	97
Figure II. 9. Photographie de la cellule de traitement utilisé pour le générateur (5000 V, 1000 A)	98
Figure II. 10. Dispositif expérimental utilisé pour traitement avec le générateur (5000 V, 1000 A)	98

Figure II. 11. Photographie du générateur (40000 V, 10000 A)	99
Figure II. 12. Chambre de traitement du générateur CEP (40000 V, 10000 A)	100
Figure II. 13. Courbes de tension par CEP (40000 V, 10000 A)	100
Figure II. 14. Dispositif expérimental utilisé pour traitement avec le générateur (40000 V, 10000 A)	101
Figure II. 15. Générateurs des ultrasons et accessoires de contrôle	102
Figure II. 16. Dispositif expérimental utilisé pour traitement avec les ultrasons	102
Figure II. 17. Dispositif expérimental utilisé pour traitement thermique modéré	103
Figure II. 18. Schéma représentatif des cellules végétales avec différents degrés de perméabilisation cellulaire Z après traitement électrique	106
Figure II. 19. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage de Folin-Ciocalteu .	108
Figure II. 20. Protocole d'extraction des polyphénols.....	110
Figure II. 21. Mécanisme d'antioxydation du DPPH	111
Figure II. 22. Protocole de l'étude antimicrobienne (partie 1)	113
Figure II. 23. Protocole de l'étude antimicrobienne (partie 2)	116
Figure III.1. Figures représentant les cinétiques des anthocyanes (mg/L) (a) et IPT (b) pour les quatre parcelles ITCS41, ITCS42, ITCS51 et ITCS52 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.....	129
Figure III.2. Figures représentant les cinétiques de ApH1 (mg/L) (a) et PAE% (b) les quatre parcelles ITCS41, ITCS42, ITCS51 et ITCS52 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.....	130
Figure III.3. Figures représentant les cinétiques de Mp sur les quatre parcelles ITCS41, ITCS42, ITCS51 et ITCS52 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011	130
Figure III.4. Figures représentant les cinétiques des anthocyanes (mg/L) (a) et IPT (b) pour la parcelle TDM002 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011	137
Figure III.5. Figures représentant les cinétiques de ApH1 (mg/L) (a) et PAE% (b) pour la parcelle TDM002 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011	137

Figure III.6. Figures représentant les cinétiques de Mp pour la parcelle TDM002 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011	138
Figure III.7. Figures représentant les cinétiques des anthocyanes (mg/L) (a) et IPT (b) pour la parcelle ITCF4 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011	143
Figure III.8. Figures représentant les cinétiques de ApH1 (mg/L) (a) et PAE% (b) pour la parcelle ITCF4 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011	143
Figure III.9. Figures représentant les cinétiques de Mp pour la parcelle ITCF4 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011	144
Figure III.10. Figures représentant les cinétiques des anthocyanes (mg/L) (a) et IPT (b) pour la parcelle ITS9 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011	148
Figure III.11. Figures représentant les cinétiques de ApH1 (mg/L) (a) et PAE% (b) pour la parcelle ITS9 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011	149
Figure III.12. Figures représentant les cinétiques de Mp pour la parcelle ITS9 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011	149
Figure III.13. Figures représentant les cinétiques des anthocyanes (mg/L) (a) et IPT (b) pour la parcelle TDPV011 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011	153
Figure III.14. Figures représentant les cinétiques de ApH1 (mg/L) (a) et PAE% (b) pour la parcelle TDPV011 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011	153
Figure III.15. Figures représentant les cinétiques de Mp pour la parcelle TDPV011 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011	153
Figure III.16. Figures représentant les cinétiques de la température (a) et de la pluviométrie (b) pour les quatre parcelles ITCS41, ITCS42, ITCS51 et ITCS52 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011	155

Liste des Tableaux

Tableau I. 1. Composition chimique de la rafle (en pourcentage de poids frais).....	27
Tableau I. 2. Composition chimique de la pellicule (en pourcentage de poids frais)	28
Tableau I. 3. Composition chimique de la pulpe (en pourcentage de poids frais)	28
Tableau I. 4. Composition chimique des pépins (en pourcentage de poids frais)	29
Tableau I. 5. Anthocyanidines de base chez <i>Vitis</i>	42
Tableau I. 6. Anthocyanes : sous-classes définies par la substitution du cycle C	43
Tableau I. 7. Evolution de l'IC, concentrations en anthocyanes et indice polyphénolique total	79
Tableau I. 8. Paramètres des CEP pour les différents traitements	80
Tableau II. 1. Caractéristiques des cépages rouges utilisés durant ma thèse	86
Tableau II. 2. Milieux gélosés adéquats pour les différentes souches microbiennes	112
Tableau II. 3. Conditions de différents contrôles positifs	114
Tableau III. 1. Les dates des pics des concentrations en anthocyanes (mg/L) et du potentiel en anthocyanes facilement extractibles (ApH3.2) (mg/L), de chacune des parcelles du cépage Cabernet Sauvignon, détectés respectivement par les méthodes ITV, Glories (1&2)	119
Tableau III.2. Les dates des pics d'indice polyphénolique total (IPT) et de la richesse phénolique totale (RPT), de chacune des parcelles du cépage Cabernet Sauvignon, détectés respectivement par les méthodes ITV, Glories (1&2)	120
Tableau III.3. Matrice de corrélation entre les différentes variables de composition phénolique des raisins appartenant au cépage CS suivant les méthodes ITV et Glories pour les quatre vendanges (2008, 2009, 2010 et 2011)	121

Tableau III.4. Les dates des vendange technologique et phénolique de chacune des parcelles du cépage Cabernet Sauvignon sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.....	124
Tableau III.5. Les EQM (Ecart Quadratique Moyens) des teneurs moyennes ANT et IPT fournis par la méthode ITV (sur les quatre vendanges) et les teneurs moyennes en ApH1,ApH3.2, PAe% et Mp (fournis par la méthode Glories) sur les quatre vendanges du cépage Cabernet Sauvignon	125
Tableau III.6. Tableau regroupant les valeurs d'IPT, d'ApH1, de Mp avec l'évaluation de chacune de ces composantes et le classement en groupe des parcelles du cépage CS	126
Tableau III.7. Tableau regroupant les normes de l'indice polyphénolique total du cabernet sauvignon, la qualité phénolique globale en fonction de la quantité d'anthocyanes totale en mg/L	127
Tableau III.8. Les dates et les teneurs des pics d'anthocyanes (mg/L) et du potentiel en anthocyanes facilement extractibles, de chacune des parcelles du cépage Merlot, détectés respectivement par les méthodes ITV,Glories(1&2)	132
Tableau III.9. Les dates et les teneurs des pics d'indice polyphénolique total et de la richesse phénolique , de chacune des parcelles du cépage Merlot, détectés respectivement par les méthodes ITV, Glories(1&2)	132
Tableau III.10. Les dates des vendange technologique et phénolique de chacune des parcelles du cépage Merlot sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011	133
Tableau III.11. Les EQM (Ecart Quadratique Moyens) des teneurs moyennes ANT et IPT fournis par la méthode ITV (sur les quatre vendanges) et les teneurs moyennes en ApH1,ApH3.2, PAE% et Mp (fournis par la méthode Glories) sur les quatre vendanges du cépage Merlot.....	134

Tableau III.12. Tableau regroupant les valeurs d’IPT, d’ApH1, de Mp avec l’évaluation de chacune de ces composantes et le classement en groupe des parcelles du cépage Merlot	135
Tableau III.13. Les dates et les teneurs des pics d’anthocyanes (mg/L) et du potentiel en anthocyanes facilement extractibles, de chacune des parcelles du cépage Cabernet Franc, détectés respectivement par les méthodes ITV, Glories(1&2)	139
Tableau III.14. Les dates et les teneurs des pics d’indice polyphénolique total et de la richesse phénolique , de chacune des parcelles du cépage Cabernet Franc, détectés respectivement par les méthodes ITV, Glories(1&2)	139
Tableau III.15. Les dates des vendange technologique et phénolique de chacune des parcelles du cépage Cabernet Franc sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.....	140
Tableau III.16. Les EQM (Ecart Quadratique Moyens) des teneurs moyennes ANT et IPT fournis par la méthode ITV (sur les quatre vendanges) et les teneurs moyennes en ApH1,ApH3.2, PAE% et Mp (fournis par la méthode Glories) sur les quatre vendanges du cépage Cabernet Franc.....	141
Tableau III.17. Tableau regroupant les valeurs d’IPT, d’ApH1, de Mp avec l’évaluation de chacune de ces composantes et le classement en groupe des parcelles du cépage CF	142
Tableau III.18. Les dates et les teneurs des pics d’anthocyanes (mg/L) et du potentiel en anthocyanes facilement extractibles, de chacune des parcelles du cépage Syrah, détectés respectivement par les méthodes ITV, Glories(1&2).....	145
Tableau III.19. Les dates et les teneurs des pics d’indice polyphénolique total et de la richesse phénolique , de chacune des parcelles du cépage Cabernet Franc, détectés respectivement par les méthodes ITV, Glories(1&2)	145

Tableau III.20. Les dates des vendange technologique et phénolique de chacune des parcelles du cépage Cabernet Franc sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.....	146
Tableau III.21. Les EQM (Ecart Quadratique Moyens) des teneurs moyennes ANT et IPT fournis par la méthode ITV (sur les quatre vendanges) et les teneurs moyennes en ApH1, ApH3.2, PAE% et Mp (fournis par la méthode Glories) sur les quatre vendanges du cépage Syrah	147
Tableau III.22. Tableau regroupant les valeurs d'IPT, d'ApH1, de Mp avec l'évaluation de chacune de ces composantes et le classement en groupe des parcelles du cépage Syrah ..	147
Tableau III.23. Les dates et les teneurs des pics d'anthocyanes (mg/L) et du potentiel en anthocyanes facilement extractibles, de chacune des parcelles du cépage Petit Verdot, détectés respectivement par les méthodes ITV, Glories(1&2)	150
Tableau III.24. Les dates et les teneurs des pics d'indice polyphénolique total et de la richesse phénolique , de chacune des parcelles du cépage Petit Verdot, détectés respectivement par les méthodes ITV, Glories(1&2)	150
Tableau III.25. Les dates des vendange technologique et phénolique de chacune des parcelles du cépage Petit Verdot sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.....	151
Tableau III.26. Les EQM (Ecart Quadratique Moyens) des teneurs moyennes ANT et IPT fournis par la méthode ITV (sur les quatre vendanges) et les teneurs moyennes en ApH1, ApH3.2, PAE% et Mp (fournis par la méthode Glories) sur les quatre vendanges du cépage Petit Verdot	151
Tableau III.27. Tableau regroupant les valeurs d'IPT, d'ApH1, de Mp avec l'évaluation de chacune de ces composantes et le classement en groupe des parcelles du cépage Petit Verdot	152

Tableau III.28. Les meilleures parcelles sélectionnées des différents cépages sur les quatre vendanges157

Introduction

L'attribution d'effets bénéfiques pour la santé à la consommation de vin remonte à la plus haute antiquité. Mais simultanément le vin a ses détracteurs, conséquence d'une consommation excessive avec les effets néfastes bien connus liés à la présence de l'alcool. C'est ainsi que Hippocrate recommandait le vin à ses patients. Mais Pythagore le condamnait. Cette dualité s'est poursuivie au cours du temps. En 1980, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a mis en évidence le French Paradox, vérifiant l'hypothèse qu'une consommation de vin rouge à dose raisonnable (un ou deux verres par jour) préviendrait le développement des maladies cardiovasculaires. D'où, le taux de mortalité cardiovasculaire est plus bas chez les Français que chez leurs voisins européens.

Au Liban, Château KSARA, timbre les vins libanais par son histoire et la qualité de ses vins. L'histoire commence en 1857 quand les pères Jésuites ont fait revivre la tradition de production du vin, vu que la culture de la vigne au Liban remonte aux Phéniciens. Grâce à leur savoir-faire français, ils produisent le premier vin rouge libanais qui a conduit à la première industrie moderne libanaise du vin.

Quant à la qualité du vin, le consommateur ne s'intéresse qu'aux aspects apparents de son verre et plus précisément aux caractéristiques organoleptiques (couleur et goût du vin). La qualité des vins rouges est en grande partie déterminée par les composés phénoliques, et plus particulièrement les anthocyanes, qui sont responsables de la couleur, et les tanins, responsables de la sensation d'astringence.

La vinification est une opération délicate dont le bon déroulement est toujours lié au savoir-faire du vinificateur et de l'œnologue. Elle apporte essentiellement les composés phénoliques (anthocyanes et tanins) qui participent à la couleur et à la structure générale du vin. La conduite de la macération doit être réglée par le vinificateur, en sorte de mortifier les tissus et favoriser la dissolution des composés phénoliques au maximum. Cependant, la paroi peut résister à ces traitements et continue à constituer un frein à la diffusion de composés recherchés dans les vins comme les composés phénoliques. Pour

cette raison, on ne retrouve dans le vin qu'une fraction du potentiel existant dans le raisin (Monagas *et al.*, 2005; Pinelo *et al.*, 2006). Environ, 20 à 30% du potentiel phénolique du raisin se trouvent dans le vin. Pour améliorer la quantité des composés phénoliques présents dans le vin, le vinificateur doit déjà partir d'une matière première en bon état sanitaire récoltée au moment requis. Par la suite, il doit développer des procédés permettant d'améliorer la diffusion des composés phénoliques durant la vinification en rouge (Sun *et al.*, 2001 ; Sacchi *et al.*, 2005 ; Lopez *et al.*, 2008a,b). En fait, l'optimisation de la qualité du vin commence par une évaluation correcte du niveau de la maturité du raisin y compris une évaluation de l'extractibilité des composés phénoliques des raisins au cours de la vinification (Segade *et al.*, 2008).

Trop souvent, la détermination de la date de récolte est établie uniquement en fonction de la maturité technologique (concentrations en sucres et teneur en acides). Ce paramètre semble insuffisant et une bonne maturité phénolique, correspondant à l'extraction d'un maximum de composés phénoliques de bonne qualité facilement extractibles, serait un atout supplémentaire pour l'obtention d'un vin de qualité. Donc, le producteur doit analyser la qualité du vin et des raisins afin de choisir la date de récolte et doit adopter un processus œnologique en lien avec l'évaluation de la qualité ou de la typicité des vins.

Dans le but d'améliorer l'extractibilité des composés phénoliques, de nombreuses technologies ont alors vu le jour tels que les extractions assistées par enzymes pectolytiques, les ultrasons (Chemat *et al.*, 2004), les microondes (Spigno & De Faveri, 2007), la thermovinification et la Flash détente. Des macérations pré-fermentaires à froid et à chaud ont été aussi adoptées pour améliorer l'extraction.

Récemment, l'application des CEP dans le but d'améliorer l'extraction des composés phénoliques des raisins durant l'étape de la macération-fermentation en rouge a été bien discutée (Lopez *et al.*, 2008 a,b, Donsi *et al.*, 2010, 2011, Delsart *et al.*, 2012). Les pré-traitements par CEP améliorent la couleur, la concentration en anthocyanes et l'indice polyphénolique total durant la phase de fermentation en rouge.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche entre le laboratoire de Biochimie cellulaire du centre d'analyse et de recherche (CAR) de la Faculté des sciences de l'Université Saint Joseph de Beyrouth et le Laboratoire de transformations intégrées de la matière renouvelable de l'Université de Technologie de Compiègne. Ce travail a été soutenu par la société Château KSARA et le conseil de recherche de l'USJ. KSARA est un château libanais en perpétuelle recherche de la qualité. Cette qualité, qui se trouve dans le vin commence à la parcelle. Une connaissance approfondie de son vignoble et de la potentialité de ses parcelles s'avère aujourd'hui une approche indispensable. Pour approfondir la connaissance de son terroir, pour classifier ses parcelles et pour améliorer l'extraction phénolique tout au long de la vinification en rouge, château KSARA a décidé de financer le sujet de thèse présent.

Ce travail de thèse vise dans un premier temps à optimiser la date de vendange des raisins, date pour laquelle le potentiel d'extractibilité des composés phénoliques est le meilleur. En deuxième temps, le but sera d'intensifier, de modéliser et d'optimiser l'extraction des composés phénoliques durant la vinification en rouge. Pour atteindre ces objectifs, une combinaison du prétraitement CEP à la macération pré-fermentaire à froid a été effectuée. Une comparaison de plusieurs procédés d'extraction en amont de la fermentation a été élucidée. Une comparaison entre les ultrasons, les CEP et un chauffage modéré à 50°C a été effectuée en premier lieu. Par la suite, une deuxième comparaison, entre l'extraction assistée par enzymes, les CEP et la thermovinification a été effectuée. Le but était de différencier les différents profils phénoliques de vin élaborés par ces différentes méthodologies. Les travaux antérieurs réalisés se sont surtout attachés à montrer l'impact des CEP sur l'amélioration de l'extraction des composés phénoliques durant la vinification, sans toutefois essayer de la combiner à une macération pré-fermentaire ou essayer de la comparer à d'autres technologies. De plus, dans ce travail, l'accent sera mis sur les caractérisations qualitatives, quantitatives et fonctionnelles des composés phénoliques. Dans ce sens, nous avons étudié l'effet des différents traitements sur la couleur, le contenu phénolique et les activités antiradicalaires des composés phénoliques. D'autre part, les aspects de consommation énergétiques ont été largement abordés et discutés.

Le dernier objectif de cette thèse sera de valoriser le marc de raisin, le principal sous-produit de la vinification riche en composés d'intérêt. Les marcs sont riches en composés phénoliques dotés d'un fort pouvoir antioxydant. D'où l'intérêt de valoriser ce marc en optimisant l'extraction de son contenu en polyphénols par des électrotechnologies (Chauffage ohmique pulsé) (Gonzalez-Paramas *et al.*, 2004).

Pour récapituler, durant cette étude nous allons élaborer une meilleure qualité du vin, en optimisant le choix de la date des vendanges et en améliorant le procédé d'extraction des composés phénoliques durant la vinification en rouge. Par la suite, nous allons valoriser le marc du raisin en améliorant l'extraction des composés phénoliques du marc du raisin par chauffage ohmique pulsé, Donc, durant cette thèse, nous avons cherché à maîtriser la chaîne entière de la vinification, tout en allant au bout en valorisant les co-produits de la vinification.

Ce travail sera décliné en six chapitres.

Le **chapitre 1** « *Etude Bibliographique* » présentera l'état de l'art sur les composés phénoliques des raisins, responsables des caractéristiques organoleptiques du vin rouge. Cette partie présentera le procédé de la vinification en rouge et les difficultés d'extraction durant la fermentation. En effet, la qualité des vins dépend de nombreux facteurs relatifs à l'état de la matière première (les raisins) et aux techniques de vinification employées. D'où une explication du suivi de la maturité phénolique et du choix de la date de récolte optimale du raisin sera étudiée. Par la suite, cette partie rassemblera l'ensemble des différents procédés d'extraction industriels appliqués en amont de la fermentation dans le but d'améliorer la diffusion des composés phénoliques. Une analyse critique de la littérature permettra de relever les problématiques dues aux procédés d'extraction existants afin de proposer des solutions alternatives appropriées.

Le **chapitre 2** « *Matériels et Méthodes* » présentera les techniques expérimentales utilisées au cours de ce travail, en présentant les matières premières étudiées, les dispositifs expérimentaux, les différents procédés appliqués ainsi que les analyses physico-chimiques. Les techniques expérimentales seront classées dans ce chapitre

relativement aux différents composés dosés. Enfin, les outils mathématiques d'évaluation et de calculs seront détaillés.

La partie « *Résultats et Discussion* » comportera les chapitres **3, 4, 5** et **6**.

Le **chapitre 3** exposera les suivis de maturité phénolique des raisins du domaine KSARA- Békaa- Liban sur trois vendanges (2008-2009-2010-2011). Une comparaison des méthodologies utilisées pour suivre la maturité phénolique: Glories et ITV sera effectuée sur les trois années. Une classification des parcelles du domaine KSARA et une élaboration d'une banque de données des caractéristiques et de la qualité phénolique des raisins libanais de différents cépages sera également effectuée.

Le **chapitre 4** sera axé sur l'étude des propriétés antiradicalaires et antimicrobiennes des composés phénoliques extraits de différentes variétés de raisins fournis par la société Château KSARA-Liban. Une nouvelle méthode quantitative permettant d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits phénoliques vis à vis de diverses souches pathogènes, incluant des souches bactériennes gram-négatifs, gram-positifs et des souches de levures sera décrite dans cette partie.

Le **chapitre 5** sera axé sur l'amélioration de l'extraction des composés phénoliques durant la macération préfermentaire à froid et la vinification en rouge, tout en comparant les différents types de prétraitements. La première étude exposera les résultats portant sur l'amélioration de l'extraction des polyphénols de deux variétés de raisins (Cabernet Sauvignon et Cabernet Franc) durant la macération pré-fermentaire à froid, intensifiée par un prétraitement électrique (CEP). Une deuxième étude de type comparative, prend en considération trois prétraitements appliqués sur les raisins du cépage Cabernet Franc: champs électriques pulsés, ultrasons et chauffage modéré (50°C). La troisième étude compare trois prétraitements appliqués sur les raisins du cépage Cabernet Sauvignon : champs électriques pulsés, traitement enzymatique et thermovinification.

Le **chapitre 6** traitera de la valorisation des composés phénoliques du marc du raisin en utilisant le chauffage ohmique pulsé.

Le **chapitre 7** intitulée « *Conclusions et Perspectives* » rassemblera les principaux résultats ainsi que des propositions de pistes d'études pour approfondir les connaissances acquises.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

Ce chapitre 1 synthétisera l'état de l'art des composés phénoliques des raisins rouges, la vinification en rouge et les problèmes de diffusion durant cette fermentation ainsi que de nouvelles techniques d'amélioration de l'extraction qu'il est possible d'appliquer. Une analyse critique de la littérature permettra de relever les inconvénients des procédés d'extraction existants afin de proposer de nouvelles solutions alternatives.

1. LES RAISINS :

1.1. Généralités

Le raisin, fruit de la vigne (*Vitis vinifera*) est l'un des fruits les plus connus et les plus cultivés au monde (Chira *et al.*, 2008 ; Xu *et al.*, 2010). Les plus grands producteurs de raisins sont la France, l'Espagne et l'Italie. Environ 80% des récoltes sont utilisées pour la production du vin (Kammerer *et al.*, 2004). La valeur de la production viticole française en 2008 est de 9.4 milliards d'euros soit 15.3% de la valeur de la production de l'agriculture en 2008 (source INSEE, Compte prévisionnels de l'agriculture 2009). La production globale de raisins a connu une légère chute de 3% en 2010 (64,49 millions de tonnes) par rapport à 2009 (67 millions tonnes) (OIV, 2011). Tandis que la production du vin s'est réduite environ de 7,4 MhL (- 2,7 %) entre 2009 et 2010, après une croissance de 1,1 MhL entre 2008 et 2009 (OIV, 2011).

1.2. Le vignoble au Liban

Au Liban, la production globale de raisins s'établit autour de 117 milliers de tonnes de raisin par an. En 2008, la récolte s'est élevée à 118 900 tonnes. Le rendement moyen fluctue autour de 8,4 tonnes de raisin par hectare (FAOSTAT, 2008) (Figure I.1).

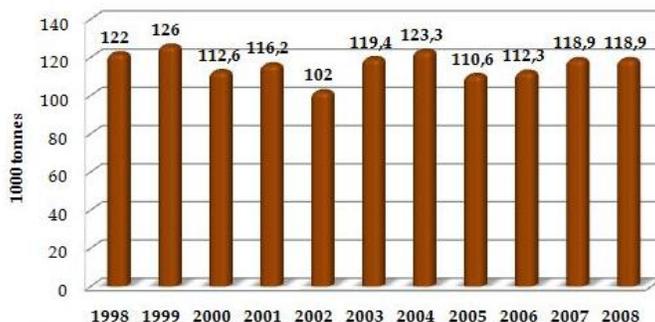


Figure I.1. Production de raisin (1998-2008) FAOSTAT, 2008

D'après le recensement agricole de 1999, la surface cultivée en raisin de cuve destinée à produire du vin ou de l'arak est de 2180 ha. La principale zone de production se situe dans la Békaa Ouest, soit 57% de la surface totale. Les variétés cultivées au Liban destinées à la production du vin sont en pleine évolution. En effet, les vins produits au Liban à partir des cépages dits nobles (Cabernet Sauvignon, de la Syrah et du Chardonnay ...).

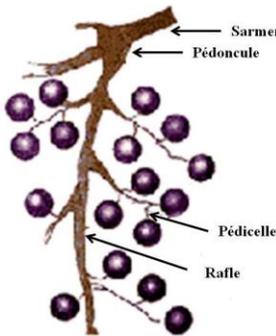
Selon une étude publiée sur le secteur viticole, le Liban a en effet produit 7 millions de bouteilles de vin en 2009, dont plus de la moitié ont été fabriquées par les deux principaux producteurs; les châteaux KSARA et KEFRAYA. Leur poids dans le secteur du vin au point de vue des volumes produits les met en position dominante vis-à-vis des autres producteurs. À titre comparatif, 6 millions de bouteilles ont été produites en 2005 et 5 millions au début des années 2000, selon les chiffres de l'Union viticole du Liban (VUL).

1.3. La structure du raisin

Le raisin contient à sa maturité principalement de l'eau et des sucres (glucose, fructose et polysaccharides). On retrouve également comme dans la plupart des fruits une grande variété de composés phénoliques qui sont des constituants importants du raisin faisant de ce dernier un fruit très bénéfique grâce à leurs nombreuses activités biologiques bénéfiques (Yang *et al.*, 2009). Le raisin est une baie, classée dans le groupe des fruits charnus à pépins. La grappe de raisin est constituée de deux parties bien distinctes : la rafle, qui en est la charpente, et le fruit proprement dit, le grain ou baie de raisin. La rafle se compose d'un axe central ; le pédoncule, sur lequel se rattachent les pédicelles. La baie de raisins se compose elle-même de trois constituants : la pellicule, la pulpe et les pépins.

1.4. La rafle

La rafle forme la charpente qui supporte les baies de raisin et les relie à la plante (Figure I.2). A maturité, elle représente 3 à 6 % du poids de la grappe selon le cépage et l'année. La rafle est un élément à éliminer lors de la vendange car elle donne un goût végétal; d'où l'intérêt de l'éraflage, l'opération qui consiste à séparer mécaniquement les grains de raisin de leur support ligneux. Le tableau I.1 représente la composition chimique de la rafle. Elle est chargée en tanins (2-7%), également les corps plus simples dont ils dérivent : les acides phénols, les catéchines et les procyanidines (Souquet *et al.*, 2000).

	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="text-align: center;">Eau</td><td style="text-align: center;">78 à 80%</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">Matières tannoides</td><td style="text-align: center;">2 à 4%</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">Matières acides</td><td style="text-align: center;">1 à 2%</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">Matières azotées</td><td style="text-align: center;">1 à 2%</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">Matières minérales</td><td style="text-align: center;">2 à 3%</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">Matières ligneuses</td><td style="text-align: center;">5 à 15%</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">Matières hydrocarbonées</td><td style="text-align: center;">< 1%</td></tr> </table>	Eau	78 à 80%	Matières tannoides	2 à 4%	Matières acides	1 à 2%	Matières azotées	1 à 2%	Matières minérales	2 à 3%	Matières ligneuses	5 à 15%	Matières hydrocarbonées	< 1%
Eau	78 à 80%														
Matières tannoides	2 à 4%														
Matières acides	1 à 2%														
Matières azotées	1 à 2%														
Matières minérales	2 à 3%														
Matières ligneuses	5 à 15%														
Matières hydrocarbonées	< 1%														
<p>Figure I.2- Représentation schématique d'une rafle</p>	<p>Tableau I.1 – Composition chimique de la rafle (en pourcentage de poids frais) (Cabanis <i>et al.</i>, 1998, Foulonneau, 2002)</p>														

1.5. La baie de raisins

La baie de raisins est composée de 3 parties distinctes: la pellicule, la pulpe et les pépins (Figure I.3).

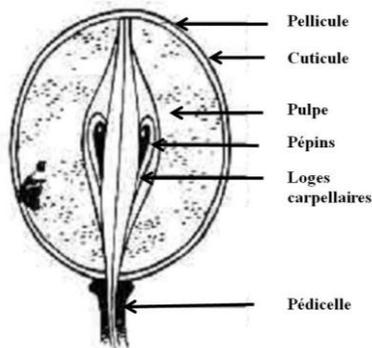
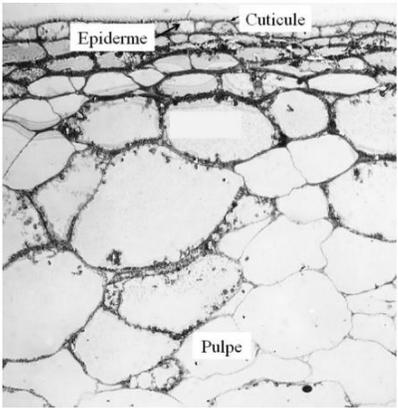


Figure I.3- Coupe transversale d'une baie de raisins (Geraudie, 2009).

1.5.1. La pellicule

La pellicule est l'enveloppe du raisin (Figure I.4). Elle comprend plusieurs assises cellulaires : la plus externe, ou cuticule formée de cires lipidiques (membrane extérieure très mince et imperméable aux levures). Le tableau I.2 donne la composition chimique de la pellicule. Sous la cuticule, se trouvent successivement les cellules de l'épiderme et les cellules de l'hypoderme, contenant, en particulier dans les couches les plus profondes, la quasi-totalité des substances odorantes et des matières colorantes et une grande partie des tanins (Alleweldt *et al.*, 1981).

 <p>The micrograph shows a cross-section of a grape skin. At the top, a thin layer is labeled 'Cuticule'. Below it is the 'Epiderme' layer. The main part of the image shows the 'Pulpe' (pulp) with large, polygonal cells and prominent vacuoles.</p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">Eau</td> <td style="text-align: center;">78 à 80%</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Acide organiques</td> <td style="text-align: center;">0.8 à 1.6%</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Tanins</td> <td style="text-align: center;">0.4 à 3%</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Pigments</td> <td style="text-align: center;">0 à 0.5%</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Composés azotés</td> <td style="text-align: center;">1.5 à 2%</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Minéraux</td> <td style="text-align: center;">1.5 à 2%</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Cires</td> <td style="text-align: center;">1 à 2 %</td> </tr> </table>	Eau	78 à 80%	Acide organiques	0.8 à 1.6%	Tanins	0.4 à 3%	Pigments	0 à 0.5%	Composés azotés	1.5 à 2%	Minéraux	1.5 à 2%	Cires	1 à 2 %
Eau	78 à 80%														
Acide organiques	0.8 à 1.6%														
Tanins	0.4 à 3%														
Pigments	0 à 0.5%														
Composés azotés	1.5 à 2%														
Minéraux	1.5 à 2%														
Cires	1 à 2 %														
<p>Figure I.4- Coupe schématique de la pellicule de baie de raisin Chardonnay (x400) (Jackson, 2008).</p>	<p>Tableau I.2 – Composition chimique de la pellicule (en pourcentage de poids frais) (Cabanis <i>et al.</i>, 1998).</p>														

1.5.2. La pulpe

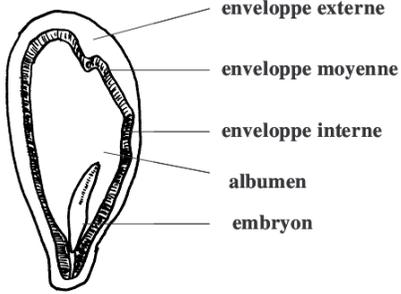
La pulpe est constituée de 25 à 30 couches de cellules, ces cellules s’agrandissent pour atteindre une taille de 400 µm à la fin du stade de maturation (Carbonneau *et al.*, 2007). A maturité, la pulpe représente 90 à 95% du poids du raisin. Après foulage, elle donnera le moût, lequel, après fermentation, donnera le vin. Les cellules de la pulpe possèdent des vacuoles représentant 99% de leur volume remplies majoritairement d’acides organiques et de sucres (Diakou & Carde, 2001). Les sucres, puis les acides, jouent un rôle très important dans l’élaboration et la conservation du vin. Le tableau I.3 donne la composition chimique de la pulpe.

Tableau I.3 – Composition chimique de la pulpe (en pourcentage de poids frais) (Cabanis *et al.*, 1998, Foulonneau, 2002)

Eau	70 à 80%
Sucres	10 à 25%
Acides libres	1%
Sels (bitartrates)	1%
Matières minérales, azotées, pectiques...	0.5%

1.5.3. Les pépins

Le mésocarpe comprend aussi un endocarpe, une fine couche de cellules délimitant les loges carpellaires qui contiennent les pépins. Les pépins sont constitués d'un embryon et d'un albumen (Figure I.5). Les pépins représentent 3 % du poids de la grappe. Ils devraient être au nombre de 4 par baie. Cependant dans les raisins d'une même grappe, leur nombre est variable, suite à des non-fécondations. Ils ont une forte charpente de cellulose et contiennent 5 à 8 % de tanins. Ils ont des goûts grossiers; notamment ils peuvent apporter trop d'astringence. Ils contiennent également 10 à 12 % d'huiles qui nuisent à la qualité du vin. Afin d'éviter une trop grande dissolution de ces tanins et la présence d'une trop grande quantité d'huile dans le moût (cela nuisant à la qualité du vin), il est recommandé de ne pas écraser les pépins. Le tableau I.4 donne la composition chimique des pépins.

	Eau	20 à 50%
	Huile	10 à 20%
	Matières tanniques	7 à 8%
	Matières acides	1%
	Matières azotées	5%
	Matières minérales	1 à 2%
	Matières hydrocarbonées	30 à 35%
<p>Figure I.5- Coupe longitudinale dans un pépin (Levadoux, 1951).</p>	<p>Tableau I.4 – Composition chimique des pépins (en pourcentage de poids frais) (Cabanis <i>et al.</i>, 1998, Foulonneau, 2002)</p>	

1.6. Cytologie

La cellule est l'unité structurale et fonctionnelle des êtres vivants (animaux, végétaux, champignons, bactéries). Chaque cellule possède une certaine autonomie et est dotée à cette fin d'un pouvoir de synthèse et de reproduction. La membrane plasmique de la cellule végétale appelée « plasmalemme » délimite le contour de la cellule. Le cytoplasme constitue l'intérieur de la cellule. Il contient un noyau, des mitochondries, du réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, des lysosomes, des ribosomes, des peroxysomes, un cytosquelette...

1.6.1. Paroi cellulaire:

Les cellules végétales sont polyédriques, c'est-à-dire que la forme est déterminée par la paroi squelettique externe rigide. Leur taille, de l'ordre de 20 à 100 μm , est supérieure à celle des cellules animales (10 à 20 μm).

La paroi cellulaire entoure la membrane cytoplasmique et assure la cohésion des cellules, permettant ainsi la rigidité du végétal. Elle est composée de glucides et de protéines (90% et 10% respectivement du poids de la matière sèche) (Bowes, 1998). La paroi cellulaire (Figure I.6) est constituée de trois régions distinctes : la paroi primaire, la paroi secondaire et la lamelle moyenne. Chacune de ces régions a une composition et un rôle différent. La paroi primaire permet la croissance de la cellule et assure la forme de la cellule. Elle est constituée de celluloses (9-25%), hémicelluloses (25-50%), composés pectiques (10-35%) et protéines. Les polysides pariétaux en constituent 80% du poids (Renard *et al.*, 1989). En ce qui concerne la paroi secondaire, c'est une structure rigide formée de microfibrilles de celluloses et de lignines. Enfin, la lamelle moyenne est constituée principalement de polysaccharides (pectines), elle a pour rôle d'assurer la cohésion entre les cellules.

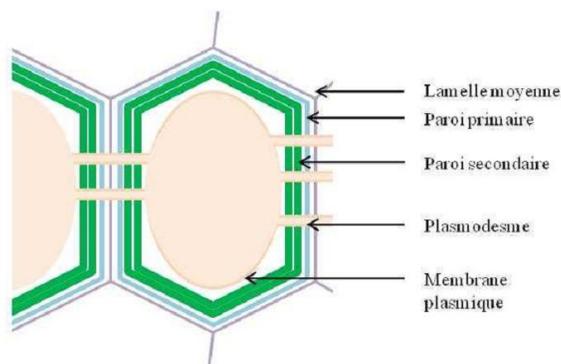


Figure I.6- Représentation schématique des parois cellulaires d'une cellule végétale (d'après Detrimont & Klein, 2001).

Dans le cas du raisin, en vinification la paroi joue un rôle de barrière dans les mécanismes d'extraction des constituants du raisin. Le modèle architectural communément admis des parois primaires comprend trois domaines de structures indépendantes interconnectés entre eux (Carpita & Gibeaut, 1993) (Figure I.7). Le premier domaine est constitué par le réseau cellulose-hémicellulose dans lequel est enchevêtré le second domaine constitué de la

matrice pectique polysaccharides pectiques composés de HG : homogalacturonane, RGI : rhamnogalacturonane, RGII : rhamnogactaturonane de type II (Visser & Voragen, 1995). Le troisième domaine est représenté par les protéines pariétales de structure (extensines).

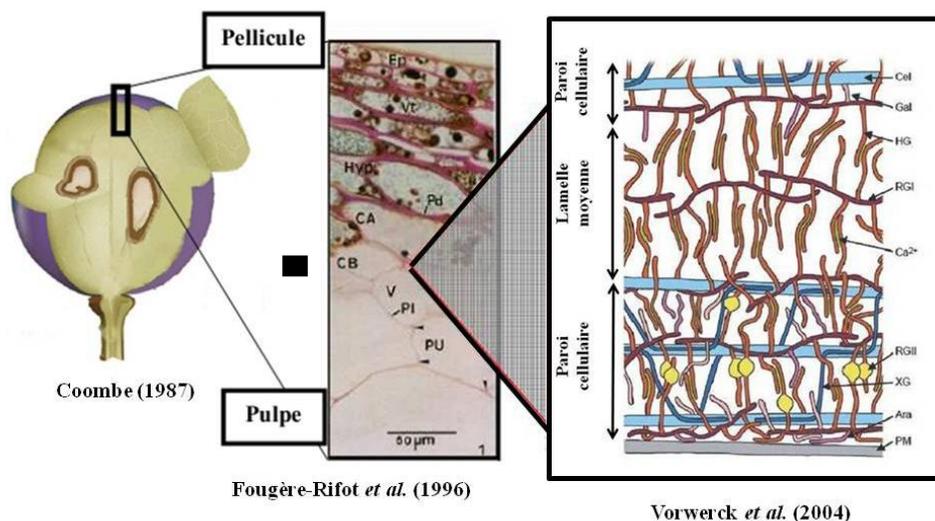


Figure I.7- Coupe d'une baie et organisation tissulaire (Coombe, 1987 ; Fougère-Rifot *et al.*, 1996). Modèle d'arrangement de la paroi primaire et représentation des structures de principaux polysaccharides qui la constituent (Vorwerck *et al.*, 2004). Le modèle de l'organisation des polysaccharides comprend les microfibrilles de cellulose (Cel) ; les hémicelluloses : xyloglucane (XG), rhamnogalacturonanes (RG) I et II, homogalacturonane (HG), arabinanes (Ara), galactanes (Gal) ; les ions calcium et la membrane plasmique est symbolisée ainsi : PM.

1.6.2. La membrane plasmique:

La membrane cellulaire joue un rôle de protection, elle assure les échanges entre la cellule et son milieu, elle délimite le compartiment cellulaire et le sépare du milieu environnant. Elle assure un rôle de barrière en empêchant les molécules cellulaires de partir et les molécules extérieures d'entrer librement. Un schéma de la structure de la membrane cellulaire est présenté dans la figure I.8. La membrane est un assemblage de phospholipides et de protéines avec une épaisseur totale d'environ 10 nm (Robert *et al.*, 1994).

La bicouche lipidique est imperméable à la diffusion des macromolécules, des solutés organiques polaires et des ions-organiques. Cette membrane contrôle les échanges entre le milieu intérieur et le milieu extérieur. Elle assure donc l'approvisionnement de la cellule et l'élimination des

déchets (Alberts *et al.*, 1994). D'où la perméabilité de la membrane plasmique est sélective : les molécules liposolubles et les gaz passent facilement au travers tandis que, l'existence de la partie apolaire (hydrophobe) au centre de la bicouche bloque le passage des ions inorganiques (Na^+ , K^+ , H^+), des grosses molécules neutres et des solutés organiques polaires (sucres, acides aminés ...) (Shechter, 1997).

D'où la nécessité de transporteurs spécifiques pour assurer la diffusion à travers la membrane. La présence de protéines membranaires (protéines périphériques et transmembranaires) rend possible ce passage (Raven *et al.*, 2003).

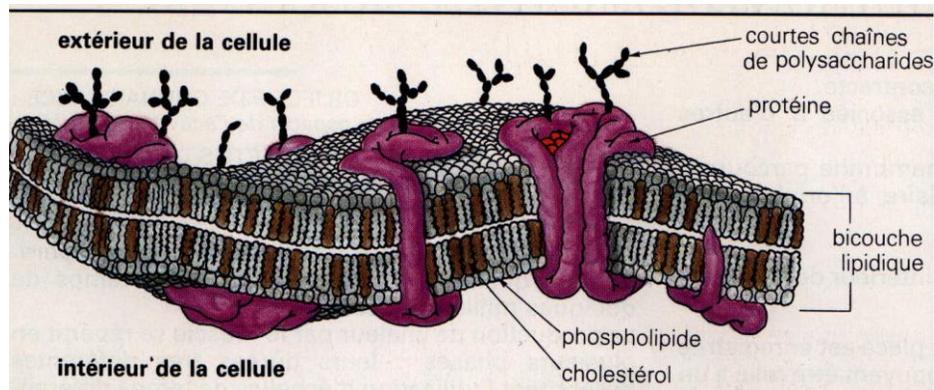


Figure I.8- Schéma de la structure de la membrane cellulaire (Robert *et al.*, 1994).

2. Les phases de développement d'une baie de raisins : (Giuliano *et al.*, 2005)

Le développement du raisin est divisé en trois phases principales, selon des critères phénologiques, biochimiques et physiologiques.

- ➔ Le développement herbacé ou végétatif après la nouaison, la formation de la baie.
- ➔ La véraison, correspond aux changements de texture et de couleur.
- ➔ La maturation.

La phase I (Figure I.9) du développement correspond à la croissance végétative de la baie, alimentée par le xylème de la vigne, jusqu'à la véraison. La phase II, la véraison, est caractérisée par la transformation de la texture et de la couleur des baies, période qui dure de 1 à 2 jours par baie, et jusqu'à 10 jours pour toute la parcelle. Pendant la phase III du développement, la maturation, le flux phloémien est seul responsable de l'alimentation de la baie de raisin. La maturation est marquée par l'accumulation des sucres, des anthocyanes et de précurseurs

aromatiques, et aussi par la diminution des acides organiques, donc de l'acidité du raisin (Vivas *et al.*, 1998).

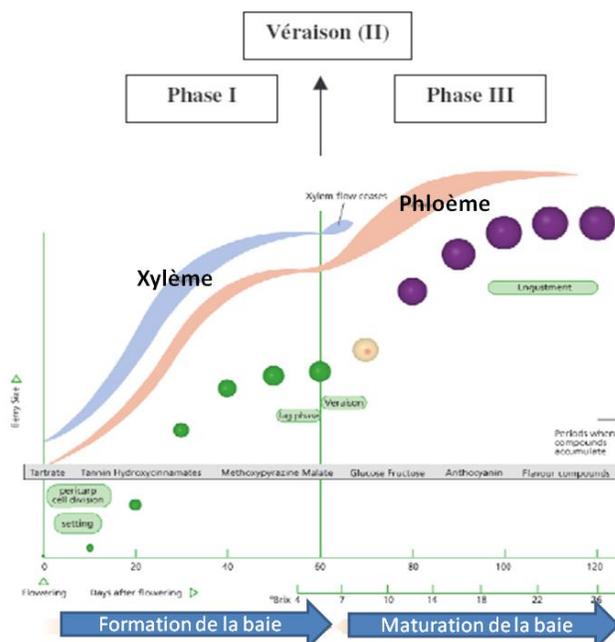


Figure I.9 - Développement d'une baie de raisins (Giuliano *et al.*, 2005)

Les paramètres qui définissent la qualité des raisins destinés à la vinification sont les sucres fermentescibles (glucose et fructose), le pH, l'acidité totale, les composés phénoliques totaux et les précurseurs d'arômes. Des raisins de qualité positive ont des petites baies, avec des taux élevés en sucres, une acidité moyenne avec des fortes teneurs en anthocyanes et une faible teneur en tanins de pépins, plutôt avec des tanins de pellicules, de poids moléculaire élevé et caractérisés comme ronds et moins astringents sur le plan sensorial. L'effet cépage peut aussi faire varier la composition métabolique, en liaison avec l'adaptation aux différents types de sol et climat et avec la durée du cycle productif, des cépages plus ou moins précoces et tardifs.

3. La maturité des raisins :

Dans la filière vinicole, il est admis que la qualité du vin repose largement sur la qualité du raisin au moment des vendanges. La notion de maturité optimale pour décider la date de vendange présente donc une importance toute particulière. L'évaluation seule des paramètres technologiques de maturation classiques (sucres et acidité) ne sont plus suffisants pour prédire de façon complète et objective le potentiel œnologique des raisins. La recherche de nouveaux

indicateurs de maturité, accompagnée si possible de nouvelles mesures rapides et non destructives, sont des enjeux attendus par les professionnels de la filière, permettant de lever des verrous technologiques que sont la définition de la maturité optimale du raisin en lien avec l'itinéraire de vinification et le type de vin souhaité.

Dans la pratique viti-vinicole, le taux de sucres contenu dans les baies est considéré depuis longtemps comme un bon indicateur du degré de maturité du raisin. C'est la norme de l'évaluation de la qualité aussi. Ainsi, deux formes de maturité doivent être considérées lorsqu'on parle de raisin: la maturité technologique qui est bien corrélée avec la "date", et la maturité phénolique qui permet d'évaluer les teneurs en composés phénoliques (anthocyanes et tanins) responsables des caractéristiques organoleptiques du vin. Cette maturité permet non seulement de suivre la maturation, mais aussi de différencier les types de parcelles.

3.1.La maturité technologique :

C'est la méthode la plus ancienne de détermination de la maturité, elle correspond à la mesure de l'équilibre du moût entre les teneurs en sucres et en acides. Au cours de la maturité, les sucres s'accumulent dans les baies et l'acidité totale diminue (Gervais *et al.*, 2005). La figure I.10 montre un profil des changements de la composition du raisin au cours de sa maturation, dont la concentration totale en sucre, le pH et l'acidité.

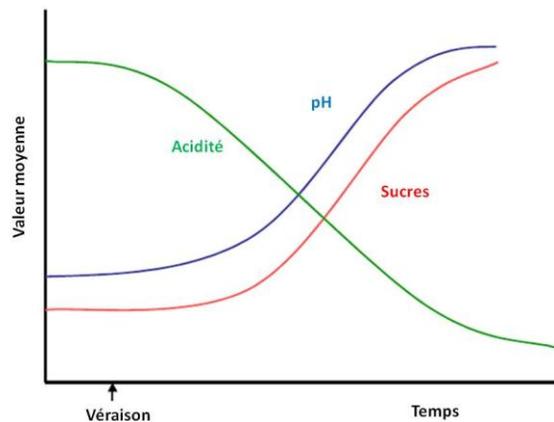


Figure I.10 - Le suivi de l'évolution du sucre, de l'acidité et du pH, au cours de la maturation des raisins.

(Gervais *et al.*, 2005).

D'après le graphe ci-dessus, la teneur en sucre des baies augmente rapidement, l'acidité diminue et le pH augmente. En fait, il y a une phase initiale rapide de l'accumulation du sucre, mais à un moment donné au cours du développement des baies et du vieillissement de la vigne, il y a eu une réduction du transport de sucre aux fruits (Roediger *et al.*, 2006). Fondé sur le phénomène de maturation, augmentation des sucres (g/l) et diminution de l'acidité totale (gH₂SO₄), le rapport S/A (Sucres/Acides) ou indice de maturité augmente au cours de la maturation. Les valeurs comprises entre 35 et 50 représentent une excellente qualité de vendange (Remy *et al.*, 1999).

3.2. La maturité phénolique :

La maturité phénolique est un élément important pour la comparaison de la qualité du raisin à celui d'autres pays puisque la méthode technologique traditionnelle d'évaluation de la maturité ne peut pas établir une comparaison de la qualité du raisin entre les différents pays.

Les principaux composés phénoliques de la baie de raisin sont les anthocyanes et les tanins condensés. Au cours de la véraison des baies, la peau des baies perd la chlorophylle et commence à synthétiser et à accumuler des composés phénoliques qui sont responsables du développement de la couleur: jaune-or (flavonols), le rose et le rouge (anthocyanes). Les anthocyanes sont responsables de la couleur rouge du vin et il faut noter que l'intensité de la couleur du vin est directement proportionnelle à la qualité de vin. Alors que les tanins, ils peuvent être séparés en deux catégories : tanins des pellicules et tanins des pépins. Ce sont des substances de nature polyphénolique aux propriétés astringentes, qui se combinent avec les anthocyanes pour former des complexes tanins –anthocyanes stables. Ces composés ne vont pas évoluer au cours de la maturation des raisins de la même manière que les sucres mais, ils vont présenter des évolutions de deux ordres (Figure I.11) (Pérez-Magariño *et al.*, 2005):

- une évolution quantitative, avec une augmentation de la teneur en anthocyanes et en composés phénoliques.

- une évolution qualitative, qui peut se traduire d'un point de vue organoleptique par un adoucissement de la sensation d'astringence, des tanins plus doux, moins végétaux. Cette évolution va de pair avec la facilité de diffusion dans le vin des composés phénoliques au cours de la vinification, que l'on appelle « extractibilité ».

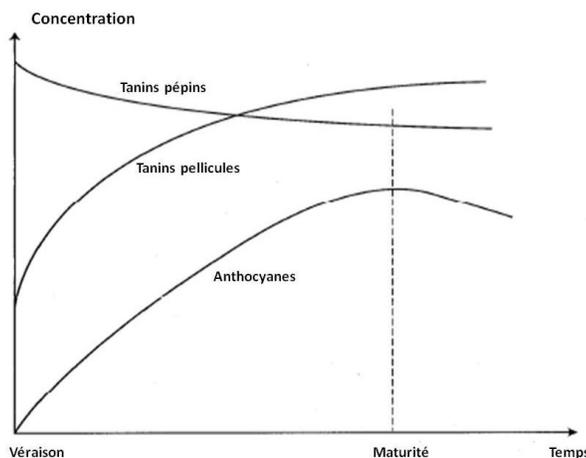


Figure I.11 - Evolution des tanins et des anthocyanes au cours de la maturation des raisins.

La maturité phénolique (Figure I.11) correspond à la maturité de la pellicule (anthocyanes, tanins) et à la maturité des pépins (tanins) : concentration maximale en "tanins qualitatifs". Elle correspond à l'accumulation maximale en tanins, en anthocyanes et éventuellement en phénols dans la peau des baies de raisin. Elle correspond aussi à une bonne extractibilité de ces composés à partir des peaux. A l'inverse, l'extractibilité de ces composés depuis les pépins devient de plus en plus difficile. Cette maturité phénolique est toujours plus utilisée pour le suivi de la maturation des raisins rouges. Toutefois, son usage pratique est limité par la complexité de la mise en oeuvre des méthodes d'extraction des composés phénoliques (Guyot *et al.*, 2004).

Maturité phénolique VS Maturité technologique :

La "maturité phénolique" ne se substitue en aucune façon à la maturité appelée traditionnellement "technologique". Cette dernière reste largement et prioritairement utilisée sur le terrain, la maturité phénolique est, elle aussi intéressante, dans la mesure où elle permet d'accéder à des données utiles pour les vinifications. Sa réalisation, le jour des vendanges, se superpose donc à celle de la maturité technologique (Vivas *et al.*, 1998). En fait, la maturité phénolique peut être définie comme le niveau de maturité permettant l'obtention simultanée d'un potentiel important et d'une bonne capacité de diffusion dans le vin. La maturité technologique est mieux corrélée avec la "date" que la maturité phénolique, ses caractéristiques sensorielles semblent être de bons marqueurs de la maturation du raisin. Alors que, la maturité phénolique

permet non seulement de suivre la maturation, mais aussi de différencier les types de parcelles. En outre d'être un paramètre majeur qui détermine le contenu du vin en éthanol, la maturité technologique peut aussi affecter la maturité phénolique, parce que l'expression de plusieurs enzymes de la voie des phénylpropanoïdes est contrôlée par les sucres. En outre, il a été démontré que les sucres améliorent la production des anthocyanes du raisin (Conde *et al.*, 2007). Sur le plan chimique, la maturité technologique ou maturité pulpaire est atteinte quand le maximum d'accumulation des sucres est atteint, avec un rapport optimal sucres / acidité et la maturité polyphénolique, ou maturité pelliculaire, est atteinte quand le potentiel en anthocyanes commence à diminuer après avoir atteint un plateau. Ce maximum est généralement observé alors que la maturité technologique a déjà été atteinte. Donc, la maturité technologique ou maturité pulpaire est souvent atteinte alors que le raisin est loin de la maturité phénolique ou maturité pelliculaire : il peut y avoir plus d'une semaine de décalage. Toutefois, la maturité phénolique est une question d'une certaine subjectivité, car chaque cépage a son propre goût et spécificité, et divers facteurs peuvent affecter le choix de la date de récolte, y compris la main-d'oeuvre disponible, les changements de saison comme la pluie et les vagues de chaleur, le terroir, et d'autres facteurs hors du contrôle de l'œnologue (Conde *et al.*, 2007).

En utilisant la maturité phénolique, le choix de la meilleure date de récolte se fait par la construction et la lecture d'une courbe représentant l'évolution des paramètres déjà cités dans la parcelle considérée. Donc, la date de récolte optimale correspond à une date pour laquelle les raisins contiennent une teneur en sucre suffisante et un maximum d'anthocyanes et de tanins facilement extractibles. Elle se situe 5 à 8 jours après le maximum d'accumulation d'anthocyanes. Elle doit être adaptée en fonction du produit que le producteur souhaite élaborer : pour un vin de type primeur, il recherchera une légère sous-maturité, pour un vin de garde concentré il privilégiera par contre une légère sur-maturité.

3.2.1. Méthodologies utilisées pour l'étude de la maturité phénolique :

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour déterminer la maturité des raisins et analyser leurs contenus phénoliques. Dans notre étude, nous nous intéressons à deux méthodes: Glories et ITV. La méthode Glories basée sur un dosage des anthocyanes par décoloration au SO₂ après macération à pH 3.2 et pH 1. La méthode ITV (Institut Technique de la Vigne – France) basée sur un dosage des anthocyanes par Puissant-Léon après macération en milieu acido-alcooleux.

Les méthodes Glories et ITV, appliquées durant notre étude seront détaillées et expliquées dans la partie matériels et méthodes et présentées en annexe 1 .Les facteurs influençant la maturité phénolique seront présentés en annexe 2.

4. Les composés phénoliques du raisin.

4.1. Classification des composés phénoliques.

Les composés phénoliques exercent une influence majeure sur la qualité des vins rouges. La connaissance des principaux composés phénoliques du raisin est donc primordiale. Ces composés sont issus du métabolisme secondaire des plantes (Bruneton, 2009), et représentent plus de 8000 espèces moléculaires connues. Ce sont des molécules actives regroupant un vaste ensemble de substances chimiques, caractérisées par une grande diversité de structure allant de molécules phénoliques simples de faible poids moléculaire (<100 g/mol) tels les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés (>30 000 g/mol) comme les tanins (Balasundram *et al.*, 2006). D'un point de vue chimique, les composés phénoliques sont caractérisés par un noyau benzénique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles et dérivent de la voie de l'acide shikimique (Escarpa, 2001 ; Sarni & Cheynier *et al.*, 2006). Leur nomenclature est basée sur la distinction entre les composés flavonoïdes et non-flavonoïdes qui ne possèdent pas de squelette « flavone » (Fang *et al.*, 2007 ; Rodríguez Vaquero *et al.*, 2007).

4.1.1. Les composés non-flavonoïdes :

Les composés non flavonoïdes recouvrent les acides phénols, divisés en acides hydroxybenzoïques et acides hydroxycinnamiques, porteurs d'une chaîne latérale insaturée, mais également d'autres dérivés phénoliques tels que les stilbènes dont la molécule la plus connue est le resvératrol.

a- Les acides phénoliques : Ils appartiennent à deux groupes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques.

a.1. Les acides hydroxybenzoïques : Ils sont dérivés de l'acide benzoïque avec une structure de base de type C6-C1 (D'Archivio *et al.*, 2007). Cinq acides benzoïques sont connus dans le raisin. Ils se différencient par la substitution de leur noyau benzénique. Le principal représentant des acides benzoïques dans le raisin est l'acide gallique, (Figure I.12), présent sous forme libre et glycoside et aussi estérifié par les flavanols (Sarni & Cheynier *et al.*, 2006).

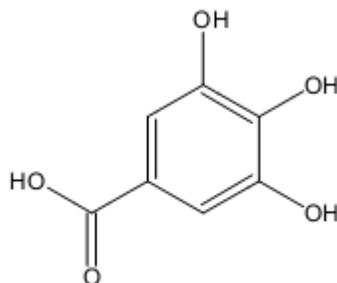


Figure I.12- Structure de l'acide gallique (Ribéreau Gayon *et al.*, 1998)

a.2. les acides hydroxycinnamiques : Ils représentent une classe très importante dont la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide hydroxycinnamique. Les trois structures de bases : l'acide caftarique, l'acide coutarique et l'acide fertarique, se différencient par les substituants du noyau aromatique . Ils sont principalement sous la forme trans mais existent aussi sous forme cis (Goetz *et al.*, 1999 ; Perret, 2001).

Dans les raisins, ils sont identifiés en faible quantité sous forme libre, surtout dans les vacuoles des cellules de la pellicule et de la pulpe, sous forme d'ester tartrique (Ribéreau-Gayon, 1965). Ils peuvent être également des hétérosides du glucose (Figure I.13, Figure I.14) (Sarni & Cheynier *et al.*, 2006).

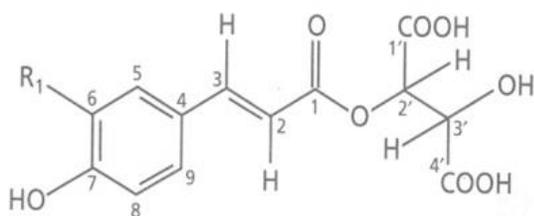


Figure I.13- Dérivés des acides cinnamiques et de l'acide tartrique (Ribéreau-Gayon P. *et al.*, 1998)

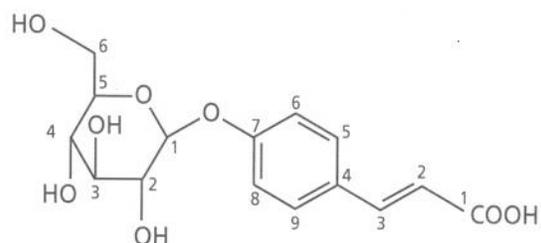


Figure I.14- Structure chimique de l'Acide 7-O-β-D-glucosyl-p-coumarique (Ribéreau-Gayon P. *et al.*, 1998)

b. Les stilbènes :

Les stilbènes sont des composés phénoliques naturels, contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la résonance des électrons sur la totalité de la molécule. Ils sont présents dans de nombreuses familles de végétaux supérieurs, mais le raisin est considéré la plus importante source alimentaire de ces substances (Rodriguez-Delgado *et al.*, 2001). Les stilbènes (Figure I.15) les plus abondants dans le raisin sont le trans-resvératrol (Frémont , 2000)

et son dérivé glucosylé : le picéide (Jeandet *et al.*, 1991; Waterhouse & Lamuela-Raventos, 1994), ainsi que les dimères : le resvératrol trans-déhydrodimère et l'ε-viniférine (Figure I.16) (Sarni & Cheynier *et al.*, 2006).



Figure I.15- Structures chimiques des stilbènes du raisin (Perret, 2001)

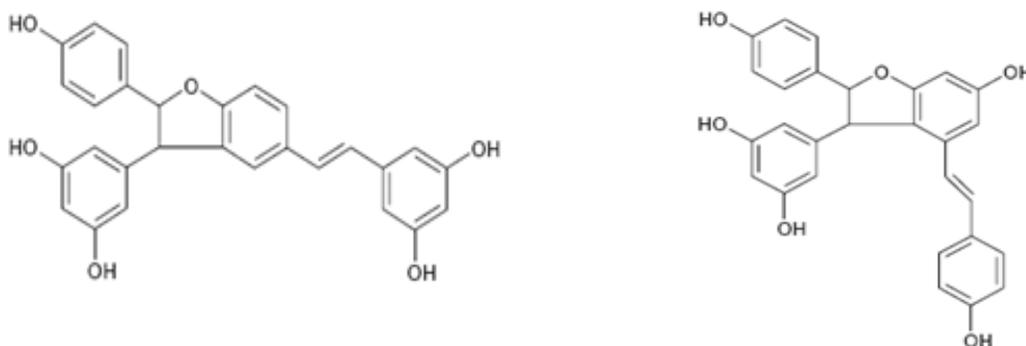


Figure I.16 - Dimères de stilbènes (respectivement : Resvératrol trans déhydrodimère et ε- viniférine)

Ces stilbènes, le resvératrol en particulier, sont rencontrés exclusivement dans la pellicule des grains de raisin (*Vitis vinifera*) (Frémont, 2000) et sont complètement absents dans les pépins (Perret, 2001). Le *Trans*-resvératrol qui est une phytoalexine polyphénolique avec un bon pouvoir antioxydant (Palomino *et al.*, 2000) a suscité un grand intérêt chez les scientifiques après avoir été identifié dans le vin et lié au "paradoxe français" (Katalinić *et al.*, 2010).

4.1.2. Les composés flavonoïdes :

C'est une grande famille constituée de plus de 4000 variétés de métabolites secondaires ubiquitaires des végétaux (Fang *et al.*, 2007). Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques : deux cycles en C6 (A et B), reliés par une

chaîne en C3 (Marfak , 2003), cette structure est nommée 2- phényl-benzopyrone (Figure I.17) (Bourzeix *et al.*, 1986 ; Perret, 2001).

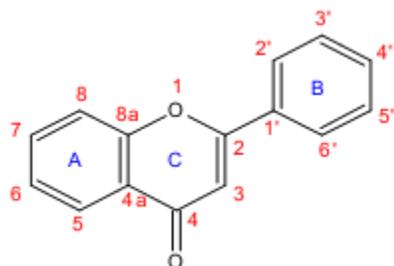


Figure I.17 - Squelette de base des flavonoïdes.

Ce groupe comprend différentes sous-classes de composés qui diffèrent par leur structure chimique (D'Archivio *et al.*, 2007). C'est d'abord la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation qui permet de distinguer les différentes classes de flavonoïdes. A l'intérieur de chacune des sous-classes, les variations autour du squelette chimique de base en C15 portent principalement sur trois points : le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire (Heim *et al.*, 2002 ; Sarni & Cheynier *et al.*, 2006). Chez les raisins, deux familles de composés sont principalement représentés, les anthocyanes et les flavan-3-ols, auxquels s'ajoutent des flavonols et des flavanonols (Sarni & Cheynier *et al.*, 2006).

a-Les anthocyanes :

Les anthocyanes, principalement présentes dans la pellicule de la baie, diffusent rapidement dans le moût dès le début de la vinification. Leur concentration atteint un maximum en quelques jours pour ensuite diminuer du fait de leur implication dans de nombreuses réactions (Ribéreau-Gayon, 1982; Somers, 1971, Cheynier *et al.* 1997a; Romero-Cascales *et al.* 2005). Ce sont des pigments instables mais leur réactivité, conduit à de nombreux pigments qui participent à la couleur des vins rouges et à sa stabilité. Elles sont localisées essentiellement dans la vacuole des cellules de la pellicule (Amrani, 1993) et dans les trois ou quatre premières assises cellulaires de l'hypoderme (Figure I.18). Elles peuvent être rencontrées dans la pulpe, au niveau subcellulaire, dans les vacuoles ou dans des organites spécialisés appelés anthocyanoplastes (Sarni & Cheynier *et al.*, 2006).

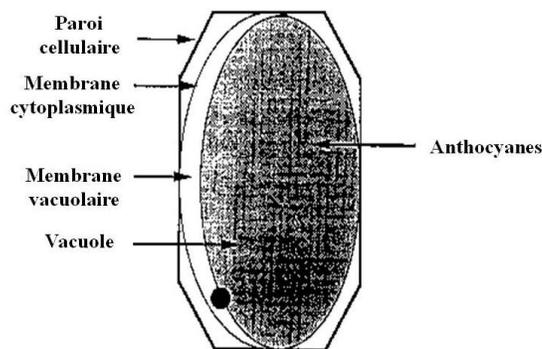


Figure I.18-Localisation des anthocyanes dans la baie de raisin

Leur structure comprend deux cycles benzéniques reliés par un hétérocycle oxygéné, insaturé et cationique, le cation flavylum, dérivant du noyau 2- phényl-benzopyrone (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998), généralement glucosylé en position C-3. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment donc ce sont les anthocyanes libres, sans oses accrochés (Figure I.19), (Perret, 2001). Dans le raisin et dans le vin, on distingue cinq anthocyanidines dans le genre *Vitis* : la cyanidine, la péonidine, la delphinidine, la pétunidine et la malvidine (Tableau I.5). Les anthocyanes se divisent en différentes sous-classes en fonction de la nature des substituants portés par le glucose du cycle C. Le glucose peut-être acylé en position 6 par l'acide acétique, l'acide para-coumarique ou l'acide caféique (Tableau I.6).

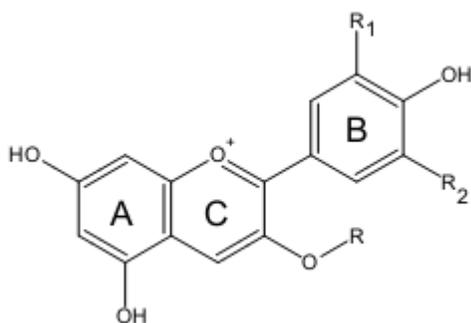


Figure I.19- Structures chimiques des anthocyanidines de base chez *Vitis* (substitution du cycle B) (Perret, 2001)

Anthocyanidines R* = H	R ₁	R ₂
Malvidine	OCH ₃	OCH ₃
Péonidine	OCH ₃	H
Delphinidine	OH	OH
Pétunidine	OCH ₃	OH
Cyanidine	OH	H

Tableau I.5 -Anthocyanidines de base chez *Vitis* (substitution du cycle B).

Sous-classes	R
Anthocyanidines	H
Anthocyanes	Glucoside
Anthocyanes acylées	
Anthocyanes acétylées	Acétylglucoside
Anthocyanes coumaroylées	6-p-coumaroyl-glucoside
Anthocyanes caféoylées	6-caféoyl-glucoside

Tableau I.6 - Anthocyanes : sous-classes définies par la substitution du cycle C.

A pH acide, comme dans les vacuoles des cellules végétales, la forme prédominante est le cation flavylium (de couleur rouge en solution aqueuse) alors qu'à pH plus élevé, ce cation flavylium est converti en d'autres espèces, dont certaines sont incolores (Cabrita, 2000).

c- Les flavan-3-ol ou flavanols

Les flavanols regroupent les monomères et les tanins, nom commun donné aux oligomères et polymères de flavanols qui, du fait de leur affinité avec les protéines, ont des propriétés « tannantes ». Au cours de la vinification, l'extraction des proanthocyanidines est plus lente que celle des anthocyanes. Les proanthocyanidines de pellicule diffusent plus rapidement que celles provenant des pépins, à cause de leur localisation et de la solubilité supérieure des prodelphinidines par rapport aux procyanidines galloylées. L'extraction des proanthocyanidines des pépins démarre quand la teneur en alcool augmente (Labarbe, 2000, Canals *et al.* 2005, Cheynier *et al.*, 1997a). Les tanins sont réactifs et peuvent former par réaction avec eux-mêmes ou avec les anthocyanes de nombreux dérivés tanins-tanins ou anthocyanes-tanins dans les vins. Ils ont aussi des propriétés physico-chimiques particulières et peuvent former des agrégats et interagir avec les protéines et les polysaccharides. De plus, les tanins jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques des vins, notamment dans la sensation d'astringence. La pellicule, les pépins et les rafles sont les zones de concentration de cette famille de composés. Plus précisément, dans les pépins, les tanins sont essentiellement localisés dans les enveloppes internes et externes. Au sein de la pellicule, ils se présentent sous forme granulaire, ou d'amas, dans les vacuoles des cellules (Figure I.20). Ils semblent également en partie liés aux parois cellulaires et aux membranes vacuolaires (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Amrani, 1993).

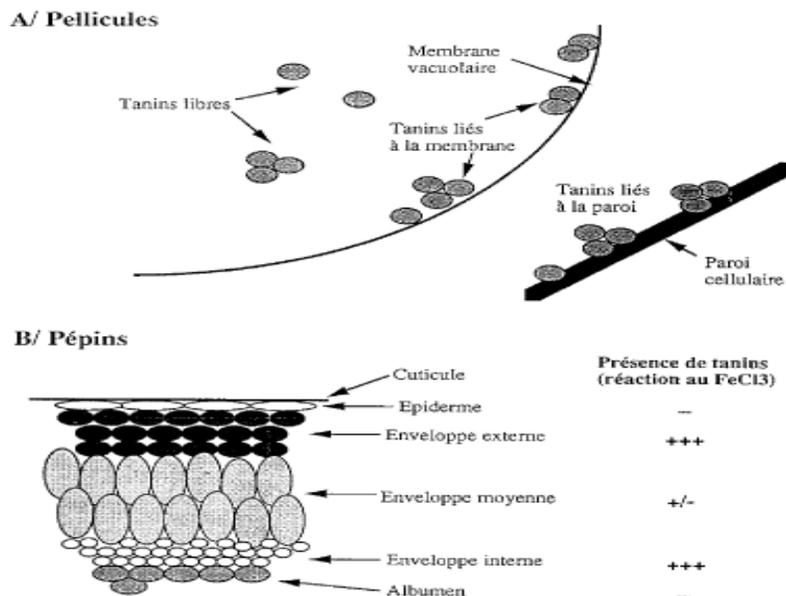


Figure I.20 - Localisation des tanins dans la baie de raisin.

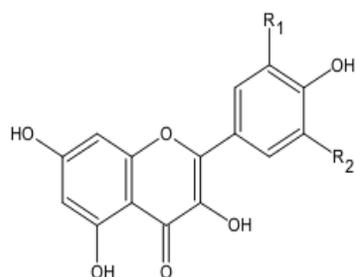
Ils existent dans le raisin à l'état de monomères (les catéchines) et sous formes plus ou moins polymérisées (proanthocyanidines, aussi appelés tanins condensés) (D'Archivio *et al.*, 2007 ; Vivas *et al.*, 2003). Ces molécules ne présentent pas de double liaison sur le cycle central. Les teneurs en flavanols des pépins sont toujours supérieures à celles des pellicules, qu'il s'agisse de monomères, d'oligomères ou de polymères (Sarni & Cheynier *et al.*, 2006). Les tanins de pépins sont constitués de procyanidines partiellement galloylées. Leur degré moyen de polymérisation (DPm) de l'ordre de 10 est largement inférieur à ceux des pellicules qui contiennent également des prodelfphinidines et dont le degré moyen de polymérisation (DPm) avoisine en moyenne les 30 unités (Prieur *et al.*, 1994 ; Souquet *et al.*, 1996). Au sein de la pulpe, la présence de monomères et d'oligomères de flavanols a été détectée, et certaines teneurs sont reportées dans la littérature (Bourzeix *et al.*, 1986). Récemment, la présence de tanins de plus haut degré de polymérisation dont les caractéristiques s'approchent de celles des tanins de pellicules a été mise en évidence (Souquet *et al.*, 2006).

Dans la partie annexe, vous trouverez une présentation et une explication en détails des unités monomériques, des tanins condensés (Annexe 3).

c. Les flavonols :

Dans la baie de raisin, les flavonols, pigments de couleur jaune pâle, sont présents uniquement au sein de la pellicule. Ces composés présentent une double liaison entre C2 et

C3, avec un groupe hydroxyle en position C3. Quatre flavonols sont majoritairement présents dans le raisin: le kaempférol, la quercétine, la myricétine et l'isorhamnétine (Figure I.21) (Remy, 1999 ; D'Archivio *et al.*, 2007 ; Perret, 2001). Ces composés sont réputés être les antioxydants les plus efficaces de tous les flavonoïdes grâce à des dérivés de syringétine et de laricitrine ont récemment été mis en évidence dans les variétés rouges (Mattivi *et al.*, 2006). Leur groupe céto et leur OH en 3 du cycle (Sarni & cheynier *et al.*, 2006). On leur attribue des propriétés bénéfiques dans le traitement des maladies du cœur et des cancers (Bohm *et al.*, 1998).



Flavonols	R ₁	R ₂
Kaempférol	H	H
Quercétine	OH	H
Myricétine	OH	OH
Isorhamnétine	OCH ₃	H
Syringétine	OCH ₃	OCH ₃
Laricitrine	OH	OCH ₃

Figure I.21 - Structure aglycone des flavonols du raisin

4.2. Localisation des composés phénoliques :

4.2.1. Répartition cellulaire:

La répartition des composés phénoliques à l'échelle cellulaire est très caractéristique. Ils s'accumulent principalement dans deux sites : d'une part la paroi cellulaire où sont présentes les lignines (et quelquefois certains flavonoïdes et des molécules associées aux lignines comme l'acide férulique) et d'autre part la vacuole où sont stockés les phénols solubles (acide chlorogénique, anthocyanes, flavonols, tanins...) (Le Bourvellec, 2005). Certains flavonoïdes (quercétine, kaempférol) pourraient également être présents au niveau du noyau et de la membrane plasmique (Peer *et al.*, 2001) mais toujours à très faible concentration.

4.2.2. Répartition tissulaire:

A l'échelle tissulaire, des répartitions très inégales des différents composés phénoliques ont été notées. Ainsi les anthocyanes et les pigments de type flavonols sont généralement présents dans

les couches cellulaires externes des organes végétaux en particulier les épidermes de fruits et des feuilles (Sarni & Cheynier, 2006). Dans les raisins, les composés phénoliques sont majoritairement trouvés dans la peau et les pépins et sont extraits dans les vins lors de la vinification (Katalinić *et al.*, 2010). Les conséquences technologiques de ces différentes situations sont extrêmement importantes lors de la vinification car la diffusion des anthocyanes dans le moût est lente à partir de la seule pellicule (Macheix *et al.*, 2006). Les types et les concentrations de ces composés dépendent d'un certain nombre de facteurs: la variété de raisin, le stade de maturation, le sol, les conditions climatiques, la culture de la vigne et le traitement auquel elle est soumise (Gómez-Alonso *et al.*, 2007 ; Rodríguez Vaquero *et al.*, 2007). En outre, chaque variété de raisin présente une composition différente en composés phénoliques. La pellicule renferme les plus grandes teneurs de la baie de raisin en anthocyanes responsables de la couleur des raisins rouges et du vin (Monagas *et al.*, 2006). Catéchine, épicatechine et épicatechine gallate sont les unités monomères principales des tanins de la pellicule, bien que gallocatéchine et épigallocatéchine soient également présentes dans des proportions moindres. Les glucosides et glucuronides de quercétine et kaempférol, l'acide gallique et ses glucosides, le resvératrol et les acides coumariques et caftariques complètent la composition de la pellicule de raisin en termes de composés phénoliques (Lu & Yeap Foo, 1999). Les tanins de pépins sont constitués des mêmes unités monomères que les tanins de la pellicule. La quantité des tanins de pépins diminue significativement pendant la maturation des raisins (Kennedy, 2000). Les pépins sont également composés de procyanidines et en moindre quantité d'acide gallique et d'épigallocatéchine (Guendez, 2005). La rafle est également une source intéressante de composés phénoliques. Les composés phénoliques les plus abondants dans les rafles sont les tanins (environ 80%) (Souquet, 2000). Les flavanols sont les composés phénoliques les plus abondants dans la pulpe ; ils représentent 60% des composés phénoliques totaux (Mané *et al.*, 2007).

4.3. Propriétés des composés phénoliques :

Les publications concernant les propriétés biologiques des composés phénoliques sont de plus en plus nombreuses. Très divers, ces derniers sont des molécules réactives qui en fonction de leur nature jouent un rôle déterminant dans l'attractivité visuelle, les caractéristiques gustatives et la

stabilité des produits. Ces molécules actives sont parmi les plus puissants phyto-actifs conçus par les plantes. Ils sont de puissants anti-oxydants qui protègent notre organisme contre les effets délétères de l'oxygène et présentent diverses autres activités physiologiques, y compris anti-inflammatoire, anti-allergique, anti-cancérogènes, anti-hypertenseurs, anti-arthritiques et anti-microbiennes (Rodríguez Vaquero *et al.*, 2007). La lutte contre l'oxydation et l'inhibition des microorganismes, deux propriétés très importantes des composés phénoliques seront représentées en détail en annexe 4.

5. La vinification en rouge

5.1. Le procédé global de la vinification en rouge:

L'élaboration du vin se fait par l'intermédiaire d'une opération que l'on appelle la vinification. Cette opération permet de transformer le raisin en vin. Il faut environ 1,3 à 1,5 kg de raisin pour obtenir un litre de vin. Durant la vinification, le moût fermente, ou macère temporairement avant fermentation, en présence des pellicules, des pépins et éventuellement, de la totalité ou d'une partie des rafles pendant une durée plus ou moins longue, habituellement de plusieurs jours. La caractéristique de ce mode de vinification est donc la macération de la phase solide (Flanzy, 1998 ; Foulonneau, 2002). La qualité du vin rouge dépend beaucoup de sa composition en matières colorantes, substances aromatiques et tanins, ces composés sont extraits du raisin au cours de la macération, avec le concours de la teneur en alcool, de l'asphyxie des cellules, du chauffage de la vendange, etc. Mais ces facteurs doivent être maniés avec précaution, car leur excès peut être nuisible, ou l'avantage qu'ils offrent pour l'extraction de certains composés peut devenir un inconvénient pour d'autres (Foulonneau, 2002).

La vinification en rouge suit un processus qui comporte 4 étapes principales, réalisées dans un ordre différent selon le type de vin : l'égrappage, le pressurage, la macération et la fermentation. Les différentes étapes sont résumées dans la figure I.22. Les principaux sous-produits issus de ce procédé sont les marcs de raisins, les bourbes et les lies de fermentation.

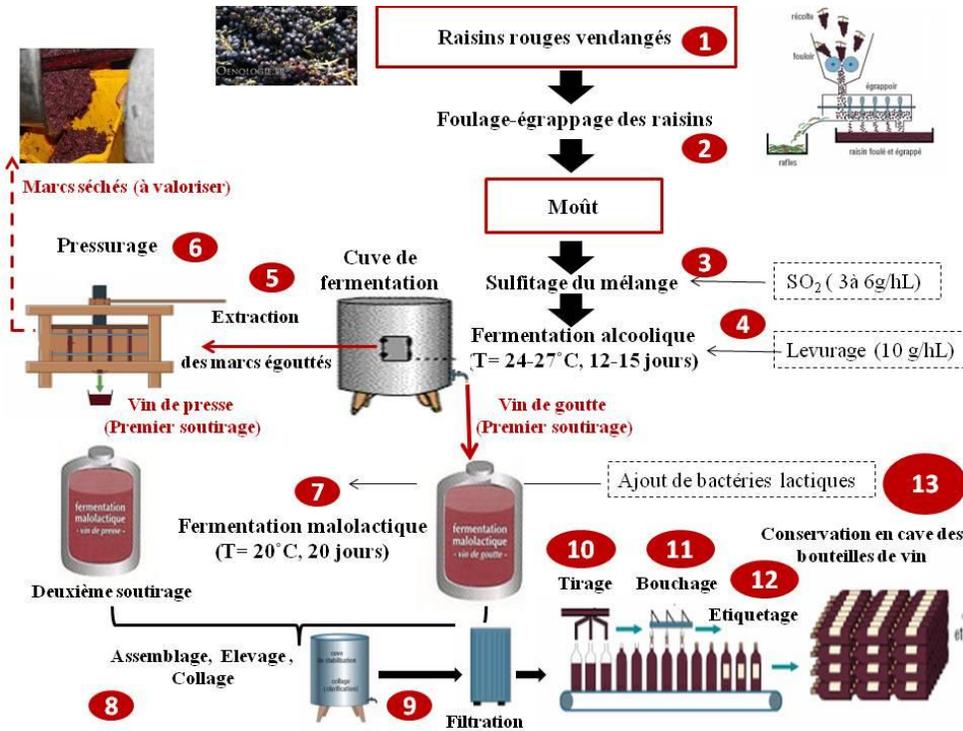


Figure I.22 - Schéma de la vinification en rouge

5.2. Etapes générales de la vinification :

Les étapes décrites ci-dessous retracent brièvement le devenir du raisin, de la vigne au produit final qu'est le vin. Elles ont été rédigées et synthétisées d'après le traité d'œnologie de Ribéreau-Gayon *et al.*, (2004) et le manuel de la connaissance et travail du vin de Blouin & Peynaud (2001) et du guide pratique de la vinification de Foulonneau (2002).

La vinification commence par la **vendange**. Le suivi de la maturité phénolique et technologique doit être effectué. Une fois arrivé à maturité, le raisin est récolté. Le choix de la vendange est stratégique puisqu'il va déterminer la qualité du vin. Il est défini parcelle par parcelle, d'après l'équilibre entre le sucre et l'acidité des baies de raisin (suivi de la maturité technologique), et d'après le maximum de composés phénoliques extractibles (suivi de la maturité phénolique).

Les raisins rouges vendangés sont rapidement transportés au chai où ils sont triés, éraflés puis foulés. La vendange est éraflée ou égrappée. **L'éraflage** (Figure I.23) a pour but de séparer les baies de la rafle. Ça permet d'éliminer les rafles (parties ligneuses de la grappe) afin de limiter les arômes herbacés qu'elles peuvent apporter. Cette dernière est facultative et dépend de la maturité des rafles.



Figure I.23 – Photo de l'éggrapoir

L'éraflage fait l'objet de recherches, les constructeurs proposent de nouveaux systèmes de tri mécaniques qui enlèvent aussi les pétiotes.

Après l'éraflage, le **foulage** (Figure I.24) est destiné à faire éclater les baies pour en libérer le jus, sans écraser les pépins. Cette opération permet de libérer la pulpe et le jus du raisin, appelé moût. Le foulage est une étape importante dans la vinification car le jus extrait joue à la fois le rôle de fluide d'extraction, ainsi que de solvant pour les composants chimiques du raisin. Il accélère significativement la **macération**, étape pendant laquelle le fruit éclaté est mis en contact avec son jus. Le but est de transmettre toute la composition chimique du cépage dans le jus. Les opérations d'éraflage et de foulage, réalisés autrefois respectivement à la main et au pied, sont maintenant exécutées mécaniquement avec des appareils spécifiques ou combinés : érafloirs, fouloirs, fouloirs-érafloirs, érafloirs-fouloirs ...



Figure I.24 – Photo de la machine à fouler des raisins

A ce stade, un **enzymage** éventuel (préparations d'enzymes pectinolytiques) peut avoir lieu, favorisant la libération des particules des baies. Le **sulfitage** peut avoir lieu à plusieurs endroits de la chaîne d'élaboration, d'une façon répétitive ou unique. Il consiste en l'apport de SO₂, sous différentes formes (pastilles de soufres, bisulfite de Potassium, solutions sulfureuses, ...). Le sulfitage a différentes fonctions. Tout d'abord, il détruit les enzymes d'oxydation naturellement présentes dans le moût. Il agit aussi sur les microorganismes aérobies et les bactéries acétiques réduisant ainsi les risques d'altération lors de la fermentation alcoolique. Aussi, le SO₂ favorise la dissolution des matières colorantes et des tanins, en détruisant les cellules pelliculaires des fruits, ce qui améliore la macération en renforçant la couleur et la teneur en arômes primaires. La concentration de SO₂ libre en fin de fermentation ne devra pas dépasser 25 mg/L.

Après sulfitage, les raisins rouges subissent une étape de macération et de fermentation alcoolique avant d'être pressurés. Le rôle de la macération est de faire migrer dans le moût, les substances aromatiques colorantes (anthocyanes) et tanniques présentes dans les pellicules, pépins et parfois les rafles. Puis, une fermentation alcoolique aura lieu, consistant à transformer les sucres naturels du raisin (glucose et fructose) en éthanol par les levures. En cours de la vinification proprement dite, le choix de la température de la fermentation alcoolique est fonction de nombreux facteurs, concernant la marche de la fermentation et l'extraction des constituants du marc par la macération. Concernant la cinétique fermentaire, il est admis un risque d'arrêt prématuré si la température dépasse 30°C ; avec des teneurs en sucre élevées et des conditions de fermentation difficiles, il est conseillé de maintenir la température à une valeur un peu plus basse, 25 à 28°C et relativement constante (Ribéreau-Gayon, 2004).

Depuis Pasteur, il est bien connu que la levure est l'usine vivante de production d'éthanol suite à la transformation de sucres. Il est établi que 16.8 grammes de sucres fermentés apportent 1 degré d'alcool (Dequin, 2008). Le jus de raisin enrichi de nutriments, de sucres ainsi que de composés phénoliques dans les étapes préfermentaires, est un milieu idéal pour la croissance et la multiplication de différents microorganismes. La levure *Saccharomyces cerevisiae* est la levure de vinification. Quoique initialement présente sur le raisin, un levurage semble classique de nos jours. Il consiste en l'apport de levures dans une concentration suffisante, permettant un bon démarrage de la fermentation alcoolique d'une part, et diminuant les risques de contaminations d'autre part (Domizio *et al.*, 2007).

Le glucose et le fructose, sucres du moût de raisin, sont catabolysés suivant la voie de la glycolyse pour donner le pyruvate. Ce dernier est ensuite décarboxylé pour donner l'acétaldéhyde, qui sera réduit en éthanol pour maintenir la balance d'oxydoréduction et régénérer le NAD^+ réduit lors de l'oxydation du glycéraldéhyde-3-phosphate. La fermentation alcoolique s'accompagne de dégagement carbonique (Figure I.25) et d'une augmentation de la température de la cuve.

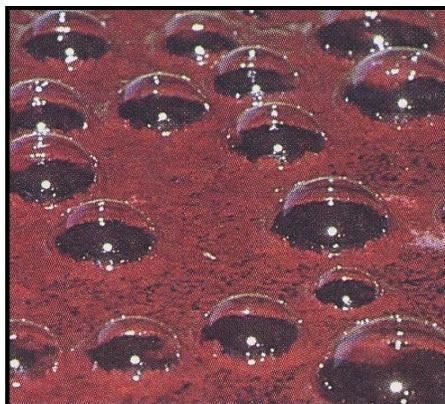


Figure I.25- Moût en fermentation.

La production d'alcool durant la fermentation s'accompagne de l'apparition de produits secondaires tels que le glycérol, l'acide acétique, l'acide succinique, l'acide lactique, les alcools supérieurs, les aldéhydes et cétones... Ce qui conduit à un rendement massique de 47% pour la production d'éthanol à partir des sucres consommés (Moreira *et al.*, 2005). La fermentation alcoolique dure en moyenne quatre à dix jours. En même temps, les matières colorantes et les éléments tanniques contenus dans la peau diffusent dans le moût en fermentation. Le remontage, une opération importante de la vinification en rouge durant la fermentation alcoolique permet simplement d'introduire l'oxygène de l'air dans le moût. Cette opération permet de faciliter l'extraction des constituants du marc (anthocyanes et tanins) et d'accroître la macération. Selon le type de vin rouge recherché, la macération sera plus ou moins prolongée. En effet, les vins rouges de garde demandent une macération plus longue afin d'obtenir une bonne structure et une aptitude au vieillissement. A la fin de la fermentation alcoolique, pour mettre fin à la macération, on procède à un écoulage des cuves. Par gravité, le vin est séparé du marc (ensemble des parties solides du raisin : rafles, pellicules, pépins, encore imprégnées d'alcool). Le vin écoulé est dit « vin de goutte ». Le marc simultanément est décuvé puis pressé afin d'en retirer le vin imbibé. C'est le «vin de presse » plus riche en couleur et en tanins. Suivant le type de vin recherché, vin

de goutte et vin de presse sont assemblés soit immédiatement, soit après élevage (ou vieillissement en fût). A ce stade, une seconde fermentation, appelée fermentation malolactique, se déclenche. Cette deuxième fermentation transforme l'acide malique en acide lactique. Ceci diminue l'acidité du vin, pour lui donner une plus grande souplesse. D'autre part, la disparition de l'acide malique assure la stabilité du vin vis-à-vis des bactéries lactiques, agents de transformation. Il faut cependant rester vigilant lors de cette étape, car une mauvaise conduite de la fermentation malolactique peut nuire aux caractéristiques du vin (Kandler, 1983).

La dernière étape est celle de l'**élevage** et du stockage des vins. Cet élevage peut se faire en barriques ou en bouteilles. Mais le vin obtenu après fermentation est chargé de matières solides en suspension : débris végétaux, levures, dépôts cristallins et autres. Il est alors loin d'être assez limpide pour être acceptable par les consommateurs. Divers traitements physico-chimiques (stabilisation, collage...) sont alors pratiqués à ce stade afin de lui donner l'aspect attendu par les amateurs (Peynaud, 1983, Flanzy, 1998). Ensuite le vin fini sera mis à la disposition des consommateurs. La figure I.26 résume les procédés de fermentations classiques en rouge.

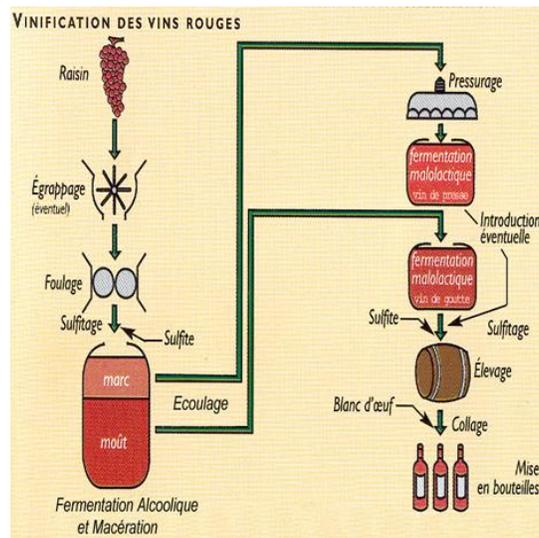


Figure I.26. Procédés de fermentations classiques en rouge

5.3. Les marcs de raisins : sous-produits de la vinification.

Le marc de raisin est le principal sous-produit de la vinification, qui peut être riche en composés d'intérêt. Il est constitué du résidu solide (pépins, pellicules, rafles) restant après l'étape de pressurage du vin blanc ou du vin rouge (Crespo *et al.*, 2010). Les marcs de raisin constituent

environ 20% du poids des raisins utilisés pour la vinification, ce qui génère presque 9 millions de tonne par an (Schieber *et al.*, 2001).

Plusieurs études ont tenté de trouver des applications industrielles au marc de raisin (Figure I.27). Ils ont été utilisés en tant qu'aliment pour bétail (Larwence, 1991; Santiago *et al.*, 1993). Plus tard, ils ont retrouvé une large gamme de produits dans ces marcs comme l'éthanol (Silva *et al.*, 2000), les tartrates (Nurgel & Canbas, 1998), l'acide citrique (Hang & Woodams, 1985), l'acide malique, les hydrocolloïdes (Stredansky & Conti, 1999), les fibres alimentaires (Saura-Calixto, 1998 ; Girdhar & Satyanarayana, 2000). Les valorisations actuelles de ces sous-produits concernent le compostage bien que les restrictions environnementales aient réduit leur utilisation.



Figure I.27 - Stockage de marc de raisin, sous-produit de la vinification en rouge.

De nos jours, une grande importance a été accordée à la valorisation des composés phénoliques du marc du raisin. En fait, les sous-produits de la vinification, principalement le marc du raisin sont riches en composés phénoliques dotés d'un fort pouvoir antioxydant, les composés phénoliques constitués principalement des flavonoïdes et des non flavonoïdes (Ducasse, 2009). D'où l'intérêt de valoriser ces marcs, tout en optimisant l'extraction de ces composés phénoliques (Gonzalez-Paramas *et al.*, 2004), présentant une capacité de réduire le risque des cancers et maladies cardio-vasculaires (Teissedre, 1996 ; Karadeniz *et al.*, 2000).

6. Procédés usuels d'extraction des composés phénoliques :

Les vins rouges sont des vins de macération ; cette macération est responsable de toutes leurs caractéristiques spécifiques, visuelles, olfactives et gustatives qui les différencient des vins

blancs. Elle apporte essentiellement les composés phénoliques (anthocyanes et tanins) qui participent à la couleur et à la structure générale. Par conséquent la conduite de la macération, nécessite la recherche d'un compromis ; elle doit être une extraction fractionnée, portant exclusivement sur les constituants doués d'un bon arôme et d'une bonne saveur, mais ils doivent être extraits en totalité. Pour régler le niveau d'extraction au cours de la macération, le vinificateur dispose d'un certain nombre de pratiques qui agissent sur la mortification des tissus et favorisent la dissolution des composés phénoliques. En effet, la paroi de la baie de raisin participe à la cohésion des cellules et confère donc les propriétés mécaniques de fermeté et de texture à la baie (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004). Par ailleurs, en vinification, la paroi peut constituer un frein à la diffusion de composés recherchés dans les vins comme les composés phénoliques. Le faible rendement d'extraction peut être expliqué par la forte résistance des parois cellulaires de la peau et des membranes cytoplasmiques au transfert de masse (Monagas *et al.*, 2005; Pinelo *et al.*, 2006). Le dosage des composés phénoliques dans les différentes parties de la grappe et la comparaison avec les valeurs trouvées dans le vin indiquent que seulement environ 20 à 30% du potentiel du raisin se trouvent dans le vin. La perte est importante, plusieurs efforts ont été déployés pour proposer de nouveaux procédés d'extraction améliorant l'extraction des composés phénoliques durant la vinification. L'extraction ne peut être possible que si les membranes cellulaires sont suffisamment perméables pour laisser passer les différentes tailles de molécules. Pour augmenter la perméabilité des membranes cellulaires intactes, différentes études ont été menées dans le but d'améliorer la diffusion des composés phénoliques durant la vinification en rouge (Sun *et al.*, 2001 ; Sacchi *et al.*, 2005 ; Lopez *et al.*, 2008a,b), à partir des raisins et du marc du raisin.

6.1. Extraction par solvant:

L'isolement des principes actifs en général (composés phénoliques, colorants...) à partir des cellules est réalisé en faisant appel à l'extraction solide-liquide (Schwartzberg & Chao, 1982 ; Mafart & Béliard, 1992; Aguilera & Stanley, 1999). Parmi les nombreuses techniques d'extraction, l'extraction par solvant est la méthode la plus ancienne et, également, la plus utilisée. Dans la forme la plus simple de ce procédé, la matière à extraire et le solvant sont bien mélangés. Ensuite, une série de processus successifs a lieu traduisant l'interaction entre le solide et le solvant (Mafart, 1992) (Figure I.28):

- transfert du solvant du milieu environnant vers la surface externe du solide,
- la diffusion du solvant au sein de la matrice solide,
- la dissolution du soluté dans le solvant,
- la diffusion du soluté dissous dans le solvant de la matrice solide vers la surface,
- le transfert par convection ou diffusion du soluté vers la masse restante du solvant.

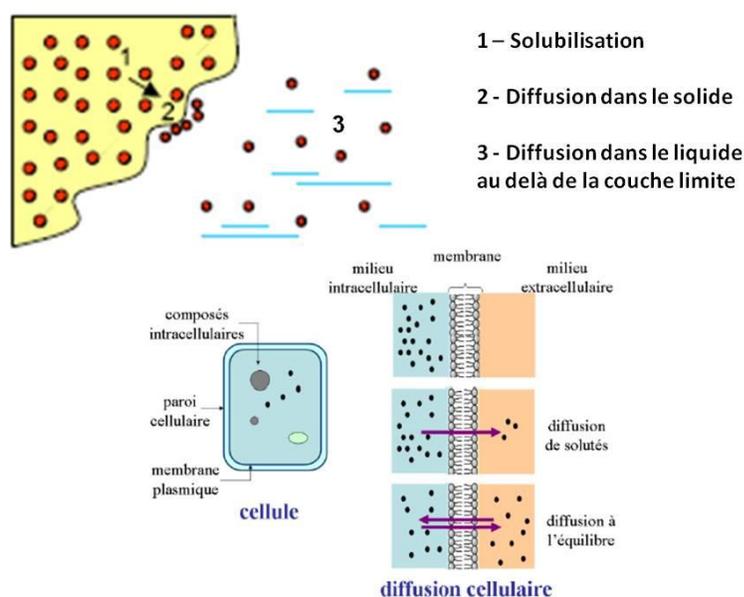


Figure I.28- Mécanisme de l'extraction solide liquide et schéma de la diffusion à travers de la membrane cellulaire

Concernant l'application de l'extraction par solvant au sous-produit de la vinification, Bonilla *et al.*, 1999 ont trouvé que le taux d'extraction des composés phénoliques à partir de marcs de raisin est significativement influencé par la taille de la matière première. La fragmentation (ou broyage) d'un produit améliore le transfert de matière en augmentant la surface de contact entre solvant et solide. A l'échelle industrielle, l'extraction des composés phénoliques des marcs de raisin (issus de la vinification en blanc) réalisée en discontinu est effectuée pendant 20 h (4 batchs de 5 h) à 50°C. Lorsque l'extraction industrielle est réalisée en continu, elle est effectuée à une température d'environ 30-40°C pour un temps de séjour de 3 h – 3 h 30.

Une optimisation de l'extraction des composés phénoliques et des anthocyanes monomériques de baies de raisin Cabernet Sauvignon en utilisant la Méthodologie de la Surface de Réponse (RSM), a été effectuée par El Hajj *et al.*, 2012. Dans cette étude, la comparaison entre deux mélanges d'extraction, acétone/eau ou méthanol/eau et l'effet de trois variables critiques – le

temps d'extraction (entre 8 et 88 h), la température d'extraction (entre 1 et 35°C) et le pourcentage du solvant d'extraction dans le mélange (entre 63 et 97%) ont été étudiés sur les rendements des composés phénoliques et des anthocyanes monomériques en utilisant la RSM. Les conditions du procédé maximisant le rendement des composés phénoliques ont été 87% d'acétone, après 88h d'incubation à 26°C, et ceux du rendement des anthocyanes monomériques 97% de méthanol, après 8h d'incubation à 10°C. Au niveau industriel, ce procédé pourrait être à la base d'une technique prometteuse pour l'extraction de molécules bioactives de plantes ou de sous-produits comme ceux issus des industries viticoles ou de jus de raisin (El Hajj *et al.*, 2012).

Effet des paramètres opératoires:

De nombreuses études ont montré l'influence des variables expérimentales sur la procédure d'extraction des composés phénoliques. Les principaux sont la nature du solvant, la température, le temps de contact (Liorach *et al.*, 2004), le ratio liquide-solide, la taille des particules .

Dans les méthodes d'extractions par solvant, les extractants les plus fréquemment utilisés pour extraire les composés phénoliques des végétaux sont : l'éthanol, le méthanol, l'acétone et l'acétate d'éthyle avec ou sans eau (Moure *et al.*, 2001; Lapornik *et al.*, 2005 ; Awika *et al.*, 2005 ; Amr & Al-Tamimi, 2007 ; Caridi *et al.*, 2007). En effet des mélanges de solvants organiques avec l'eau ont démontré une plus grande richesse à la diversité phénolique des extraits (Cork & Krockenberger, 1991; Palma & Taylor, 1999; Jayaprakasha *et al.*, 2001; 2003; Baydar *et al.*, 2004), qu'un seul solvant utilisé à l'état absolu. Les données de la littérature montrent que l'acétone et le méthanol sont les solvants les plus appropriés pour extraire respectivement les composés phénoliques et les anthocyanes des raisins (Revilla *et al.*, 1998; Jayaprakasha *et al.*, 2001 ; Baydar *et al.*, 2004 ; Kapasakalidis *et al.*, 2006). En effet, l'extraction d'anthocyanes de la pulpe est 20% plus efficace avec le méthanol qu'avec l'éthanol, et 73% plus efficace avec le méthanol qu'avec l'eau (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009). Pourtant, l'éthanol est préféré par "Food and Drug Administration", vu qu'il est moins toxique que le méthanol (Ignat *et al.*, 2011). La température et le temps de contact sont des paramètres importants qu'il est nécessaire d'optimiser. L'augmentation de la température favorise l'extraction en augmentant la solubilité des composés et leurs coefficients de diffusion. Toutefois, la stabilité des composés phénoliques est affectée par la température. Lorsqu'ils sont maintenus au-delà d'une certaine température pendant un temps donné, ils sont dégradés thermiquement (oxydation) et perdent

leur activité antioxydante (Lafka *et al.*, 2007). La température limite à ne pas dépasser varie selon les auteurs ; elle est de 50°C pour certains (Cacace & Mazza, 2003) ou de 60°C pour d'autres (Spigno *et al.*, 2007).

L'étude de l'influence de la durée d'extraction optimale des composés phénoliques donnent des résultats assez contradictoires. Certains auteurs préconisent de courtes durées d'extraction de 5 à 30 min (Bonilla *et al.*, 1999 ; Pinelo *et al.*, 2005 ; Yilmaz *et al.*, 2006) alors que d'autres montrent la nécessité de plus longs temps de contact de 1 à 24 h (Lapornik *et al.*, 2005; Pekic *et al.*, 1998; Pinelo *et al.*, 2005). Le couple temps/température est à déterminer en fonction des molécules recherchées mais également du solvant. Par exemple, l'extraction des anthocyanes de cassis peut être réalisée à de hautes températures (> 50°C) lorsqu'un solvant hydro-alcoolique est utilisé alors qu'avec de l'eau sulfitée, il est nécessaire d'extraire à de plus faibles températures pour atteindre un rendement d'extraction similaire et éviter une dégradation des anthocyanes (Cacace & Mazza, 2003).

7. Nouvelles technologies utilisées pour l'intensification de l'extraction des composés phénoliques durant la vinification en rouge

De nombreux procédés d'intensification se sont développés dans le but d'améliorer l'extraction des composés phénoliques durant la vinification en rouge tels que les extractions assistées par enzymes pectolytiques, ultrasons et microondes, la thermovinification et la Flash détente. Des macérations pré-fermentaires à froid et à chaud ont été aussi adoptées pour améliorer l'extraction. De plus, les puissances pulsées (champs électriques pulsés et décharges électriques) sont des techniques qui agissent sur les membranes et/ou les parois cellulaires et facilitent ainsi l'extraction de biocomposés. Les procédés d'extraction permettent de réaliser une extraction plus ou moins complète et sélective des constituants de la baie de raisin (Flanzy *et al.*, 1998).

7.1. Extraction assistée par enzymes pectolytiques :

Les préparations enzymatiques commerciales servent essentiellement à amplifier et améliorer les phénomènes naturels observés au cours de la vinification. Les enzymes œnologiques ont pour application principale la dégradation des pectines, éléments constitutifs de la baie de raisin. Elles contiennent principalement des pectinases (PG, PL, PME) et des β -glucanases. Ces enzymes présentes dans les préparations industrielles ne sont jamais totalement absentes du

raisin, de la levure ou de la flore microbienne. L'apport d'enzymes exogènes est en général justifié par la faiblesse des niveaux d'activités rencontrés dans le raisin ou les levures. Cet ajout permet d'accélérer et d'optimiser les phénomènes recherchés par le vinificateur. Les enzymes commerciales sont produites par des micro-organismes sélectionnés : *Aspergillus niger* pour les pectinases et *Trichoderma harzianum* pour les β -glucanases. Les préparations s'utilisent à différents stades d'élaboration du vin : sur raisin, sur moût, et sur vin jeune en fin de fermentation (Canal-Llaubères, 2000). Elles sont utilisées pour le débourbage et la clarification, pour la macération et l'extraction, pour la révélation des arômes et pour l'élevage sur lies.

L'ajout d'enzymes dégrade les enveloppes cellulaires et aide à une plus grande libération de jus (Marteau, 1972, Canal-Llaubères *et al.*, 1989 ; Villettaz, 1996). La dégradation poussée des parois cellulaires de la pellicule par les préparations commerciales (à activités pectolytiques, hémicellulases et cellulases) permet la lyse de la paroi cellulaire de la pellicule de raisin. Ce qui entraîne une augmentation de l'extraction du potentiel aromatique polyphénolique de la vendange (Canal-Llaubères, 1990 ; Lecas, 1994; Villettaz, 1996). Les préparations dites de macération sont riches en pectinases et contiennent des activités secondaires type cellulase-hémicellulase. Ces préparations permettent d'augmenter l'extraction de certains constituants contenus dans la paroi cellulaire de la pellicule de raisin, tels que les composés phénoliques (anthocyanes) et donc de la couleur. Cependant, des activités contaminantes (β -D-glucosidases) des cellulases dégradant les anthocyanes et les flavonols ont été détectées (Le Traon-Masson & Pellerin, 1998) entraînant la perte de couleur pour les anthocyanes et l'apparition de trouble du fait de la faible solubilité des aglycones des flavonols (Somers & Ziemelis, 1985). De plus, les enzymes facilitent la dégradation des pectines et des glucanes, améliorant ainsi la filtrabilité des vins (Humbert *et al.*, 2003). Les préparations enzymatiques sont souvent déterminantes pour obtenir un vin de bonne qualité. Par conséquent, l'utilisation d'enzymes pour l'élaboration d'un vin doit être maîtrisée par l'œnologue. C'est pour cette raison que l'emploi de diverses préparations enzymatiques est devenu un outil important pour faciliter la clarification des moûts (pectinases améliorent et accélèrent le débourbage) et renforcer ainsi le profil aromatique (Castro-Vázquez *et al.*, 2002, Cabaroglu *et al.*, 2003) de certains cépages.

L'impact des enzymes de macération sur l'extraction des composés phénoliques :

Beaucoup d'études ont cherché à démontrer l'effet des enzymes sur la composition des vins en composés phénoliques. Une extraction accrue des tanins et l'augmentation de l'indice des composés phénoliques totaux sont observés dans de nombreux cas (Canal-Llaubères, 1990 ; Revilla *et al.*, 2002; 2003 ; Salinas *et al.*, 2003; Bautista-Ortin *et al.*, 2005 ; Guadalupe *et al.*, 2007 ; Kelebek *et al.*, 2007). Les études effectuées sur l'effet des préparations enzymatiques sur la composition polyphénolique, l'extraction des anthocyanes et sur la couleur donnent des résultats conflictuels (Sacchi *et al.*, 2005). Une augmentation de la teneur en anthocyanes est décrite dans certains cas (Parley, 1997; Wightman, *et al.* 1997; Kammerer *et al.*, 2005), les enzymes pectolytiques ont été utilisés pour augmenter la couleur du vin, car elles dégradent la paroi cellulaire des pellicules de raisins, ce qui libèrent les anthocyanes (Ducruet *et al.*, 1997 ; Ducasse *et al.*, 2010). Tandis que dans d'autres études, l'effet des enzymes sur les anthocyanes n'est pas décelable ou se traduit par une perte (Pardo *et al.*, 1999; Revilla *et al.*, 2002; Salinas *et al.*, 2003; Kelebek *et al.*, 2007). Ces divergences peuvent être dues à des différences de compositions de raisin en composés phénoliques. La couleur étant liée à de nombreux paramètres (réactivité des anthocyanes, pH, bisulfite, copigmentation), l'impact des traitements enzymatiques sur l'intensité colorante n'est pas toujours corrélé à la concentration en anthocyanes. Ainsi, Kelebek *et al.*, 2007 ont observé une augmentation de l'intensité colorante (IC) et des anthocyanes alors que d'autres auteurs (Bautista-Ortin *et al.*, 2005 ; Parley, 1997) ont démontré une augmentation de l'intensité colorante (IC) et une diminution des anthocyanes et suivant les préparations enzymatiques, une diminution de l'IC et des anthocyanes.

7.2. Extraction assistée par ultrasons :

L'extraction assistée par ultrasons est un nouveau procédé d'extraction permettant d'extraire des molécules de faibles poids moléculaires (Hromadkova *et al.*, 2002). Dans les secteurs agroalimentaire et pharmaceutique, les ultrasons permettent l'extraction de composés bioactifs tels que les flavonoïdes, les huiles essentielles, les polysaccharides et les esters. Cette technologie s'est développée jusqu'au niveau industriel. En effet, les traitements par ultrasons améliorent l'extraction des composés phénoliques des végétaux (Entezari Nazary &

Khodaparast, 2004, Gonzalez *et al.*, 2006; Cabredo *et al.*, 2006; Corrales *et al.*, 2008, Chemat *et al.*, 2011).

Le principe :

Les ultrasons sont des ondes sonores qui génèrent des vibrations mécaniques dans un solide, un liquide ou un gaz. Elles ont la capacité de se déformer. Elles sont principalement caractérisées par leur fréquence (15 kHz-500 MHz). L'amplitude ou l'intensité des ondes permet de classer les ultrasons pour leurs applications industrielles : ultrasons de faible intensité (1-3 W/cm²), appliqués souvent pour le contrôle de la qualité des produits. Ces ultrasons génèrent de stable cavitation, alors que les ultrasons de forte intensité (10-1000 W/cm²) génèrent des cavitations transitoires, appliqués pour la modification des produits par rupture physique des tissus (Santos *et al.*, 2009). La propagation des ondes sonores dans les liquides soumis aux ultrasons à hautes intensités induit en alternance des cycles de haute pression (compression) et des cycles de basse pression (à basse pression). Les séries de ces cycles de compressions et de raréfactions créent une pression acoustique. Au cours du cycle de basse pression, les ondes ultrasonores créent des petites bulles de cavitation dans le liquide. Lorsque ces bulles atteignent un volume pour lequel elles ne peuvent plus absorber de l'énergie, elles éclatent violemment au cours d'un cycle de haute pression (Suslick, 1998). L'effondrement de cavité est asymétrique et produit un jet de liquide à grande vitesse. Le principal effet physique et mécanique des ultrasons est alors la production de micro-jets dirigés vers une surface solide lors de l'implosion des bulles de cavitation (Chemat *et al.*, 2010). Les bulles entrent elles-mêmes en collision et sont responsables du phénomène de cavitation. Durant l'implosion, de très hautes températures (5000°C) et pressions (2000 atm) sont atteintes localement (Santos *et al.*, 2009) (Figure I.29). Il est à noter que le niveau de température et de pression atteint dépend toutefois de la fréquence des ultrasons appliqués. L'implosion des bulles de cavitations provoquent également des jets de liquide qui peuvent atteindre la vitesse de 280 m/s.

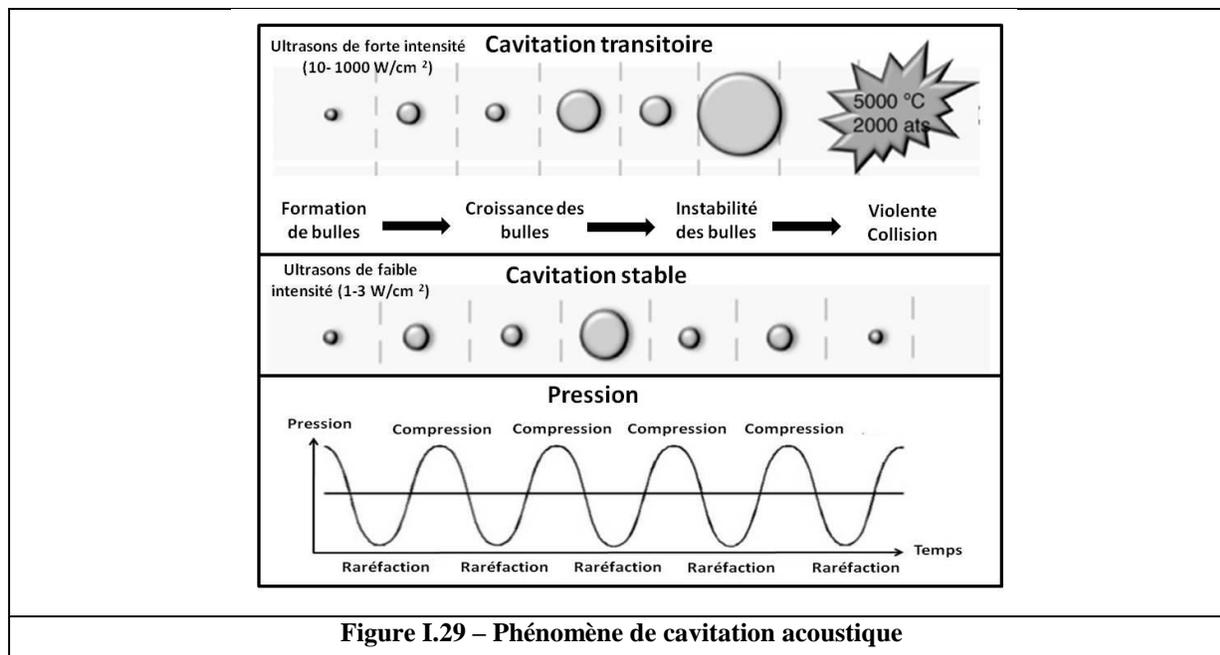


Figure I.29 – Phénomène de cavitation acoustique

Les effets sonochimiques de ces cavitations se traduisent entre autres par des accélérations de cinétique et/ou d'amélioration du rendement d'extraction solide-liquide (Haunold, 1991). Les membranes cellulaires des produits se trouvant à proximité subissent alors d'importants cisaillements répétitifs. Les forces de cisaillement résultant détruisent l'enveloppe des cellules, ce qui altère ces membranes cellulaires et libèrent le contenu intracellulaire dans le milieu environnant (Chemat *et al.*, 2004). La littérature indique que l'application des ultrasons à 20-35 kHz améliore l'extraction des composés phénoliques des résidus du raisin rouge (Gonzalez *et al.*, 2006) et à partir des pépins de raisins (Ghafoor *et al.*, 2009). Par ailleurs, Novak *et al.*, (2008) ont montré que l'extraction par ultrasons améliorent l'extraction des flavonoïdes à partir de la peau des raisins rouges tout en évitant une dégradation indésirable des composés phénoliques. Il a été démontré également que les ondes ultrasonores améliorent l'extraction des composés phénoliques et d'autres composés bioactifs à partir de moût de raisins (Cocito *et al.*, 1995). De même, de faibles irradiations ultrasoniques ont aboutit à une augmentation de la quantité de composés phénoliques extraits dans le vin rouge (Masuzawa *et al.*, 2000). Cette amélioration est causée par la perturbation des membranes cellulaires, la réduction de la taille des particules et à l'amélioration du transfert de masse causée par la collision des bulles responsables de la cavitation (Vinatoru, 1999; Paniwnyk *et al.*, 2001).

Effet des paramètres opératoires:

Une meilleure utilisation de la méthode d'extraction par ultrasons passe par l'optimisation de plusieurs paramètres. Parmi ces paramètres, on retrouve les paramètres classiques tels que la nature du solvant, le rapport masse de matière/volume de solvant, le temps ou encore la taille des particules, mais également des paramètres plus spécifiques à la technique tels que la fréquence des impulsions, la température du bain, l'amplitude des impulsions, le mode continu ou alterne et la puissance (Wang, 2006). La sélection d'un solvant est généralement basée sur l'affinité moléculaire entre le solvant et le soluté. Des études ont pu démontrer que pour obtenir une intensité de cavitation maximale, l'extraction à l'eau doit être effectuée à 35°C (bain-marie) alors que celle à l'éthanol doit être maintenue à 21°C (bain glycolé).

Plusieurs études ont comparé l'efficacité de la technique d'extraction assisté par ultrasons aux techniques classiques telles que le Soxhlet (Smain *et al.*, 2004).. Une étude a démontré que la température optimale d'extraction par ultrasons se situe entre 40 et 60°C (Romdhane & Gourdon, 2002). Ainsi comparé aux fortes températures nécessaires pour l'extraction au Soxhlet, cette technique permet d'éviter la dégradation de certains composés thermolabiles. De plus, le temps requis avec cette méthode est largement inférieur au temps nécessaire pour obtenir un résultat identique par macération au solvant ou par extraction Soxhlet. Cependant, les effets des ultrasons sur l'extraction en termes de rendement et de cinétique sont liés à la nature de la matrice elle-même. La présence d'une phase dispersée conduit à l'atténuation de vague d'ultrasons dans la proximité de l'émetteur ultrasonique. De plus, à haute puissance, il y a le risque de provoquer une altération de la qualité du produit.

7.3. Extraction assistée par microondes :

Les micro-ondes se situent dans la bande de fréquences comprises entre 300 MHz et 300 GHz. L'extraction assistée par micro-ondes offre un transfert rapide d'énergie et un chauffage simultané de l'ensemble « solvant et matrice végétale solide ». Le principe de l'extraction par micro-ondes est d'apporter, très sélectivement, une grande quantité d'énergie à l'intérieur de la cellule végétale ou biologique pour provoquer sa rupture sans dégrader les produits libérés. En absorbant l'énergie des microondes, l'eau présente dans la matrice végétale favorise la rupture des cellules facilitant ainsi la libération des produits chimiques de la matrice et améliorant leur extraction (Kaufmann *et al.*, 2001).

L'extraction assistée par microondes appliquée pour les raisins a montré son efficacité pour extraire les composés phénoliques des sous-produits de la vinification dans différentes conditions : Une optimisation de l'extraction des anthocyanes de la pellicule du raisin a été effectuée par Liazid *et al.*, 2011 en utilisant du méthanol à 40%, une température de 100°C, une durée de 5 min et une puissance de 500 W.

Pérez-Serradilla & Luque de Castro, 2011 ont montré l'efficacité de l'extraction des composés phénoliques par microondes des lies de vin avec une teneur en éthanol de 75%, une durée d'extraction de 17 min et une puissance de 200W. De plus, l'extraction de composés phénoliques de pépins de raisin de cultivars *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon, Shiraz Sauvignon Blanc et Chardonnay, a été optimisé par Wijngaar *et al.*, 2011 en utilisant la méthodologie de surface de réponse avec la technologie à micro-ondes assistée. Les paramètres optimaux étaient 47,2% d'éthanol, un ratio liquide: solide (3 :1) et une durée de traitement de 4,6 minutes.

7.4. La thermovinification

De nombreux travaux expérimentaux ont été réalisés en France dès les années 1970, sur les vinifications de vendanges thermotraitées. La thermovinification est une méthode physique développée dans le but de permettre une extraction rapide des composés phénoliques (Parenti *et al.*, 2004, Kelebek *et al.*, 2007) et des arômes (Crachereau, 2012) de la pellicule du raisin pendant la fermentation en rouge.

Classiquement, le procédé consiste à chauffer la vendange foulée éraflée à 70-75°C pendant un laps de temps très court (30 à 40 minutes), la pressurer, la refroidir et la vinifier en phase liquide après clarification (Fischer *et al.*, 1997). Cette technique est largement utilisée dans les grosses unités de vinification (Davaux & Oubart, 2008). Ce chauffage permet une modification de la composition du moût qui peut être intéressante dans certains cas. Ainsi, en cas de vendange altérée par le *Botrytis* (pourriture grise), le principal danger lié au *Botrytis* est la laccase qui favorise l'oxydation rapide de la couleur et des arômes ; celle-ci va être détruite par la chaleur. De même, en cas de maturité insuffisante, les pyrazines, molécules aromatiques responsables du caractère végétal de certains cépages bordelais, vont être détruites par le chauffage de la vendange. Les deux avantages principaux de la thermovinification, concernent l'objectif de réduction des besoins en cuverie de fermentation par l'élimination immédiate de toute la masse

solide (Desseigne *et al.*, 1998 ; Boulet *et al.*, 1988) et l'amélioration de l'extraction des composés pelliculaires et notamment des composés phénoliques (Crachereau, 2012).

Le chauffage de la vendange entre 60 et 85°C permet de fragiliser les parois cellulaires pour en libérer facilement le contenu, perturber la structure de cellule permettant une extraction immédiate de tous les constituants cellulaires, en particulier des anthocyanes. Le chauffage dénature également la polyphénol oxydase, empêchant le brunissement (Sacchi *et al.*, 2005). Cependant, la technique de thermovinification classique ne permet pas l'élaboration de vin à forte structure tannique (Girard *et al.*, 2001), et les vins obtenus sont dans la majorité des cas vinifiés en phase liquide (macération à chaud de 30 minutes), ce qui conduit à l'obtention de vins souples et fruités (Davaux & Oubart, 2008). Les aspects positifs de la thermovinification ne doivent pas occulter les effets secondaires de la technique. La limite du procédé concernait la perte de la couleur au cours des mois suivant la vinification. Ces vins ne correspondaient pas à des vins d'AOC « appellations d'origine contrôlée ». De plus, le chauffage entraîne à la fois la dénaturation des enzymes du raisin et l'extraction de pectines différentes de celles qui sont extraites en vinification classique. Le résultat de ce phénomène est une grande difficulté de la clarification des vins thermotraités. Enfin, cette technique présente un coût important.

L'utilisation de la thermovinification dans le but d'améliorer l'extraction existait toujours mais le développement récent et très important de la thermovinification est surtout lié aux incidences qualitatives du chauffage de la vendange (Crachereau, 2012). Donc, pour toutes les lacunes de cette méthode, une évolution du chauffage de la vendange s'est développée dans les caves depuis une dizaine d'année. Cette évolution a été élucidée par les technologies suivantes : la macération préfermentaire à chaud, la Flash détente et la thermodétente.

7.5. La macération préfermentaire à chaud:

Pour améliorer les extractions des composés phénoliques à partir des raisins, avec le même équipement traditionnel de la thermovinification, une évolution du chauffage de la vendange a été mise en place par un nouveau procédé intitulé « Macération Préfermentaire à Chaud de longue durée » (MPC). Le niveau de traitement thermique est identique à celui de la thermovinification classique, le raisin est alors chauffé de 70 à 75°C. Par contre, la phase de la macération à chaud dure beaucoup plus longtemps, jusqu'à une quinzaine d'heures (Escudier *et al.*, 2008). Après ce chauffage, le moût est ensuite refroidi autour de 25-30°C. Contrairement à

la thermovinification, il n'y a pas de séparation de phase, le moût est vinifié de façon dite « classique » (Vallée *et al.*, 1997). Dans cette technique, il n'y a pas d'action mécanique. Seul l'allongement de la durée de macération assure la diffusion passive des composés de la pellicule dans le jus.

La MPC entraîne une augmentation rapide de l'extraction des pigments dans le milieu. Ceci étant dû à l'effet de la chaleur, consistant à une mortification des tissus cellulaires conduisant à une diffusion et une libération accrue du contenu cellulaire. Après deux heures de macération préfermentaire à chaud, un gain en indice de composés phénoliques totaux (de 25 à 45%) et des gains en couleurs (de 30 à 40%) ont été observés. En revanche, il n'y a pas de gain supplémentaire au-delà de 6 à 7 heures (Cottureau *et al.*, 2007). Le chauffage induit donc une profonde modification du moût (plus coloré, plus riche en anthocyanes et en composés phénoliques totaux), mais les gains obtenus ne sont pas tous conservés et, après égouttage-pressurage, ces vins sont analytiquement proches des vins vinifiés classiquement (Vallée *et al.*, 1997). Les anthocyanes extraits n'ont pas été stabilisés dans le milieu et ont disparu (précipitation, absorption). En effet, le chauffage a accéléré la diffusion de ces composés dans le milieu. Le refroidissement du moût a entraîné l'insolubilisation de ces complexes (précipitation, disparition). Les teneurs sont alors redevenues proches à une vinification classique. De plus, le départ en fermentation alcoolique, avec une adsorption sur les levures et l'apparition d'éthanol dans le milieu, peut conduire aussi à cette disparition. Au niveau organoleptique, dans les essais avec macération en phase fermentaire, les profils olfactifs des vins sont très peu modifiés par rapport à ceux des vins « vinification traditionnelle » (Cottureau *et al.*, 2007).

La contrainte de cette technique reste que la vendange doit être refroidie avant mise en fermentation (comme en thermovinification). L'avantage de cette macération est qu'elle n'impose pas de surcoût en termes d'équipement mais en revanche, il y a un surcoût au niveau énergétique pour refroidir la masse de vendange.

7.6. La Flash détente :

Dans cette technique, la vendange est chauffée entre 85 et 96°C pendant 3 à 4 minutes, puis elle est envoyée dans une enceinte sous vide-poussé (de l'ordre de 50 – 60 hPa soit 50 à 60 mbars). Cette mise sous-vide entraîne une vaporisation et une expansion instantanée de l'eau des raisins avec en parallèle un refroidissement de la vendange chaude à une température d'environ 30°C.

La mise sous-vide de la vendange chaude provoque une désorganisation mécanique de la pellicule des baies de raisin, une fragilisation des structures cellulaires qui permet l'extraction des composés phénoliques. Elle permet d'obtenir des vins rouges plus colorés et plus riches en tanins (Davaux & Oubart, 2008, Moutounet & Escudier, 2000).

Ce procédé a fait l'objet de protection de brevets (Escudier *et al.*, 1993, Cogat, 1995). Le procédé flash détente (Moutounet & Escudier, 2000; Escudier *et al.*, 2002), qui a fait ses preuves en vinification en rouge, permet une extraction poussée de la couleur et pourrait être particulièrement bien adapté aux objectifs visés (Escudier *et al.*, 2008). La figure I.30 présente le principe de la Flash détente. Comme ce schéma l'indique, la vendange est montée en température à 90°C, en 4 à 6 minutes, par la vapeur (1). Ensuite elle est acheminée dans ce que l'on appelle le « cône de détente », où la température est abaissée immédiatement à 30-35°C sous vide, par la chute brutale de pression, avec formation de vapeur. Ainsi, la brusque vaporisation de l'eau contenue dans la baie, et en particulier dans la pellicule, provoque une déstructuration cellulaire qui va favoriser les phénomènes d'extraction des composés pelliculaires, principalement la libération des composés phénoliques (tanins et matières colorantes principalement) (2) (Moutounet & Escudier, 2000 ; Ageron *et al.*, 1995). Cette vaporisation est la conséquence de la mise sous-vide rapide qui, par équilibrage de la température au vide donné, refroidit toute la vendange (liquide exogène et intracellulaire) et génère cette vapeur d'eau issue de la vendange. A la sortie du cône, la température de la vendange se situe aux alentours des 28-32°C.

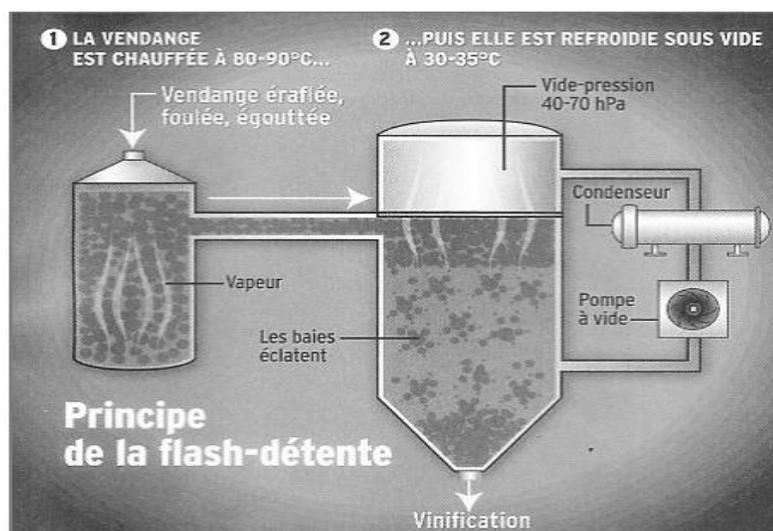


Figure I.30 - Principe de la Flash détente

La vapeur d'eau condensée est classiquement réintroduite dans la vendange sous forme de condensats. Sous le vide considéré, la vapeur d'1 kg d'eau occupe un volume de 28 m³, ajouté à l'instantanéité de la vaporisation, ceci explique l'effet déstructurant au niveau tissulaire (Figure I.31) et la fragmentation des pellicules.

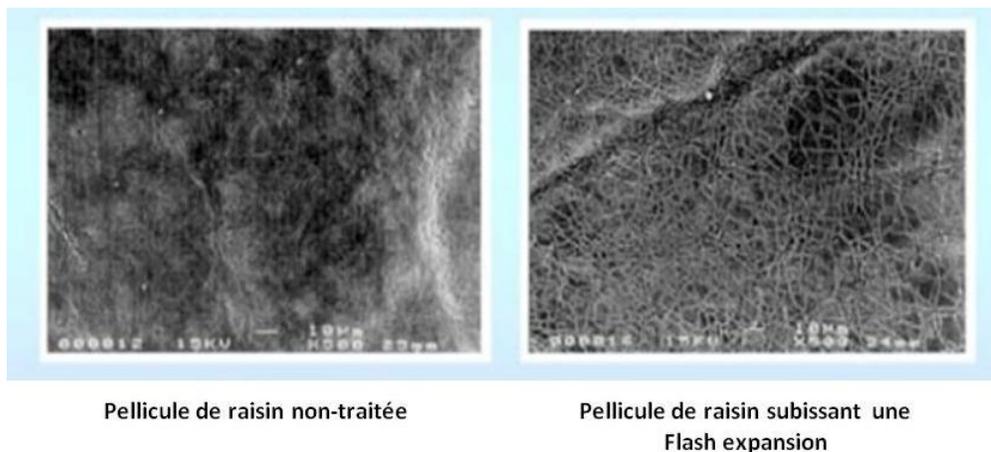


Figure I.31- Effet déstructurant de la Flash expansion sur la pellicule du raisin
(Ageron et al., 1995)

La vendange traitée par Flash-détente est ensuite vinifiée soit en phase liquide, soit en macération fermentaire sur marc. De nos jours, le procédé peut traiter de 15 à 30 tonnes par heure. Les professionnels y ont recours pour raccourcir le temps de macération et avoir des vins plus aromatiques et colorés. Ce système est assez coûteux, il exige un investissement de l'ordre d'1 à 1,5 millions d'euros.

Au niveau analytique, les résultats montrent que le traitement par Flash détente a un impact sur la composition polyphénolique des vins. Les vins traités sont en moyenne plus riches en composés phénoliques totaux (+23% en IPT à souvent + 50% en vinification de 10 jours), plus colorés (+21% en intensité colorante), avec des tanins plus réactifs vis à vis des protéines (Vinsonneau *et al.*, 2006). Les résultats obtenus montrent une très bonne conservation des extractions. Il n'y a pas de pertes de couleur et de tanins. Contrairement aux observations faites couramment sur les vins de thermotraitement, le gain d'extraction observé sur vin jeune se maintient dans le temps pour les vins références Flash Détente (Escudier *et al.*, 2002).

Au niveau organoleptique, les vins sont jugés positivement par les dégustateurs après huit mois d'élevage. Les vins obtenus par Flash détente sont olfactivement moins végétaux. Au niveau

gustatif, ils sont plus structurés avec des tanins plus présents. Ces vins sont globalement mieux notés (Vinsonneau *et al.*, 2006).

7.7. La thermo détente:

La société ERTIA, 10 ans après le développement de la flash-détente, a imaginé un diapositif dont l'objectif est d'obtenir un gain d'extraction sur raisin avant pressurage. L'étape de thermodétente s'intègre dans le procédé de thermovinification. Le principe consiste à appliquer sur une vendange chaude (68 à 80°C), une surpression de 1 à 5 bars pendant quelques secondes (Figure I.32). Le retour à la pression atmosphérique crée une détente brutale, mais sans vaporisation donc sans refroidissement. Ceci tend à fragiliser les cellules des pellicules et favorise l'extraction des composés phénoliques (tanins et anthocyanes) lors de la phase de macération qui suit (Davaux & Oubart, 2008). Par rapport à la Flash détente, le traitement appliqué au raisin est moins intense bien que le niveau de pression puisse être modulé en fonction du cépage, du niveau de maturité et de l'objectif recherché.

La thermo-détente, intégrée à la chaîne de la vinification, provoque une déstructuration complémentaire de la baie de raisin, par un procédé physique, une extraction plus poussée est ainsi attendue. Le procédé est réalisé dans des « bouteilles » de pression, placées entre la sortie du chauffage de la chaîne de thermovinification et la cuve de macération (Escudier *et al.*, 2008).

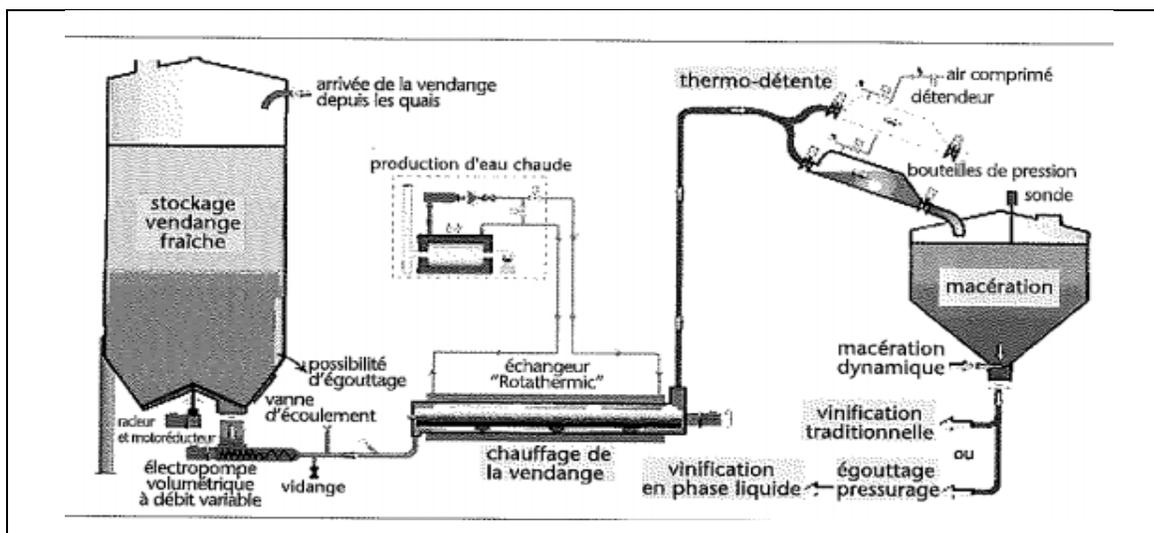


Figure I.32: La chaîne de thermovinification, position du module de thermo-détente.

(Dubernet *et al.*, 2004)

Le gain moyen d'extraction obtenu entre une thermovinification classique et la thermo-détente est de +27% pour les anthocyanes, + 40% pour les tanins et + 37% pour l'intensité colorante. Dans la majorité des cas, cette technologie permet un gain en tanins supérieurs aux anthocyanes (Davaux *et al.*, 2009).

7.8. La macération préfermentaire à froid :

La Macération Préfermentaire à Froid (notée MPF), l'une des techniques de vinification utilisée pour optimiser l'extraction des composés phénoliques du raisin rouge, consiste à retarder le départ en fermentation tout en maintenant la vendange foulée, éraflée, à une température basse (5 à 15°C) pendant plusieurs jours (3 à 6 jours) (Ribéreau-Gayon, 1998). Plusieurs études ont discuté l'effet de la macération préfermentaire à froid sur la qualité du vin. Alvarez *et al.*, (2006) a démontré une augmentation du contenu phénolique, aromatique et de la concentration en anthocyanes du vin obtenu après la macération à froid des raisins du cépage Monastrell. Parenti *et al.*, (2004) ont observé une amélioration de la couleur du vin élaboré à partir des raisins du cépage Sangiovese macérés à froid. Cette macération permet une désorganisation cellulaire, ce qui améliore l'extraction de la couleur, des composés phénoliques (Blouin & Peynaud, 2001, Retali *et al.*, 2004). C'est une alternative à la vinification classique permettant une amélioration de l'extraction des composés phénoliques, des anthocyanes, de la couleur, des macromolécules et de précurseurs d'arômes (Norman, 1992). Cependant, la MPF nécessite un système frigorifique adapté qui permet de refroidir, ce qui est coûteux en énergie (Retali *et al.*, 2004).

7.9. Les Décharges Electriques de Haute-Tension (DEHT)

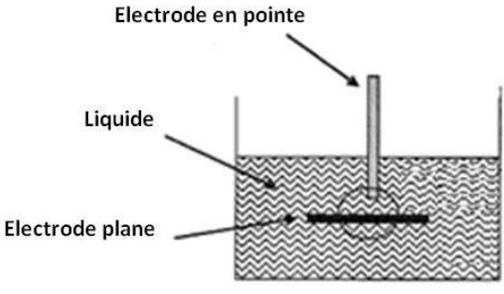
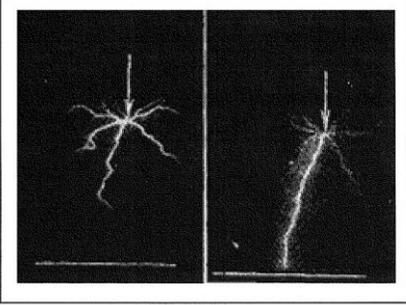
Le traitement par décharges électriques de haute tension est une technique qui consiste à appliquer un champ électrique de haute intensité entre deux électrodes immergées dans l'eau. L'intensité élevée du champ et la forme des électrodes (électrodes pointes ou planes) permettent la formation d'un arc électrique.

Mode d'actions des DEHT :

Les mécanismes mis en jeu lors de l'application des décharges diffèrent selon le milieu où ils se produisent : un milieu gazeux, peut être utilisé après coupure des décharges ; liquide, quoique les bulles de gaz produites, souvent en abondance, peuvent constituer ultérieurement un danger, un solide, sera très généralement dégradé de façon irrémédiable (Vacquié, 1995 ; Tobazéon, 1997).

Application des DEHT dans un milieu liquide :

Les conditions de génération des décharges dans un milieu liquide dépendent essentiellement de la géométrie des électrodes (pointe-plan, électrodes planes, pointe-pointe) (Figure I.33). Souvent, un système pointe-plan est utilisé comme électrode (Tobazéon,1997). En effet, la génération des DEHT est favorisée avec cette géométrie. Cette pointe entraîne le renforcement du champ électrique en son sommet et conduit par la suite à un phénomène spécifique: un arc électrique. De nombreuses théories ont été développées pour expliquer la formation de l'arc électrique dans les liquides. Jones *et al.* (1995) ont supposé l'existence de 4 étapes pour créer un arc dans un liquide avec un champ uniforme. La nucléation d'un site de faible densité dans le liquide à proximité de l'électrode, l'apparition de l'ionisation, la croissance de l'avalanche électronique et la propagation du front ionisant.

 <p>Electrode en pointe</p> <p>Liquide</p> <p>Electrode plane</p>	
<p>Figure I.33 - Géométrie des électrodes.</p>	<p>Figure I.34 - Décharges électriques dans l'eau (Naugol'nyh et Roï, 1971)</p>

La présence d'un électron germe dans un liquide situé entre deux électrodes soumises à une tension, qui dépasse un seuil donné, conduit à une multiplication des charges par collision. Ces dernières acquièrent à leur tour suffisamment d'énergie pour ioniser et/ou exciter d'autres molécules. Une avalanche d'électrons est ainsi formée, une décharge se forme très rapidement entre les électrodes et se propage vers la deuxième électrode. Il en résulte alors la création d'un arc électrique (Figure I.34) (Vacquié, 1995). Le courant électrique qui traverse le liquide pendant la décharge électrique d'une intensité de 1000 A conduit à une augmentation de température qui s'accompagne d'une augmentation de pression et d'une apparition des bulles de gaz dont la taille augmente et diminue périodiquement ce qui provoque des turbulences dans le milieu.

Sous l'effet du champ appliqué, des électrons provenant d'une première électrode sont accélérés et entrent en collision avec les autres molécules environnantes. Actuellement, on considère qu'avant la décharge (claquage) proprement dite, où se développe l'arc, il existe une période de préclaquage, comprenant elle-même deux phases : une phase de génération pendant laquelle se crée un canal conducteur lumineux et ramifié « streamer » et une phase de propagation de la perturbation précédemment créée. Selon les cas, les décharges sont contrôlées par la génération ou par la propagation des streamers et selon la forme et la durée d'application de l'onde de tension, le streamer peut stopper ou progresser jusqu'à l'électrode opposée ; en règle générale, lorsqu'il atteint cette électrode, l'arc se produit. Ainsi, la tension d'apparition des décharges dans un liquide est régie par le comportement des streamers ; elle dépend, pour un même liquide, du type de tension appliqué et de la géométrie des électrodes.

Malgré les effets bénéfiques de ce type de traitement (DEHT) dans l'amélioration de l'extraction, le tissu est fortement fragmenté et les cellules (parois et membranes) sont complètement détruites. Des étapes ultérieures de filtration et de séparation sont à envisager ce qui augmente les coûts du procédé. Les essais de traitement par décharges électriques se font jusqu'à présent en mode discontinu à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote. Les pilotes de traitement en continu ne sont actuellement pas disponibles en raison de la complexité de leur construction et de l'adaptation des générateurs de haute tension.

Applications des DEHT :

Les décharges électriques ont été utilisées comme moyen de dégradation des composés organiques contenus dans l'eau (Surgiaro & Sato, 2001), de l'inactivation des micro-organismes (Zuckerman *et al.*, 2002) et l'amélioration de l'extraction solide-liquide de solutés des produits végétaux (Vishkvaztzev *et al.*, 1998 ; Gros *et al.*, 2003). Les applications des décharges électriques pour l'extraction des antioxydants à partir des raisins sont en plein essor actuellement. Par exemple, les DEHT ont montré leur efficacité pour l'extraction aqueuse des composés phénoliques sur chaque constituant du marc de raisin (pellicules, rafles et pépins) (Boussetta *et al.*, 2009a, 2009b) ainsi que pour l'extraction d'antioxydants à partir de marc de raisin (Boussetta *et al.*, 2011). L'étude de l'effet des DEHT sur l'extraction des composés phénoliques totaux à partir de marc de raisin et l'activité antioxydante des composés phénoliques extraits a montré que la teneur en composés phénoliques extraits augmente après le traitement

par DEHT par rapport à un essai témoin. L'activité antioxydante des extraits est également plus élevée en présence de DEHT. Une autre étude a été menée par Boussetta (2010) pour valider la faisabilité d'appliquer les DEHT à l'échelle semi-pilote pour améliorer l'extraction aqueuse des composés phénoliques à partir de marcs de raisin. Les décharges électriques améliorent significativement l'extraction des composés phénoliques par rapport aux expérimentations témoins (diffusion simple) à la fois à l'échelle laboratoire et à l'échelle semi-pilote. Cette étude a donc permis de valider l'effet positif des DEHT sur l'extraction des composés phénoliques de plusieurs sous-produits de la vinification. Ces performances de traitement par décharges électriques ont été attribuées par plusieurs auteurs à la dénaturation cellulaire lors du passage du courant électrique à travers le produit. Il a également été démontré que lors du traitement par décharges électriques, une pression élevée est générée dans la solution d'extraction. Des bulles de gaz prennent naissance dans la solution et des ondes de choc sont émises dans le milieu lors de la génération de ces bulles. Ces ondes de choc exercent une pression élevée (10^7 Pa) que le produit solide ne peut pas supporter. Il finira par se fragmenter, ce qui aboutit à une augmentation de la surface de contact entre le solide et la solution et facilite l'extraction aqueuse (Barskaya *et al.*, 2000). Par ailleurs, la propagation rapide des bulles de gaz dans la solution, crée des turbulences au niveau de l'interface solide-liquide. Ces turbulences provoquent l'agitation du milieu d'extraction, ce qui facilite et accélère davantage le transfert des solutés du solide vers la solution. L'efficacité des DEHT dépend de plusieurs paramètres à savoir la tension des impulsions, le nombre des impulsions, les propriétés du liquide d'extraction et la conductivité électrique du milieu.

7.10. Les champs électriques pulsés (CEP)

Au cours des dernières décennies, un intérêt croissant pour l'application du champ électrique dans le traitement des aliments et des matières premières agricoles a été noté. Les premiers travaux d'application des champs électriques pulsés (CEP) pour l'extraction à partir des végétaux et des fruits ont été effectués par des chercheurs russes. Le traitement électrique a été appliqué dans le procédé de l'intensification de l'extraction du jus à partir de fruits et légumes (Flaumenbaum, 1949), et pour la diffusion de sucre à partir des betteraves (Zagorulko, 1957, 1958). Dans les années 1990, de nouveaux équipements pilotes de champs électriques pulsés ont été mis au point. Ainsi, en Allemagne, le procédé Elsteril a permis le

traitement de liquides alimentaires variés tandis que le procédé Elcrack a été conçu dans le but d'extraire la matière grasse de poissons. La première industrialisation aux Etats-Unis de produits alimentaires traités par CEP a été réalisée grâce au système PurePulse mis au point par les laboratoires Maxwell en 1993 (Heinz *et al.*, 2002). Récemment, les CEP ont été appliqués à l'échelle industrielle entre 2001 et 2005 grâce au système KEA-Wein (Sigler *et al.*, 2005) (Allemagne) sur des raisins de vigne pour l'amélioration de la couleur et de la teneur en composés phénoliques des vins. Plus récemment, une amélioration du procédé industriel d'extraction de fractions solubles de pomme à l'aide de technologies de CEP est réalisée (Turk, 2010).

Application des champs électriques pulsés :

Actuellement, deux principales applications des champs électriques pulsés sont bien abordées. Il s'agit essentiellement de la réduction microbienne des aliments à basse température (Barbosa-Canovas, 1998 ; Heinz *et al.*, 2002 ; Knorr *et al.*, 2001) en utilisant des CEP de hautes intensités et l'extraction de métabolites ou de composés intracellulaires à partir de cellules végétales en utilisant des CEP de moyennes intensités (Bazhal, 2001 ; Bazhal & Vorobiev, 2000 ; Bouzrara, 2001 ; Vorobiev & Lebovka, 2008 ; Grimi *et al.*, 2009).

Par ailleurs, la technologie des CEP présente plusieurs avantages par rapport aux méthodes de dénaturation classiques. Tout d'abord, c'est une technique isotherme (l'augmentation de la température au cours du traitement est très faible $< 5^{\circ}\text{C}$). De plus, le faible coût énergétique (le CEP est un traitement non thermique), la durée de traitement très courte (quelques millisecondes ce qui entraîne une moindre consommation énergétique), l'intensification et la sélectivité d'extraction sont les principaux avantages de cette technologie. Il est bien à noter que ce soit dans le cas de l'inactivation des micro-organismes ou de l'extraction à partir des végétaux, la théorie d'action des CEP est la même. Ce sont les membranes cellulaires qui sont visées par l'effet du CEP et qui perdent leur perméabilité sélective après traitement.

Mécanisme d'action :

L'exposition des cellules (animales, végétales, microbiennes) à un champ électrique donné (kV/cm) provoque l'endommagement des membranes cellulaires. L'intensité du champ dépend de la nature de la cellule. L'intensité varie généralement entre 0.1 kV/cm pour le traitement des

cellules végétales jusqu'à 40 kV/cm pour l'inactivation des microorganismes. L'originalité d'un traitement par CEP réside dans sa sélectivité vis-à-vis des membranes biologiques. Suite à l'application d'impulsions de courte durée, des instabilités locales au niveau de la membrane cellulaire auront lieu suite à une compression électromécanique. Ce traitement déclenche le processus de formation de pore au niveau de la membrane cellulaire, ce phénomène s'appelle « électroporation » ou encore « électroperméabilisation » (Zimmermann, 1986; Neumann *et al.*, 1992 ; Vorobiev *et al.*, 2006, 2008, H0 & Mittal, 1996). La formation de ces pores peut être temporaire (réversible : ouverture puis fermeture des pores) ou permanente (irréversible : les pores restent ouverts).

Le modèle de Zimmermann (1986) est souvent utilisé dans le but d'expliquer la théorie de l'électroporation. Ce modèle suppose que l'exposition de la cellule vivante à un champ électrique entraîne une polarisation au niveau de la bicouche lipidique formant la membrane qui va se comporter alors comme un condensateur (Figure I.35). Etant donné que les plaques d'un condensateur sont de charges inverses, elles s'attirent en créant une compression électromécanique réduisant l'épaisseur de la membrane. Il s'agit ainsi d'une électrostriction de la bicouche membranaire plate qui va réagir selon une pression inverse provoquant la perforation mécanique de la membrane.

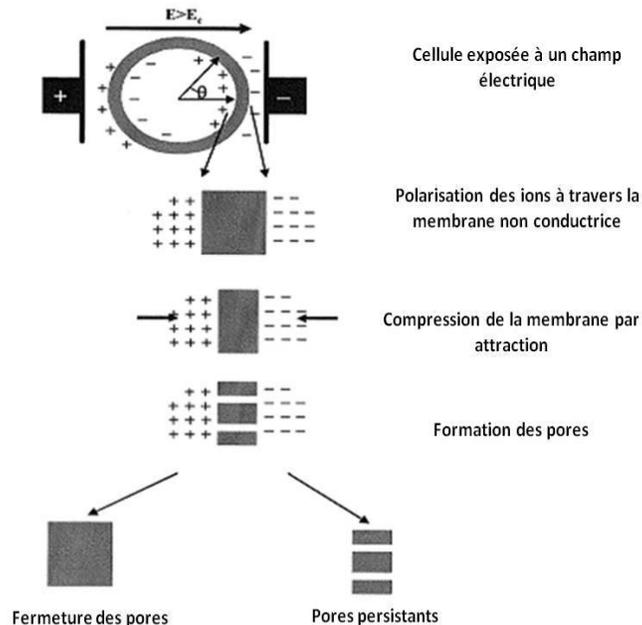


Figure I.35. Description schématique de l'électroperméabilisation des membranes cellulaires.

Zimmermann (1986) a démontré que la valeur critique du potentiel transmembranaire à partir de laquelle la perméabilisation d'une membrane biologique est irréversible, pour un traitement à température ambiante correspond à 1 Volt. Etant donné que le diamètre des cellules végétales est supérieur à celui des cellules de micro-organismes, l'effet des CEP sur la matière végétale peut être visible à moyenne intensité (CEP). En effet, le diamètre d'une cellule végétale est compris entre 10 et 100 μm , donc un CEP d'intensité modérée comprise entre 100 et 1000 V/cm suffit pour atteindre le PTM d'ordre 1 V et la perméabilisation cellulaire.

Principaux paramètres influençant le traitement par CEP :

Lors du traitement par champs électriques, plusieurs paramètres peuvent influencer favorablement ou défavorablement l'efficacité de la perméabilisation.

Intensité du champ électrique

L'application d'un champ électrique externe avec une intensité E supérieure à l'intensité critique, favorise la formation des pores dans la membrane cellulaire. En général, l'efficacité du traitement est d'autant meilleure que l'amplitude du champ électrique est élevée. Par exemple, lorsque des raisins sont traités par CEP par une intensité de champ électrique variant entre 0,3 et 2,5 kV/cm, l'endommagement cellulaire s'intensifie et le taux de composés phénoliques extrait double (Balasa, 2006). Cependant, l'augmentation vers des intensités élevées des CEP ne semble pas toujours apporter d'amélioration. Ceci peut dépendre du cépage. Les études de Lopez *et al.* (2008a, b) ont montré que pour le cépage Cabernet Sauvignon, le meilleur traitement est à une intensité de 5 kV/cm. Par contre pour Graciano, le meilleur traitement est à 2 kV/cm (Lopez *et al.*, 2008 a ,b). Par ailleurs, la taille et l'orientation des cellules influencent la valeur de l'intensité électrique critique et la cinétique de perméabilisation des cellules (Grimi *et al.*, 2010; Heinz, 2002; Toepfl, 2006). Lorsque les cellules sont de petite taille (comme les cellules de micro-organismes avec un diamètre compris entre 1 et 10 μm), l'intensité des CEP nécessaire est élevée ($E_c > 10$ kV/cm). Les cellules végétales étant environ dix fois plus grandes, l'intensité de CEP à appliquer est dix fois plus faible.

Temps de traitement :

La durée du traitement par champ électrique dépend du nombre et de la durée d'impulsions. Différents résultats ont été observés concernant l'effet de la durée des impulsions. Certains travaux (Grimi *et al.*, 2009) indiquent que les impulsions longues (1000 μs) favorisent la

perméabilisation cellulaire dans le cas de raisins traités par CEP. D'autres auteurs stipulent que plusieurs impulsions courtes sont plus efficaces (Elez-Martinez *et al.*, 2004). L'augmentation du nombre d'impulsion et par conséquent la hausse du temps total de traitement par CEP favorise l'extraction des biomolécules (El-Belghiti, 2008; Grimi *et al.*, 2009). Il existe une durée de traitement optimale au-delà de laquelle le taux d'extraction se stabilise. Par ailleurs, les durées de traitements supérieures à celle de la durée optimale contribuent seulement à l'augmentation des coûts énergétiques (Grimi *et al.*, 2009).

Température :

La température a un effet considérable sur l'efficacité du traitement électrique et la perméabilisation cellulaire. Evrendilek & Zhang (2004) ; Heinz *et al.* (2003) ; Li *et al.* (2005) ont confirmé une meilleure efficacité des CEP avec la hausse de la température. Toutefois, une élévation très importante de la température peut avoir un impact négatif sur la sélectivité de l'extraction. En raison de l'influence que peut avoir une haute température sur la conductivité du milieu et donc sur l'amplitude du champ électrique, les conditions de procédé optimales doivent minimiser les échauffements (Wouters *et al.*, 1999). L'élévation de température est favorisée par de fortes fréquences et de longues impulsions (Raso *et al.*, 2000).

Conductivité électrique :

La conductivité électrique est un paramètre clé pour le bon fonctionnement des CEP. Elle est fonction de la température du milieu (Reitler, 1990), une hausse de la température conduit à une augmentation de la conductivité électrique. Au niveau énergétique, un milieu qui présente une conductivité électrique importante nécessite beaucoup plus d'énergie lors du passage du courant.

L'extraction des composés phénoliques assistée par CEP:

Le phénomène d'électroporation par les CEP peut présenter deux applications : la débactérisation et l'extraction de macromolécules du contenu cellulaire. De nombreuses études, portant sur la débactérisation par CEP d'une grande variété de bactéries, ont été effectuées (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1999). Contrairement aux traitements thermiques de pasteurisation, cette technique utilise peu d'énergie.

La possibilité d'améliorer l'extraction des composants des cellules biologiques en utilisant un champ électrique pulsé est connue depuis longtemps. Plusieurs travaux ont évoqué l'amélioration de la diffusion de solutés des tissus végétaux en utilisant les CEP. Jemai et Vorobiev (2001 ;

2003) ont montré que les CEP (500V/cm, 1000 impulsions) améliorent considérablement l'extraction de solutés des pommes (Jemai et Vorobeiv , 2001) et des betteraves à sucres (Jemai et Vorobiev, 2003). De nombreuses études récentes sur l'extraction d'antioxydants à partir des sous-produits de la vinification par un prétraitement électrique ont été menées. Corrales *et al* (2008) ont montré que l'application d'un pré-traitement par champ électrique pulsé ($E= 3 \text{ kV/cm}$, $N= 30$ impulsions, consommation énergétique $W= 10 \text{ kJ/kg}$) sur des pellicules de raisin améliore le contenu phénolique total et la concentration en anthocyanes. Boussetta et al., 2009b ont montré qu'un prétraitement par CEP ($E= 1300 \text{ V/cm}$, $t = 1 \text{ s}$, $W= 120 \text{ kJ/Kg}$) des pellicules de raisins blancs Chardonnay permet d'obtenir un taux de perméabilisation des membranes cellulaires maximal ($Z=1$). Suite au traitement par CEP, une diffusion dans de l'eau distillée a été menée à 20, 40 ou 60°C pendant 3 h. Après 60 min de diffusion à 20°C, l'extraction des composés phénoliques des extraits pré-traités par CEP est augmentée d'un facteur 2 par rapport aux non-traités. Un profil phénolique similaire a été observé pour les extraits traités et témoins. Praporscic *et al.* (2007) et Anderson *et al.* (2009) ont étudié l'effet de l'application des CEP sur des raisins blancs (Chardonnay, Sauvignon blanc, Trebbiano Toscano, Muscadelle and Semillon). L'application des CEP a amélioré significativement la qualité et le rendement du jus de raisin (20 à 50%). L'application du CEP en tant que prétraitement en amont du pressage a été prouvée plus efficace que son application durant le pressage.

Récemment, l'application des CEP dans le but d'améliorer l'extraction des composés phénoliques des raisins durant l'étape de la macération-fermentation en rouge a été bien discutée (Puértolas 2010 a, b, c, d, e & f). Lopez (2008 a, b); Lopez (2009) ont étudié l'effet de l'application des CEP durant la vinification en rouge. Ils ont traité le marc (pellicule + pulpes + pépins) séparé du jus par un pressage faible des raisins foulés . La vue macroscopique des moûts traités par CEP et témoins a montré que le traitement par CEP améliore la couleur durant la phase de fermentation en rouge. La Figure I.36 montre que les CEP présentaient une coloration rouge framboise en comparaison avec les autres moûts.

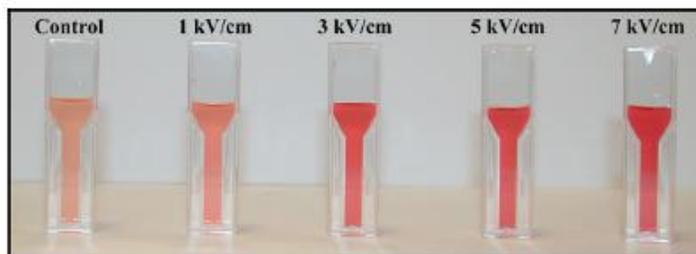


Figure I.36. Vue macroscopique du moût de Garnacha après 1 heure de macération avec des grappes témoins ou traités par CEP ($E = 1-7 \text{ kV/cm}$, $N = 50$ impulsions, $W = 0.4-4.1 \text{ kJ/kg}$) (Puértolas *et al.*, 2010 e)

L'étude microscopique (Figure I.37) montre aussi que les traitements par CEP entraînent la formation de pores au niveau des parois cellulaires, permettant ainsi la libération du contenu intracellulaire (Delsart *et al.*, 2011). L'observation des coupes semi-fines (Figure I.37) montre des couches cellulaires de la pellicule du moût traité par CEP ($E = 700 \text{ V/cm}$, temps = 200 ms, $W = 35 \text{ kJ/kg}$) qui sont très aplaties et écrasées (surtout dans les couches les plus profondes), des parois cellulaires qui ont un aspect effrité et des vacuoles qui sont plus ou moins modifiées en comparaison avec les couches cellulaires de la pellicule du témoin. Les parois cellulaires ne présentent pas la même couleur : elles sont devenues, après le traitement de CEP, bordeaux/fuchsia, qui est dû à l'extraction des anthocyanes et n'ont plus le même aspect, elles sont sous forme de globules de diamètres différents, plus ou moins agglutinées dans les vacuoles (Delsart *et al.*, 2011).

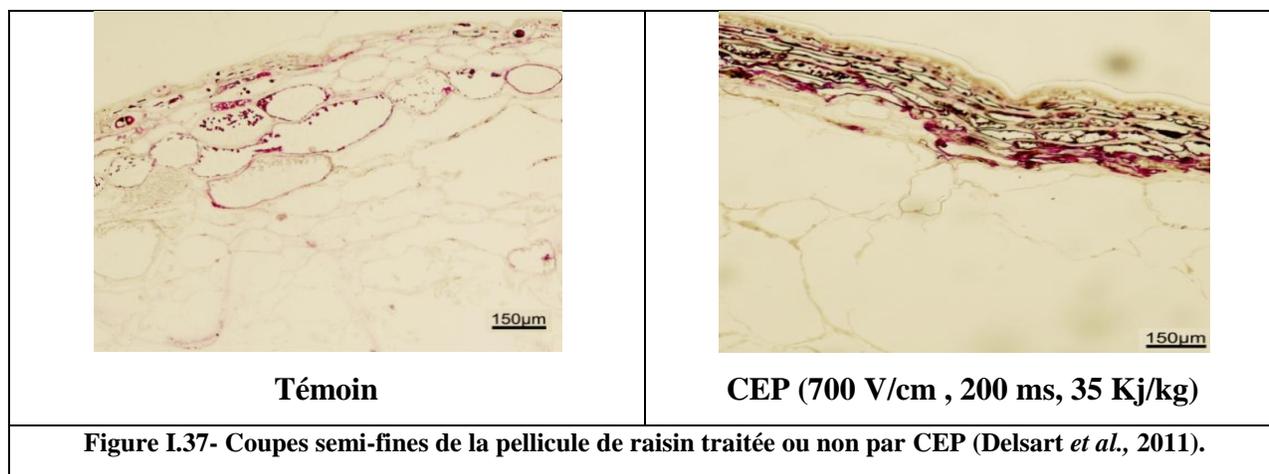


Figure I.37- Coupes semi-fines de la pellicule de raisin traitée ou non par CEP (Delsart *et al.*, 2011).

Le suivi des cinétiques (Figure I.38) de l'intensité colorante (A), de la concentration en anthocyanes (B) et de l'indice phénolique total (C) montre une évolution similaire des raisins

traités et non-traités par CEP durant la vinification en rouge. Mais, ces trois cinétiques sont plus amplifiées dans les échantillons de moût qui ont subi un traitement comparé à un témoin tout au long de la fermentation.

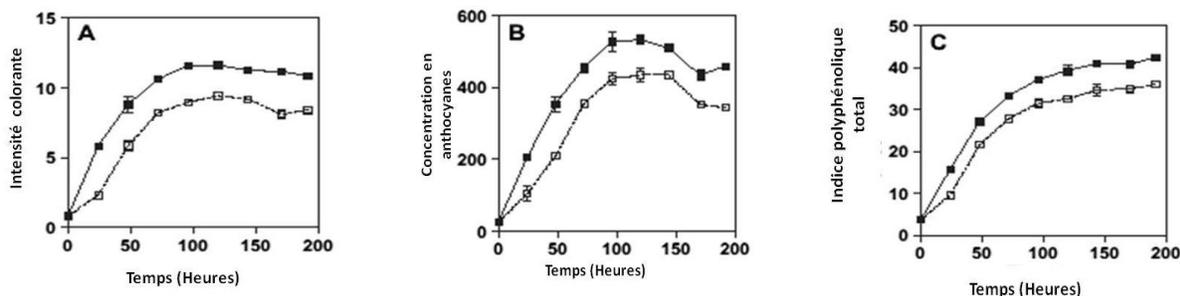


Fig I.38. Evolution de l'intensité colorante (A), Concentration en anthocyanes (B), et l'indice polyphénolique total (C) durant la fermentation des raisins de Cabernet sauvignon témoins (□) et traités par CEP (E= 5 kV/cm; N= 50 impulsions, W = 1.8 Kj/kg) (■) (Puértolas *et al.*, 2010 e)

L'effet des traitements des raisins par CEP en discontinu à différentes intensités (E= 2 à 10 kV/cm) et différentes consommations énergétiques (W=0.4-6.7 kJ/kg) est présenté dans le tableau I.7. Ces résultats montrent que l'efficacité du traitement par CEP augmente avec l'augmentation de son intensité, à l'exception de quelques variétés. Pour le cépage Cabernet Sauvignon, le meilleur traitement est à une intensité de 5 kV/cm. Par contre pour Graciano, le meilleur traitement est à 2 kV/cm. Les meilleurs traitements par CEP des raisins peuvent aboutir à une augmentation de l'intensité colorante du vin obtenue entre 19 et 61%, une amélioration de la concentration en anthocyanes entre 18 et 43% et une amélioration de l'indice phénolique total de 14 à 45%.

Grape variety	PEF treatment conditions	ΔCI (%)	ΔAC (%)	ΔTPI (%)	Reference
Cabernet Sauvignon	5 kV/cm; 50 exponential decay pulses; 1 Hz; 2.1 kJ/kg	48	43	45	1
Tempranillo	5 kV/cm; 50 exponential decay pulses; 1 Hz; 1.8 kJ/kg	13	15	18	2
	10 kV/cm; 50 exponential decay pulses; 1 Hz; 6.7 kJ/kg	23	26	24	2
Gamacha	2 kV/cm; 50 exponential decay pulses; 1 Hz; 0.4 kJ/kg	26	11	18	3
	5 kV/cm; 50 exponential decay pulses; 1 Hz; 1.8 kJ/kg	21	32	14	3
	10 kV/cm; 50 exponential decay pulses; 1 Hz; 6.7 kJ/kg	29	24	16	3
Graciano	2 kV/cm; 50 exponential decay pulses; 1 Hz; 0.4 kJ/kg	19	18	14	3
	5 kV/cm; 50 exponential decay pulses; 1 Hz; 1.8 kJ/kg	12	14	13	3
	10 kV/cm; 50 exponential decay pulses; 1 Hz; 6.7 kJ/kg	6	7	12	3
Mazuelo	2 kV/cm; 50 exponential decay pulses; 1 Hz; 0.4 kJ/kg	29	16	14	3
	5 kV/cm; 50 exponential decay pulses; 1 Hz; 1.8 kJ/kg	51	36	31	3
	10 kV/cm; 50 exponential decay pulses; 1 Hz; 6.7 kJ/kg	61	38	36	3

Tableau I.7 : Amélioration obtenue sur l'intensité colorante (ΔCI), le contenu en anthocyanes (ΔAC) et l'indice phénolique totale (ΔTPI) dans du vin traité par CEP à la fin de la fermentation alcoolique.

1 : Lopez (2009) ; 2 : Lopez (2008 a) ; 3 : Lopez (2008 b)

De plus, les CEP n'affectent pas la proportion entre les composants de la couleur rouge du vin (la teinte et les composés jaunes, rouges et bleus) et d'autres caractéristiques de vin comme la teneur en alcool, l'acidité totale ou le pH, mais peut réduire la concentration en sucre (López *et al.*, 2008).

D'autres études ont été réalisées par Donsi (2010 , 2011) dans le but d'étudier l'effet de l'application du CEP sur l'extraction de la couleur et des composés phénoliques durant la vinification en rouge. Donsi *et al.* (2010) ont étudié l'effet des CEP sur deux variétés de raisins Aglianico et Piediroso durant la fermentation en rouge. En amont de la fermentation en rouge, ces raisins ont été traités par CEP à différentes intensités ($E = 0.5$ à 1.5 kV/cm) et différentes consommations énergétiques (1 à 50 kJ/kg). Les résultats ont montré que le traitement par CEP des raisins de variété Aglianico a amélioré la libération des composés phénoliques (+20%), des anthocyanes (+75%), ce qui a amélioré l'intensité colorante (+20%) et l'activité antioxydante (+20%) tout en conservant les autres caractéristiques organoleptiques. Par contre, l'effet des CEP sur la variété Piediroso était mineure. Pour vérifier ces résultats, Donsi *et al.*, (2011) ont testé quatre variétés de raisins italiens : Aglianico, Piediroso, Nebbiolo et Casavecchia. En amont de la phase de la fermentation, les pellicules de raisins ont été traitées par des CEP à différentes intensités ($E= 1.5$ & 3 kV/cm) et différentes énergies ($W= 10$ & 20 kJ/kg). Les résultats montrent que le prétraitement par CEP est efficace quant à l'amélioration du contenu phénolique, de la couleur et de l'activité antioxydante des vins élaborés par des pellicules traités par CEP comparant à un témoin. Pour la variété Aglianico, une amélioration de l'IC (+20%), de la concentration en anthocyanes (+30%), de l'IPT (+100%) et de l'activité antioxydante (+40%) a été notée. Des résultats similaires ont été obtenus sur deux vendanges dans le but de vérifier la répétabilité de l'étude. Pour les 3 autres variétés de raisins, et selon les auteurs, les CEP n'ont pas abouti à une amélioration. Ceci étant dû à la taille de la vacuole, qui peut être petite pour les autres variétés et large pour Aglianico. D'où, la nécessité d'augmenter l'intensité du traitement dans le but de pouvoir perméabiliser la paroi membranaire de leur vacuole plus mince.

De plus, Delsart *et al.*, (2011, 2012) ont aussi testé l'effet de l'application des CEP durant la vinification en rouge. Delsart *et al.*, (2011) ont traité des raisins rouges de Cabernet Sauvignon par CEP à différentes intensités, durées de traitements et consommations énergétiques comme est indiqué dans le tableau I.8 .

<i>Paramètres</i>	<i>CEP1</i>	<i>CEP2</i>	<i>CEP3</i>	<i>CEP4</i>
Force du champs électrique E (V/cm)	4000	700	1000	700
Δt (ms)	1	200	20	20
Consommation énergétique W (kJ/kg)	4	35	10	3.5

Tableau I.8. Paramètres des CEP pour les différents traitements (Delsart *et al.*, 2011).

L'application des CEP a augmenté significativement l'extraction de la plupart des composés phénoliques par rapport à la vinification classique. Les résultats de l'étude ont montré que l'extraction des tanins était plus influencée par la durée du traitement que par l'intensité du CEP et inversement pour les anthocyanes. L'extraction optimale a été déterminée en appliquant un CEP de 700 V/cm pendant 200 ms. En effet, l'application du CEP (700 V/cm, 200 ms) a abouti à la meilleure couleur et teneur en composés phénoliques. De plus, le CEP (700 V/cm, 200 ms) était la modalité la plus extractive quant aux flavan-3-ols. D'où, CEP (700 V/cm, 200 ms) est la meilleure modalité malgré qu'elle représente la plus haute consommation énergétique.

Delsart *et al.*, (2012) ont étudié l'effet des CEP à différentes intensités ($E = 0.5-0.7$ kV/cm) et différentes durées ($t = 40-100$ ms) tout au long de la fermentation, tout en atteignant 7 mois après la fermentation. Les résultats de cette étude ont montré une différence non significative de l'application des CEP sur l'intensité colorante 7 mois après la fermentation mais ils ont expliqué cela par l'addition de SO_2 qui a abouti à la formation de complexes et par la suite à la précipitation des anthocyanes. Pour l'indice polyphénolique total, l'effet a été principalement noté au temps initial. Reste à étudier l'effet des CEP sur les caractéristiques organoleptiques par une évaluation sensorielle.

Pour simuler le processus continu dans une usine de vinification, des travaux par Puertolas et Lopez *et al.* (2010a) ont traité des raisins entiers par CEP dans une chambre de traitement en continu. Ces études appliquées à échelle pilote (118 kg/h) ont montré qu'avec le prétraitement par CEP, l'extraction des composés phénoliques est accélérée durant la vinification en rouge. Une amélioration de l'intensité colorante, de la concentration en anthocyanes et de l'indice phénolique total des moûts de raisins de Cabernet Sauvignon, Syrah et Merlot traités par CEP à échelle continue a été observée, résultat similaire qu'en discontinu. Il est à noter que l'effet du CEP dépend de la variété de raisins. Une autre étude effectuée par Puertolas *et al.*, (2010b) a discuté l'effet du traitement par CEP en continu des raisins Cabernet sauvignon sur l'évolution

des paramètres chromatiques. Les résultats ont montré une amélioration de 27%, 18% et 10% respectivement pour l'intensité colorante, anthocyanes et indice polyphénolique total du vin après 4 mois du vieillissement en bouteille. Après 12 mois en bouteilles, le contenu en anthocyanes monomériques était similaire entre le vin témoin et traité par CEP, mais le contenu en flavan-3-ols, flavonols et en acide hydroxycinnamiques était plus élevé pour le vin traité par CEP (Puertolas 2010c).

Des études ont investi d'autres intérêts de l'application des CEP durant la fermentation (Puertolas *et al.*, 2009; Lopez *et al.*, 2008a,b; Puertolas *et al.*, 2010). PEF a été appliqué dans le but d'assurer le contrôle microbiologique durant la vinification. Un traitement optimal (E= 29 kV/cm , W= 186 kJ/kg) a été établi. Ceci a abouti à une réduction de 99% de la flore bactérienne du moût et du vin, ce qui limite le risque d'altération par des microorganismes (*Brettanomyces* and *Lactobacillus*).

8. CONCLUSIONS ET POSITIONNEMENT DU SUJET

L'état des connaissances réalisé dans ce chapitre a permis de comprendre dans un premier temps le procédé de la vinification en rouge et l'importance d'améliorer l'extraction de la couleur et des composés phénoliques durant ce procédé.

Durant la fermentation en rouge, une fraction des composés phénoliques présents dans les raisins (environ 20 à 30%) est transférée dans le vin. Ceci étant dû à la paroi qui peut constituer un frein à la diffusion des composés phénoliques. Pour améliorer l'extraction de ces composés dans le vin élaboré fini, il faut maîtriser la chaîne entière de la vinification en rouge tout en allant de la vendange jusqu'à la mise en bouteille du vin.

Il s'agit en premier de récolter les raisins à la date de la vendange optimale, tout en respectant les suivis de maturités technologiques et phénoliques, en essayant de trouver un compromis entre les deux dates. Le but étant de récolter les raisins au moment où ils présentent le meilleur potentiel d'extractibilité phénolique. Pour assurer cet objectif, il faut appliquer les deux méthodes Glories et ITV, permettant de suivre la maturité phénolique.

Par la suite, il s'agit d'intensifier l'extractibilité phénolique durant la vinification en rouge. Pour acquérir cet objectif, des macérations préfermentaires à froid ou à chaud des raisins peuvent aboutir à améliorer l'extraction des composés phénoliques. De plus, d'autres procédés ont été

proposés dans le but d'intensifier l'extraction des composés phénoliques durant la vinification en rouge comme la thermovinification, la flash détente, la thermo-détente et l'extraction assistée par ultrasons. L'objectif est toujours d'endommager les membranes cellulaires pour libérer les composés phénoliques.

Ces procédés peuvent aboutir parfois à la dégradation des composés phénoliques et sont coûteux énergétiquement. D'où le recours à des nouvelles technologies comme les Champs électriques pulsés (CEP). Les CEP offrent la possibilité de réaliser un traitement athermique, court et en réduisant l'ajout de produits chimiques. Ces nouveaux procédés permettent d'extraire des composés d'intérêt par endommagement des membranes et/ou parois cellulaires.

Pour boucler le procédé, il s'agit aussi de valoriser les sous-produits de la fermentation en rouge. Le procédé classique d'extraction est relativement long (environ 3 h en mode continu et 20 h pour un mode discontinu). Une température élevée (50°C voire plus) est également nécessaire et résulte en un coût énergétique conséquent. D'autre part, l'addition de solvants organiques ou de sulfites représentent à la fois une contrainte pour l'environnement mais limitent également les applications du produit final. Par conséquent, il apparaît nécessaire d'améliorer le procédé d'extraction par un procédé d'intensification. Le traitement par CEP du marc du raisin à faible intensité n'a pas donné un effet décelable. D'où la nécessité de trouver un nouveau procédé où une combinaison de plusieurs procédés permettant d'améliorer l'extraction des composés phénoliques.

Dans ce contexte, les enjeux visés par ce travail sont de développer et optimiser une nouvelle technologie d'intensification de la diffusion durant la fermentation en rouge permettant d'atteindre des rendements élevés en composés phénoliques en réduisant l'ajout de solvants organiques et en diminuant la température de diffusion et la durée de diffusion.

Afin de répondre à cette problématique, nous nous sommes fixés quatre objectifs scientifiques :

(1) Récolter les raisins à une date de vendange optimale dans le but d'extraire le maximum de pool phénolique présent dans les raisins. Le choix de cette date de récolte se basera sur les suivis de maturités phénoliques et technologiques. Un compromis entre les dates des récoltes choisies selon ces deux méthodes permettra d'optimiser la date de vendange, et par la suite d'avoir le maximum de composés phénoliques extractibles.

(2) Améliorer l'extraction de composés phénoliques et de la couleur durant la macération pré-fermentaire à froid et réduire la durée de cette macération en appliquant des champs électriques pulsés en amont de la phase de la macération.

(3) Améliorer l'extraction de composés phénoliques et de la couleur durant la vinification en rouge et réduire la durée de la fermentation alcoolique en appliquant divers prétraitements en amont de la phase de la macération. Il s'agit de comparer les performances d'extraction de plusieurs prétraitements (champs électriques pulsés, ultrasons et chauffage modéré, thermovinification et ajout d'enzymes pectolytiques) sur l'amélioration de l'extraction des composés phénoliques et de la couleur durant la vinification en rouge.

(4) Valoriser les sous-produits de la vinification (marcs du raisin) en appliquant une nouvelle technologie, les chauffages ohmiques pulsés dans le but d'extraire le maximum de composés phénoliques restant dans les marcs de raisins.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

Les prétraitements décrits dans le chapitre 1 ont fait l'objet de plusieurs études dans le cadre de cette thèse afin d'extraire les polyphénols durant la vinification en rouge. Ce chapitre 2 s'attachera à décrire la méthodologie expérimentale adoptée au cours de ce travail, en présentant les matières premières étudiées, les dispositifs expérimentaux, les différents procédés appliqués ainsi que les analyses physico-chimiques.

2.1 Matières premières:

a. Les raisins : cépages.

Différentes variétés de grappes de raisin provenant de différentes parcelles localisées dans la vallée de la Békaa, appartenant à différents terroirs et différents cépages ont fait l'objectif de la présente étude. Les raisins (*Vitis Vinifera*) de quatre millésimes (2008, 2009, 2010 et 2011), fournis par la société Château KSARA SARL, sont des variétés de raisins rouges appartenant principalement à cinq cépages : Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Syrah, Petit Verdot. Chacun de ces cépages a un comportement propre qui le distingue des autres. Les caractéristiques de ces différents cépages sont présentées dans le tableau II.1.

<p>Le Merlot</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Cépage riche en anthocyanes. - Durée optimale de récolte courte. - Dégradation rapide (quelques jours) après maturité. - Atteinte de la maturité une semaine à une semaine et demie avant le Cabernet Sauvignon. - Vendange de ce cépage avec une légère surmaturation. - Elaboration de vins ronds, puissants, riches en alcool et en couleur, relativement peu acides, avec des arômes complexes et élégants.
<p>Le Cabernet Sauvignon</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Cépage issu d'un croisement probablement naturel entre le Cabernet franc et le Sauvignon blanc. - Potentiel phénolique le plus important, caractérisé par sa richesse équilibrée en anthocyanes et tanins. - Cépage très tardif qui arrive plus difficilement à une maturité phénolique suffisante (soit une à deux semaines après le merlot et le cabernet franc). - Cépage à petit degré potentiel doit être récolté à forte surmaturation. - Elaboration de vins de Cabernet Sauvignon possédant une structure tannique très intéressante et une couleur soutenue à bonne maturité, avec des arômes végétaux.

<p>Le Cabernet Franc</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Cépage possédant souvent le potentiel le plus limité, caractérisé par beaucoup de tanins et peu d'anthocyanes. - Cépage relativement tardif, plus tardif que le Merlot et plus précoce que le Cabernet Sauvignon. - Elaboration d'un vin possédant une couleur bien plus légère que le Cabernet Sauvignon .Il est moins sucré, plus acide et moins coloré que le Merlot et ses tanins sont un peu plus rustiques que ceux du Cabernet Sauvignon.
<p>La Syrah</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Cépage relativement tardif. - Maturité rapide, donc sa période de récolte optimale est brève. - Besoin de chaleur pour parvenir à maturité, mais peut très vite perdre son caractère si elle n'est pas vendangée immédiatement. - Elaboration de vins très aromatiques et robustes, avec une couleur très sombre, une texture riche et soyeuse, et un haut degré d'alcool.
<p>Le Petit Verdot</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Cépage rouge tardif, qui n'atteint que très difficilement sa pleine maturité. - C'est le dernier à être vendangé. - Vins tanniques parfumés, aux tanins soyeux, corsés avec une robe très colorée. - Sous forme de grappes très petites avec une peau épaisse et très foncée.

Tableau II.1. Caractéristiques des cépages rouges (Boidron *et al.*, 1995).

b. Le marquage des parcelles :

Un quadrillage est effectué sur les parcelles pour répartir les prélèvements sur l'ensemble des pieds et des rangs. Les 39 parcelles localisées dans la vallée de la Békaa, de différents terroirs de Château KSARA seront sujettes aux trois marquages suivants :

Tout d'abord, un marquage de quatre demi rangs complets par parcelle avec du Lycra sur les cornières du bout du rang. Ces rangs seront symétriquement choisis en respectant la grandeur de la parcelle. Il faut éviter les petits rangs et les rangs de bordure.

Puis, un marquage de trois pieds de vigne par demi-rang, avec une identification des pieds à l'aide d'une étiquette numérotée par pied, douze pieds par parcelle. Les 3 pieds

seront symétriquement choisis sur la longueur du rang de manière à respecter le haut, le milieu et le bas du rang en évitant les pieds du bout. Il faut éviter de choisir des pieds ayant un nombre de grappe inférieur à la moyenne, (NMGP normal : Nombre Moyen de Grappes par Pied normal) et les pieds jeunes ou les pieds ayant un développement végétatif inférieur à la moyenne. (SFCV normal : Surface Foliaire du Couvert Végétal normale). Finalement, un marquage de six grappes par pied de vigne (Avec du ruban papier rouge chaque pédoncule de grappe). Il faut choisir des grappes de calibre supérieur à la moyenne, entre 75 et 100 grammes de poids au stade fermeture de la grappe, des grappes des rameaux principaux correspondants aux yeux fructifères laissés à la taille. Ces grappes doivent être réparties sur les deux bras ou bien les deux cordons du pied de vigne.

c. Échantillonnage des grappes de raisins

Selon le calendrier de prélèvement préétabli, l'échantillonnage se déroule comme suit. Une fiche de prélèvement est remplie, en identifiant chaque parcelle selon le codex prédéterminé par cépage, domaine et parcelle. Par la suite, il y a l'étape d'étiquetage des sacs, en marquant le codex, le nom de la parcelle et la date de l'échantillonnage sur les sacs en plastique. La troisième étape consiste à un repérage des 4 demi-rangs marqués par parcelle et les douze pieds marqués par parcelle. Puis, à l'aide d'un outil de coupe (une épinette) préalablement nettoyé à l'alcool, un prélèvement (Figure II.1.a) d'une grappe marquée par pied de vigne étiquetée et 3 grappes par demi-rang et donc 12 grappes par parcelle est effectué. Enfin, les sacs (Figure II.3.b) sont bien fermés puis placés dans des box frigorifiques jusqu'à l'expédition.

	
<p>Figure II.1.a. Prélèvement des grappes</p>	<p>Figure II.1.b. Grappes dans le sac en plastique.</p>

Ces échantillons maintenus à froid, afin d'éviter leurs détériorations en cours de transport, sont acheminés au laboratoire dans un délai bref après le ramassage pour une bonne fiabilité des résultats.

d. Echantillonnage des baies de raisins

Les échantillons de grappes de raisins provenant de différentes parcelles localisées dans la vallée de la Békaa, appartenant à différents terroirs et différents cépages ont été fournis par la société Château KSARA SARL pour analyse au laboratoire.

Une fois l'échantillon des grappes de raisins est reçu à la Faculté des sciences, il faut respecter la démarche suivante. Il faut prélever les différentes grappes de raisin contenues dans le sac en plastique, et les examiner. Si la vendange est mouillée, il faut la sécher au sèche-cheveux ou avec du papier absorbant. Par la suite, il faut compter exactement 200 baies. Ces baies doivent être représentatives de toutes les grappes de raisins présentes dans le sac, de façon à prélever de chaque grappe de raisins, des baies représentatives de la grappe en position haute/basse, face interne/externe. De cette façon, l'hétérogénéité entre les cépages, entre les grappes et entre les baies d'une même grappe est prise en considération. Enfin, il faut placer ces 200 baies dans un sac en plastique et les peser à l'aide d'une balance de précision. Ces sacs doivent être stockés au frigo - 20⁰C jusqu'au moment de la manipulation.

2.2. Suivi de l'évolution de la maturité phénolique :

Le protocole au laboratoire consiste à broyer les 200 baies afin de déterminer le potentiel polyphénolique, puis l'indice polyphénolique total et les anthocyanes totaux par spectrophotométrie en utilisant soit la méthode ITV (Institut Technique de la Vigne – France) soit la méthode Glories (Figure II.2).

Décongeler les 200 baies de raisins qui ont été stockés à - 20 degrés Celsius, en les plaçant 30 minutes à température ambiante. Broyer les 200 baies de l'échantillon 2 minutes dans un broyeur à jus de fruit. Puis, prélever 50 g de broyat homogène dans un erlenmeyer de 250 ml afin d'appliquer la méthode ITV, et prélever aussi 100 g de broyat homogène dans deux erlenmeyers de 250 ml contenant chacun 50g de ce broyat afin d'appliquer la méthode Glories.

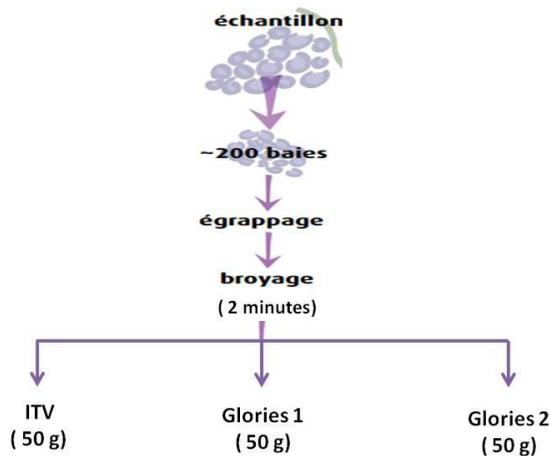


Figure II.2. Méthodologie utilisée pour le suivi de la maturité phénolique

A) Estimation du Potentiel polyphénolique de la vendange par la méthode ITV (Institut Technique de la Vigne – France) (Institut Français de la Vigne et du Vin de Midi-Pyrénées, 2005-2009).

La méthode de référence ITV a été utilisée pour suivre l'évolution des anthocyanes libres et des composés phénoliques totaux du raisin au cours de la maturation (Lamandon, 1995). Les protocoles de mise en œuvre et de mesures ont été adaptés afin d'optimiser le rendement. La méthode ITV est basée sur une micro-extraction des composés phénoliques en milieu hydro-alcoolique acide, à température ambiante. Le protocole consiste à broyer les 200 baies de raisins. Puis, prélever 50 g de broyat homogène dans un erlenmeyer de 250 ml, sur lesquelles il faudrait rajouter 15 ml d'éthanol (à 95%) et 85 ml de solution d'HCl (à 37 % diluée à 0.1 % dans de l'eau distillée) puis il faut homogénéiser par la suite. Après macération à température ambiante pendant une heure avec une agitation manuelle d'une minute tous les quarts d'heure, le broyat est filtré sur de la laine de verre. Par la suite, ce filtrat sera soumis à deux dilutions.

- Premièrement, une dilution de l'échantillon au 1/100ème avec de l'eau déminéralisée qui sert à déterminer l'absorbance DO à 280 nm contre un blanc d'eau distillée sous 1 cm de trajet optique. Les composés phénoliques totaux seront estimés par cette mesure d'absorbance à 280 nm en utilisant la formule suivante :

$$\text{Indice polyphénolique total} = \text{DO280} \times 100 \times \left[\frac{(\text{poids du broyat} + 100)}{\text{poids du broyat}} \right]$$

100= volume de la solution rajoutée au broyat.

- Deuxièmement, il faut diluer l'échantillon au 1/20ème avec une solution d'HCl à 1% puis déterminer l'absorbance à DO 520 nm contre un blanc d'eau distillée sous 1 cm de trajet optique. La concentration en anthocyanes et le potentiel anthocyanique total seront estimés par cette mesure d'absorbance à 520 nm de la solution d'extraction en utilisant les formules suivantes :

$$\text{Anthocyanes (mg/L)} = \text{DO520} \times 22.75 \times 20$$

$$\text{Potentiel anthocyanique total (mg/kg)} = \text{Anthocyanes (mg/L)} \times \left[\frac{(\text{poids du broyat} + 100)}{\text{poids du broyat}} \right]$$

B) Estimation de la maturité phénolique par la méthode Glories : (Saucier *et al*, 1990 ; Cayla *et al*, 1998 ; Amrani *et al*, 2006 ; Vivas *et al*, 1998).

Cette méthode consiste à prélever 2 fois x grammes (calculés par $x = (50 \times d)/1000$) de broyat homogène en mélangeant bien pour obtenir deux échantillons parfaitement homogènes dans 2 erlenmeyers de 250 ml à col large).

- Au 1^{er} échantillon, il faut ajouter 50 ml de solution aqueuse pH 3,2.

Pour préparer la solution aqueuse pH 3,2, il faut mélanger 5 g d'acide tartrique à 800 mL d'eau distillée. Par la suite, il faut ajuster le pH à 3,2 en ajoutant 22,2 ml de NaOH 1N, puis compléter jusqu'à 1 L d'eau distillée.

- Au 2^{ème} échantillon, il faut ajouter 50 ml de solution aqueuse pH 1.

Pour préparer la solution aqueuse pH 1, il faut mélanger 8,33ml d'HCL 37% dans 1L d'eau distillée.

Après l'ajout des deux solutions sur les deux broyats (50 g), il faut homogénéiser, boucher avec du Parafilm, puis macérer 4 h à Température ambiante. Après cette longue macération, il faut filtrer sur de la laine de verre (Coton de verre) dans un entonnoir en verre. Par la suite, un prélèvement de 3 ml de solution a été réalisé pour l'analyse des anthocyanes. Il s'agit en premier lieu de doser les anthocyanes et en second lieu d'estimer la richesse polyphénolique totale.

- ✓ Le dosage des anthocyanes est basé sur la décoloration des anthocyanes par un excès de SO_2 (Ribéreau-Gayon et Stonestreet, 1965). Pour doser les anthocyanes (Filtrats pH1 et pH3, 2), il faut suivre le mode opératoire suivant :

Dans un Erlenmeyer de 50 ml, il faut introduire 1 ml de chaque filtrat (pH1 ou pH3.2), 1 ml d'éthanol à 0,1 % HCl et 20 ml d'HCl concentrée à 2 %. A partir de cette solution, il faut verser dans un premier tube à essai 10 ml de la solution et 4 ml d'eau distillée ; et dans un deuxième tube, 10 ml de la solution et 4 ml de bisulfite de sodium à 15%. La décoloration est pratiquement instantanée. Cependant, il faut attendre 20 minutes, puis mesurer les densités optiques à 520 nm par rapport à l'eau distillée sous 1 cm de parcours optique. La concentration est donnée en milligramme (mg) d'anthocyanes par millilitre (ml) en reportant la différence des densités optiques à partir de la formule suivante: $C \text{ (mg/l)} = 875 \times \Delta DO$

Avec $\Delta DO = DO \text{ premier tube} - DO \text{ second tube}$

Donc, $A = (DO \text{ tem} - DO \text{ essai}) \times 875$

875 : pente de la droite d'étalonnage obtenu à partir de malvidine-3-glucoside.

Suite à ce calcul, deux valeurs seront calculées A1 et A2. A partir de ces valeurs, plusieurs résultats seront fournis :

- Le potentiel en anthocyanes facilement extractibles $A_{pH3,2}$, avec $A_{pH3,2} = 2 \times A_2$ (mg/l) .
 - Le potentiel total en anthocyanes A_{pH1} , avec $A_{pH1} = 2 \times A_1$ mg/l
 - **N.B** : les valeurs sont multipliées par 2 pour tenir en compte de la dilution des 50ml ajoutés.
- ✓ Pour estimer la richesse polyphénolique, l'analyse est réalisée sur des extraits de macération à pH 3.2. Le jus de cette macération sera dilué au $1/100^{\text{ème}}$ et la densité optique sera mesurée à 280 nm sous 1 cm de parcours optique par rapport à l'eau distillée. La mesure de la densité optique à 280 nm constitue alors une estimation globale des composés phénoliques des raisins.
 - La Richesse Polyphénolique Totale, $RPT = 2 \text{ DO}_{280} \times 100$
 - Le pourcentage d'Anthocyanes Extractibles, $PAE\% = [A_{pH3,2} / A_{pH1}] \times 100$.

- L'extractibilité cellulaire ou indice de maturité cellulaire, $EA = [(ApH1 - ApH3,2) / ApH1] \times 100$
- Les tanins des pépins, $dTpépins = RPT - d\text{ pellicules} = RPT - [A\text{ pH } 3,2 \cdot 40/1000]$
- La maturité phénolique des pépins, $Mp = [(RPT - dpellicules) / RPT] \times 100 = (dTpépins / RPT) \times 100$

2.3. Intensification de l'extraction durant la vinification en rouge.

L'extraction des polyphénols durant la vinification est réalisée en deux étapes principales (Figure II.3):

- (1) un prétraitement mécanique ou électrique de la matière première ayant pour objectif d'endommager les membranes ou parois cellulaires afin de faciliter l'extraction.
- (2) Une macération consistant soit par une étape pré-fermentaire soit par une fermentation alcoolique.

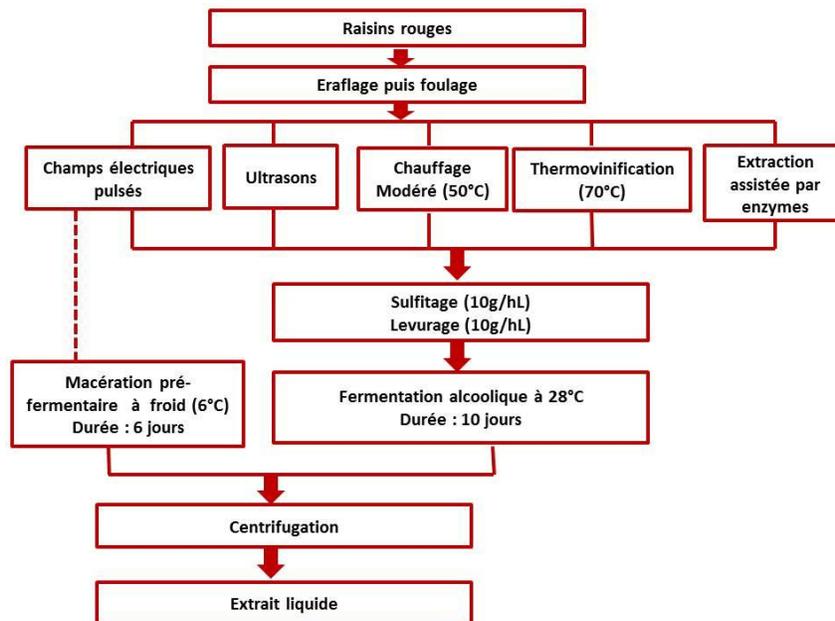


Figure II.3. Schéma général des procédés d'extraction des polyphénols étudiés

2.3.1. Macérations pré-fermentaires à froid (MPF):

Les raisins qui ont subi la macération à froid appartenaient à deux variétés Cabernet Sauvignon et Cabernet Franc. Ces raisins ont été récoltés manuellement à maturité

optimale durant l'année 2010 à partir des vignes de la province de la Bekaa (Liban). Les raisins ont été pesés ($m = 750$ g), égrappés manuellement, soumis à un traitement par champ électrique pulsé (CEP) puis placés dans des flacons 1000 mL pour déclencher la macération pré-fermentaire à froid pendant 6 jours dans une chambre froide (ZANOTTI FRANCE) à 6°C avec une capacité de réfrigération de 2,7 kW pour 10 m³. Des échantillons de moût ont été prélevés tous les jours de la MPF. Ces échantillons ont été centrifugés à 4000 rpm pour 10 min en utilisant la centrifugeuse HERMLE Universal Z 200A (Wehingen, Germany). Le surnageant a été utilisé par la suite pour les différentes analyses physico-chimiques (pH, °Brix, polyphénols et contenu en anthocyanes).

2.3.2. Vinification en rouge:

Le déroulement des essais de vinification à partir de cépage de Cabernet Sauvignon et Cabernet Franc sont présentés ci-après :

- 1- **Egrappage** des baies de raisins manuellement.
- 2- Ensuite viendra le **foulage**, qui a pour but d'éclater le fruit de la baie afin de libérer le jus.
- 3- Après le foulage, les raisins foulés seront subis aux différents **prétraitements** (Champ électrique pulsé, ultrasons, chauffage modéré, thermovinification, addition d'enzymes et macération pré-fermentaire à froid).
- 4- Après les prétraitements, des flacons de différentes capacités (500- 5000 ml) ont été remplis.
- 5- Après remplissage des flacons, un tube en verre bouché avec du coton cardé a été inséré au niveau du bouchon dans le but de vérifier le dégagement du CO₂ tout au long de la fermentation alcoolique qui aura lieu.
Après le remplissage, nous avons **sulfité** les moûts traités : le sulfitage dépend de l'état sanitaire des raisins. Les quantités employées pour une vinification rouge classique se situent dans la fourchette de 3 à 6g/hL.
- 6- Après le sulfitage, nous avons inoculé tous les flacons avec des **levures** pour déclencher la fermentation alcoolique. Les doses à apporter se situent dans la fourchette de 5 à 20 g de levures sèches par hectolitre, avec une moyenne de l'ordre de 10g. Les quantités sont calculées pour assurer un ensemencement de l'ordre de 2 à 5 millions de cellules viables actives par millilitre de moût.

Différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* ont été utilisées sur une période de 6 jours de fermentation alcoolique. La préparation du **levain** consiste à chauffer 100 ml d'eau distillée (65-70°C) avec 100 ml jus de raisin (le mélange aura une température de 40°C). Par la suite, nous avons ajouté les levures (*Saccharomyces cerevisiae*) progressivement sur ce mélange et nous avons agité pendant 20 minutes. Sur ce mélange de 200 ml, nous avons ajouté 200 ml de jus de raisin puis nous avons agité pendant 10 min.

Par la suite, nous avons inoculé les flacons avec cette préparation de levain puis nous avons remué. En effet, il faut remuer tous les jours de la fermentation alcoolique pour assurer le bon déroulement de la fermentation alcoolique.

- 7- Par la suite, nous avons déclenché la fermentation alcoolique en incubant tous les flacons dans une étuve à 25 °C pour lancer la fermentation alcoolique à 30°C. En vinification classique en rouge, on recherche habituellement des températures voisines de 24 à 27 °C. Les excès thermiques provoquent des arrêts fermentaires. Il faut vérifier que l'intérieur des flacons est à une température de 30°C.
- 8- A la fin de la fermentation alcoolique, nous avons récupéré le vin de goutte et nous avons pressé le marc restant pour récupérer le vin de presse. Le pressurage suit immédiatement l'égouttage.
- 9- Tout au long de la FA nous avons effectué différents prélèvements (un prélèvement pour le mélange et deux prélèvements séparés respectivement du vin de goutte et du vin de presse). Ces échantillons ont été centrifugés à 4000 rpm pour 10 min en utilisant la centrifugeuse HERMLE Universal Z 200A (Wehingen, Germany). Les surnageants ont été utilisés par la suite pour les différentes analyses physico-chimiques (pH, °Brix, polyphénols et contenu en anthocyanes).

2.3.3. Procédés d'intensification de l'extraction

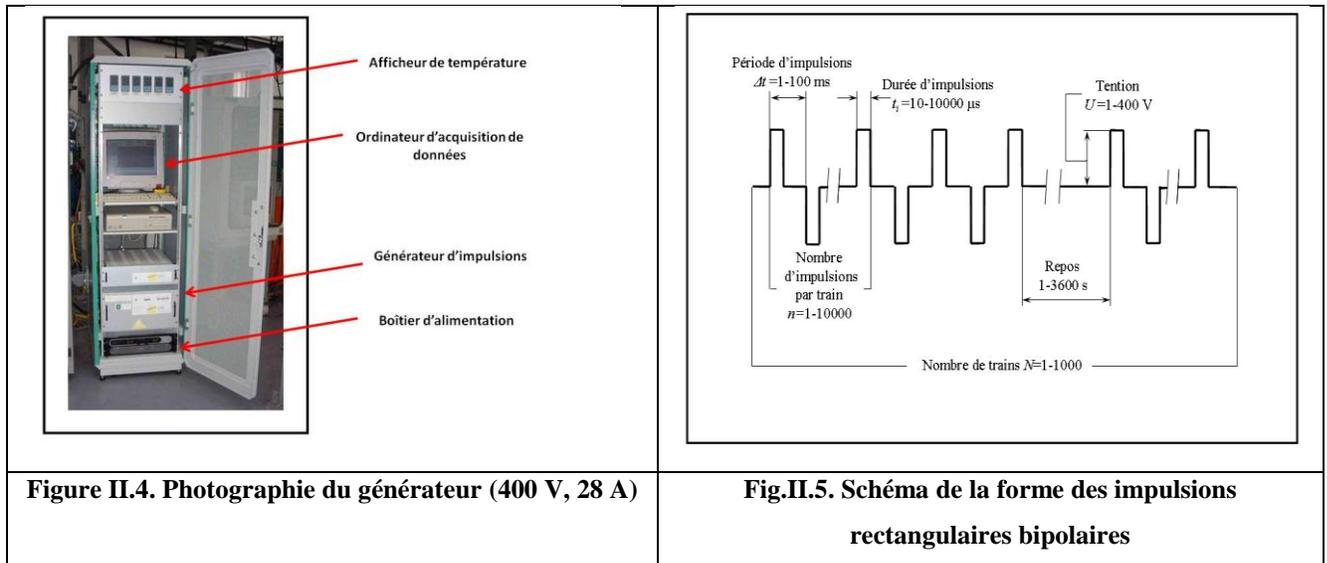
Durant la vinification en rouge, une fraction des polyphénols est extraite. Afin d'augmenter les rendements d'extraction et de réduire la durée de la macération à froid ou de la fermentation, quatre techniques de prétraitement de la matière sont proposées : les champs électriques pulsés, les ultrasons, le chauffage modéré, la thermovinification et l'extraction assistée par enzymes.

2.3.3.1- Traitement par champs électriques pulsés (CEP)

Durant notre étude, nous nous sommes servis de trois générateurs d'impulsion pour des raisons de puissance électrique et de paramètres de traitement. Un générateur pour les traitements de faible intensité (400 V, 38 A) et deux pour les traitements de forte intensité (5000 V, 1000 A) et (40 kV, 10kA). Les principales différences entre ces générateurs sont la tension et l'intensité du courant maximal. La forme des impulsions est soit carrée ou rectangulaire (pour la majorité des générateurs) soit exponentielle.

a) Traitement de d'intensité moyenne (400 V, 38 A) :

Afin d'éviter au maximum les phénomènes d'électrolyse des électrodes et de polarisation de cellules végétales lors du traitement, un générateur qui fournit des impulsions bipolaires a été développé et conçu par le Service Electronique de l'UTC, France (Figure II.4).



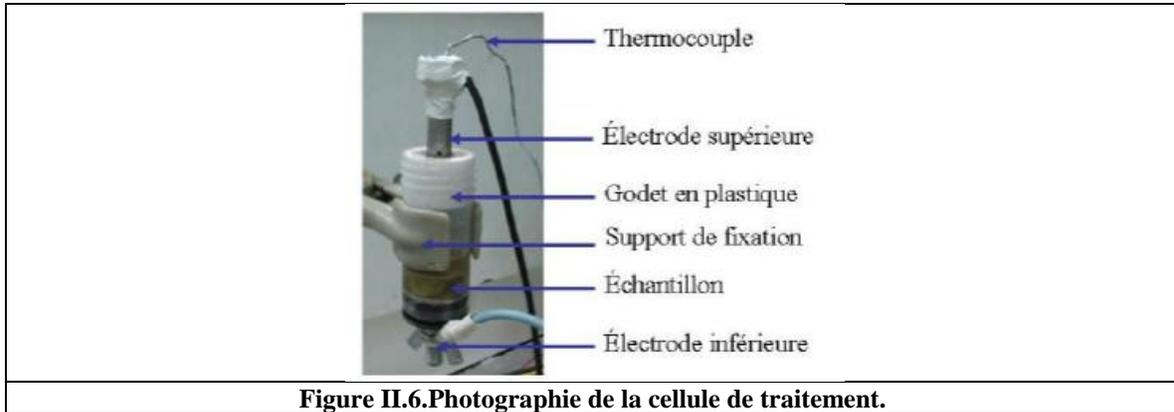
Le générateur électrique fournit des impulsions rectangulaires bipolaires (Figure II.5) avec une tension maximale de 400 V et un courant maximal de 38 A. Comme montré dans la figure, le générateur est couplé à un module de mesure de la température. Un ordinateur et un système de protection qui arrête le traitement électrique si le courant maximal est dépassé. La programmation des signaux électriques et la génération des impulsions de tension se fait à partir d'un logiciel développé par HPVEE 4.0 Agilent, (Hewlett-Packard, Palo Alto, Californie, Etats-Unis). La température dans les

échantillons traités électriquement est continuellement mesurée au cours du traitement grâce à des thermocouples de type K enveloppés de téflon pour éviter les interférences avec le champ électrique.

Les principales caractéristiques de ce générateur d'impulsions sont présentées ci-dessous:

- ✓ Tension : 0-400 V
- ✓ Intensité du courant : 0-38 A
- ✓ Nombre d'impulsions par train : 1-10000
- ✓ Durée de chaque impulsion : 10-10000 μ s (précision $\pm 2 \mu$ s)
- ✓ Période : 1-100 ms (précision $\pm 0.1 \mu$ s)
- ✓ Nombre de trains : 1-1000
- ✓ Temps de repos entre chaque train : 1-3600 s
- ✓ Résistance inter-électrode : 0 -9990 Ω
- ✓ Fréquence de mesure de la résistance : 50 Hz

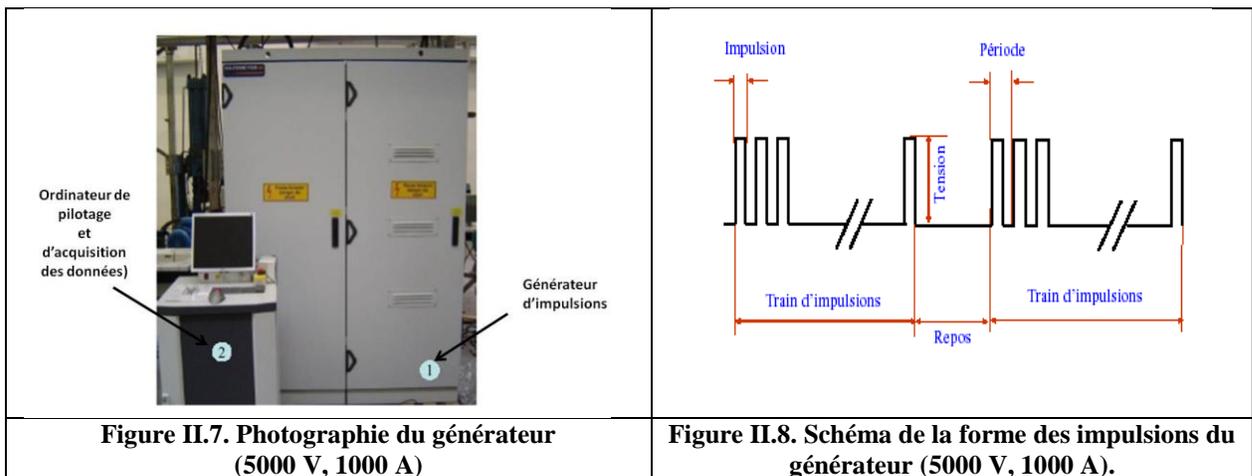
La cellule de traitement que nous avons utilisée pour se servir de ce générateur est présentée dans la figure II.6. Elle est constituée d'un godet en plastique de 30 mm de diamètre et de 75 mm de hauteur. Une grille en inox est fixée au fond de ce godet, servant d'électrode. Un piston en inox qui coulisse dans le godet est utilisé comme deuxième électrode. Ce dernier possède un orifice cylindrique permettant d'introduire un thermocouple pour le suivi de l'évolution de température au cœur de l'échantillon et au cours du traitement électrique. Les deux électrodes sont connectées à un générateur d'impulsions. L'échantillon de marc de raisin ($m = 5$ g dans notre étude) est placé entre les deux électrodes de sorte à créer un bon contact entre le produit et ces dernières. Les mesures de la résistance électrique ont été prises automatiquement avec un pas d'une seconde.



b) Traitement de fort intensité:

1-Générateur (5000 V, 1000 A)

Ce générateur a été conçu dans le but d'étudier la faisabilité du traitement par champs électriques pulsés couplés à des équipements pilotes ou semi-industriels (presse à bandes et presse à vis). Il a été fabriqué par la société Hazemeyer, France avec la participation de la région Picardie, France. Le Service Electronique de l'UTC s'est chargé du développement d'une interface de commande et d'enregistrement pour ce générateur (Figure II.7).



Le système est relié à une balance et deux thermocouples. Il permet d'enregistrer la masse et la température grâce à un logiciel d'acquisition des données. Pour le paramétrage des mesures et l'enregistrement, un logiciel d'utilisation a été développé sous Agilent VEE-Pro version 8.5. Ce logiciel permet de faire des mesures optionnelles

(masse des échantillons, température et consommation électrique du générateur). Le système peut générer un nombre d'impulsions fini (entre 1 et 65000) ou bien infini (génération continue). Dans les deux cas, la génération des impulsions peut être interrompue à tout moment en actionnant le bouton arrêt.

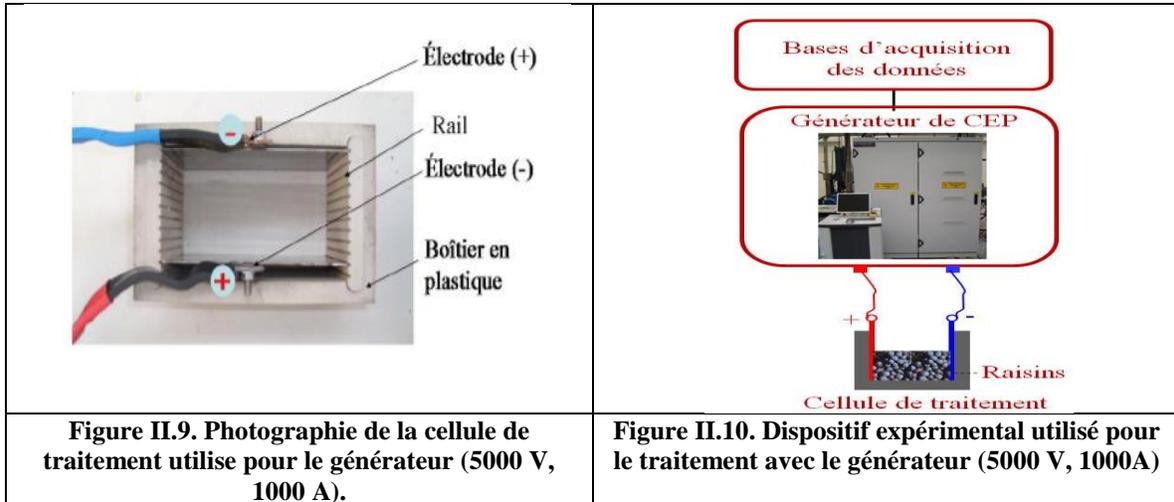
Pendant le traitement électrique, les valeurs suivantes sont affichées numériquement sur l'écran de l'ordinateur : nombre d'impulsions, tension, intensité et consommation électrique du générateur. Les courbes de tension et d'intensité sont affichées graphiquement grâce à la fonction oscilloscope virtuel. Un fichier d'enregistrement de type « texte » sauvegarde l'ensemble des données.

La figure II.8 représente un schéma des impulsions envoyées par le générateur IV.

Les principales caractéristiques de ce générateur d'impulsions sont présentées ci-dessous:

- ✓ Tension : 0-5000 V
- ✓ Intensité du courant : 0-1000 A
- ✓ Nombre d'impulsions: 0 (en continu) et 1-65000 (Discontinu)
- ✓ Durée de chaque impulsion : 20-100 μ s (précision $\pm 2 \mu$ s)
- ✓ Période : 5-100 ms (précision $\pm 0.1 \mu$ s)
- ✓ Nombre de trains : 1-10000
- ✓ Temps de repos entre chaque train : 1-3600 s

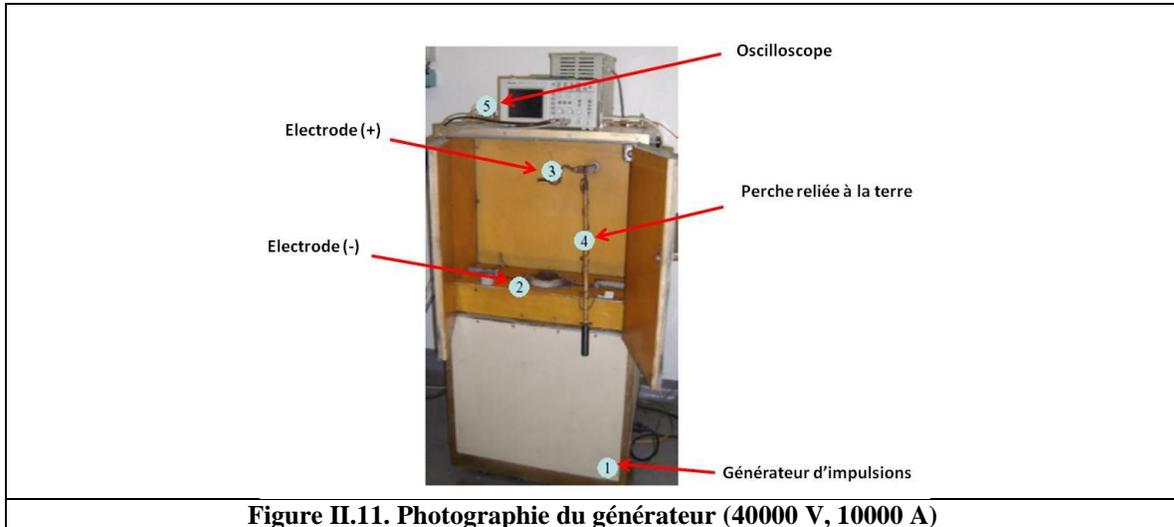
La cellule de traitement que nous avons utilisée pour se servir de ce générateur est présentée dans la figure II.9. Cette cellule est constituée de deux électrodes (verticales) en inox (120 mm x 205 mm) et d'un boîtier en plastique (téflon). Ce système présente l'avantage de pouvoir contrôler la distance entre les deux électrodes avec la présence de rails des deux côtés des électrodes. Les deux plaques en inox sont reliées au générateur d'impulsions. Comme pour les autres dispositifs, avant chaque traitement le système est mis dans un boîtier isolant et après traitement une perche est utilisée pour décharger le système.



Dans la présente étude, les raisins ont été traités par CEP en utilisant un générateur d'impulsions (5 kV/cm- 1kA) (Société Hazemeyer, Saint-Quentin, France). Les raisins rouges foulés ($m = 750$ g) ont été placés dans la chambre de traitement entre les deux électrodes. Les paramètres suivants ont été utilisés dans les expériences de CEP: $E = 400 - 800$ V / cm, $n = 100$, $t_i = 100 \pm 1$ s, $\Delta t = 5$ ms. Le dispositif expérimental utilisé pour ce traitement est présenté dans la figure II.10.

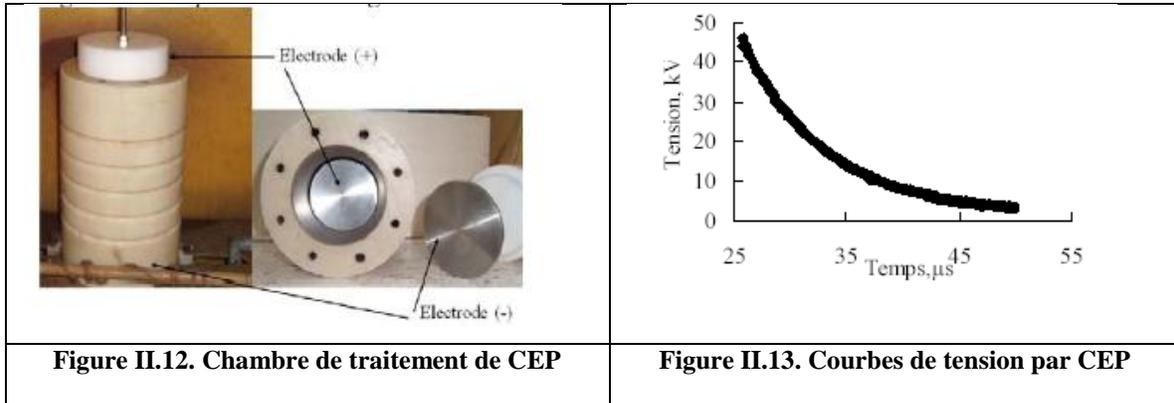
2-Générateur (40000 V, 10000 A)

Un générateur de haute tension conçu et développé par l'Université Polytechnique de Tomsk, Russie (Figure II.11) a été utilisé dans le cas des traitements dépassant les intensités de CEP de 5 kV/cm. Ce générateur peut fournir une puissance crête allant jusqu'à $4 \cdot 10^5$ kW. La durée d'impulsion est d'environ $10 \mu\text{s}$.



Ce générateur a été conçu initialement pour faire des traitements par décharge électrique, mais il peut également servir de générateur de champs électriques pulsés, avec des impulsions exponentielles. La génération d'impulsions avec une fréquence de 0,5 Hz, s'effectue grâce à deux condensateurs en parallèle. Un système d'acquisition des données sous interface HPVEE 4.01 développé par le Service Electronique de l'UTC permet de faire l'enregistrement du temps de traitement, la tension et le courant ainsi que l'énergie consommée lors des impulsions.

Pour utiliser ce générateur pour la génération des champs électriques pulsés, il suffit alors de changer les électrodes de la chambre de traitement (Figure II.12.). Ainsi, deux électrodes planes et parallèles (105 mm de diamètre), en acier inoxydable, sont utilisées (figure II.12). Le générateur fournit des impulsions exponentielles décroissantes avec une amplitude de 40 kV. Le schéma des impulsions envoyées est représenté sur la Figure II.13. La distance entre les électrodes peut varier de 1 à 8 cm, soit une intensité de CEP correspondante de 5 à 40 kV/cm. Cette cellule d'une capacité de 1 L offre également la possibilité de traiter une plus grande quantité de produits (jusqu'à 900 g).



Les principales caractéristiques de ce générateur d'impulsions sont présentées ci-dessous:

- ✓ Tension : 40000 V
- ✓ Intensité du courant : 10000 A
- ✓ Nombre d'impulsions: continu
- ✓ Durée de chaque impulsion : $\sim 10 \mu\text{s}$
- ✓ Période : 2 s

Dans notre étude, les raisins ont été traités par CEP en utilisant un générateur d'impulsions (40000 V/cm- 10000 A) (Société Hazemeyer, Saint-Quentin, France). Les raisins rouges foulés ($m = 4500 \text{ g}$) ont été placés dans la cellule de traitement cylindrique. La distance entre les électrodes a été réglée à 80 mm pour assurer une intensité de CEP correspondante de 5 kV/cm. Le temps de traitement est estimé par $t_{PEF} = n.t_i$, où n ($=100$) est le nombre de pulsations et t_i ($\approx 9 \pm 1 \mu\text{s}$) est la durée de chaque impulsion. Le dispositif expérimental utilisé pour ce traitement est présenté dans la figure II.14.

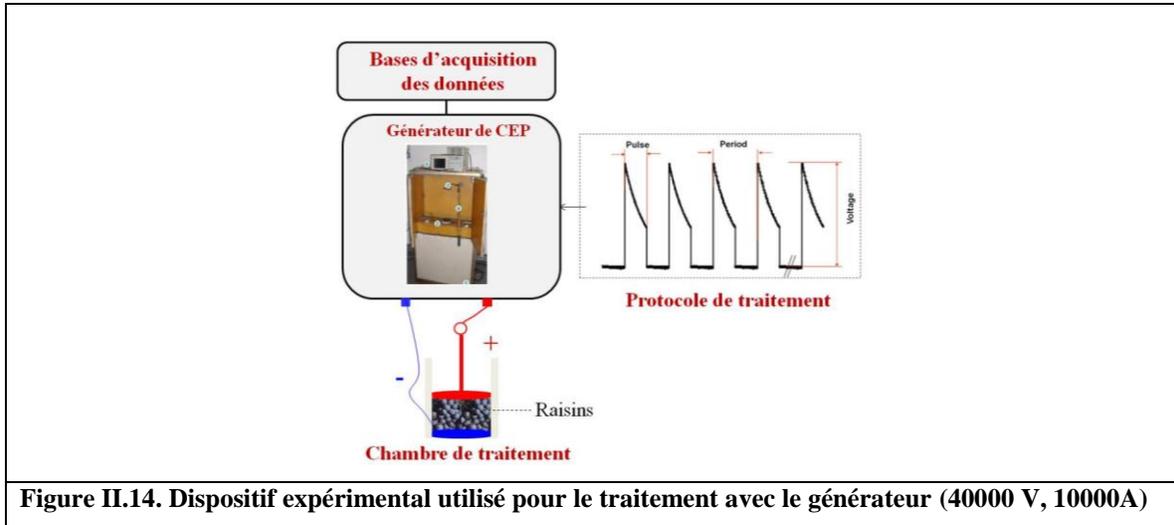


Figure II.14. Dispositif expérimental utilisé pour le traitement avec le générateur (40000 V, 10000A)

2.3.3.2- Les ultrasons :

Le générateur d'ultrasons, conçu et développé par la société Hielscher GmbH (Stuttgart, Allemagne), peut fournir une puissance maximale de 400 W/cm². L'amplitude est réglable de 20% à 100%. L'appareil expérimental (Figure II.15) est composé d'un générateur d'ultrasons (Hielscher GmbH, Stuttgart, Allemagne) relié à une sonde d'ultrasons placée dans une cabine de traitement (190 x 200 x 130 mm). La sonde est plongée dans un bécher contenant le mélange de produit et solvant à traiter.

Nous avons travaillé avec une sonde de type H14 de 100 mm de longueur et de 14 mm de diamètre. La sonde a été placée au centre du bécher et plongée jusqu'à 10 mm du fond du bécher. Le bécher a été immergé dans un bain de glace pour que la température au cours du traitement reste constante. Le générateur d'ondes ultrasonores est relié à l'ordinateur par une liaison de type COM et est équipé d'un logiciel UPCCTRL (Hielscher GmbH, Allemagne) fourni par le fabricant. Ce logiciel permet de fixer la durée du traitement et d'enregistrer la puissance des ondes ultrasonores, la fréquence d'ultrasons et la température du mélange. La température du mélange est contrôlée en continu au cours de l'opération de traitement grâce à un limiteur de température, conçu par le Service Electronique de l'UTC. Ce dernier permet, grâce à un thermocouple, de suivre la température et d'arrêter le traitement lorsque la température dépasse 50°C.

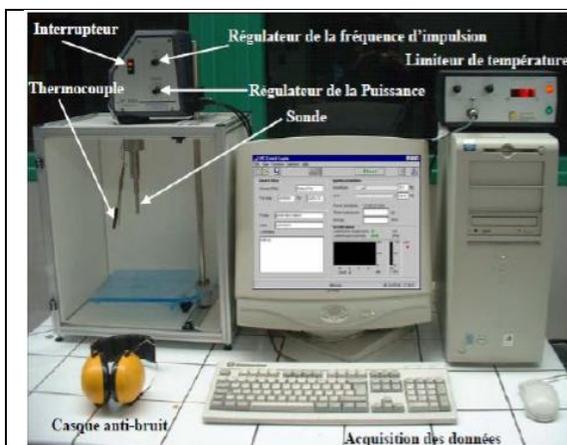
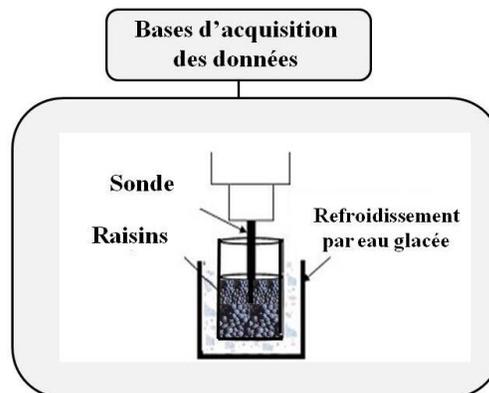


Figure II.15. Générateur des ultrasons et accessoires de contrôle



Cellule de traitement par les ultrasons

Figure II.16. Dispositif expérimental utilisé pour le traitement avec les ultrasons.

Les caractéristiques du générateur d'ultrasons sont les suivantes :

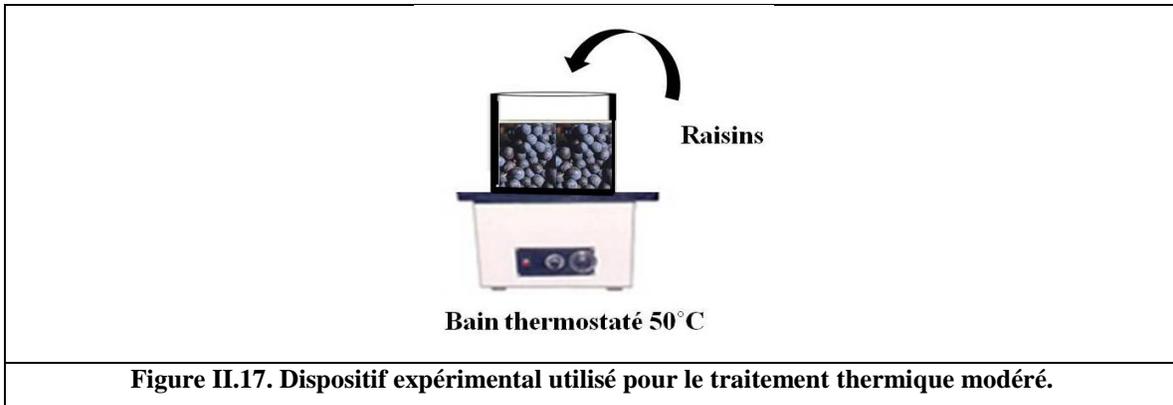
- (1) puissance maximale : 400 W/cm²,
- (2) contrôle de la puissance : 20 – 100 % ,
- (3) fréquence maximale : 24 kHz,
- (4) contrôle de la fréquence : 0 – 100 % ,
- (5) alimentation : 340 V, 4 A, 50 – 60 Hz.

Il est possible de traiter un volume maximum de 1000 mL. La température du mélange est continuellement contrôlée lors du traitement grâce à un thermocouple. Celui-ci est relié à un régulateur de température (Service Electronique, UTC, France) qui permet de couper l'alimentation électrique du générateur lorsque la température de consigne est dépassée. Les raisins rouges foulés (m = 400 g) ont été placés dans la cellule pour les traitements successifs par ultrasons (figure II.16). Les paramètres suivants sont utilisés: puissance: 400 W ; fréquence d'impulsion: 24 kHz; temps de traitement (5 à 15 min). La cellule de traitement a été plongée dans de l'eau glacée pour éviter le chauffage et refroidir le mélange. La libération des composés d'intérêt au cours du traitement par ultrasons est suivie par mesure des caractéristiques physico-chimiques de l'échantillon traité.

2.3.3.3. Traitement thermique modéré :

Les raisins rouges foulés (m = 400 g) ont été placés dans un bain thermostaté maintenu à 50°C pour 15 minutes (Figure II.17). Le contrôle de la température (précisions de mesure

de la température ± 0.1 °C) grâce à un thermocouple de type K enveloppé de téflon. La libération des composés d'intérêt au cours du chauffage est suivie par mesure des caractéristiques physico-chimiques de l'échantillon traité.



2.3.3.4. Thermovinification :

Les raisins rouges foulés ($m = 4500$ g) ont été placés dans un bain thermostaté maintenu à 70°C pour 30 minutes (Figure II.18). Le contrôle de la température grâce à un thermocouple de type K enveloppé de téflon. La libération des composés d'intérêt au cours du chauffage est suivie par mesure des caractéristiques physico-chimiques de l'échantillon traité.

2.3.3.5. Traitement enzymatique :

Pour appliquer ce traitement enzymatique, des enzymes de macération (Lafase He Grand Cru, Laffort Oenologie, Bordeaux, France) ont été ajoutés aux raisins rouges foulés ($m = 4500$ g). Ces enzymes ont été ajoutées à une concentration de 6 g par hectolitre de grappes foulées. La libération des composés d'intérêt au cours du chauffage est suivie par mesure des caractéristiques physico-chimiques de l'échantillon traité.

2.3.3.6. Consommation énergétique:

➤ Champs électriques pulsés :

Le système d'acquisition du traitement par CEP permet d'enregistrer les valeurs du courant et de la tension pendant l'application du traitement par CEP. La consommation énergétique totale du traitement électrique W_E (J/kg) est obtenue à partir de l'équation :

$$W_E = \frac{NW_i}{m}$$

Avec :

W_i : l'énergie totale du condensateur,

N : le nombre des impulsions

M (kg) : la masse de l'échantillon traité.

$$W_i = \int_0^T UI dt$$

Avec :

I (A) : le courant qui traverse l'échantillon pendant le traitement par CEP.

U (V) : la tension appliquée.

T : le temps de l'impulsion électrique (s).

➤ **Les ultrasons** : (Ratoarinoro *et al.*, 1995)

L'énergie du traitement par ultrasons W_{US} (J/kg) est calculée en tenant compte de la densité acoustique et de la surface de la sonde :

$$W_{US} = \frac{W_0 S t}{m}$$

Où W_0 est la densité acoustique (W/m²), $W_0 = 1.05 \cdot 10^6$ W/m² pour la sonde utilisée (UP S400, H14), S est la surface de sonde (m²) (ici $S = 1$ cm²), t est le temps de sonication (s) et m est la masse de produit (kg).

➤ **Traitement thermique modéré** :

L'énergie du traitement par ultrasons W_{MT} (J/kg) est calculée en utilisant la formule suivante :

$$W_{MT} = MC_p \Delta T$$

où M est la masse de la vendange en kg, C_p est la capacité calorifique (estimée par 4.18 kJ/kg.K) et ΔT (=30°C=30 K) est l'élévation de température durant le traitement thermique (de la température ambiante ($T = 20^\circ\text{C}$) à la température désirée ($T = 50^\circ\text{C}$)).

Après le chauffage à 50°C pendant 15 min, le flacon contenant les raisins foulés chauffés sera immergé dans un bain de glace dans le but de refroidir les raisins foulés avant de lancer la fermentation alcoolique.

➤ **Thermovinification** : (Escudier *et al.*, 2008)

L'énergie du traitement par thermovinification W_{Th} (J/kg) est calculée en utilisant la formule suivante :

$$W_{Th} = MC_s \Delta T$$

Où M est la masse de la vendange en kg, C_s est la capacité calorifique (estimée par 4.18 kJ/K.kg) et ΔT (=50°C) est l'élévation de température durant le traitement thermique (de la température ambiante ($T= 20^\circ\text{C}$) à la température désirée ($T =70^\circ\text{C}$)). Après le chauffage à 50°C pendant 30 min, le flacon contenant les raisins foulés chauffés sera immergé dans un bain de glace dans le but de refroidir les raisins foulés avant de lancer la fermentation alcoolique.

2.4. Analyses physico-chimiques des extraits (moûts + vins)

Les analyses sont réalisées sur les extraits liquides obtenus au cours ou après macération pré-fermentaire à froid ou la fermentation alcoolique. Des caractérisations quantitatives et qualitatives permettent d'évaluer les performances d'extraction des polyphénols.

2.4.1 Mesure du pH

Les mesures du pH des solutions sont mesurées à l'aide d'un pHmètre (CONSOR C931, Bioblock Scientific, France) à température ambiante. Ce paramètre est un facteur clé concernant la stabilité des polyphénols.

2.4.2 Mesure de la conductivité électrique

La mesure de la conductivité électrique permet de quantifier l'endommagement des tissus végétaux (Vorobiev & Lebovka, 2008). Les mesures de conductivité électrique sont réalisées à température ambiante à l'aide d'un conductimètre (CONSOR C931, Bioblock Scientific, France). Les résultats sont exprimés en S/m et la gamme de mesure s'étend de

0 à 9.99 S/m. Le degré de destruction des tissus végétaux par voie électrique est estimé en termes de taux de dénaturation cellulaire Z . L'indice de perméabilisation Z (Lebovka *et al.*, 2002) se détermine par l'équation suivante:

$$Z = \frac{\sigma - \sigma_i}{\sigma_d - \sigma_i}$$

Avec :

Z : est l'indice conductimétrique de perméabilisation du tissu.

σ : est la conductivité électrique mesurée au temps t (S/m).

σ_i : est la conductivité électrique mesurée du tissu intact (S/m).

σ_d : est la conductivité électrique du tissu complètement dénaturé par congélation (S/m).

Pour le tissu entièrement endommagé, les valeurs de Z ont été obtenues après mesure de la conductivité électrique des échantillons congelés puis décongelés (Reid, 1997). L'application de cette équation donne $Z = 0$ pour un tissu intact et $Z = 1$ pour un tissu entièrement endommagé (Figure II.18).

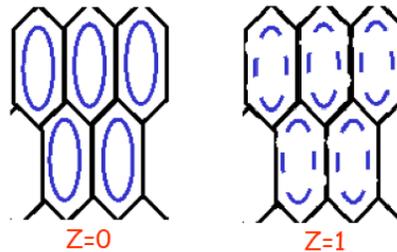


Figure II.18. Schéma représentatif des cellules végétales avec différents degrés de perméabilisation cellulaire Z après traitement électrique

2.4.3. Mesure de l'extrait sec (°Brix)

L'extrait sec (°Brix) des produits liquides est la quantité de matière sèche soluble dans 100 g de solution. Le degré brix est mesuré par un refractomètre digital (PR-101, Atago, USA) à température ambiante. Les résultats sont exprimés en °Brix (g MS/100 g solution). Pour les prélèvements, nous avons utilisé une micropipette. Pour ne pas influencer le volume du moût pendant la macération, la quantité de solution prélevée a été remise dans le solvant d'extraction après avoir mesuré le brix.

2.4.4. Spectrophotométrie

L'étude de l'absorbance est faite par un spectrophotomètre (Secoman Anthelie Advanced France). Après les différents prétraitements, les échantillons ont été centrifugés pendant 10 minutes à 4000 g (centrifugeuse : Hermle Z200A), et le surnageant est analysé par spectrophotométrie. Des dilutions en cascade sont réalisées pour chacun des échantillons, jusqu'à obtenir des mesures d'absorbances cohérentes avec la gamme de lecture de l'appareil. Après chaque dilution, l'échantillon dilué est introduit dans une cuve en quartz de 1 cm dans le spectrophotomètre dans la gamme de longueur d'onde de 190 à 260 nm. Le blanc est réalisé avec de l'eau distillée.

2.4.5. Quantification des polyphénols

La concentration en polyphénols totaux peut être déterminée par deux méthodes principales. La première par un dosage spectrophotométrique à 280 nm permet une estimation rapide du contenu phénolique. La deuxième par un dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu est plus spécifique et renseigne sur la quantité des polyphénols totaux. Enfin, la dernière par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) permet d'identifier et de quantifier chaque composé phénolique.

➤ **Estimation globale des composés phénoliques à 280 nm**

La mesure de l'absorption à 280 nm constitue une estimation globale des composés phénoliques totaux des vins (après centrifugation) (Ribéreau-Gayon, 1970). Les mesures d'absorbance sont réalisées par un spectrophotomètre UV-VIS (Secomam, Shimadzu, France). Le vin rouge est dilué au 1/100^{ème} et la densité optique mesurée à 280 nm par rapport à l'eau sous 1 cm de parcours optique. Le résultat est exprimé par un indice polyphénolique total obtenu par la multiplication de la DO280 nm par un facteur de 100.

➤ **Dosage de Folin-Ciocalteu**

Le dosage des composés phénoliques totaux présents dans les extraits de raisin a été effectué par une méthode adaptée de Singleton et Rossi (1965) avec le réactif de Folin-Ciocalteu commercial (Mello L.D. *et al.*, 2003 ; Vivas *et al.*, 2003). Pour réaliser ce dosage, il faut introduire dans un tube de 2 ml, 0,2 mL de solution étalon ou d'échantillon centrifugé et dilué et 1 mL du réactif de Folin (dilué dix fois dans l'eau distillée). Après agitation au vortex, 0,8 mL d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/L) sont

introduit dans le tube. Ces tubes sont ensuite agités puis placés pendant 2 h à température ambiante ou 10 min à 60°C, à l'obscurité.

Une mesure de l'absorbance de la solution à 750 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS (Seconam, Shimadzu, France) permet de déterminer ensuite les concentrations en polyphénols totaux dans chaque échantillon et cela à partir d'une gamme étalon d'acide gallique. La mesure d'absorbance est réalisée contre une solution de référence ne contenant pas les extraits de polyphénols mais ayant subi toutes les étapes du dosage. La courbe d'étalonnage est effectuée à partir de solutions d'acide gallique (Figure II.19).

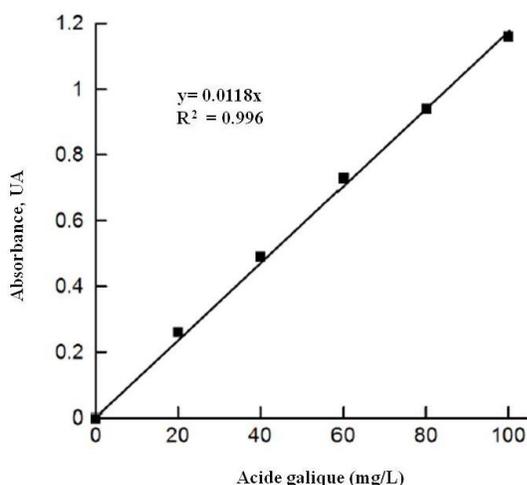


Figure II.19. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage de Folin-Ciocalteu

Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent acide gallique par litre de solution (mg GAE/L) ou en teneur en polyphénols P par rapport à la matière sèche (MS) initiale de la matière première (g GAE/100 g MS).

$$P = \frac{C \times V}{m_{MS}} \times 10$$

où C est la concentration en polyphénols (g/L) ($C=k.A$ avec k la pente de la droite d'étalonnage, A est l'absorbance à 750 nm ; V est le volume total du solvant d'extraction (L) ; m_{MS} est la masse de matière sèche dans le produit (g).

Par la suite, nous avons effectué une série d'analyses lors de mon déplacement à l'Institut Français de la vigne et du vin (IFV). Ces analyses consiste dans l'accomplissement des manipulations ci-dessous:

- **Quantification des polyphénols par Chromatographie liquide à haute performance (CLHP).**
- **Evaluation spectrophotométrique des composantes de la couleur des vins rouges.**
- **Mesure de la couleur du jus.**
- **Analyse par CLHP-DAD des tanins après phloroglucinolyse des moûts et des vins.**
- **Réaction de dépolymérisation.**
- **Analyse des proanthocyanidines par CLHP-DAD.**

Les détails et l'explication de ces analyses est présentée dans l'annexe 5.

2.4.6. Etude des propriétés bioactives des composés phénoliques

En amont de l'étude des différentes propriétés bioactives des composés phénoliques, il faut extraire les polyphénols. Donc, il faut préparer les extraits phénoliques à partir des broyats de raisins de différents cépages.

2.4.6.1. Préparation des extraits phénoliques et stockage

La préparation des extraits de raisin est réalisée à la température ambiante (macération) (Figure II.20). En première étape, pour chaque variété, 10 g de filtrat de jus de raisins sont mélangés à 15 mL d'acétone 85%. Ensuite, le mélange (filtrat de jus de raisin + acétone) est soumis à une agitation pendant une période de 3 à 4 jours à température ambiante pour extraire le maximum de composés phénoliques présents dans les structures vacuolaires du fruit. Une fois l'extraction achevée le mélange est soumis à une centrifugation pendant 15 minutes à 20 degrés Celsius et à une vitesse de 2500 rpm. Une fois terminé, le surnageant est récupéré et transvasé dans de nouveaux tubes Falcon pour être ensuite incubé 2 jours à une température de 40 degrés Celsius afin d'assurer l'évaporation totale de l'acétone. Les extraits restants dans les tubes après évaporation du solvant sont remplis dans des seringues et soumis à une filtration par passage sur des filtres de 0,2 µm pour se débarrasser des impuretés. Finalement les extraits ainsi préparés seront conservés à - 20 degrés Celsius jusqu'à leur utilisation.

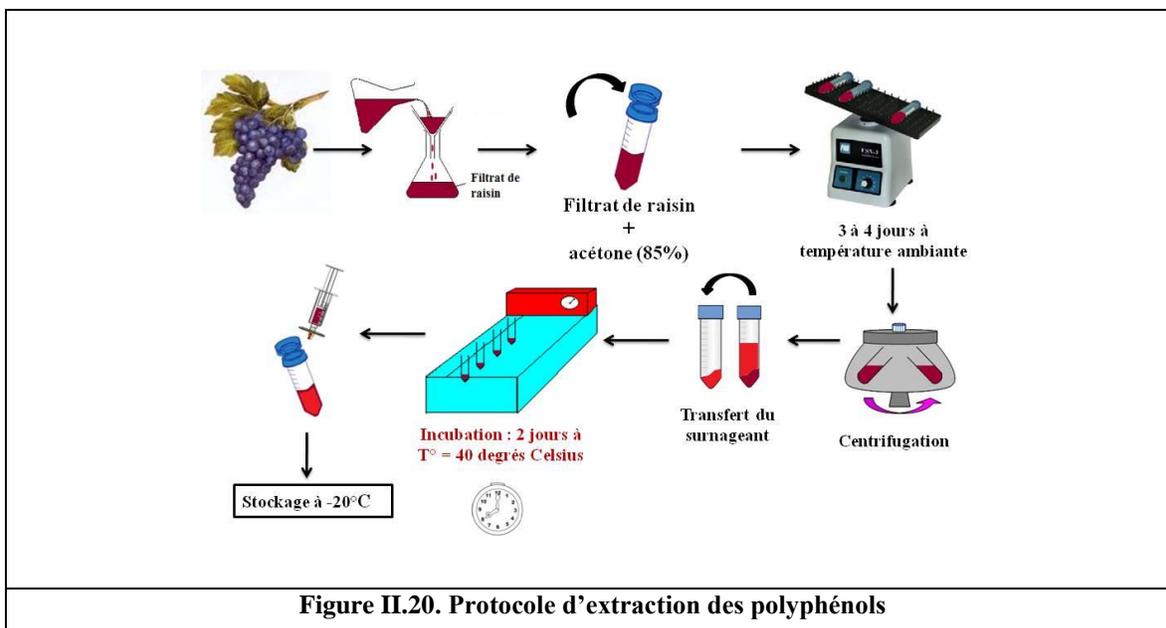


Figure II.20. Protocole d'extraction des polyphénols

2.4.6.2. Etude des propriétés antiradicalaires:

L'étude des activités antiradicalaires dans les produits naturels a reçu une attention croissante ces dernières années (De Quirós *et al.*, 2009). La caractéristique principale d'un antioxydant est sa capacité de capter les radicaux libres. Le DPPH (2,2-Diphényl-picrylhydrazyl) est un radical libre stable. Cette stabilité est due à la délocalisation de l'électron libre sur toute la molécule de telle façon que ces molécules ne peuvent pas se dimériser comme est le cas de la plupart des radicaux libres. L'électron libre du radical du DPPH, de couleur pourpre, donne une forte absorption maximale à 517 nm. Quand cet électron libre devient parié par un hydrogène à partir d'un radical libre d'un antioxydant (ici les polyphénols), DPPH-H réduit se forme et sa couleur vire par la suite vers le jaune pâle (Figure II.21). L'effet de l'antioxydant sur le DPPH a été évalué quantitativement en suivant, la disparition du radical stable DPPH et donc la diminution de l'absorbance par spectrophotométrie d'absorption UV-visible à 515 nm en utilisant des contrôles positifs connus par leurs activités antioxydantes et antiradicalaires comme le BHT qui est un antioxydant synthétique et le resvératrol qui est un antioxydant naturel (Wu *et al.*, 2005).

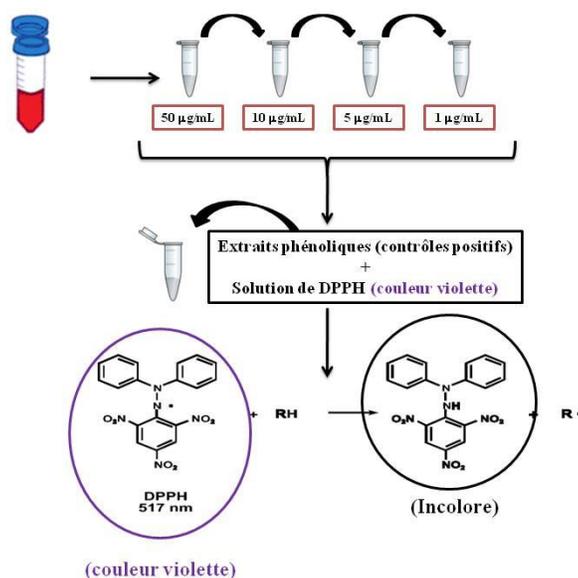


Figure II.21. Mécanisme d'antioxydation du DPPH

Le protocole à suivre pour étudier les propriétés antiradicalaires est le suivant (Göktürk Baydar *et al.*, 2007) :

Dans un tube Eppendorf de 2 mL, verser 450 µL de tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,4). Puis, rajouter 50 µL des échantillons à étudier ou des contrôles (de concentrations décroissantes d'extraits phénoliques : 50 - 10 - 5 et 1 µg/mL. Par la suite, 1,5 mL de la solution de DPPH (0,1 mM) sont ajoutés au mélange. Le tout est incubé pendant 30 minutes à température ambiante. A la fin de la période d'incubation, l'absorbance des milieux réactionnels est lue à 517 nm contre un blanc préparé avec du méthanol pur (le même employé pour la dissolution de DPPH).

Les propriétés antiradicalaires des échantillons sont déterminées en incubant le DPPH avec des concentrations connues de polyphénols. En effet, une diminution de l'intensité de la couleur du DPPH, mesurée à 517 nm, reflète la présence de substances antiradicalaires dans le milieu. Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres de DPPH est calculé d'après la formule suivante :

% d'inhibition = [(absorbance du control (BHT ou Resvératrol) – absorbance de l'échantillon)/ absorbance du control] x 100.

2.4.6.3. Etude des propriétés antimicrobiennes :

Dans cette thèse, le potentiel antimicrobien de quelques extraits phénoliques isolés à partir de différentes variétés de raisins cultivées dans la plaine de la Békaa au Liban dans les domaines de la société KSARA a été examiné à l'égard de la croissance de divers souches de microorganismes pouvant être des agents causals de nombreuses infections chez l'homme.

Les souches microbiennes utilisées comme souches de référence pour réaliser les tests furent :

- Deux souches bactériennes à Gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 10536.
Salmonella arizonae ATCC 13314
- Une souche bactérienne à Gram positif : *Listeria monocytogenes* ATCC 19111.
- Une souche de levure : *Candida albicans* ATCC 10231.

Le protocole expérimental à suivre est le suivant (Rodríguez Vaquero *et al.*, 2006 ; Papadopoulou *et al.*, 2005). Tout d'abord, Il faut manipuler différentes souches à la fois pour empêcher la contamination croisée et par la suite prévenir l'obtention de résultats erronés, donc une fois le travail avec une souche est terminé, démarrer les tests sur un autre microorganisme. A partir de souches congelées maintenues dans le réfrigérateur à - 80 degrés Celsius ensemercer de manière à isoler sur des milieux gélosés adéquats (Tableau II.2).

Souches	Milieux gélosés adéquats
<i>Candida albicans</i>	Milieu solide (YGC: Yeast Glucose Chloramphenicol): 41,1g YGC agar (BioMérieux) dissous dans 1L d'eau distillée.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Milieu solide (TSAYE : Trypticase Soy Agar -Yeast Extract): 40g TSA (Trypticase Soy Agar) (BioMérieux) et 6g extrait de levures dissous dans 1L d'eau distillée.
<i>Escherichia coli</i>	Milieu solide (LA : Luria Agar): 5g Tryptone, 5g extrait de levures, 5 g NaCl, et 15 g Agar agar (Merck) dissous dans 1L d'eau distillée.
<i>Salmonella arizonae</i>	Milieu solide (TSA : Trypticase Soy Agar): 40g TSA dissous dans 1L d'eau distillée.
Tabelau II.2. Milieux gélosés adéquats pour les différentes souches microbiennes.	

Incuber les cultures à l'étuve à 37 degrés Celsius pendant 24 heures pour *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* (Jayaprakasha *et al.*, 2003) et *Salmonella arizonae* (Karapinar *et al.*, 2007) ainsi qu' à 30 degrés Celsius pendant 48 heures pour *Candida albicans* (Papadopoulou *et al.*, 2005). Après l'incubation, prélever stérilement quelques colonies de la culture isolée sur boîte de pétri avec un enseigneur stérile et les placer dans un tube Falcon stérile contenant 5mL de :

- Bouillon YGC pour *Candida albicans*.
- Bouillon TSBYE pour *Listeria monocytogenes*.
- Bouillon LB pour *Escherichia coli*.
- Bouillon TSB pour *Salmonella arizonae*.

Fermer le tube puis l'agiter vigoureusement pour bien mettre en suspension les cellules qui ont tendance à rester collées entre elles. Par la suite, placer le tube sous agitation au shaker, à 37 degrés Celsius pour les bactéries et à 30 degrés Celsius pour les levures, pendant une heure afin d'assurer leur multiplication. Après une heure, agiter de nouveau le tube, transvaser 2mL de son contenu dans une cuve de spectrophotomètre en plastique et lire la DO à 630 nm en se servant des différents bouillons utilisés pour la culture liquide comme blanc (Figure II.22). La croissance microbienne sera alors suivie par la mesure de l'absorbance qui doit être aux alentours de 0,132 pour les bactéries et aux alentours de 0,08 pour *Candida albicans* (Serra *et al.*, 2008).

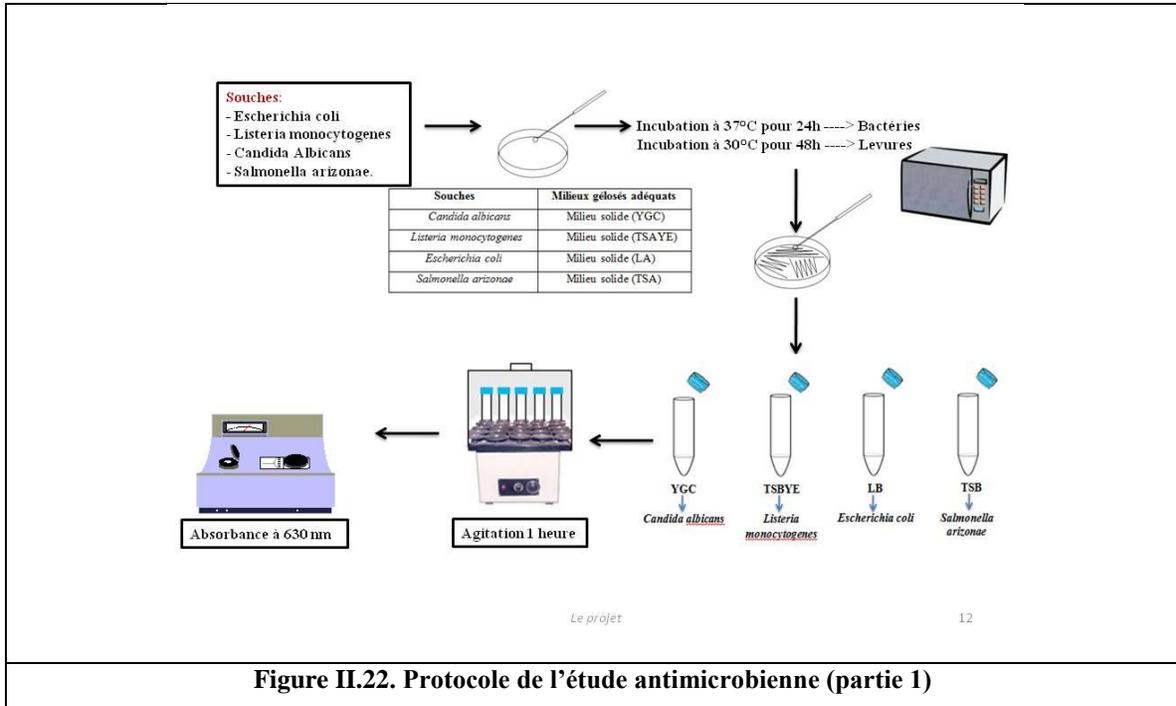


Figure II.22. Protocole de l'étude antimicrobienne (partie 1)

En parallèle, préparer sous la hotte dans des tubes Eppendorf stériles (1,5 mL) une solution à 5 mg / mL de chaque échantillon d'extraits phénoliques (la dilution nécessaire est faite avec de l'eau distillée autoclavée). Préparer également une solution à 5 mg /mL de chaque contrôle positif selon les conditions suivantes (Tableau II.3):

Standard phénolique	Masse	DMSO	Eau distillée autoclavée
Acide gallique*	30 mg	100 µL	900 µL
BHT	5 mg	0 µL	1 mL
Resvératrol*	30 mg	100 µL	900 µL

Antibiotique	Masse	DMSO	Eau distillée autoclavée
Chloramphénicol	5 mg	0 µL	1 mL

Tableau II.3. Conditions des différents contrôles positifs

- **N.B :*** L'acide gallique et le Resvératrol sont insolubles dans l'eau, d'où la nécessité de faire appel à un solvant organique permettant la dilution de ces standards. Le « DMSO » a été choisi comme le meilleur solvant. Ce dernier étant reconnu par son pouvoir inhibiteur vis à vis des bactéries et des levures (Pereira *et al.*, 2007) on a procédé à la dilution de façon à éliminer son effet inhibiteur, alors

une solution à 30 mg/mL d'acide gallique et de Resvératrol est préparée avec une concentration en DMSO de 10% v/v. Une dilution est effectuée à partir de cette solution afin d'avoir une concentration finale de 5 mg/mL.

Puis, transvaser 200 µL de chaque solution 5 mg/mL d'extraits ou de standards phénoliques dans des tubes Eppendorf de 0,5 mL. La suspension de bactéries (ou de levures) est ensuite répartie à raison de 200 µL de suspension par tube dans les tubes Eppendorf contenant au préalable les 200 µL de chaque solution à 5 mg/mL. Les solutions obtenues (volume final 400 µL) sont les solutions mères. Préparer deux autres tubes servant comme contrôles négatifs :

- **Tube 1** : 200µL de bouillon adéquat et 200µL de la suspension bactérienne.
- **Tube 2** : 200µL de DMSO (dilué de façon à avoir la même concentration en DMSO que dans les solutions de Resvératrol et d'acide gallique) et 200µL de la suspension bactérienne.

Agiter tous les tubes (solutions mères et contrôles négatifs) et garder les au shaker pendant 24 heures, à 37 degrés Celsius pour les bactéries et à 30 degrés Celsius pour la levure *Candida albicans*. Après 24 heures, diluer stérilement chacune des solutions mères et des contrôles négatifs dans du bouillon adéquat stérile de façon sérielle (de 10 en 10) jusqu'à la dilution 10^{-8} pour les bactéries et jusqu'à la dilution 10^{-5} pour la levure *Candida albicans* (avec un volume final de 1.2 mL pour chaque dilution). Puis, préparer et identifier des boîtes de Pétri stériles.

Pour chaque tube (solutions mères et contrôles négatifs), ajouter respectivement dans des tubes Falcon, 500µl des dilutions choisies à 20 mL de milieu solide adéquat pour chaque microorganisme au moment de couler le milieu dans les boîtes de Pétri.

- **N.B :** Il faut attendre à ce que le milieu se refroidit un peu avant d'ajouter les 500µL de chaque dilution sinon on risque de tuer les microorganismes contenus et d'errer les résultats.

Homogénéiser et couler immédiatement le milieu en faisant un mouvement circulaire et répété afin de répartir le mieux possible le milieu dans la boîte de Pétri. Puis, laisser solidifier sous la hotte. Par la suite, mettre les boîtes à incuber à 37 degrés Celsius pendant 24 heures pour les bactéries et à 30 degrés Celsius pendant 48 heures pour *Candida albicans* (Serra *et al.*, 2008), en position inversée (couvercle en bas) pour empêcher l'eau de condensation du couvercle de couler sur le milieu gélosé. Après

incubation compter le nombre de colonies, qui ont poussé en absence de composés phénoliques (les contrôles négatifs) et ceux qui ont poussé sur des milieux additionnés d'extraits ou de contrôles positifs (Figure II.23).

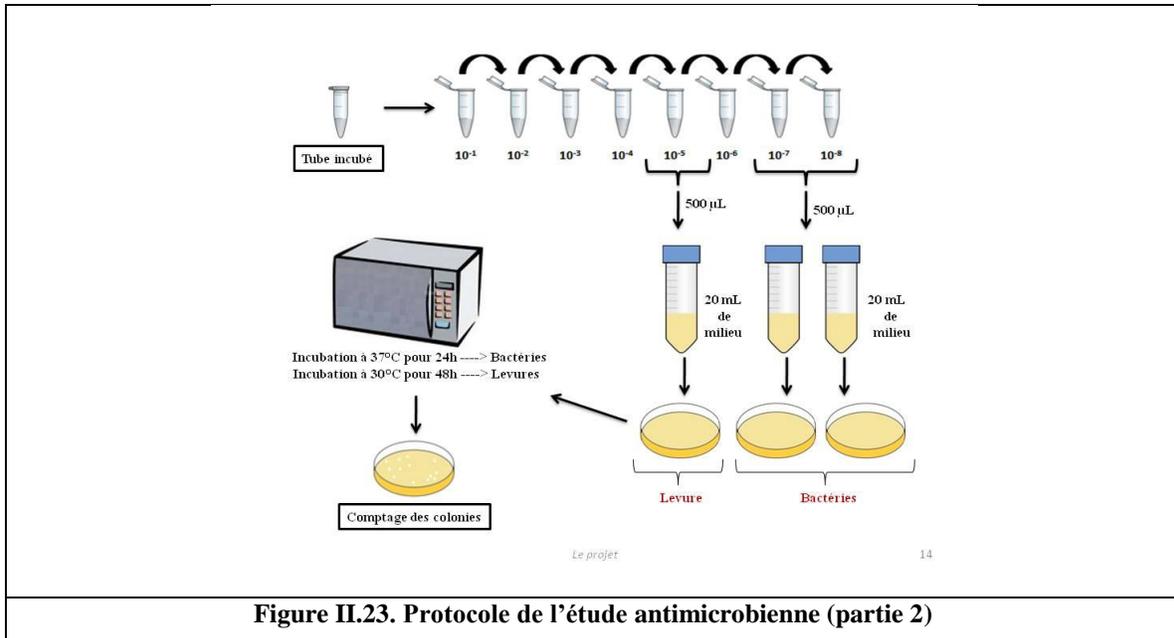


Figure II.23. Protocole de l'étude antimicrobienne (partie 2)

2.5. Analyses statistiques des résultats

L'ensemble des expérimentations ont été répétées au minimum 3 fois. Les moyennes et écarts-types des données ont été calculés. Les barres d'erreurs sur les figures correspondent à ces écarts-types. Les tests de comparaison de moyenne ainsi que le test de Fisher (LSD) ont été appliqués afin de comparer les résultats obtenus. L'intervalle de confiance de mesure a été fixé à 5 %. Pour les tests statistiques, le logiciel Statgraphics plus 5.1 (Statpoint Technologies, Inc.) a été utilisé. La modélisation des courbes expérimentales obtenues a été réalisée à l'aide du logiciel Table Curve (2D Windows version 2.03).

Chapitre 3 : La maturité phénolique

Dans la filière vinicole, il est admis que la qualité du vin repose largement sur la qualité du raisin au moment des vendanges. La connaissance du stade de maturité de ces composés facilite la prise de décisions quant au choix de la date de récolte et des techniques de vinification. Durant ce chapitre, nous allons suivre la maturité phénolique, tout en se servant des méthodes Glories (1&2) (Vivas *et al.*, 1998 ; Amrani *et al.*, 2006) et ITV (Lamandon, 1995). Ces méthodes ont été appliquées sur plusieurs échantillons provenant de différentes parcelles localisées dans la vallée de la Békaa, et de différents cépages dans le but de suivre l'évolution de la maturité phénolique et de quantifier les composés phénoliques dans les extraits de raisins. Ce suivi est caractérisé par une accumulation des anthocyanes et des tanins dans la pellicule (Ribéreau-Gayon, 1999). En parallèle à ces phénomènes de concentrations, les tanins des pépins seront de moins en moins libérables. En effet, les tanins des pellicules, généralement combinés à d'autres composés, sont de nature peu astringents comparés à ceux des pépins qui sont eux à l'origine du "corps" du vin. Donc, un raisin mur se caractérise par des pellicules riches en tanins et en anthocyanes et des pépins relativement pauvres en tanins. Alors qu'un déficit de maturité se traduira par une faible accumulation de pigments dans les pellicules et une difficulté de leur extractibilité, une faible accumulation de tanins peu astringents dans les pellicules et une forte concentration de tanins astringents dans les pépins (Vivas *et al.*, 1998).

Durant la maturité phénolique, l'extractibilité des pellicules augmentent l'extraction des anthocyanes et des tanins pelliculaires. C'est sur ce phénomène que se base cette maturité, que l'on peut définir par l'aptitude du raisin à céder ces composés phénoliques durant la vinification en rouge. Parmi les composés phénoliques, nous nous intéressons principalement au suivi des anthocyanes durant la maturité phénolique; ces derniers ont été désignés comme indicateur de cette maturité. Les anthocyanes, situées dans les vacuoles de la cellule de la pellicule, sont facilement libérables. La vacuole peut être représentée comme un sac dont la fragilité dépend étroitement de la fermeture qui est conditionnée par le degré de la maturité. Les anthocyanes ont l'avantage de s'extraire facilement, en quantité importante, d'être facilement dosables et de refléter la qualité vu qu'ils sont étroitement corrélés aux facteurs de qualité (Lanaridis *et al.*, 1997). Comme est indiqué dans nos parties précédentes du manuscrit, nous nous sommes servis principalement de deux méthodes de suivi de la maturité phénolique : les méthodes Glories (1&2) (Saint-Cricq, 1998 ; Glories, 1993) et la

méthode ITV (Lamadon, 1995 ; Cayla, 2002). Nous avons appliqué ces méthodes sur les échantillons de raisins sélectionnés de différentes parcelles localisées dans la vallée de la Békaa. Ces analyses ont été effectuées sur 4 vendanges (2008, 2009, 2010 et 2011). Les raisins sélectionnés appartiennent principalement à cinq cépages : Cabernet sauvignon, Cabernet Franc, Syrah, Merlot et Petit verdot. Dans ce chapitre, nous allons comparer les dates de vendange phénolique choisies par les deux méthodes de suivi de maturité phénolique (méthodes ITV et Glories), et analyser la corrélation entre les deux méthodes. Cette comparaison sera basée sur un suivi des cinétiques des différentes composantes (anthocyanes, indice polyphénolique total, maturité des pépins) élaborées par les deux méthodes pour chaque cépage. Par la suite, une comparaison entre les dates de vendange phénolique proposées par les méthodes ITV et Glories et les dates de vendange technologique a été également effectuée. Une classification qualitative des parcelles du Château KSARA sur les quatre années sera réalisée en fonction du potentiel phénolique déterminé par la maturité phénolique. Une comparaison entre les quatre vendanges sera aussi effectuée dans le but de choisir le meilleur millésime. Enfin, une comparaison de nos cépages libanais avec les cépages français sera aussi abordée dans le but d'estimer la qualité de nos vignobles.

3.1. Etude de la maturité phénolique des différents cépages par les méthodes Glories (1&2) et ITV sur les quatre millésimes (2008, 2009, 2010 et 2011).

Dans la première partie de ce chapitre, nous aborderons le suivi de chacun des cinq cépages : Cabernet Sauvignon, Merlot, Cabernet Franc, Syrah et Petit Verdot, et par la suite nous comparerons le potentiel qualitatif des différents cépages sur les quatre vendanges, en essayant de classer les meilleures parcelles de chaque cépage.

3.1.1-Suivi du cépage Cabernet Sauvignon :

3.1.1.1-Maturité anthocyanique:

Pour suivre la maturité du cépage Cabernet Sauvignon, nous allons présenter en premier lieu la maturité anthocyanique analysée par les deux méthodes : ITV et Glories. Ces méthodes ont permis de suivre avec fiabilité l'évolution de la teneur en anthocyanes, cette évolution est traduite par l'allure de la courbe avec les trois phases de maturation phénolique : phase d'augmentation du potentiel, phase de stagnation et de surmaturation (voir Fig I.11 partie bibliographie).L'interprétation des courbes d'accumulation anthocyanique pour les différentes parcelles étudiées, nous a fourni les dates de pics des anthocyanes ANT (mg/L) proposées par la méthode ITV et les dates des pics des potentiels en anthocyanes facilement

extractibles ApH3.2 (mg/L) proposées par la méthode Glories. Le tableau (III.1) présente les dates des pics d'anthocyanes (ANT et ApH3.2) de chacune des différentes parcelles du cépage Cabernet Sauvignon sur les quatre vendanges (2008, 2009, 2010 et 2011). Les dates de vendange phénolique proposées ont été décalées environ une semaine par rapport au pic d'anthocyanes présentés dans le tableau puisque le Cabernet Sauvignon est un cépage qui doit être récolté à forte surmaturation (Dupuch, 1998, Anneraud & Vinsonneau, 2009).

Domaine	Parcelle	Codex	Pic d'anthocyanes (mg/L)				Pics de Potentiel en anthocyanes facilement extractibles (ApH3.2) d'après Glories			
			(d'après la méthode ITV)							
			Vendange 2008	Vendange 2009	Vendange 2010	Vendange 2011	Vendange 2008	Vendange 2009	Vendange 2010	Vendange 2011
MANSOURA	Cabernet Y. HA. 1995-1	MVCS51	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept
MANSOURA	Cabernet K. CH. 1990	MVCSK0	08-sept	14-sept	13-sept	26-sept	08-sept	14-sept	13-sept	26-sept
ITANY	Cabernet 1994-1	ITCS41	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept
ITANY	Cabernet 1994-2	ITCS42	08-sept	14-sept	13-sept	26-sept	08-sept	14-sept	13-sept	26-sept
ITANY	Cabernet 1995-1	ITCS51	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept
ITANY	Cabernet 1995-2	ITCS52	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept	22-sept	14-sept	13-sept	26-sept
TANAYEL	Cabernet B6	TACS6	29-sept	14-sept	13-sept	26-sept	29-sept	14-sept	13-sept	26-sept
KANAFAR	Cabernet 1	KACS31	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept	22-sept	14-sept	13-sept	26-sept
KANAFAR	Cabernet 2	KACS32	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept

Tableau III.1: Les dates des pics d'anthocyanes ANT (mg/L) et du potentiel en anthocyanes facilement extractibles (ApH3.2), de chacune des parcelles du cépage Cabernet Sauvignon, détectés respectivement par les méthodes ITV et Glories (1&2).

Au sein du cépage Cabernet Sauvignon, nous constatons une variabilité de la précocité d'une parcelle à une autre durant la vendange 2008. Toutes ne sont pas au même stade au même moment. Les écarts peuvent atteindre plusieurs jours. En effet, le cépage s'exprime différemment selon le sol sur lequel il est cultivé. D'où les différentes parcelles d'un même cépage présente un sol et une exposition différente des parcelles voisines. Ce qui peut aboutir à des caractéristiques phénoliques significativement différentes. Dans le domaine de la viticulture, la plante subit les influences de son environnement. Cet ensemble de facteurs se rassemble sous la dénomination de terroir. Le terroir est l'ensemble des conditions naturelles - pédologiques, géologiques et climatiques qui constituent l'environnement de fait d'un vignoble. Il s'agit de données de la nature telles que la pédologie du sol et du sous-sol, l'exposition et l'ensoleillement, la sécheresse ou la pluviométrie, sur lesquelles l'homme ne peut exercer qu'une influence limitée. Il est généralement admis que le climat et le sol jouent

un rôle prépondérant sur la précocité des parcelles (Jones & Davis 2000; Tesic *et al.* 2002). Ce phénomène traduit, en général, des variations du fonctionnement des ceps lié à leur état physiologique propre ou à de subtiles variations locales des conditions climatiques. Alors que pour les vendanges 2009, 2010 et 2011, les pics d'anthocyanes (fournis par la méthode ITV) et les pics du pourcentage d'anthocyane extractible (fournis par la méthode Glories) se situent à la même date pour toutes les parcelles appartenant à ce cépage. Ce résultat a été validé sur les trois vendanges (2009, 2010 et 2011). Donc, pour la majorité des parcelles, les dates de vendange phénolique proposées par les deux méthodes Glories et ITV sont les mêmes.

3.1.1.2-Les pics phénoliques:

Après avoir comparé les dates des pics d'accumulation des anthocyanes fournis par les méthodes ITV et Glories, nous avons comparé les dates de pics phénoliques. Il s'agit alors de comparer les dates des pics d'indice polyphénolique total (IPT) (fournis par la méthode ITV) et les dates des richesses phénoliques totales (RPT) (fournis par la méthode Glories). Le tableau III.2 présente les dates des pics en composés phénoliques.

Domaine	Parcelle	Codex	Pic d'indice polyphénolique total (mg/L)				Pics de richesse phénolique totale			
			(IPT d'après la méthode ITV)				(RPT) d'après Glories			
			Vendange 2008	Vendange 2009	Vendange 2010	Vendange 2011	Vendange 2008	Vendange 2009	Vendange 2010	Vendange 2011
MANSOU RA	Cabernet Y. HA. 1995-1	MVCS51	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept
MANSOU RA	Cabernet K. CH. 1990	MVCSK0	08-sept	14-sept	13-sept	26-sept	08-sept	14-sept	13-sept	26-sept
ITANY	Cabernet 1994-1	ITCS41	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept
ITANY	Cabernet 1994-2	ITCS42	08-sept	14-sept	13-sept	26-sept	08-sept	14-sept	13-sept	26-sept
ITANY	Cabernet 1995-1	ITCS51	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept
ITANY	Cabernet 1995-2	ITCS52	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept	22-sept	14-sept	13-sept	26-sept
TANAYEL	Cabernet B6	TACS6	29-sept	14-sept	13-sept	26-sept	29-sept	14-sept	13-sept	26-sept
KANAFAR	Cabernet 1	KACS31	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept	22-sept	14-sept	13-sept	26-sept
KANAFAR	Cabernet 2	KACS32	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept	15-sept	14-sept	13-sept	26-sept

Tableau III.2: Les dates des pics d'indice polyphénolique total (IPT) et de la richesse phénolique totale (RPT) de chacune des parcelles du cépage Cabernet Sauvignon, détectés respectivement par les méthodes ITV, Glories (1&2).

La comparaison des dates de pics d'anthocyanes (Tableau III.1) et de composés phénoliques (Tableau III.2) montre que les dates des pics d'IPT et d'ANT (mg/L) fournis par la méthode ITV et celles des pics de RPT et de ApH.3.2 fournis par la méthode Glories sont toutes

atteintes à la même date. De plus, la comparaison entre les dates de pics IPT et RPT obtenus par les deux méthodes sont les mêmes sur les quatre vendanges, résultat déjà observé pour les dates des pics d'anthocyanes des parcelles du cépage Cabernet Sauvignon. Ici aussi, une variation au niveau des parcelles a été observée pour la vendange 2008.

D'où l'existence d'une forte corrélation entre les dates des pics d'accumulation anthocyanique et phénoliques fournis par les méthodes Glories et ITV. Des études comparatives des deux méthodes d'estimation des composés phénoliques ont montré une corrélation plus ou moins étroite selon les cépages entre les deux méthodes ITV et Glories (1&2) (Cayla *et al.*, 1998). Kontoudakis *et al.*, 2010 ont prouvé de même que les deux méthodes étudiées Glories et ITV sont adéquates pour mesurer la maturité phénolique et pour prédire une partie des caractéristiques des futurs vins élaborés. Plus précisément, ces deux méthodes présentent une très bonne régression linéaire et des coefficients de corrélation élevés entre les teneurs en anthocyanes et en IPT des raisins vendangés et du vin élaboré. Toutefois, seul Glories offre de bons résultats pour les paramètres de couleur.

3.1.1.3-Matrice de corrélation correspondant aux pics d'accumulations anthocyaniques et phénoliques:

Pour vérifier la corrélation entre les composantes phénoliques fournis par la méthode ITV d'une part, par la méthode Glories (1&2) d'autre part et entre les deux méthodes, nous avons réalisé une matrice de corrélation sur les valeurs moyennes des quatre vendanges des échantillons correspondant au pic d'accumulation anthocyanique et phénolique analysées suivant les deux méthodes Glories et ITV. Cette matrice est présentée dans le tableau III.3.

	Variables	ITV			GLORIES			
		ANT (mg/L)	PAT (mg/Kg)	IPT	ApH1 (mg/L)	ApH3.2 (mg/L)	RPT	Mp
ITV	ANT (mg/L)	1.00	0.93	0.83	0.84	0.74	0.35	0.20
	PAT (mg/Kg)	0.93	1.00	0.69	0.87	0.60	0.20	0.32
	IPT	0.83	0.69	1.00	0.70	0.80	0.60	0.07
GLORIES	ApH1 (mg/L)	0.84	0.87	0.70	1.00	0.70	0.30	0.25
	ApH3.2 (mg/L)	0.74	0.60	0.80	0.70	1.00	0.70	0.08
	RPT	0.35	0.20	0.60	0.30	0.70	1.00	0.04
	Mp	0.20	0.32	0.07	0.25	0.08	0.04	1.00

Tableau III.3:Matrice de corrélation entre les différentes variables de composition phénolique des raisins appartenant au cépage CS suivant les méthodes ITV et Glories pour les quatre vendanges (2008, 2009, 2010 et 2011).

La matrice de corrélation montre une forte corrélation entre les composantes phénoliques suivant la méthode ITV, $R^2 = 0.7-0.93$ entre les composantes ANT, PAT et IPT. D'où la fiabilité de la méthode ITV. L'IPT est relié au potentiel anthocyanique obtenu par la méthode ITV (ANT et PAT). Quant à la méthode Glories, la matrice de corrélation montre une forte corrélation entre le potentiel total en anthocyanes (ApH1), le potentiel en anthocyanes facilement extractibles (ApH3.2). Une bonne tendance a été notée entre ApH3.2 et RPT, mais la corrélation diminue entre ApH1 et RPT. De plus, toute parcelle confondue, la matrice réalisée montre qu'il existe une bonne corrélation entre les deux méthodes ITV et Glories. Une bonne corrélation a été notée entre les composantes fournis par ITV (ANT, PAT et IPT) et par Glories (ApH1, ApH3.2). Les études comparatives des méthodes de suivi des composés phénoliques montrent bien ce lien (Cayla, 1998). La matrice montre que la maturité des pépins est faiblement corrélée aux autres composantes phénoliques (ANT, PAT, ApH1, ApH3.2 et RPT).

La comparaison des deux méthodes (ITV et Glories) montre que les dates de pics d'accumulation phénoliques se croisent dans la majorité des cas. De plus, une forte corrélation a été notée entre ces deux méthodes. Ce résultat étant validé sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011. La méthode ITV, permet de suivre avec fiabilité l'évolution de la maturité phénolique et la quantification des composés phénoliques. Cette mesure n'est qu'une approche quantitative, et l'analyse quantitative des composés phénoliques et des anthocyanes, est en théorie insuffisante pour une approche qualitative. Cependant, pour un cépage donné, et dans un terroir donné, l'évolution quantitative des anthocyanes se fait de façon parallèle à l'évolution qualitative des tanins. Celle-ci étant réalisée par la méthode Glories. Ainsi, le suivi de la concentration en anthocyanes au cours de la maturation constitue un indice de qualité pertinent, le passage à un maximum de concentration indiquant le moment de maturité optimale. Donc, l'utilisation d'une méthode quantitative doit être complétée par une approche qualitative. L'amélioration de l'étude du suivi de la maturité phénolique nécessitera alors l'application en parallèle des méthodes ITV (méthode quantitative) et Glories (méthode quantitative et qualitative), celles-ci étant bien corrélées et pouvant aboutir à l'élaboration d'une méthodologie optimisée du suivi de la maturité phénolique, l'optimisation du choix de la date de vendange et la classification des parcelles de chaque cépage.

3.1.1.4-Comparaison des dates de vendange phénolique et technologique :

La maturité technologique peut être approchée par différents indices de maturité (p. ex. rapport du sucre sur l'acidité de la pulpe). La maturité phénolique tient compte de la teneur globale en molécules de cette famille : les anthocyanes, les composés phénoliques et les tanins mais aussi leur aptitude à l'extraction . Ainsi, la maturité phénolique peut se définir comme le niveau de maturité permettant d'obtenir simultanément un potentiel important en composés phénoliques et leur bonne capacité à diffuser dans le vin futur.

Dans le but de comparer les dates de vendange technologique avec celles phénolique, nous présentons dans le tableau III.4 les dates de vendanges technologique et phénolique des différentes parcelles du cépage Cabernet Sauvignon sur les quatre millésimes 2008, 2009, 2010 et 2011. Pour les vendanges 2008, 2009 et 2011, les parcelles KACS31 et KACS32 du domaine KANAFAR, les parcelles ITCS41, ITCS42, ITCS51 et ITCS52 du domaine ITANY, et les parcelles MVCS51, MVCSK0 du domaine Mansoura présentent des dates de vendange phénoliques précoces par rapport aux dates de vendange technologique. Ceci implique une bonne maturité phénolique de ces parcelles vu qu'ils auront atteint une pleine maturité phénolique avant d'être vendangé. En effet, la date de vendange technologique est tardive une semaine par rapport à celle phénolique. Vu que le cépage Cabernet Sauvignon est un cépage qui doit être récolté à une légère surmaturation (environ une semaine après le pic d'anthocyanes) (Dupuch, 1998, Anneraud & Vinsonneau , 2009), alors, nous pouvons dire que les parcelles du cépage CS ont été vendangés majoritairement à une date optimale pour les vendanges 2008, 2009 et 2011. Date pour laquelle la vendange technologique et phénolique ont été atteintes. Par contre pour la vendange 2010, pour la majorité des parcelles (MVCSK0, ITCS51, ITCS52, TACS6, KACS31 et KACS32) la date de vendange phénolique est tardive par rapport à la date de vendange technologique. Ceci implique d'avoir des raisins vendangés (en fonction de la vendange technologique) mais ne possédant pas la meilleure maturité phénolique. En évaluant le choix de la vendange sur quatre ans, nous remarquons que les dates de vendange phénoliques proposées sont précoces par rapport aux dates de vendange technologique. D'où pour la majorité des parcelles du cépage Cabernet Sauvignon, les raisins vendangés présenteront une bonne maturité phénolique.

Domaine	Parcelle	Codex	Dates de Vendange 2008		Dates de Vendange 2009		Dates de Vendange 2010		Dates de Vendange 2011	
			Technologique	Phénolique	Technologique	Phénolique	Technologique	Phénolique	Technologique	Phénolique
MANSOUR A	Cabernet Y. HA. 1995-1	MVCS51	Entre 22-sept et 25-sept	15-sept	Entre 28-sept et 30-sept	14-sept	Entre 23-sept et 25-sept	13-sept	Entre 21-sept et 22-sept	26-sept
MANSOUR A	Cabernet K. CH. 1990	MVCSK0	Entre 15-sept et 17-sept	08-sept	Entre 5-Oct et 7-Oct	14-sept	Entre 7-sept et 8-sept	13-sept	Entre 4-Oct et 5-Oct	26-sept
ITANY	Cabernet 1994-1	ITCS41	Entre 18-sept et 20-sept	15-sept	Entre 13-Oct et 17-Oct	14-sept	Entre 13-sept et 14-sept	13-sept	Entre 13-Oct et 14-Oct	26-sept
ITANY	Cabernet 1994-2	ITCS42	18-sept	08-sept	Entre 14-Oct et 16-Oct	14-sept	Entre 09-sept et 14-sept	13-sept	03-oct	26-sept
ITANY	Cabernet 1995-1	ITCS51	Entre 20-sept et 24-sept	15-sept	Entre 7-Oct et 10-Oct	14-sept	Entre 7-sept et 8-sept	13-sept	Entre 10-Oct et 11-Oct	26-sept
ITANY	Cabernet 1995-2	ITCS52	Entre 19-sept et 23-sept	15-sept	Entre 9-Oct et 14-Oct	14-sept	Entre 8-sept et 9-sept	13-sept	Entre 4-Oct et 15-Oct	26-sept
TANAYEL	Cabernet B6	TACS6	Entre 25-sept et 10-Oct	29-sept	Entre 9-Oct et 10-Oct	14-sept	Entre 6-sept et 8-sept	13-sept	Entre 3-Oct et 10-Oct	26-sept
KANAFAR	Cabernet 1	KACS31	Entre 18-sept et 19-sept	15-sept	12-oct	14-sept	11-sept	13-sept	14-oct	26-sept
KANAFAR	Cabernet 2	KACS32	18-sept	15-sept	13-oct	14-sept	11-sept	13-sept	15-sept	26-sept

Tableau III.4: Les dates des vendange technologique et phénolique de chacune des parcelles du cépage Cabernet Sauvignon sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

3.1.1.5-Classification des parcelles.

Après avoir évalué la corrélation entre les deux méthodes de suivi de maturité phénolique (Glories et ITV), une classification des parcelles du cépage Cabernet Sauvignon a été menée, en essayant de regrouper les parcelles suivant les différentes composantes phénoliques. Pour pouvoir comparer les parcelles du cépage Cabernet Sauvignon, nous avons utilisé deux indicateurs fournis par la méthode ITV : ANT (anthocyanes mg/l) et IPT (Indice phénolique total). Les valeurs de ANT et IPT indiqués dans le tableau III.5 sont les moyennes sur les quatre vendanges (2008, 2009, 2010 et 2011). La dernière ligne du tableau représente les valeurs maximales de ANT et IPT, parce que la meilleure parcelle est celle qui possède les meilleures valeurs de ANT et IPT. Pour pouvoir classifier les parcelles du cépage Cabernet Sauvignon, nous avons aussi utilisé la méthode Glories qui nous a fourni le potentiel total en anthocyanes (Aph1), le potentiel en anthocyanes facilement extractibles (Aph3.2), le pourcentage en anthocyanes facilement extractibles (PAE%) et la maturité des pépins (Mp). Comme nous remarquons dans le tableau III.5, les meilleurs valeurs de Aph1, Aph3.2 et PAE% sont les valeurs maximales. Alors que pour la maturité des pépins, la meilleure valeur est la valeur minimale. Par la suite, pour calculer l'écart entre les valeurs des différentes parcelles et la meilleure valeur, nous avons utilisé la valeur de l'écart moyen ECM. La formule de ECM est :

$$ECM\% = \frac{|Valeur\ parcelle - meilleure\ valeur|}{Meilleure\ valeur} * 100.$$

L'écart des différents indicateurs par rapport aux meilleures valeurs a été calculé respectivement : ECANT% pour ANT, ECIPT% pour IPT, ECAPH1% pour pH1, ECAPH3.2% pour ApH3.2, ECPAE% pour PAE%, ECMp % pour Mp.

	ITV		Glories				ITV		Glories				EQM%
	ANT	IPT	ApH1	ApH3.2	PAE%	Mp	ECANT %	ECIPT %	ECAPH1%	ECAPH3.2%	ECPAE %	ECMp%	
MVCS51	436,8	160,6	1193,4	953,7	79,9	60,7	24,5	34,0	17,2	17,2	14,8	13,9	21,4
MVCSK0	478,3	156,9	1187,9	880,9	74,2	63,5	17,3	35,5	17,6	17,6	21,3	19,1	22,4
ITCS41	504,5	181,1	1325,5	857,0	64,7	59,8	12,7	25,6	8,1	8,1	23,5	12,2	16,6
ITCS42	503,5	191,0	1367,2	922,4	67,5	54,2	12,9	21,5	5,2	5,2	17,6	1,7	12,9
ITCS51	578,1	243,4	1417,1	1119,7	79,0	59,9	0,0	0,0	1,7	1,7	0,0	12,4	5,1
ITCS52	515,5	186,8	1441,6	1004,4	69,7	53,3	10,8	23,3	0,0	0,0	10,3	0,0	11,3
TACS6	486,2	193,1	1357,1	959,9	70,7	65,6	15,9	20,7	5,9	5,9	14,3	23,1	15,7
KACS31	389,8	125,5	1142,1	674,2	59,0	61,7	32,6	48,4	20,8	20,8	39,8	15,8	31,9
KACS32	377,6	148,6	1046,9	768,2	73,4	62,1	34,7	38,9	27,4	27,4	31,4	16,5	30,2
Meilleurs valeurs	578,1	243,4	1441,6	1119,7	79,9	53,3							

Tableau III.5: Les EQM (Ecart Quadratique Moyens) des teneurs moyennes ANT et IPT fournis par la méthode ITV (sur les quatre vendanges) et les teneurs moyennes en ApH1, ApH3.2, PAE% et Mp (fournis par la méthode Glories) sur les quatre vendanges du cépage Cabernet Sauvignon.

En prenant en considération tous les écarts moyens pour pouvoir classier les parcelles, on calculera l'écart quadratique moyen, EQM qui permettra de calculer le carré des écarts.

En effet la formule de EQM est la suivante :

$$EQM = \sqrt{\frac{(ECANT)^2 + (ECIPT)^2 + (ECAPH1)^2 + \dots}{n}} \quad \text{ou} \quad EQM = \sqrt{\frac{1}{n} \sum (x - \bar{X})^2}$$

L'écart quadratique moyen (EQM) permet de prendre en considération les écarts des différentes teneurs pour les différents critères par rapport aux meilleurs valeurs pour pouvoir classier et se décider sur les meilleures parcelles. Donc, par la suite, nous avons classifié les parcelles par la moyenne quadratique de l'écart à la meilleure parcelle.

Les valeurs les plus faibles de EQM montrent un écart très faible entre la parcelle et les meilleurs valeurs. Le tableau III.5 montre que les plus faibles valeurs de EQM sont pour les parcelles ITANY, ITCS41, ITCS42, ITCS51 et ITCS52. D'où, ces parcelles sont classifiées en tant que meilleures parcelles. Pour classier les parcelles d'une autre méthode, nous avons choisi l'indice polyphénolique total (IPT) fournis par la méthode ITV pour estimer la teneur en composés phénoliques. Nous avons également suivi le potentiel total en anthocyanes (ApH1) pour estimer la qualité phénolique par sa teneur en anthocyanes ainsi que la maturité des pépins (Mp) pour évaluer la teneur en tanins des pépins. ApH1 et Mp sont fournis par la méthode Glories. Le tableau III.6 regroupe les valeurs d'IPT, d'ApH1 et de Mp avec

l'évaluation de chacune de ces composantes et le classement en groupe des parcelles du cépage CS.

En examinant les valeurs moyennes d'IPT, d'ApH1 et de Mp des parcelles du cépage CS sur les quatre vendanges, nous remarquons la classification en trois groupes. Le groupe 1 regroupant les parcelles Itany (ITCS41, ITCS42, ITCS51 et ITCS52) et Taanayel (TACS6) ayant des valeurs d'IPT comprises entre 180 et 250, des valeurs d'ApH1 comprises entre 1325 et 1450 mg/L et des valeurs de Mp comprises entre 53 et 65.6. Le groupe 2 comprend les parcelles Mansoura (MVCS51 et MVCK0), ces parcelles ont des valeurs d'IPT comprises entre 150 et 160, des valeurs d'ApH1 comprises entre 1180 et 1200 mg/L et des valeurs de Mp comprises entre 60 et 64. Le groupe 3 comprend les parcelles Kanafar (KACS31 et KACS32) avec des valeurs d'IPT comprises entre 120 et 150, des valeurs d'ApH1 comprises entre 1000 et 1100 mg/L et des valeurs de Mp comprises entre 60 et 63.

	IPT	Groupes	Evaluation de l'IPT	ApH1 (mg/L)	Classe	Evaluation de ApH1	Mp	Classe	Evaluation de Mp
MVCS51	160.6	2	très élevé	1193.4	2	très bonne	60.7	2	élevé
MVCK0	156.9	2	très élevé	1187.9	2	très bonne	63.5	2	élevé
ITCS41	181.1	1	très élevé	1325.5	1	Excellente	59.8	1	bonne
ITCS42	191.0	1	très élevé	1367.2	1	Excellente	54.2	1	bonne
ITCS51	243.4	1	très élevé	1417.1	1	Excellente	59.9	1	bonne
ITCS52	186.8	1	très élevé	1441.6	1	Excellente	53.3	1	bonne
TACS6	193.1	1	très élevé	1357.1	1	Excellente	65.6	1	élevé
KACS31	125.5	3	très élevé	1142.1	3	très bonne	61.7	3	élevé
KACS32	148.6	3	très élevé	1046.9	3	très bonne	62.1	3	élevé

Tableau III.6: Tableau regroupant les valeurs d'IPT, d'ApH1 et de Mp avec l'évaluation de chacune de ces composantes et le classement en groupe des parcelles du cépage CS.

L'évaluation des valeurs d'IPT des différentes parcelles du cépage CS montre que toutes ces parcelles ont un IPT très élevé puisqu'il est supérieur à 22 (Dupuch ,1998). Les valeurs de ApH1 sont entre très bonnes et excellentes en se basant sur l'évaluation de la qualité phénolique globale en fonction de la quantité d'anthocyanes totale en mg/L (Guérin *et al.*, 2005) (Voir Tableau III.7).

IPT	Evaluation de l'IPT	ApH1 (mg/L)	Evaluation de ApH1
>22	Très élevé	Inférieures à 600	Insuffisante
18-22	élevé	De 600 à 800	Moyenne
16-18	moyen	De 800 à 1000	Bonne
14-16	faible	De 1000 à 1200	Très bonne
<14	Très faible	Supérieures à 1200	Excellente

Tableau III.7: Tableau regroupant les normes de l'indice polyphénolique total du CS , la qualité phénolique globale en fonction de la quantité d'anthocyanes totale en mg/L. (Guérin *et al.* ,2005)

La maturité des pépins est la contribution des tanins des pépins au contenu phénolique de la baie. C'est l'indicateur le plus pertinent pour déterminer les conditions de la cuvaison. En effet, les tanins des pépins sont moins qualitatifs que ceux des pellicules ; en conséquence, plus Mp est faible, plus la proportion de tanins provenant des pellicules est forte et plus on peut pousser l'extraction au cours de la macération. Le tableau III.6 montre que la Mp des différentes parcelles est entre bonne et élevée. Dans notre raisonnement, nous avons considéré qu'une valeur dite bonne de la Mp serait comprise entre 50 et 60% et idéale pour les valeurs comprises entre 40 et 50% (Glories, 2001, Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004). En effet, pour élaborer un vin rouge de couleur stable, il vaut mieux avoir une maturité des pépins faible. En effet, il est à présent admis que la formation de combinaisons Tanins-Anthocyanes (T-A), très recherchées pour la stabilisation de la couleur des vins, n'est pas principalement due à ces tanins de pépins, comme on le pense trop souvent, même si ces derniers sont très réactifs. En effet, les tanins pépins ont davantage tendance à se combiner, de part leur très forte réactivité, aux protéines et polysaccharides provenant du matériel végétal et des levures. La formation de complexes tanins pépins-protéines ou tanins pépins-polysaccharides est donc prépondérante par rapport aux combinaisons tanins-anthocyanes. Ceci veut dire que les raisins fortement concentrés en tanins des pépins (maturation phénolique incomplète) conduisent à des vins agressifs et dont la couleur sera très probablement instable. C'est la raison pour laquelle nous recherchons des valeurs de Mp faible pour les raisins.

D'où la classification du cépage Cabernet Sauvignon selon les méthodes ITV et Glories montre que les deux premières classes réunissent principalement les domaines Itany et la parcelle de Taanayel, la deuxième classe englobe le domaine de Mansoura village et la dernière classe réunit les restants de Kanafar.

En effet, les quatre parcelles de Cabernet Sauvignon (ITCS41, ITCS42, ITCS51 et ITCS52) du domaine Itany sont classées premières, ainsi que le pool polyphénolique est une résultante directe des caractéristiques de ce terroir. L'alimentation en eau naturelle du terroir Itany est favorisée par une texture du sol équilibrée et un réservoir hydrique élevé. Ce terroir est doté d'un potentiel de précocité bas, il montre une aptitude à la surmaturité élevée recherchée pour les CS. Cette caractéristique de ce terroir a été confirmée sur les quatre millésimes 2008, 2009, 2010 et 2011 pour le cépage CS. De plus, la parcelle TACS6 appartenant au domaine Taanayel est aussi classée première, vu qu'elle présente un potentiel polyphénolique élevé. Toutefois, la maturité des pépins de cette parcelle est élevée.

3.1.1.6-Comparaison des vendanges :

Pour comparer les différentes vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011, nous présenterons par la suite les cinétiques du suivi des différentes composantes phénoliques. Nous débuterons par la présentation des critères phénoliques fournis par la méthode ITV : les anthocyanes (mg/L) et IPT des meilleures parcelles du cépage CS appartenant au domaine Itany (ITCS41, ITCS42, ITCS51 et ITCS52) sur les quatre vendanges (Figure III.1a & b). Nous avons choisi ces quatre parcelles vu qu'elles ont été classées les meilleures pour le cépage Cabernet Sauvignon.

La figure III.1.a montre que la teneur en anthocyanes (mg/L) augmente, passe par un maximum puis diminue. Cette chute correspond au phénomène de surmaturation. Cette cinétique a été déjà démontrée dans plusieurs études (Canals *et al.*, 2005 ; Bautista-Ortín *et al.*, 2005; De la Hera Orts *et al.*, 2005 ; Somers, 1976). La chute des anthocyanes après le pic peut être due à la combinaison des anthocyanes aux tanins (Jackson, 2008). En fonction des parcelles, nous remarquons que les anthocyanes n'évoluent pas de la même façon, on peut avoir des courbes très plates ou très anguleuses.

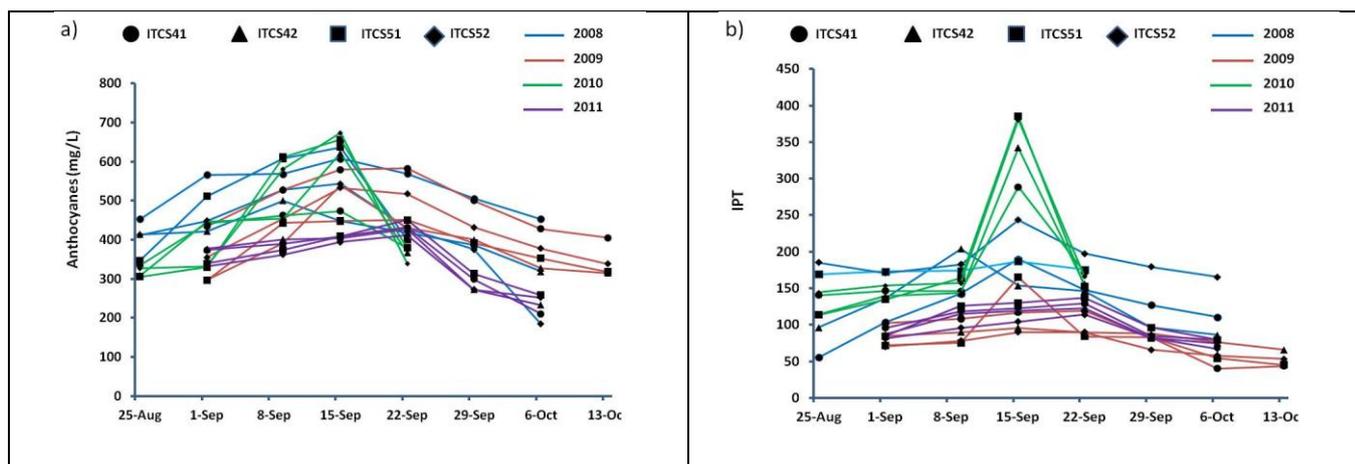


Figure III.1: Figures représentant les cinétiques des anthocyanes (mg/L) (a) et IPT (b) pour les quatre parcelles ITCS41, ITCS42, ITCS51 et ITCS52 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

La figure III.1.a montre que l'évolution des cinétiques des anthocyanes des parcelles de la même vendange est similaire, et le pic est atteint à la même date pour la même vendange. Par contre, nous remarquons que les pics de maximum d'anthocyanes sont décalés pour différentes vendanges, avec les pics des vendanges 2008 et 2010 précoces par rapport au pic d'anthocyanes des vendanges 2009 et 2011. De plus, les teneurs en anthocyanes des parcelles des vendanges 2008 et 2010 sont pour la majorité des parcelles plus élevées que les vendanges 2009 et 2011.

Les cinétiques d'évolution de l'indice polyphénolique total (Figure III.1.b) présente une allure déjà attendue. D'après les travaux de la littérature (Kennedy *et al.*, 2000; 2002), l'IPT augmente au début de la maturation, pour atteindre un pic puis chute. Cette allure a été obtenue pour les quatre parcelles du CS et sur les quatre vendanges. La figure III.1.b montre aussi que les teneurs d'IPT des suivis des vendanges 2008 et 2010 sont plus riches que celles de 2009 et 2011.

Après avoir étudié les cinétiques des critères fournis par la méthode ITV, nous présenterons par la suite, les cinétiques du potentiel total en anthocyanes (ApH1) et du pourcentage en anthocyanes extractibles (PAE%) d'après la méthode Glories (Figure III.2.a & b).

Les cinétiques d'Aph1 (Figure III.2.a) présentent une évolution similaire pour les différentes parcelles caractérisées par une augmentation jusqu'à l'atteinte du pic puis une diminution. Les vendanges 2008 et 2010 présentent de meilleurs teneurs en Aph1 par rapport aux deux autres vendanges. Ce même résultat, quant à la comparaison des vendanges, a été montré pour l'évolution des cinétiques des PAE% des différentes parcelles.

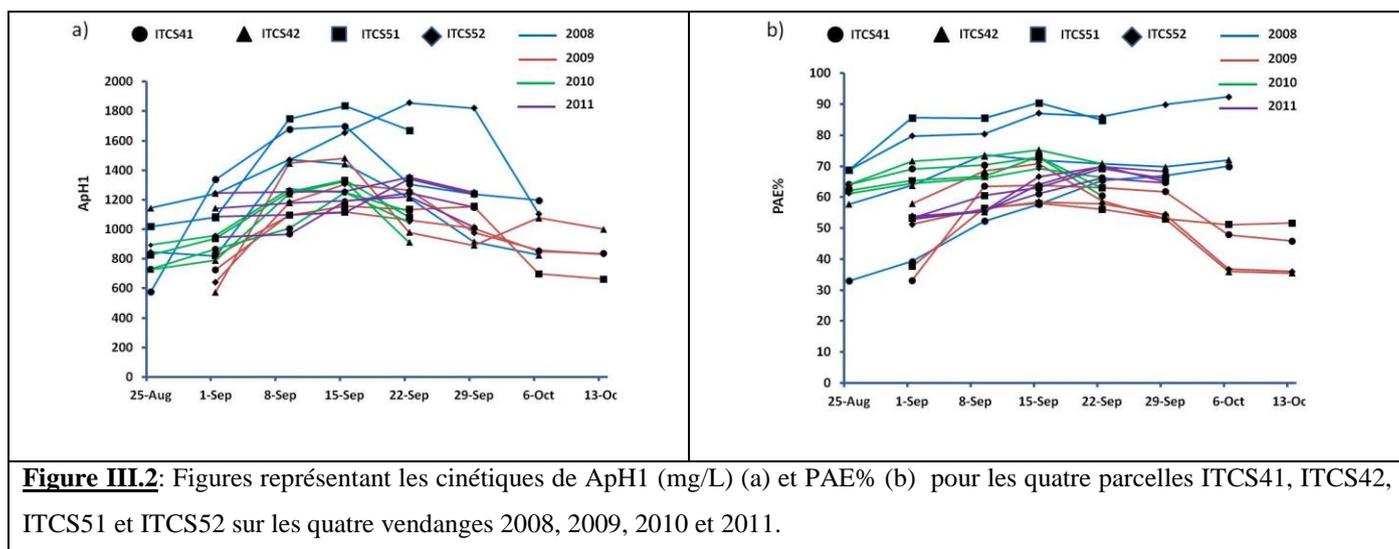


Figure III.2: Figures représentant les cinétiques de Aph1 (mg/L) (a) et PAE% (b) pour les quatre parcelles ITCS41, ITCS42, ITCS51 et ITCS52 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

En outre, Il faut bien noter que l'évolution des anthocyanes est étroitement corrélée avec la qualité des tanins. Le suivi de l'indice de Mp au cours du temps montre une évolution normale pour les différentes parcelles du cépage CS (Fig.III.3). La Mp est élevée au début et décroît graduellement pour atteindre un plateau. De plus, Mp permet de déterminer le rôle joué par les pépins dans le contenu tannique du vin, ce qui constitue une indication très utile pour l'orientation de la vinification du raisin.

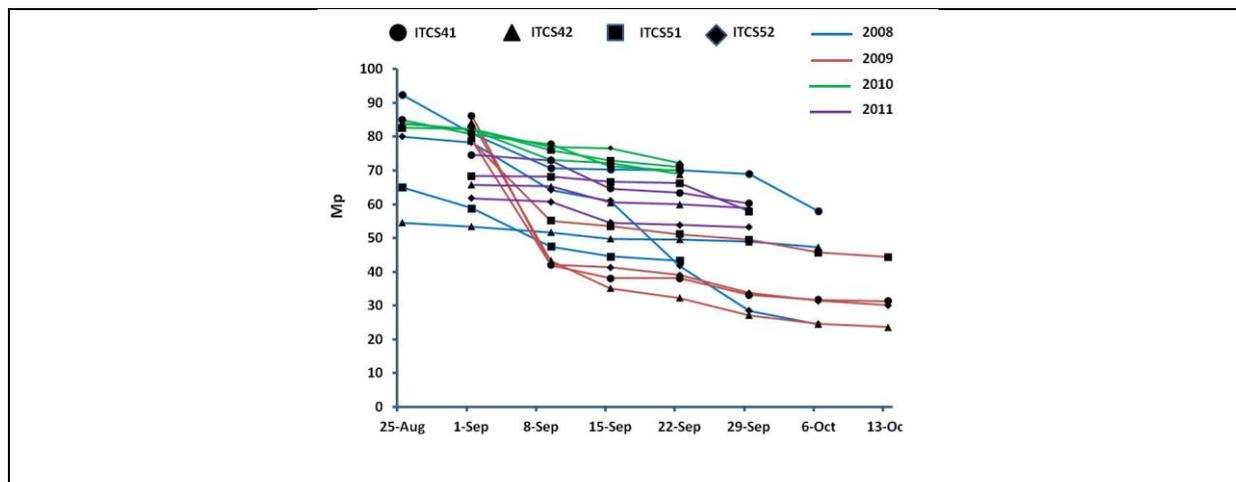


Figure III.3: Figures représentant les cinétiques de Mp pour les quatre parcelles ITCS41, ITCS42, ITCS51 et ITCS52 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

Les cinétiques de Mp montrent que les valeurs les plus faibles de Mp sont atteintes pour les parcelles de la vendange 2009. La vendange 2008 montrant les meilleurs teneurs en ANT (mg/L), IPT, ApH3.2 et PAE%, présentent des valeurs faibles de Mp. Alors, que la vendange 2010 présente des valeurs importantes en Mp. D'où la vendange 2008 est classée la meilleure vue qu'elle présente les meilleurs teneurs en anthocyanes et en composés phénoliques avec des valeurs faibles en Mp. La faiblesse en Mp est un signe de qualité vu que plus Mp est faible, plus la proportion de tanins provenant des pellicules est forte et plus on peut pousser l'extraction au cours de la macération (Guérin *et al.*, 2005). Plus la quantité de tanins extraite des pellicules est forte, plus la couleur est stable vu que les tanins des pellicules sont impliqués dans la formation des complexes, tanins-anthocyanes responsables de la couleur.

3.1.2-Suivi du cépage Merlot :

3.1.2.1-Maturité anthocyanique:

Le suivi de maturation du cépage Merlot a été réalisé sur quatre vendanges (2008, 2009, 2010 et 2011). Le tableau III.8 présente les dates des pics d'anthocyanes (en mg/L) fournis par la méthode ITV et du potentiel en anthocyanes facilement extractibles fournis par la méthode Glories. Pour ce cépage, la date de vendange phénolique proposée correspond au pic d'anthocyanes puisque le Merlot est un cépage qui doit être récolté avec une légère surmaturation (Dupuch, 1998, Anneraud & Vinsonneau , 2009).

Au sein du cépage Merlot, nous constatons une variabilité de la précocité d'une parcelle à une autre durant la vendange 2008. Toutes ne sont pas au même stade au même moment. Alors que pour les trois autres vendanges, les pics d'anthocyanes et d'ApH3.2, sont atteints à la même date. Les mêmes dates de pics ont été proposées pour les deux méthodes de suivi de maturité Glories et ITV. D'où, la forte corrélation entre les deux méthodes concernant la date de pic et la par la suite la date de vendange phénolique proposée.

Domaine	Parcelle	Codex	<u>Pic d'anthocyanes (mg/L)</u>				<u>Pics de Potentiel en anthocyanes facilement extractibles (Aph3.2)</u>			
			<u>(d'après la méthode ITV)</u>				<u>d'après Glories</u>			
			<u>Vendange 2008</u>	<u>Vendange 2009</u>	<u>Vendange 2010</u>	<u>Vendange 2011</u>	<u>Vendange 2008</u>	<u>Vendange 2009</u>	<u>Vendange 2010</u>	<u>Vendange 2011</u>
TAL DNOUB	Merlot 1999-1	TDM91	19-août	01-sept	17-août	06-sept	19-août	01-sept	17-août	06-sept
TAL DNOUB	Merlot 1999-2	TDM92	19-août	01-sept	17-août	06-sept	19-août	01-sept	17-août	06-sept
TAL DNOUB	Merlot 2000-1	TDM001	26-août	01-sept	17-août	06-sept	26-août	01-sept	17-août	06-sept
TAL DNOUB	Merlot 2000-2	TDM002	19-août	01-sept	17-août	06-sept	19-août	01-sept	17-août	06-sept
KANAFAR	Merlot 1	KAM31	19-août	01-sept	17-août	06-sept	19-août	01-sept	17-août	06-sept
KANAFAR	Merlot 3	KAM33	19-août	01-sept	17-août	06-sept	19-août	01-sept	17-août	06-sept

Tableau III.8: Les dates et les teneurs des pics d'anthocyanes (mg/L) et du potentiel en anthocyanes facilement extractibles, de chacune des parcelles du cépage Merlot, détectés respectivement par les méthodes ITV, Glories (1&2).

3.1.2.2-Les pics phénoliques:

Cette même corrélation a été validée pour les dates des pics de l'indice polyphénolique total et la richesse phénolique des différentes parcelles du cépage merlot. Le tableau III.9 montre que les mêmes dates de pics d'anthocyanes et de composés phénoliques ont été obtenues par les deux méthodes (ITV et Glories) pour les différentes parcelles.

Domaine	Parcelle	Codex	<u>Pic d'indice polyphénolique total (mg/L)</u>				<u>Pics de richesse phénolique totale</u>			
			<u>(IPT d'après la méthode ITV)</u>				<u>(RPT d'après Glories)</u>			
			<u>Vendange 2008</u>	<u>Vendange 2009</u>	<u>Vendange 2010</u>	<u>Vendange 2011</u>	<u>Vendange 2008</u>	<u>Vendange 2009</u>	<u>Vendange 2010</u>	<u>Vendange 2011</u>
TAL DNOUB	Merlot 1999-1	TDM91	19-août	01-sept	17-août	06-sept	19-août	01-sept	17-août	06-sept
TAL DNOUB	Merlot 1999-2	TDM92	19-août	01-sept	17-août	06-sept	19-août	01-sept	17-août	06-sept
TAL DNOUB	Merlot 2000-1	TDM001	26-août	01-sept	17-août	06-sept	26-août	01-sept	17-août	06-sept
TAL DNOUB	Merlot 2000-2	TDM002	19-août	01-sept	17-août	06-sept	19-août	01-sept	17-août	06-sept
KANAFAR	Merlot 1	KAM31	19-août	01-sept	17-août	06-sept	19-août	01-sept	17-août	06-sept
KANAFAR	Merlot 3	KAM33	19-août	01-sept	17-août	06-sept	19-août	01-sept	17-août	06-sept

Tableau III.9: Les dates et les teneurs des pics d'indice polyphénolique total et de la richesse phénolique totale, de chacune des parcelles du cépage Merlot, détectés respectivement par les méthodes ITV, Glories (1&2).

Pour toutes les parcelles du cépage Merlot et sur les quatre vendanges, nous remarquons que la date de vendange phénolique proposée est entre le 17 août et le 6 septembre, alors que pour le cépage Cabernet sauvignon, cette période s'étale entre le 13 et le 26 septembre. Donc,

d'après nos résultats on trouve que le Cabernet Sauvignon est plus tardif que le merlot puisque la date de vendange proposée pour toutes les parcelles de ce dernier est durant le mois d'août. Donc, d'après nos résultats, le Merlot mûrit une semaine à une semaine et demie avant le Cabernet Sauvignon, ce qui est conforme avec la littérature (Boidron *et al.*, 1995).

3.1.2.3-Comparaison des dates de vendange phénolique et technologique :

Dans le but de comparer les dates de vendange technologique avec celles phénolique, nous présentons dans le tableau III.10 les dates de vendange technologique et phénolique des différentes parcelles du cépage Merlot sur les quatre millésimes 2008, 2009, 2010 et 2011. Pour les vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011, toutes les parcelles du cépage merlot présentent des dates de vendange phénolique précoces par rapport aux dates de vendange technologique. Ceci implique une élaboration de vin moins apprécié vu que pour le merlot, la vendange phénolique optimale est atteinte lors de l'atteinte du pic d'anthocyanes ou avec une légère surmaturation (Boidron *et al.*, 1995). Un décalage de la vendange d'environ une semaine, vu que la vendange technologique est atteinte environ une semaine après la vendange phénolique aboutira à une chute d'anthocyanes. Pour un cépage Merlot, il vaut mieux que la vendange technologique coïncide avec celle phénolique.

Domaine	Parcelle	Codex	Dates de Vendange 2008		Dates de Vendange 2009		Dates de Vendange 2010		Dates de Vendange 2011	
			Technologique	Phénolique	Technologique	Phénolique	Technologique	Phénolique	Technologique	Phénolique
TALDNOUB	Merlot 1999-1	TDM91	Entre 25-août et 27-août	19-août	Entre 5-sept et 8-sept	01-sept	Entre 21-août et 23-août	17-août	Entre 8-sept et 15-sept	06-sept
TALDNOUB	Merlot 1999-2	TDM92	Entre 25-août et 27-août	19-août	Entre 4-sept et 7-sept	01-sept	23-août	17-août	08-sept	06-sept
TALDNOUB	Merlot 2000-1	TDM001	Entre 26-août et 3-sept	26-août	Entre 9-sept et 17-sept	01-sept	Entre 18-août et 20-août	17-août	Entre 12-sept et 13-sept	06-sept
TALDNOUB	Merlot 2000-2	TDM002	Entre 1-sept et 5-sept	19-août	Entre 8-sept et 14-sept	01-sept	Entre 19-août et 20-août	17-août	Entre 13-sept et 15-sept	06-sept
KANAFAR	Merlot 1	KAM31	Entre 4-sept et 8-sept	19-août	Entre 15-sept et 25-sept	01-sept	Entre 25-août et 26-août	17-août	Entre 19-sept et 20-sept	06-sept
KANAFAR	Merlot 3	KAM33	Entre 2-sept et 3-sept	19-août	Entre 14-sept et 15-sept	01-sept	25-août	17-août	Entre 20-sept et 21-sept	06-sept

Tableau III.10: Les dates des vendange technologique et phénolique de chacune des parcelles du cépage Merlot sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

3.1.2.4-Classification des parcelles.

Après avoir évalué la corrélation entre les deux méthodes de suivi de maturité phénolique (Glories et ITV), une classification des parcelles du cépage Merlot a été menée, en essayant de regrouper les parcelles suivant les différentes composantes phénoliques.

Pour pouvoir comparer les parcelles du cépage Merlot, nous avons utilisé deux indicateurs fournis par la méthode ITV : ANT (anthocyanes mg/l) et IPT (Indice phénolique total). Les valeurs de ANT et IPT indiqués dans le tableau III.11 sont les moyennes sur les quatre vendanges. La dernière ligne du tableau représente les valeurs maximales de ANT et IPT, parce que la meilleure parcelle est celle qui possède les meilleures valeurs de ANT et IPT. Pour pouvoir classier les parcelles du cépage Merlot, nous avons aussi utilisé la méthode Glories qui nous a fourni le potentiel total en anthocyanes (ApH1), le potentiel en anthocyanes facilement extractibles (ApH3.2), le pourcentage en anthocyanes facilement extractibles (PAE%), et la maturité des pépins (Mp). Comme nous remarquons dans le tableau III.11, les meilleurs valeurs de ApH1, ApH3.2 et PAE% sont les valeurs maximales. Alors que pour la maturité des pépins, la meilleure valeur est la valeur minimale. Par la suite, pour calculer l'écart entre les valeurs des différentes parcelles et la meilleure valeur, nous avons utilisé la valeur ECM. Puis, nous avons classifié les parcelles par la moyenne quadratique de l'écart à la meilleure parcelle.

Les valeurs les plus faibles de EQM montrent un écart très faible entre la parcelle et les meilleurs valeurs. Le tableau III.11 montre que la valeur la plus faible de EQM est de 8.3 pour la parcelle TDM002. D'où, cette parcelle est classifiée en tant que meilleure parcelle du cépage Merlot.

	ITV		Glories				ITV		Glories				EQM%
	ANT	IPT	ApH1	ApH3.2	PAE%	Mp	ECANT %	ECIPT %	ECApH1%	ECApH3.2%	ECPAE %	ECMp%	
TDM91	470,6	145,0	1105,1	794,4	71,9	67,0	15,1	14,8	11,3	12,8	21,1	0,7	14,1
TDM92	452,6	132,4	1133,1	678,5	59,9	73,1	18,3	22,2	9,0	25,5	34,3	9,8	21,7
TDM001	434,9	132,9	1057,9	809,1	76,5	66,6	21,5	21,9	15,1	11,2	16,1	0,0	16,1
TDM002	554,1	170,3	1245,8	906,3	72,7	68,5	0,0	0,0	0,0	0,5	20,2	2,9	8,3
KAM31	396,1	111,9	955,9	617,5	64,6	67,1	28,5	34,3	23,3	32,2	29,1	0,9	27,1
KAM33	432,7	128,2	999,3	910,9	91,2	66,7	21,9	24,7	19,8	0,0	0,0	0,2	15,7
Meilleurs valeurs	554,1	170,3	1245,8	910,9	91,2	66,6							

Tableau III.11: Les EQM (Ecart Quadratique Moyens) des teneurs moyennes ANT et IPT fournis par la méthode ITV (sur les quatre vendanges) et les teneurs moyennes en ApH1, ApH3.2, PAE% et Mp (fournis par la méthode Glories) sur les quatre vendanges du cépage Merlot.

Pour classer les parcelles d'une autre méthode, nous avons choisi l'indice polyphénolique total (IPT) fournis par la méthode ITV pour estimer la teneur en composés phénoliques. Nous avons également suivi le potentiel total en anthocyanes (ApH1) pour estimer la qualité phénolique par sa teneur en anthocyanes ainsi que la maturité des pépins (Mp) pour évaluer la teneur en tanins des pépins. ApH1 et Mp sont fournis par la méthode Glories. Le tableau III.12 regroupe les valeurs d'IPT, d'ApH1 et de Mp avec l'évaluation de chacune de ces composantes et le classement en groupe des parcelles du cépage Merlot.

Echantillon	IPT	Classe	Evaluation de l'IPT	ApH1 (mg/L)	Classe	Evaluation de ApH1	Mp	Classe	Evaluation de Mp
TDM91	145.0	2	très élevé	1105.1	2	Très bonne	67.0	2	Insuffisante
TDM92	132.4	2	très élevé	1133.1	2	Bonne	73.1	2	Insuffisante
TDM001	132.9	2	très élevé	1057.9	2	Très bonne	66.6	1	Insuffisante
TDM002	170.3	1	très élevé	1245.8	1	Très bonne	68.5	1	Insuffisante
KAM31	111.9	3	très élevé	955.9	3	Bonne	67.1	1	Insuffisante
KAM33	128.2	3	très élevé	999.3	3	Très bonne	66.7	1	Insuffisante

Tableau III.12: Tableau regroupant les valeurs d'IPT, d'ApH1, de Mp avec l'évaluation de chacune de ces composantes et le classement en groupe des parcelles du cépage Merlot.

En examinant les valeurs moyennes d'IPT, d'ApH1 et de Mp des parcelles du cépage Merlot sur les quatre vendanges, nous remarquons la classification en trois groupes. Le groupe 1 regroupant TDM002 appartenant à la parcelle Tal Dnoub ayant une valeur d'IPT de 170.3, des valeurs d'ApH1 de 1245.8 présentent les meilleures valeurs. Le groupe 2 comprend les parcelles Tal Dnoub (TDM91, TDM92 et TDM001), ces parcelles ont des valeurs d'IPT comprises entre 130 et 150, des valeurs d'ApH1 comprises entre 1110 et 1150 mg/L. Le groupe 3 comprend les parcelles Kanafar (KAM31 et KAM33) avec des valeurs d'IPT comprises entre 100 et 130, des valeurs d'ApH1 comprises entre 900 et 1000 mg/L. Les valeurs de Mp sont insuffisantes pour toutes les parcelles. Une valeur insuffisante de Mp veut dire que les valeurs de Mp sont élevées et donc plus de tanins de pépins et moins de tanins de pellicules. En fait, Mp représente le pourcentage de la contribution des tanins de pépins au contenu phénolique total du raisin. Il est donc directement lié à la quantité de tanins dans les pépins, considérés comme astringents. Or les tanins de pépins ont la particularité de se polymériser au fur et à mesure de la maturation, devenant ainsi plus souples et moins agressifs, étant donné que la polymérisation diminue leur réactivité avec les protéines

salivaires à l'origine de la notion d'astringence de ces molécules. Il faut également souligner que, si ces molécules sont elles aussi biosynthétisées, leur extractibilité est, contrairement aux anthocyanes, uniquement mécanique. En effet, aucune dégradation de la cuticule ou de l'épiderme du péricarpe, susceptible de favoriser l'extraction des tanins situés dans les enveloppes externe et interne n'a été observée au cours de la maturation du raisin. Le pourcentage de tanins provenant des pépins est donc exclusivement lié au terroir (essentiellement aux conditions climatiques et pédologiques) favorisant ou pas la biosynthèse de ces molécules. Les faibles valeurs de Mp sont liées essentiellement aux conditions climatiques. Leur extractibilité est elle fonction du mode de vinification utilisé. En effet, l'extraction des pépins et donc l'obtention du "corps du vin" sont, pour partie, dus aux remontages plus intenses en fin de fermentation alcoolique, permettant la solubilisation des tanins les moins polymérisés "tanins extractibles"; une température assez élevée (de l'ordre de 30°C) est susceptible de modifier leur structure (en favorisant les réactions de polymérisation) et d'assouplir ainsi leurs caractères organoleptiques (deviennent moins astringents) (Saint-Cricq., 1998).

La maturité phénolique des pépins (Mp) conditionne la quantité de tanins dans le vin résultant. Les tanins de pellicules, qui sont gras, charnus et souples mais parfois végétaux, sont extraits avec les anthocyanes pendant la cuvaison. Alors que les tanins de pépins, indispensable à la structure du vin mais présentant une dureté organoleptique, sont extraits surtout en fin de fermentation alcoolique. Les valeurs de Mp sont insuffisantes parcequ'elles sont élevées. D'où, moins de tanins de pellicules extraits, par la suite moins de stabilité de la couleur. La comparaison des différentes parcelles du cépage sur les quatre vendanges montre que TDM002 présente les meilleurs teneurs phénoliques et anthocyaniques.

3.1.2.5-Comparaison des différents millésimes :

Pour comparer les différents millésimes 2008, 2009, 2010 et 2011, nous présenterons par la suite les cinétiques du suivi des différentes composantes phénoliques. Nous débuterons par la présentation des critères phénoliques fournis par la méthode ITV (IPT et anthocyanes) de TDM002, appartenant au domaine Tal Dnoub sur les quatre vendanges, vu que c'est la parcelle la mieux classée parmi les parcelles du cépage Merlot (Figure III.4.a & b) .

La cinétique des anthocyanes (mg/L) et de l'IPT montre une tendance similaire sur les quatre vendanges, caractérisée par une augmentation pour l'atteinte du pic puis une chute. De plus,

nous remarquons que les pics de maximum d'anthocyanes et de composés phénoliques sont décalés pour différentes vendanges, avec les pics des vendanges 2008 et 2010 précoces par rapport au pic d'anthocyanes des vendanges 2009 et 2011. De plus, la teneur en anthocyanes et en composés phénoliques des vendanges 2008 et 2010 sont plus élevées que les vendanges 2009 et 2011.

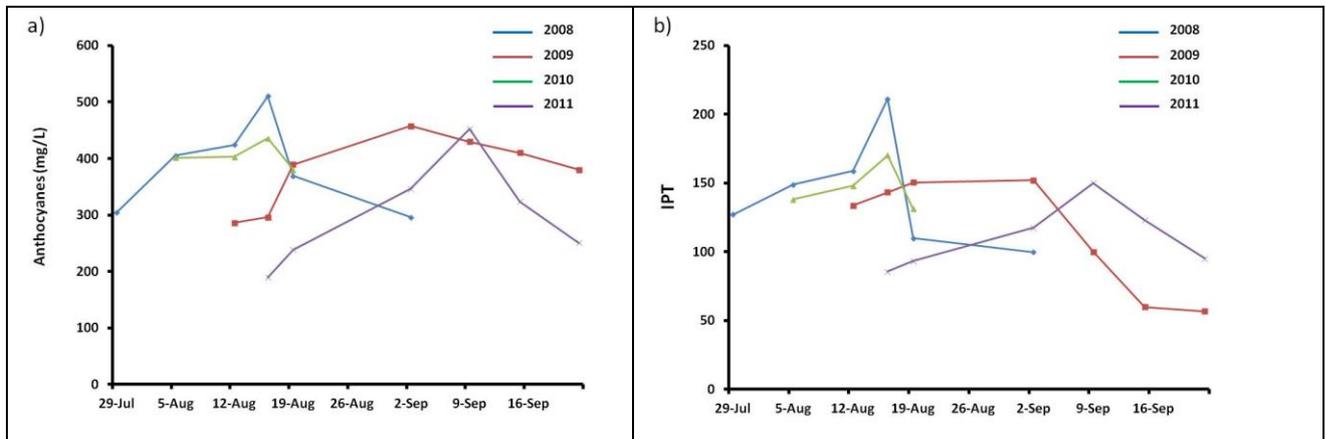


Figure III.4: Figures représentant les cinétiques des anthocyanes (mg/L) (a) et IPT (b) pour la parcelle TDM002 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

Après avoir étudié les cinétiques des critères fournis par la méthode ITV, nous présenterons par la suite, les cinétiques de ApH1 et du pourcentage en anthocyanes extractibles d'après la méthode Glories (Figure III.5.a & b).

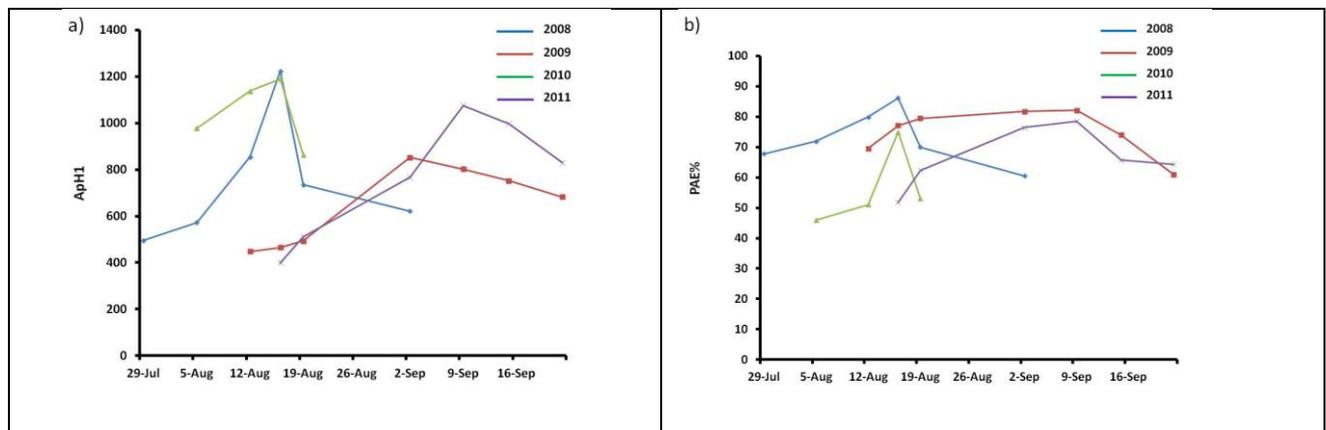


Figure III.5: Figures représentant les cinétiques de ApH1 (mg/L) (a) et PAE% (b) pour la parcelle TDM002 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

Les cinétiques d'ApH1 (Figure III.5.a) présentent une évolution similaire pour les différentes parcelles. Les vendanges 2008 et 2010 présentent de meilleurs teneurs en ApH1 par rapport aux deux autres vendanges. De plus, les pics de ApH1 (Figure III.5.a) et de PAE% (Figure III.5.b) sont précoces par rapport aux pics des vendanges 2009 et 2011. Le pourcentage d'anthocyanes extractibles est le plus élevé pour la vendange 2008, suivi par la vendange 2009.

En outre, le suivi de la Mp au cours du temps montre une évolution normale pour la parcelle TDM002 du cépage Merlot (Fig.III.6). La Mp est élevée au début et décroît graduellement pour atteindre un plateau. La valeur la plus faible de Mp est atteinte pour la vendange 2009.

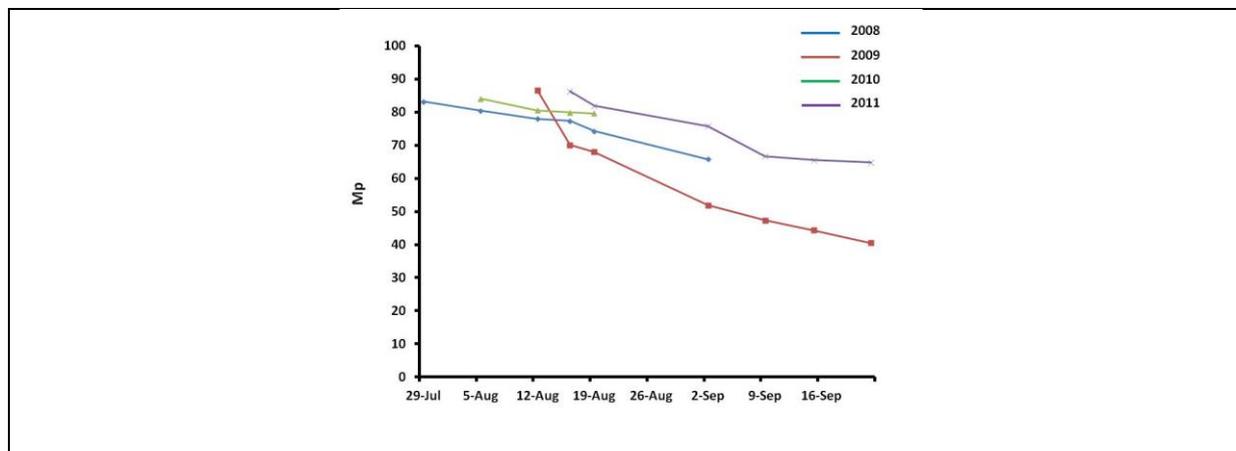


Figure III.6: Figures représentant les cinétiques de Mp pour la parcelle TDM002 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

L'ensemble des comparaisons des quatre vendanges au niveau de la parcelle TDM002 prouve que la vendange 2008 est la meilleure avec les teneurs en anthocyanes, IPT, ApH1 et PAE% les plus élevées.

3.1.3-Suivi du cépage Cabernet Franc :

3.1.3.1-Maturité anthocyanique:

Le suivi de maturation du cépage Cabernet Franc a été réalisé sur quatre vendanges (2008, 2009, 2010 et 2011). Le tableau III.13 présente les dates des pics d'anthocyanes (en mg/L) fournis par la méthode ITV et du potentiel en anthocyanes facilement extractibles (ApH3.2) fournis par la méthode Glories. Pour le cépage Cabernet Franc, la date de vendange phénolique proposée se situe 3 à 4 jours après le pic d'anthocyanes (Dupuch, 1998, Boidron *et al.*, 1995).

Les mêmes résultats obtenus sur Cabernet Sauvignon et Merlot en faveur de la forte corrélation entre les dates de pics d'anthocyanes (fournis par ITV) et de ApH3.2 (fournis par Glories) ont été validés pour le cépage Cabernet Franc (Voir Tableau III.13).

Domaine	Parcelle	Codex	Pic d'anthocyanes (mg/L)				Pics de Potentiel en anthocyanes facilement extractibles (ApH3.2)			
			(d'après la méthode ITV)				d'après Glories			
			Vendange 2008	Vendange 2009	Vendange 2010	Vendange 2011	Vendange 2008	Vendange 2009	Vendange 2010	Vendange 2011
TALDNOUB	Cabernet Franc 1999-1	TDC91	17-sept	16-sept	15-sept	21-sept	17-sept	16-sept	15-sept	21-sept
TALDNOUB	Cabernet Franc 1999-2	TDC92	17-sept	16-sept	15-sept	21-sept	17-sept	16-sept	15-sept	21-sept
TALDNOUB	Cabernet Franc 2001-1	TDCF001	03-sept	16-sept	15-sept	21-sept	03-sept	16-sept	15-sept	21-sept
TALDNOUB	Cabernet Franc 2001-2	TDCF012	10-sept	16-sept	15-sept	21-sept	10-sept	16-sept	15-sept	21-sept
ITANY	Cabernet Franc 1994	ITCF4	10-sept	16-sept	15-sept	21-sept	10-sept	16-sept	15-sept	21-sept
ITANY	Cabernet Franc 1999-1	ITC91	03-sept	16-sept	15-sept	21-sept	03-sept	16-sept	15-sept	21-sept

Tableau III.13: Les dates et les teneurs des pics d'anthocyanes (mg/L) et du potentiel en anthocyanes facilement extractibles, de chacune des parcelles du cépage Cabernet Franc, détectés respectivement par les méthodes ITV, Glories (1&2).

3.1.3.2-Les pics phénoliques:

La corrélation entre les dates de pics d'ANT (mg/L) et IPT fournis par ITV d'une part, de ApH3.2 et de RPT fournis par Glories d'autre part et entre les pics d'anthocyanes et de composés phénoliques par les deux méthodes a été démontrée dans les tableaux III.13 et III.14.

Domaine	Parcelle	Codex	Pic d'indice polyphénolique total (mg/L)				Pics de richesse phénolique totale			
			(IPT d'après la méthode ITV)				(RPT) d'après Glories			
			Vendange 2008	Vendange 2009	Vendange 2010	Vendange 2011	Vendange 2008	Vendange 2009	Vendange 2010	Vendange 2011
TALDNOUB	Cabernet Franc 1999-1	TDC91	17-sept	16-sept	15-sept	21-sept	17-sept	16-sept	15-sept	21-sept
TALDNOUB	Cabernet Franc 1999-2	TDC92	17-sept	16-sept	15-sept	21-sept	17-sept	16-sept	15-sept	21-sept
TALDNOUB	Cabernet Franc 2001-1	TDCF001	03-sept	16-sept	15-sept	21-sept	03-sept	16-sept	15-sept	21-sept
TALDNOUB	Cabernet Franc 2001-2	TDCF012	10-sept	16-sept	15-sept	21-sept	10-sept	16-sept	15-sept	21-sept
ITANY	Cabernet Franc 1994	ITCF4	10-sept	16-sept	15-sept	21-sept	10-sept	16-sept	15-sept	21-sept
ITANY	Cabernet Franc 1999-1	ITC91	03-sept	16-sept	15-sept	21-sept	03-sept	16-sept	15-sept	21-sept

Tableau III.14: Les dates et les teneurs des pics d'indice polyphénolique total et de la richesse phénolique, de chacune des parcelles du cépage Cabernet Franc, détectés respectivement par les méthodes ITV, Glories (1&2).

Donc, d'après nos résultats on trouve que le Cabernet Franc est plus tardif que le Merlot et plus précoce que le Cabernet Sauvignon. Il mûrit 8 à 10 jours plus tôt que le Cabernet

Sauvignon, puisque les dates de pics fournis pour toutes les parcelles du cépage Cabernet Franc sont entre le 3 et le 21 septembre. Alors que les dates de pics phénoliques pour toutes les parcelles du cépage Cabernet Sauvignon sont entre le 13 et le 26 septembre. Ce qui est conforme avec la littérature (Dupuch, 1998; Boidron *et al.*, 1995).

3.1.3.3-Comparaison des dates de vendange phénolique et technologique :

Dans le but de comparer les dates de vendange technologique avec celles phénolique, nous présentons dans le tableau III.15 les dates de vendange technologique et phénolique des différentes parcelles du cépage Cabernet Franc sur les quatres millésimes 2008, 2009, 2010 et 2011. Pour les vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011, toutes les parcelles du cépage Cabernet Franc présentent des dates de vendange phénolique précoces par rapport aux dates de vendange technologique. Ceci implique une bonne maturité phénolique de ces parcelles vu qu'ils auront atteint une pleine maturité phénolique avant d'être vendanger. En effet, la date de vendange technologique est tardive une semaine par rapport à la phénolique. Vu que le cépage Cabernet Franc est un cépage qui doit être récolté à une légère surmaturation (3 à 4 jours après le pic d'anthocyanes). Alors, nous pouvons dire que les parcelles du cépage CF ont été vendangés majoritairement à une date optimale

Domaine	Parcelle	Codex	Dates de Vendange 2008		Dates de Vendange 2009		Dates de Vendange 2010		Dates de Vendange 2011	
			Technologique	Phénolique	Technologique	Phénolique	Technologique	Phénolique	Technologique	Phénolique
TAL DNOUB	Cabernet Franc 1999-1	TDC91	Entre 19-sept et 25-sept	17-sept	Entre 5-oct et 7-oct	16-sept	Entre 31-août et 2-sept	15-sept	Entre 4-oct et 6-oct	21-sept
TAL DNOUB	Cabernet Franc 1999-2	TDC92	Entre 17-sept et 19-sept	17-sept	Entre 7-oct et 10-oct	16-sept	Entre 31-août et 4-sept	15-sept	Entre 3-oct et 7-oct	21-sept
TAL DNOUB	Cabernet Franc 2001-1	TDCF001	Entre 3-sept et 15-sept	03-sept	Entre 10-oct et 15-oct	16-sept	Entre 31-août et 6-sept	15-sept	Entre 7-oct et 11-oct	21-sept
TAL DNOUB	Cabernet Franc 2001-2	TDCF012	Entre 22-sept et 24-sept	10-sept	Entre 15-oct et 17-oct	16-sept	Entre 6-sept et 23-sept	15-sept	Entre 8-oct et 13-oct	21-sept
ITANY	Cabernet Franc 1994	ITCF4	Entre 11-sept et 12-sept	10-sept	Entre 2-oct et 6-oct	16-sept	Entre 1-sept et 3-sept	15-sept	Entre 21-sept et 7-oct	21-sept
ITANY	Cabernet Franc 1999-1	ITC91	Entre 8-sept et 10-sept	03-sept	Entre 1-oct et 6-oct	16-sept	Entre 6-sept et 7-sept	15-sept	Entre 25-sept et 27-sept	21-sept

Tableau III.15: Les dates des vendange technologique et phénolique de chacune des parcelles du cépage Cabernet Franc sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

3.1.3.4-Classification des parcelles.

Après avoir évalué la corrélation entre les deux méthodes de suivi de maturité phénolique (Glories et ITV), une classification des parcelles du cépage CF a été menée, en essayant de regrouper les parcelles suivant les différentes composantes phénoliques.

Pour pouvoir comparer les parcelles du cépage Cabernet Franc, nous avons utilisé des indicateurs fournis par la méthode ITV et Glories. Les valeurs de ces indicateurs sont indiqués dans le tableau III.16, ce sont les valeurs moyennes sur les quatre vendanges. Nous avons classifié les parcelles par la moyenne quadratique de l'écart à la meilleure parcelle.

Les valeurs les plus faibles de EQM montrent un écart très faible entre la parcelle et les meilleurs valeurs. Le tableau III.16 montre que la valeur la plus faible de EQM est de 11.1 pour la parcelle ITCF4. D'où, cette parcelle est classifiée en tant que meilleure parcelle du cépage Cabernet Franc.

	ITV		Glories				ITV		Glories				EQM%
	ANT	IPT	ApH1	ApH3.2	PAE%	Mp	ECANT %	ECIPT %	ECApH1%	ECApH3.2%	ECPAE %	ECMp%	
TDC91	471,6	183,1	1143,6	815,6	71,3	64,2	16,9	6,9	24,0	17,4	21,0	5,4	16,7
TDC92	386,8	177,3	994,0	731,0	73,5	67,8	31,9	9,9	33,9	25,9	18,5	11,3	23,8
TDCF001	474,7	185,4	1015,4	710,0	69,9	63,5	16,4	5,7	32,5	28,1	22,5	4,1	21,1
TDCF012	358,4	179,0	991,1	607,6	61,3	69,0	36,9	9,0	34,1	38,4	32,0	13,2	29,7
ITCF4	567,7	196,7	1504,6	987,0	65,6	60,9	0,0	0,0	0,0	0,0	27,3	0,0	11,1
ITC91	447,2	179,2	961,5	867,5	90,2	66,6	21,2	8,9	36,1	12,1	0,0	9,2	18,5
Meilleurs valeurs	567,7	196,7	1504,6	987,0	90,2	60,9							

Tableau III.16: Les EQM (Ecart Quadratique Moyens) des teneurs moyennes ANT et IPT fournis par la méthode ITV (sur les quatre vendanges) et les teneurs moyennes en ApH1, ApH3.2, PAE% et Mp (fournis par la méthode Glories) sur les quatre vendanges du cépage Cabernet Franc.

Pour classier les parcelles d'une autre méthode, nous avons choisi l'indice polyphénolique total (IPT) fournis par la méthode ITV pour estimer la teneur en composés phénoliques. Nous avons également suivi le potentiel total en anthocyanes (ApH1) pour estimer la qualité phénolique par sa teneur en anthocyanes ainsi que la maturité des pépins (Mp) pour évaluer la teneur en tanins des pépins. ApH1 et Mp sont fournis par la méthode Glories. Le tableau III.17 regroupe les valeurs d'IPT, d'ApH1 et de Mp avec l'évaluation de chacune de ces composantes et le classement en groupe des parcelles du cépage CF.

Echantillon	IPT	Classe	Evaluation de l'IPT	ApH1 (mg/L)	Classe	Evaluation de ApH1	Mp	Classe	Evaluation de Mp
TDCF91	183.1	2	très élevé	1143.6	2	Très bonne	64.2	2	Insuffisante
TDCF92	177.3	3	très élevé	994.0	3	Bonne	67.8	3	Insuffisante
TDCF011	185.4	2	très élevé	1015.4	2	Très bonne	63.5	2	Insuffisante
TDCF012	179.0	3	très élevé	991.1	3	Bonne	69.0	3	Insuffisante
ITCF4	196.7	1	très élevé	1504.6	1	Excellente	60.9	1	Insuffisante
ITCF91	179.2	3	très élevé	961.5	3	Bonne	66.6	3	Insuffisante

Tableau III.17: Tableau regroupant les valeurs d'IPT, d'ApH1, de Mp avec l'évaluation de chacune de ces composantes et le classement en groupe des parcelles du cépage CF.

En examinant les valeurs moyennes d'IPT, d'ApH1 et de Mp des parcelles du cépage CF sur les quatre vendanges, nous remarquons la classification en trois groupes. Le groupe 1 regroupant la parcelle ITCF4 appartenant à la parcelle Itany ayant une valeur d'IPT de 196.7, des valeurs d'ApH1 de 1504.6 présentent les meilleures valeurs et la plus faible valeur de Mp 60.9. Le groupe 2 comprend les parcelles Tal Dnoub (TDCF91 et TDCF011), ces parcelles ont des valeurs d'IPT comprises entre 180 et 190, des valeurs d'ApH1 comprises entre 1000 et 1200 mg/L. Le groupe 3 comprend les parcelles Tal Dnoub (TDCF92 et TDCF012) et la parcelle Itany (ITCF91) avec des valeurs d'IPT comprises entre 170 et 180, des valeurs d'ApH1 comprises entre 900 et 1000 mg/L. Les valeurs de Mp sont insuffisantes pour toutes les parcelles. La comparaison des différentes parcelles du cépage sur les quatre vendanges montre que ITCF4 présente les meilleurs teneurs phénoliques et anthocyaniques avec la plus faible teneur en Mp.

3.1.3.5-Comparaison des vendanges :

Pour comparer les différentes vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011, nous présenterons par la suite les cinétiques du suivi des différentes composantes phénoliques. Nous débuterons par la présentation des critères phénoliques fournis par la méthode ITV (IPT et anthocyanes) de ITCF4, appartenant au domaine Itany sur les quatre vendanges, vu que c'est la parcelle classée meilleure parmi par les parcelles du cépage Cabernet Franc (Figure III.7.a & b).

La comparaison des cinétiques des anthocyanes (mg/L) et de l'IPT montre que la vendange 2008 présente les meilleures valeurs par rapport à la teneur en anthocyanes tandis que la vendange 2010 présente la meilleure valeur par rapport à la teneur en composés phénoliques.

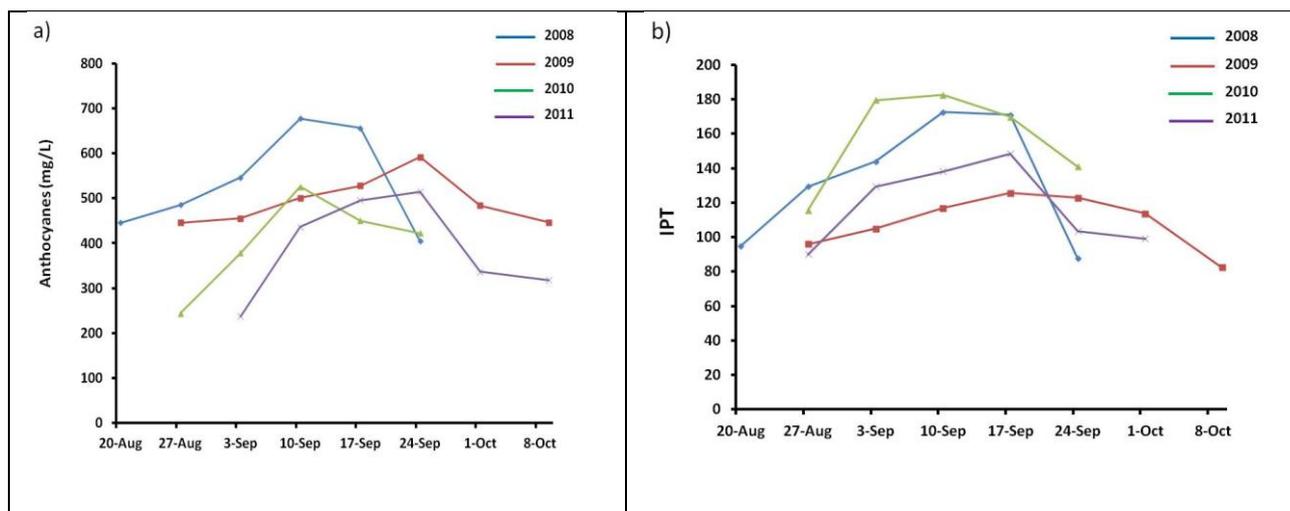


Figure III.7: Figures représentant les cinétiques des anthocyanes (mg/L) (a) et IPT (b) pour la parcelle ITCF4 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

Après avoir étudié les cinétiques des critères fournis par la méthode ITV, nous présenterons par la suite, les cinétiques de ApH1, et du pourcentage en anthocyanes extractibles d'après la méthode Glories (Figure III.8.a & b).

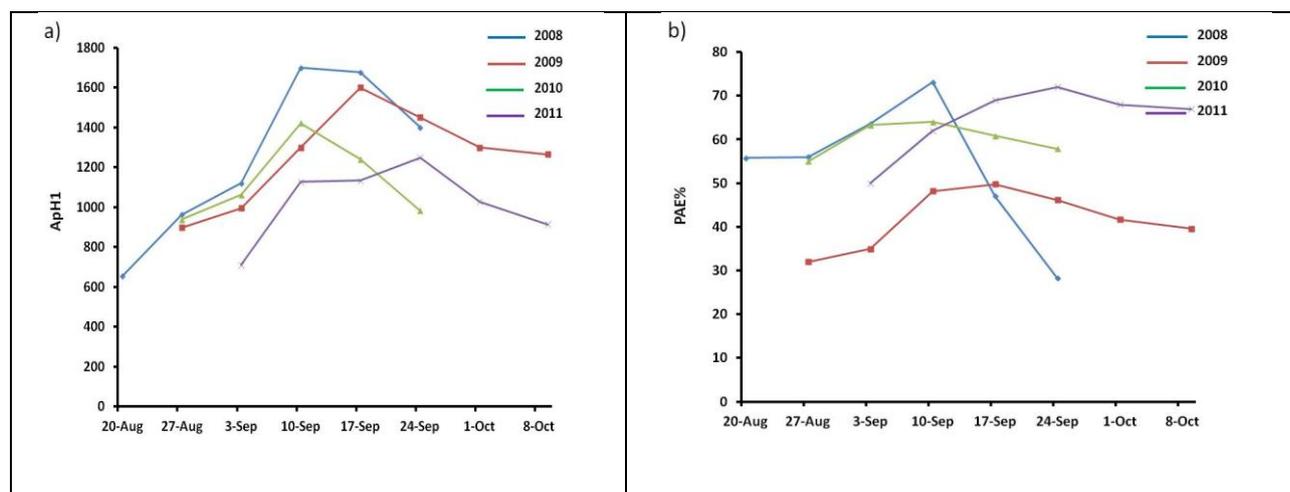


Figure III.8: Figures représentant les cinétiques de ApH1 (mg/L) (a) et PAE% (b) pour la parcelle ITCF4 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

La comparaison des cinétiques d'ApH1 et de PAE% de ITCF4 sur les quatre vendanges montre que la vendange 2008 présente les meilleurs valeurs. De plus, les pics de ApH1 et de PAE% des vendanges 2008 et 2010 sont précoces par rapport aux les pics des deux autres vendanges.

Le suivi de la Mp (Figure III.9) montre une tendance similaire des quatre vendanges avec les valeurs les plus faibles pour la vendange 2009 mais pas trop d'écart entre les trois autres vendanges.

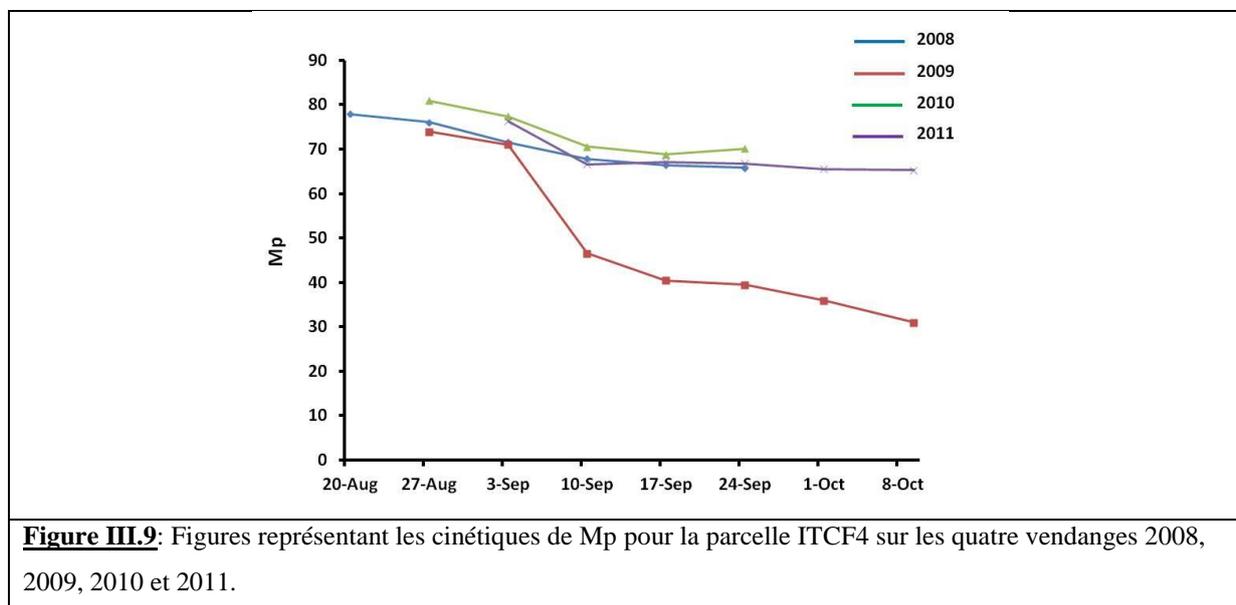


Figure III.9: Figures représentant les cinétiques de Mp pour la parcelle ITCF4 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

L'ensemble des comparaisons des quatre vendanges au niveau de la parcelle ITCF4 prouve que la vendange 2008 est la meilleure avec les meilleurs teneurs en anthocyanes, IPT, ApH3.2, PAE% et Mp.

3.1.4-Suivi du cépage Syrah :

3.1.4.1-Maturité anthocyanique:

Le suivi de maturation du cépage Syrah est réalisé sur quatre vendanges (2008,2009, 2010 et 2011). Le tableau III.18 présente les pics d'anthocyanes fournis suite à l'application des deux méthodes pour l'étude de la maturité phénolique.

Pour la Syrah, la date de vendange phénolique proposée correspond au pic d'anthocyanes puisque la Syrah est un cépage qui perd son caractère s'il n'est pas vendangé immédiatement. Le tableau III.18 prouve de même la forte corrélation entre les dates de pics d'anthocyanes fournis par les méthodes Glories et ITV.

Domaine	Parcelle	Codex	Pic d'anthocyanes (mg/L)				Pics de Potentiel en anthocyanes facilement extractibles (A _{pH3.2})			
			(d'après la méthode ITV)				d'après Glories			
			Vendange 2008	Vendange 2009	Vendange 2010	Vendange 2011	Vendange 2008	Vendange 2009	Vendange 2010	Vendange 2011
KANAFAR	Syrah 3	KAS33	28-août	03-sept	26-août	08-sept	28-août	03-sept	26-août	08-sept
KANAFAR	Syrah 2	KAS32	04-sept	03-sept	26-août	08-sept	04-sept	03-sept	26-août	08-sept
ITANY	Syrah 1999	ITS9	11-sept	03-sept	26-août	08-sept	11-sept	03-sept	26-août	08-sept
ITANY	Syrah 1994	ITS4	04-sept	03-sept	26-août	08-sept	04-sept	03-sept	26-août	08-sept
TAL DNOUB	Syrah 2000-1	TDS001	11-sept	03-sept	26-août	08-sept	11-sept	03-sept	26-août	08-sept
TAL DNOUB	Syrah 2000-2	TDS002	28-août	03-sept	26-août	08-sept	28-août	03-sept	26-août	08-sept

Tableau III.18: Les dates et les teneurs des pics d'anthocyanes (mg/L) et du potentiel en anthocyanes facilement extractibles, de chacune des parcelles du cépage Syrah, détectés respectivement par les méthodes ITV, Glories (1&2).

3.1.4.2-Les pics phénoliques:

Le tableau III.19 valide la corrélation entre les méthodes Glories et ITV quant à la composition phénolique.

Domaine	Parcelle	Codex	Pic d'indice polyphénolique total (mg/L)				Pics de richesse phénolique totale			
			(IPT d'après la méthode ITV)				(RPT) d'après Glories			
			Vendange 2008	Vendange 2009	Vendange 2010	Vendange 2011	Vendange 2008	Vendange 2009	Vendange 2010	Vendange 2011
KANAFAR	Syrah 3	KAS33	28-août	03-sept	26-août	08-sept	28-août	03-sept	26-août	08-sept
KANAFAR	Syrah 2	KAS32	04-sept	03-sept	26-août	08-sept	04-sept	03-sept	26-août	08-sept
ITANY	Syrah 1999	ITS9	11-sept	03-sept	26-août	08-sept	11-sept	03-sept	26-août	08-sept
ITANY	Syrah 1994	ITS4	04-sept	03-sept	26-août	08-sept	04-sept	03-sept	26-août	08-sept
TAL DNOUB	Syrah 2000-1	TDS001	11-sept	03-sept	26-août	08-sept	11-sept	03-sept	26-août	08-sept
TAL DNOUB	Syrah 2000-2	TDS002	28-août	03-sept	26-août	08-sept	28-août	03-sept	26-août	08-sept

Tableau III.19: Les dates et les teneurs des pics d'indice polyphénolique total et de la richesse phénolique totale, de chacune des parcelles du cépage Syrah, détectés respectivement par les méthodes ITV, Glories (1&2).

De plus, nous trouvons que la Syrah est plus tardive que le Merlot et plus précoce que le Cabernet Franc, puisque la date de vendange proposée pour toutes les parcelles du cépage Syrah est entre le 26 août et le 11 septembre. Alors que la date de vendange proposée pour toutes les parcelles du cépage du cépage Cabernet Franc est entre le 3 et 21 septembre, et pour le merlot entre le 17 août et le 6 septembre. Ce qui est conforme avec la littérature (Dupuch, 1998, Anneraud & Vinsonneau, 2009).

3.1.4.3-Comparaison des dates de vendange phénolique et technologique :

Dans le but de comparer les dates de vendange technologique avec celles phénolique, nous présentons dans le tableau III.20 les dates de vendange technologique et phénolique des différentes parcelles du cépage Syrah sur les quatre millésimes 2008, 2009, 2010 et 2011. Pour les vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011, toutes les parcelles du cépage Syrah présentent des dates de vendange phénolique précoces par rapport aux dates de vendange technologique. Ceci implique une élaboration de vin moins apprécié vu que pour la Syrah, la vendange phénolique optimale est atteinte lors de l'atteinte du pic d'anthocyanes ou avec une légère surmaturation (Boidron *et al.*, 1995). Un décalage de la vendange d'environ une semaine, vu que la vendange technologique est atteinte environ une semaine après la vendange phénolique aboutira à une chute d'anthocyanes. La Syrah peut très vite perdre son caractère si elle n'est pas vendangée immédiatement. Pour un cépage Syrah, il vaut mieux que la vendange technologique coïncide avec celle phénolique.

Domaine	Parcelle	Codex	Dates de Vendange 2008		Dates de Vendange 2009		Dates de Vendange 2010		Dates de Vendange 2011	
			Technologique	Phénolique	Technologique	Phénolique	Technologique	Phénolique	Technologique	Phé
KANAFAR	Syrah 3	KAS33	Entre 1-sept et 9-sept	28-août	Entre 16-sept et 30-sept	03-sept	Entre 27-sept et 2-sept	26-août	Entre 26-sept et 28-sept	0
KANAFAR	Syrah 2	KAS32	Entre 9-sept et 10-sept	04-sept	Entre 28-sept et 30-sept	03-sept	Entre 30-août et 31-août	26-août	Entre 23-sept et 24-sept	0
ITANY	Syrah 1999	ITS9	Entre 15-sept et 17-sept	11-sept	Entre 17-sept et 3-oct	03-sept	Entre 30-août et 1-sept	26-août	Entre 16-sept et 5-oct	0
ITANY	Syrah 1994	ITS4	Entre 12-sept et 17-sept	04-sept	Entre 16-sept et 26-sept	03-sept	Entre 26-août et 27-août	26-août	Entre 14-sept et 15-sept	0
TAL DNOUB	Syrah 2000-1	TDS001	Entre 11-sept et 15-sept	11-sept	Entre 22-sept et 13-oct	03-sept	Entre 26-août et 27-août	26-août	Entre 28-sept et 30-sept	0
TAL DNOUB	Syrah 2000-2	TDS002	Entre 10-sept et 14-sept	28-août	Entre 28-sept et 29-sept	03-sept	Entre 27-août et 1-sept	26-août	Entre 29-sept et 5-oct	0

Tableau III.20: Les dates des vendange technologique et phénolique de chacune des parcelles du cépage Syrah sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

3.1.4.4-Classification des parcelles.

Après avoir évalué la corrélation entre les deux méthodes de suivi de maturité phénolique (Glories et ITV), une classification des parcelles du cépage Syrah a été menée, en essayant de regrouper les parcelles suivant les différentes composantes phénoliques.

Pour pouvoir comparer les parcelles du cépage Syrah, nous avons utilisé des indicateurs fournis par la méthode ITV et Glories. Les valeurs de ces indicateurs sont indiquées dans le tableau III.21, ce sont les valeurs moyennes sur les quatre vendanges. Nous avons classifié les parcelles par la moyenne quadratique de l'écart à la meilleure parcelle.

Les valeurs les plus faibles de EQM montrent un écart très faible entre la parcelle et les meilleures valeurs. Le tableau III.21 montre que la valeur la plus faible de EQM est de 0.6 pour la parcelle ITS9. D'où, cette parcelle est classifiée en tant que meilleure parcelle du cépage Syrah.

	ITV		Glories				ITV		Glories				EQM%
	ANT	IPT	ApH1	ApH3.2	PAE%	Mp	ECANT %	ECIPT %	ECApH1%	ECApH3.2%	ECPAE %	ECMp%	
KAS33	388,2	126,63	936,25	695,6	74,3	62,1	23,5	9,3	9,7	8,2	0,0	1,5	11,5
KAS32	430,1	130,40	906,94	623,8	68,8	62,5	15,2	6,5	12,5	17,7	7,4	2,1	11,6
ITS9	507,2	139,54	1036,44	757,8	73,1	61,2	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	0,0	0,6
ITS4	409,8	110,50	839,56	605,4	72,1	64,8	19,2	20,8	19,0	20,1	2,9	5,9	16,4
TDS001	362,8	105,20	887,69	515,5	58,1	66,3	28,5	24,6	14,4	32,0	21,8	8,4	23,1
TDS002	424,3	120,28	931,00	589,7	63,3	62,9	16,4	13,8	10,2	22,2	14,7	2,8	14,6
Meilleurs valeurs	507,2	139,5	1036,4	757,8	74,3	61,2							

Tableau III.21: Les EQM (Ecart Quadratique Moyens) des teneurs moyennes ANT et IPT fournis par la méthode ITV (sur les quatre vendanges) et les teneurs moyennes en ApH1, ApH3.2, PAE% et Mp (fournis par la méthode Glories) sur les quatre vendanges du cépage Syrah.

Pour classifier les parcelles d'une autre méthode, nous avons choisi l'indice polyphénolique total (IPT) fournis par la méthode ITV pour estimer la teneur en composés phénoliques. Nous avons également suivi le potentiel total en anthocyanes (ApH1) pour estimer la qualité phénolique par sa teneur en anthocyanes ainsi que la maturité des pépins (Mp) pour évaluer la teneur en tanins des pépins. ApH1 et Mp sont fournis par la méthode Glories. Le tableau III.22 regroupe les valeurs d'IPT, d'ApH1 et de Mp avec l'évaluation de chacune de ces composantes et le classement en groupe des parcelles du cépage Syrah.

Echantillon	IPT	Classe	Evaluation de l'IPT	ApH1 (mg/L)	Classe	Evaluation de ApH1	Mp	Classe	Evaluation de Mp
KAS33	126.6	2	très élevé	936.2	2	Bonne	62.1	2	Insuffisant e
KAS32	130.4	2	très élevé	906.9	2	Bonne	62.5	3	Insuffisant e
ITS9	139.5	1	très élevé	1036.4	1	Très bonne	61.2	2	Insuffisant e
ITS4	110.5	3	très élevé	839.5	3	Bonne	64.8	3	Insuffisant e
TDS001	105.2	3	très élevé	887.6	1	Bonne	66.3	1	Insuffisant e
TDS002	120.3	2	très élevé	931.0	2	Bonne	62.9	3	Insuffisant e

Tableau III.22: Tableau regroupant les valeurs d'IPT, d'ApH1, de Mp avec l'évaluation de chacune de ces composantes et le classement en groupe des parcelles du cépage Syrah.

En examinant les valeurs moyennes d'IPT, d'ApH1 et de Mp des parcelles du cépage Syrah sur les quatre vendanges, nous remarquons la classification en trois groupes. Le groupe 1 regroupant la parcelle ITS9 appartenant à la parcelle Itany ayant une valeur d'IPT de 139.5, des valeurs d'ApH1 de 1036.4, présentant les meilleures valeurs et la plus faible valeur de Mp

61.2. Le groupe 2 comprend les parcelles Kanafar (KAS32 &KAS33) et la parcelle Tal Dnoub (TDS002), ces parcelles ont des valeurs d'IPT comprises entre 120 et 131, des valeurs d'ApH1 comprises entre 900 et 1000 mg/L. Le groupe 3 comprend les parcelles Tal Dnoub (TDS001) et la parcelle Itany (ITS4) avec des valeurs d'IPT comprises entre 105 et 121, des valeurs d'ApH1 comprises entre 800 et 950 mg/L. Les valeurs de Mp sont insuffisantes pour toutes les parcelles. La comparaison des différentes parcelles du cépage sur les quatre vendanges montre que ITS9 présente les meilleurs teneurs phénoliques et anthocyaniques avec la plus faible teneur en Mp.

3.1.4.5-Comparaison des vendanges :

Pour comparer les différentes vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011, nous présenterons par la suite les cinétiques du suivi des différentes composantes phénoliques. Nous débuterons par la présentation des critères phénoliques fournis par la méthode ITV (IPT et anthocyanes) de ITS9, appartenant au domaine Itany sur les quatre vendanges (Figure III.10.a & b).

La comparaison des cinétiques des anthocyanes (mg/L), et d'IPT montre que la vendange 2008 présente les meilleures valeurs par rapport à la teneur en anthocyanes tandis que la vendange 2010 présente la meilleure valeur par rapport à la teneur en composés phénoliques.

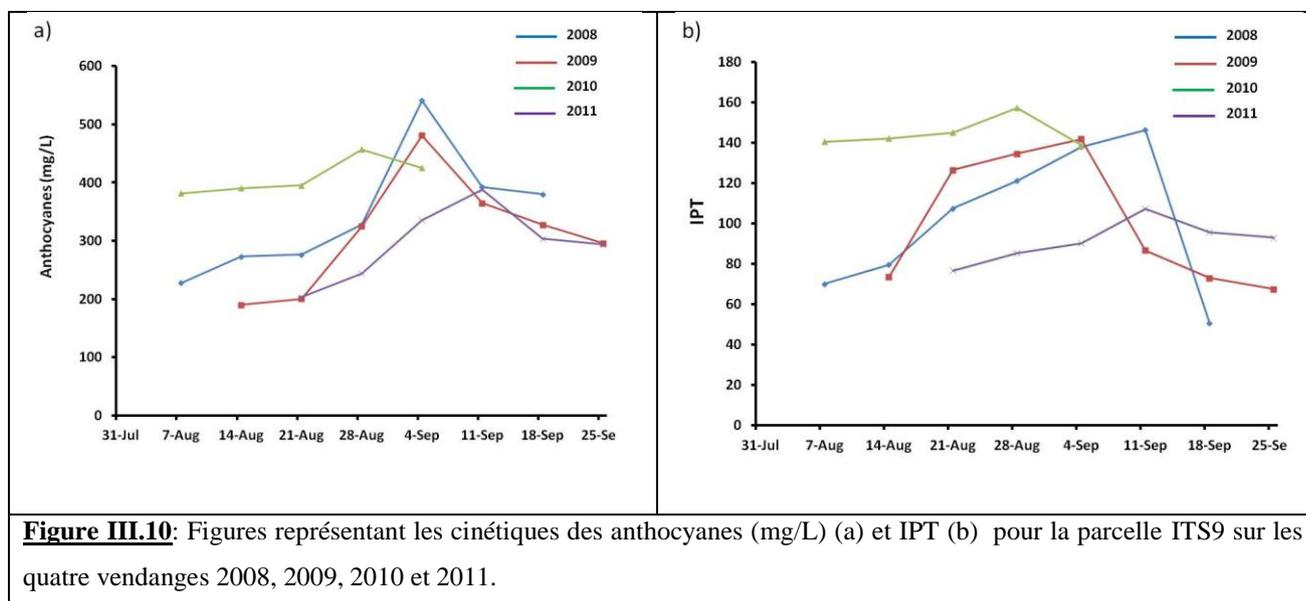


Figure III.10: Figures représentant les cinétiques des anthocyanes (mg/L) (a) et IPT (b) pour la parcelle ITS9 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

La comparaison des cinétiques des ApH1 (mg/L) et des PAE% (Figure III.11.a & b) montre que la vendange 2008 présente les meilleures valeurs par rapport à la teneur en ApH1 tandis que la vendange 2010 présente la meilleure valeur par rapport à PAE%.

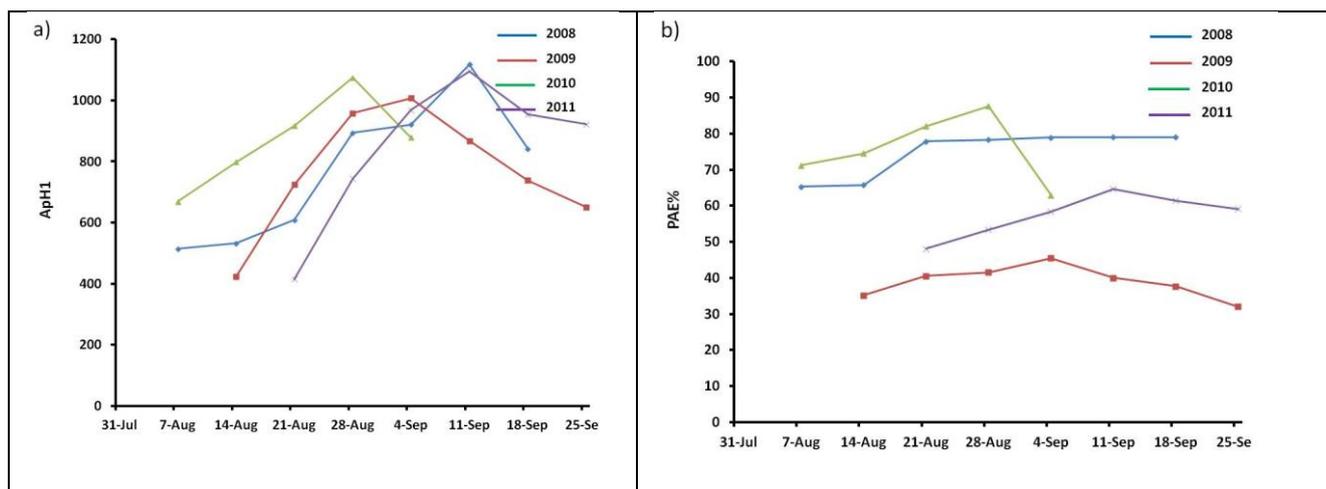


Figure III.11: Figures représentant les cinétiques de ApH1 (mg/L) (a) et PAE% (b) pour la parcelle ITS9 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

Le suivi de la Mp montre une tendance similaire des quatre vendanges avec les valeurs les plus faibles pour la vendange 2009 mais pas trop d'écart entre les trois autres vendanges (Figure III.12).

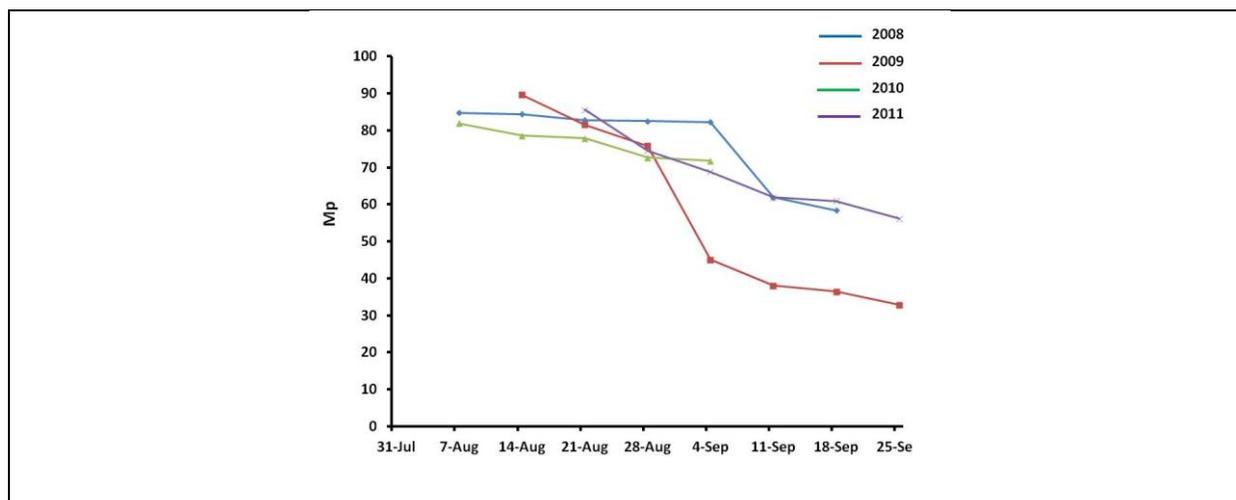


Figure III.12: Figures représentant les cinétiques de Mp pour la parcelle ITS9 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

L'ensemble des comparaisons des quatre vendanges au niveau de la parcelle ITS9 prouve que la vendange 2008 est la meilleure avec les meilleurs teneurs en anthocyanes, IPT, ApH3.2, PAE%.

3.1.5-Suivi du cépage Petit Verdot :

3.1.5.1-Maturité anthocyanique et phénoliques:

Le Petit Verdot est un cépage rouge tardif, qui n'atteint que très difficilement sa pleine maturité. C'est le dernier à être vendangé. La date de vendange phénolique proposée pour les parcelles du Petit Verdot est décalée une semaine ou même plus par rapport au pic

d'anthocyanes puisque le Petit verdot est un cépage qui doit être récolté à forte surmaturation. Le suivi de maturation du cépage Petit Verdot est réalisé sur quatre vendanges (2008,2009, 2010 et 2011). Le tableau III.23 et 24 présente les pics d'anthocyanes et de composés phénoliques fournis suite à l'application des deux méthodes pour l'étude de la maturité phénolique. Les dates de pics anthocyaniques et phénoliques sont fortement corrélées par les deux méthodes. Ce résultat étant déjà validé sur les précédents suivis de cépages.

Domaine	Parcelle	Codex	Pic d'anthocyanes (mg/L)				Pics de Potentiel en anthocyanes facilement extractibles (A _{pH3.2})			
			(d'après la méthode ITV)				d'après Glories			
			Vendange 2008	Vendange 2009	Vendange 2010	Vendange 2011	Vendange 2008	Vendange 2009	Vendange 2010	Vendange 2011
ITANY	Petit Verdot 1995	IIPV5	03-oct	02-oct	10-sept	30-sept	03-oct	02-oct	10-sept	30-sept
TAL DNOUB	Petit Verdot 2001-1	TDPV011	26-sept	02-oct	10-sept	30-sept	26-sept	02-oct	10-sept	30-sept
TAL DNOUB	Petit Verdot 2001-2	TDPV012	19-sept	02-oct	10-sept	30-sept	19-sept	02-oct	10-sept	30-sept

Tableau III.23: Les dates et les teneurs des pics d'anthocyanes (mg/L) et du potentiel en anthocyanes facilement extractibles, de chacune des parcelles du cépage Petit Verdot, détectés respectivement par les méthodes ITV, Glories (1&2).

Domaine	Parcelle	Codex	Pic d'indice polyphénolique total (mg/L)				Pics de richesse phénolique totale			
			(IPT d'après la méthode ITV)				(RPT d'après Glories)			
			Vendange 2008	Vendange 2009	Vendange 2010	Vendange 2011	Vendange 2008	Vendange 2009	Vendange 2010	Vendange 2011
ITANY	Petit Verdot 1995	IIPV5	03-oct	02-oct	10-sept	30-sept	03-oct	02-oct	10-sept	30-sept
TAL DNOUB	Petit Verdot 2001-1	TDPV011	26-sept	02-oct	10-sept	30-sept	26-sept	02-oct	10-sept	30-sept
TAL DNOUB	Petit Verdot 2001-2	TDPV012	19-sept	02-oct	10-sept	30-sept	19-sept	02-oct	10-sept	30-sept

Tableau III.24: Les dates et les teneurs des pics d'indice polyphénolique total et de la richesse phénolique totale, de chacune des parcelles du cépage Petit Verdot, détectés respectivement par les méthodes ITV, Glories (1&2).

Les échantillons des parcelles du cépage de petit verdot ont été récoltés entre le 10 septembre et le 3 octobre. Donc, c'est un cépage tardif par rapport au cépage Merlot, Syrah, Cabernet Franc et Cabernet Sauvignon.

3.1.5.2-Comparaison des dates de vendange phénolique et technologique :

Dans le but de comparer les dates de vendange technologique avec celles de vendange phénolique, nous présentons dans le tableau III.25 les dates de vendange technologique et phénolique des différentes parcelles du cépage Petit Verdot sur les quatres millésimes 2008,

2009, 2010 et 2011. Pour les vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011, toutes les parcelles du cépage Petit Verdot présentent des dates de vendange phénolique précoces par rapport aux dates de vendange technologique. Ceci implique une bonne maturité phénolique de ces parcelles vu qu'elles auront atteint une pleine maturité phénolique avant d'être vendangé. En effet, la date de vendange technologique est tardive une semaine par rapport à la phénolique. Vu que le cépage Petit Verdot est un cépage qui doit être récolté à une très forte surmaturation (environ 10 jours après le pic d'anthocyanes). Alors, nous pouvons dire que les parcelles du cépage Petit Verdot ont été vendangées majoritairement à une date optimale.

Domaine	Parcelle	Codex	Dates de Vendange 2008		Dates de Vendange 2009		Dates de Vendange 2010		Dates de Vendange 2011	
			Technologique	Phénolique	Technologique	Phénolique	Technologique	Phénolique	Technologique	Phénolique
			ITANY	Petit Verdot 1995	IIPV5	Entre 3-oct et 4-oct	03-oct	Entre 21-oct et 22-oct	02-oct	Entre 16-sept et 17-sept
TALDNOUB	Petit Verdot 2001-1	TDPV011	Entre 3-oct et 4-oct	26-sept	Entre 23-oct et 24-oct	02-oct	13-sept	10-sept	Entre 21-oct et 24-oct	30-sept
TALDNOUB	Petit Verdot 2001-2	TDPV012	Entre 1-oct et 3-oct	19-sept	Entre 21-oct et 23-oct	02-oct	Entre 13-sept et 14-sept	10-sept	Entre 22-oct et 25-oct	30-sept

Tableau III.25: Les dates des vendange technologique et phénolique de chacune des parcelles du cépage Petit Verdot sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

3.1.5.3-Classification des parcelles.

Après avoir évalué la corrélation entre les deux méthodes de suivi de maturité phénolique (Glories et ITV), une classification des parcelles du cépage Petit Verdot a été menée, en essayant de regrouper les parcelles suivant les différentes composantes phénoliques. Pour pouvoir comparer les parcelles du cépage Petit Verdot, nous avons utilisé des indicateurs fournis par la méthode ITV et Glories. Les valeurs de ces indicateurs sont indiquées dans le tableau III.26, ce sont les valeurs moyennes sur les quatre vendanges. Nous avons classifié les parcelles par la moyenne quadratique de l'écart à la meilleure parcelle.

Les valeurs les plus faibles de EQM montrent un écart très faible entre la parcelle et les meilleures valeurs. Le tableau III.26 montre que la valeur la plus faible de EQM est de 1.2 pour la parcelle TDPV011. D'où, cette parcelle est classifiée en tant que meilleure parcelle du cépage Petit Verdot.

	ITV		Glories				ITV		Glories				EQM%
	ANT	IPT	ApH1	ApH3,2	PAE%	Mp	ECANT %	ECIPT %	ECApH1%	ECApH3,2%	ECPAE %	ECMp%	
IIPV5	504,1	274,46	1367,63	1000,2	73,1	65,4	17,8	5,7	9,5	6,9	0,0	6,1	9,4
TDPV011	613,4	291,08	1512,00	1074,5	71,1	61,6	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8	0,0	1,2
TDPV012	575,0	260,00	1315,13	946,75	72,0	62,7	6,3	10,7	13,0	11,9	1,6	1,8	8,8
Meilleurs valeurs	613,4	291,1	1512,0	1074,5	73,1	61,6							

Tableau III.26: Les EQM (Ecart Quadratique Moyens) des teneurs moyennes ANT et IPT fournis par la méthode ITV (sur les quatre vendanges) et les teneurs moyennes en ApH1, ApH3.2, PAE% et Mp (fournis par la méthode Glories) sur les quatre vendanges du cépage Petit Verdot.

Pour classifier les parcelles d'une autre méthode, nous avons choisi l'indice polyphénolique total (IPT) fournis par la méthode ITV pour estimer la teneur en composés phénoliques. Nous avons également suivi le potentiel total en anthocyanes (ApH1) pour estimer la qualité phénolique par sa teneur en anthocyanes ainsi que la maturité des pépins (Mp) pour évaluer la teneur en tanins des pépins. ApH1 et Mp sont fournis par la méthode Glories. Le tableau III.27 regroupe les valeurs d'IPT, d'ApH1 et de Mp avec l'évaluation de chacune de ces composantes et le classement en groupe des parcelles du cépage Petit Verdot.

Echantillon	IPT	Classe	Evaluation de l'IPT	ApH1 (mg/L)	Classe	Evaluation de ApH1	Mp	Classe	Evaluation de Mp
ITPV5	274.4	2	très élevé	1367.6	2	Bonne	65.4	2	Insuffisante
TDPV011	291.0	1	très élevé	1512.0	1	Bonne	61.6	1	Insuffisante
TDPV012	260.0	2	très élevé	1315.1	2	Très bonne	62.7	2	Insuffisante

Tableau III.27: Tableau regroupant les valeurs d'IPT, d'ApH1, de Mp avec l'évaluation de chacune de ces composantes et le classement en groupe des parcelles du cépage PV.

En examinant les valeurs moyennes d'IPT, d'ApH1 et de Mp des parcelles du cépage Petit Verdot sur les quatre vendanges, nous classifions les parcelles en deux groupes : le groupe 1 regroupant la parcelle TDPV011 appartenant à la parcelle Tal Dnoub et le groupe 2 regroupant les parcelles ITPV5 appartenant au domaine Itany et la parcelle TDPV012 appartenant à la parcelle Tal Dnoub. La comparaison des différentes parcelles du cépage sur les quatre vendanges montre que TDPV011 présente les meilleurs teneurs phénoliques et anthocyaniques avec la plus faible teneur en Mp.

3.1.5.4-Comparaison des vendanges :

Pour comparer les différentes vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011, nous présenterons par la suite les cinétiques du suivi des différentes composantes phénoliques. Nous débuterons par la présentation des critères phénoliques fournis par la méthode ITV (IPT et anthocyanes) de TDPV011, appartenant au domaine Itany sur les quatre vendanges (Figure V.a & b).

La comparaison des cinétiques des anthocyanes (mg/L) et de l'IPT (Figure III.13.a&b) et ApH1 et PAE% (Figure III.14.a&b) montrent que la vendange 2008 présente les meilleures valeurs par rapport à la teneur en anthocyanes et en composés phénoliques.

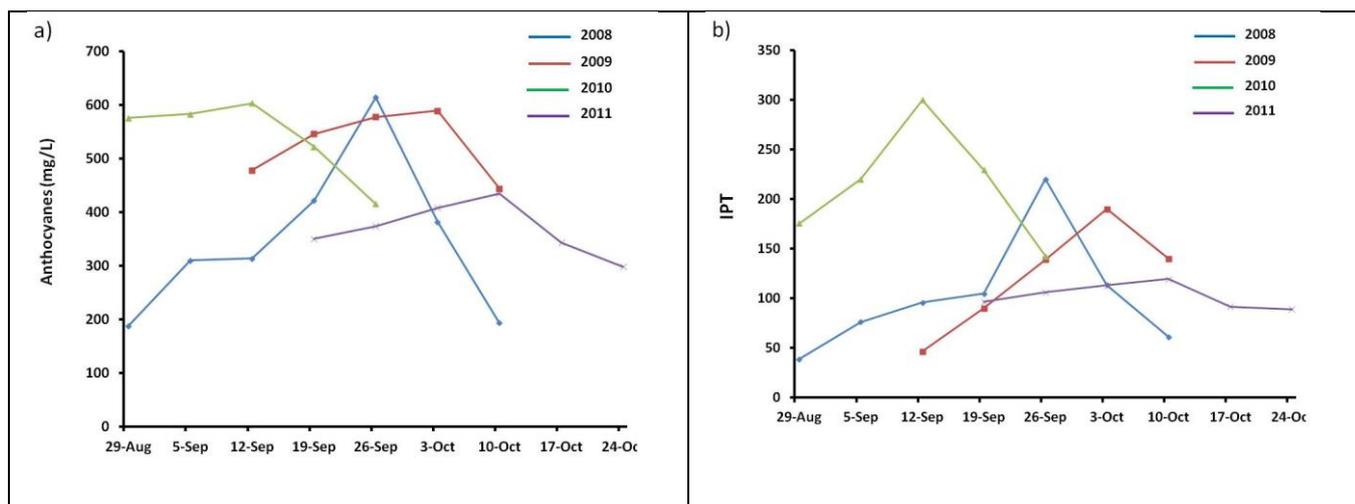


Figure III.13: Figures représentant les cinétiques des anthocyanes (mg/L) (a) et IPT (b) pour la parcelle TDPV011 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

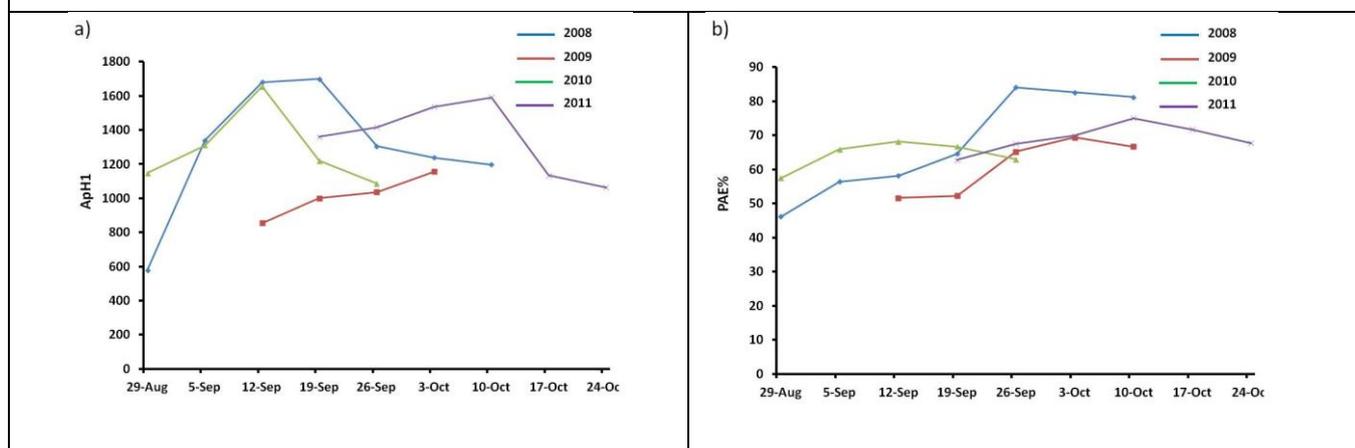


Figure III.14: Figures représentant les cinétiques de Aph3.2 (mg/L) (a) et PAE% (b) pour la parcelle TDPV011 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

Le suivi de la Mp montre une tendance similaire des quatre vendanges avec les valeurs les plus faibles pour la vendange 2009 mais pas trop d'écart entre les trois autres vendanges.

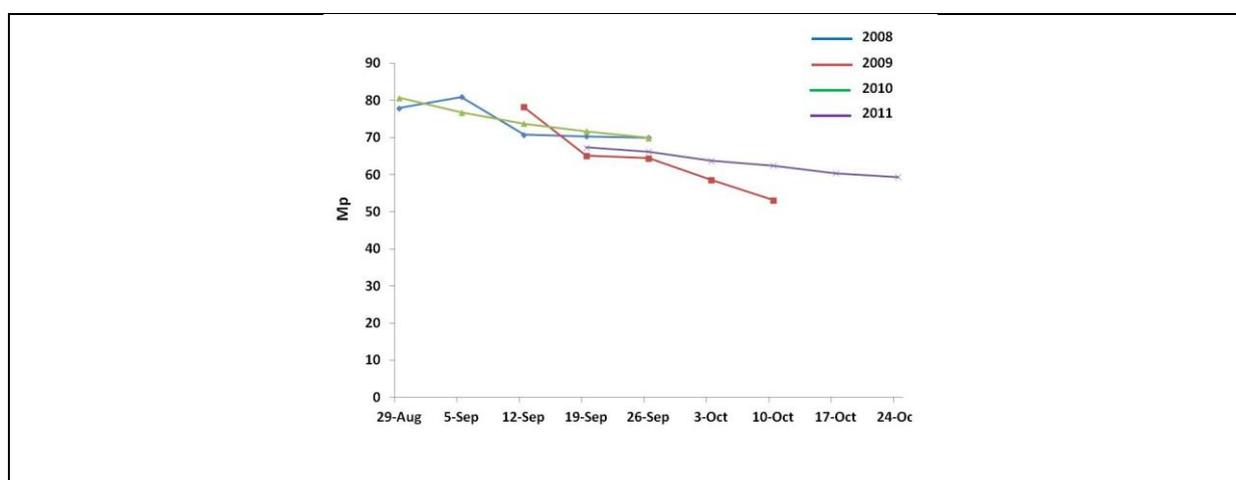


Figure III.15: Figures représentant les cinétiques de Mp pour la parcelle TDPV011 sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

L'ensemble des comparaisons des quatre vendanges au niveau de la parcelle TDPV011 prouve que la vendange 2008 est la meilleure avec les meilleurs teneurs en anthocyanes, IPT, ApH3.2, PAE%.

3.2. Evolution du climat de la région d'étude pour les vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011:

Le climat à ses diverses échelles est placé dans l'expression de l'effet terroir. D'où, l'importance de la notion du climat quant à la variabilité entre différents cépages et différentes vendanges. L'effet du climat, sur plusieurs paramètres du terroir, est plus important que les caractéristiques environnementales du terroir (Van Leeuwen *et al.*, 2004 ; Cadot, 2008). Il est admis que le climat soit un facteur déterminant de la qualité et de la typicité du vin (Jackson & Lombard, 1983). Malgré l'importance évidente du climat sur la qualité du vin, il n'est pas possible de définir des conditions climatiques optimales pour la production de vins de grande qualité. Suivant les études de Cadot., (2008) la synthèse des composés phénoliques est étroitement dépendante du climat, les conditions climatiques avant la véraison détermine la teneur phénolique des cellules de la pellicule. Le climat joue aussi sur la qualité du vin par son effet sur le régime hydrique. Le climat agit sur le bilan hydrique à travers la quantité et la répartition des précipitations ainsi que par la température. Il a été montré qu'une limitation de l'alimentation en eau de la vigne augmente le potentiel qualitatif de la récolte, surtout pour la production de vins rouges de garde (Trégoat *et al.*, 2002; Van Leeuwen et Seguin, 1994).

Pour essayer de comprendre le comportement phénolique des différentes parcelles entre les quatre vendanges, il s'agit d'étudier la pluviométrie et la température moyenne des quatre années. En effet, la comparaison des cinq cépages sur les quatre vendanges a montré que les vendanges 2008 et 2010 sont mieux que les vendanges 2009 et 2011. Nous présentons par la suite les évolutions de la somme des pluies (mm) et de la température (°C) tout au long des quatre vendanges (Figures III.16.a&b).

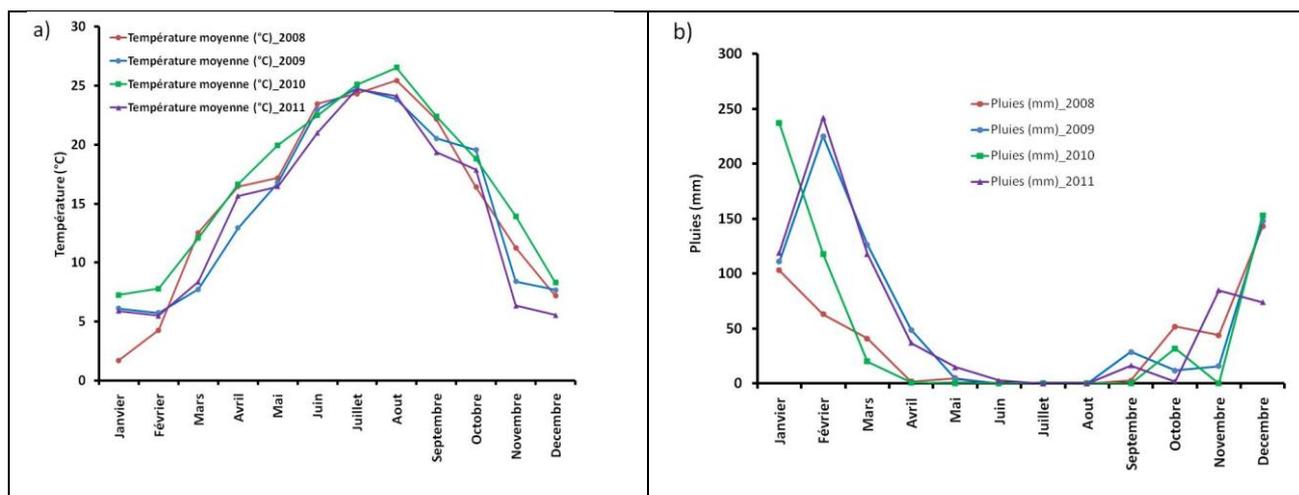


Figure III.16: Figures représentant les cinétiques de la température (a) et de la pluviométrie (b) sur les quatre vendanges 2008, 2009, 2010 et 2011.

Les cinétiques de la température (Figure III.16. a) montrent une tendance similaire tout au long des quatre vendanges. En comparant les valeurs de la température au cours du mois de septembre vu que c'est le mois durant lequel les pics phénoliques et anthocyaniques ont été atteints sur les quatre vendanges pour les raisins de cépage CS, nous remarquons une température plus élevée pour les vendanges 2008 et 2010. Les températures moyennes du mois de septembre des vendanges 2008 et 2010 sont respectivement ($T= 22.16$ et 22.42°C), alors que celles des vendanges 2009 et 2011, sont respectivement ($T= 20.55$ et 19.37°C). Pour le cépage Merlot, les mois d'août et de septembre sont les mois pour lesquelles les pics phénoliques et anthocyaniques sont obtenus pour les différentes vendanges. Pour le mois d'août, nous remarquons une température plus élevée pour les vendanges 2008 et 2010. Les températures moyennes du mois d'août des vendanges 2008 et 2010 sont respectivement ($T= 25.54$ et 26.55°C), alors que celles des vendanges 2009 et 2011, sont respectivement ($T= 23.84$ et 24.14°C) pour le mois d'août. Pour le cépage Cabernet Franc, les pics phénoliques et anthocyaniques ont été atteints durant le mois de septembre. Alors que pour la Syrah, les pics phénoliques ont été atteints durant les mois d'août et de septembre. Pour le petit verdot, les pics ont été atteints majoritairement pour le mois de septembre. Pour les différents cépages, nous avons validé que les températures notées durant les mois de pics phénoliques sont plus élevées pour les vendanges 2008 et 2010. Ceci étant corrélé avec de meilleures valeurs phénoliques et anthocyaniques. D'où, la température plus élevée des vendanges 2008 et 2010 a abouti à avoir de meilleurs potentiels anthocyaniques et phénoliques des parcelles des différents cépages. Ce résultat a été déjà prouvé par Lorrain *et al.*, (2011) qui ont prouvé qu'un climat plus chaud aboutit à un endommagement des peaux des raisins, améliorant

l'extractibilité anthocyanique et phénolique, vu que Coombe (1987) rapporte que la composition en composés phénoliques du raisin présente la même tendance que celle observée pour les anthocyanes par rapport à l'effet de la température. Il a été aussi vérifié à ce niveau par Carbonneau *et al.*, (1992) que l'accumulation des anthocyanes dans les pellicules est favorisée par des températures diurnes relativement élevées mais sans excès. En effet, le régime thermique en période de maturation du raisin est l'une des variables déterminantes de la coloration du raisin et de la richesse en arômes, anthocyanes et composés phénoliques des vins (Coombe, 1987; Jackson & Lombard, 1993).

De par la température, la contrainte hydrique a de nombreux effets positifs pour la production de vins de qualité, d'où l'intérêt d'étudier la pluviométrie au cours des quatre vendanges. La figure (III.16.b) montre que les millésimes 2008 et 2010 sont des millésimes secs. Leurs pluviométries respectives (456-561 mm) sont inférieures à la moyenne annuelle (Moyenne 2004-2006 = 699 mm), alors que la pluviométrie des vendanges 2009 et 2011 est respectivement 720.5 et 711.5 mm. D'après nos résultats, les vendanges 2008 et 2010 qui sont les plus sèches présentent les meilleurs potentiels phénoliques et anthocyaniques. A ce niveau, nous pouvons pas comparer le mois d'août pour lequel la pluviométrie était nulle sur les quatre vendanges. Par contre, ce qui est à noter est durant le mois de septembre, où la pluviométrie était respectivement de 3 mm et nulle pour les vendanges 2008 et 2010. Alors que pour les vendanges 2009 et 2011, la pluviométrie était notable avec des valeurs successives de 29 et 16.5 mm. D'où, les vendanges 2008 et 2010, qui sont plus sèches que 2009 et 2011, présentent les meilleurs potentiels phénoliques. Ce résultat a été déjà prouvé par des études antérieures qui ont montré que la contrainte hydrique augmente la synthèse des composés phénoliques (Van Leeuwen et Seguin, 1994 ; Trégoat *et al.*, 2002).

De plus, les dates de pics anthocyaniques de ces deux millésimes (2008 et 2010) sont précoces par rapport aux deux autres vendanges. Ce résultat a été aussi déjà démontré que la sécheresse rend la maturité plus rapide, d'où la précocité des pics. La précocité du cycle phénologique dépend essentiellement de la température du sol, qui est en relation avec sa teneur en eau (Morlat, 1989). La vitesse de maturation est en grande partie déterminée par le régime hydrique de la vigne (Van Leeuwen et Seguin, 1994). Un déficit hydrique est favorable à une maturation rapide, car il limite la taille des baies (et donc du compartiment à remplir avec des sucres). Suivant le même raisonnement, la plupart des sols secs sont des sols précoces.

3.3. Comparaison des meilleures parcelles de chaque cépage:

La comparaison des meilleures parcelles des cinq cépages (Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Syrah et Petit verdot) montre que les meilleurs cépages sont le CF et le PV, les meilleures parcelles étant ITCF4 du cépage CF et la parcelle TDPV011 du cépage Petit verdot avec les meilleures teneurs en anthocyanes et composés phénoliques et les valeurs les plus faibles en Mp. La parcelle ITS9 du cépage Syrah est la parcelle la moins classée avec les valeurs les plus faibles en anthocyanes et composés phénoliques.

Cépage	Meilleures parcelles sélectionnées sur les quatre vendanges	ApH1 (mg/L)	IPT	Mp
Cabernet Sauvignon	ITCS41, ITCS42,	1325.5-	181.1-243.4	53.3-59.9
	ITCS51, ITCS52	1441.6		
Merlot	TDM002	1245.8	170.3	68.5
Cabernet Franc	ITCF4	1504.6	196.7	60.9
Syrah	ITS9	1036.4	139.5	61.2
Petit Verdot	TDPV011	1512.0	291	61.6

Tableau III.28: Les meilleures parcelles sélectionnées des différents cépages sur les quatre vendanges.

3.4. Conclusion:

L'ensemble des suivis des cépages montre une forte corrélation entre les méthodes ITV et Glories au niveau des pics d'anthocyanes et de composés phénoliques, et au niveau des classifications des meilleures parcelles de chaque cépage. Les mêmes parcelles ont été sélectionnées par les deux méthodes. La corrélation entre les méthodes Glories et ITV a été validée sur tous les cépages et sur les quatre vendanges (2008, 2009, 2010 et 2011).

Une fois, les meilleures parcelles de chaque cépage ont été sélectionnées sur les quatre vendanges, il s'agit par la suite de comparer les cinétiques des teneurs en composés phénoliques et en anthocyanes obtenus par les méthodes ITV et Glories entre les meilleures parcelles des différents cépages et ceci sur les quatre vendanges. La comparaison montre une bonne corrélation entre les composantes phénoliques fournis par chaque méthode, et ceci a été validé sur les quatre millésimes. De plus, nous avons pu démontré que chaque cépage du domaine KSARA, est différent et ses particularités se reflètent notamment dans l'évolution de la maturation.

La méthode ITV, que nous avons utilisé, est fiable, très simple, rapide et répétable. Mais, elle est complémentaire, elle ne se substitue pas aux critères classiques de détermination de la

maturité, elle se propose d'apporter une information complémentaire. L'avantage de cette méthode réside dans sa capacité à renseigner sur le choix de la date de récolte, et sur les potentiels parcellaires. Mais, la limite de cette méthode réside dans son incapacité à renseigner sur l'état des différents constituants (pellicules et pépins). La méthode Glories est la méthode la plus couramment utilisée pour analyser la quantité de composés phénoliques dans le raisin. Elle permet de juger la qualité du raisin en mesurant le pourcentage d'anthocyanes extractibles du fruit. C'est l'avantage principal de la méthode Glories qui est un indicateur important de la maturité. De plus, la méthode Glories permet de détecter l'effet des différentes pratiques viticoles sur la maturité des raisins, elle donne des informations qualitatives sur la maturité phénolique, elle renseigne sur l'état des différents constituants (pellicules et pépins) et permet d'orienter les méthodes de vinification. La limite de cette méthode est sa durée qui est très longue puisqu'elle nécessite une macération de quatre heures. De plus, la méthode Glories ne permet pas à elle seule de fixer la date de récolte.

D'après nos résultats, la méthode Glories est plus utile que la méthode ITV pour la détermination de la date de vendange phénolique puisqu'elle prend en considération plusieurs critères. Mais, il faut noter une importante corrélation entre ces deux méthodes pour la majorité des parcelles de tous les cépages. En contrepartie, les résultats des méthodes Glories (1&2) et ITV ont été difficiles à mettre en corrélation avec les résultats de la méthode de Folin-Ciocalteu.

Les quatre millésimes permettent une classification des cépages à "potentiel qualitatif élevé" selon leur adaptation au terroir comme suit:

Les Cabernets Sauvignon ressortent premiers aux domaines de Itany (ITCS41, ITCS42, ITCS52 et ITCS52) et Taanayel (TACS6).

Les Merlots s'expriment le mieux au domaine Tal Dnoub (TDM002).

Les Cabernets Francs premiers s'expriment aux domaines Itany (ITCF4).

Les Syrah résultant premiers au domaine Itany (ITS9).

Les Petit Verdot les meilleurs s'expriment aux domaines Tal noub (TDPV011).

La comparaison de meilleures parcelles des cinq cépages, montre que les meilleurs cépages quant à leurs riches potentiels phénoliques et anthocyaniques sont le Cabernet Franc et le Petit Verdot.

Le potentiel qualitatif d'une vigne est valorisé par les potentiels phénoliques du raisin. La comparaison des quatre millésimes (2008, 2009, 2010 et 2011) montre que les millésimes 2008 et 2010 sont caractérisés par un climat sec et chaud; les conditions de leurs maturations étaient bonnes.

Cette étude autorise la connaissance de la richesse en anthocyanes et en tanins de raisin et celle de leur extractibilité et permet une amélioration de la gestion de la vinification et une prédiction sur certaines caractéristiques du vin tel que leur composition phénolique. Les résultats sur quatre millésimes confirment les caractéristiques des terroirs du château KSARA et conduisent une validation des potentiels qualitatifs du parcellaire correspondant.

Chapitre 4: Etude du profil phénolique, des activités antiradicalaires, antioxydantes et antimicrobiennes des extraits phénoliques de variétés de raisins libanais

L'article « A comparative study on antiradical and antimicrobial properties of red grapes extracts obtained from different *Vitis Vinifera* varieties » a été publié dans « *Food and Nutrition Sciences* » Journal. Ce premier article porte essentiellement sur l'étude du profil phénolique des extraits provenant de différents cépages cultivés au Liban. Leurs activités antiradicalaires, antioxydantes et antimicrobiennes ont été également explorées.

4.1. Résumé de l'article:

L'objectif du travail est d'étudier les propriétés antiradicalaires et antimicrobiennes des composés phénoliques extraits de différentes variétés de raisins fournis par la société Château KSARA_Liban. Des études antérieures ont été menées dans le but d'évaluer les activités antiradicalaires et antimicrobiennes des extraits phénoliques du vin, et de différentes parties de la baie de raisin (pépins, pulpes et pellicules), mais aucune étude n'a été menée sur la totalité de la baie. Nous avons déterminé les propriétés bioactives (antiradicalaires et antimicrobiennes) des composés phénoliques extraits des baies entières broyées. Le contenu phénolique a été déterminé par la méthode Folin-Ciocalteu. Une chromatographie liquide à haute performance (CLHP) a été conduite dans le but de d'identifier et de quantifier les principaux composés phénoliques flavonoïdes et non-flavonoïdes, pour pouvoir leur attribuer les diverses activités biologiques. L'évaluation de l'activité antiradicalaire a été basée sur la capacité de l'extrait à chélater le radical libre (DPPH). Durant cette étude, nous avons décrit une nouvelle méthode quantitative permettant d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits phénoliques vis à vis de diverses souche pathogènes, incluant des souches bactériennes gram-négatifs, gram-positifs et des souches de levures.

L'étude a été menée sur quatre échantillons appartenant à différents cépages (Merlot, Syrah, Cabernet Sauvignon et Cabernet Franc). Les résultats montrent que le contenu phénolique et anthocyanique dépend étroitement de la variété de raisin. De plus, l'identification par CLHP a

montré que tous les extraits contiennent les acides chlorogénique, caféique, gallique, férulique, hydroxybenzoïque, cinnamique, p-coumarique et protocatéchuïque. La concentration de chacun de ces composés phénoliques varie en fonction de la variété. De plus, les résultats montrent que globalement les extraits des raisins des différents cépages sont plus riches en composés non-flavonoïdes qu'en composés flavonoïdes.

Concernant l'étude des propriétés antiradicalaires, les résultats montrent que, les composés phénoliques extraits de nos échantillons de raisin sont pour la plupart d'excellents neutralisants du radical libre DPPH. Toutefois, leur activité antiradicalaire est variable en fonction des cépages, ceci étant certainement dû à leur contenu phénolique varié. Une corrélation a été notée entre le pourcentage d'inhibition du radical et la teneur en composés flavonoïdes. Un effet synergique entre les différents composés flavonoïdes (Quercétine, myricétine, rutine, catéchine et épicatechine) peut expliquer le fort pouvoir antiradicalaire de certaines variétés.

Les résultats des tests de sensibilité des souches pathogènes aux extraits de raisins, ont permis de révéler la présence d'une activité antimicrobienne importante vis-à-vis de quatre souches pathogènes. La souche à Gram positif : *Listeria monocytogenes* a montré la plus grande sensibilité aux différents extraits avec les pourcentages d'inhibition les plus élevés, suivie par les deux bactéries à Gram négatif : *Salmonella arizonae* et *Escherichia coli* puis la souche levurienne *Candida albicans*, cette dernière a démontré les plus faibles pourcentages d'inhibition. Ce résultat peut être attribué à des différences dans la structure de la paroi cellulaire entre bactéries à Gram (+) et à Gram (-) d'une part et entre bactéries et levures d'autre part. En effet, la structure moins complexe de la paroi cellulaire des bactéries à Gram (+), la rend plus perméable aux composés antimicrobiens. Ainsi, cette étude nous a permis de mettre en évidence certaines des propriétés biologiques des composés phénoliques, extraits des raisins du domaine château KSARA. À ce sujet, les résultats obtenus ont permis de montrer le rôle fonctionnel de ces molécules, qui ont pu inhiber l'activité des radicaux libres, et inhiber la croissance de quatre souches pathogènes susceptibles d'altérer les produits alimentaires ou d'autres produits industriels. La technique CLHP a pu mettre en évidence les molécules actives, et qui sont susceptibles de jouer un rôle majeur dans les activités bioactives des extraits. Un effet synergique a été proposé entre les différents composés phénoliques des différents cépages analysés, ce qui a élucidé les diverses propriétés biologiques observées.

4.2. ARTICLE: A comparative study on antiradical and antimicrobial properties of red grapes extracts obtained from different *VitisVinifera* varieties

(Voir le manuscrit qui suit)

A Comparative Study on Antiradical and Antimicrobial Properties of Red Grapes Extracts Obtained from Different *Vitis vinifera* Varieties

Nada El Darra^{1,2}, Joanna Tannous¹, Paulette Bou Mouncef³, James Palge³, Joseph Yaghi¹, Eugène Vorobiev², Nicolas Louka¹, Richard G. Maroun^{1*}

¹Biochemistry Unit and Research and Analysis Center, Faculty of Sciences, Saint-Joseph University of Beirut, Beirut, Lebanon; ²Research Center of Royallieu, Unit of Transformations of Integrated Renewable Matter, Department of Chemical Engineering, University of Technology of Compiègne, Compiègne Cedex, France; ³Château KSARA, s.a.l, Ksara, Bekaa Valley, Lebanon.
Email: *richard.maroun@usj.edu.lb

Received August 9th, 2012; revised September 9th, 2012; accepted September 16th, 2012

ABSTRACT

The present work is devoted to the study of antiradical and antimicrobial activities of phenolic compounds extracted from different grapevine varieties grown in the Bekaa plane—Lebanon. The amount of phenolic compounds in selected grape extracts was determined by the Folin-Ciocalteu method. Phenolic composition was specified by high performance liquid chromatography. Free radical scavenging activity was examined by using the (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) DPPH assay. The potential antimicrobial activity was studied using a new quantitative method developed during this work. This activity was tested against several microbial pathogens, including a Gram-positive strain (*Listeria monocytogenes*), two Gram-negative strains (*Escherichia coli* and *Salmonella arizonae*) and a fungal strain (*Candida albicans*). According to the results of the present screening study, a great variability in the composition of phenolic compounds in red grape extracts was detected. All phenolic compounds extracts, demonstrated important scavenging properties and antimicrobial effect against bacterial and fungal strains. Yet, a different response degree was noticed depending on the tested microorganism and the phenolic composition of grape extracts. Antimicrobial activity was more effective against Gram-positive than Gram-negative and yeast strains. Furthermore, our results highlighted a significant role of synergistic effect between various phenolic compounds in the free radical scavenging and antimicrobial activities.

Keywords: Phenolic Compounds; DPPH; HPLC-DAD; Antimicrobial; Antiradical; Grapevines; Synergistic Effect

1. Introduction

Phenolic compounds make up one of the major families of secondary metabolites widely distributed in the plant kingdom, and they are found in foods of vegetable origin, constituting an integral part of our daily diet [1]. Grapes contain large amounts of phenolic compounds in skins, pulp and seeds, which are partially transferred to wine during red wine-making [2,3]. Currently, grape compounds have attracted increased attention especially in the field of nutrition, health and medicine.

Structurally, phenolic compounds comprise an aromatic ring, bearing one or more hydroxyl substituents, and range from simple phenolic molecules such as phenolic acid to highly polymerized compounds such as tannins [4]. Phenolic compounds are divided into several classes according to the number of phenol rings that they

contain and to the structural elements that bind these rings to one another [5]. Phenolic grape and wine compounds can be divided into two groups: non-flavonoid (Hydroxybenzoic and Hydroxycinnamic acids, Stilbenes) and flavonoid compounds (Anthocyanins, Flavan-3-ols and Flavonols) [6].

Phenolic compounds are considered to be the most important components of red wine, due to their direct relationship with its color, astringency, bitterness, and susceptibility to oxidation reactions [7]. Furthermore, phenolic compounds are known by their potent antioxidant, antimutagenic, antibacterial, antiviral, antifungal and anti-ulcer activities [8].

Indeed, due to the mobility of the phenolic hydrogen, phenolic compounds are able to scavenge free radicals generated continuously by endogenous factors such as normal physiological metabolism and also by exogenous factors including smoking, pollution, infections, sun ex-

*Corresponding author.

posure and others [9]. The loss of hydrogen causes the formation of a highly stabilized mesomeric radical.

Several studies have highlighted that phenolic compounds by virtue of their antioxidant capacity participate in the prevention of various chronic diseases in which an oxidative stress is potentially involved [10].

Nowadays bacteria, yeasts and free radicals cause real health problems because of their involvement in many diseases mainly those in which an oxidative stress is involved such as cancer and cardiovascular disease and in food borne diseases [11]. Currently there is a growing scientific interest to use natural antibacterial compounds, as biopreservatives face to conventional synthetic additives, due to consumer preferences towards more natural and healthier products [12]. Thus the role of natural phenolic compounds extracted from plant reaches its paroxysm and the addition of these natural compounds to food products has therefore become popular as a means of increasing shelf life and to reduce wastage and nutritional losses by inhibiting microbial growth and delaying oxidation [13].

The aim of the present work was to assess the antiradical and antimicrobial activities of phenolic compounds extracted from grapevine varieties of Château KSARA-Bekaa-Lebanon. Several previous studies have been conducted to evaluate antioxidant activity as well as antimicrobial activity of phenolic extract from wines or grapes seeds, skins and pulps [14-16]. As a first study in Lebanon two of the most important biological activities of phenolic compounds, antiradical and antimicrobial, have been tested on phenolic extracts prepared from the whole grape berries. The phenolic content of these grape extracts was determined by the Folin-Ciocalteu method. An HPLC-DAD method was conducted for the determination and quantification of the main phenolic compounds belonging to flavonoids and non-flavonoids molecules in order to determine the influence of these molecules towards their bioactive properties. The evaluation of antiradical activity was based on the capacity of a sample to scavenge the DPPH radical. In this work, we describe a new and innovative quantitative method for the evaluation of the antimicrobial activity of red grapes phenolic compounds against various pathogenic strains, such as Gram-positive and Gram-negative bacteria and yeasts.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

The grapes examined in our study were harvested in the vintage 2009, at optimum maturity from vineyards in the province of Bekaa-Château KSARA S.A.L, Lebanon. At their optimum phenolic maturity, these grapes have both,

a high content of phenolic compounds and a good extractability [17].

All samples analyzed were *V. vinifera* species from different cultivars. The varieties chosen were: Merlot, Syrah, Cabernet franc and Cabernet Sauvignon, the most important red grape varieties that can be encountered in the Lebanese vineyard. We should notice that this study is applied for the first time in the Lebanese vineyard.

2.2. Chemicals and Reagents

Solvents used for high-performance liquid chromatographic analysis were: Methanol (Merck, Darmstadt, Germany) and Formic acid (Scharlau, Barcelona, Spain) of HPLC ultra gradient grade. HPLC grade water (Merck, Darmstadt, Germany) was also used. Folin-Ciocalteu's phenol reagent; Sodium Carbonate; 2, 6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT); 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical and Tris-HCl buffer were obtained from Sigma (Aldrich).

Phenolic Standards: Gallic acid, Protocatechin, Hydroxybenzoic acid, Catechin, Epigallocatechin, Caffeic acid, Chlorogenic acid, Epicatechin, *p*-Coumaric acid, Gallo-catechin gallate, Ferulic acid, Resveratrol, Cinnamic acid, Rutin, Myricetin, Quercetin and Kaempferol were purchased from Sigma (Aldrich) Laboratories.

2.3. Microbial Strains and Growth Conditions

Antimicrobial activity was screened against two Gram negative bacteria: *Escherichia coli* ATCC 10536 (*E. coli*) and *Salmonella arizonae* ATCC 13314 (*S. arizonae*), one Gram positive bacteria: *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (*L. monocytogenes*), and one yeast strain: *Candida albicans* ATCC 10231 (*C. albicans*).

Chloramphenicol (Sigma, Aldrich) and Amphotericin B (Sigma, Aldrich) were used respectively as the reference antimicrobial and antifungal standards.

All strains were cryo-preserved at -80°C . *E. coli* was cultured in Luria Broth, *S. arizonae* in Trypticase Soy Broth (BioMérieux, Marcy L'Etoile, France), *L. monocytogenes* in Trypticase Soy Broth-Yeast Extract (BioMérieux, Marcy L'Etoile, France), while the yeast strain *C. albicans* was maintained in Yeast Glucose Chloramphenicol Broth.

For experimental use, the microorganisms were subcultured in agar media, incubated for 24 h at 37°C for bacteria and 30°C for yeast and used as the source of inoculum for each experiment. After incubation, each microorganism was suspended in 5 mL of appropriate broth and incubated for one hour at adequate temperature with agitation. Cultures growth was followed by the turbidity measurement at 630 nm, until it achieved the turbidity of 0.5 McFarland standard, which is equal to an

inoculum containing approximately 10^8 cfu/mL [18].

2.4. Sample Preparation and Extraction

In our study, 239 samples of red grapes extracts from different varieties were analyzed and quantified. According to their phenolic maturity, four samples presenting the greatest phenolic maturity were selected. The phenolic constituents from the whole grape berries were extracted using conventional solvent extraction procedure. The extraction protocol was developed and optimized in our laboratory [19]. Briefly, to extract phenolic compounds, ten grams of homogenized grape berries (in high speed grinder) were mixed with 15 mL of acetone solvent (acetone/water 85/15, v/v) at room temperature. Contact time was 3 to 4 days. When the extraction is completed, the mixture is centrifuged at 2500 rpm for 15 minutes, at 20°C. When completed, the supernatant was recovered and transferred into new tubes and incubated for two days at 40°C to ensure the complete evaporation of the solvent. After the extraction, samples were filtered through 0.2 µm syringe filters. The resulting extract was stored at -20°C protected from light.

2.5. Determination of Total Phenolic Compounds Content Using Folin-Ciocalteu Method

The total phenolic content was determined according to Folin Ciocalteu (FC) method [20]. An aliquot of 10 µl of the sample solution was mixed with 100 µl of commercial Folin-Ciocalteu reagent and 1580 µl of water. After a brief incubation at room temperature (5 min), 300 µl of saturated sodium carbonate was added. The color generated was read after 2 h at room temperature at 760 nm using a UV-Vis spectrophotometer (UV-9200, BioTECH Engineering Management, UK). A calibration plot of absorbance versus phenol concentration was made using Gallic acid as standard. The total phenolic compounds content in samples was evaluated from the generated absorbance value.

2.6. Determination of Anthocyanin Concentration

The concentration of free anthocyanins in red grapes extracts selected was analyzed by bleaching with bisulfite [21]. The bisulfite bleaching procedure requires the preparation of two samples, each containing 1 ml of grape extract, 1 ml of ethanol (EtOH), 0.1% Chloridric acid (HCl) and 20 ml of HCl at 2% (pH 0.8). For the two samples, 4 ml of water (H₂O) are added to 10 ml of the first sample, 4 ml of sodium bisulfite solution, are added to 10 ml of the second sample and the mixture is diluted by half. The difference in optical density (ΔOD) at 520

nm is measured on a 1 cm optical path. By comparison with a standardized anthocyanin solution, the concentration is given by the following equation:

$$C \text{ (mg/l)} = \Delta OD \times 875$$

875 is the slope of the calibration curve obtained from Malvidin-3-glucoside.

2.7. HPLC Analysis

Polyphenol analyses of the extracts prepared from the whole red grapes were performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Prior to analytical chromatography, samples and standards were purified by filtration through 0.2 µm syringe filters to remove interferences of sugars and organic acids from the crude sample. An equipment consisting of a liquid chromatography-KNAUER apparatus coupled to a diode array detector was employed. Analyses were performed on a Spherisorb ODS-2 (5 mm, 250*4.6 mm), at a flow rate of 1 mL·min⁻¹, using a 20 µL injection volume, detection at 280 nm and 320 nm, and the elution programme given in **Table 1**. Eluent A was 2% aqueous Formic acid and eluent B: 69% Methanol (MeOH), 29 % HPLC water and 2% Formic acid. Identification was based on comparing retention times of the peaks detected with those of original compounds, and on UV-Vis on-line spectral data. Quantification was accomplished using the phenolic standards solutions. Results were expressed as mg/ml grape extract volume [22].

2.8. Biological Activity of Grape Extracts

The antiradical and antimicrobial capacity of phenolic compounds, in a general was well known [23,24]. As previously described, individual phenolic compounds present in grape extracts were identified and quantified, but we choose to submit the entire extracts to the biological activity studies. In fact, total food extracts may be

Table 1. Linear gradient used for the separation of phenolic compounds present in grapes.

Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	100	0
3	100	0
10	90	10
60	60	40
80	40	60
105	20	80
120	0	100
140	100	0

more beneficial than isolated constituents, since a bioactive individual component can change its properties in the presence of other compounds present in the extract [25] corresponding to a synergistic effect.

2.8.1 Free Radical Scavenging Activity

The scavenging activity of DPPH free radical by grape must was determined according to the method reported by [26,27]. The free radical scavenging activity of extracts were examined by comparing to those of known antioxidants such as butylhydroxytoluene (BHT) (a synthetic antioxidant) and resveratrol (a natural antioxidant) by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Each extract or positive control (BHT or Resveratrol) was diluted at a series of extract concentrations of 1, 5, 10 and 50 µg/mL. In each reaction, an aliquot of 50 µL of the diluted extract was added to 3.9 mL of DPPH solution in Methanol (0.1 mM) and 450 µL of Tris-HCl buffer. Absorbance at 517 nm was measured after 30 min of incubation at room temperature using pure Methanol as a blank. All samples were analyzed in duplicate.

The percentage of inhibition of the DPPH was determined as follows:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[(\text{absorbance of control} - \text{absorbance of test sample}) / \text{absorbance of control}] * 100}$$

The free radical scavenging activity of Lebanese grape extracts was evaluated by the decrease in the peak area of the DPPH radical which exhibits a deep purple color with maximum absorption at 517 nm. Antioxidant molecules can quench DPPH free radicals, resulting in decoloration of DPPH because of their conversion into a colorless product.

2.8.2. Antimicrobial Activity

To determine the antimicrobial effect of the grape extracts, a new quantitative method was adapted. Aliquots of 200 µL bacterial or fungal pure cultures previously prepared (*L. monocytogenes* or *S. arizonae* or *E. coli* or *C. albicans*) were mixed with 200 µL of each sample or antimicrobial agent (Chloramphenicol), antifungal agent (Amphotericin B) and phenolic standards (Resveratrol, BHT, Gallic acid) used as positive controls at a concentration of 5 mg/mL and grown at 37°C (for bacterial strains) and 30°C (for fungal strain) for 24 hours with agitation. A negative control was also applied under the same experimental conditions, by replacing the grape extracts with the adequate broth for each microbial strain.

After appropriate incubation, serial dilutions from stock solutions were prepared in adapted broth for each strain. 500 µl from the 10⁻⁷ dilution was suspended into 20 mL agar medium and homogenized, then transferred into Petri dishes.

All plates were incubated for 24 h at 37°C for bacterial strains and 30°C for the fungal strain. After incubation the numbers of bacteria or yeast colonies that grow on each plate were counted.

The inhibitory effect was calculated using the following formula:

$$\% \text{ Inhibition} = (1 - T/C) * 100,$$

where T = cfu/ml of test sample and C = cfu/ml of negative control [28].

2.9. Statistical Analysis

Each modality was conducted in duplicates and analysis repeated twice. Means and standard deviations of data were calculated. Two way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's LSD (Least Significant Difference) were performed to compare the means of the different investigated responses and to determine statistical significance. For each analysis, significance level of 5 % was assumed. All statistical analyses were performed using Statgraphics 5.1 (Statpoint Technologies Inc, USA).

3. Results and Discussion

3.1. The Content of Polyphenols and Anthocyanins in Grape Extracts

The phenolic composition is an important quality parameter of red grape, which affects the quality of the resulting wines. Its knowledge is essential to classify red grapes varieties. In our study, 239 samples of red grapes extracts from different varieties were analyzed and quantified. Among these extracts, four were chosen for their high phenolic content and antiradical activities.

In order to classify the Lebanese grape varieties, a prior analysis of the phenolic and anthocyanin content of these four grapes extracts was done. **Table 2** presents the total concentration of phenolic compounds (mg GAE/L) and anthocyanins concentrations (mg/L) of the Lebanese red grapes extracts (Merlot, Syrah, Cabernet Sauvignon and Cabernet Franc) used in this study. Based on statistical analysis by Fisher's LSD test. **Table 2** showed significant differences between phenolic content of the different grapes cultivars. Results showed that the total phenolic content of the different varieties was quite variable. This result was also proved [29], within a study on the polyphenolic content of different grape varieties. The variability found in total phenolic content between different cultivars confirmed the hypothesis that genetic and environmental factors [30-32], are key influencers of a cultivar's phenolic content.

Table 2 showed that the anthocyanin concentration is also dependant from the variety. However, statistical analysis showed that only Syrah presents significant dif-

ferences comparing to the other varieties. Whereas, non-significant differences were noticed between anthocyanin concentration contents of the other cultivars (Merlot, Cabernet Sauvignon and Cabernet Franc). This result confirmed the hypothesis that apart from the genetic background, several agroecological factors, such as maturation [33], ripening stage [34], cultivar [31], climate [35], stress levels [32], soil conditions vine water status and cultural practices) are able to impact the level of polyphenols and anthocyanin contents of red grape extracts. Therefore, these factors can be used to modify the phenolic composition of red grapes, which explains the differences between the phenolic and anthocyanin con-

centration for different red grape varieties.

Every family of polyphenols is directly responsible for the special characteristics of specific grapes varieties. In order to explain the physiological activities of phenolic compounds present in our different red grape extracts, an identification and quantification of these compounds were done before testing their antiradical and antimicrobial activities. Therefore, different phenolic compounds flavonoids and non-flavonoids were chosen as standards because of their biological and pharmacological interest and their contents were determined by reverse-phase HPLC (Tables 3 and 4). The concentration of the components was calculated from each chromatogram peak area.

Table 2. The weight (g) of grape berries, the phenolic (mg GAE/L) and the anthocyanin (mg/L) contents in the red grape varieties. The given values are the means of two repetitions.

Grape varieties	Codex	Weight (g) of 100 grape berries	Polyphenols concentration (mg/L)	Anthocyanins concentration (mg/L)
Merlot	KAM33	151.3 ^b	8101.4 ^d	530 ^b
Syrah	ITS9	176.3 ^a	13801.4 ^a	58 ^a
Cabernet Sauvignon	TACS22	136.5 ^c	12858.5 ^b	528 ^b
Cabernet Franc	ITCF4	123.5 ^d	8815.7 ^c	528 ^b

^{a,b,c,d}Marks with the same superscript letters were not significantly different within the same column (LSD test, 5% level)

Table 3. Non-flavonoid contents of the red grape varieties. (-) corresponds to a none-determined quantity.

Grape varieties	Codex	Non-flavonoids (mg/ml)								
		Stilbenes (mg/L)	Phenolic acids (mg/ml)							
		Resveratrol	Chlorogenic acid	Caffeic acid	Gallic acid	Ferrulic acid	Hydroxybenzoic acid	Cinnamic acid	p-Coumaric acid	Protocatechuic acid
Merlot	KAM33	0.20	0.04	0.08	0.37	—	0.02	—	0.11	0.05
Syrah	ITS9	0.84	1.04	—	0.14	0.05	0.01	0.98	0.06	0.33
Cabernet Sauvignon	TACS22	1.67	0.03	0.01	0.98	—	1.47	—	0.01	0.18
Cabernet Franc	ITCF4	0.97	0.02	0.01	0.13	—	—	1.49	0.00	0.12

Table 4. Flavonoid contents of the red grape varieties. (-) corresponds to a none determined quantity.

Grape varieties	Codex	Flavonoids (mg/ml)							
		Quercetin	Kampherol	Myricetin	Rutin	Catechin	Epicatechin	Epigallocatechin	GallocatechinGallate
Merlot	KAM33	0.05	0.04	0.42	—	0.17	0.23	—	0.99
Syrah	ITS9	0.28	0.10	0.21	—	—	—	—	1.10
Cabernet Sauvignon	TACS22	0.10	—	0.30	1.81	0.22	—	—	—
Cabernet Franc	ITCF4	—	—	0.09	—	—	0.4	0.15	0.65

HPLC analysis of phenolic compounds in red grape extracts showed that most of the non-flavonoid and flavonoid compounds chosen have been identified in the different red grapes varieties of vintage 2009. **Table 3** showed that the amount of non-flavonoid content and especially resveratrol is dependent on the red grapes varieties and that the Cabernet Sauvignon variety was richer in resveratrol than other cultivars, which was confirmed by Sun *et al.*, 2006 [36]. The latter confirmed that stilbenes (Resveratrol) content is largely dependent of grape varieties. The phenolic pattern of grape extracts contains Chlorogenic acid, Caffeic acid, Gallic acid, Ferulic acid, Hydroxybenzoic acid, Cinnamic acid, *p-Coumaric* acid and Protocatechuic acid. The concentration of each of these compounds varies between different cultivars.

Moreover **Table 4** showed that the flavonoid content of grape extracts was variety dependent as well. The phenolic pattern of grape extracts contains Quercetin, Kammpferol, Myricetin, Rutin, Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin, and Gallocatechin gallate.

Also **Table 4** showed that Merlot and Cabernet Sauvignon varieties were the only cultivars that contain Catechin. This result was confirmed by other authors who showed that Cabernet Sauvignon and Merlot were the cultivar in which the Catechin is the main compound [37, 38].

To determine the total phenolic content of the grapes varieties, the total of flavonoid, non-flavonoid and phenolic acid contents of the four red grapes varieties were calculated (**Table 5**). **Table 5** showed that flavonoid, non-flavonoid and phenolic acid contents were significantly different between the four grape varieties. Of these compounds, non-flavonoid-compounds especially phenolic acids are in higher concentration than the flavonoid compound at the exception of the variety Merlot KAM 33.

Table 5 showed that the greatest range of non-flavonoid was found in the grape extract of Cabernet Sauvignon TACS22 and the lowest in the grape extract of Merlot KAM33, with high flavonoid content for both cultivars. Therefore to present a global overview on the phenolic

profiles of TACS22 and KAM33, two representative chromatograms of these two samples are illustrated in **Figure 1**.

Figure 1(a) represents the chromatogram for the Merlot KAM33 and **Figure 1(b)** for the Cabernet Sauvignon TACS22. The results showed that non-flavonoid compound especially Resveratrol were present in greater amounts in Cabernet Sauvignon TACS2 than in Merlot KAM33.

3.2. Radical Scavenging Effect Assay

The free radical scavenging activity of red grape extracts was assessed by DPPH assay. From a methodological point of view, the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method [39], is recommended as easy and accurate methods for measuring the antiradical activity of fruit and vegetable juice or extracts.

The scavenging effects of ethanolic extracts from red grapes from different varieties were examined and compared. Several concentrations of red grapes extracts ranging from 1 - 50 µg/mL were tested for their scavenging activity in vitro model. As shown in **Figure 2**, the amount of DPPH decreased in the presence of grape extracts. Therefore, radical scavenging activity increased with increasing percentage of the free radical inhibition. **Figure 2** showed also that free radicals were scavenged by the test compound in a concentration dependent manner in the model. **Figure 2** showed that all the test samples have a significant inhibitory activity against the DPPH radical, but the higher inhibition of DPPH radical by extracts samples was observed at a range of 50 µg/mL. This result is in agreement with the study of the scavenging activity of the seed methanolic extracts of three *Vitis vinifera* realized by Saïdani Tounsi M. *et al.* 2009 [40], who showed that all seed extracts showed remarkable DPPH radical scavenging activity at a concentration of 50 µg/mL.

Figure 2 showed also that the scavenging activity was different between the grape varieties, which was due to the difference in their phenolic compounds contents.

To find the contribution of different phenolic content

Table 5. Flavonoid, non-flavonoid and phenolic acid contents of the red grape varieties.

Grape varieties	Codex	Flavonoid (mg/ml)	Non-flavonoid (mg/ml)	Phenolic acid (mg/ml)
Merlot	KAM33	1.9 ^b	0.87 ^d	0.66 ^d
Syrah	ITS9	1.7 ^c	3.45 ^b	2.61 ^b
Cabernet Sauvignon	TACS22	2.5 ^a	4.35 ^a	2.68 ^a
Cabernet Franc	ITCF4	1.3 ^d	2.75 ^c	1.79 ^c

^{a,b,c,d}Marks with the same superscript letters were not significantly different within the same column (LSD test, 5% level)

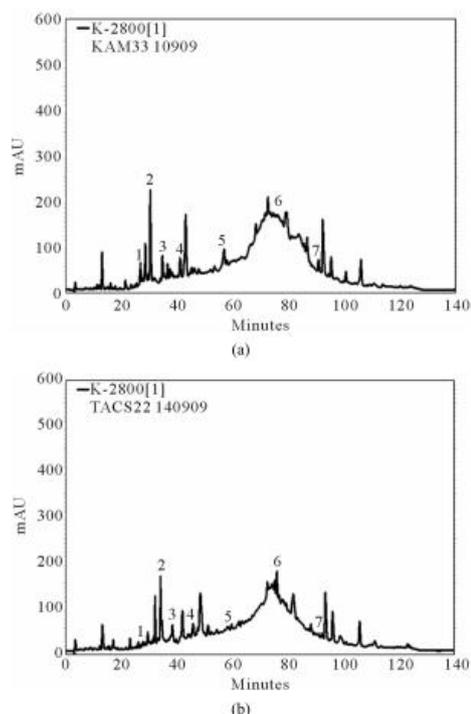


Figure 1. HPLC chromatogram of red grape extracts of two varieties (a) Merlot KAM 33 and (b) Cabernet Sauvignon TACS22. Peak identification: 1. Hydroxybenzoic acid, 2. Catechin, 3. Caffeic acid, 4. Chlorogenic acid, 5. P-coumaric acid, 6. Resveratrol, 7. Myricetin.

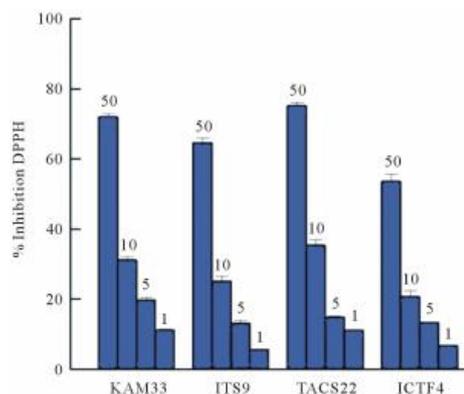


Figure 2. Free radical scavenging activity of red grapes varieties extracts measured by the DPPH assay.

in the scavenging activity of the grape phenolic extracts, **Table 6** presents the flavonoid and non-flavonoid contents of grape extracts with the inhibition of the free radical DPPH. A correlation between the flavonoid content and the inhibition of the DPPH radical was noticed in **Table 6**. In fact, it seems to be clear that the basic structure of compounds and other structural factors are very important in the scavenging mechanism [41]. **Table 6** showed that the scavenging effects of red grapes on DPPH radicals increased when the flavonoid concentration increase. This result showed that flavonoid are the main responsible of the scavenging activity of red grape extracts, which was also proved by many studies [42,43]. Earlier studies indicated that the ability of flavonoids to inactivate peroxy radicals was in the main better than the small phenolic antioxidants [44]. Other approaches also have established that the position and degree of hydroxylation is fundamental to the antioxidant activity of flavonoids [45].

Moreover, **Table 6** showed significant differences between scavenging activities of the different grapes cultivars. Cabernet sauvignon grapes extract and merlot have the greatest activity toward DPPH radical, but there were not the extracts with the highest phenolic content. Many authors confirmed that there is an insignificant correlation between free radical scavenging capacity and phenolic content, suggesting the presence of further phenolic components or interactions involved in the antioxidant potential [46].

In fact, in the phenolic pool of red grapes, there are some secondary compounds that are important for their antioxidant activity: Catechin and Epicatechin (flavan-3-ols), Quercetin [47,48] and its glycoside Rutin (flavonols), and trans-Resveratrol (stilbene). These compounds have been proven to be potent antioxidants and to have important biological, pharmacological and medicinal properties [49]. In our study, TACS22 and KAM33 represent the greatest scavenging activity due to their high concentration of these compounds. These extracts contain most of the flavonoids components identified by HPLC (**Tables 3** and **4**). A synergistic effect of these various phenolic compounds could explain the high scavenging activity of the TACS22 and KAM33 extracts. This effect was also discussed by Sun and Ho, 2005 [36] who proved that the synergistic effect of the antioxidants in the extracts should also be considered.

The Cabernet franc extract represents the lowest scavenging capacity, due to the absence of Quercetin and Catechin in this extract.

After studying the scavenging activity results, an antimicrobial studies on the efficacy of the phenolic compounds of Lebanese red grapes extracts to inactivate the bacterial and fungal strains should be discussed.

Table 6. Flavonoid, non-flavonoid and % of inhibition of the extracts.

Grape varieties	Codex	Flavonoid (mg/ml)	Non-flavonoid (mg/ml)	% inhibition DPPH
Merlot	KAM33	1.9 ^b	0.87 ^d	71 ^b
Syrah	ITS9	1.7 ^c	3.45 ^b	65 ^c
Cabernet Sauvignon	TACS22	2.5 ^a	4.35 ^a	75 ^a
Cabernet Franc	ITCF4	1.3 ^d	2.75 ^c	52 ^d

^{a,b,c,d}Marks with the same superscript letters were not significantly different within the same column (LSD test, 5% level).

3.3. Antimicrobial Assays

Due to the development of resistant microbial strains, the number of publications on antimicrobial activity of phenolic compound is increasing. The two most commonly used methods for the screening of the potential antimicrobial plant compounds were the disc diffusion test and the dilution plate assay. These techniques do not distinguish bactericidal and bacteriostatic effects and permit to determine just an approximate minimum inhibitory concentration (MIC) [50]. Recently, the microplate method was used to the screening of antimicrobial compounds. It provided a potentially useful technique for determining MICs of large numbers of test samples. It consisted on adding phenolic extract on the well of an ELISA tray filled with the exponentially growing culture (about 10⁸ colony-forming units/ml). The plate was incubated at 37°C for 18 h, agitated and the absorbance read after the incubation were subtracted of those read before, at the same wavelength (620 nm). The application of this method was not adequate on the grape extract. This is due to the fact that the red grape extract and the inoculum of bacteria read at the same absorbance which induces an interference of the color of the tested substance with the bacteria. In order to avoid this problem, a new quantitative method was adapted in our study to determine the antimicrobial efficacy of the Lebanese red grape extracts. It consists on counting the numbers of bacteria or yeast colonies that grow on each plate after the addition of the phenolic extract on the plate containing the bacterial or fungal culture.

Antimicrobial activities of antimicrobials agents (Chloramphenicol), phenolic standards (Resveratrol, BHT, Gallic acid) used as positive controls (at a concentration of 5 mg/mL) and red grape extracts against Gram-negative strains (*S. arizonae* and *E. coli*), Gram-positive strain (*L. monocytogenes*) and a fungal strain (*C. albicans*) were studied. The antimicrobial activity toward *S. arizonae* and *E. coli* (Gram-negative strains) is presented in **Figure 3**.

Figure 3 showed that Chloramphenicol presented the highest growth inhibition on Gram-negative strains, and that natural phenolic compounds has more effect than

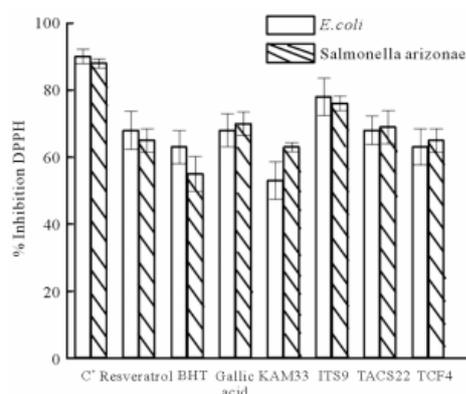


Figure 3. Antimicrobial activity of C⁺, phenolic standards and red grape extracts of vintage 2009 against Gram-negative strains (*Salmonella arizonae* and *Escherichia coli*).

synthetic phenolic compounds (BHT). It showed also that grapes extracts inhibited the growth of Gram-negative strains. But a different response degree was noticed between the two strains, depending on the tested microorganism to grape extracts. To explain the antimicrobial activity of phenolic extracts against Gram-negative, a relation between the phenolic content and the inhibition growth should be done. ITS9 and TACS22 exhibited more antimicrobial activity on Gram-negative strains than other grape extracts studied. This could be explained by the phenolic composition of these 2 extracts. ITS9 and TACS22 were rich in phenolic acids, known by its growth inhibition on Gram-negative strains. In fact, several studies showed the antimicrobial effect of phenolic acid on Gram-negative strain. Papadopoulou *et al.*, 2005; Butkhu L. *et al.*, 2010 [14,50] studying the action of phenolic compounds on Gram-negative bacteria found that phenolic acids are likely to exhibit antimicrobial activity toward Gram-negative strains. Moreover ITS9 and TACS22 are also rich in Resveratrol and Quercetin, known by their antibacterial effect against *E. coli* and *Salmonella* [51]. Therefore, a synergetic antimicrobial

effect noticed between phenolic acids, Resveratrol and Quercetin for ITS9 and TACS22, could explain their high antimicrobial activities toward Gram-negative strains. **Figure 3** showed also that red grape extracts presented for some samples higher inhibition than phenolic standards (at 5 mg/ml), and we should noticed that the content of these phenolic standards in grape extracts are (much lower than 5 mg/ml), which proves the efficiency of the synergetic effect of different phenolic compounds found in grape extracts.

In addition, KAM 33 had a growth inhibition towards *E. coli* but less than the others because he is poorer in Resveratrol which proved that the Resveratrol is one of the responsible of the inhibition effect on the *E. coli*. So the inhibition of *E. coli* by KAM 33 is due to a synergetic antimicrobial effect between Gallic acid, *p-Coumaric* acid and Quercetin. And a synergetic effect between Resveratrol and Cinamic acid explained the *E. coli* inhibition by ITCF4.

Within a comparison between the antimicrobial effect of grape extracts against *E. coli* and *S. arizonae*, we noticed that KAM 33 have more effect on *S. arizonae* than *E. coli*. Therefore, Resveratrol has probably more effect on *E. coli* than *S. arizonae* because while testing the phenolic standards resveratrol on the two bacterial strains, a more pronounced effect on *E. coli* was detectable. Furthermore, KAM 33 the poorer extract in Resveratrol presents a good inhibition against *S. arizonae*. But KAM 33 is rich in flavonoid content. So, flavonoids present a good inhibition on *S. arizonae*. This is also proved by the fact that ITCF4, the poorer extract in flavonoid content represent the lower inhibition of *S. arizonae*. This result showed the importance of the role of flavonoid component on the antimicrobial activity. Anastasiadi *et al.* (2009) [52] showed that flavonoids are known to possess antibacterial activities, which have been attributed to their interaction with extracellular soluble proteins and/or bacterial cell walls.

Antimicrobial activity of Chloramphenicol, phenolic standards and red grape extracts toward *L. monocytogenes* (Gram-positive strain) and *C. albicans* (yeast strain) are presented respectively in **Figures 4** and **5**.

Figure 5 showed that Amphotericin B presented the highest growth inhibition on *C. albicans*, and that a natural phenolic compound has more effect than synthetic phenolic compounds (BHT).

Furthermore, **Figures 4** and **5** showed that ITS9 and ITCF4 exhibit the same inhibition profile against *L. monocytogenes* and *C. albicans*. ITCF4 and ITS9 are not the richer compound in flavonoid content but are the richer in phenolic acid, mainly in Cinnamic acid, known by its inhibition activity against *L. monocytogenes* [53] and *C. albicans*. Phenolic acids are the most active com-

ponents in inhibiting the growth of pathogens. In fact, TACS22 does not contain Cinnamic acid but contains Hydroxybenzoic acid which has a near structure. But, Cinnamic acids, due to their propenoic side chain, are much less polar than the corresponding Hydroxybenzoic acids and this property might facilitate the transport of these molecules across the cell membrane, which might be related in turn to the stronger inhibitory effect [54]. For KAM 33, it is mainly *p-Coumaric* acid and Gallic acid which are responsible of the inhibition activity. This result is in agreement with several studies. Masquelier, 1988 [55] showed that *p-Coumaric* acid is particularly active against Gram-positive bacteria. Rodriguez Vaquero, 2007 [56] showed also that flavonoid are active

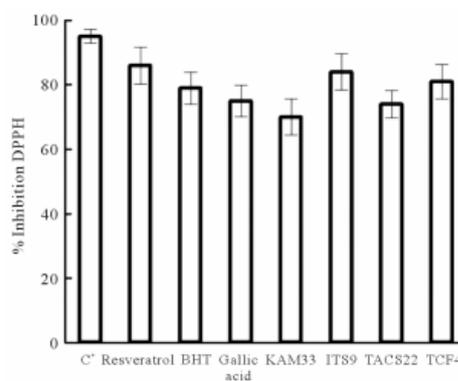


Figure 4. Antimicrobial activity of C⁺, phenolic standards and red grape extracts of vintage 2009 against Gram-positive strain.

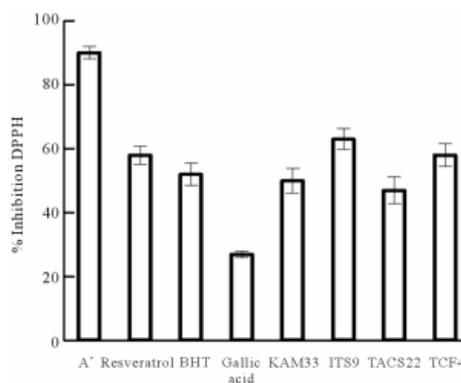


Figure 5. Antimicrobial activity of Amphotericin B (A⁺), phenolic standards and red grape extracts of vintage 2009 against a fungi strain.

Table 7. Antimicrobial activity of the extracts.

Grape varieties	Codex	% growth inhibition Gram-negative		% growth inhibition Gram-positive	% growth inhibition Fungi
		<i>E. coli</i>	<i>Salmonella arizonae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Candida albicans</i>
Merlot	KAM33	53 ^d	63 ^d	70 ^d	50 ^e
Syrah	ITS9	78 ^a	76 ^e	84 ^a	63 ^a
Cabernet Sauvignon	TACS22	68 ^b	69 ^b	74 ^c	47 ^d
Cabernet Franc	ITCF4	63 ^c	65 ^c	81 ^b	58 ^b

^{a,b,c,d}Marks with the same superscript letters were not significantly different within the same column (LSD test, 5% level).

against *L. monocytogenes*. These results showed that this observation may be rationalized considering the possible synergistic activity among polyphenols that is applied in the extracts.

The antimicrobial activity pattern of red grape extracts indicates that different classes of phenolic compounds are most likely to be the active substances in inhibiting the growth of *E. coli*, *S. arizonae*, *L. monocytogenes* and *C. albicans*. The summary of the antimicrobial activities of the red grape extracts against these bacterial and fungal strains is presented in **Table 7**. The values shown are the means from duplicate experimental performed twice on every strain. Significant differences were observed between antimicrobial activities of the different grapes cultivars.

Table 7 showed that most of the grape extracts exhibited some kind of antimicrobial activity against bacterial and fungal strains. But this response varies, depending on the tested microorganism to grape extracts. The *L. monocytogenes* was the most sensitive microorganism. In almost all grape extracts, the inhibition for *Listeria monocytogenes* (Gram-positive) was greater than for *E. coli* and *S. arizonae* (Gram-negative strains), indicating that the Gram-positive strain was more sensitive than the Gram-negative ones. Our results were in agreement with several studies done on the antimicrobial activity of wine extracts on Gram-positive strain and Gram-negative strains. Jayaprakaska *et al.* 2003, and Papadopoulou *et al.*, 2005, [14,28]. showed that phenolic extracts were more effective antibacterial fraction against Gram-positive bacteria when compared to Gram-negative bacteria. This observation can be attributed to differences in the structure of bacteria cell wall. The less complex structure of the cell wall in the Gram-positive bacteria makes it more permeable to the antimicrobial compounds.

Furthermore, **Table 7** showed that the tested bacteria showed more sensitivity to the investigated extracts than the yeast strain. In all tests, the inhibition of *C. albicans* was smaller than the inhibition measured for *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. arizonae*. It appears that the yeast strains were more resistant to wine phenolics than the

bacterial strains, which has been observed by other researchers too [14,28,50]. These different resistant patterns are likely to be related to differences in yeast and bacterial cell wall structures and in protein synthesis.

4. Conclusion

In the present work, we report the investigation on scavenging and antimicrobial activities of Lebanese grape extracts, to exploit their potential as natural preservatives. According to the results of the present screening study, we can emphasize on the great variability in the composition of phenolic compounds between red grape cultivars. It is well known that phenolic composition of grapes depends on multiple factors including climate, degree of ripeness, berry size and grapevine variety. Our study demonstrates that grape extracts present important scavenging and antimicrobial activities, corroborating the relevance of grape as a healthy alimentary product and a source of antioxidant and multiresistant bacteria drug substances. A synergistic effect of various phenolic compounds contained in the extracts could explain the different physiological activities observed during this work. Our results if well exploited could lead to the production of high added value of clean natural products. These could be made available to the food, pharmaceutical and cosmetics industries.

5. Acknowledgements

The project was funded by the Research Council of Saint Joseph University-Lebanon (Project FS27).

REFERENCES

- [1] L. D. Mello, M. D. P. T. Sotomayor and L. T. Kubota, "HRP-Based Amperometric Biosensor for the Polyphenols Determination in Vegetables Extract," *Sensors and Actuators B*, Vol. 96, No. 3, 2003, pp. 636-645. doi:10.1016/j.snb.2003.07.008
- [2] R. S. Jackson, "Wine Sciences," Academic Press, New York, 1994.

- [3] M. Pinelo, A. Arnous and A. S. Meyer, "Upgrading of Grape Skins: Significance of Plant Cell-Wall Structural Components and Extraction Techniques for Phenol Release," *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 17, No. 11, 2006, pp. 579-590.
[doi:10.1016/j.tifs.2006.05.003](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.05.003)
- [4] N. Balasundram, K. Sundram and S. Samman, "Phenolic Compounds in Plant and Agri-Industrial Byproducts: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses," *Food Chemistry*, Vol. 99, No. 1, 2006, pp. 191-203.
[doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.042](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042)
- [5] M. D'Archivio, C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini and R. Masella, "Polyphenols, Dietary Sources and Bioavailability," *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, Vol. 43, No. 4, 2007, pp. 348-361.
- [6] S. Gómez-Alonso, E. García-Romero and I. Hermosín-Gutiérrez, "HPLC Analysis of Diverse Grape and Wine Phenolics Using Direct Injection and Multidetector by DAD and Fluorescence," *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 20, No. 7, 2007, pp. 618-626.
[doi:10.1016/j.jfca.2007.03.002](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.03.002)
- [7] J. L. Robichaud and A. C. Noble, "Astringency and Bitterness of Selected Phenolics in Wine," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 53, No. 3, 1990, pp. 343-353. [doi:10.1002/jsfa.2740530307](https://doi.org/10.1002/jsfa.2740530307)
- [8] P. Ribereau-Gayon, "Accident Ferroviaire en Dordogne Port-Sainte-Foy, 8 Septembre 1997," *Médecine de Catastrophe—Urgences Collectives*, Vol. 1, No. 1, 1998, 23 pages. [doi:10.1016/S1279-8479\(98\)80010-4](https://doi.org/10.1016/S1279-8479(98)80010-4)
- [9] Y. Rolland, "Antioxydants Naturels Végétaux," *OCL*, Vol. 11, No. 6, 2004, pp. 419-424.
- [10] I. Gülçin, Z. Huyut, M. Elmastaş and H. Y. Aboul-Enein, "Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Tannic Acid," *Arabian Journal of Chemistry*, Vol. 3, No. 1, 2010, pp. 43-53. [doi:10.1016/j.arabjc.2009.12.008](https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2009.12.008)
- [11] R. Carpenter, M. N. O'Grady, Y. C. O'Callaghan, N. M. O'Brien and J. P. Kerry, "Evaluation of the Antioxidant Potential of Grape Seed and Bearberry Extracts in Raw and Cooked Pork," *Meat Science*, Vol. 76, No. 4, 2007, pp. 604-610. [doi:10.1016/j.meatsci.2007.01.021](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.01.021)
- [12] A. T. Serra, A. Matias, V. M. Nunes, M. C. Leitão, D. Brito, R. Bronze, S. Silva, A. Pires, M. T. Crespo, M. V. San Romão and C. M. Duarte, "In Vitro Evaluation of Olive- and Grape-Based Natural Extracts as Potential Preservatives for Food," *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Vol. 9, No. 3, 2008, pp. 311-319.
[doi:10.1016/j.ifset.2007.07.011](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.07.011)
- [13] E.-Q. Xia, G.-F. Deng, Y.-J. Guo and H.-B. Li, "Biological Activities of Polyphenols from Grapes," *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 11, No. 2, 2010, pp. 622-646. [doi:10.3390/ijms11020622](https://doi.org/10.3390/ijms11020622)
- [14] C. Papadopoulou, K. Soulti and I. Roussis, "Antimicrobial Activity of Wine Phenolic Extracts," *Food Technology and Biotechnology*, Vol. 43, No. 1, 2005, pp. 41-46.
- [15] A. Furiga, A. Lonvaud-Funel and C. Badet, "In Vitro Study of Antioxidant Capacity and Antibacterial Activity on Oral Anaerobes of a Grape Seed Extract," *Food Chemistry*, Vol. 13, No. 4, 2009, pp. 1037-1040.
[doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.059](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.059)
- [16] A. Ojeil, N. El Darra, Y. El Hajj, P. B. Mouncef, T. J. Rizk and R. G. Maroun, "Identification et Caractérisation de Composés Phénoliques Extraits Du Raisin Château KSARA," *Lebanese Science Journal*, Vol. 11, No. 2, 2010, pp. 117-131.
- [17] P. Chrétien and J. Marsault, "Polyphenolic Potential of the Harvest, Impacts (Analytical and Organoleptic) of Harvest Dates on the Vinification of Red Wine Cabernet Francin Anjou," IFV Unité, d'Angers, 2003.
- [18] S. Imbeault, S. Parent, J. F. Blais, M. Lagace and C. Uhlund, "Use of Bacteriophages to Control the Populations of *Aeromonas salmonicida* Resistant to Antibiotic," *Journal of Water Science*, Vol. 19, 2006, pp. 275-282.
- [19] Y. El Hajj, N. Louka, C. Nguyen and R. G. Maroun, "Low Cost Process for Phenolic Compounds Extraction from Cabernet Sauvignon Grapes (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon). Optimization by Response Surface Methodology," *Food and Nutrition Sciences*, Vol. 3, 2012, pp. 89-103. [doi:10.4236/fns.2012.31014](https://doi.org/10.4236/fns.2012.31014)
- [20] K. Slinkard and V. L. Singleton, "Total Phenol Analyses: Automation and Comparison with Manual Methods," *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 28, No. 1, 1977, pp. 49-55.
- [21] P. Ribereau-Gayon and E. Stonestreet, "Assays of Anthocyanins in Red Wine," *Bulletin Société Chimiques Française*, Vol. 9, No. 419, 1968, pp. 2649-2652.
- [22] P. Ho, T. A. Hogg and M. C. M. Silva, "Application of a Liquid Chromatography for the Determination of Phenolic Compounds and Furans in Fortified Wines," *Food Chemistry*, Vol. 64, No. 1, 1999, pp. 115-122.
[doi:10.1016/S0308-8146\(98\)00115-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00115-0)
- [23] J. P. Rauha, S. Remes, M. Heinonem, A. Hopia, M. Kahkonen, T. Kujala, K. Pihlaja, H. Vuorela and P. Vuorela, "Antimicrobial Effects of Finnish Plant Extracts Containing Flavonoids and Other Phenolic Compounds," *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 56, No. 1, 2000, pp. 3-12.
- [24] J. A. Pereira, A. P. G. Pereira, I. C. F. R. Ferreira, P. Valentao, P. B. Andrade, R. Seabra, L. Estevinho and A. Bento, "Table Olives from Portugal: Compounds Antioxidant Potential, and Antimicrobial Activity," *Journal Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 54, No. 22, 2006, pp. 8425-9431. [doi:10.1021/jf061769j](https://doi.org/10.1021/jf061769j)
- [25] A. T. Borchers, C. L. Keen and M. E. Gerstwin, "Mushrooms, Tumors and Immunity: An Update," *Experimental Biology and Medicine*, Vol. 229, No. 5, 2004, pp. 393-406.
- [26] M. A. Gyamfi, M. Yonamine and Y. Aniya, "Free-Radical Scavenging Action of Medicinal Herbs from Ghana: *Thonningia Sanguine* on Experimentally Induced Liver Injuries," *General Pharmacology: The Vascular System*, Vol. 32, No. 6, 1999, pp. 661-667.
[doi:10.1016/S0306-3623\(98\)00238-9](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(98)00238-9)
- [27] S. Kallithraka, A. A.-A., Mohdaly, D. P. Makris and P. Kefalas, "Determination of Major Anthocyanin Pigments in Hellenic Native Grape Varieties (*Vitis vinifera* sp.): Association with Antiradical Activity," *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 18, No. 5, 2005, pp. 375-

386. doi:10.1016/j.jfca.2004.02.010
- [28] G. K. Jayaprakasha, T. Selvi and K. K. Sakariah, "Antibacterial and Antioxidant Activities of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Extracts," *Food Research International*, Vol. 36, No. 2, 2003, pp. 117-122. doi:10.1016/S0963-9969(02)00116-3
- [29] P. Iacopini, M. Baldi, P. Storchi and L. Sebastiani, "Catechin, Epicatechin, Quercetin, Rutin and Resveratrol in Red Grape: Content, *In Vitro* Antioxidant Activity and Interactions," *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 21, No. 8, 2008, pp. 589-598. doi:10.1016/j.jfca.2008.03.011
- [30] J. M. Ryan and E. Revilla, "Anthocyanin Composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo Grapes at Different Stages of Ripening," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 51, No. 11, 2003, pp. 3372-3378. doi:10.1021/jf020849u
- [31] F. Pomar, M. Novo and A. Masa, "Varietal Differences among the Anthocyanin Profiles, of 50 Red Table Grape Cultivars Studied by High Performance Liquid Chromatography," *Journal of Chromatography A*, Vol. 1094, No. 1-2, 2005, pp. 34-41. doi:10.1016/j.chroma.2005.07.096
- [32] P. Gatto, U. Vrhovsek, J. Muth, C. Segala, C. Romualdi and P. Fontana, "Ripening and Genotype Control Stilbene Accumulation in Healthy Grapes," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 56, No. 24, 2008, pp. 11773-11785. doi:10.1021/jf8017707
- [33] N. Vivas, N. St-Cricq de Gaulejac, T. Demptos and Y. Glories, "The Phenolic Ripening of Red Grapes and the Relationship with the Quality of Wine, Comparison of the Cultivars," Merlot and Tempranillo, Bordeaux II, 1998.
- [34] S. R. Segade, E. S. Vázquez and E. D. Losada, "Influence of Ripeness Grade on Accumulation and Extractability of Grape Skin Anthocyanins in Different Cultivars," *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 21, No. 8, 2008, pp. 599-607. doi:10.1016/j.jfca.2008.04.006
- [35] M. Gil and J. Yuste, "Phenolic Maturity of Tempranillo Grapevine Trained as Goblet, under Different Soil and Climate Conditions in the Dueri Valley Area," *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, Vol. 38, No. 1, 2004, pp. 81-88.
- [36] T. Sun and C. T. Ho, "Antioxidant Activities of Buckwheat Extracts," *Food Chemistry*, Vol. 90, No. 4, 2005, pp. 743-749. doi:10.1016/j.foodchem.2004.04.035
- [37] Y. Yilmaz and R. T. Toledo, "Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins: Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin and Gallic Acid," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52, No. 2, 2004, pp. 255-260. doi:10.1021/jf030117h
- [38] R. R. Montealegre, R. R. Peces, J. L. C. Vozmediano, J. M. Gascuena and E. G. Romero, "Phenolic Compounds in Skin and Seeds of Ten Grape *Vitis vinifera* Varieties Grown in a Warm Climate," *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 19, No. 6-7, 2006, pp. 687-693. doi:10.1016/j.jfca.2005.05.003
- [39] Y. Cai, M. Sun and H. Corke, "Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 51, No. 8, 2003, pp. 2288-2294. doi:10.1021/jf030045u
- [40] T. Saldani, M. Ouerghemmi, I. Aidi Wannes, W. Ksouri, R. Zemni, H. Marzouk, B. Elyes and M. Kchouk, "Valorization of Three Varieties of Grape," *Industrial Crops and Products*, Vol. 30, No. 2, 2009, pp. 292-296. doi:10.1016/j.indcrop.2009.05.007
- [41] M. Sadeghipour, R. Terreux and J. Phipps, "Flavonoids and Tyrosine Nitration: Structure-Activity Relationship Correlation with Enthalpy of Formation," *Toxicology in Vitro*, Vol. 19, No. 2, 2005, pp. 155-165. doi:10.1016/j.tiv.2004.06.009
- [42] A. Ghiselli, M. Nardini, A. Baldi and C. Scaccini, "Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated from an Italian Red Wine," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 46, No. 2, 1998, pp. 361-367. doi:10.1021/jf970486b
- [43] M. Ebrahimzadeh, S. M. Nabavi, S. F. Nabavi, F. Bahramian and A. Bekhradnia, "Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of *H. officinalis*, *L. var. augustifolius*, *V. odorata*, *B. hyrcana* and *C. speciosum*," *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 23, No. 1, 2010, pp. 29-34.
- [44] N. Uri, "Mechanism of Antioxidation," In: W. O. Lundberg, Ed., *Autoxidation and Antioxidants*, Intersciences, Vol. 133, New York, 1961.
- [45] D. E. Pratt and B. J. F. Hudson, "Natural Antioxidants Not Exploited Commercially in Food Antioxidants," In: B. J. F. Hudson, Ed., *Elsevier Applied Science, London*, 1990, pp. 171-191.
- [46] G. Ruberto, A. Renda, C. Daquino, V. Amico, C. Spatafora, C. Tringali and N. D. Tommasi, "Polyphenol Constituents and Antioxidant Activity of Grape Pomace Extracts from Five Sicilian Red Grape Cultivars," *Food Chemistry*, Vol. 100, No. 1, 2007, pp. 203-210. doi:10.1016/j.foodchem.2005.09.041
- [47] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller and G. Paganga, "Structure-Antioxidant Activity Relationship of Flavonoids and Phenolic Acids," *Free Radicals in Biology and Medicine*, Vol. 20, No. 7, 1996, pp. 933-956. doi:10.1016/0891-5849(95)02227-9
- [48] D. Villano, M. S. Fernandez-Pachon, M. L. Moya, A. M. Troncoso and M. C. Garcia-Parrilla, "Radical Scavenging Ability of Polyphenolic Compounds towards DPPH Free Radical," *Talanta*, Vol. 71, No. 1, 2007, pp. 230-235. doi:10.1016/j.talanta.2006.03.050
- [49] T. Maier, A. Schieber, D. R. Kammerer and R. Carle "Residues of Grape (*Vitis vinifera* L.) Seed Oil Production as a Valuable Source of Phenolic Antioxidants," *Food Chemistry*, Vol. 112, No. 3, 2009, pp. 551-559. doi:10.1016/j.foodchem.2008.06.005
- [50] L. Butkhup, S. Chotvannakul, R. Gaensakoo, P. Prathepha and Samappito, "Study of the Phenolic Composition of Shiraz Red Grape Cultivar (*Vitis vinifera* L.) Cultivated in North-Eastern Thailand and Its Antioxidant and Antimicrobial Activity," *South African Journal for Enology and Viticulture*, Vol. 31, No. 2, 2010.
- [51] G. Bisignano, A. Tomaino, R. Lo Cascio, G. Crisafi, N. Uccella and A. Saija, "On the *In Vitro* Antimicrobial Ac-

- tivity of Oeluropein and Hydroxytyrosol," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 51, No. 8, 1999, pp. 971-974. doi:10.1211/0022357991773258
- [52] M. Anastasiadi, N. G. Chorianopoulos, G. J. Nychas and S. A. Haroutounian, "Antilisteral Activities of Polyphenol-Rich Extracts of Grapes and Vinification Byproducts," *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 57, No. 2, 2004, pp. 457-463. doi:10.1021/jf8024979
- [53] A. M. Wen, P. Delaquis, K. Stanich and P. Toivonen, "Antilisterial Activity of Selected Phenolic Acids," *Food Microbiology*, Vol. 20, No. 3, 2003, pp. 305-311. doi:10.1016/S0740-0020(02)00135-1
- [54] F. M. Campos, J. A. Couto and T. A. Hogg, "Influence of Phenolic Acids on Growth and Inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*," *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 94, No. 2, 2003, pp. 167-173. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01801.x
- [55] J. Masquelier, "Physiological Effects of Wine, Its Share in Alcoholism," *Bulletin de l'Office International de la Vigne et du Vin*, Vol. 61, 1988, pp. 555-577.
- [56] M. J. Rodriguez-Vaquero, M. R. Alberto and M. C. Manca-de-Nadra, "Influence of Phenolic Compounds from Wines on the Growth of *Listeria monocytogenes*," *Food Control*, Vol. 18, No. 5, 2007, pp. 587-593. doi:10.1016/j.foodcont.2006.02.005

Chapitre 5 : Evaluation de l'effet des traitements par champs électriques pulsés sur l'extraction phénolique des moûts pendant la macération préfermentaire à froid et la fermentation en rouge

Ce chapitre exposera les résultats portant sur l'extraction des composés phénoliques durant la macération préfermentaire à froid et la vinification en rouge, intensifiée par différents prétraitements.

En effet, durant la vinification, la paroi constitue un frein à la diffusion de composés recherchés dans les vins comme les composés phénoliques. De ce fait, on ne retrouve dans le vin qu'une fraction du potentiel existant dans le raisin. D'où, le recours à de nombreux procédés d'intensification dans le but d'améliorer l'extraction des composés phénoliques durant la vinification en rouge tels que la macération préfermentaire à froid, les extractions assistées par enzymes pectolytiques, ultrasons, microondes, la thermovinification et la Flash détente.

Dans cette partie étude, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'impact d'un prétraitement par champs électriques pulsés pendant l'étape de macération à froid (MPF). La teneur en composés phénoliques ainsi que les cinétiques d'extraction ont été évaluées pendant la fermentation en rouge. Cette technique a été développée et étudiée au sein de notre laboratoire et a montré son efficacité sur d'autres types de matière première. Elle permet d'endommager les membranes et/ou parois cellulaires et accélèrent ainsi l'extraction de composés intracellulaires. Après l'application des CEP en tant que prétraitement en amont de la macération préfermentaire à froid et la vinification en rouge, une comparaison entre différents prétraitements appliqués avant la fermentation en rouge a été menée.

L'impact de ces traitements sur l'amélioration de l'extraction sera suivi par l'établissement de cinétiques d'extraction des solutés totaux (mesures du °Brix), de la couleur et des composés phénoliques (dosages spectrophotométriques et HPLC). L'étude sera tout d'abord réalisée en appliquant des CEP en amont de la phase préfermentaire à froid sur deux variétés de raisins (partie 5.1). Par la suite, une comparaison de trois prétraitements, les CEP, les ultrasons et un chauffage modéré a été menée en amont de la vinification en rouge dans la partie 5.2. La partie 5.3 sera consacrée à une autre comparaison en amont de la vinification en rouge; c'est une

comparaison entre les CEP, la thermovinification et l'ajout d'enzymes pectolytiques. Trois articles rédigés en langue anglaise présenteront les résultats obtenus.

5.1. Evaluation de l'effet des traitements par champs électriques pulsés sur l'extraction phénolique des moûts pendant la macération pré-fermentaire à froid

L'article « Pulsed Electric Field Assisted Cold Maceration of Cabernet Franc and Cabernet Sauvignon Grapes » a été accepté dans "*American Journal Of Enology And Viticulture*". Cet article porte essentiellement sur le prétraitement de deux variétés de raisins par champs électriques pulsés en amont de la phase pré-fermentaire à froid.

5.1.1. Résumé de l'article

La macération préfermentaire à froid (MPF) est une étape de la vinification en rouge qui consiste à maintenir la vendange foulée et éraflée à une basse température (5 à 15°C) pendant 3 à 6 jours. Elle permet de favoriser une extraction des composés phénoliques. Des études récentes ont montré que le traitement par champs électriques pulsés (CEP) augmente le rendement d'extraction et améliore la qualité des extraits (jus de raisins). L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet d'un prétraitement électrique (CEP) des raisins rouges sur le contenu phénolique, l'intensité colorante et l'activité antiradicalaire du moût obtenu tout au long de la MPF (6 jours à 6°C).

Le prétraitement par CEP a été appliqué sur deux variétés de raisins (Cabernet Franc et Cabernet Sauvignon), en utilisant soit une haute intensité du champ ($E=5000$ V/cm) soit des intensités modérées ($E = 400-800$ V/cm). Durant notre étude, les raisins ont été pesés ($m = 750$ g), égrappés manuellement, soumis à un traitement par CEP puis placés dans des flacons de 1L pendant 6 jours à 6 °C. A la fin de la MPF, l'intensité colorante ($IC = DO 420 + 520 + 620$ nm), et la concentration en composés phénoliques $Y_{(e)}$ (g Equivalent d'acide gallique (GAE)/ 100 g de matière sèche (MS)) ont été mesurées par spectrophotométrie. L'évaluation des propriétés antiradicalaires a été effectuée par la méthode au DPPH (1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl). Une identification des composés phénoliques présents dans les moûts a été effectuée par CLHP. Un modèle empirique simplifié a été utilisé pour décrire la cinétique d'extraction des composés phénoliques.

Les résultats montrent que l'application des CEP sur les deux variétés de raisins (Cabernet Sauvignon et Cabernet Franc) n'affecte pas les valeurs de pH et de °Brix au cours des 6 jours de la MPF.

Les prétraitements par CEP ont montré un effet positif sur l'amélioration de la couleur. Le meilleur prétraitement par CEP (5000 V/cm) a abouti à une amélioration respectivement de 75% et de 68% de l'IC des moûts de CF et de CS. D'où, une meilleure efficacité des CEP sur le CF que sur le CS, ce qui met en évidence la variabilité de l'effet des CEP par rapport à la variété de raisins. De plus, le traitement par CEP avec intensité modérée ($E=400$ & 800 V/cm) ont amélioré l'IC de façon similaire pour une courte ou une longue durée ($t=50-100$ ms). Ce résultat a été prouvé sur les deux variétés de raisins. D'où, l'importance de réaliser des traitements de faibles durées afin de réduire les consommations énergétiques. Les CEP ont abouti aussi à une amélioration de l'extraction des anthocyanes dans les moûts traités, ce qui explique l'augmentation de l'IC. Probablement, la majorité des anthocyanes ont été copigmentés sous forme de complexes colorés, ce qui augmentait l'IC.

Les prétraitements par CEP ont montré un effet positif sur l'extraction des composés phénoliques. Le meilleur prétraitement par CEP (5000 V/cm) a abouti à une amélioration respective de 48% et de 43% des composés phénoliques des moûts de CF et de CS. En effet, les CEP influencent l'extraction des composés phénoliques en augmentant la perméabilité de la membrane cellulaire. Vu que la majorité des composés phénoliques sont présents dans l'hypoderme de la baie de raisins, les traitements par CEP entraînent la formation de pores au niveau des membranes cellulaires, permettant ainsi la libération du contenu intracellulaire.

De plus, les résultats ont montré que l'application des CEP en amont de la MPF réduit la durée de cette macération. Un modèle cinétique simplifié corrèle bien avec les valeurs expérimentales. Les valeurs de la constante cinétique (k) et de la teneur en polyphénol maximale (Y_{∞}) augmentent avec l'augmentation de l'intensité de traitement et de la durée des CEP. La valeur de k est proportionnelle à l'énergie du traitement. Le CEP (5000 V/cm, 1 ms) augmente la constante d'extraction de 68%.

Une consommation énergétique de 6.2 kJ/kg est suffisante pour atteindre une cinétique d'extraction rapide ($k=0.692s^{-1}$) pour la MPF de CS, alors que la cinétique d'extraction des raisins de CF est plus rapide ($k= 0.68s^{-1}$) avec une consommation énergétique de 48 kJ/kg.

La composition phénolique des moûts traités par CEP (5000 V/cm, 1 ms) et non traités à la fin de MPF a été déterminée par CLHP. Les profils CLHP de ces moûts sont assez semblables. Huit principaux composés ont été identifiés et quantifiés par comparaison de leur spectre UV-visible, des temps de rétention et des spectres de masses avec des composés de référence. Les CEP améliorent différemment l'extraction des différents composés phénoliques à partir des deux variétés de raisins CF et CS. Il s'agit de composés flavonoïdes. La quercétine 3-β-D glucoside et l'épicatéchine gallate ont été amélioré respectivement de 100% et 62.5% après la MPF des raisins traités de CF, alors que pour les raisins de CS, ces valeurs ont été améliorées respectivement de 74.2% et 42.4%. Pour les composés non-flavonoïdes, le resvératrol a été augmenté respectivement de 65.7 et 57.9 % à la fin de la MPF des CF et CS.

Concernant les propriétés antiradicalaires, les échantillons traités par CEP possèdent un pouvoir anti-radicalaire plus fort que le témoin. Les pourcentages d'inhibition des moûts traités par CEP (5000 V/cm, 1 ms) est respectivement de 42.5 et 52.5 % pour les extraits de CF et de CS. Cette amélioration est due à l'augmentation de l'extraction des composés flavonoïdes dotés d'un fort pouvoir antiradicalaire.

Le lancement de la fermentation alcoolique suite à la MPF, montre que le CEP (5000V/cm) améliore toujours l'extraction des composés phénoliques du vin obtenu (14-11%) et de l'IC (15-32%) respectivement pour les raisins de CF et de CS.

En conclusion, les prétraitements par CEP améliorent l'intensité colorante et le contenu en anthocyanes et accélèrent la cinétique d'extraction des composés phénoliques durant la MPF. Les extraits traités par CEP montrent de meilleurs pouvoirs antiradicalaires. Les vins élaborés à partir de raisins de CF et de CS prétraités par CEP en amont de la MPF montrent de meilleurs contenus phénoliques et couleurs que les raisins témoins. La technique proposée du traitement par CEP durant la MPF semble être prometteuse pour des applications industrielles afin de

réduire la durée de la MPF avec une meilleure qualité des composés phénoliques du vin rouge élaboré.

5.1.2. ARTICLE: Pulsed Electric Field Assisted Cold Maceration of Cabernet Franc and
Cabernet Sauvignon Grapes

(Voir le manuscrit qui suit)

Pulsed Electric Field Assisted Cold Maceration of Cabernet Franc and Cabernet Sauvignon Grapes

Nada EL DARRA^{a,b}, Nabil GRIMI^a, Eugène VOROBIEV^a, Richard G.MAROUN^b, Nicolas LOUKA^b

^aUniversité de Technologie de Compiègne, Département de Génie des Procédés Industriels, Laboratoire Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable, (UTC/ESCOM, EA 4297 TIMR), Centre de Recherche de Royallieu, B.P. 20529-60205 Compiègne Cedex, France
nada.el-darra@utc.fr, nabil.grimi@utc.fr, eugene.vorobiev@utc.fr

^bUniversité Saint-Joseph de Beyrouth, Faculté des sciences, Rue de Damas, BP.17-5208, Mar Mikhael 1104, 2020, Beyrouth 1107 2050, Liban
rmaroun@fs.usj.edu.lb, nicolas.louka@fs.usj.edu.lb

Contact information about Corresponding Author:

Nada El DARRA
UTC / ESCOM
EA 4297 TIMR
F-60200 Compiègne, France
Fax number: +33.3.44.23.46.86
E-mail address: nada.el-darra@utc.fr

Short version of title:

PEF assisted cold maceration of red grapes

Abstract

Effect of pulsed electric field (PEF) treatment on the cold maceration (6 days at 6°C) of Cabernet Franc (CF) and Cabernet Sauvignon (CS) grapes is investigated. The qualitative parameters of extracts (pH, °Brix, color intensity), their anthocyanins and total polyphenols content, and free radical scavending activity were determined during the whole period of cold maceration. The high PEF-treatment (5 kV/cm, 1 ms, 48 kJ/kg) enhances significantly extraction of flavonoids (quercetin 3-β-D glucoside and epicatechin gallate) and non-flavonoid (resveratrol) components after the cold maceration of red grapes. Such PEF treatment also enhances the color intensity (on 75 and 68% respectively for the CF and CS grapes), and increases the anthocyanin content of extract (from 87 to 172 mg/L for CF and from 168 to 269 mg/L for CS grapes). The moderate PEF treatments: 400 and 800 V/cm, duration 50-100 ms, are less effective for the polyphenols extraction, but consumes less energy (3- 40 kJ/kg). The wines obtained from PEF treated Cabernet Franc and Cabernet Sauvignon grapes have higher phenolic content and color intensity during the alcoholic fermentation period than wines obtained from the untreated grapes.

Keywords: anthocyanin; cold maceration; color intensity; phenolic compounds; pulsed electric fields; wine.

1. Introduction

Phenolic compounds influence essentially on the color, taste and aging properties of red wines (Monagas et al. 2005a, Kovaè et al. 1995, Jackson, 2000, Cheynier et al. 2006). Anthocyanins and tannins are the main phenolic compounds responsible for the sensorial characteristics of red wines. Several studies have highlighted that phenolics by virtue of their scavenging and antioxidant capacity, participate in the prevention of various chronic diseases in which an oxidative stress is potentially involved (Gülçin et al. 2010).

Phenolic content of red wine depends not only on the grape composition, but also on the winemaking conditions. Phenolic compounds are mainly located in the grape skin exerting a high resistance to the mass transfer. That is why in the traditional winemaking, recommending the maceration at 30°C, only a fraction of phenolic compounds can be extracted (Monagas et al. 2005a).

Numerous studies have been focused on prefermentative techniques able to weaken the cell walls and to increase phenolic concentration in red wines during vinification (Sun et al. 2001, Sacchi et al. 2005, López et al. 2008b). The effects of thermal treatments, such as thermovinification (Auw et al. 1996, Kelebek et al. 2007) and flash release (Escudier et al. 2002) have been tested to elaborate red wines. However, the heating imply high energy consumption and can degrade the product quality (Spranger et al. 2004).

The prefermentative cold maceration or cold soak consists in maintaining the crushed grapes at the low temperatures (4–15 °C) for a variable period (from one to several weeks) in order to delay the beginning of the fermentation (Ribereau-Gayon, 1998). Many studies have discussed the the impact of cold maceration (CM) on the quality of wines. Alvarez et al. 2006, demonstrates increased polyphenolic content, aromatic content, and anthocyanin concentration in wines obtained after Monastrell grape cold maceration. Parenti et al. 2004, shows an increase of color and flavor intensities in the wine obtained after Sangiovese grape

cold maceration. The low temperature weakens the grape skin structure, allowing a better extraction of the phenolic compounds and a release of intensely colored juice (Blouin and Peynaud, 2001, Retali et al. 2004). Generally, the CM was designed as an alternative to the traditional maceration for increasing the extraction of polyphenols, aromas, anthocyanins, enhancing the color and tannic intensity (Norman, 1992). However, a CM requires special equipment (cold-storage room, tanks with cooling jackets) and it is energy costly (Retali et al. 2004).

Recently, the novel electrotechnologies such as pulsed electric field (PEF) (Praporscic et al. 2007, Anderson et al. 2009, Puértolas et al. 2010a, Grimi et al. 2009, Boussetta et al. 2009b, López et al. 2008a, Corrales et al. 2008, Vorobiev and Lebovka, 2008, 2010) and high voltage electrical discharges (Boussetta et al. 2009a, 2011) have been used as a pre-treatment for effective weakening or disintegration of fruit and vegetable tissues. Electrical treatments provoke a membrane permeabilisation, which is a key factor for the mass transfer enhancement (Grimi et al. 2011). The PEF treatment was recently studied for the phenolic extraction during traditional maceration and fermentation of red must. Lopez et al. 2008a, b, Puértolas et al. 2010a, b, c, Donsi et al. 2010 and Delsart et al. 2012 have shown that the color intensity, the anthocyanin concentration and the total polyphenol index were increased after the high PEF treatment (2-10 kV/cm). Puértolas et al. 2010c has also shown that the efficiency of polyphenols extraction depends on the grape variety.

The main goal of this work is to study the impact of PEF treatment parameters on the phenolic content, color intensity, and scavenging activity of must obtained during CM (6 days at 6°C) of two red grape varieties (Cabernet Sauvignon and Cabernet Franc). The studied grapes were treated using both high (5000 V/cm) and moderate (400 and 800V/cm) PEF strengths. A simplified empirical model is used to describe the kinetics of polyphenols extraction. The energy consumption is estimated for different treatment conditions.

2. Materials and methods

2.1. Plant Material

Two different grape varieties were tested, Cabernet Sauvignon (CS) and Cabernet Franc (CF), which were both manually harvested at optimum maturity during 2010 from vineyards in the province of Bekaa (Lebanon). The dry matter content in the grape pomace was 25.5 ± 0.5 wt %. Must characteristics are given in table 1.

Table 1. Grapes characteristics at harvest

	pH	°Brix	TA (g H ₂ SO ₄ /L)
Cabernet Franc	3.6	16.5	4.2
Cabernet Sauvignon	3.4	16	4.5

The grapes of each variety were weighed ($m= 750$ g), destemmed manually, crushed and then placed in 1000 mL flasks to carry out the cold maceration processes for 6 days in a cold-storage room at 6°C.

2.2. Pulsed electric field treatment

The experiments were carried out using a PEF-generator (5kV-1kA, Hazemeyer Company, Saint-Quentin, France) for the treatments with moderate electric field strengths ($E=400$ and 800 V/cm) (Fig.1.a), and PEF-generator (40kV-10kA, Tomsk Polytechnic University Russia) (Fig.1.b) for the treatments with high electric field strength ($E=5000$ V/cm).

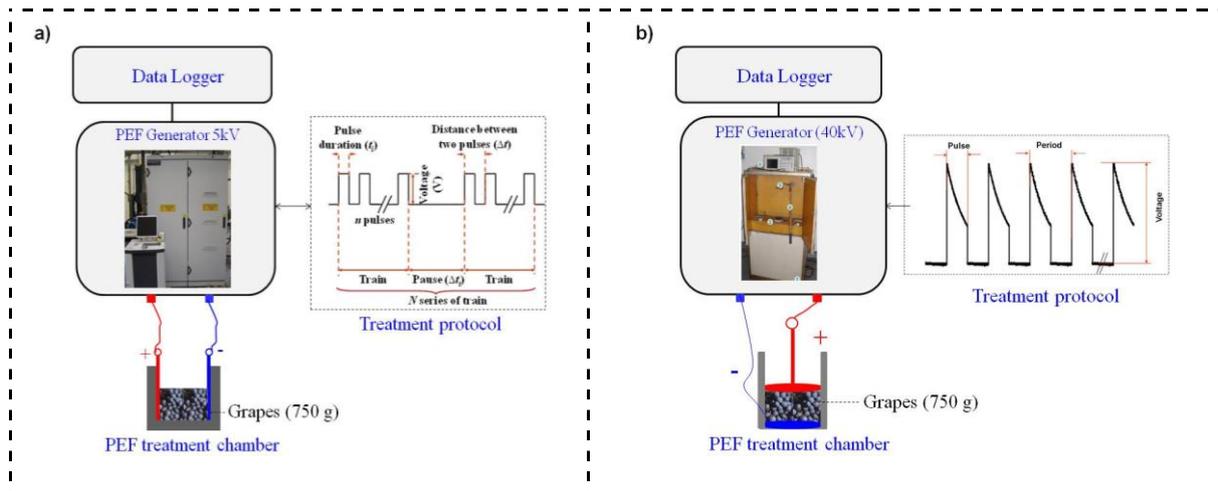


Figure 1. Schematic representation of the experimental setup and the corresponding treatment protocol. PEF-Generator (5kV-1 kA) (fig 1.a) and PEF-generator 40 kV-10kA (fig 1.b).

2.2.1. Treatment with moderate electric field strengths

A sample with a mass of $m = 750$ g grape (solids + liquids issued from crushed red grapes) was placed in the rectangular PEF treatment cell supplied by two plane stainless electrodes (70×60 mm). The distance d between the electrodes can be varied from 1 to 6 cm. The value of the electric field strength E was evaluated as $E = U/d$, where U is the applied voltage.

The PEF generator (5kV-1kA) provided pulses of a near-rectangular shape (Figure 1a). The total time of PEF treatment was calculated as $t_{PEF} = n.N.t_i$, where N ($=5-10$) is the number of series of pulses, n ($=100$) is the number of pulses in each series, t_i ($=100 \pm 1 \mu s$) is the pulse duration and the time intervals between two series of pulses is Δt_i ($= 10$ s). The data were collected using a data logger and specific software, adapted by Service Electronique UTC, Compiègne, France.

2.2.2. Treatment with high electric field strength

A sample with a mass of $m = 750 \pm 5$ g (solids + liquids issued from crushed red grapes) was placed in the cylindrical one-litre treatment chamber. Both of the grounded plate electrodes of

this chamber were a stainless disk of 100 mm in diameter. The distance between the electrodes was 80 mm to produce the high PEF of 5000V/cm (estimated from the maximum peak voltage).

The PEF generator (40 kV, 10 kA) provided pulses of an exponential form (Figure 1b).

The effective time of PEF treatment was estimated as :

$$t_{PEF} = n.t_i \quad \text{Eq. 1}$$

where n (=100) is the number of pulses and t_i ($\approx 9 \pm 1 \mu\text{s}$) is the pulse duration. The pulse width is defined as the time until decay to 37% for exponential decay pulses (Toepfl et al. 2006).

These conditions correspond to the electrical energy input of $W=48 \text{ kJ/kg}$ (Table 2).

The energy consumption of the PEF treatment (kJ/kg) was calculated as :

$$W = \frac{\int_0^t UI dt}{m} \quad \text{Eq. 2}$$

where U is the PEF voltage (V), I is the current intensity (A), t is the time (s), and m is the mass of the must (kg).

The energy inputs (kJ/kg) estimated for different values of t_{PEF} are summarized in Table 2.

Table 2. Electric field strength E (V/cm), treatment time t_{PEF} (ms) and electrical energy input W (kJ/kg).

E (V/cm)	t_{PEF} (ms)	Energy (kJ/kg)
0	0	0.0
400	50	3.1
400	100	6.2
800	50	18.1
800	100	41.6
5000	1	48.0

2.3. Cold prefermentative maceration (CM).

Untreated and PEF-treated samples were placed in 1000mL flasks for the 6-days cold maceration in a cold storage-room (ZANOTTI FRANCE) at 6°C , with a refrigerating

capacity of 2.7 kW for 10m³. Must samples (volume = 1 mL of liquid) were taken for analysis each day of CM after homogenization of the must. The samples were centrifuged at 4000 rpm for 10 min using a HERMLE Universal Z 200A centrifuge (Wehingen, Germany) to remove any undesired solids. The supernatant was then used for the analysis (Brix, polyphenol and anthocyanin contents).

2.4. Alcoholic fermentation

After the cold maceration, the *Saccharomyces cerevisiae* yeast (Actiflore F33, Laffort Oenologie, Bordeaux, France) was added to the must in the quantity of 10g/hL to launch the alcoholic fermentation. The flasks containing must samples were placed for 16 days in an oven where the fermentation temperature was kept at 30 ± 1 °C to carry out the alcoholic fermentation.

2.5. Analysis of grape must

2.5.1. Quantitative analyses

Total soluble matter (°Brix) and pH

The total soluble matter (°Brix) and pH of must were respectively measured with a refractometer AR (Leica Microsystems Inc., Buffalo, New York, USA) and pH-conductivity meter InoLab pH/cond Level 1 (WTW, Weilheim, Germany) at a frequency of 50 Hz.

Color determination in wines

Absorbance measurements were made using spectrophotometer UV-VIS (Libra S32, Biochrom, France) with 1 cm path length glass cells.

The color intensity (*CI*) was determined, as a sum of the optical densities at 420 nm (yellow), 520 nm (red), and 620 nm (blue) (Glories, 1984):

$$CI = OD_{420} + OD_{520} + DO_{620} \quad (\text{Eq. 3})$$

Quantification of Total Polyphenols

The total phenolic content was determined according to Folin Ciocalteu (FC) method (Slinkard and Singleton, 1977, Ribéreau-Gayon et al. 1970). A 0.2 mL of standard (gallic acid) or diluted sample, 1.0 mL of FC reagent, and 0.8 mL of Na₂CO₃ solution (7.5%) were mixed and allowed to stand for 2 hours at room temperature. Light absorption was measured at 750 nm by a spectrophotometer UV-VIS (Libra S32, Biochrom, France) against a blank similarly prepared, but containing distilled water instead of extract. The total phenolic content (Y_e) was expressed in grams of gallic acid equivalent (GAE) per 100 grams of dry matter (DM) (g GAE/100 g DM).

Determination of anthocyanin concentration

The concentration of free anthocyanins in the samples was analysed by bleaching with bisulphite (Ribereau-Gayon and Stonestreet, 1968). The SO₂ bleaching procedure requires the preparation of two samples, each containing 1 mL of must, 1 mL of EtOH with 0.1% of HCl and 20 mL of HCl at 2% . A 4 mL of H₂O is added to a 10 mL of first sample, a 4 mL of sodium bisulfite solution is added to a 10 mL of second sample and the mixture is diluted by half. The difference in optical density (ΔOD) at 520 nm is measured on a 1 cm optical path. The concentration of free anthocyanins is given by the following equation:

$$C \text{ (mg/l)} = \Delta OD \times 875 \quad (\text{Eq. 4})$$

where 875 is the slope of the calibration curve obtained from malvidin-3-glucoside (Ribereau-Gayon and Stonestreet, 1968)

HPLC-MS analyses

Polyphenol analyses of the must extracts were realized by high-performance liquid chromatography (HPLC). Prior to analytical chromatography, samples were purified to remove interferences of sugars and organic acids. Solid phase extraction (SPE) was conducted using C18 cartridges (500 mg, Isolute, Biotage) preconditioned at pH 7 (Jaworski, 1987). The cartridge was preconditioned by 5 mL of the absolute methanol and

10 mL of deionized water. Then a 10 mL portion of the aliquot of must was loaded onto the cartridge. The cartridge was washed with 30 mL of water and dried under vacuum. Finally, a 7 mL of methanol was added to elute polyphenols. The fraction was collected and the solvent was evaporated to dryness. The semi- μ purified sample was dissolved in a mix of methanol (150 μ L) and water (150 μ L), and then centrifuged. The supernatant was injected into the HPLC system.

The HPLC equipment included an auto-sampler (Famos, Dionex) and a capillary HPLC (RSLC, Dionex) with UV detection (280 nm). The analytical column was a C18 capillary column (100 \times 2.1 mm i.d., 2.2 μ m of particle diameter, and 120 Å of pore size) (RSLC Acclaim 120, Dionex). The temperature was maintained at 35 °C. The elution gradient was performed as follow: the column was initially equilibrated with formic acid/water (0.2%, v/v) as solvent A for x min. Polyphenols were eluted with a three-stage linear gradient: from 90 to 74% of A in 12 min, from 74 to 18% of A in 6 min, and from 18 to 0% of A in 6 min with a flow rate of 550 μ L/min. Pure acetonitrile was used as solvent B. A wavelength of $\lambda=280$ nm was used for the absorbance detector. The solvents were purchased from Sigma-Aldrich (HPLC grade).

The volume of injected sample was 2 μ L. A mass spectrometry analysis was used for the identification of polyphenols. Analyses were performed in the positive SIR mode. Collision energies (20 or 40 eV) and cone voltage (20 V) were set using the following standards: Gallic acid, catechin hydrate, epicatechin, quercetin-3- β -D-glucoside, epicatechin gallate, kaempferol- 3- β -D -glucoside, resveratrol, gallocatechin were all purchased from Extrasynthese.

2.5.2. Qualitative analyses

Free radical Scavenging Activity

The DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical was used in the present study for the screening of the radical scavenging activity of must samples (Gyamfi et al. 1999).

The DPPH radical scavenging activity was measured with spectrophotometer UV-VIS (Libra S32, Biochrom, France). Samples were diluted in ethanol at the concentration of 10 µg/mL. Then samples were mixed with 1000 µL of 0.1 mM DPPH-ethanol solution and 450 µL of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). Methanol (50 µL) was used for blank measurements in this experiment. After 30 min of incubation at room temperature, the reduction of the DPPH free radical was measured by reading the absorbance at 517 nm. Butylhydroxytoluene (BHT) (a synthetic antioxidant) was used as a positive reference. The inhibition ratio (percent) was calculated from the following equation:

$$\% \text{ inhibition} = \left[\frac{(\text{absorbance of control} - \text{absorbance of test sample})}{\text{absorbance of control}} \right] * 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

2.6. Modelling of extraction kinetics

Kinetics of phenolics extraction from red grapes is described as follows:

$$Y_{(t)} = Y_{(0)} + (Y_{(\infty)} - Y_{(0)}) \cdot (1 - \exp(-k \cdot t)) \quad (\text{Eq. 6})$$

where $Y_{(t)}$ is the phenolic content at time (t), $Y_{(0)}$ is the phenolic content at time ($t=0$), $Y_{(\infty)}$ is the phenolic content at infinite time, and k is the rate constant (s^{-1}).

Zanoni B. et al. 2010 had proposed the same kinetic equation (6) to describe the dissolution of phenolic compounds of red grapes during the red wine fermentation. A similar model had also been proposed by Amendola et al. 2010 and Bucić-Kojić et al. 2007 to describe the extraction of phenols from waste by-products such as grape marc and seeds.

2.7. Statistical analysis and data processing

Each experiment was repeated, at least, three times. Means and standard deviations of data were calculated. The Tukey's test was applied for analysis of the effects of PEF treatment. For each analysis, significance level of 5 % was assumed. All statistical analyses were carried out using the software Statgraphics Plus 5.1 (Statpoint Technologies, Inc.). TableCurve 2D

5.0 software packages (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) was used to carry out nonlinear regression analysis of kinetic models.

3. Results and discussion

3.1. pH and °Brix of grape extracts

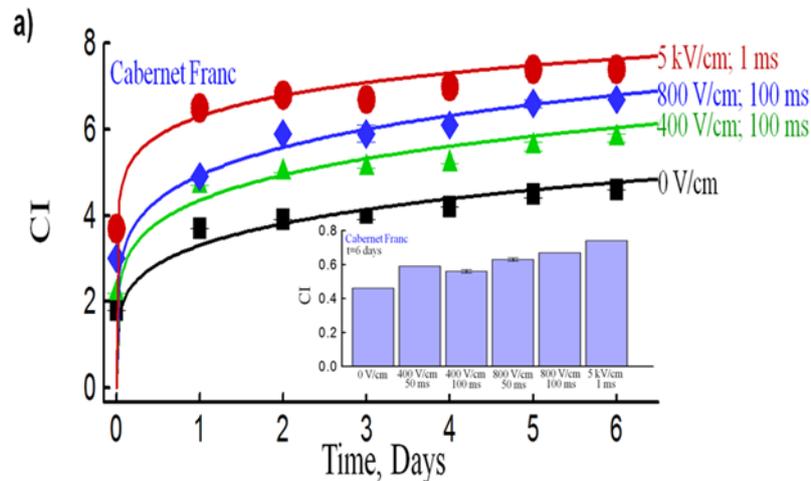
Table 3 shows that for extracts obtained from Cabernet Sauvignon and Cabernet Franc grapes, the values of pH and Brix remain nearly constant within the 6 days of cold maceration. Therefore, the PEF treatment did not lead to the fermentation of samples during the 6 days of cold maceration. Lopez et al. 2008a had also shown that the PEF treatment does not modify the pH and Brix values of extracts prior to red vinification. However, their studies were done during the traditional maceration-fermentation and did not include the cold maceration stage.

Table 3. The values of pH and °Brix of extracts obtained before and after the cold maceration of grapes treated by PEF

PEF conditions	pH				°Brix			
	Cabernet Franc		Cabernet Sauvignon		Cabernet Franc		Cabernet Sauvignon	
	0 day	6 days	0 day	6 days	0 day	6 days	0 day	6 days
0	3.76	3.59	3.40	3.35	26.7	25.8	25.7	24.2
400 V/cm, 50 ms	3.62	3.41	3.40	3.32	27.7	26.4	26.0	24.0
400 V/cm, 100 ms	3.61	3.40	3.41	3.32	27.4	26.3	26.1	24.7
800 V/cm, 50 ms	3.60	3.34	3.46	3.38	27.4	26.4	26.1	24.6
800 V/cm, 100 ms	3.57	3.35	3.42	3.31	27.4	26.3	26.1	24.6
5000 V/cm, 1 ms	3.52	3.36	3.48	3.37	27.7	26.3	25.7	24.9

3.2. Color intensity and anthocyanins content

Figure 2 presents the evolution of color intensity during the cold maceration of CF (Fig. 2a) and CS (Fig. 2b) grapes. Results presented in Fig. 2 confirm that a pre-fermentative cold maceration increases the color intensity of extract even without PEF treatment. This corroborates with a previous data of Gordillo et al. 2010 and Naiara et al. 2011. The application of PEF treatment enhances color intensity during cold maceration of both CF and CS grapes. The most efficient PEF treatment (5kV/cm, 1ms) leads to increase the *CI* on 75 and 68% respectively for the CF (Fig. 2a) and CS (Fig. 2b) grapes. For the pretreated Cabernet Franc grapes, the *CI* of extracts obtained after 6 days of cold maceration were somewhat lower ($CI= 5.6$ for $E=400V/cm$, 100ms) and ($CI= 6.7$ for $E=800V/cm$, 100ms) than their *CI* after high PEF treatment ($CI= 7.4$ for $E=5$ kV/cm, 1ms). However, for the Cabernet Sauvignon grapes, the color intensity of extracts obtained after 6 days of cold maceration was nearly the same after the moderate ($E=800V/cm$, 100ms ($CI=21$)) and after the high ($E=5$ kV/cm, 1ms ($CI=21.2$)) PEF treatment.



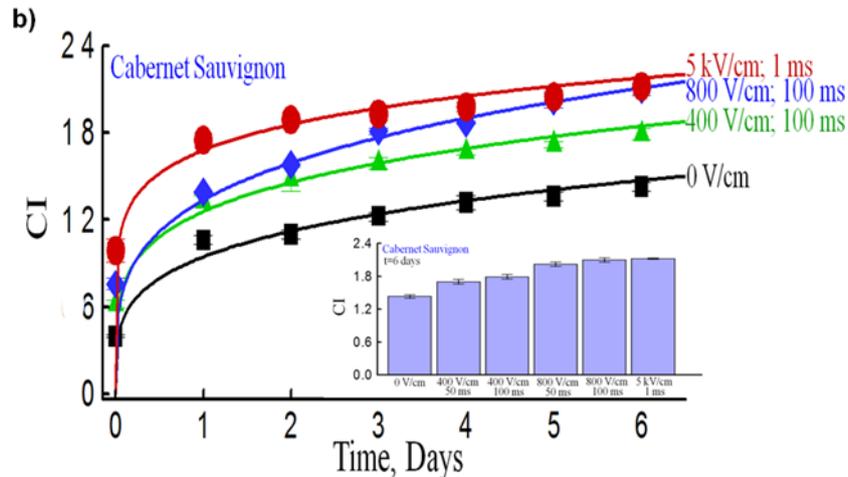


Figure 2. Evolution of color intensity (CI) during cold maceration of CF (a) and CS (b) grapes treated by PEF

Insets in Fig. 2 show that the moderate PEF treatments ($E=400$ and 800 V/cm) during 50 ms permits attain nearly the same CI of extracts as longer treatments during 100ms. For instance, the color intensity of extract obtained after cold maceration of CF grapes treated at 800 V/cm during 50 ms ($CI= 6.3$) is just slightly lower than one obtained after longer treatment of 100 ms ($CI= 6.7$). The same tendency is observed for the CS grapes. Shorter PEF treatment permits important saving of energy consumption. The energy input was $W=41.6$ kJ/kg to attain the color intensity of extract $CI= 21$ under the PEF treatment at $E=800$ V/cm and 100 ms, while it was just $W=18.08$ kJ/kg to attain nearly the same color intensity of extract ($CI= 20.2$) under the PEF treatment at $E=800$ V/cm and 50 ms.

Results presented in Fig. 2 shows that the color intensity of the extracts depends on the grape varieties. The obtained results after cold maceration of untreated and PEF treated CS grapes is significantly higher than one obtained after cold maceration of CF grapes. Earlier, Cliff et al. 2007, are demonstrated that the color density, copigmented, monomeric, polymeric and total anthocyanins were higher in Cabernet Sauvignon wines than in Cabernet Franc wines. According to Boulton (2001), the lack of colour within a variety of wine can be related to the natural inability of this variety to form copigmented anthocyanins.

Figure 3 presents the total anthocyanins content in extracts obtained after the cold maceration of CF (Fig. 3a) and CS (Fig. 3b) grapes.

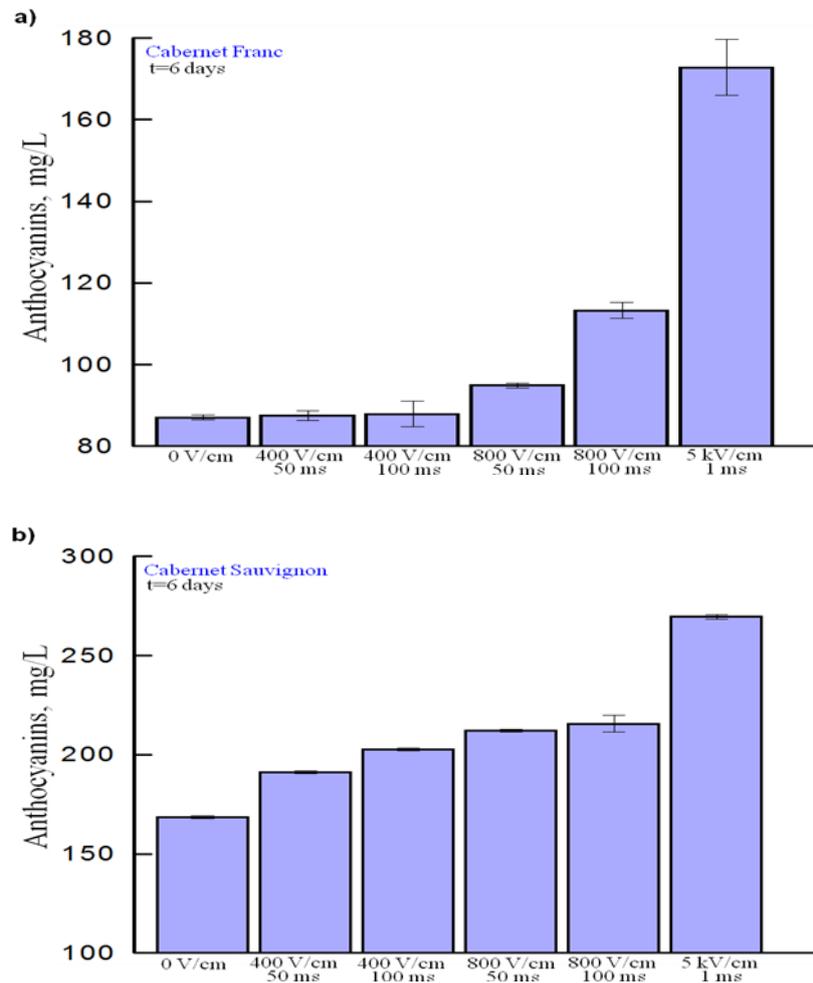


Figure 3. Total anthocyanins content after cold maceration of CF (a) and CS (b) grapes treated by PEF

The application of high PEF treatment (5 kV/cm, 1 ms) significantly increases the anthocyanins content in extract obtained after cold maceration of both CF and CS grapes. The total anthocyanin contents of untreated CF and CS grapes were respectively 87 and 168 mg/L, while there were respectively 172 and 269 mg/L after the cold maceration of PEF treated grapes ($E=5$ kV/cm, 1ms). It corroborates with higher color intensity of the extracts obtained after the PEF treatment. However, the moderate PEF treatments (400 and 800 V/cm) were significantly less effective for the anthocyanins extraction than a

high PEF treatment (5000 V/cm), especially for the CF grapes. For instance, the moderate PEF treatment ($E=400$ V/cm, $t_{PEF}= 50$ or 100 ms) was completely ineffective for the anthocyanins extraction from CF grapes and did not increase the anthocyanins content in extracts. However, it contributes to an enhancing in *CI*. This might be explained by the fact that most of anthocyanins extracted are copigmented in colored complexes and are not native.

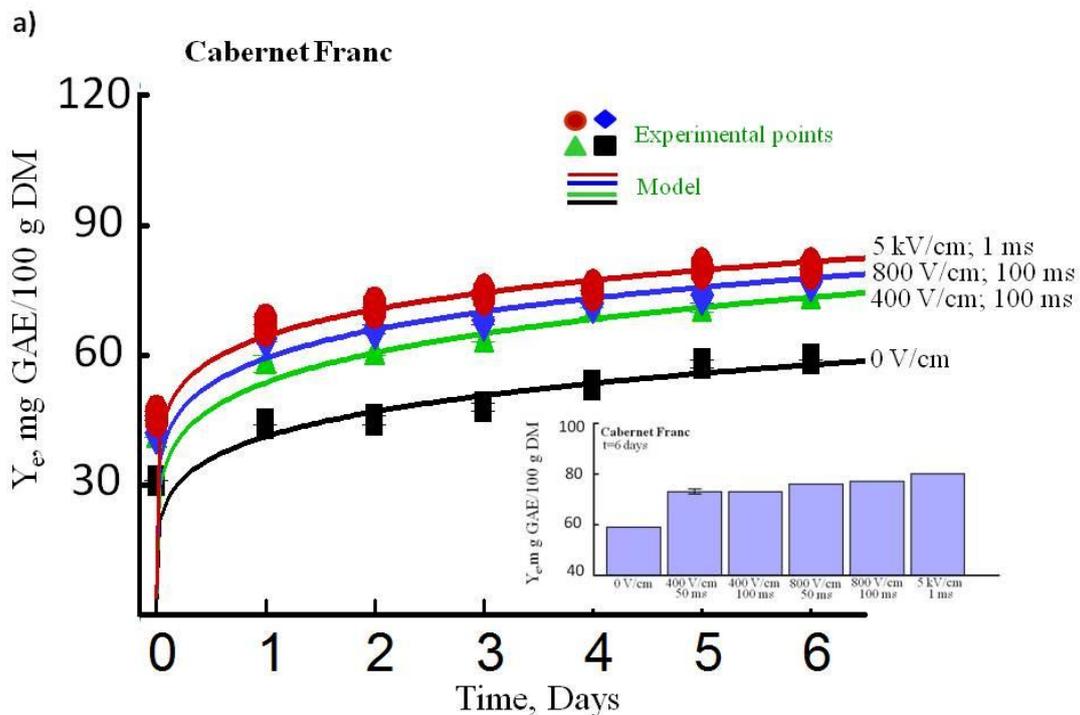
The moderate electric field ($E=800$ V/cm) and longer duration ($t_{PEF}= 100$ ms) permit somewhat increase the anthocyanins content in extracts of CF grapes, but it remains considerably lower than after the high PEF treatment at 5000 V/cm (Fig. 3a). For the CS grapes, the moderate PEF treatments were more effective than for the CF grapes. However, even the moderate PEF treatment at $E=800$ V/cm and $t_{PEF}= 100$ ms was noticeably less effective than the high PEF treatment. For instance, the anthocyanins content of extract obtained after cold maceration of Cabernet Sauvignon grapes was $Y_e =214$ mg GAE/100 g DM after the moderate PEF treatment (800 V/cm, 50 ms) and $Y_e =267$ mg GAE/100 g DM after the high PEF treatment (5000 V/cm, 1ms).

According to these results, the effect of PEF on the anthocyanins content of extracts depends on the grape variety and PEF parameters. Puértolas et al. 2010c have also shown that the effect of PEF varies between different grape cultivars.

3.3. Extraction kinetics of phenolic compounds

Figure 4 presents the extraction kinetics of polyphenols during the cold maceration of CF (Fig. 4a) and CS (Fig. 4b) grapes. Phenolic content in the extract increases constantly during the cold maceration period, even in absence of PEF treatment. This corroborates with the results of Gomez-Miguez et al. 2006. The most efficient PEF treatment (5 kV/cm, 1ms) leads to the increase of polyphenols in extract on 48% and 43% for respectively the CF (Fig. 4a) and CS (Fig. 4b) grapes. For instance, the polyphenols content of extract obtained after cold

maceration of CS grapes was $Y_e = 96$ mg GAE/100 g DM after the high PEF treatment (5kV/cm, 1 ms), while it was just 68 mg GAE/100 g DM for the untreated grapes. The increasing of PEF intensity from 400 to 5000 V/cm increases the polyphenols content in extract. However, even at the moderate PEF treatment, the polyphenols content of the extracts increases considerably after the cold maceration. For instance, the polyphenols content of extract obtained after cold maceration of Cabernet Sauvignon grapes was $Y_e = 90$ mg GAE/100 g DM after the moderate PEF treatment (800 V/cm, 50 ms). This value of Y_e is just slightly lower than one obtained after the high PEF treatment of 5 kV/cm, 1ms. In fact, the PEF impacts extraction efficiency of phenolic compounds by increasing the cell membrane permeability. As the majority of polyphenols is located in the inner cell layers (hypodermis) of grape berries (Lecas et al. 1994), the PEF treatment acts by increasing the skin cells permeability facilitating release of polyphenols (Vorobiev et al. 2011).



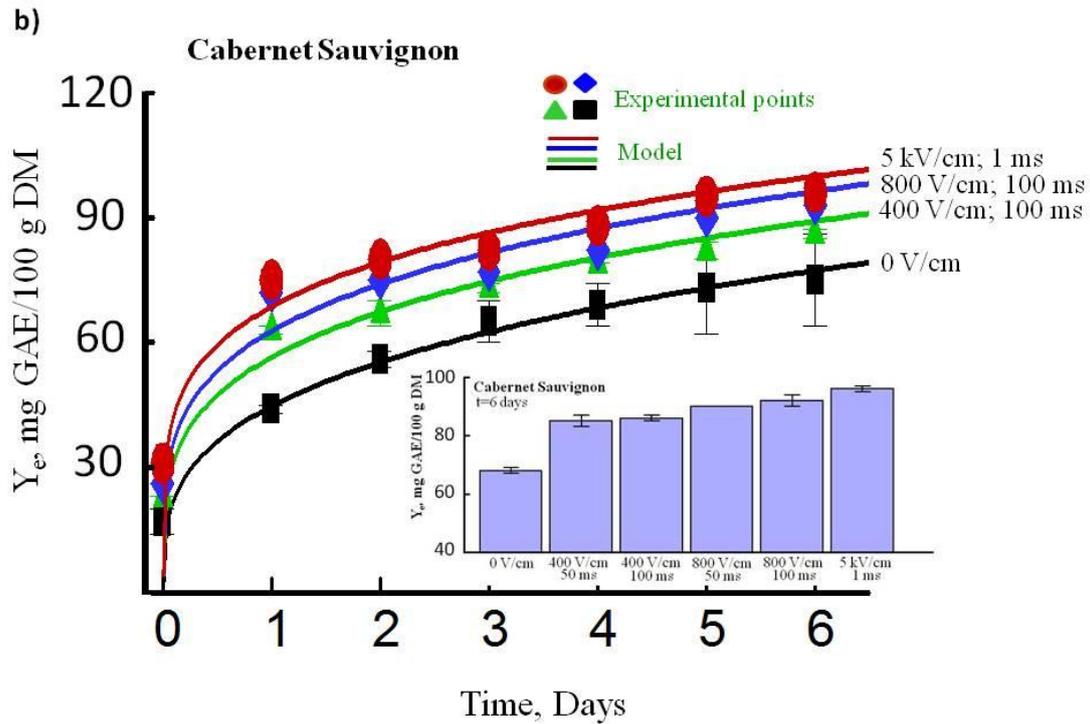


Figure 4. Evolution of total polyphenols during cold maceration of CF (a) and CS (b) grapes treated by PEF

Insets in Fig. 4 shows that the time $t_{PEF} = 50$ ms is sufficient for the effective treatment of studied red grapes under the moderate PEF (400 and 800 V/cm). For instance, the polyphenols content of extract obtained after cold maceration of CS grapes was $Y_e = 90$ mg GAE/100 g DM after the shorter PEF treatment (800 V/cm, 50 ms), while it was just slightly higher (92 mg GAE/100 g DM) for two times longer PEF treatment (800 V/cm, 100 ms). The same tendency is observed for the CF grapes. The PEF treatment permits to decrease the duration of cold maceration.

Fig. 4a shows that the quantity of polyphenols extracted during 6 days of cold maceration of untreated CF grapes ($Y_t = 59$ mg GAE/100g DM) corresponds to the quantity of polyphenols extracted during 1 day of cold maceration of CF grapes treated by PEF at 400 V/cm. The same quantity of polyphenols can be extracted after 12 hours of cold maceration of CF grapes treated by PEF at 800 V/cm or after just a few minutes without cold maceration for the CF grapes treated by high PEF at 5000 V/cm.

For the untreated CS grapes, the quantity of polyphenols extracted during 6 days of cold maceration was somewhat higher ($Y_t = 75$ mg GAE/100g DM), corresponding to the quantity of polyphenols extracted after 2 days of cold maceration of grapes treated by PEF at 400 V/cm. The same quantity of polyphenols was extracted after just 1 day of cold maceration of CS grapes treated by PEF at 800 V/cm. These results show that the application of PEF treatment prior to cold maceration decreases the duration of this step.

Simplified kinetic model (Eq. (6)) fits well experimental data presented in Fig.4. Table 4 shows the values of kinetic constant (k) and correlation coefficient (R^2) for the model.

Table 4: Kinetic constant (k), maximal extraction yield Y_∞ and correlation coefficient (R^2) obtained by fitting of experimental extraction data presented in Fig.4.

E (V/cm)	t_{PEF} (ms)	Cabernet Franc		Cabernet Sauvignon			
		k (s^{-1})	R^2	Y_∞ , mg GAE /100 g DM	k (s^{-1})	R^2	Y_∞ , mg GAE /100 g DM
0	0	0.40	0.94	57.0	0.58	0.99	78.1
400	50	0.43	0.95	70.3	0.62	0.95	88.2
400	100	0.49	0.95	71.7	0.69	0.96	89.9
800	50	0.52	0.95	75.0	0.71	0.94	94.8
800	100	0.63	0.94	76.2	0.72	0.92	98.0
5000	1	0.68	0.97	79.9	0.76	0.95	101.7

As can be expected, the value of k and Y_∞ increases for higher electric field strength E and treatment duration t_{PEF} .

Figure 5 shows the influence of PEF energy input on the values of k and Y_∞ (Eq. (6)). The energy input of 6.2 kJ/kg is sufficient to attain the most rapid extraction kinetic ($k=0.692$) and rather high during the cold maceration of CS grapes, while the extraction kinetic from CF grapes is most rapid ($k= 0.68$) with higher energy input 48 kJ/kg (Fig. 5a). It can be speculated that the effective membrane electroporation needs the higher energy input for CF grapes. Fig. 5b shows that for the same energy input, the maximal extraction yield of polyphenols is significantly higher for the CS grapes comparatively to the CF grapes.

Table 5 presents the extracted polyphenols identified by HPLC analysis after cold maceration of untreated and PEF-treated (5 kV/cm, 1 ms) grapes. Eight phenolic components were identified and quantified. The results pointed substantial differences between musts obtained with and without PEF-treatment. The PEF-treatment enhances unequally extraction of different phenolic compounds from CF and CS grapes. The concentration of flavonoid components: quercetin 3- β -D glucoside and epicatechin gallate was increased on respectively 100% and 62.5% after the cold maceration of PEF-treated CF grapes, while it was increased on respectively 74.2% and 42.4% after the cold maceration of PEF-treated CS grapes. The concentration of non-flavonoid component resveratrol was increased on respectively 65.7 and 57.9 % after the cold maceration of PEF-treated CF and CS grapes.

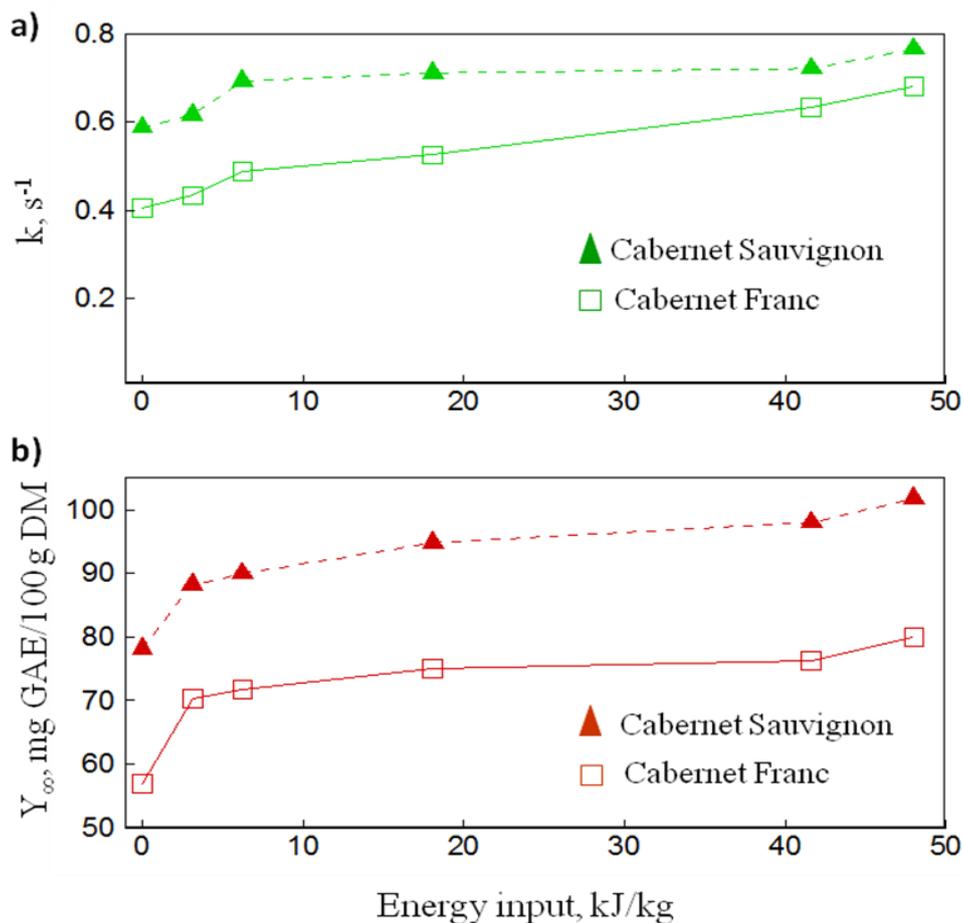


Figure 5. The values of constants k (a) and Y_{∞} (b) (Eq.(4)) in function of PEF energy input

3.4. Scavenging activity of polyphenols

The DPPH scavenging activity of phenolic compounds presented in CF and CS extracts is shown in Fig. 6. The PEF treated samples show significant inhibitory activity against the DPPH radical. Radical inhibition ratio is attained respectively 42.5 and 52.5 % for the CF and CS extracts obtained after the cold maceration of PEF treated (5kV/cm, 1ms) grapes, while it was respectively 17.9 and 20.2% for the CF and CS extracts obtained after the cold maceration of untreated grapes. The moderate PEF treatment (400 and 800 V/cm) leads to the less noticeable increase of radical inhibition (Fig. 6).

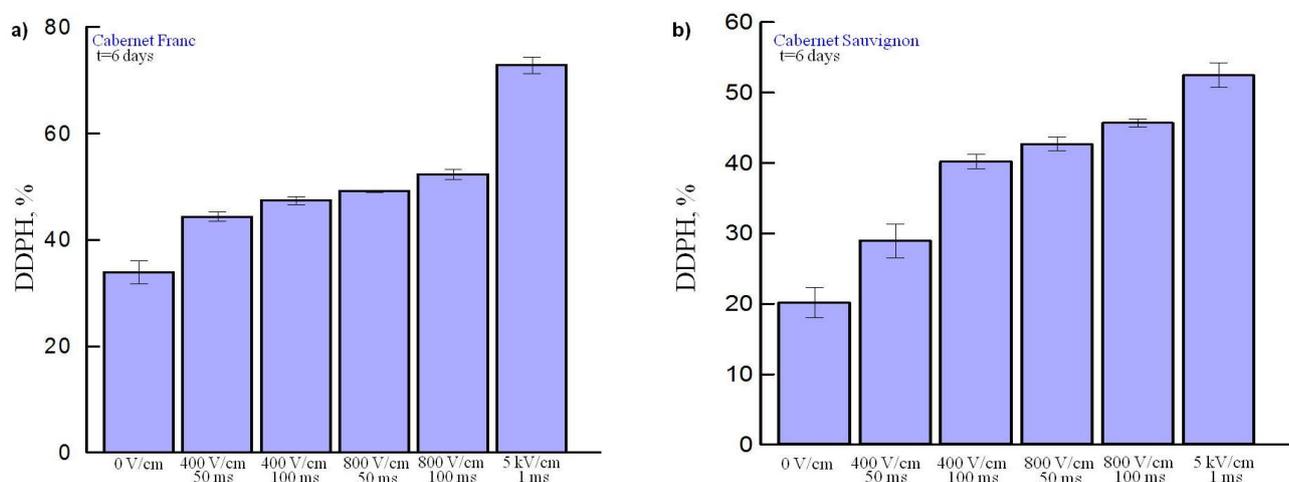


Figure 6. Free radical scavenging activity of phenolic compounds presented in CF (a) and CS (b) extracts after the cold maceration of grapes treated by PEF

This result is in a good agreement with the study of Corrales et al. (2008). In their study the PEF-treatment ($E=3\text{kV/cm}$, $W=10\text{ kJ/kg}$) of grape by-products (grape skins) led to the better antioxidant activity of the samples. Donsi et al. 2010 have demonstrated that PEF treatment ($E=1\text{ kV/cm}$, $t_{CEP}=100\text{ ms}$, $W=50\text{ kJ/kg}$) leads to a higher antioxidant activity of the red wine.

Extracted flavonoid components (quercetin 3- β -D glucoside and epicatechin gallate) are known by their inhibitory effects towards the DPPH-radical (Lacopini et al. 2008, Lee et al.

1998). These flavonoid components were more presented in extracts obtained after the cold maceration of PEF-treated grapes (Table 5) leading to a stronger scavenging activity. This latter result is in a good correlation with literature studies showing that higher total phenol and flavonoid content of extracts leads to a better DPPH-scavenging activity (Robards and Antolovich, 1997, Ghiselli et al. 1998, Bao et al. 2005, Ebrahimzadeh et al. 2009).

Table 5. Phenolic compounds identified after the cold maceration of untreated and PEF-treated grapes

Phenolic compounds (mg/L)	Cabernet Franc			Cabernet Sauvignon		
	Untreated (0V/cm)	PEF-treated (5 kV/cm, 1ms)	Differences (%)	Untreated (0V/cm)	PEF-treated (5 kV/cm, 1ms)	Differences (%)
Gallic acid	15.1 ^a	20.6 ^b	36.4	14.1 ^a	22.2 ^b	57.4
Catechin hydrate	83.4 ^a	94.2 ^b	12.9	72.4 ^a	98.2 ^b	35.6
Epicatechin	190.2 ^a	260.6 ^b	37.0	195.6 ^a	263.2 ^b	34.6
Quercetin 3-β-D-glucoside	130.1 ^a	260.2 ^b	100.0	155.3 ^a	270.3 ^b	74.1
Epicatechin gallate	32.5 ^a	52.7 ^b	62.2	33.1 ^a	47.4 ^b	43.2
Kaempferol 3-β-D-glucopyranosid	92.6 ^a	100.5 ^b	8.5	80.3 ^a	90.5 ^b	12.7
Resveratrol	73.2 ^a	121.2 ^b	65.6	76.2 ^a	120.2 ^b	57.7
Gallocatechin	159.3 ^a	159.4 ^a	0.1	145.5 ^a	150.5 ^a	3.4

^(a,b) marks with the same superscript letters were not significantly different (LSD test, 5% level), different letters within the same line represents significant differences. Means discrimination by Tukey's test ($\alpha = 0.05$).

3.5. Phenolic content and color intensity during alcoholic fermentation

The evolution of phenolic content and color intensity during the alcoholic fermentation of must obtained from untreated and PEF-treated (5 kV/cm, 1 ms) Cabernet Franc and Cabernet Sauvignon grapes is presented respectively in Fig. 7 and 8.

It can be observed that during the whole alcoholic fermentation period of 14 days (beginning after the 6 days of cold maceration), the wines obtained from PEF treated grapes had higher phenolic content than wines obtained from the untreated grapes. For both studied grapes, the extraction of polyphenols was more rapid during alcoholic fermentation comparatively to the cold maceration period (Fig. 7 a,b).

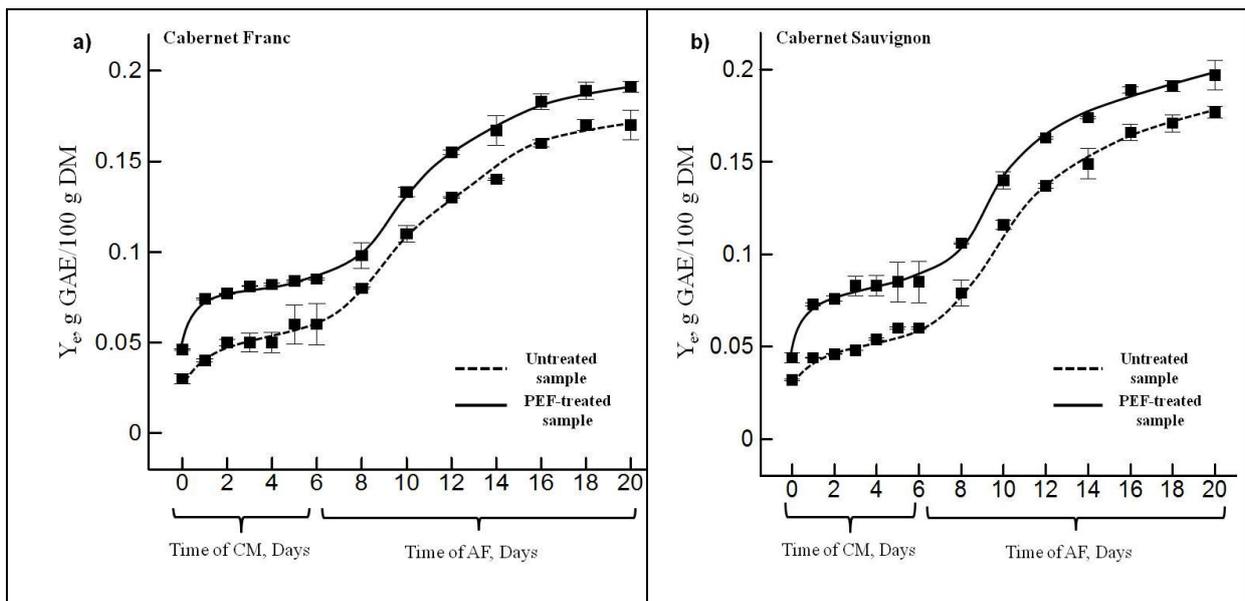


Figure 7. Evolution of total polyphenols content $Y(t)$ during the cold maceration and the alcoholic fermentation of CF (a) and CS (b) grapes treated by PEF (5kV/cm, 1 ms)

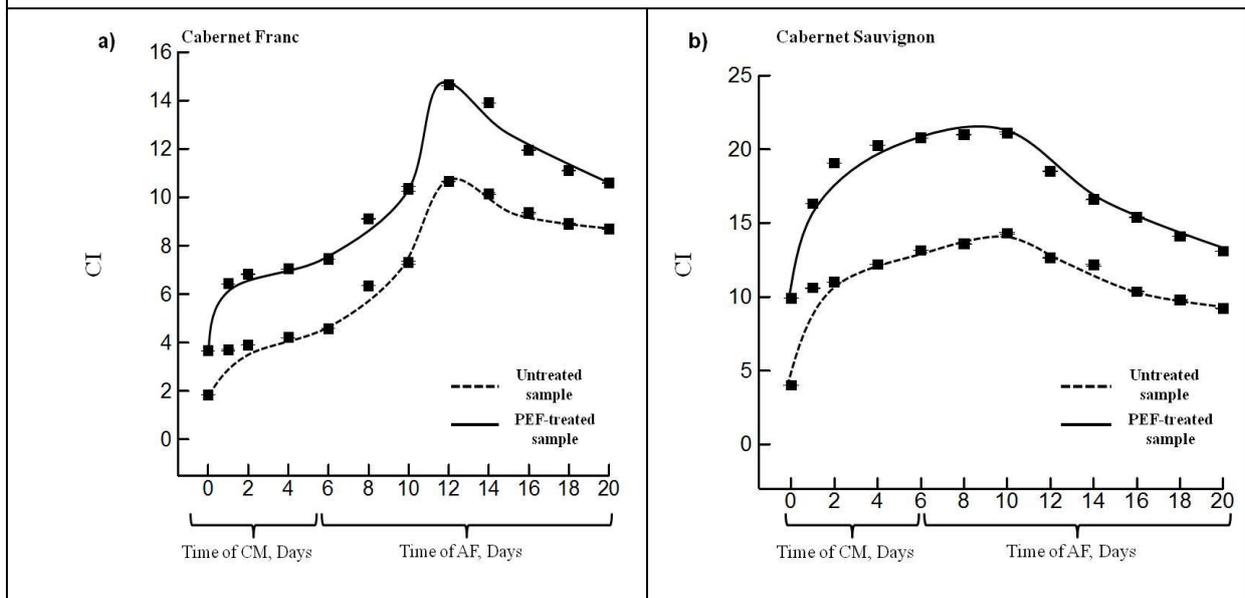


Figure 8. Evolution of CI during the cold maceration and the alcoholic fermentation of CF (a) and CS (b) grapes treated by PEF (5kV/cm, 1 ms)

The color intensity (*CI*) of wines obtained from PEF treated grapes was higher during the whole alcoholic fermentation period (Fig. 8). The maximum *CI* was attained after 12 days (6 days of alcoholic fermentation) for both untreated and PEF-treated CF grapes. For the CS grapes (untreated and PEF-treated), the maximum *CI* was attained after 11 days (5 days of alcoholic fermentation). Afterword, the color intensity of wines somewhat decreased. This decrease is caused by several phenomenons like, hydrolysis and oxidation of anthocyanins occurring simultaneously during the fermentation (Monagas et al. 2005b). However, the higher coloration of PEF treated wines remained noticeable. The enhancement of the *CI* and the phenolic content of wine elaborated from cold macerated red grapes was shown earlier by Gil-Munoz et al. 2009 and Gordillo et al. 2010. In the experiments of Donsi et al. 2010, the PEF-treatment ($E=1$ kV/cm, $t_{CEP}=100$ ms, $W=50$ kJ/kg) applied before red fermentation, enhanced the phenolic content and the color intensity of the red wine by 20%.

The higher degree of anthocyanin copigmentation after the cold maceration of PEF treated grapes, may conduct to the enhancing of *CI*.

At the end of alcoholic fermentation, the PEF-treatment (5000V/cm) enhanced the phenolic extraction of the wine by 14% and 11% (Fig. 7) and the color intensity by 15% and 32% (Fig. 8) respectively for CF and CS compared to the untreated wine.

4. Conclusions

The application of high (5kV/cm) and moderate (400 and 800 V/cm) PEF treatments enhances the color intensity, increases the anthocyanins content, and accelerates the extraction kinetics of phenolic compounds during the cold maceration of Cabernet Franc and Cabernet Sauvignon grapes. The PEF treated samples show significant inhibitory activity against the DPPH radical. The PEF-treatment enhances unequally extraction of different phenolic compounds from Cabernet Franc and Cabernet Sauvignon grapes. The concentration of flavonoid components: quercetin 3- β -D glucoside and epicatechin gallate was increased on

respectively 100% and 62.5% after the cold maceration of PEF-treated Cabernet Franc grapes, while it was increased on respectively 74.2% and 42.4% after the cold maceration of PEF-treated Cabernet Sauvignon grapes. The concentration of non-flavonoid component resveratrol was increased on respectively 65.7 and 57.9 % after the cold maceration of PEF-treated Cabernet Franc and Cabernet Sauvignon grapes. The wines obtained from PEF treated Cabernet Franc and Cabernet Sauvignon grapes have higher phenolic content and color intensity during the whole alcoholic fermentation period than wines obtained from the untreated grapes.

Acknowledgements

The authors would like to thank the society Château KSARA, s.a.l, Ksara, Békaa, Lebanon for financial support. This project received a grant from “Conseil de la recherche, projet FS27”, Saint Joseph University, Lebanon.

5. References

Alvarez, I., Aleixandre, J.L., Garcia, M.J. and Lizama, V. 2006. Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *Anal. Chim. Acta* 563:109–115.

Amendola, D., De Faveri, D.M. and Spigno, G. 2010. Grape marc phenolics: extraction kinetics, quality and stability of extracts. *J. Food Eng.* 97: 384–392.

Anderson, M., Singleton, D., Sanders, J., Gundersen, M., and Waterhouse, A. 2009. Effects of Pulsed Energy Field Treatments on White Winegrapes. Abstracts from Presentations at the ASEV 60th Annual Meeting. Napa, California. *Am. J. Enol. Vitic.* 60: 386A - 409A.

Auw, J. M., Blanco, V., O'Keefe, S. F., Sims, and C. A. 1996. Effect of processing on the phenolics and color of Cabernet Sauvignon: Chambourcin and Noble wines and juices. *Am. J. Enol. Vitic.* 47 : 279-286.

Bao J.S., Cai Y.Z., Sun M., Wang G.Y. and Corke H. 2005. Anthocyanins flavonols and free radical scavenging activity of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) extracts and their color properties and stability. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2327–2332.

Blouin, J., and Peynaud, E. 2001. *Connaissance et Travail du Vin*. Paris: Dunod.

Boulton R. 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am. J. Enol. Vitic* 52: 67–86.

Boussetta, N., Lanoisellé, J-L., Bedel-Cloutour, C., and Vorobiev, E. 2009a. Extraction of soluble matter from grape pomace by high voltage electrical discharges for polyphenol recovery: Effect of sulphur dioxide and thermal treatments. *J. Food Eng.* 95: 192–198.

Boussetta, N., Lebovka, N., Vorobiev, E., Adenier, H., Bedel-Cloutour, C., and Lanoisellé, J., 2009b. Electrically assisted extraction of soluble matter from Chardonnay grape skins for polyphenol recovery. *J. Agric. Food Chem.* 57:1491–1497.

Boussetta N., Vorobiev E., Deloison V., Pochez F., Cordin-Falcimaigne A., and Lanoisellé J.L. 2011. Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: Application of High Voltage Electrical discharges. *Food Chem.* 128: 364-370.

Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S., Bilic, M. and Velic, D. 2007. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J. Food Eng.* 81: 236–242.

Cheynier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.-M., Sarni-Manchado, P., and Fulcrand, H. 2006. Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic* 57 : 298-305.

Cliff M.A., King M.C., and Chlosser J. 2007. Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. *Food Res. Int.* 40: 92–100.

Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., and Tauscher, B. 2008. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innov. Food Sci. and Emerging Tech.* 9:85–91.

Delsart, C., Ghidossi, R., Poupot, C., Cholet C., Grimi N., Vorobiev E., Milisic V. & Mietton Peuchot M. 2012. Enhanced Extraction of Valuable Compounds from Merlot Grapes by Pulsed Electric Field. *Am. J. Enol. Vitic* 11088.

Donsi F., Ferrari G, Fruilo M, and Pataro G. 2010. Pulsed Electric Field-Assisted Vinification of Aglianico and Piediroso Grapes. *J. Agric. Food Chem.* 58:11606–11615.

Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF and Eslami B. 2009. Antioxidant activity of aqueous extract of *Pyrus boissieriana* fruit. *Pharmacologyonline* 1:1318- 1323.

Escudier J.L, Kotseridis Y., and Moutounet M. 2002. Flash release and wine quality. *Progrès Agricole et Viticole*, 119 : 438-442.

Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, and Scaccini C. 1998. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *J. Agric. Food Chem.* 46: 361-367.

Gil-Muñoz, R., Moreno-Perez, A., Vila-Lopez, R., Fernandez-Fernandez, J.I., Martinez-Cutillas, A. and Gómez-Plaza, E., 2009. Influence of low temperature prefermentative techniques on chromatic and phenolic characteristics of Shiraz and Cabernet Sauvignon wines. *European Food Res. and Tech.* 228 : 777-78.

Glories, Y. 1984. La couleur des vins rouges: 11 partie “les équilibres des anthocyanes et des tanins. *Connaissance Vigne Vin*, 18 :195–217.

Gomez-Miguez, M., Gonzalez-Manzano, S., Escribano-Bailon, M, M. T., Heredia, F. J., and Santos-Buelga, C. 2006. Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside. *J. Agric. Food Chem.* 54: 5422-5429.

Gordillo, B., López-Infante, M.I., Ramírez-Pérez, P., González-Miret, M.L., and Heredia, F.J. 2010. Influence of prefermentative cold maceration on the color and anthocyanic copigmentation of organic Tempranillo wines elaborated in a warm climate. *J. Agric. Food Chem.* 58:6797–6803.

Grimi, N., Lebovka, N.I., Vorobiev, E., and Vaxelaire, J. 2009. Effect of a Pulsed Electric Field Treatment on Expression Behavior and Juice Quality of Chardonnay Grape, *Food Biophysics* 4:191-198.

Grimi, N., Mamouni, F., Lebovka, N.I., Vorobiev, E., and Vaxelaire, J. 2011. Impact of apple processing modes on extracted juice quality : Pressing assisted by pulsed electric fields, *J. Food Eng.* 103:52-61.

Gülçin I. 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innov. Food Sci. and Emerging Tech.* 11: 210-218.

Gyamfi, M. A., Yonamine, M., and Aniya, Y. 1999. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguine* on experimentally induced liver injuries, *General Pharmacol*, 32:661-667.

Jackson, R.S. 2000. *Wine sciences: principles, practice, perception*, Second edition. Academic Press, San Diego, CA.

Jaworski, A. and Lee, C.Y. 1987. Fractionation and HPLC determination of grape phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 35: 257–259.

Kelebek, H., Canbas, A., Cabaroglu, T., and Selli, S. 2007. Improvement of anthocyanin content in the cv. Okuzgozu wines by using pectolytic enzymes. *Food Chem.* 105: 334-339.

Kovaè V., Alonso E., and Revilla E., (1995). The Effect of Adding Supplementary Quantities of Seeds During Fermentation on the Phenolic Composition of Wines. *Am. J. Enol. Vitic* 46:363-367

Lacopini P., Baldi M., Storchi P., and Sebastiani L. 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions, *J Food Compos Anal.* 21: 589–598.

Lecas, M.; and Brillouet, J.-M 1994. Cell wall composition of grape berry skins. *Phytochemistry*, 35, 1241–1243.

Lee, S. K., Mbwambo, Z. H., Chung, H. S., Luyengi, L., Games, E. J. C., and Mehta, R. G. 1998. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Combinatorial Chemistry and High-Throughput Screening*, 1:35–46.

López, N., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., and Raso, J., 2008a. Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes. *Innov. Food Sci. and Emerging Tech.* 9: 477-482.

Lopez, N.; Puertolas, E.; Condon, S.; Alvarez, I.; and Raso, J., 2008b. Application of pulsed electric fields for improving the maceration process during vinification of red wine: influence of grape variety. *European Food Res. and Tech.* 227:1099-1107.

Monagas, M., Bartolome, B., and Gomez-Cordoves, C. 2005a. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 85-118.

Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., and Bartolomé, B. 2005b. Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle .I. Anthocyanins and pyranoanthocyanins. *European Food Res. and Tech.* 220:607-614.

Naiara B.V., Gómez-Plaza E., López-Roca J.M, Gil-Muñoz R., and Bautista-Ortín A.B. 2011. The Extraction of Anthocyanins and Proanthocyanidins from Grapes to Wine during Fermentative Maceration Is Affected by the Enological Technique. *J. Agric. Food Chem.* 59: 5450–5455.

Norman R. 1992. *The great domaines of Burgundy*. London: Kyle Cathie Ltd.

Praporscic, I., Lebovka, N., Vorobiev, E., and Mietton-Peuchot, M. 2007. Pulsed electric field enhanced expression and juice quality of white grapes. *Sep. and Pur. Tech.* 52:520–526.

Parenti, A., Spugnoli, P., Calamai, L., Ferrari, S., and Gori, C. 2004. Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovese grape. *European Food Res. and Tech.* 218:360-366.

Puértolas, E., Saldaña, G., Condón, S., Álvarez, I., and Raso, J., 2010a. Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. *Food Chem* 119:1063-1070.

Puértolas, E., López, N., Condón, S., Álvarez, I., and Raso, J., 2010b. Potential applications of PEF to improve red wine quality. *Trends in Food Sci. and Tech.* 21: 247-255.

Puertolas, E.; Lopez, N.; Saldana, G.; Alvarez, I.; and Raso, J., 2010c. Evaluation of phenolic extraction during fermentation of red grapes treated by a continuous pulsed electric fields process at pilot-plant scale. *J. Food Eng.* 98:120-125.

Retali E. (2004). Macération préfermentaire à froid : application à une vendange de nielluccio. *Revue Française d'Oenologie* - novembre/décembre - N° 209.

Ribereau-Gayon P. and Stonestreet E. 1968. Les dosages des anthocyanes dans le vin rouge. *Bulletin Societe Chimiques Francaise*, 9 : 2649-2652

Ribéreau-Gayon, P.; Sudraud, P.; Milhe', J. C.; and Canbas, A. 1970. Recherches technologiques sur les compose's phénoliques des vins rouges. *Connaissance Vigne Vin*, 2 : 133–143.

Ribereau-Gayon P., 1998. *Traité d'oenologie*, tome 2. Ed Dunod.

Robards K. and Antolovich M. 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. A review, *Analyst*, 122:11R–34R.

Sacchi, K. L., Bisson, L. F., and Adams, D. 2005. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am. J. Enol. Vitic* 56:197–206.

Slinkard, K., and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic*. 28:49-55.

Spranger, M.I., Climaco, M.C., Sun, B., Eiriz, N., Fortunato, C., Nunes, A., Leandro, M.C., Avelar, M.L., and Belchior, A.P . 2004. Differentiation of red winemaking technologies by phenolic and volatile composition. *Anal. Chim. Acta* 513: 151–161.

Sun B.S., Spanger M.I., Roque-Do-Vale F., Leandro M.C., and Belchior A.P. 2001. Effect of different winemaking technology on phenolic composition in Tinta Miuda red wines. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5809-5816.

Toepfl, S., Heinz, V. and Knorr, D. 2006. Applications of pulsed electric field technology for the food industry: In: *Pulsed Electric Field Treatment of Foods*, Ed: Raso, J. and Heinz, V., p. 197-221, Elsevier, Oxford, UK.

Vorobiev E and Lebovka NI 2008. Pulsed Electric Field Induced Effects in Plant Tissues: Fundamental Aspects and Perspectives of Application. In: E. Vorobiev and N. Lebovka (Editors), *Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials*, Springer, 39-82.

Vorobiev E. and Lebovka N. 2010. Extraction from solid foods and biosuspensions enhanced by electrical pulsed energy (pulsed electric field, pulsed ohmic heating and high voltage electrical discharges). *Food Engineering Reviews*, n°2.

Vorobiev E and Lebovka NI. 2011. Pulse Electric Field Assisted Extraction. In: N. Lebovka, E. Vorobiev and F. Chemat (Editors), *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry*. CRC Press.

Zanoni B., Siliani S., Canuti V., Rosi I. and Bertuccioli M. 2010. A kinetic study on extraction and transformation phenomena of phenolic compounds during red wine fermentation. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45: 2080–2088.

Nomenclature

d	distance between electrodes	(cm)
E	electric field strength	(V/cm)
n	number of pulses	
N	number of trains	
t	Time	(min)
t_i	pulse duration	(μ s)
t_{PEF}	effective time of PEF treatment	(s)
Δt	time between pulses	(ms)
Δt_t	pause after each train	(s)
m	mass of grapes	(kg)
U	Voltage	(V)
W	energy consumption	(kJ/kg)
Y_0	initial content of total phenolic compounds	(g GAE/100 g DM)
Y_t	content of total phenolic compounds at t	(g GAE/100 g DM)
Y_{∞}	phenolic content at infinite time	(g GAE/100 g DM)
k	rate constant	(s^{-1})

Abbreviations

CM	cold maceration
CF	cabernet franc
CS	cabernet sauvignon
DM	dry matter
GAE	gallic acid equivalent
PEF	pulsed electric field
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
OD	optical Density
HPLC	high performance liquid chromatography
CI	color intensity
SO ₂	sulphur dioxide
HCl	hydrochloric acid
R ²	linear regression coefficient

Tables

Table 1. Grapes characteristics at harvest

Table 2. Electric field strength E (V/cm), treatment time t_{PEF} (ms) and electrical energy input W (kJ/kg).

Table 3. The values of pH and °Brix of extracts obtained before and after the cold maceration of grapes treated by PEF

Table 4. Kinetic constant (k), maximal extraction yield Y_{∞} and correlation coefficient (R^2) obtained by fitting of experimental extraction data presented in Fig.4.

Table 5. Phenolic compounds identified after the cold maceration of untreated and PEF-treated grapes

Figure captions

Figure 1. Schematic representation of the experimental setup and the corresponding treatment protocol. PEF-Generator (5Kv-1 kA) (fig 1.a) and PEF-generator 40 kV-10kA (fig 1.b).

Figure 2. Evolution of color intensity (CI) during cold maceration of CF (a) and CS (b) grapes treated by PEF

Figure 3. Total anthocyanins content after cold maceration of CF (a) and CS (b) grapes treated by PEF

Figure 4. Evolution of total polyphenols during cold maceration of CF (a) and CS (b) grapes treated by PEF.

Figure 5. The values of constants k (a) and Y_{∞} (b) (Eq.(4)) in function of PEF energy input

Figure 6. Free radical scavenging activity of phenolic compounds presented in CF (a) and CS (b) extracts after the cold maceration of grapes treated by PEF

Figure 7. Evolution of total polyphenols content $Y(t)$ during the cold maceration and the alcoholic fermentation of CF (a) and CS (b) grapes treated by PEF (5kV/cm, 1 ms)

Figure 8. Evolution of CI during the cold maceration and the alcoholic fermentation of CF (a) and CS (b) grapes treated by PEF (5kV/cm, 1 ms)

5.2. Comparaison de différents prétraitements : Champs électriques pulsés, Ultrasons et Chauffage modéré en amont de la vinification en rouge

L'article «Pulsed Electric Field, ultrasonic and thermal pretreatments for better phenolic extraction during red fermentation » a été publié dans «*European Food Research and Technology*». Cet article porte essentiellement sur la comparaison de trois prétraitements en amont de la vinification en rouge : les champs électriques pulsés, les ultrasons et un chauffage modéré.

5.2.1. Résumé de l'article

Durant la vinification en rouge, une partie des composés phénoliques présents dans le raisin est transféré dans le vin (environ 40% des anthocyanes et 20% des tanins). D'où, la nécessité de la recherche de procédés d'extraction permettant d'améliorer la libération des composés phénoliques au niveau de la paroi cellulaire, qui constitue un frein à leur extraction. Dans cet objectif, nous comparons dans cette étude trois prétraitements en amont de la vinification en rouge : un chauffage thermique modéré, les champs électriques pulsés et les ultrasons.

Les prétraitements par chauffage thermique modéré (CM), les champs électriques pulsés (CEP) et les ultrasons (US) ont été appliqués sur une variété de raisins (Cabernet Franc) dans le but d'améliorer l'extraction phénolique durant la fermentation en rouge. Les conditions des différents prétraitements sont les suivantes: Chauffage modéré CM (50°C, 15 min, 125 kJ/kg), les ultrasons US1 (24 kHz, 5 min, 121 kJ/kg), US 2 (24 kHz, 10 min, 242 kJ/kg), US3 (24 kHz, 15 min, 363 kJ/kg), et les Champs électriques pulsés CEP1 (0.8 kV/cm, 100 ms, 42 kJ/kg), et CEP2 (5 kV/cm, 1 ms, 53 kJ/kg). Durant notre étude, les raisins ont été pesés (m=400g), foulés puis soumis aux différents prétraitements par CM, US et CEP puis inoculer par les levures (10g/hL) pour déclencher la fermentation alcoolique pendant 30 jours dans une étuve à 30°C. Les paramètres quantitatifs et qualitatifs des extraits de CF (pH, °Brix), leur intensité colorante, leur contenu phénolique et anthocyanique, leur teneur en tanins et leur activité antiradicalaire ont été déterminés tout au long de la fermentation alcoolique. Les conditions de traitements optimales ont été sélectionnées en se basant sur le meilleur rapport qualité de l'extrait et de consommation énergétique.

Les résultats ont montré que les prétraitements par CM, CEP et US n'ont pas d'effet sur le pH et le °Brix tout au long de la fermentation en rouge. Ces prétraitements améliorent l'extraction des composés phénoliques tout au long de la fermentation en rouge et réduisent la durée de cette macération. L'augmentation de la durée du traitement par US améliore l'extraction des composés phénoliques. La teneur en composés phénoliques atteinte suite au traitement par US ($t=15$ min) est supérieure à celle obtenue suite au traitement par CM à 50°C. L'effet des US est attribué aux cavitations acoustiques qui causent une rupture mécanique de la paroi cellulaire, permettant une meilleure pénétration du solvant dans la matrice du raisin, et augmentant par la suite l'extraction des composés phénoliques. Les CEP semblent être les plus efficaces quant à l'amélioration de l'extraction des composés phénoliques durant la vinification en rouge. En effet, le traitement par US durant 5 à 15 min a amélioré la constante d'extraction phénolique (k de 7 à 38%, le CM a amélioré k de 20% alors que les CEP à intensité modéré et élevé ont amélioré respectivement k de 50 à 60%.

La comparaison de l'effet des trois prétraitements sur les teneurs en anthocyanes montre que les CEP ont permis d'atteindre les meilleurs concentrations en anthocyanes dans les extraits. Les CEP (5000 V/cm) ont permis d'améliorer l'extraction des anthocyanes de 60% comparée à une extraction conventionnelle. Quant aux tanins, les CEP ont de même permis d'atteindre les meilleures teneurs en tanins dans les extraits, avec une amélioration respective de 50 et 62% en tanins pour CEP1 et CEP2, suivi par les US3 (+47%), le CM (+42%) et les US2 et 1 (+30 et 20% respectivement). La comparaison de l'effet des trois prétraitements sur l'intensité colorante montre que les CEP1 (0.8 kV/cm, 100 ms) et CEP2 (5kV/cm, 1 ms) améliorent respectivement l'IC de 20 et 23%, alors que le chauffage modéré améliore l'IC de 17% et les US 1,2 et 3 améliorent l'IC respectivement de 6, 13 et 16%. L'effet prononcé des CEP sur l'amélioration de l'IC est dû au fait de l'amélioration de l'extraction des anthocyanes, des tanins avec l'amélioration de l'indice HCl de 34 à 38% pour CEP 1 et 2. Ce qui aboutit à une meilleure copigmentation des anthocyanes-tanins formant par la suite des complexes colorés améliorant l'intensité colorante. De plus, les trois prétraitements améliorent le pouvoir antiradicalaire des composés phénoliques extraits, avec la meilleure inhibition de radical pour les CEP1 et 2 (respectivement 89.17 et 89.75%).

Pour conclure, la comparaison des trois prétraitements: CM, CEP et US en amont de la vinification en rouge valide leur efficacité sur l'amélioration de la couleur, de l'extraction des anthocyanes et des tanins et de l'accélération de la cinétique d'extraction des composés

phénoliques. Toutefois, la technique CEP semble être la plus efficace en tant que prétraitement avant la fermentation en rouge, avec la meilleure teneur en composés phénoliques (anthocyanes et tanins) et en couleur du vin élaboré, le meilleur pouvoir antiradicalaire et la plus faible consommation énergétique.

5.2.2.ARTICLE: Pulsed electric field, ultrasound and thermal pretreatments for better phenolic extraction during red fermentation

(Voir le manuscrit qui suit)

Pulsed electric field, ultrasound, and thermal pretreatments for better phenolic extraction during red fermentation

Nada El Darra · Nabil Grimi · Richard G. Maroun ·
Nicolas Louka · Eugène Vorobiev

Received: 24 June 2012 / Revised: 5 October 2012 / Accepted: 15 October 2012
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract The moderate thermal (MT), ultrasound (US), and pulsed electric field (PEF) pretreatments are studied to enhance the phenolics extraction from Cabernet Franc (CF) grapes. The next pretreatment conditions are investigated: MT (50 °C, 15 min, 125 kJ/kg), US1 (24 kHz, 5 min, 121 kJ/kg), US2 (24 kHz, 10 min, 242 kJ/kg), US3 (24 kHz, 15 min, 363 kJ/kg), PEF1 (0.8 kV/cm, 100 ms, 42 kJ/kg), and PEF2 (5 kV/cm, 1 ms, 53 kJ/kg). The qualitative parameters of extracts (pH, °Brix, and color intensity), their total polyphenols content, anthocyanins, tannins, and free radical scavenging activity were determined during the whole period of alcoholic fermentation. The results show that all studied pretreatments improve phenolics extraction (anthocyanins and tannins content), color intensity, and scavenging activity of the samples during red fermentation. However, the moderate (0.8 kV/cm) and high (5 kV/cm) PEF were the most effective pretreatments and increased the phenolics extraction yield, respectively, on 51 and 62 %, while the MT and US3 pretreatments increased the phenolics extraction yield, respectively, on 20 and 7 %. The anthocyanin and tannins were also better extracted, and the color intensity was highest after the PEF pretreatments in comparison with the MT and US pretreatments.

N. El Darra (✉) · N. Grimi · E. Vorobiev
Laboratoire Transformations Intégrées de la Matière
Renouvelable (UTC/ESCOM, EA 4297 TIMR), Département de
Génie des Procédés Industriels, Centre de Recherche de
Royallieu, Université de Technologie de Compiègne, B.P.
20529-60205, 60200 Compiègne Cedex, France
e-mail: nada.darra@hotmail.com

N. El Darra · R. G. Maroun · N. Louka
Faculté des sciences, Université Saint-Joseph
de Beyrouth, Rue de Damas, BP.17-5208,
Mar Mikhael 1104, 2020,
Beirut 1107 2050, Lebanon

Keywords Thermal · Ultrasound · Pulsed electric fields · Anthocyanin · Phenolic compounds · Color intensity

Abbreviations

MT	Moderate thermal
US	Ultrasound
PEF	Pulsed electric field
CF	Cabernet Franc
DM	Dry matter
GAE	Galic acid equivalent
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
OD	Optical density
CI	Color intensity
SO ₂	Sulfur dioxide
HCl	Hydrochloric acid
R ²	Linear regression coefficient

List of symbol

d	Distance between electrodes (cm)
E	Electric field strength (V/cm)
n	Number of pulses
N	Number of trains
T	Time (min)
t_i	Pulse duration (μs)
t_{PEF}	Effective time of PEF treatment (s)
Δt	Time between pulses (ms)
Δt_i	Pause after each train (s)
m	Mass of grapes (kg)
U	Voltage (V)
W	Energy consumption (kJ/kg)
Y_0	Initial content of total phenolic compounds (mg GAE/100 g DM)
Y_t	Content of total phenolic compounds at t (mg GAE/100 g DM)

Introduction

Red grapes are the most important raw material for wine-making. Polyphenols constitute the significant group of organic compounds present in red grapes. Anthocyanins and tannins are the main phenolic compounds responsible for color, taste, and aging properties of the red wine [1]. The distribution of extractable phenolics in fresh grape is the following: about 10 % in pulp, 60–70 % in seeds, and 28–35 % in skin [2].

During the winemaking, just a part of grape skin phenolic compounds transfers to wine (about 40 % of anthocyanins and 20 % of tannins). The grape skin forms a physical barrier to extraction of anthocyanins, tannins, and aromas present in cells. The low extraction yield can be explained by the high resistance of skin cell walls and cytoplasmic membranes to the mass transfer [3, 4].

Numerous studies have been focused on techniques able to weaken the cell walls and facilitate the diffusion of grape's phenolic compounds during vinification [5–7]. Thermovinification has been developed to enhance the extraction of phenolic components [8, 9]. Heating leads to a better solubilization and diffusivity of cell components; however, it may cause degradation of the phenolic substances [10]. Moreover, the thermal treatment increases volatilization of aromatic compounds and may reduce the quality of wine; it is also energy costly.

Recently, different alternative pretreatments such as ultrasound (US), pulsed electric fields (PEF), and high-voltage electrical discharges (HVED) were tested to enhance the extraction of phenolic compounds from grape berries, grape mash, grape skin, and seeds [11–13].

Ultrasound can effectively enhance the extraction of intracellular compounds from different plants [13–16]. Literature indicates that ultrasound application at 20–35 kHz enhances the extraction of polyphenols from red-grape residues [14] and from grapes seeds [17]. Furthermore, Novak et al. [18] showed that the ultrasound improves the flavonoid extraction from grape skins avoiding undesirable degradation of phenolics. US enhances the extraction of phenolic and other bioactive compounds from grape must [19]. The weak US irradiation increases the amount of phenolic compounds in red wine [20]. Extraction enhancement is caused by the disruption of cell membranes and reduction in particle size due the collapse of cavitation bubbles [21, 22].

Pulsed electric field (PEF) is another alternative treatment for the extraction enhancement, which is particularly attractive due to its selectivity and nonthermal mechanism [7, 16, 23–28]. PEF leads to electroporation of cell membranes and increasing of their permeability. Consequently, the release of intracellular compounds is accelerated by PEF. Cell membranes of plant tissue can be electroporated by

moderate PEF of 0.5–0.8 kV/cm [24]. However, the inner cell layers (hypodermis) of grape berries containing majority of phenolic compounds are more difficult to damage electrically. The PEF treatment was recently studied for the phenolic extraction during traditional maceration and fermentation of the red must. López et al. [7], Puértolas et al. [27, 29], Donsi et al. [30], and Delsart et al. [11] have examined the PEF of red grapes to improve the extraction of anthocyanins and tannins during the maceration–fermentation process. These authors have shown that PEF treatment (1–7 kV/cm) can significantly increase the extraction rate of anthocyanins and total phenols from Merlot, Syrah, and Cabernet Sauvignon varieties.

Despite effective phenolic extraction obtained with some alternative techniques, it remains difficult to choose the better pretreatment for the red fermentation. Indeed, the grape varieties and properties, as well as fermentation conditions vary in different publications influencing on the phenolic content, color, and other wine parameters. The number of papers comparing different alternative pretreatments for the same grape varieties is still very limited.

The main objective of this work is to compare the influence of moderate thermal MT (50 °C), PEF, and US pretreatments on the qualitative parameters of Cabernet Franc extracts (pH, °Brix, color intensity, total polyphenols content, anthocyanins, tannins, and free radical scavenging activity) during the whole period of alcoholic fermentation. The optimal treatment conditions are selected regarding the extract quality and energy consumption.

Materials and methods

Grapes

The Cabernet Franc red grapes were manually harvested at the optimum maturity (total polyphenol index = 100, °Brix = 25.4) from vineyards in the province of Bekaa (Lebanon). Grapes were stored at 4 °C until their processing. The dry matter content of the grapes determined gravimetrically by oven drying at 105 °C was 25.5 ± 0.5 wt %.

Winemaking (micro-vinification)

The grapes were weighed ($m = 400$ g), destemmed, and crushed. After the crushing, the must and the grape skins were sampled and then subjected to different pretreatments: MT, US, and PEF. To prevent microbial activation, the potassium metabisulfite was added to the pretreated must in the quantity (3 g/hL) recommended in [51]. Then, the *Saccharomyces cerevisiae* yeast (Actiflore F33, Laffort Oenologie, Bordeaux, France) was added to the must in the quantity of 20 g/hL to launch the alcoholic fermentation [51].

Studied pretreatments

Moderate thermal treatment

Flask containing 400 ± 5 g of must and grape skins was placed in a thermostatic chamber maintaining at 50°C for 15 min (Fig. 1). The thermal treatment was carried out at 50°C to avoid a phenolic degradation (especially anthocyanins) caused by higher temperature [50].

The temperature control (temperature measurement precision with $\pm 0.1^\circ\text{C}$) was provided by a Teflon-coated thermocouple (Thermocoax, Suresnes, France) inserted into the sample.

The energy consumption of the MT treatment (kJ/kg) was calculated using the following formula:

$$W_{\text{MT}} = C_p \Delta T \quad (1)$$

where C_p is the heat capacity (estimated as 4.18 kJ/kg K) and ΔT ($\approx 30^\circ\text{C} = 30$ K) is the temperature increase during the treatment.

Ultrasound treatment

The experiments were carried out using ultrasound processor UP 400S (Hielscher GmbH, Germany). US probe acting as a wave amplifier was plunged in a flask containing 400 ± 5 g of must and grape skins (Fig. 2). The US processor operates at 400 W and 24 kHz frequency. The US duration was varied ($t_{\text{US}} = 5$ – 15 min), and the amplitude was fixed at 100% , which corresponds to 400 W. The different US durations were studied in order to select the optimal treatment conditions to decrease the energy consumption.

The energy consumption of the US treatment W_{US} (J/kg) was calculated using the following formula [31]:

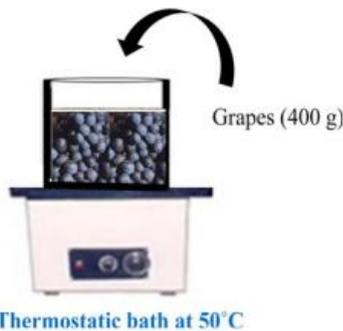


Fig. 1 Schematic representation of the experimental setup for MT treatment

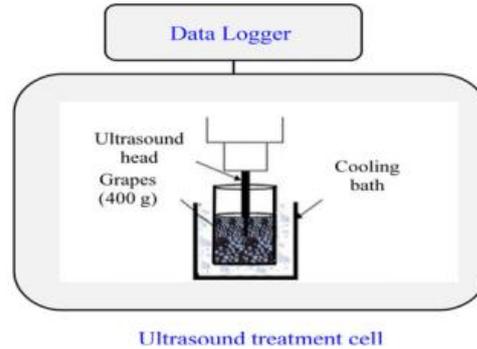


Fig. 2 Schematic representation of the experimental setup for US treatment

$$W_{\text{US}} = \frac{W_0 S t}{m} \quad (2)$$

where W_0 is the acoustic density (W/m^2), $W_0 = 1.05 \times 10^6$ W/m^2 for the US probe (UP S400, H14), S is the surface of the probe (m^2) ($S = 15.39 \times 10^{-5}$ m^2), t is the sonication time (s), and m is the mass of the product (kg).

Pulsed electric field

The experiments were carried out using a PEF generator (5 kV– 1 kA, Hazemeyer Company, Saint-Quentin, France) for the moderate PEF treatments ($E = 0.8$ kV/cm) (Fig. 3a), and PEF generator (40 kV– 10 kA, Tomsk Polytechnic University Russia) for the high electric PEF treatments ($E = 5$ kV/cm) (Fig. 3b). These PEF conditions were shown to be the optimal regarding the energy consumption (42 – 53 kJ/kg) and polyphenols extraction [11]. The shape of the pulses could effectively affect the efficacy of the treatment.

Moderate PEF treatment A sample with a mass of $m = 400 \pm 5$ g (grape skins + must) was placed in the rectangular PEF treatment cell supplied by two plane stainless electrodes (70×60 mm). The distance d between the electrodes can be varied from 1 to 6 cm. The value of the electric field strength E was evaluated as $E = U/d$, where U is the applied voltage. The distance between the electrodes was 6 cm to produce the moderate PEF of 0.8 kV/cm.

The PEF generator (5 kV– 1 kA) provided monopolar pulses of a near-rectangular shape (Fig. 3a). The total time of PEF treatment was calculated as $t_{\text{PEF}} = n \cdot N \cdot t_p$, where N ($=5$ – 10) is the number of series of pulses, n ($=100$) is the number of pulses in each series, and t_p ($=100 \pm 1$ μs) is the pulse duration. Therefore, the frequency of pulses in each

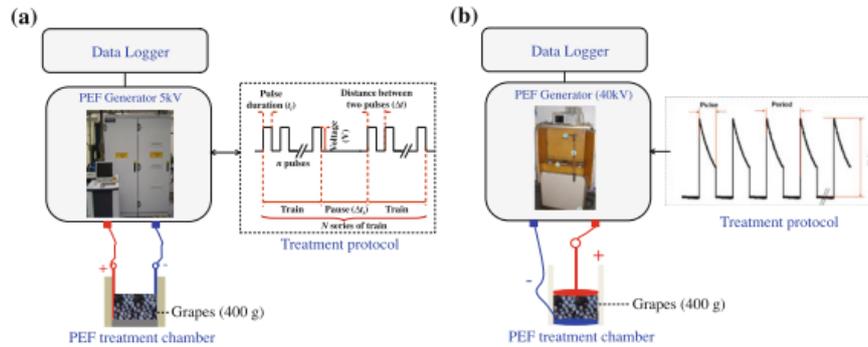


Fig. 3 Schematic representation of the experimental setup and the corresponding treatment protocol. PEF generator (5 kV–1 kA) (a) and PEF generator (40 kV–10 kA) (b)

series was 100. The time intervals between two series of pulses were Δt_r ($=10$ s) to avoid the product heating. The data were collected using a data logger and specific software, adapted by Service Electronique UTC, Compiègne, France.

High PEF treatment A sample with a mass of $m = 400 \pm 5$ g (grape skins + must) was placed in the cylindrical treatment chamber. Both electrodes were stainless steel disks of 100 mm in diameter. The distance between the electrodes was 80 mm to produce the high PEF of 5 kV/cm (estimated from the maximum peak voltage). The frequency was 0.5 ± 0.1 Hz.

The PEF generator (40 kV, 10 kA) provided monopolar pulses of an exponential form (Fig. 3b). The effective time of PEF treatment was estimated as:

$$t_{PEF} = n \cdot t_i \tag{3}$$

where n ($=100$) is the number of pulses and t_i ($\approx 9 \pm 1$ μ s) is the pulse duration. The pulse width is defined as the time until decay to 37 % for exponential decay pulses [26].

These conditions correspond to the electrical energy input of $W = 53$ kJ/kg.

The energy consumption of the PEF treatment (kJ/kg) was calculated as:

$$W = \frac{\int_0^t UI dt}{m} \tag{4}$$

where U is the PEF voltage (V), I is the current intensity (A), t is the time (s), and m is the mass of the must (kg). The studied treatments are presented in Table 1.

Alcoholic fermentation

After the MT, US, and PEF pretreatments, the *Saccharomyces cerevisiae* yeast was added to the must in the

Table 1 Pretreatments of Cabernet Franc grapes prior to alcoholic fermentation

Type of treatment	Treatment conditions	Time of treatment	Energy (kJ/kg)
UN	Untreated	0	0.0
MT	Heating at 50 °C	15 min	125
US1	$f = 24$ kHz	5 min	121
US2	$f = 24$ kHz	10 min	242
US3	$f = 24$ kHz	15 min	363
PEF1	$E = 0.8$ kV/cm	100 ms	42
PEF2	$E = 5$ kV/cm	1 ms	53

quantity of 20 g/hL to launch the alcoholic fermentation. The flasks containing must and grape skins were placed for 30 days in the incubator where the fermentation temperature was kept at 30 ± 1 °C to carry out the alcoholic fermentation (AF). Must samples were taken for analysis each day of AF. The samples were centrifuged at 4,000 rpm for 10 min using a HERMLE Universal Z 200A centrifuge (Wehingen, Germany) to remove any undesired solids. The supernatant was then used for the analysis ($^{\circ}$ Brix, polyphenol, and anthocyanin contents).

Analysis of grape musts

All analytical measurements were done on centrifuged samples. Must samples (1 mL) were taken for analysis each day of AF.

Total soluble matter and pH measurements

The total soluble matter ($^{\circ}$ Brix) and the pH of must were, respectively, measured with a refractometer AR (Leica Microsystems Inc., Buffalo, New York, USA) and a pH-

conductivity meter InoLab pH/cond Level 1 (WTW, Weilheim, Germany) at the frequency of 50 Hz.

Color determination in wines

Absorbance measurements were made using a spectrophotometer UV-VIS (Libra S32, Biochrom, France) with 1 cm path length glass cells.

The color intensity (CI) was determined as a sum of the optical densities at 420 nm (yellow), 520 nm (red), and 620 nm (blue) [32]:

$$CI = OD420 + OD520 + OD620 \quad (5)$$

Quantification of total polyphenols

The total phenolic content was determined according to Folin Ciocalteu (FC) method [33, 34]. A 0.2 mL of standard (gallic acid) or diluted sample, 1.0 mL of FC reagent, and 0.8 mL of Na_2CO_3 solution (7.5 %) were mixed and allowed to stand for 2 h at room temperature. Light absorption was measured at 750 nm by a spectrophotometer UV-VIS (Libra S32, Biochrom, France) against a blank similarly prepared, but containing distilled water instead of extract. The total phenolic content (Y_p) was expressed in grams of gallic acid equivalent (GAE) per 100 g of dry matter (DM) (g GAE/100 g DM).

Determination of anthocyanin concentration

The concentration of free anthocyanins in the samples was analyzed by bleaching with bisulfate³⁵. The SO_2 bleaching procedure requires the preparation of two samples, each containing 1 mL of must, 1 mL of EtOH with 0.1 % of HCl, and 20 mL of HCl at 2 %; 4 mL of H_2O is added to 10 mL of first sample, 4 mL of sodium bisulfite solution is added to 10 mL of second sample, and the mixture is diluted by half. The difference in optical density (ΔOD) at 520 nm is measured on a 1 cm optical path. The concentration of free anthocyanins is given by the following equation:

$$C(\text{mg/l}) = \Delta\text{OD} \times 875 \quad (6)$$

where 875 is the slope of the calibration curve obtained from malvidin-3-glucoside [35].

Determination of tannin concentration

Total tannin content (g/L) and HCl index which represents the tannin polymerization degree were determined according to Ribéreau-Gayon et al. [36]. Two milliliter of 1:50 diluted wine and 6 mL of 12 N HCl were mixed and heated in a water bath for 30 min. Following the rapid

cooling, 1 mL of ethanol was added to the mixture, and the resulting absorbance at 550 nm was measured.

Free radical scavenging activity

The DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical was used in the present study for screening of the radical scavenging activity of must samples [37].

The DPPH radical scavenging activity was measured with spectrophotometer UV-VIS (Libra S32, Biochrom, France). Samples were diluted in ethanol at the concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$. Then samples were mixed with 1,000 μL of 0.1 mM DPPH-ethanol solution and 450 μL of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). Methanol (50 μL) was used for blank measurements in this experiment. After 30 min of incubation at room temperature, the reduction of the DPPH free radical was measured by reading the absorbance at 517 nm. Butylhydroxytoluene (BHT) (a synthetic antioxidant) was used as a positive reference. The inhibition ratio (percent) was calculated from the following equation:

$$\% \text{inhibition} = \left[\frac{(\text{absorbance of control} - \text{absorbance of test sample})}{\text{absorbance of control}} \right] \times 100 \quad (7)$$

Modelization of phenolics extraction

Extraction kinetics is described by the following equation:

$$Y_{(t)} = Y_{(0)} + (Y_{(\infty)} - Y_{(0)})(1 - \exp(-kt)) \quad (8)$$

where $Y_{(t)}$ is the phenolic content at time (t), $Y_{(0)}$ is the phenolic content at time ($t = 0$), $Y_{(\infty)}$ is the phenolic content at infinite time, and k is the rate constant (s^{-1}).

Zanoni et al. [38] had proposed the same kinetic Eq. (8) to describe the dissolution of phenolic compounds of red grapes during the red wine fermentation. A similar equation had also been used by Amendola et al. [39] and Bucić-Kojić et al. [40] to describe the extraction of phenols from waste by-products such as grape marc and seeds.

Statistical analysis and data processing

Each experiment was repeated, at least, three times. Means and standard deviations of data were calculated. The Tukey's test was applied for analysis of the effects of MT, US, and PEF pretreatments. For each analysis, significance level of 5 % was assumed. All statistical analyses were carried out using the software Statgraphics Plus 5.1 (Statpoint Technologies, Inc.). TableCurve 2D 5.0 software

packages (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) were used to carry out nonlinear regression analysis of kinetic models.

Results and discussion

Must characteristics

The characteristics of the untreated (UN), MT-, US (1, 2, and 3)-, and PEF (1 and 2)-pretreated musts were monitored at $t = 0$ and 30 days of alcoholic fermentation (Table 2).

Table 2 shows that the studied pretreatments do not change the pH and °Brix values of the extract. Lopez et al. [7] had also shown that the PEF treatment does not modify the pH and °Brix values of extracts prior to red vinification. Tiwari et al. [41] had reported the absence of any effect of the US ($f = 20$ kHz, $t_{US} = 0$ –10 min) on the pH and °Brix values of extract prior to red fermentation. Mikolajzack et al. [42] had shown that the heating of red grapes (65 °C) for 20 min before the alcoholic fermentation does not modify the pH of extracts.

Polyphenols extraction during alcoholic fermentation

Figure 4 presents the kinetics of polyphenols extraction during the alcoholic fermentation of UN, MT-, US-, and PEF-treated Cabernet Franc grapes.

All studied pretreatments improve polyphenols extraction yield $Y(t)$ and can shorten the fermentation time. For instance, the polyphenols content of extract obtained after alcoholic maceration of the untreated grapes was 213 mg GAE/100 g DM, while it was 252 mg GAE/100 g DM after the MT pretreatment at 50 °C. Pinelo et al. [4] had also shown that the phenolic content of extract increases after the MT pretreatment of the Cabernet Franc at 50 °C.

Table 2 Must characteristics (pH and °Brix at $t = 0$ and 30 days of maceration) for Cabernet Franc grapes treated by MT, US, and PEF treatments prior to alcoholic fermentation

Type of treatment	Energy (kJ/kg)	pH		°Brix	
		0 day	30 days	0 day	30 days
UN	0.0	4.11	3.80	26.7	8.4
MT	125	4.06	3.81	27.0	8.6
US1	121	4.00	3.76	26.7	8.7
US2	242	4.01	3.80	26.8	8.5
US3	363	3.99	3.74	26.8	8.7
PEF1	42	4.07	3.78	26.7	8.7
PEF2	53	3.99	3.69	27.6	8.7

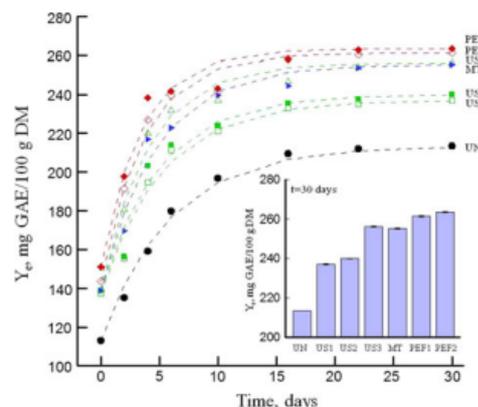


Fig. 4 Extraction kinetics of total polyphenols, $Y(t)$ after different treatments. Symbols represent the experimental data, and the dashed lines represent the model (Eq. 8)

The US enhances the polyphenols yield, which attains, respectively, 237, 240, and 256 mg GAE/100 g DM after the US pretreatments of 5, 10, and 15 min (Fig. 4). The temperature attained, respectively, 25, 30, and 38 °C after these US pretreatments. These data confirm the results of the previous study of Novak et al. [18], showing better polyphenols yield obtained for higher US exposure time. In our study, the US application for 15 min led to the temperature elevation up to 38 °C. However, the polyphenols extraction yield obtained after the US pretreatment for 15 min was higher than one after the MT pretreatment at 50 °C. The additional effect of US is usually attributed to the acoustic cavitations causing mechanical rupture of solid particles and cell structure, allowing better penetration of solvent into the sample matrix, increasing the contact surface area between the solid and liquid phase, and as a result, permitting better diffusivity of solute from the solid phase to the solvent [43]. It could also be speculated the existing of some synergistic effect of ultrasound and temperature effects.

The results presented in Fig. 4 suggest that PEF pretreatments seem to be most efficient for the enhancement of polyphenols extraction during the red fermentation of Cabernet Franc grapes.

The polyphenols content of extract attained nearly the same values of 260–263 mg GAE/100 g DM after the high (5 kV/cm, 1 ms) and the moderate (0.8 kV/cm, 100 ms) pretreatments. These PEF pretreatments consumed approximately the same energy (Table 2). The temperature attained, respectively, 27 and 23 °C after the high and the moderate PEF pretreatments. Such a result is in a good agreement with the previous study of Donsi et al. (2010) [30]. These authors demonstrated that the PEF treatment

Table 3 Temperature after the pretreatment T ($^{\circ}\text{C}$), extraction rate constant k (s^{-1}) of total polyphenols yield $Y(t)$, and correlation coefficient (R^2) for red grapes versus type of treatment during alcoholic fermentation

Type of treatment	k (s^{-1})	R^2
UN	0.177 ^f	0.99
MT	0.213 ^d	0.98
US1	0.190 ^e	0.98
US2	0.198 ^e	0.98
US3	0.244 ^c	0.98
PEF1	0.268 ^b	0.98
PEF2	0.287 ^a	0.97

a, b, c, d, e, f represent significant differences between the different modalities. Means discrimination by LSD test ($\alpha = 0.05$)

($E = 1 \text{ kV/cm}$, $t_{\text{CEP}} = 100 \text{ ms}$, $W = 50 \text{ kJ/kg}$) prior to fermentation step enhances the phenolic content of the grape extract on 20 %. As the majority of polyphenols is located in the inner cell layers (hypodermis) of grape berries [44], the PEF treatment acts by increasing the skin cells permeability, facilitating release of polyphenols [45].

Simplified kinetic model (Eq. 8) fits rather well experimental data presented in Fig. 4. Table 3 shows the values of kinetic constant (k) and correlation coefficient (R^2) for the model.

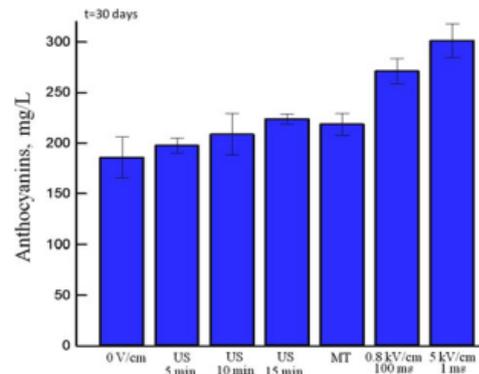
The values of the extraction rate constant (k) were higher for pretreated samples ($k = 0.19\text{--}0.287 \text{ s}^{-1}$) as compared to the untreated ones ($k = 0.177 \text{ s}^{-1}$). The higher extraction rate was obtained, respectively, after the PEF2 and PEF1 pretreatments, following by US3 ($t = 15 \text{ min}$) and MT pretreatments.

The US treatments for 5–15 min increase the value of k on 7–38 %, which corresponds to the results obtained in Vilku et al. [46]. The MT treatment at $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ increases the k value on 20 %, while the moderate and high PEF treatments increase the k value on 50–60 %.

Anthocyanin and tannins yields at the end of alcoholic fermentation

Anthocyanin extraction

Figure 5 presents the total anthocyanins content (mg/L) in extracts obtained after the alcoholic fermentation of Cabernet Franc grapes. Anthocyanins are mainly located in the grape skin, whereas tannins are presented in both grape skin and seeds [4]. The application of the different pretreatments increases the anthocyanins content in extract. For instance, the anthocyanin content of the extract obtained after the alcoholic maceration of untreated grapes was 186 mg/L, while it was increased to, respectively, 198, 209, and 224 mg/L after the

**Fig. 5** Anthocyanins content (mg/L) in extracts obtained after the alcoholic fermentation of Cabernet Franc grapes

alcoholic fermentation of grapes treated by US1, 2, and 3 and attained 204 mg/L after the alcoholic fermentation of grapes treated by MT treatment at $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$. In the study of Corrales et al. [16] the US treatment of grape skins (35 kHz, 1 h) did not improve the anthocyanin content of extract in comparison with the untreated samples.

The moderate (0.8 kV/cm, 100 ms) and high (5 kV/cm, 1 ms) PEF treatments permitted attain the best anthocyanin content of extract (271 and 301 mg/L, respectively). Fig. 5 shows that the anthocyanin content of extract after the alcoholic fermentation of grapes treated by high PEF2 was increased on 60 % in comparison with the conventional extraction (UN). In the study of Donsi et al. (2010) [30], the PEF treatment of red grapes ($E = 1 \text{ kV/cm}$, $t_{\text{CEP}} = 100 \text{ ms}$, $W = 50 \text{ kJ/kg}$) also led to the higher anthocyanins content (+20 %) in the red wine.

Tannins extraction yields and HCl index

Figures 6 and 7 present the total tannins content (g/L) and the HCl index (%) in extracts obtained after the alcoholic fermentation of Cabernet Franc grapes. The application of the different pretreatments increases the tannin content in extract and the HCl index. For instance, the tannins content of extract obtained after the alcoholic maceration of untreated grapes was 2.46 g/L, while it was, respectively, 2.96, 3.21, and 3.62 g/L after the alcoholic fermentation of grapes treated by US1, 2, and 3 and attained 3.51 g/L after the alcoholic fermentation of grapes treated by MT treatment at $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$. The moderate (0.8 kV/cm, 100 ms) and the high (5 kV/cm, 1 ms) PEF treatments permitted attain the higher tannin content of extract (3.69 and 3.92 g/L, respectively). Therefore, the best results for the tannin extraction were obtained after the PEF treatments (+50 and +62 %, respectively, for

the PEF1 and PEF2, followed by the US3 (+47 %), the MT (+42 %), and the US1 and US2 (+20 and +30 %, respectively). The positive effect of PEF treatment on the tannins extraction was also shown by Delsart et al. [11].

The application of the different pretreatments also increases the HCl index (%) of extracts (Fig. 7). For instance, the HCl index (%) of extract obtained after the alcoholic maceration of untreated grapes was 18.8 %, while it was increased to, respectively, 20.5, 25.2, and 32.6 % after the alcoholic fermentation of grapes treated by US1, 2, and 3 and attained 29.1 % after the alcoholic fermentation of grapes treated by MT treatment at 50 °C. The moderate (0.8 kV/cm, 100 ms) and high (5 kV/cm, 1 ms) PEF treatments permitted attain the higher level of HCl index (%) of extract (38.28 and 34.36 %, respectively).

The higher degree of anthocyanin–tannins copigmentation may conduct to enhance the color extraction and stability [47].

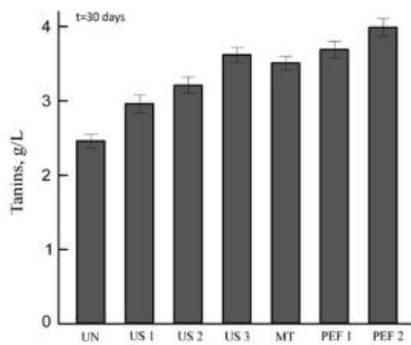


Fig. 6 Tannins content (g/L) in extracts obtained after the alcoholic fermentation of Cabernet Franc grapes

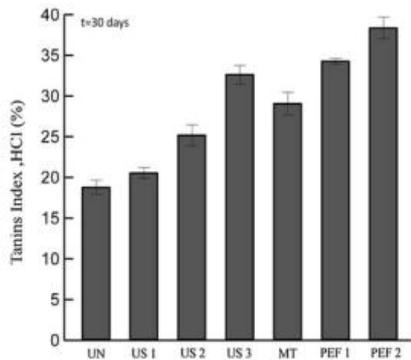


Fig. 7 HCl index (%) of extracts obtained after the alcoholic fermentation of Cabernet Franc grapes

Color intensity kinetics during alcoholic fermentation

Figure 8 presents the kinetics of color intensity during the alcoholic fermentation of UN, MT-, US-, and PEF-treated Cabernet Franc grapes. The evolution of CI was similar in all wines. The application of all studied pretreatments enhances color intensity during the alcoholic fermentation (Fig. 8). A rapid initial increase in CI is observed until reaching a maximum value. The increase in the CI during the maceration/fermentation step is mainly related to the increase in monomeric anthocyanins content [48]. The maximum value of CI was attained after 10 days of alcoholic fermentation for both untreated and pretreated CF grapes. For instance, the color intensity of extract obtained after 10 days of alcoholic maceration of the untreated grapes was 15.7, while it was 18.8 after the MT pretreatment at 50 °C. The US treatment enhances the color intensity, which attains, respectively, 17.2, 18, and 18.4 after the US pretreatments of 5, 10, and 15 min (Fig. 8). The results presented in Fig. 8 suggest that PEF enhances better the color intensity than US and MT treatments. For instance, the CI of extracts increased to 20–21 after both high (5 kV/cm, 1 ms) and moderate (0.8 kV/cm, 100 ms) PEF treatments. After 10 days of alcoholic fermentation, the color intensity of wines became decreasing. This decrease can be explained by anthocyanins hydrolysis and oxidation during fermentation (Monagas et al. [3]). However, even at the end of fermentation period of 30 days, the color intensity remained higher for wines obtained from the treated grapes. Moreover, the tendency of the highest color intensity of wines obtained from grapes treated electrically was also confirmed. The application of moderate (0.8 kV/cm, 100 ms) and high (5 kV/cm, 1 ms) PEF increases color intensity of the red wine, respectively, on 20 and 23 %,

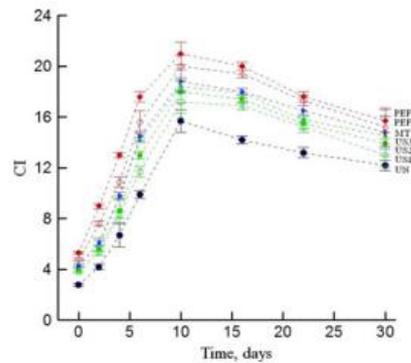


Fig. 8 Color intensity (CI) for CF varieties after different pretreatments (PEF1 and 2, US1, 2, and 3 and MT treatments at 50 °C) during the alcoholic fermentation

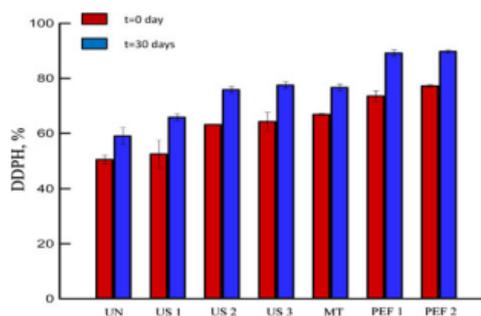


Fig. 9 Free radical scavenging activity of phenolic compounds of CF after different pretreatments (PEF, US, and MT treatments at 50 °C) immediately after pretreatment ($t = 0$ day) and the end of AF ($t = 30$ days)

while the MT treatment increases the CI on 17 %, and the US treatments increase the CI on 6, 13, and 16 %, respectively, for the US1, 2, and 3. In the experiments of Donsi et al. [30], the PEF treatment ($E = 1$ kV/cm, $t_{PEF} = 100$ ms, $W = 50$ kJ/kg) applied before red fermentation enhanced the phenolic content and the color intensity of the red wine on 20 %. Lopez et al. [7] demonstrated that immediately after the PEF application (2–5 kV/cm), the values of color intensity increase as compared to control samples components.

Influence of different pretreatments on the scavenging activity of polyphenols during the alcoholic fermentation

The polyphenolic content usually correlates with the most scavenging activity [49]. In our experiments, the scavenging activity was increased during the period of alcoholic fermentation (Fig. 4). As shown in Fig. 9, the pretreated samples had a better inhibitory activity against the DPPH radical compared to the untreated samples.

Radical inhibition ratio attained, respectively, 89.17 and 89.75 % for the Cabernet Franc extracts obtained after the fermentation of PEF1- and PEF2-treated grapes, while it was, respectively, 65, 75, and 77 % after the ultrasound treatment (US1, 2, and 3). The scavenging activity of extract obtained after the MT treatment was 76 %. The lowest scavenging activity of extract was obtained for the untreated samples (59 %).

Conclusion

The application of MT (50 °C, 125 kJ/kg), US (5–15 min, 121–363 kJ/kg), and PEF (0.8 and 5 kV/cm, 42–53 kJ/kg) enhances the color intensity, increases the anthocyanins

content, and accelerates the extraction of phenolic compounds during the alcoholic fermentation of Cabernet Franc grapes. The comparison between these three alternative technologies shows that both moderate (0.8 kV/cm) and high (5 kV/cm) PEF treatments permit attain the highest phenolic content in wine (increased on 23 %) and highest anthocyanin content (increased on about 60 %) and tannins content (increased on about 60 %). The wines obtained from PEF-treated Cabernet Franc grapes have the highest color intensity during the whole alcoholic fermentation period. The PEF treatment also consumed less energy (40–50 kJ/kg) during the treatment. The US and MT treatments also permitted enhance the phenolic, anthocyanin, and tannin contents of wines, as well obtain the higher color intensity comparing to the untreated samples. The longest US treatment (15 min) was more effective than the MT treatment in terms of phenolics extraction; however, it was most energy consuming.

Acknowledgments The authors would like to thank the society KSARA (Lebanon) for financial support.

References

- Jackson RS (2000) Wine sciences: principles, practice, perception, 2 nd edn. Academic Press, San Diego
- Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y (2003) Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. *J Med Food* 6:291–299
- Monagas M, Bartolome B, Gomez-Cordoves C (2005) Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45:85–118
- Pinelo M, Arnous A, Meyer AS (2006) Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci Technol* 17:579–590
- Sun BS, Spanger MI, Roque-Do-Vale F, Leandro MC, Belchior AP (2001) Effect of different winemaking technology on phenolic composition in Tinta Miuda red wines. *J Agri Food Chem* 49:5809–5816
- Sacchi KL, Bisson LF, Adams D (2005) A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am J Enol Vitic* 56:197–206
- López N, Puértolas E, Condón S, Álvarez I, Raso I (2008) Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes. *Innov Food Sci Emerg Technol* 9:477–482
- Parenti A, Spugnoli P, Calamai L, Ferrari S, Gori C (2004) Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovese grape. *Eur Food Res Technol* 4:360–366
- Kelebek H, Canbas A, Cabaroglu T, Selli S (2007) Improvement of anthocyanin content in the cv. Okuzgozu wines by using pectolytic enzymes. *Food Chem* 105:334–339
- Palma MM, Taylor LT (1999) Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *J Chromatogr A* 849:117–124
- Delsart C, Ghidossi R, Poupot C, Cholet C, Grimi N, Vorobiev E, Milisic V, Mietton Peuchot M (2012) Enhanced extraction of valuable compounds from merlot grapes by pulsed electric field. *Am J Enol, Vitic* 11088

12. Boussetta N, Vorobiev E, Deloison V, Pochez F, Cordin-Falcaimaigne A, Lanoisellé JL (2011) Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: application of High-Voltage Electrical discharges. *Food Chem* 128:364–370
13. Chemat F, Zill EH, Khan MK (2011) Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrason Sonochem* 18:813–835
14. González MG, Uasuquén-Castro X, Martínez RM, Aya-Baquero H (2006). Ultrasound-assisted Extraction of Polyphenols from Red-grape (*Vitis Vinifera*) Residues. 13th world congress of food science & technology
15. Cabredo-Pinillos S, Cedron-Fernandez T, Gonzalez-Briongos M, Puente-Pascual L, Saenz-Barrio C (2006) Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from wine samples: optimization of the method. *Talanta* 69:1123–1129
16. Corrales M, Toepfl S, Butz P, Knorr D, Tauscher B (2008) Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. *Innov Food Sci Emerg Technol* 9:85–91
17. Ghafoor K, Choi YH, Jeon JY, In HJ (2009) Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *J Agric Food Chem* 57:4988–4994
18. Novak I, Janeiro P, Seruga M, Oliveira-Brett A (2008) Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal Chim Acta* 630:107–115
19. Cocito C, Gaetano G, Delfini C (1995) Rapid extraction of aroma compounds in must and wine by means of ultrasound. *Food Chem* 52:311–320
20. Masuzawa N, Ohdaira E, Ide M (2000) Effects of ultrasonic irradiation on phenolic compounds in wine. *Jpn J Appl Phys* 39:2978–2979
21. Vinatoru M, Toma M, Mason TJ (1999) Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from plants and the constituents. *Adv Sonochem* 5:216
22. Paniwnyk L, Beaufoy E, Lorimer JP, Mason TJ (2001) The extraction of rutin from flower buds of sophora japonica. *Ultrason Sonochem* 8:299–301
23. Vorobiev E, Lebovka NI (2007) Extraction of intercellular components by pulsed electric fields. In: Raso J, Heinz V (eds) Pulsed electric field technology for the food industry. Fundamentals and applications, Springer, pp 153–194
24. Vorobiev E, Lebovka NI (2008) Pulsed electric field induced effects in plant tissues: fundamental aspects and perspectives of application. In: Vorobiev E, Lebovka N (eds) Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials. Springer, Berlin, pp 39–82
25. Vorobiev E, Lebovka N (2010) Extraction from solid foods and biosuspensions enhanced by electrical pulsed energy (pulsed electric field, pulsed ohmic heating and high voltage electrical discharges). *Food Engineering Reviews*, no 2
26. Toepfl S, Heinz V, Knorr D (2006) Applications of pulsed electric field technology for the food industry. In: Raso J, Heinz V (eds) Pulsed electric field treatment of foods. Elsevier, Oxford, pp 197–221
27. Puértolas E, Saldaña G, Condón S, Álvarez I, Raso J (2010) Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. *Food Chem* 119:1063–1070
28. De Vito F, Ferrari G, Lebovka N, Shynkaryk M, Vorobiev E (2008) Pulse duration and efficiency of soft cellular tissue disintegration by pulsed electric fields. *Food Bioprocess Technol* 1:307–313
29. Puértolas E, López N, Condón S, Álvarez I, Raso J (2010) Potential applications of PEF to improve red wine quality. *Trends Food Sci Technol* 21:247–255
30. Donsi F, Ferrari G, Fruilo M, Pataro G (2010) Pulsed electric field-assisted vinification of Aglianico and Piedirosso Grapes. *J Agric Food Chem* 58:11606–11615
31. Ratoarino CF, Wilhelm AM, Berlan J, Delmas H (1995) Power measurement in sonochemistry. *Ultrason Sonochem* 2:43–47
32. Glories Y (1984) La couleur des vins rouges: 11 partie "les équilibres des anthocyanes et des tanins. *Connaissance Vigne Vin* 18:195–217
33. Slinkard K, Singleton VL (1977) Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Vitic* 28:49–55
34. Ribéreau-Gayon P (1970) Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chimie Analytique* 52:627–631
35. Ribéreau-Gayon P, Stonestreet E (1968) Les dosages des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull Soc Chim Fr* 9:2649–2652
36. Ribéreau-Gayon P (1998) *Traité d'oenologie*, tome 2. Ed Dunod
37. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y (1999) Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *thoningia sanguine* on experimentally induced liver injuries. *Gen Pharmacol* 32:661–667
38. Zanoni B, Siliani S, Canuti V, Rosi I, Bertuccioli M (2010) A kinetic study on extraction and transformation phenomena of phenolic compounds during red wine fermentation. *Int J Food Sci Tech* 45:2080–2088
39. Amendola D, De Faveri DM, Spigno G (2010) Grape marc phenolics: extraction kinetics, quality and stability of extracts. *J Food Eng* 97:384–392
40. Bucic-Kojic A, Planinic M, Tomas S, Bilic M, Velic D (2007) Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J Food Eng* 81:236–242
41. Tiwari BK, Patras A, Brunton N, Cullen PJ, O'Donnell CP (2010) Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrason Sonochem* 17:598–604
42. Mikolajzack M, Veyret M, Williams P, Doco T, Escudier JL (2011) Jus de raisin: comment extraire le maximum du potentiel de la baie de raisin. *Revue française d'oenologie* 249:24–32
43. Rostagno MA, Palma M, Barroso CG (2003) Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *J Chromatogr A* 1012:119–128
44. Lecas M, Brillouet JM (1994) Cell wall composition of grape berry skins. *Phytochemistry* 35:1241–1243
45. Vorobiev E, Lebovka NI (2011) Pulse electric field assisted extraction. In: Lebovka N, Vorobiev E, Chemat F (eds) *Enhancing extraction processes in the food industry*. CRC Press, USA
46. Vilku K, Mawson R, Simons L, Bates D (2008) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry: a review. *Innov Food Sci Emerg Technol* 9:161–169
47. Boulton R (2001) The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am J Enol Vitic*. 52:67–86
48. Ribéreau-Gayon P (1982) The anthocyanins of grapes and wines. In: Markakis P (ed) *Anthocyanins as food colors*. Academic Press, New York, pp 209–244
49. Spigno GL, Tramelli L, De-Faveri DM (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J Food Eng* 81:200–208
50. Patras Ankit, Brunton NP, O'Donnell C, Tiwari BK (2010) Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods: mechanisms and kinetics of degradation. *Trends Food Sci Technol* 21:3–11
51. Ducasse MA (2009) Impact des enzymes de macération sur la composition en polysaccharides et en polyphénols des vins rouges – étude de l'évolution de ces composés en solution modèle vin. Thèse de doctorat de l'université Montpellier II, Montpellier

5.3. Comparaison de différents prétraitements : Les Champs électriques pulsés, la thermovinification et l'ajout des enzymes en amont de la vinification en rouge

L'article «Pulsed electric field, enzymatic and thermovinified pretreatments for enhancing the phenolic extraction during red fermentation» a été soumis dans «*Food Chemistry*». Cet article porte essentiellement sur la comparaison de trois prétraitements en amont de la vinification en rouge: les champs électriques pulsés, le traitement enzymatique et la thermovinification.

5.3.1. Résumé de l'article

Nous avons déjà expliqué dans l'article précédent, l'importance d'étudier des prétraitements dans le but d'améliorer l'extraction des composés phénoliques tout au long de la fermentation en rouge. Cet article vient pour comparer d'autres techniques de prétraitements : les champs électriques pulsés (CEP), le traitement enzymatique (TE) et la thermovinification (TV) sur les caractéristiques qualitatives et quantitatives durant la fermentation en rouge des raisins de Cabernet Sauvignon.

Les prétraitements par CEP, TE et TV ont été appliqués sur une variété de raisins rouges (Cabernet Sauvignon) dans le but d'améliorer l'extraction phénolique durant la fermentation en rouge. Les conditions des différents prétraitements sont les suivantes: CEP (5000 V/cm, 1ms), TE (6 g/hL d'enzymes) et TV (chauffage 30 min à 70°C). Durant notre étude, les raisins ont été pesés ($m=4500\text{g}$), foulés puis soumis aux différents prétraitements par CEP, TE et TV puis inoculés par les levures (10g/hL) pour déclencher la fermentation alcoolique pendant 16 jours dans une étuve à 30°C. Une étude des caractéristiques du moût de CS (pH, °Brix), intensité colorante, composition de la couleur du vin, contenu phénolique et anthocyanique, et composition quantitative en proanthocyanidine ont été déterminés tout au long de la fermentation alcoolique. La couleur du moût a été déterminée par les paramètres de CIELAB (L^* , a^* , and b^*).

Les résultats de notre étude montrent que les trois prétraitements : CEP, TE et TV n'ont pas d'effet significatif sur le pH et le Brix tout au long de la fermentation en rouge. De plus, la consommation énergétique des CEP ($E=48\text{ kJ/kg}$) est plus faible que celle de la thermovinification ($E=420\text{ kJ/kg}$).

L'étude des cinétiques des composés phénoliques et d'anthocyanes des extraits prétraités par TE, CEP et TV montre une tendance similaire pour le témoin, le TE et le CEP.

Par contre, une autre allure a été détectée pour la TV. Ces prétraitements améliorant l'extraction des composés phénoliques tout au long de la fermentation en rouge, avec un effet comparable entre la thermovinification (+41%) et les CEP (+36%) suivi par le traitement enzymatique (+12%). De même, la TV et les CEP sont plus efficaces vis à vis de l'amélioration de la couleur que TE.

L'identification des composés phénoliques par CLHP des moûts prétraités montre que le contenu en flavonols augmente de 97% pour la TV, 48% pour les CEP, par contre, pas d'effet détectable sur les flavonols par TE. La teneur en acides phénoliques augmente de 12% pour les CEP, 92% pour la TV et 32% pour le TE. De plus, le TE et le CEP améliorent significativement le contenu en anthocyanes respectivement de 3 et de 18%. Alors que le TV améliore l'extraction d'anthocyanes durant la fermentation alcoolique de 31%.

Les résultats de l'analyse des proanthocyanidines du vin élaboré à partir des raisins prétraités montrent que la TV et la CEP améliorent significativement la teneur en tanins, par contre aucun effet notable n'a été détecté entre le contrôle et le TE. De plus, pour les différents prétraitements, la proportion des formes monomériques restent stables. Cette analyse montre de même que le degré de polymérisation des proanthocyanidines du témoin, de TE et des CEP restent constantes. En ce qui concerne la TV, une chute du degré de polymérisation a été notée, ce qui met en évidence une astringence plus faible pour les vins élaborés à partir de raisins thermovinifiés.

L'étude de l'effet des différents prétraitements sur la composition de la couleur du vin montre que la couleur due à la copigmentation au début de la fermentation alcoolique, est respectivement de 28, 40 et 48% pour TE, CEP et TV, alors qu'elle est juste de 16% pour le témoin.

A la fin de la fermentation alcoolique, les différents prétraitements aboutissent à la même composition de la couleur du vin rouge. Les cinétiques du contrôle, TE et CEP sont similaires. Alors que la thermovinification aboutit à une cinétique différente, ceci étant dû au chauffage en amont de la fermentation.

L'analyse de la couleur (L^* , a^* , and b^*) du vin élaboré par les différents prétraitements montrent une différence significative de L, a, b des raisins traités par CEP et TV au début de la fermentation alcoolique. A la fin de la fermentation alcoolique, les écarts de couleurs

deviennent plus faibles. Cependant, l'écart le plus élevé sur les indices de couleur (L^* , a^* , and b^*) a été noté pour les CEP.

Pour conclure, la comparaison des trois prétraitements: TE, CEP et TV en amont de la vinification en rouge valide leur efficacité sur l'amélioration de la couleur, de l'extraction des anthocyanes et des tanins et également sur l'accélération de la cinétique d'extraction des composés phénoliques. Toutefois, chaque prétraitement aboutit à un profil phénolique différent du vin élaboré. La technique TE semble être moins efficace que les CEP et la TV en tant que prétraitement avant la fermentation en rouge. La TV aboutit à la meilleure extraction phénolique et intensité colorante. Les CEP améliorent aussi les critères phénoliques, avec une moindre consommation énergétique par rapport à TV ($W= 48$ kJ/kg pour CEP et 420 kJ/kg pour TV), une plus faible durée de traitement ($t=1$ ms pour CEP et $t= 30$ min pour TV), et le CEP est une technique athermique ($\Delta T < 7^\circ\text{C}$ pour CEP et $\Delta T = 50^\circ\text{C}$ pour TV).

5.3.2. ARTICLE: Pulsed electric field, enzymatic and thermovinified pretreatments for enhancing the phenolic extraction during red fermentation

(Voir le manuscrit qui suit)

Phenolic profile of red wine elaborated by pulsed electric field, enzymatic and thermovinified pretreatments

Nada El Darra^{a,b}, Marie-Agnès Ducasse^c, Mohammad F.Turk^d, Nabil Grimi^a, Richard G.Maroun^b, Nicolas Louka^b, Rémi Guérin-Schneider^c, Eugène Vorobiev^a

^aUniversité de Technologie de Compiègne, Département de Génie des Procédés Industriels, Laboratoire Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable, (UTC/ESCOM, EA 4297 TIMR), Centre de Recherche de Royallieu, B.P. 20529-60205 Compiègne Cedex, France

^bUniversité Saint-Joseph de Beyrouth, Faculté des sciences, Rue de Damas, BP.17-5208, Mar Mikhael 1104, 2020, Beyrouth 1107 2050, Liban

^c Institut Français de la Vigne et du Vin, Pôle Rhône-Méditerranée, Domaine de Pech Rouge, 11430 Gruissan, France

^d Ecole supérieure de chimie organique et minérale "ESCOM", Compiègne Cedex, France

Short version of title:

Electrical, enzymatic and thermovinified treatments assisted polyphenol extraction

Abstract

During the traditional winemaking process, only a small fraction of grape skin polyphenols is transferred to the red wine. For this reason, different pretreatments, known to improve mass transfer coefficients, are used to increase the polyphenol content of grape must. Among these techniques, pulsed electric fields (PEF), enzyme treatment (ET) and thermovinification (TV) that have different impacts are therefore likely to produce different qualities of wines. The aim of this study is to assess the effects of three pretreatments techniques (PEF, ET and TV treatments) on the polyphenol extraction into the must during red fermentation and on the impact on wine color. All pretreatments resulted in a higher extraction of phenolic compounds and improving of the colors during the fermentative phase comparing to control. The comparison between the three techniques showed that the PEF and thermovinified pretreatments have a higher effect on polyphenol extraction than the enzymatic treatment. In conclusion, this study showed that the different pretreatments could induce different sensory profile of red wines and revealed that PEF pretreatment is an attractive technique due to the non-thermal effect, the low energy consumption and the short duration of this technology for extraction enhancement.

Keywords: pulsed electric fields, enzyme treatment, thermovinification, phenolic, vinification.

1 **Introduction**

2 The red grape skins are particularly rich in extractable polyphenols (anthocyanins and tannins)
3 which are responsible of the major sensorial characteristics of wine such as the colour astringency
4 and the ageing ability (Robichaud & Noble, 1990, Gawel, 1998, Sarni-Manchado *et al.*, 1999).
5 Grape anthocyanins are red pigments, located in the first external layers of the hypodermal tissue,
6 mainly in the vacuoles (Barcelo *et al.*, 1994). This family is responsible for the evolution of wine
7 colour due to the copigmentation phenomenon (Boulton, 2001, Daris *et al.*, 2002, Boselli *et al.*,
8 2004, Fulcrand *et al.*, 2004). Copigmentation phenomenon is a non-covalent association between
9 anthocyanin pigments and copigments especially tannins, flavonols and phenolic acids which is
10 responsible of the anthocyanin colour modification (Mazza & Brouillard, 1990) and the long term
11 colour stability (Robinson & Robinson, 1931, Cai *et al.*, 1990).

12 During the traditional winemaking, 40% of anthocyanins and 20% of tannins of the grape skins
13 are partially transferred to the wine (Boulton 2003, Haslam 2005, Cerpa-Calderon & Kennedy,
14 2008). The partial extraction of these compounds is mainly due to the resistance to the mass
15 transfer through the cell walls and the cytoplasmatic membranes (Monagas *et al.*, 2005a, Pinelo *et*
16 *al.*, 2006). Numerous studies have been focused on prefermentive techniques such
17 thermovinification, enzyme maceration and pulsed electric field that are able to weaken the cell
18 barriers and increase the concentration as well as the quality of polyphenols in the red wines
19 during vinification (Sun *et al.*, 2001, Sacchi *et al.*, 2005, López *et al.*, 2008).

20 Thermovinification is a physical thermal method that aims to disrupt the cell structure by
21 heating the destemmed grapes up to 70°C for a short time (30 to 40 minutes) and then cooling
22 before fermentation (Fischer *et al.*, 1999, Parenti *et al.*, 2004, Kelebek *et al.*, 2007). As a result,
23 water soluble anthocyanins are instantaneously released among other constituents of the cells in a
24 non selective manner.

25 It has, in fact, been reported that compared to fermentation on the skins for an untreated
26 sample (without thermovinification), the concentrations of anthocyanins in wine have been shown
27 to increase after thermovinification with the expectation that little additional tannin would be
28 extracted during thermovinification without alcohol present (Auw *et al.*, 1996, Girard *et al.*,
29 1997).

30 Commercially pectolytic enzymes consist of preparations of pectinases and low quantities
31 of other enzymes, especially hemicellulases and cellulases (Munoz *et al.*, 2004). Pectinases act on
32 the pectic substances which occur as the structural polysaccharides in the middle lamella and
33 primary grape cell wall (Pinelo *et al.*, 2006). They have been widely used in the wine industry
34 to improve important characteristics of wines, such as aroma (Canal-Llauberes, 1990,
35 Castro-Vázquez *et al.*, 2002, Cabaroglu *et al.*, 2003) and colour (Revilla & González-San
36 José, 2003) by breaking down the skin cell walls which lead to the release of pigments (Ducasse
37 *et al.*, 2010, Ducruet *et al.*, 1997). However, the studies on the effect of these enzymes on the
38 wine colour and anthocyanin content have led to conflicting results (Sacchi *et al.*, 2005). Some
39 authors showed a significant increase of the anthocyanins content and colour due to the enzymatic
40 effect (Kelebek *et al.*, 2007, Revilla & González-San José, 2003, Bakker *et al.*, 1999, Ducruet *et*
41 *al.*, 1997) while others have found the opposite effect (Wightman *et al.*, 1997; Bautista-Ortin *et*
42 *al.*, 2005). The different enzymatic preparation proposed in the wine industry might explain the
43 different impacts of the ET on the phenolic extraction. The enzymatic treatment (ET) requires the
44 addition of exogenous molecules in the fermentation processes.

45 Compared to the treatments described above, pulsed electric field (PEF) is an athermal
46 treatment (Lebovka *et al.*, 2003, Wu *et al.*, 2005, Cserhalmi *et al.*, 2006) that does not require the
47 addition of exogenous molecules in the fermentation processes. It is a physical treatment that
48 requires an electric field that induces the electroporation of the cell membranes, increases their
49 permeability and accelerates the release of intracellular compounds (Vorobiev & Lebovka, 2008,

50 2010, Toepfl & Knorr, 2006). Recent studies have demonstrated that the application of PEF
51 treatment to the red grape before the maceration/fermentation step enhances the extraction of
52 polyphenols during subsequent vinification steps (López *et al.*, 2008, Puértolas *et al.*, 2010a,b,
53 Delsart *et al.*, 2012).

54 López *et al.*, (2008), Puértolas *et al.*, (2010a,b), Donsi *et al.*, 2010 and Delsart *et al.*,
55 (2012) have examined the feasibility of processing red grapes by PEF in order to improve the
56 extraction of anthocyanins and tannins during the maceration-fermentation stage of the
57 winemaking process. These authors have shown that an increment in the electric field from 1 to 7
58 kV/cm increased the extraction rate of anthocyanins and total phenols for the three varieties
59 investigated (Merlot, Syrah and Cabernet Sauvignon).

60 The main objective of this study is to assess the effects of three pretreatments techniques: Pulsed
61 electric field (PEF), enzymatic treatment (ET) and thermovinification (TV) treatments, on the
62 qualitative and quantitative attributes of grape must during red fermentation. A study of the effect
63 of these pretreatments on different parameters (pH and °Brix), total polyphenol index, colour
64 intensity, individual phenolic content and proanthocyanidin quantitative compositions has been
65 performed. The must's colour analysis was determined by the CIELAB parameters (L*, a*, and
66 b*). The aim of this comparison is to select the better conditions regarding the quality and the
67 energy consumption, in order to improve the extraction of phenolic compounds during
68 vinification. A comparative study of the phenolic profile of red wine elaborated by each pre-
69 treatment (PEF, ET and TV) was also established in order to identify new phenolic profiles of red
70 wine.

71 **2. Materials and methods**

72 **2.1. Grapes**

73 The Cabernet Sauvignon red grapes were manually harvested at optimum maturity from
74 vineyards in the province of Bekaa (Lebanon). Grapes were stored at 4°C until their processing.

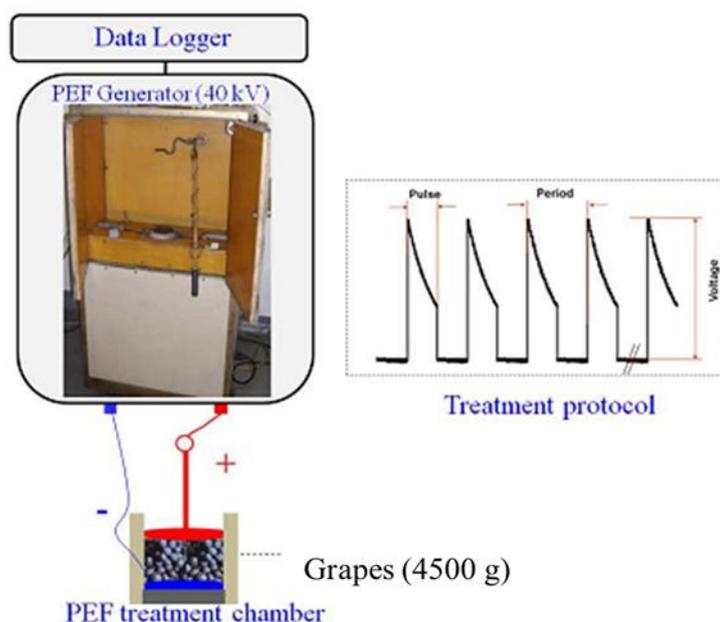
75 **2.2. Wine making (micro-vinification)**

76 The grapes of Cabernet Sauvignon variety were weighed ($m=4500\text{g}$), destemmed, and crushed.
77 Potassium metabisulfite (10g/hL) was added to the must. These grapes were sampled and then
78 subjected to pulsed electric field (PEF), macerating enzyme (ET) and thermovinification (TV)
79 pre-treatments prior to alcoholic fermentation. All these samples were compared to an untreated
80 one (control).

81 **2.3. Pre-treatments prior to alcoholic fermentation**

82 a. Pulsed electric field:

83 The experiments were carried out using a PEF-generator ($40\text{kV}-10\text{kA}$, Tomsk Polytechnic
84 University Russia) (Fig.1) for the treatments with high electric field strength ($E=5\text{ kV/cm}$).



85 *Figure 1. Schematic representation of the experimental setup and the corresponding treatment protocol. PEF-generator 40 kV-10kA.*

86 A sample with a mass of $m = 4500 \pm 5\text{ g}$ (grape skins + must) was treated in the cylindrical one-
87 liter treatment chamber. Both of the grounded plate electrodes were a stainless disk of 100 mm in
88 diameter. The distance between the electrodes was 80 mm to produce the high PEF of 5 kV/cm
89 (estimated from the maximum peak voltage).

90 The PEF generator (40 kV, 10 kA) provided pulses of an exponential form. The total time
91 of PEF treatment was estimated as $t_{PEF} = n.t_i$, where n (=100) is the number of pulses and t_i ($\approx 9 \pm$
92 $1 \mu\text{s}$) is the pulse duration. The pulse width is defined as the time where the peak field is
93 maintained for square wave pulses or the time until decay to 37% for exponential decay pulses.

94 These conditions correspond to the electrical energy input of $W=48 \text{ kJ/kg}$ (Table 1).
95 The energy consumption of the PEF treatment (kJ/kg) was calculated using the following
96 formula.

$$97 \quad W = \frac{\int_0^t UI dt}{m}$$

98 where U is the PEF voltage (V), I is the current intensity (A), t is the time (s), and m is the mass
99 of the must (kg).

100 b. Thermovinification:

101 Flask containing 4500g of crushed grapes was placed in a thermostatic chamber maintained at
102 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min. The temperature control (temperature measurement precision with $\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$)
103 was provided by a Teflon-coated thermocouple (Thermocoax, Suresnes, France) inserted in the
104 center of the sample.

105 The energy consumption of the thermovinified treatment W (kJ, kg) was calculated using the
106 following formula.

$$107 \quad W_{Th} = QC_s \Delta T$$

108 Where C_s is the heat capacity (estimated by 4.18 kJ/kg) and ΔT is the temperature change during
109 the treatment (Escudier *et al.*, 2008).

110 c. Enzymatic treatment:

111 The crushed grapes were distributed into 5 L tanks. The macerating enzyme (Lafase HE Grand
112 Cru, Laffort Oenologie, Bordeaux, France) were added at a concentration of 6 g per hectoliter of
113 crushed grapes.

114 **2.4. Alcoholic fermentation**

115 After the PEF, ET and TV pre-treatments, the *Saccharomyces cerevisiae* yeast (Actiflore F33,
116 Laffort Oenologie, Bordeaux, France) was added to the must in the quantity of 10g/hL to launch
117 the alcoholic fermentation. The flasks containing must samples were placed for 16 days in the
118 incubator where the fermentation temperature was kept at 30 ± 1 °C to carry out the alcoholic
119 fermentation. Alcoholic fermentation was carried out until no residual sugars. Must samples were
120 taken for analysis each day of AF. The samples were centrifuged at 4000 rpm for 10 min using a
121 HERMLE Universal Z 200A centrifuge (Wehingen, Germany) to remove any undesired solids.
122 The supernatant was then used for the analysis.

123 **2.5. Analysis of Must and wine**

124 **a. Total soluble matter, pH and conductivity measurements**

125 The total soluble matter (°Brix) and pH of must were respectively measured with a refractometer
126 AR (Leica Microsystems Inc., Buffalo, New York, USA), and a pH-conductivity meter InoLab
127 pH/cond Level 1 (WTW, Weilheim, Germany) at the frequency of 50 Hz.

128 **b. Kinetics: monitoring of extractions**

129 The kinetics of extraction were monitored during fermentation through the measurement of the
130 absorbance of appropriately diluted samples at 280nm, 420 nm (yellow), 520 nm (red), and 620
131 nm (blue) (Glories, 1984). Absorbance measurements were made by a spectrophotometer UV-
132 VIS (Libra S32, Biochrom, France) with 1 cm path length glass cells. The colour intensity (*CI*)
133 was expressed as the sum of all the three absorbance values (420, 520 and 620 nm) and the total
134 polyphenol index (*TPI*) was determined from the absorbance at 280 nm, after a 100-fold dilution.

135 **c. Spectrophotometric measurements and characterization of colour composition**

136 Absorbance measurements were made with an Evolution 300 spectrophotometer (ThermoFischer)
137 and colour indices were deduced from these absorbance measurements as previously described
138 (Atanasova *et al.*, 2002, Glories, 1984, Somers & Evans, 1977). All the absorbance measurements

139 were converted to a 10-mm light path cell and a dilution of 1 before calculating indices. Colour
140 due to derivatives resistant to sulfite bleaching was determined at 520 nm in a 1-mm light path
141 cell after addition of a metabisulfite solution, and colour due to non-discoloured pigments (NPD)
142 was calculated. Absorbance at 520 nm was measured after dilution in wine model solution at the
143 wine pH. Color due to copigmentation phenomenon (CC) was defined as the subtraction of the
144 absorbance at 520 nm and the absorbance at 520 nm after dilution at the wine pH. Total red
145 pigment colour was determined from absorbance at 520 nm with a 10-mm light path after a 100-
146 fold dilution in HCl 1M.

147 **d. Analysis of wine polyphenols**

148 **d.1. Analysis of phenolic acids, anthocyanins, flavonols**

149 Anthocyanins, phenolics acids and flavonols were analysed by direct injection of wines into the
150 HPLC system. HPLC-DAD analyses were performed using a Waters 2690 system equipped with
151 an autosampler system, a Waters 2996 photodiode array detector, and a Empower
152 chromatography manager software (Waters, Milford, MA). Separation was achieved on a
153 reversed-phase Atlantis T3 column (250 × 4,6 mm i.d., 5 μm packing) protected with a guard
154 column of the same material (Phenomenex, Torrance, CA; 4.0 × 3.0 mm, 3 μm packing) (Waters,
155 Milford, MA). The elution conditions were as follows, 1 mL/min flow rate; oven temperature 30
156 °C; solvent A, water/formic acid (95/5 v/v); solvent B, acetonitrile/water/formic acid (80/15/5
157 v/v/v); elution began : isocratically with 0% B during 5 min, then continued with linear gradients
158 from 0 to 5% B in 20 min, from 5 to 20% B in 15 min, isocratically with 20% B during 10 min,
159 from 20 to 30% B in 10 min, from 30 to 80% B in 15 min, followed by washing and re-
160 equilibration of the column. The injection volume for all samples was 10 μL. A calibration curve
161 was established using malvidin 3-O-glucoside from Extrasynthese (Genay, France) to quantify
162 anthocyanins at 520 nm as equivalent malvidin 3-O-glucoside, using caffeic acid to quantify

163 phenolic acid at 320 nm, using quercetin to quantify flavonols at 360 nm, using gallic acid to
164 quantify it at 280 nm.

165 **d.2. Analysis of tannins**

166 Tannins were analysed by HPLC after acid-catalysed cleavage in the presence of excess
167 phloroglucinol as previously described (Souquet et al., 2004, Kennedy & Jones, 2001). The
168 protocole was adapted for analysis of wine tannins as follows. Wine (3ml) was evaporated with
169 an evaporator (Bushi). The residue was dissolved in 3mL of water/acetic acid (98/2 v/v) and 1mL
170 was applied on a solid phase extraction cartridge (Phenomenex, strata SDB-L, polymer, 100µm,
171 260A , 500mg/3mL). Sugars and organic acids were eluted with 5mL of water/acetic acid (98/2
172 v/v) and phenolic compounds recovered with 8mL of methanol. 2g/L methyl paraben was added
173 as an internal standard. 8 mL were taken to dryness under vacuum, redissolved in 250 µL of
174 MeOH containing 0.2 N HCl, 50 g/L phloroglucinol, and 10 g/L ascorbic acid and heated for 20
175 min at 50 °C. Then, an equivalent volume of aqueous 200 mM sodium acetate was added to stop
176 the reaction. Released terminal subunits and extension subunit-phloroglucinol adducts were
177 analyzed by HPLC using a Waters 2690 system with a reversed-phase Atlantis T3 column (250 ×
178 4,6 mm i.d., 5 µm packing) protected with a guard column of the same material (Phenomenex,
179 Torrance, CA; 4.0 × 3.0 mm, 3 µm packing). The mobile phase was a gradient of
180 water/acetonitrile/formic acid (80/15/5 v/v/v; solvent B) in water/formic acid (95/5 v/v; solvent
181 A), at a flow rate of 1 mL/min at 30 °C. Proportions of solvent B were as follows: 0-5 min with
182 0%B; 5-25 min, 0-10%; 25-40 min, 10-12%; 40-70 min, 12-30%; 70-75 min, 30-0%; 75-80 min,
183 100-0%. The injection volume for all samples was 10 µL. The proanthocyanidin units were
184 detected by a Waters 2996 photodiode array detector and quantified from peak areas at 280 nm
185 using external calibration with known concentrations of flavan-3-ol monomers from
186 extrasynthese). These analyses gave access to total proanthocyanidin content, their mean degree
187 of polymerization (mDP), and the percentage of each constitutive unit (i.e. catechin (%cat),

188 epicatechin (%epi), epicatechin gallate (%gal), epigallocatechin (%egc). The mDP was calculated
189 as the ratio between the summed molar concentrations of all released constitutive units and the
190 summed molar concentrations of terminal constitutive units.

191 **2.6. Statistical analysis**

192 Each modality was conducted in duplicates and analysis repeated twice. Means and standard
193 deviations of data were calculated. Two way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's
194 LSD (Least Significant Difference) were performed to investigate the effect of the different
195 pretreatments, to compare the means of the different investigated responses and to determine
196 statistical significance. For each analysis, significance level of 5 % was assumed. All statistical
197 analyses were performed using Statgraphics 5.1 (Statpoint Technologies Inc, USA).

198

199 **3. Results and discussions**

200 **3.1. pH and °Brix of Cabernet Sauvignon musts**

201 The pH and the total soluble matter (°Brix) have been measured during the alcoholic fermentation
202 of the Cabernet sauvignon (CS) musts after that the different pre-treatments were applied. None of
203 the pretreatments had a significant effect on the pH and the total soluble content at the beginning
204 of the alcoholic fermentation (Table 1).

205 The values of the pH were slightly lower at the end of the fermentation when compared to the
206 beginning. Note that a significant difference was observed between the control (pH=3.76) and the
207 three other modalities (a mean pH of 3.61). The pretreatment by PEF, heat and enzymes seemed to
208 promote a more acid must than the control. On the contrary, no significant difference was
209 detected for the total soluble content at the end of the alcoholic fermentation. It's interesting to
210 note that PEF treatment ($E=48$ kJ/kg) is less energy consuming than heat treatment ($E=420$
211 kJ/kg).

212 The non-significant effect of pulsed electric field, macerating enzymes and thermovinification
 213 pretreatment on pH (at the beginning on AF) and °Brix values of red must are consistent with the
 214 observations of other researchers, who reported that these parameters were not affected by the
 215 treatment of grapes with pulsed electric field or with macerating enzymes (Pardo *et al.*, 1999,
 216 Gambuti *et al.*, 2007, López *et al.*, 2009). The non-significant effect of thermal treatment on pH
 217 was also validated by the study of Mikolajzack *et al.*, (2011), heating red grapes 65°C during 20
 218 min before pressing the grapes.

219 *Table 1. Must characteristics (pH & °Brix) for Cabernet Sauvignon control and treated by enzymatic (ET), pulse*
 220 *electrical field (PEF) and thermovinification (THERM) treatments prior to alcoholic fermentation (AF).*

Type of treatment	Time of treatment	Energy (kJ/kg)	pH		°Brix	
			Beginning of AF	End of AF	Beginning of AF	End of AF
Control	-	-	3.20 ^a	3.76 ^a	20.00 ^a	6.71 ^a
Enzymatical (ET)	-	-	3.24 ^a	3.64 ^b	20.70 ^a	6.69 ^a
Pulsed electric field (PEF 5 KV/cm)	1 ms	48	3.24 ^a	3.60 ^b	20.80 ^a	6.71 ^a
Thermovinification at 70°C (TV)	30 min	420	3.18 ^a	3.61 ^b	20.60 ^a	6.72 ^a

221 (a,b) marks with the same superscript letters were not significantly different within the same column (LSD
 222 test, 5% level)
 223
 224

225 3.2. Extraction kinetics of polyphenols and colour intensity during alcoholic fermentation

226 The extraction of phenolic compounds was monitored during the alcoholic fermentation of
 227 the Cabernet Sauvignon (CS) red grapes (Figure 2). The curve aspect of Total Polyphenol Index
 228 (TPI) was similar for the different modalities. At the beginning of the alcoholic fermentation, a
 229 significant increase of polyphenol content was found in the musts due to the different
 230 pretreatments. The values ranged from 20.1 for the control and 35.1 for the Thermal treatment.
 231 Whereas, a gap was deepened between both thermal (83.5), electric (80.5), enzymatic (66.0)
 232 treatments and control (59.0) at the end of the alcoholic fermentation.
 233 The efficiency of pectolytic enzyme pretreatment of grape must was demonstrated in previous
 234 studies (Ducasse *et al.*, 2010). Still, it seems that pulsed electric field and thermal treatments are

235 more efficient than the enzymatic treatments. These results are in accordance with Donsi *et al.*,
 236 2010 and Atanackovic *et al.*, 2012. Both electric and thermal treatments have different
 237 mechanisms to enhance polyphenol extraction. The electric field causes localized electrical
 238 breakdown of cells membrane which lead to a selective release of compounds due to
 239 electroporation (Zimmerman *et al.*, 1974; Knorr & Angersbach, 1998; Bazhal *et al.*, 2001;
 240 Vorobiev *et al.*, 2011) while the heat destroys the integrity of cell membranes, and lead to a non
 241 selective release of pigments and different phenolic substances into the must.

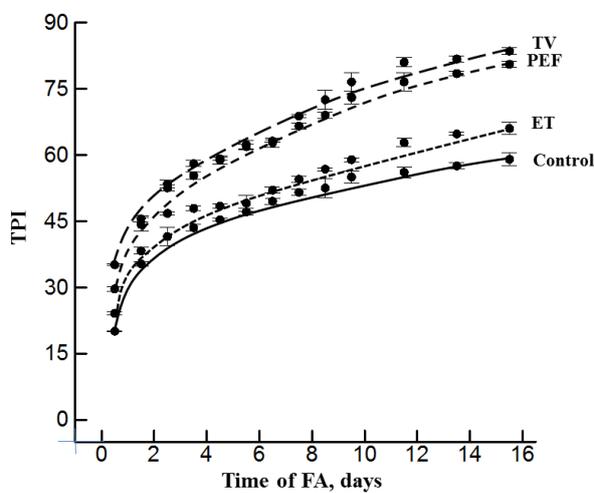


Figure 2. Extraction kinetics of total polyphenol index (TPI) after different pretreatments during alcoholic fermentation.

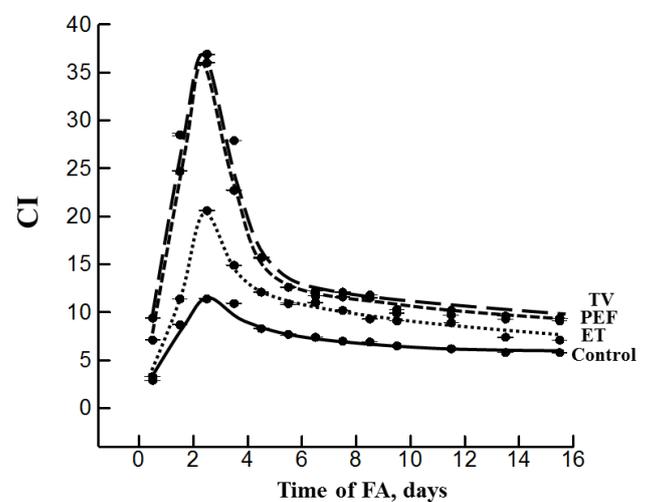


Figure 3. Extraction kinetics of colour intensity (CI) after different pretreatments during alcoholic fermentation.

242

243 After evaluating the effect of the different pretreatments on the kinetics extraction of
 244 phenolic compound during the red vinification, a study of the effect of these pretreatments on the
 245 kinetic of colour intensity during the AF is elucidated in figure 3. As shown in figure 3, the
 246 general evolution of Colour intensity (CI) was similar in all wines. The application of all studied
 247 pretreatments enhances color intensity during the alcoholic fermentation (Fig. 3). A rapid initial
 248 increase of CI is observed until reaching a maximum value. The increase of the CI during the
 249 maceration/fermentation step is mainly related to the increase of monomeric anthocyanins content

250 (Ribéreau-Gayon P, 1982). The maximum value of *CI* was attained after the 3 days of alcoholic
251 fermentation for both untreated and pretreated CS grapes.

252 For instance, the color intensity of extract obtained after the 3 days of alcoholic maceration of the
253 ET treated grapes was 20.6, lower than their *CI* obtained after PEF and TV treatments (*CI*= 36.0
254 and 36.9 respectively). However, for the control grapes, the value of colour intensity was rather
255 small (*CI*= 11.4). The results presented in Fig.3 suggest that TV and PEF enhances better the
256 color intensity than ET treatments. After the 3 days of alcoholic fermentation, the color intensity
257 of wines became decreasing. This decrease can be explained by anthocyanins hydrolysis and
258 oxidation during fermentation (Monagas *et al.*, 2005b).

259 However, even at the end of fermentation period of 16 days, the color intensity remained higher
260 for wines obtained from the treated grapes. Moreover, the tendency of the highest color intensity
261 of wines obtained from grapes treated thermally and electrically was also confirmed. The
262 application of TV and PEF increases color intensity of the red wine respectively on 62 and 56%,
263 while the ET treatment increases the *CI* on 22% comparing to the untreated sample.

264 The wines produced with added enzyme preparation showed a higher intensity of colour than
265 their respective control wines in all the samples studied, which agrees with the result obtained by
266 Kelebec *et al.*, (2007). In the experiments of Donsi *et al.*, (2010), the PEF-treatment ($E=1$ kV/cm,
267 $t_{PEF}=100$ ms, $W=50$ kJ/kg) applied before red fermentation, enhanced the phenolic content and the
268 color intensity of the red wine on the 20%. Lopez *et al* (2008) demonstrated that immediately
269 after the PEF application (2-5 kV/cm) the values of color intensity increase as compared to
270 control samples components. This increase is directly related to the degree of cell membranes
271 permeabilisation and the release of intracellular components.

272 To summarize, Figure 2 & 3 have shown that the application of TV and PEF to red grape
273 improved the phenolic extraction and the colour intensity more effectively than ET. To explain

274 these results, it is important to thoroughly identify the phenolic composition and concentration for
 275 the different pretreatments by HPLC in our study.

276 3.3. Evolution of the content of total and individual phenolic compounds during vinification 277 for the different pretreatments.

278 To explain the effect of the different pre-treatments on the kinetic of phenolic extraction and *CI*,
 279 monomeric anthocyanins were analysed because they are directly responsible for red wine colour.
 280 Phenolic acids and monomeric flavonols were also quantified since they have been described as
 281 highly effective copigments (Gómez-Míguez *et al.*, 2006). Table 2 shows the content of total
 282 phenolic families (TP), total monomeric anthocyanins (T-MA), total Phenolic acids (T-PA), and
 283 total Flavonols (T-Flavo) during vinification for the control and the different pretreated samples.
 284 The content of total phenolic families was calculated by adding the amounts T-MA, T-PA and T-
 285 Flavo and gallic acid.

286 *Table 2. Identification and quantification by HPLC of phenolic compounds (anthocyanins, phenolic acids*
 287 *and flavonols) in CS pretreated during the vinification.*

Phenolic compounds (mg/L)	Beginning of AF				During AF				End of AF			
	Control	ET	PEF	TV	Control	ET	PEF	TV	Control	ET	PEF	TV
Dp-3-gl ¹	1.3 ^b	1.0 ^b	4.0 ^b	28.0 ^a	9.6 ^b	12.3 ^b	11.5 ^b	17.3 ^a	1.4 ^b	1.5 ^b	1.8 ^{ab}	2.0 ^a
Cy-3-gl ²	0.5 ^c	0.3 ^c	1.3 ^b	3.0 ^a	1.4 ^a	1.2 ^a	1.3 ^a	ND	4.1 ^b	5.8 ^b	4.7 ^b	8.9 ^a
Pt-3-gl ³	2.1 ^c	1.4 ^c	8.1 ^b	26.5 ^a	15.2 ^b	17.2 ^{ab}	16.7 ^{ab}	20.6 ^a	6.9 ^b	8.0 ^b	8.3 ^b	13.4 ^a
Pn-3-gl ⁴	4.2 ^c	4.7 ^c	12.1 ^b	20.9 ^a	7.8 ^b	8.5 ^b	7.6 ^b	11.7 ^a	4.9 ^{bc}	4.2 ^c	6.1 ^{ab}	7.4 ^a
Mv-3-gl ⁵	73.9 ^c	84.0 ^c	207.4 ^b	352.3 ^a	299.2 ^a	305.1 ^a	313.7 ^a	343.8 ^a	176.9 ^a	179.3 ^a	208.1 ^a	211.2 ^a
Pn-3-gl-ac ⁶	1.5 ^c	1.4 ^c	2.9 ^b	8.2 ^a	3.5 ^b	3.8 ^b	4.3 ^b	6.7 ^a	2.0 ^b	1.5 ^b	1.7 ^b	3.3 ^a
Mvgl-ac ⁷	34.6 ^c	39.4 ^c	100.0 ^b	195.6 ^a	121.5 ^b	133.5 ^{ab}	136.1 ^{ab}	173.3 ^a	58.1 ^b	60.5 ^b	67.4 ^{ab}	84.9 ^a
Mvgl-p-coum ⁸	4.5 ^c	4.1 ^c	13.8 ^b	39.0 ^a	21.6 ^b	23.7 ^b	24.9 ^{ab}	32.3 ^a	9.4 ^b	11.0 ^b	11.6 ^b	16.0 ^a
T-MA (mg/L) ⁹	122.5 ^c	136.3 ^c	349.7 ^b	673.5 ^a	479.6 ^a	505.3 ^a	516.1 ^a	605.7 ^a	263.6 ^a	271.7 ^a	309.9 ^a	347.0 ^a
t-caffeoyl tartaric acid	3.7 ^b	2.2 ^b	3.52 ^b	22.83 ^a	9.5 ^b	12.6 ^b	9.53 ^b	16.41 ^a	2.0 ^b	2.7 ^b	2.0 ^b	3.9 ^a
trans-p-coumaroyl tartaric	1.3 ^c	1.1 ^c	2.71 ^b	4.23 ^a	2.8 ^b	3.5 ^b	2.58 ^b	4.55 ^a	0.4 ^b	0.6 ^b	0.9 ^a	0.9 ^a
T-PA (mg/L) ¹⁰	5.0 ^b	3.4 ^b	6.2 ^b	27.1 ^a	12.3 ^b	16.1 ^b	12.1 ^b	21.0 ^a	2.5 ^b	3.3 ^b	2.8 ^b	4.8 ^a
Gallic acid (mg/L)	0.6 ^b	0.7 ^b	0.9 ^b	1.6 ^a	9.9 ^b	11.9 ^{ab}	14.2 ^b	12.3 ^{ab}	24.8 ^a	25.4 ^a	26.1 ^a	23.7 ^a
Flavonol 1	1.4 ^c	1.7 ^c	4.1 ^b	6.4 ^a	6.8 ^a	6.4 ^a	7.1 ^a	7.8 ^a	4.3 ^b	4.4 ^b	12.5 ^a	14.4 ^a
Flavonol 2	1.4 ^c	1.4 ^c	3.2 ^b	6.2 ^a	4.2 ^b	4.8 ^b	4.8 ^a	6.7 ^a	4.4 ^b	4.9 ^b	2.4 ^c	7.1 ^a
Flavonol 3	ND	ND	ND	ND	4.8 ^b	4.8 ^b	5.4 ^{ab}	6.4 ^a	5.4 ^a	5.4 ^a	6.1 ^a	6.3 ^a
T-Flavo (mg/L) ¹¹	2.8 ^c	3.1 ^c	7.3 ^b	12.7 ^a	15.8 ^a	16.0 ^a	17.3 ^a	20.9 ^a	14.1 ^c	14.7 ^c	21.0 ^b	27.8 ^a
Total phenols (mg/L)	130.9 ^c	143.5 ^c	364.1 ^b	714.9 ^a	517.6 ^b	549.3 ^b	559.7 ^b	659.9 ^a	305 ^c	315.1 ^c	359.8 ^b	403.3 ^a

288
 289 ^(a,b,c) Different letters within the same line represents significant differences between the different modalities (At the
 290 beginning, during and the end of AF). Means discrimination by LSD test
 291 ($\alpha = 0.05$). ND: not determined

292 At the beginning of AF, a significant increase of total phenolic values (mg/L) and
293 anthocyanins contents T-MA (mg/L) was remarked in the musts for the different pretreatments.
294 The Total phenol and T-MA values of the different modalities at the beginning of the AF are
295 respectively: TV (714.9 mg/L ; 673.5 mg/L), PEF (364.1 mg/L; 349.7 mg/L), ET (143.5 mg/L ,
296 136.3 mg/L), comparing to the control sample (130.9 mg/L , 122.5 mg/L). The higher T-MA
297 values of PEF and TV treatment could explain the higher colour intensity of the extracts obtained
298 after the PEF and TV treatments at the beginning of AF (Figure 3). The kinetics evolution of total
299 phenolic values and total anthocyanins contents are similar for the control, ET and PEF
300 treatments, characterized by an increasing of total phenolic values followed by a decreasing to the
301 end of AF. Whereas, a different kinetic evolution was observed for the TV treatment,
302 characterized by a decreasing of phenolic content and T-MA during the whole period of AF. A
303 decreasing was noticed at the end of AF for the T-MA of the different modalities, which
304 corroborates with the decrease of *CI* (Figure 3). At the end of AF, slight differences of the
305 phenolic values and T-MA were noticed between the ET treatment and the control, whereas an
306 enhancing by 18% and 32% of the phenolic values and anthocyanins was noticed respectively for
307 the PEF and TV treatments. The positive effect of PEF on the anthocyanin extraction was also
308 reported by Donsi *et al.* (2010), in which the PEF treatment of red grapes ($E=1$ kV/cm, $t_{CEP}=100$
309 ms, $W=50$ kJ/kg) led to a high anthocyanins content (+20%) in the red wine. The high effect of
310 TV on the anthocyanin extraction corroborates with the data obtained by Spranger *et al.*, 2004. In
311 their studies, they show that wine made by thermovinification techniques has much more colour
312 than a traditional wine while containing less anthocyanins.

313 Furthermore, table 2 showed that the Flavonols evolution during the vinification presents a
314 similar curve aspect for the different modalities. The higher value attained at the end of AF was
315 respectively for TV (+97%) and PEF-treatments (+48%) comparing to the control one. Whereas,
316 no significant difference was observed between the ET treated musts and the control one.

317 Table 2 showed that the evolution of anthocyanin and phenolic acids during the red
318 fermentation was similar. It should be noticed that the values of phenolic acids were always
319 higher for the TV (+92%), ET (+32%) and PEF-treated (12%) than for the control. The loss of
320 monomeric anthocyanins may be due to either reactions of formation of new stable pigments or
321 precipitation and degradation reactions. Phenolic acids have been of interest for copigmentation
322 researchers, and have shown a prominent effect on the enhancement and stabilization of
323 anthocyanin (Dimitrović-Marković *et al.*, 2000). To understand the colour phenomenon, an
324 analysis of colour composition was done in our study. The decrease in anthocyanins was due to
325 their degradation, but also due to their strong reactivity with other compounds which can lead to
326 form more stable pigments in terms of colour.

327
328 Table 3 shows the results of the analysis of wine proanthocyanidins obtained by acid-
329 catalysis in the presence of excess phloroglucinol for the different pre-treatments. The pro-
330 anthocyanidin concentration of the wines was higher for the TV and PEF-treatments with a value
331 of 522 mg/L and 428 mg/L respectively whereas no differences were noticed for the control and
332 ET with a value respectively of 378 mg/L and 382 mg/L. Moreover, for the different
333 pretreatments, the composition of tannins in egc, epi, cat, e3O was similar. The tannins have the
334 same characteristic in all the treatment.

335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348

349 *Table 3. HPLC analysis of total proanthocyanidins and related parameters, following acid-catalysis in the*
 350 *presence of excess of phloroglucinol for the different pretreated wine during AF*

Phenolic compounds (mg/L)	Control	ET	PEF	TV
Egc-ph ¹	84 ^a	92 ^a	83 ^a	91 ^a
Epi-ph ²	171 ^a	172 ^a	199 ^a	221 ^a
Cat-ph ³	22 ^b	20 ^b	30 ^a	30 ^a
Cat ⁴	62 ^b	58 ^b	76 ^b	99 ^a
E30-ph ⁵	7 ^b	8 ^b	10 ^b	17 ^a
Epi ⁶	32 ^b	32 ^b	30 ^b	64 ^a
Total proanthocyanidins (mg/L)	378 ^b	382 ^b	428 ^{ab}	522 ^a
mDP ⁷	4.05 ^a	4.25 ^a	4.05 ^a	3.21 ^a

351 (a,b) *Different letters within the same line represents significant differences between the different modalities.*
 352 *Means discrimination by LSD test ($\alpha = 0.05$).*
 353
 354

355 The mean degree of polymerization (mDP) of proanthocyanidins of the control, ET and PEF
 356 treated wines remains constant. Table 3 shows that the mDP of the thermovinified wine was
 357 lower. However, no statistically significant difference was noticed for the thermovinified
 358 treatment comparing to the others treatments.

359 **3.4. Evolution of the composition of the red wine colour during the vinification for the** 360 **different pre-treatments.**

361 The evolution of the composition of the red wine colour, monomeric anthocyanins colour (MAC),
 362 copigmentation colour (CC), and non-discoloured pigments (NPD) was analysed during AF (Fig.
 363 4). Red winemaking increased the value of MAC, CC and NDP, and maceration was the main
 364 process affecting these values. Throughout the period studied, the value of monomeric
 365 anthocyanin colour (MAC) was considerably higher than CC and NDP, contributing more than
 366 77% to wine colour for the control must at the beginning of AF. Whereas (MAC) contributed
 367 respectively 64%, 52% and 45% to wine colour for ET, PEF and TV at the beginning of AF.
 368 These differences could be explained by the fact that the colour phenomenon was different
 369 according to the treatments. The copigmentation phenomenon (CC) is higher for the different
 370 pretreatments compared to the control, respectively, 28%, 40% and 48% for ET, PEF and TV

371 treatments and just 16% of the colour was attributed to CC for the control sample. The light red
372 colour of must control sample was due to monomeric anthocyanins colour, since the colour values
373 due to their polymeric and copigmented forms were negligible. However for PEF and TV
374 samples, the colour is darker, due to the lower values of MAC and higher values of CC.

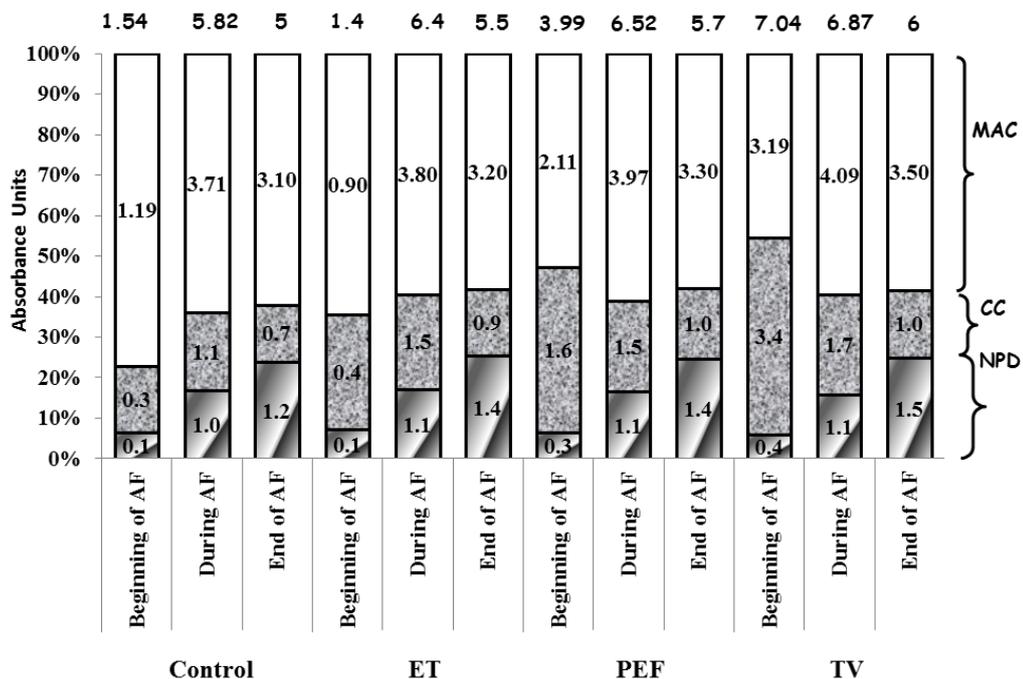
375 However, the ratio of stable bisulfite and copigmentation colour (NDP + CC) to unstable
376 anthocyanin colour (MAC) changed with the winemaking process. MAC, NPD, and CC values
377 increased significantly in the samples during AF, indicating a high extraction of grape
378 anthocyanins which are stabilized under red forms by copigmentation phenomenon and polymeric
379 pigments. These reactions were seen to be greater for must pretreated, due to the fact that more
380 anthocyanins were extracted after the different pre-treatments. At the beginning of AF, the ratio of
381 stable colour is higher for the different pretreatments , with a value of 0.56 , 0.9, 1.21 respectively
382 for ET, PEF and TV , compared to the control sample (ratio =0.3). The three pretreatments
383 enhance the copigmentation complexes, which results in a high colour of the must. At the end of
384 AF, the ratio of decrease for PEF and thermovinification (0.73 & 0.71), but remains higher than
385 the control sample (0.61). The contribution of copigmentation colour to wine colour was almost
386 38% for the control sample and 42% for the different pre-treated samples. This result corroborates
387 with the results reported by Boulton, 2001, who reported that the contribution of copigmented
388 anthocyanins to young red wine colour ranged from 30 to 50%. Copigments in young wines are
389 very important for wine colour since they increase colour intensity and transform the colour of
390 wine red to purple. They may also be seen as a storage form of anthocyanin, allowing more
391 anthocyanin to be removed from the skins and stabilized in solution until the polymeric pigments
392 are formed.

393 At the end of AF, the anthocyanin content of the control and pre-treated samples decreased (Table
394 2). Whereas, the percentage colour contribution of red wine colour comparing to total red pigment
395 colour (measured at 520 nm after the acidification of the red wine with hydrochloric acid at pH 1)

396 increased respectively by 15, 16 and 17% for the control, ET and PEF. Whereas a different kinetic
 397 is always noticed for the TV treatment, with a decrease of the ratio of red wine colour comparing
 398 to a red colour at pH1 by 32%. The increase of the percentage colour contribution of red wine
 399 colour comparing to total red pigment colour of the control and pretreated musts by ET and PEF
 400 is due to different chemical phenomena such as copigmentations that can stabilize the red forms
 401 of anthocyanins and enhance the colour in red wine. Then, the decrease of red pigment in a wine
 402 does not necessarily imply less decrease of colour. Our study shows that the decrease of
 403 anthocyanins leads to a slight loss of colour but compensated by the colour of new formed
 404 pigments.

405 According to these results, the pretreatments leads at the end approximatively to the same
 406 composition of colour. The kinetics of the control, ET and PEF is similar. Whereas, the TV
 407 treatment presents always a different kinetics due to the heat prior to red fermentation.

408



409
 410 *Figure 4. Wine colour (WC) composition for CS varieties versus different pre-treatments, after the AF.*
 411 *Monomeric anthocyanins colour (MAC), copigmentation colour (CC), and non discoloured pigments (NDP)*
 412 *during vinification.*
 413

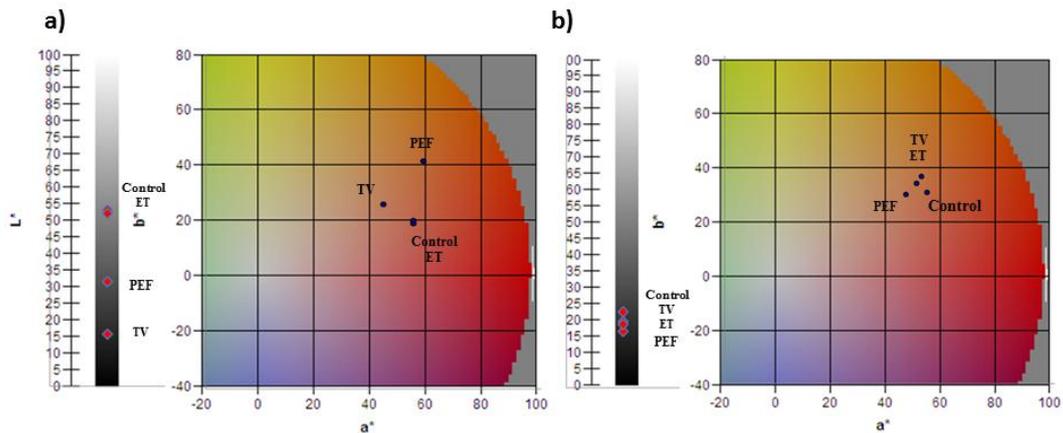
414 **3.5. Influence of different pretreatments on CIELAB parameters during vinification at the**
415 **start (a) and the end of AF (b).**

416 Fig. 5 compares the CIELAB parameters (L^* , a^* , and b^*) of Cabernet Sauvignon must at the
417 beginning (a) and the end of AF (b) for the control and different pretreated samples. In the Fig. 5,
418 colour coordinates L represents the lightness and a^* and b^* indicate the change in hue from red to
419 green and from yellow to blue, respectively. Lightness (L^*) was affected by maceration and the
420 application of a PEF treatment to the must. It was observed in the Fig 5.a. that the TV and the
421 PEF musts were the darkest (lower L^*), however non-significant difference was detected between
422 the control and enzymatic treated must but these musts have the lighter red colour (highest L^*).
423 The light red colour of must control sample was due to monomeric anthocyanins colour, since the
424 colour values due to their polymeric and copigmented forms were negligible. However for PEF
425 and TV samples, the colour is darker, due to the lower values of MAC and higher values of CC.
426 At the end of AF (b), no differences were detected between the L^* of control and different
427 pretreated samples.

428 The red tones (values of a^*) were lower in the control, enzymatic musts ($a^*= 54.5$) and in
429 the thermovinified must ($a^*= 50.0$) than in the musts obtained from pulsed electrical field treated
430 skins ($a^*= 54.5$). However the yellow tones (values of b^*) was the highest in PEF-treated musts
431 ($b^*= 41.8$), whereas it was lower for the TV must ($b^*= 34.0$) and the lowest for the control and
432 enzymatic treated must ($b^*= 20.0$). After longer maceration times (at the end of AF), slighter
433 differences were noticed between the parameters (a^* and b^*) for the different wines.

434 The ΔE^*_{ab} is a parameter that has been suggested to estimate if the differences observed
435 in the L^*, a^*, b^* values can be detected by the human eye. A value higher than 3 indicates that
436 observers can easily detect a difference among samples. This value is visually detectable, because
437 it is higher than the estimation of 3.0 CIELAB units as the acceptable tolerance for the human eye
438 in distinguishing the colour of wines, when trained tasters use standardized wine tasting glasses

439 (Martinez *et al.*, 2001). The value of this parameter when comparing control and the different
 440 pretreatments at the end of AF shows a ΔE^*_{ab} higher than 3 for the different pre-treatments with
 441 respectively a value of 6.89, 9.93 and 6.32 for the ET, PEF and TV samples. The PEF-treatment
 442 represents the highest value of ΔE^*_{ab} . Therefore, a great difference in juice colour could be
 443 observed due to the PEF treatment as compared to the control.



$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

	ET		PEF		THERM	
	Beginning of AF	End of AF	Beginning of AF	End of AF	Beginning of AF	End of AF
ΔE^*_{ab}	1.4	6.89	31.35	9.93	39.63	6.32

Figure 5. CIELAB parameters (L^* , a^* , and b^*) of the control and different pretreated musts at the beginning of AF (a) and the end of AF (b)

444

445 **4. Conclusion**

446 The application of different pretreatments technologies has demonstrated to offer an extraordinary
 447 potential and selectivity for extraction purposes. In comparison with the control sample, the
 448 macerating enzymes treatment, the application of pulsed electrical field and thermovinification
 449 treatment before winemaking enhanced extraction yield of phenolic content (anthocyanins and
 450 tannins), and the colour intensity of the samples. Theses pretreatments increased the extraction of
 451 phenolic compounds compared with wines produced without pretreatments. The comparison
 452 between the three techniques showed that the enzymatic treatment effect was less marked than

453 PEF and thermovinification on polyphenol extraction of the red wine. Indeed, the increase in
454 polyphenol content led to a great difference in the total colour of the treated juices when
455 compared to their respective controls. The study showed that the thermovinified treatment
456 induced a higher extraction of phenolic content and colour of the red wine than wine issued from
457 PEF-treated musts. Pulsed electric field and thermovinification are efficient for the polyphenols
458 extraction, whereas PEF is less energy consumption ($W = 48$ kJ/kg for PEF and 420 kJ/kg for
459 TV), duration of treatment ($t = 1$ ms for PEF and $t = 30$ min for TV) and it is a non-thermal
460 treatment ($\Delta T < 7^\circ\text{C}$ for PEF and $\Delta T = 50^\circ\text{C}$ for TV). Each pretreatment leads to a different
461 phenolic profile of the red wine. The PEF treatment could be an attractive non-thermal technique
462 to extract polyphenol and induce another profile of wines compared to classical techniques.

463 **References:**

464 Atanacković, M., Petrović, A., Jović, S., Gojković- Bukarica, L., Bursać, M., & Cvejić, J. (2012).
465 Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and
466 antioxidant potential of red wines. *Food Chemistry*, *131*, 513-518.

467
468 Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2002). Effect of oxygenation
469 on polyphenol changes occurring in the course of wine making. *Analytica*
470 *Chimica Acta*, *458*, 15-27.

471
472 Auw, J. M., Blanco, V., O'Keefe, S. F., Sims, & C. A., (1996). Effect of processing on the
473 phenolics and color of Cabernet Sauvignon: Chambourcin and Noble wines and juices. *American*
474 *Journal of Enology and Viticulture*, *47*, 279-286.

475
476 Bahzal, M.I., Lebovka, N.I., Vorobiev, E.I. (2001). Pulsed electric field treatment of apple tissue
477 during compression for juice extraction. *Journal of Food Engineering*, *50*, 129-139.

478
479 Bakker, J., Bellworthy, S.J., Reader, H.P., & Watkins, S.J. (1999). Effects of enzymes during
480 vinification on colour and sensory properties of port wines. *American Journal of Enology and*
481 *Viticulture*, *50*, 271-276.

482

483 Barcelo, A.R., Calderon, A., Zapata, M., & Munoz R. (1994). The histochemical localization of
484 anthocyanins in seeded and seedless grapes (*Vitis vinifera*). *Scientia Horticulturae*, 57, 265-268.
485

486 Bautista-Ortín, A.B., Martínez-Cutillas A., Ros-García J.M., López-Roca J.M., & E. Gómez-
487 Plaza (2005). Improving colour extraction and stability in red wines: The use of maceration
488 enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science & Technology*, 40, 867-
489 878.

490

491 Boselli, E., Boulton, R.B., Thorngate, J.H. & Frega, & N.G., (2004). Chemical and sensory
492 characterization of DOC wines from Marche (Italy) related to vintage and grape cultivars. *Journal*
493 *of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3843-3854.

494

495 Boulton, R., (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A
496 critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 67-87.

497

498 Boulton, R. 2003. Red wines. In Lea, A;G & Piggott; J.R. (Eds.) *Fermented Beverage Production*.
499 2nd ed., New York. Springer.

500

501 Cabaroglu, T., Selli, S., Canbas, A., Lepoutre, J.P. & Günata, Z., (2003). Wine flavor
502 enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. *Enzyme and Microbial*
503 *Technology*, 33, 581-587.

504

505 Cai, Y., Lilley, TH., & Haslam, E., (1990). Polyphenolanthocyanin co-pigmentation. *Journal of*
506 *the Chemical Society, Chemical Communications*, 5, 380-383.

507

508 Canal-Llauberes, R.M., (1990). Utilisation des enzymes dans les procédés d'extraction en
509 œnologie. *La Revue Française d'Œnologie*, 122, 28-33.

510

511 Castro-Vázquez, I., Pérez-Coello, M.S. & Cabezudo, M.D., (2002). Effects of enzyme treatment
512 and skin extraction on varietal volatiles in Spanish wines made from Chardonnay, Muscat,
513 Airén, and Macabeo grapes. *Analytica Chimica Acta*, 458, 39-44.

514

515 Cerpa-Calderon, F.K. & Kennedy, J.A. (2008). Berry integrity and extraction of skin and seed
516 proanthocyanidins during red wine fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
517 *19*, 9006-9014.

518
519

520 Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B. (2008). Extraction of anthocyanins
521 from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields:
522 A comparison. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *9*, 85–91.

523

524 Cserhalmi, Zs., Sass-Kiss, Á., Tóth-Márkus, M., & Lechner, N. (2006). Study of pulsed electric
525 field treated citrus fruit juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *7*, 49 – 54.

526 Daris, J. Martin, Martin-Luis, B., Carrillo-Lopez M., Lamuela Raventos R., Diaz-Romero C., &
527 Boulton R., (2002). Effect of caffeic acid on the color of red wine. *Journal of Agricultural and*
528 *Food Chemistry*, *27*, 2062-2067.

529 Delsart, C., Ghidossi, R., Poupot, C., Cholet C., Grimi N., Vorobiev E., Milisic V. & Mietton
530 Peuchot M. (2012). Enhanced Extraction of Valuable Compounds from Merlot Grapes by Pulsed
531 Electric Field. *American Journal of Enology and Viticulture*, 11088.

532 Dimitrović-Marković, J.M., Petranović, N.A., Baranac, J.M. (2000): A spectrophotometric
533 study of the copigmentation of malvin with caffeic and ferulic acids, *Journal of Agricultural*
534 *and Food Chemistry*, *48* , 5530-5536.

535

536 Donsi, F., Ferrari, G., Fruilo, M., Pataro, G. (2010). Pulsed Electric Field-Assisted Vinification of
537 Aglianico and Piedirosso Grapes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 11606–11615.

538

539 Ducasse, M-A., Canal-Llauberes, R-M., De Lumley, M., Williams, P., Souquet, J-M., Fulcrand,
540 H., Doco, T., Cheynier, V. (2010). Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and
541 polysaccharide composition of red wines, *Food Chemistry*, *118*, 369–376.

542

543 Ducruet, J., Canal-Llauberes, R.M. & Glories, Y., (1997). Influence des enzymes pectolytiques
544 sélectionnés pour l'œnologie sur la qualité et la composition des vins rouges. *La Revue*
545 *Française d'Œnologie*, *166*, 16-19.

546

- 547 Escudier, J-L., Mikolajczak, M., Bes M. (2008). *Chauffage de la vendange : les technologies*
548 *disponibles et les méthodes de vinification associées. Congrès national des œnologues de France*
549 *à Carcassonne, 229, 9-18.*
- 550
- 551 Fischer, U. (1997). Farbe bekennen. *Das Deutsche Weinmagazin, 13, 24-29.*
- 552
- 553 Fulcrand, H., Atanasova, V., Salas, E., Cheynier, V. (2004). The fate of anthocyanins in wine: are
554 there determining factors? In: A. L. Waterhouse, & J. Kennedy, *Red wine color: revealing the*
555 *mysteries*, vol. 886 (pp. 68-85). Washington, DC: American Chemical Society Publication.
- 556
- 557 Gambuti, A., Stollo, D., Erbaggio, A., Lecce, L., Moio, L. (2007). Effect of winemaking
558 practices on color indexes and selected bioactive phenolics of Aglianico wine. *Journal of Food*
559 *Science, 72, 623-628.*
- 560
- 561 Gawel, R., (1998). Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine*
562 *Research, 4, 74-95.*
- 563 Girard, B., D. Yuksel, M.A. Cliff, P. Delaquis, & A.G. Reynolds (2001). Vinification effects on
564 the sensory, colour, and GC profiles of Pinot noir wines from British Columbia. *Food Research*
565 *International, 34, 483-499.*
- 566 Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 1e. Partie: Les equilibres des anthocyanes et des
567 tannins. *Connaissances de la Vigne et du Vin, 18, 195-217.*
- 568 Gómez-Míguez, M., González-Manzano, S., Escribano-Bailón, M. T., Heredia, F. J., & Santos-
569 Buelga, C. (2006). Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-
570 glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 5422-5429.*
- 571
- 572 Haslam, E. (2005). Taste, bitterness and astringency. In Haslam, E. (Ed). *Practical Polyphenolics,*
573 *Cambridge University Press, New York, 195.*
- 574 Kelebek, H., Canbas, A., Cabaroglu, T., & Selli, S. (2007). Improvement of anthocyanin content
575 in the cv. Okuzgozu wines by using pectolytic enzymes. *Food Chemistry, 105, 334-339.*

576 Kennedy, J., & Jones, G.P. (2001). Analysis of proanthocyanidin cleavage products following
577 acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food*
578 *Chemistry*, 49, 1740-1746.

579

580 Knorr, D., & Angersbach, A., (1998). Impact of high intensity electric field pulses on plant
581 membrane permeabilization. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 185-191.

582

583 Knorr, D., (2003). Impact of non-thermal processing on plant metabolites. *Journal of Food*
584 *Engineering*, 56, 131-134.

585

586 Lebovka, N. I., Praporscic, I., & Vorobiev, E. (2003). Enhanced expression of juice from soft
587 vegetable tissues by pulsed electric fields: consolidation stages analysis. *Journal of Food*
588 *Engineering*, 59, 309–317

589

590 López, N., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J., (2008). Effects of pulsed electric
591 fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo
592 grapes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 477-482.

593

594 López, N., Puértolas, E., Condón, S., Raso, J., & Álvarez, I. (2009). Enhancement of the solid–
595 liquid extraction of sucrose from sugar beet (*Beta vulgaris*) by pulsed electric fields. *LWT-Food*
596 *Science and Technology*, 42, 1674–1680.

597

598 Martínez, J. A., Melgosa, M., Perez, M. M., Hita, E., & Negueruela, A. I. (2001). Note: Visual
599 and instrumental color evaluation in red wines. *Food Science and Technology International*, 7,
600 439–444.

601 Mazza, G., & Brouillard, R. (1990) The mechanism of copigmentation of anthocyanins in
602 aqueous-solutions. *Phytochemistry*, 29, 1097–1102

603

604 Mikolajzack, M., Veyret, M., Williams, P., Doco, T., Escudier, J-L., (2011). *Jus de raisin :*
605 *Comment extraire le maximum du potentiel de la baie de raisin*, 249, 24-32.

606

607 Monagas, M., Bartolome, B., and Gomez-Cordoves, C. (2005a). Updated knowledge about the
608 presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 85-
609 118.

610
611 Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., and Bartolomé, B. (2005b). Evolution of polyphenols in red
612 wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle .I. Anthocyanins and pyranoanthocyanins.
613 *European Food Research and Technology*, 220, 607-614.
614
615 Muñoz, O., Sepúlveda, M., & Schwartz, M. (2004). Effects of enzymatic treatment on
616 anthocyanic pigments from grapes skin from Chilean wine. *Food Chemistry*, 87, 487-490.
617
618 Parenti, A., Spugnoli, P., Calamai, L., Ferrari, S., & Gori, C. (2004). Effects of cold maceration
619 on red wine quality from Tuscan Sangiovese grape. *European Food Research and Technology*,
620 218, 360-366.
621
622
623 Pardo, F., Salinas, M.R., Alonso, G.L., Navarro, G. and Huerta, M.D. (1999). Effect of diverse
624 enzyme preparations on the extraction and evolution of phenolic compounds in red wines. *Food*
625 *Chemistry*, 67, 135–142.
626
627 Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer A.S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant
628 cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release, *Trends in Food*
629 *Science and Technology*, 17, 579–590.
630
631 Puértolas, E., Saldaña, G., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J., (2010a). Evolution of polyphenolic
632 compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields
633 during aging in bottle. *Food Chemistry*, 119, 1063-1070.
634
635 Puértolas, E., López, N., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J., (2010b). Potential applications of
636 PEF to improve red wine quality. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 247-255.
637 Ribéreau-Gayon P, (1982). The anthocyanins of grapes and wines. In: P. Markakis,
638 Anthocyanins as food colors (pp. 209-244). New York: Academic Press.
639
640 Revilla, I. & González-San José, M.L., (2003). Compositional changes during the storage of red
641 wines treated with pectolytic enzymes: low molecular-weight phenols and flavan-3-ol derivative
642 levels. *Food chemistry*, 80, 205-214

643
644 Robichaud, J.L., & Noble, A.C. (1990). Astringency and bitterness of selected phenolics in wine.
645 *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53, 343–353.
646
647 Robinson, G.M. & Robinson, R., 1931. A survey of anthocyanins. *Biochemical journal*, 25, 1687-
648 1705 .
649
650 Sacchi, K., Bisson, L. F., & Adams, D. (2005). A review of the effect of winemaking techniques
651 on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 197–206.
652
653 Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1999). Interactions of grape seed tannins
654 with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 47, 42–47.
655
656 Souquet, J-M., Mazauric, J-P., Meudec, E., Preys, S., Morel-Salmi, C., Cheynier, V. (2004).
657 Comparison on different methods of depolymerisation to the characterization and quantification
658 of proanthocyanidins in grape seed, grape skin and wine. *XXIInd International Conference on*
659 *Polyphenols, Helsinki, Finlande*, 693-694.
660 Sun, B.S., Spanger, M.I., Roque-Do-Vale, F., Leandro, M.C., & Belchior, A.P. (2001). Effect of
661 different winemaking technology on phenolic composition in Tinta Miuda red wines. *Journal of*
662 *Agricultural and Food chemistry*, 49, 5809-5816.
663
664 Somers, T. C., & Evans, M. E. (1977). Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin
665 equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂. *Journal of the Science of Food and*
666 *Agriculture*, 28, 279-287.
667
668 Spranger M.I., M.C. Clímaco, B. Sun, N. Eiriz, C. Fortunato, A. Nunes, M.C. Leandro, M.L.
669 Avelar and A.P. Belchior. 2004. Differentiation of red winemaking technologies by phenolic and
670 volatile composition. *Analytica Chimica Acta*, 513, 151-161.
671
672 Toepfl, S., Heinz, V. & Knorr, D. (2006) Applications of pulsed electric field technology for the
673 food industry: In: Pulsed Electric Field Treatment of Foods, Ed: Raso, J. and Heinz, V., p. 197-
674 221, Elsevier, Oxford, UK.
675

676 Vorobiev E & Lebovka NI (2008). Pulsed Electric Field Induced Effects in Plant Tissues:
677 Fundamental Aspects and Perspectives of Application. In: E. Vorobiev and N. Lebovka (Editors),
678 Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials, *Springer*, 39-82.
679

680 Vorobiev E. & Lebovka N. (2010). Extraction from solid foods and biosuspensions enhanced by
681 electrical pulsed energy (pulsed electric field, pulsed ohmic heating and high voltage electrical
682 discharges). *Food Engineering Reviews*, n°2.
683

684 Vorobiev, E., & Lebovka, NI., (2011). Pulse Electric Field Assisted Extraction. In: N. Lebovka,
685 E. Vorobiev and F. Chemat (Editors), *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry*. CRC
686 Press.
687

688 Wightman, J.D., Price, S.F., Watson, B.T., & R.E. Wrolstad. (1997). Some effects of processing
689 enzymes on anthocyanins and phenolics in Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines. *American*
690 *Journal of Enology and Viticulture*, 48, 39-48.
691

692 Wu, S.J., Ng, L.T., Huang, Y.M., Lin, D.L., Wang, S.S., Huang, S.N., & Lin, C.C., (2005).
693 Antioxidant of *Physalis peruviana*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 963–966.
694

695 Zimmermann, U., Pilwat, G., Riemann, F. (1974). Dielectric breakdown of cell membranes.
696 *Biophysical Journal*, 14, 881-899.
697

Chapitre 6 : Optimisation de l'extraction des polyphénols du marc du raisin assistée par chauffage ohmique pulsé

L'article « Extraction of Polyphenols from Red Grape Pomace Assisted by Pulsed Ohmic Heating » a été publié dans « *Food bioprocess and technology* ». Cet article porte essentiellement sur le prétraitement par chauffage ohmique pulsé pour la valorisation des marcs de raisin par extraction des composés phénoliques.

6.1.1. Résumé de l'article

L'extraction industrielle des polyphénols à partir des marcs de raisin est basée sur une étape de diffusion réalisée soit en continu soit en discontinu. Dans les deux cas, l'étape de diffusion est longue : 3 à 4 h de temps de séjour pour l'extraction en continu et 20 h (4 batchs successifs de 5 h) pour l'extraction en discontinu. De plus, ces procédés nécessitent la mise en oeuvre de composés tels que des solvants organiques. Cependant, la majorité des solvants organiques sont considérés comme de potentiels allergènes, et leur présence dans des produits à destination de l'alimentation est très réglementée. Afin de réduire la durée de l'étape de diffusion tout en atteignant des rendements en polyphénols élevés et d'éviter l'ajout de co-solvant, un type de prétraitement électrique a été appliqué dans les travaux antérieurs. Il s'agit des CEP. Boussetta *et al.*, (2011a) a montré que l'application des CEP à haut voltage ($E=20$ kV/cm) améliore l'extraction des polyphénols du marc du raisin. Corrales *et al.*, 2008 a montré de même une amélioration de cette extraction suite à une application des CEP à $E=3$ kV/cm. Cependant, les CEP à bas voltage n'ont pas montré d'effets vis à vis de l'extraction des polyphénols. D'où l'intérêt de notre étude qui vient appliquer les CEP en les combinant à un chauffage à température modérée dans le but d'améliorer l'extraction des polyphénols. Le chauffage facilite l'endommagement membranaire suite à l'application des CEP. Cette technique combinant le chauffage thermique au traitement électrique s'appelle « chauffage ohmique pulsé » (COP) à intensité modérée des CEP associée à un chauffage modéré.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de l'application d'un chauffage ohmique pulsé « COP » à différentes intensités de voltages ($E=100-800$ V/cm) et différentes températures modérées ($30-60$ °C) sur l'extraction des polyphénols à partir du marc du raisin.

Le procédé d'extraction des polyphénols se divise en deux étapes successives : un prétraitement par COP et une diffusion en batch. Le principal paramètre étudiés est : le pourcentage en éthanol dans le milieu de diffusion (10, 20, 30 and 50 %). . Les paramètres fixés sont: la température (50°C) et la durée (1 h). Des prélèvements au cours du temps permettent d'établir les cinétiques d'extraction des solutés totaux (Brix) et des polyphénols. La matière première testée est obtenue directement après pressurage des raisins rouges de Cabernet Sauvignon.

Ainsi, les résultats obtenus ont montré que la conductivité électrique augmente avec l'augmentation de l'intensité du COP de 200 à 400 V/cm et de la température. La meilleure perméabilisation cellulaire ($Z>0.75-0.8$) est atteinte avec une intensité du champ modérée (300-400V/cm) et une température modérée ($40-50$ °C), une consommation énergétique de 38,1 kJ/kg et une durée de traitement de 5 sec. Alors que pour atteindre le même degré de perméabilisation, $Z=0.8$ pour une intensité de champ de 100 V/cm, une consommation énergétique plus élevée est demandée ($W=178.75$ kJ/kg), ceci étant dû à une plus longue durée de traitement (210 sec) et une température plus élevée (82°C). D'où, le COP à intensité modérée ($E=300-400$ V/cm) et à température modérée ($40-50^{\circ}\text{C}$) permet d'atteindre le meilleur degré de perméabilisation cellulaire.

Concernant leur effet sur l'extraction des polyphénols, les COP ont amélioré cette extraction dans un milieu aqueux et dans un milieu de diffusion hydroalcoolique. Cependant, la présence d'éthanol dans le milieu a favorisé l'extraction des polyphénols. Après 1 h de diffusion à 50°C dans de l'eau, la teneur en polyphénols est respectivement 35 et 41% supérieure pour un COP (400& 800 V/cm) à celle obtenue après 1 h de diffusion pour un témoin. Alors que dans un milieu hydroalcoolique à 30% d'éthanol, la teneur obtenue en polyphénols est 40% supérieure pour un COP (400& 800 V/cm) par rapport à un témoin. Les cinétiques d'extraction des COP (400& 800 V/cm) sont différentes dans un milieu aqueux et similaire dans un milieu

hydroalcoolique. Ceci étant dû à la présence d'éthanol qui extrait sélectivement les composés cellulaires et améliore leur extraction. Probablement, la taille des pores induits par 400 V/cm, était suffisante pour le passage des polyphénols et la présence d'éthanol a facilité ce passage.

De plus, les cinétiques d'extraction des polyphénols ont pu être modélisées par le modèle de Peleg qui permet d'estimer les rendements d'extraction finaux théoriques (Y_e) ainsi que les vitesses d'extraction dans les premières minutes (q). Une bonne corrélation a été obtenue entre le modèle proposé et les données expérimentales avec des coefficients de corrélation R^2 compris entre 0,970 et 0,995. Les valeurs de q et de Y_{\max} augmentent ainsi avec l'application des COP, et la congélation. Une dépendance linéaire a été observée entre la teneur maximale en polyphénols et le pourcentage d'éthanol dans le milieu (0-50%).

Concernant l'étude de la sélectivité de l'extraction des polyphénols, nous avons noté une augmentation de l'indice de perméabilisation Z et de l'indice de l'extraction des polyphénols Z_p avec l'augmentation de l'intensité du COP de 200 à 800 V/cm. Pour le même indice de perméabilisation Z et la même intensité de COP, l'extraction des polyphénols dans de l'eau est moins importante comparée à un milieu hydroalcoolique, ce qui met en évidence l'extraction sélective des polyphénols en utilisant le traitement par COP suivi d'une diffusion dans un milieu hydroalcoolique.

En conclusion, cette étude a permis de valider l'efficacité du prétraitement par COP dans l'amélioration de la perméabilisation membranaire du marc de raisin avec une faible consommation énergétique ($W= 38$ kJ/kg). L'application du COP (400 & 800 V/cm) a amélioré l'extraction des polyphénols de 40% suite à une heure de diffusion. Une synergie a été observée en combinant l'application du COP à une température de diffusion modérée (50°C) et un milieu hydroalcoolique (30% d'éthanol). Une extraction sélective des polyphénols a été notée suite à l'application de COP suivi d'une diffusion dans un milieu hydroalcoolique. Enfin, nous pouvons déduire que l'extraction assistée par COP peut être prometteuse dans l'objectif de valoriser le marc de raisin. La validation de ce procédé sur des quantités de produits supérieures est nécessaire pour une perspective d'application industrielle.

6.2. ARTICLE: Article : Pulsed ohmic heating assisted polyphenols extraction from red grape pomace

(Voir le manuscrit qui suit)

Extraction of Polyphenols from Red Grape Pomace Assisted by Pulsed Ohmic Heating

Nada El Darra · Nabil Grimi · Eugène Vorobiev ·
Nicolas Louka · Richard Maroun

Received: 7 October 2011 / Accepted: 18 April 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract The present work is devoted to the investigation of the effect of pulsed ohmic heating (POH) on cells membrane damage and intensification of polyphenols extraction from red grape pomace. Untreated, POH-treated and freeze-thawed samples were compared. The effects of electric field strength ($E=100\text{--}800\text{ V/cm}$) and the percentage of ethanol in water ($E/W=0\text{--}50\%$) on polyphenols extraction were discussed. Measurements of electrical conductivity and electric energy consumption were performed for POH pretreatment optimization. Results show that POH treatment results in cells membrane denaturation. This permeabilization increases with the elevation of electric field strength and temperature. POH pretreatment accelerates the extraction kinetics of total polyphenols

from grape pomace. Freeze-thawed samples are always accompanied with a high degree of cell damage and high concentration of polyphenols in the extract. The highest extraction yields were obtained with a POH pretreatment at 400 V/cm followed by a diffusion step for 60 min at 50 °C and with a solvent composed of 30 % of ethanol in water. In these conditions, the polyphenol content was 36 % more than untreated samples. The proposed technique (POH pretreatment) appears to be promising for future industrial applications of polyphenols extraction from pomace.

Keywords Grape pomace · Pulsed ohmic heating · Cell membrane denaturation · Polyphenol content

N. El Darra · N. Grimi · E. Vorobiev
Département de Génie des Procédés Industriels, Laboratoire Transformations Intégrées de La Matière Renouvelable (UTC/ESCOM, EA 4297 TIMR), Centre de Recherche de Royallieu, Université de Technologie de Compiègne, B.P. 20529-60205, Compiègne Cedex, France

N. Grimi
e-mail: nabil.grimi@utc.fr

E. Vorobiev
e-mail: eugene.vorobiev@utc.fr

N. El Darra · N. Louka · R. Maroun
Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph de Beyrouth, Rue de Damas, Mar Mikhael 1104 2020, B.P. 17-5208, Beirut 1107 2050, Lebanon

N. Louka
e-mail: nicolas.louka@fs.usj.edu.lb

R. Maroun
e-mail: rmaroun@fs.usj.edu.lb

N. El Darra (✉)
UTC/ESCOM, EA 4297 TIMR,
60200 Compiègne, France
e-mail: nada.el-darra@utc.fr

Nomenclature

d	Diameter (mm)
E	Electric field strength (V/cm)
h	Height (mm)
I	Current intensity (A)
K_1	Peleg rate constant (min 100 g DM/g GAE)
K_2	Peleg's capacity constant (100 g DM/g GAE)
n	Number of pulses
N	Number of trains
N_Z	Number of trains to attain the value of $Z=0.8$
m	Mass of grape pomace (g)
m_s	Mass of the sample (grape pomace + water) (kg)
q	Maximum of extraction rate (g GAE/100 g DM min)
R	Resistance (ohm)
T	Time (min)
t_i	Pulse duration (μs)
t_t	Total time of POH treatment (s)
t_{POH}	Effective time of POH treatment (s)
T	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)
T_z	Characteristic damage temperature ($^{\circ}\text{C}$)
Δt	Time between pulses (ms)

U	Voltage (V)
W	Energy consumption (J/kg)
Y_0	Initial yield of total phenolic compounds (g GAE/100 g DM)
Y_{\max}	Maximum extraction yield of phenolic compounds estimated by Peleg's model (g GAE/100 g DM)
$Y(t)$	Yield of total phenolic compounds (g GAE/100 g DM)
Z	Disintegration index
Z_p	Polyphenols extraction index

Greek symbols

σ	Electrical conductivity (S/m)
τ_z	Characteristic damage time (s)
α	Electrical conductivity at $T=0$ °C (S/m)
β	Slope of σ vs. T (S/m °C)

Subscripts

d	Completely damaged tissue
u	Untreated (intact)

Abbreviations

DM	Dry matter
E/W	Ratio between ethanol and water
FC	Folin Ciocalteu
GAE	Gallic acid equivalent
PEF	Pulsed electric field
POH	Pulsed ohmic heating

Introduction

Cabernet Sauvignon is one of the red grape varieties used for rosé wine production (Puértolas et al. 2011). Red grapes contain an important quantity of polyphenolic compounds in skin, pulp and seeds, which can be just partially transferred to wine during wine-making (Jackson 1994). Pressing, which is the basic technique for making rosé wine (Ribéreau-Gayon et al. 2004; Murat and Dumeau 2005), generates high amounts of grape pomace (approximately 20 % of the weight of processed grapes). Grape pomace is considered as a valuable co-product due to its polyphenol composition. Phenolic grape compounds can be divided into two groups: non-flavonoid (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids and stilbenes) and flavonoid compounds (anthocyanins, flavan-3-ols and flavonols) (Gómez-Alonso et al. 2007). Studies in vitro and in vivo have shown that some of polyphenols exhibit antioxidant and free radical scavenging properties, which may play an important role in human health, reducing the risk of various degenerative diseases, such as cardiovascular diseases, osteoporosis and cancer (Dugand 1980; Singleton 1982; Brasseur et al. 1986; Macheix et al. 1990; Loliger 1991).

Industrial extraction of polyphenols from grape pomace is a batch or continuous process combining water with other solvents (ethanol, methanol or sulphur dioxide). Conventional extraction is performed at moderate temperatures (50–60 °C) and has rather long duration (3–20 h) (Boussetta et al. 2009a). When applied for a long time, heat can deteriorate thermo-sensitive compounds containing in a grape pomace (such as antioxidants). Alternative extractions assisted by enzymes or supercritical fluid have been proposed (Ju and Howard 2003; Louli et al. 2004; Kammerer et al. 2005).

Recently, novel electrotechnologies such as pulsed electric field (Praporscic et al. 2007; Grimi et al. 2007; 2009; De Vito et al. 2008; Vorobiev and Lebovka 2008; Corrales et al. 2008; Boussetta et al. 2009b; Loginova et al. 2011), high voltage electrical discharges (El-Belghiti et al. 2005; Boussetta et al. 2009a; Vorobiev and Lebovka 2008) and ohmic heating (Sastry and Barach 2000; Sastry 2005, 2008; Allali et al. 2008; Shynkaryk et al. 2010) have been used for membrane damage in plant tissues. The application of pulsed electrical treatments is particularly attractive to enhance the solute extraction with lower energetic costs and better product quality (Boussetta et al. 2009a, b; Puértolas et al. 2010a; Donsi et al. 2010).

For instance, the pulsed electric field (PEF) applied to wine grapes leads to a prudent extraction of colorants and other valuable constituents. Recent studies have shown that PEF treatment enhanced compression kinetics and extraction of polyphenols from white grapes (Praporscic et al. 2007; Grimi et al. 2009). Evolution of color intensity, anthocyanin content and total polyphenolic index during vinification of the red grapes treated by PEF was also investigated (López et al. 2008; Puértolas et al. 2010c; Puértolas et al. 2010b). These authors have demonstrated that high PEF treatment ($E=2-5$ kV/cm) of red grapes before their maceration–fermentation increases the polyphenols extraction during subsequent vinification.

Furthermore, Boussetta et al. (2011a) have shown that high PEF treatment ($E=20$ kV/cm) enhances the polyphenols extraction from red grape pomace. Corrales et al. (2008) have shown that a PEF (3 kV cm^{-1}) has a similar effect on polyphenols extraction from a grape pomace as an ultrasound (35 kHz).

Despite the effectiveness of the high PEF treatment applied to the red grape pomace, the lower PEF ($E=500$ V/cm) was not effective for polyphenols extraction (anonymous). Polyphenols are mainly situated in a grape skin, which consists of three successive layers: the cuticle, the epidermis and the hypodermis. The hypodermis, which is the layer closest to the pulp, is composed of several cell layers that contain most of the grape skin phenols (Delsart et al. 2010). The moderate PEF ($E<500$ V/cm) applied at ambient temperature is probably insufficient to damage effectively the cells situated in a grape skin. However, preheating can soften the

plant tissue and facilitate membrane damage during the PEF treatment (Lebovka et al. 2007a, b; 2008). This effect also reflects structural transitions inside cell membrane at elevated temperatures (Zimmermann 1986). Therefore, pulsed ohmic heating (POH) combining electrical and thermal treatments can be an effective method to extract valuable cell compounds using moderate electric field and moderate temperatures (Praporscic 2005).

The objective of this study is to investigate the effect of POH under moderate electric fields (100–800 V/cm) and moderate temperatures (30–60 °C) on the polyphenols extraction from red grape pomace.

Materials and Methods

Grapes

The good quality Cabernet Sauvignon red grapes were purchased from an experimental vineyard in Chile. Grapes were transported and stored at 4 °C until their processing. Grape pomace was obtained as a residue of pressed grapes. The dry matter content in the grape pomace was 36.9±0.5 wt %.

POH Treatment for Cell Permeabilization

For the estimation of cell permeabilization index (Z) of grape pomace, a sample of 5 g was placed in a treatment chamber. The chamber consisted of a cylindrical polypropylene glass with an inner diameter of 29 mm and stainless steel electrode on its bottom. The second electrode was placed on the top of the sample. The chamber with a grape pomace sample was placed in a water thermostat kept at the desired temperature. The temperature control (temperature measurement precision with ±0.1 °C) was provided by a Teflon-coated thermocouple (Thermocoax, Suresnes, France) inserted into the sample. The electrodes were connected to a POH generator (400 V–38 A) (Service Electronique, UTC, France), which provided bipolar pulses of rectangular shape. A series of N trains were applied to attain the desired final temperature. Then the POH treatment was automatically stopped. Each series consisted of n electrical pulses with pulse duration t_i , and time interval between pulses Δt . The following parameters were used in POH experiments: $E=100\text{--}400$ V/cm, $n=2$, $t_i=2000\pm 1$ μs , $\Delta t=20$ ms. The effective POH time was calculated as $t_{\text{POH}} = Nnt_i$, and the total treatment time was $t_t = N(nt_i + \Delta t)$. The characteristic damage time (τ_Z) corresponds to the required time to reach a high degree of cell permeabilization ($Z=0.8$). It was calculated as $\tau_Z = N_Z n t_i$, where N_Z is the number of trains to attain the value of $Z=0.8$. All the output data (current, voltage, impedance and temperature) were collected using a data

logger and special software, adapted by Service Electronique UTC, France.

Cell permeabilization index Z was calculated using the following formula (Lebovka et al. 2002):

$$Z = \frac{\sigma - \sigma_u}{\sigma_d - \sigma_u} \quad (1)$$

where σ is the measured electrical conductivity of the grape pomace sample, and the subscripts u and d refer to the conductivities of untreated and maximally damaged sample, respectively.

Application of the above equation gives $Z=0$ for an intact material and $Z=1$ for a maximally disintegrated material. The maximally damaged tissue $Z=1$ was obtained by freezing–thawing the grape pomace (Lebovka et al. 2000; Jalté et al. 2009). The freezing/thawing is used in this study as a reference method to show maximum cell membrane damage. This method is less destructive for the cell walls in comparison to mechanical damage (e.g. grinding), but it is effective for the membrane damage. Therefore, freezing/thawing is often used as reference method for the PEF treatment (Angersbach et al. 2002; Vorobiev and Lebovka 2008).

Temperature elevation during the POH treatments of a grape pomace sample is presented in Fig. 1. The higher electric field strengths were accompanied by faster temperature increasing. For instance, to reach a final temperature of 50 °C, the effective time of POH was $t_{\text{POH}}=5$ s for $E=400$ V/cm, $t_{\text{POH}}=10$ s for $E=200$ V/cm and $t_{\text{POH}}=120$ s for $E=100$ V/cm.

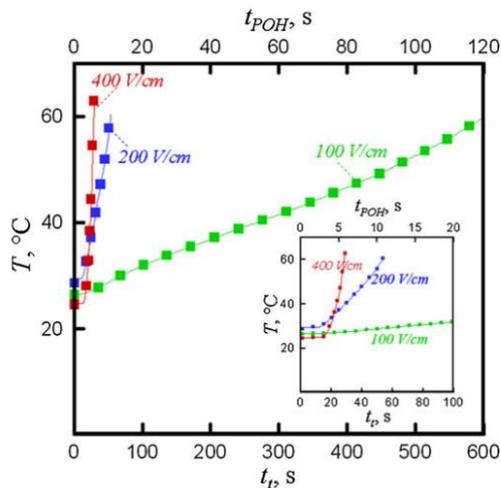


Fig. 1 Temperature elevation during the POH treatments with different electric field strengths

POH Treatment for Polyphenols Extraction

A sample of grape pomace with mass of 50 g was placed inside the polypropylene treatment chamber (150×70×60 mm) between two stainless steel electrodes connected to a pilot POH generator (5000 V–1000 A) (Hazemeyer, France). The distance between electrodes was fixed at 6 cm. Tap water (50 g) was added to the chamber to assure a better contact between electrodes and sample. The temperature control was provided by a Teflon-coated thermocouple (Thermocoax, Suresnes, France) inserted into the center of the sample. The pilot POH generator provided pulses of a rectangular shape (Fig. 2). A series of N trains were applied until the desired temperature (50 °C) was attained, and then the POH treatment was stopped. Each series consisted of n pulses with pulse duration t_i , and time interval between pulses Δt . The following parameters were used in POH experiments: $E=400\text{--}800$ V/cm, $n=300$, $N=20\text{--}50$, $t_i=100 \pm 1$ μs , $\Delta t=1$ s. The values of t_{POH} and t_i were determined as $t_{\text{POH}} = Nnt_i$ and $t_i = N(nt_i + \Delta t)$. For instance, to reach a temperature of 50 °C, the effective time of POH was $t_{\text{POH}}=0.6$ s for $E=800$ V/cm and $t_{\text{POH}}=5$ s for $E=400$ V/cm. The current and voltage values were measured during the time between two consecutive series of pulses. These data were collected using a data logger and specific software, adapted by Service Electronique UTC, Compiègne, France.

Extraction Experiments

Untreated, POH-treated and freeze-thawed grape pomace (mixture containing 50 g of grape pomace and 50 g of tap water) was introduced in a glass beaker with an inner diameter of 105 mm and a height of 145 mm. A 200 g of water preheated at 50 °C was added to the beaker in order to obtain a liquid to solid ratio of 5. The beaker was placed in a water thermostatic bath to maintain an extraction temperature of 50 °C. The total extraction time was fixed at 60 min. In some experiments an aqueous solution of ethanol in water

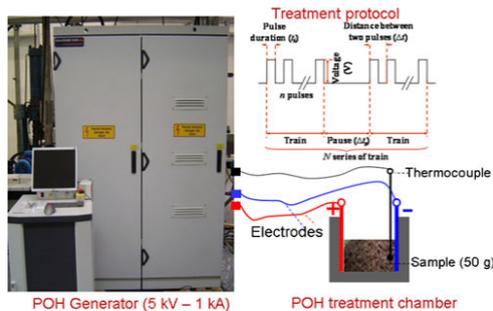


Fig. 2 Schematic representation of the POH treatment apparatus

Springer

($E/W=10, 20, 30$ and 50 %) was used for extraction to increase the polyphenols yield. In order to avoid any evaporation and degradation of polyphenols under the impact of oxygen or light, the diffusion cell was closed and covered by aluminium foil during the extraction.

Determination of Total Polyphenols Content

The total phenolic content in extract was determined according to the Folin Ciocalteu (FC) method (Slinkard and Singleton 1977). A 0.2-ml part of the standard (gallic acid) or diluted sample, 1.0 ml of FC reagent and 0.8 ml of Na_2CO_3 solution (7.5 %, w/v) were mixed and allowed to stand for 2 h at room temperature. Light absorption was measured at 750 nm with a spectrophotometer UV-Vis (Libra S32, Biochrom, France) against a blank similarly prepared, but containing distilled water instead of extract. The total phenolic content was expressed as gram of gallic acid equivalent (GAE) per 100 g of dry matter (DM) (g GAE/100 g DM).

Solid-Liquid Extraction Kinetics

Peleg's model (Peleg 1988) can be successfully used to describe the extraction kinetics from different plant materials (Bucic-Kojic et al. 2007). The experimental data are fitted to the next empirical equation:

$$Y(t) = Y_0 + \frac{t}{K_1 + K_2 t} \tag{2}$$

where $Y(t)$ is the yield of phenolic compounds (g GAE/100 g DM) at time t , Y_0 is the initial yield of phenolic compounds at time $t=0$ (g GAE/100 g DM), K_1 is the Peleg's rate constant (min 100 g DM/g GAE) and K_2 is the Peleg's capacity constant (100 g DM/g GAE). Since Y_0 was zero in all experiments, Eq. 2 is used in the following form:

$$\frac{t}{Y(t)} = K_1 + K_2 t \tag{3}$$

The Peleg rate constant K_1 relates to the maximum of extraction rate (q , g GAE/100 g DM min) at $t=0$:

$$q = \frac{1}{K_1} \tag{4}$$

The Peleg's capacity constant K_2 is related to the maximal extraction yield Y_{max} at ($t \rightarrow \infty$)

$$Y_{\text{max}} = \frac{1}{K_2} \tag{5}$$

For clarity purposes, only the values of q and Y_{max} are presented.

Energy Consumption

The electrical energy consumption of the POH treatment (W , joules per kilogram) is calculated as:

$$W = \frac{UIt_{\text{POH}}}{m_s} \quad (6)$$

where U is the POH voltage (volt), I is the current intensity (ampere), and m_s is the mass of product (kilogram).

Statistical Analysis

Each experiment was repeated at least three times. Means and standard deviations of data were calculated. The parameters of modified Peleg's equation (constants K_1 and K_2) are determined from experimental data using Microsoft Excel solver (Microsoft office 2007). The concordance between experimental data and calculated values was established by the coefficient of determination R^2 . The Fisher least significant difference (LSD) tests were applied for analysis of the effects of POH treatment. For each analysis, a significance level of 5 % was assumed. All statistical analyses were carried out using the software Statgraphics Plus 5.1 (Statpoint Technologies, Inc.).

Results and Discussions

Characterization of Cell Permeabilization under the POH Treatment

Figure 3 shows the evolution of electrical conductivity of grape pomace with temperature. For the untreated and freeze-thawed samples, the electrical conductivity (σ) increased almost linearly with temperature rise between 25 and 65 °C:

$$\sigma = \alpha + \beta.T \quad (7)$$

where α is the electrical conductivity at $T=0$ °C and β is the slope of the straight line σ vs. T . The estimated values of the slope β were, respectively, 0.0012 S/m °C and 0.0008 S/m °C for the untreated and freeze-thawed samples. The electrical conductivity for the untreated and freeze-thawed samples was calculated proceeding from the sample dimensions and electrical resistance R , accounted for as $\sigma = 4h/R\pi d^2$. We have also studied the change of electrical conductivity with temperature in the samples, ohmically heated during POH treatment. The values of σ were calculated from the voltage and current data as $\sigma = 4hI/\pi d^2U$, where I is the electric current and U is the applied voltage. As shown in Fig. 3, the conductivity curve $\sigma(T)$ of the ohmically treated tissue noticeably exceeds the conductivity curve for the untreated tissue. It

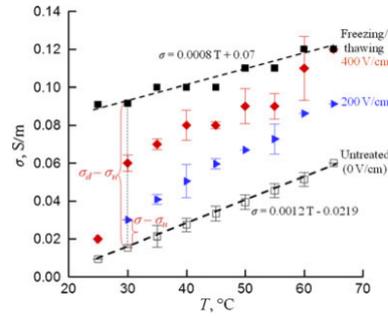


Fig. 3 Evolution of the electrical conductivity (σ) of grape pomace versus temperature (T) at $E=200$ V/cm (\blacktriangleright) and $E=400$ V/cm (\blacklozenge). Dashed lines show the σ vs. T dependencies for the totally damaged (\blacksquare) (freeze-thawed) and intact (\square) (untreated) grape pomace. POH treatment was applied at 25 °C. The error bars represent the standard data deviations

evidences importance of the electrically induced damage and electroporation contributions to the temperature and time dependences of σ .

Figure 3 shows that the electrical conductivity σ increases with the electric field strength increasing from 200 to 400 V/cm. Temperature dependences of the permeabilization index $Z(T)$ were determined from Eq. 1 using the values of σ , σ_d and σ_u presented in Fig. 3.

Curves $Z(T)$ obtained at different electric field strengths E are presented in Fig. 4 and show that better cell permeabilization can be attained with increase of electric field strength and temperature. For instance, a half of cells ($Z=0.5$) can be permeabilized even at the temperature close to ambient ($T < 30$ °C) with electric field strength of $E=400$ V/cm, while the elevated temperature of about 60 °C is needed for the permeabilization of 40 % ($Z=0.4$) of cells at $E=100$ V/cm. A high cell permeabilization degree of grape pomace ($Z > 0.75-0.8$) can be attained at mild temperatures of 45–50 °C with electric field strengths of $E=300-400$ V/cm (Fig. 4). These results are in good agreement with previously reported data for sugar beet tissues (Lebovka et al. 2007a).

The characteristic damage time (τ_z) (the effective time of POH treatment) and temperature (T_z) needed to attain a high degree of cell permeabilization ($Z=0.8$) at different electric field strengths E are presented in Fig. 5a, b. At lower values of $E \leq 200$ V/cm, the time needed for the efficient permeabilization of cells seems to be too long and the final temperature of POH is rather high, which may lead to the important losses of product quality. Moreover, the energy consumption increases at $E \leq 200$ V/cm (Fig. 5c).

Figure 5c shows that the electrical energy input W needed for the efficient cell permeabilization ($Z=0.8$) is noticeably lower for the electric fields with $E=300$ and 400 V/cm compared to smaller electric fields with $E \leq 200$ V/cm. The energy

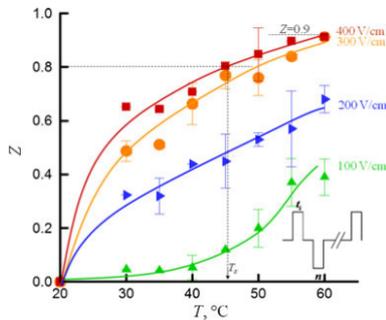


Fig. 4 Cell permeabilization index (Z) versus temperature (T) at different electric field strengths (E) for grape pomace. The error bars represent the standard data deviations

consumption during the POH is mainly related to the temperature elevation (Fig. 5a), the POH treatment duration (Fig. 5b) and the electric field intensity. For instance, the energy consumption was 38.1 kJ/kg to attain the cell permeabilization degree $Z=0.8$ with $E=400$ V/cm, while it was 178.75 kJ/kg to attain the same degree of cell permeabilization with $E=100$ V/cm. The duration of POH to attain the cell permeabilization degree $Z=0.8$ was longer ($\tau_z=210$ s), and the final temperature of POH was higher ($T_z=82$ °C) with $E=100$ V/cm than with $E=400$ V/cm (respectively, $\tau_z=5$ s and $T_z=45$ °C).

Intensification of Polyphenols Extraction by Using POH Treatment

The yields of polyphenols $Y(t)$ from untreated, freeze-thawed and POH-treated grape pomace are presented in

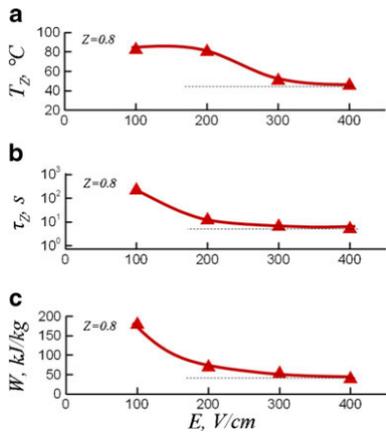


Fig. 5 The characteristic thermal damage temperature (T_z), damage time (τ_z) and energy consumption (W) versus electric field strength (E) at $Z=0.8$. The error bars represent the standard data deviations

Springer

Fig. 6a, b. Figure 6a shows the yields of polyphenols in water, while Fig. 6b presents the yields of polyphenols in aqueous solution of ethanol (30 %) in water. In both extractions, the temperature was fixed at 50 °C to preserve the product quality.

The POH treatment resulted in a better polyphenols extraction in water and in water–ethanol solution. For instance, the final yield of polyphenols in water after 60 min of extraction was $Y \approx 310$ mg GAE/100 g DM for the untreated grape pomace, $Y \approx 420$ mg GAE/100 g DM for the pomace treated at $E=400$ V/cm and $Y \approx 540$ mg GAE/100 g DM for the pomace treated at $E=800$ V/cm. As reported in previous studies, the addition of ethanol improves the polyphenol extraction efficiency (Boussetta et al. 2011b). The results presented in Fig. 6b confirm the better polyphenol extraction in the ethanol–water solution. For the same diffusion temperature ($T=50$ °C), the noticeable effect of ethanol addition was observed for the untreated and POH-treated grape pomace. For instance, the

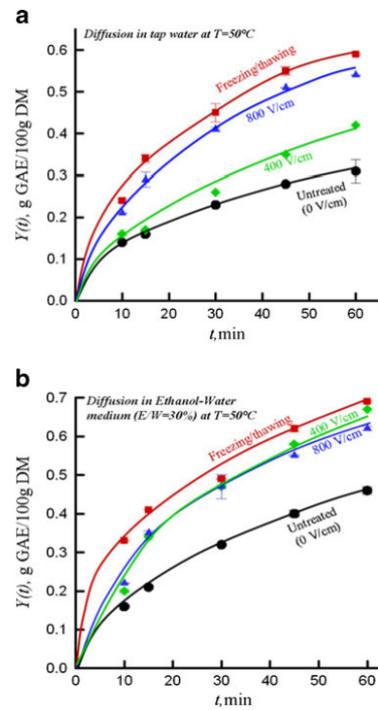


Fig. 6 Evolution of total polyphenols yield Y versus extraction time (t) for untreated, POH-treated (400 and 800 V/cm) and freeze-thawed grape pomace. Diffusion was carried out at 50 °C in water (a) and hydroalcoholic ($E/W=30\%$) (b) solvent. The error bars represent the standard data deviations

Table 1 Constants Y_{\max} and q calculated by fitting of experimental data to Peleg's model (Eq. 3)

	Without ethanol ($E/W=0\%$)			With ethanol ($E/W=30\%$)		
	Y_{\max} (g GAE/100 g DM)	q (g GAE/100 g DM min)	R^2	Y_{\max} (g GAE/100 g DM)	q (g GAE/100 g DM min)	R^2
Untreated (0 V/cm)	0.391 ^a	0.021 ^a	0.985	0.732 ^a	0.019 ^a	0.995
POH (400 V/cm)	0.652 ^b	0.017 ^b	0.933	0.890 ^b	0.027 ^b	0.972
POH (800 V/cm)	0.705 ^c	0.037 ^c	0.969	0.898 ^b	0.032 ^c	0.988
Freezing–thawing	0.753 ^d	0.042 ^c	0.98	0.868 ^b	0.048 ^d	0.979

Values with the same superscript letters were not significantly different (LSD test, 5 % level)

final yield of polyphenols in ethanol–water solution after 60 min of extraction was $Y \approx 440$ mg GAE/100 g DM for the untreated grape pomace and $Y \approx 620$ mg GAE/100 g DM for the pomace treated at $E=400$ and 800 V/cm. The extraction was done in a hydroalcoholic solvent containing up to 50 % of ethanol in water. The results show an increase in polyphenols extraction when the ethanol concentration increases. No significant difference between 30 and 50 % of ethanol in water was observed. For clarity purposes, only the results of 30 % of ethanol in water were selected for Fig. 6b.

The kinetic of polyphenols extraction in water was noticeably slower for the grape pomace treated at $E=400$ V/cm as compared to $E=800$ V/cm (Fig. 6a). On the contrary, the extraction kinetics for the grape pomace treated at $E=400$ V/cm and $E=800$ V/cm were very similar in the aqueous solution of ethanol (Fig. 6b). This result is due to the diffusion phenomena of polyphenols compounds with and without ethanol. The POH treatments induce the permeabilization of cell membranes. However, ethanol is a solvent that can extract selectively some cell compounds and may accelerate the extraction kinetics. It may be speculated that the size of pores

induced electrically in cell membranes at 400 V/cm was sufficient for the passage of polyphenol compounds, and this passage was accelerated by ethanol addition. The damage of tissue structure by ethanol may also contribute to the better extraction of polyphenols.

Fitting Experimental Extraction Data with Peleg's Model

Experimental data on polyphenols extraction presented in Fig. 6 can be satisfactorily fitted to Peleg's Eq. 3. Table 1 presents the values of constants Y_{\max} ($t \rightarrow \infty$) and q ($t=0$) calculated from Eqs. 4 and 5 for extractions without and with ethanol addition to water. The corresponding values of R^2 are also presented in Table 1. The values of maximal extraction yield of polyphenols (Y_{\max}) are noticeably higher for the extraction with ethanol addition. With no ethanol addition, the maximal extraction yield of polyphenols (Y_{\max}) is higher for the POH treatment at $E=800$ V/cm than for the treatment at $E=400$ V/cm. However, with 30 % of ethanol addition in water, the values of maximal polyphenol yield Y_{\max} are practically the same (considering experimental

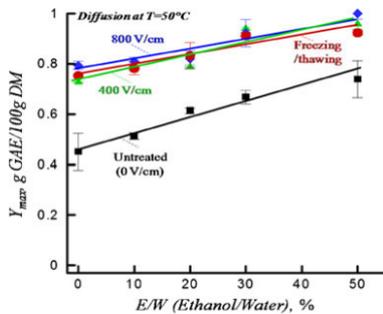


Fig. 7 Maximal polyphenols yield Y_{\max} (estimated from Eq. 4) versus the percentage of aqueous ethanol solution, for untreated, POH-treated (400 and 800 V/cm) and freeze-thawed grape pomace. The error bars represent the standard data deviations

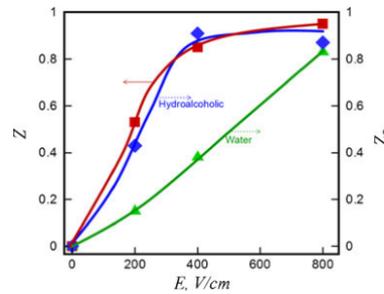


Fig. 8 Cell permeabilization index (Z) and polyphenols extraction index (Z_p) at different electric field strengths (E) for grape pomace. For each electric field strength, the index Z corresponded to the permeabilization value obtained at $T=50\text{ }^\circ\text{C}$. The polyphenol extraction index Z_p was determined after POH pretreatment followed by diffusion extraction ($t=60$ min)

errors) after the POH treatments at 400 and 800 V/cm and after the freeze-thawing.

Figure 7 shows nearly linear dependence between the estimated maximal extraction yield of polyphenols (Y_{\max}) and the percentage of added ethanol in the diapason between 0 and 50 %. De Campos et al. (2008) also showed that the concentration of polyphenols extracted from grape pomace increases with the increase of ethanol ratio in water.

Selectivity of Polyphenols Extraction

Figure 8 presents the cell permeabilization Z and polyphenols extraction Z_p indices calculated at different electric field strengths $E=200, 400$ and 800 V/cm. The value of Z was determined from Eq. 1 based on the electrical conductivity measurements. However, the value of Z_p was calculated using the following equation:

$$Z_p = \frac{Y - Y_o}{Y_f - Y_o} \quad (8)$$

where Y is the yield of polyphenols at the end of the extraction ($t=60$ min) for POH treated samples, and the subscripts 0 and d refer to the yield of untreated and maximally damaged sample at $t=60$ min of extraction, respectively.

Figure 8 shows that cell permeabilization (Z) and polyphenols extraction (Z_p) indices increase with the electric field strength (from 200 to 800 V/cm). The index Z presents global information concerning membrane damage. Grape pomace is composed of various intracellular compounds like sugar, lipids, protein, polyphenols and ionic species (potassium and other species presenting in must). The application of POH treatment induces a high degree of cell membrane damage, which enhances the release of intracellular compounds. Previous studies have shown that the electric conductivity is well correlated to the potassium concentration. Favarel (1998) have also shown a linear correlation between electric conductivity and polyphenol content in the case of grape juice. Therefore, the good correlation between electric conductivity and a quantity of extracted polyphenols can be assumed.

The results show linear correlation between polyphenols extraction and cell permeabilization indices when extraction was done in hydroalcoholic solution (30 %). The curves Z and Z_p coincide. For the same permeabilization index (Z) and electric field strength (E), the extraction of polyphenols in water solvent is less important as compared to hydroalcoholic solution. This result can reflect some selective extraction of phenolic compounds by using POH treatment and hydroalcoholic solvent.

Conclusions

The obtained data evidence that POH application allows high cell membrane permeabilization from red grape pomace, with low energy consumption ($W=38$ kJ/kg). It also results on the increase of polyphenols extraction from 440 to 620 mg GAE/100 g DM at 60 min. Thermal diffusion at 50 °C combined with POH pretreatment was found to exert the most pronounced effects on the extraction kinetics and on the total polyphenol yield. A synergy was observed in respect of polyphenol extraction when POH was combined with moderate diffusion temperature (50 °C) and 30 % ethanol. Peleg's equation has also been shown to be suitable for describing the extraction kinetics for phenolic compounds. A linear correlation was observed between permeabilization index and polyphenols extraction index when extraction was done in hydroalcoholic solution. The use of POH treatment prior to hydroalcoholic extraction results in selective extraction of phenolic compounds. It can be assumed that the POH-accelerated extraction is promising for future application in the valorization of pomace from fruits and vegetables without hydroalcoholic solvent use.

Acknowledgments The authors would like to thank the society KSARA (Lebanon) for financial support. Thanks to Dr. Nadia Boussetta for her help on the realization of the preparation of the manuscript.

References

- Allali, H., Marchal, L., & Vorobiev, E. (2008). Blanching of strawberries by ohmic heating: effects on the kinetics of mass transfer during osmotic dehydration. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3), 406–414.
- Angersbach, A., Heinz, V., & Knorr, D. (2002). Evaluation of process-induced dimensional changes in the membrane structure of biological cells using impedance measurement. *Biotechnology Progress*, 18, 597–603.
- Boussetta N (2011a) Intensification de l'extraction des polyphénols par électrotechnologies pour la valorisation des marcs de Champagne. PhD thesis, Université de Technologie de Compiègne.
- Boussetta, N., Lanoisellé, J.-L., Bedel-Cloutour, C., & Vorobiev, E. (2009). Extraction of soluble matter from grape pomace by high voltage electrical discharges for polyphenol recovery: effect of sulphur dioxide and thermal treatments. *Journal of Food Engineering*, 95, 192–198.
- Boussetta, N., Lebovka, N., Vorobiev, E., Adenier, H., Bedel-Cloutour, C., & Lanoisellé, J. (2009). Electrically assisted extraction of soluble matter from Chardonnay grape skins for polyphenol recovery. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 1491–1497.
- Boussetta, N., Vorobiev, E., Deloison, V., Pochez, F., Falcimaigne-Cordin, A., & Lanoisellé, J. (2011). Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: application of high voltage electrical discharges. *Food Chemistry*, 128, 364–370.
- Brasseur, T., Angenot, L., Pinemail, I., & Deby, C. (1986). Antiradicals, antilipid peroxidation and antioxidant properties of flavonoids. *Bull. Liaison Groupe Polyphenols*, 13, 507.
- Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S., Bilic, M., & Velic, D. (2007). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81, 236–242.

- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 85–91.
- De Campos, L., Fernanda, V., Pedrosa, R., & Ferreira, S. (2008). Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). *Bioresource Technology*, 99, 8413–8420.
- De Vito, F., Ferrari, G., Lebovka, N., Shynkaryk, M., & Vorobiev, E. (2008). Pulse duration and efficiency of soft cellular tissue disintegration by pulsed electric fields. *Food and Bioprocess Technology*, 1(4), 307–313.
- Delsart C, Cholet C, Ghidossi R, Poupot C, Grimi N, Vorobiev E, Milisic V & Mietton-Peuchot M (2010) Effect of pulsed electric field on grape polyphenols extraction. European conference on fluid-particle separation (FPS 2010), 5–7 October 2010, Lyon, France.
- Donsi, F., Ferrari, G., Frullo, M., & Pataro, G. (2010). Pulsed electric field-assisted vinification of Aglianico and Piedrosso grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(22), 11606–11615.
- Dugand, L. R. (1980). Natural antioxidants. In M. G. Simic & M. Karel (Eds.), *Autoxidation in food and biological systems* (pp. 261–295). New York: Plenum.
- El-Belghiti, K., Rabhi, Z., & Vorobiev, E. (2005). Kinetic model of sugar diffusion from sugar beet tissue treated by pulsed electric field. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(2), 213–218.
- Favarel, J.L. (1998). Protection de la vendange et extraction des jus en vendange blanche. Compte Rendu, Extrait de «Cinquanteenaire ITV France».
- Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 618–626.
- Grimi, N., Praporscic, I., Lebovka, N. I., & Vorobiev, E. (2007). Selective extraction from carrot slices by pressing and washing enhanced by pulsed electric fields. *Separation and Purification Technology*, 58, 267–273.
- Grimi, N., Lebovka, N. I., Vorobiev, E., & Vaxelaire, J. (2009). Effect of a pulsed electric field treatment on expression behavior and juice quality of Chardonnay grape. *Food Biophysics*, 4, 191–198.
- Jackson, R. S. (1994). *Wine sciences*. New York: Academic.
- Jalté, M., Lanoisellé, J. L., Lebovka, N. I., & Vorobiev, E. (2009). Freezing of potato tissue pre-treated by pulsed electric fields. *LWT - Food Science and Technology*, 42(2), 576–580.
- Ju, Z. Y., & Howard, L. R. (2003). Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 5207–5213.
- Kammerer, D., Claus, A., Schieber, A., & Carle, A. (2005). A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *Journal of Food Science*, 70, 157–163.
- Lebovka, N. I., Bazhal, M. I., & Vorobiev, E. (2000). Simulation and experimental investigation of food material breakage using pulsed electric field treatment. *Journal of Food Engineering*, 44, 213–223.
- Lebovka, N. I., Bazhal, M. I., & Vorobiev, E. (2002). Estimation of characteristic damage time of food materials in pulsed-electric fields. *Journal of Food Engineering*, 54, 337–346.
- Lebovka, N. I., Shynkaryk, M. V., El-Belghiti, K., Benjelloun, H., & Vorobiev, E. (2007). Plasmolysis of sugarbeet: pulsed electric fields and thermal treatment. *Journal of Food Engineering*, 80(2), 639–644.
- Lebovka, N. I., Shynkaryk, M., & Vorobiev, E. (2007). Moderate electric field treatment of sugarbeet tissues. *Biosystems Engineering*, 96(1), 47–56.
- Lebovka, N. I., Kupchik, M. P., Sereda, K., & Vorobiev, E. (2008). Electrostimulated thermal permeabilisation of potato tissues. *Biosystems Engineering*, 99, 76–80.
- Loginova, K. V., Vorobiev, E., Bals, O., & Lebovka, N. I. (2011). Pilot study of countercurrent cold and mild heat extraction of sugar from sugar beets, assisted by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 102(4), 340–347.
- Loliger, J. (1991). The use of antioxidants in foods. In O. I. Aurooma & B. Halliwell (Eds.), *Free radicals and food additives* (p. 121). London: Taylor and Francis.
- López, N., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2008). Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 9(4), 477–482.
- Louli, V., Ragoussis, N., & Magoulas, K. (2004). Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Bioresources Technology*, 92, 201–208.
- Macheix, J., Fleurient, A., & Billot J. (1990). Flavanoids. In: *Fruit phenolics*. Boca Raton: CRC, 39–80.
- Murat, M. L., & Dumeau, F. (2005). Recent findings on rosé wine aromas. Part II: optimizing winemaking techniques. *Aust. NZ Grapegrower Winemaker*, 499, 49–52–54–55.
- Peleg, M. (1988). An empirical model for the description of moisture sorption curves. *Journal of Food Science*, 53(4), 1216–1219.
- Praporscic, I. (2005). Influence du traitement combiné par champ électriques pulsés et chauffage modéré sur les propriétés physiques et sur le comportement au pressage de produits végétaux. Thesis, Université de Technologie de Compiègne, France.
- Praporscic, I., Lebovka, N., Vorobiev, E., & Mietton-Peuchot, M. (2007). Pulsed electric field enhanced expression and juice quality of white grapes. *Separation and Purification Technology*, 52, 520–526.
- Puértolas, E., Hernandez-Orte, P., Saldana, G., Alvarez, I., & Raso, J. (2010). Improvement of winemaking process using pulsed electric fields at pilot-plant scale. Evolution of chromatic parameters and phenolic content of Cabernet Sauvignon red wines. *Food Research International*, 43(3), 761–766.
- Puértolas, E., López, N., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2010). Potential applications of PEF to improve red wine quality. *Trends in Food Science & Technology*, 21(5), 247–255.
- Puértolas, E., Saldana, G., Condón, S., Alvarez, I., & Raso, J. (2010). Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. *Food Chemistry*, 119(3), 1063–1070.
- Puertolas, E., Saldana, G., Alvarez, I., & Raso, J. (2011). Experimental design approach for the evaluation of rose wines obtained by pulsed electric fields. Influence of temperature and time of maceration. *Food Chemistry*, 126, 1482–1487.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2004). *Traité d'oenologie - 2. Chimie du vin—stabilisation et traitements*. Dunod, Paris.
- Sastry, S. K. (2005). Advances in ohmic heating and moderate electric field (MEF) processing. In G. V. Barbosa-Cánovas, M. S. Tapia, & M. P. Cano (Eds.), *Novel food processing technologies*. CRC: Boca Raton.
- Sastry, S. K. (2008). Ohmic heating and moderate electric fields processing. *Food Science and Technology International*, 14, 419.
- Sastry, S., & Barach, J. (2000). Ohmic and inductive heating. *Journal of Food Science*, 65(4), 42–46.
- Shynkaryk, M., Ji, T., Alvarez, V. B., & Sastry, S. K. (2010). Ohmic heating of peaches in the wide range of frequencies (50 Hz to 1 MHz). *Journal of Food Science*, 75(7), 493–500.
- Singleton, V. L. (1982). Grapes and wine phenolics: Background and prospects. In A. D. Webb (Ed.), *Proceedings of the University of California, Davis, wine grape centennial symposium*. Davis: Department of Viticulture and Enology, University of California.
- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49–55.
- Vorobiev E & Lebovka N (eds) (2008) *Electro technologies for extraction from food plants and biomaterials*. New York: Springer, 272 p. 157 illus., Hardcover.
- Zimmermann, U. (1986). Electrical breakdown, electropemabilization and electrofusion. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 105, 175–256.

Conclusions générales et perspectives

Ce travail de thèse s'est attaché à l'étude de l'intensification et de l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques durant la chaîne de la vinification en rouge. Une revue bibliographique a montré qu'une meilleure qualité du vin est obtenue par une amélioration du potentiel phénolique du raisin puis par une meilleure extraction de ces composés durant la vinification en rouge. Pour améliorer la quantité des composés phénoliques présents dans le vin, le vinificateur doit déjà partir d'une matière première en bon état sanitaire récoltée au moment requis. Pour cette raison, des travaux supplémentaires s'avèrent nécessaires pour optimiser le choix de la date de vendange phénolique pour laquelle les raisins présentent les meilleurs teneurs phénolique. Par la suite, il doit développer des procédés permettant d'améliorer la diffusion des composés phénoliques durant la vinification en rouge. La revue bibliographique a montré que la paroi constitue un frein à la diffusion des composés dans les vins durant la vinification en rouge. D'où l'intérêt de comparer l'effet de plusieurs méthodes différentes méthodes de pré-traitements en amont de la vinification en rouge sur l'extraction des composés phénoliques.

Suite à l'analyse bibliographique, il ressort plusieurs points qui nécessitent des études plus approfondies :

(1) Les deux méthodologies de suivi de maturité phénolique (Glories et ITV) n'ont jamais été comparées dans la bibliographie. Le suivi de cette maturité était une première au Liban.

(2) L'étude des propriétés antiradicalaires et antimicrobiennes des composés phénoliques extraits de différentes variétés de raisins fournis par la société Château KSARA n'a jamais été abordée.

(3) L'étude de l'effet de l'application d'un prétraitement électrique (CEP) en amont de la macération pré-fermentaire à froid sur l'amélioration de l'extraction des composés phénoliques n'a jamais été discutée.

(4) La comparaison de l'efficacité de différents pré-traitements (CEP, Ultrasons, Chauffage modéré, thermovinification, traitements enzymatiques) sur l'amélioration de l'extraction des composés phénoliques à partir des raisins durant la fermentation alcoolique n'a jamais été étudiée.

(5) L'étude de l'intensification de l'extraction des composés phénoliques du marc du raisin en utilisant le chauffage ohmique pulsé n'a jamais été validée.

C'est à l'ensemble de ces questions que ce travail tente d'apporter des réponses. Les travaux effectués dans cette thèse ont porté sur l'étude de l'effet du pré-traitement par CEP sur l'extraction des composés phénoliques durant la vinification en rouge. Les champs électriques pulsés permettent de perméabiliser les membranes cellulaires des raisins et ainsi d'améliorer les processus d'extraction durant la vinification en rouge.

L'ensemble des suivis de la maturité phénolique par les deux méthodes (ITV et Glories) sur des échantillons de raisins sélectionnés de différentes parcelles localisées dans la vallée de la Békaa sur 4 vendanges (2008, 2009, 2010 et 2011) a montré une forte corrélation entre les méthodes ITV et Glories au niveau des pics d'anthocyanes et des composés phénoliques, et au niveau des classifications des meilleures parcelles de chaque cépage. Cette corrélation fut validée sur tous les cépages et sur les quatre millésimes (2008, 2009, 2010 et 2011). La comparaison des meilleurs parcelles des cinq cépages (Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Syrah et Petit verdot) a montré que les meilleurs cépages quant à leurs riches potentiels phénoliques et anthocyaniques sont le Cabernet Franc et le Petit Verdot. La comparaison des cinq cépages sur les quatre vendanges a montré que les vendanges 2008 et 2010 ont été meilleures que celles des vendanges 2009 et 2011. En étudiant les conditions climatiques, nous avons constaté que les vendanges 2008 et 2010 ont été caractérisées par un climat sec et chaud, ce qui a

aboutit à de meilleurs potentiels anthocyaniques et phénoliques par rapport aux millésimes 2009 et 2011.

L'étude des propriétés antiradicalaires et antimicrobiennes des composés phénoliques extraits de différentes variétés de raisins fournis par la société Château KSARA ont montré que les composés phénoliques extraits sont pour la plupart des excellents anti-radicaux libres naturels, cette activité étant variable entre les différents cépages dû à un contenu phénolique différent. Un effet synergique entre les différents composés flavonoïdes pourrait expliquer le fort pouvoir antiradicalaire de certaines variétés.

Quant à l'étude des propriétés antimicrobiennes, nous avons noté la présence d'une activité antimicrobienne importante des extraits vis-à-vis de quatre souches pathogènes. Des pourcentages d'inhibition plus élevés ont été notés vis à vis des souches à Gram positif suivi comparé aux Gram négatif et aux levures. Ce résultat peut être attribué à des différences dans la structure de la paroi cellulaire entre bactéries à Gram (+) et à Gram (-) d'une part et entre bactéries et levures d'autre part. Un effet synergique a été proposé entre les composés phénoliques des différents extraits dans le but de comprendre les diverses activités biologiques observées.

Quant aux études visant l'amélioration de l'extraction des composés phénoliques durant la vinification en rouge via l'application de différents pré-traitements en amont la vinification en rouge, nous avons obtenu pour les différentes modalités de pré-traitements une amélioration de l'intensité colorante et de la teneur en composés phénoliques par rapport à un témoin soumis à une vinification classique.

Dans un premier temps, l'étude qui consistait à étudier l'impact d'un prétraitement par champs électriques pulsés durant l'étape de macération à froid (MPF) de deux variétés de raisins (Cabernet Franc et Cabernet Sauvignon), en utilisant soit une haute intensité du champ ($E=5000$ V/cm) soit des intensités modérées ($E = 400-800$ V/cm) a montré ce qui suit. Un prétraitement, CEP (5000 V/cm) a montré le meilleur effet sur l'amélioration de la couleur (+ 68-75 % de l'IC des moûts), l'extraction des composés phénoliques (+43-48% du contenu phénolique des moûts) et l'activité antiradicalaire. Vu que la majorité des composés phénoliques sont présents dans l'hypoderme de la baie de raisins, les

traitements par CEP entraîneraient la formation de pores au niveau des parois cellulaires, permettant ainsi la libération du contenu intracellulaire. L'application du CEP en amont de la MPF a permis de réduire la durée de la MPF avec une meilleure qualité des composés phénoliques du vin rouge élaboré.

Dans un deuxième temps, l'étude visant à comparer l'efficacité de l'application des Champs électriques pulsés CEP1 (0.8 kV/cm, 100 ms, 42 kJ/kg), et CEP2 (5 kV/cm, 1 ms, 53 kJ/kg), des Ultrasons US1 (24 kHz, 5 min, 121 kJ/kg), US 2 (24 kHz, 10 min, 242 kJ/kg), US3 (24 kHz, 15 min, 363 kJ/kg), et du chauffage modéré CM (50°C, 15 min, 125 kJ/kg), quant à l'extraction des composés phénoliques et de la couleur durant la vinification en rouge a montré ce qui suit. Les CEP (de 50 à 60%) semblent être les plus efficaces quant à l'amélioration de l'extraction des composés phénoliques durant la vinification en rouge, par rapport au chauffage modéré (20%) et aux ultrasons (de 7 à 38%). La comparaison de l'effet des trois prétraitements a montré que la technique CEP est la plus efficace en tant que prétraitement avant la fermentation en rouge, avec les meilleurs concentrations en intensité colorante (de 20 à 23%) , en anthocyanes (60%) en tanins (de 50 à 60%) et en pouvoir antiradicalaire (89.7%), tout en possédant la plus faible consommation énergétique.

Dans un troisième temps, l'étude basée sur une comparaison de l'application des Champs électriques pulsés CEP (5000 V/cm, 1ms), de la thermovinification (chauffage 30 min à 70°C), et du traitement enzymatique TE (6 g/hL d'enzymes) quant à l'extraction des composés phénoliques durant la vinification en rouge a montré ce qui suit. L'étude des cinétiques des composés phénoliques et d'anthocyanes des extraits prétraités par TE, CEP et TV a montré une tendance similaire pour le témoin, le TE et le CEP. Par contre, une autre allure a été détectée pour la thermovinification, ceci étant dû au chauffage en amont de la fermentation. la comparaison des trois prétraitements: TE, CEP et TV en amont de la vinification en rouge valide leur efficacité sur l'amélioration de la couleur, de l'extraction des anthocyanes, des tanins et également sur l'accélération de la cinétique d'extraction des composés phénoliques. Toutefois, chaque prétraitement aboutit à un profil phénolique différent du vin élaboré. La technique TE semble être moins efficace

que les CEP et la TV en tant que prétraitement avant la fermentation en rouge. La TV aboutit à la meilleure extraction phénolique (+41%) et intensité colorante (+62%). Les CEP améliorent aussi les critères phénoliques (+36%) et l'intensité colorante (+56%), avec une moindre consommation énergétique par rapport à la TV ($W= 48$ kJ/kg pour CEP et 420 kJ/kg pour TV), une plus faible durée de traitement ($t = 1$ ms pour CEP et $t = 30$ min pour TV), à noter que le CEP est une technique athermique ($\Delta T < 7^\circ\text{C}$ pour CEP et $\Delta T = 50^\circ\text{C}$ pour TV).

La dernière étude, basée sur l'application d'un chauffage ohmique pulsé « COP » à différentes intensités de voltages ($E=100-800$ V/cm) et différentes températures modérées ($30-60^\circ\text{C}$), dans le but de valoriser le marc du raisin par une meilleure extraction des composés phénoliques a permis de valider l'efficacité du prétraitement par COP dans l'amélioration de la perméabilisation membranaire des cellules présentes dans le marc du raisin avec une faible consommation énergétique ($W= 38$ kJ/kg). L'application du COP (400 & 800 V/cm) a amélioré l'extraction des composés phénoliques de 40% suite à une heure de diffusion. Une synergie a été observée en combinant l'application du COP à une température de diffusion modérée (50°C) et un milieu hydroalcoolique (30% d'éthanol). Une extraction sélective des composés phénoliques a été notée suite à l'application de COP suivi d'une diffusion dans un milieu hydroalcoolique. Enfin, nous pouvons déduire que l'extraction assistée par COP peut être prometteuse dans l'objectif de valoriser le marc de raisin. La validation de ce procédé sur des quantités de produits supérieures est nécessaire pour une perspective d'application industrielle.

Pour récapituler, nous avons tenté dans cette thèse à maîtriser et améliorer l'extraction des composés phénoliques tout au long de la chaîne de vinification. Nous avons amélioré le potentiel et l'extractibilité phénolique des raisins vendangés sur le terrain par une amélioration du suivi de la maturité phénolique et une meilleure décision quant à la date de récolte optimale. Puis, par une amélioration de l'extraction des composés phénoliques durant la macération pré-fermentaire à froid et la vinification en rouge par l'application de divers pré-traitements tels que les champs électriques pulsés, chauffage, traitement enzymatique, thermovinification, ultrasons etc. A ce stade les CEP ont montré une

meilleure efficacité quant à l'amélioration de l'extraction de ces composés antioxydants, notamment, des anthocyanes et des tanins, qui ont induit une meilleure intensité colorante. Par ailleurs, nous avons aussi amélioré l'extraction à partir des co-produits de la vinification "les marcs de raisins" en appliquant le chauffage ohmique pulsé, afin de valoriser les déchets de la vinification. En effectuant toutes ces études, nous avons travaillé sur une maîtrise de l'amélioration de l'extraction des composés phénoliques tout au long de la chaîne de la vinification en partant de la matière première et en atteignant même les "déchets" correspondants.

Durant cette thèse, la technique des CEP a montré son efficacité en amont de la vinification en rouge mais la compréhension des mécanismes d'action à l'échelle cellulaire est limitée. Jusqu'à ce jour, aucun traitement par CEP n'a été réalisé en continu pour une vinification en rouge à l'échelle industrielle. En effet, l'avancée des travaux a montré la faisabilité d'appliquer un traitement par CEP en continu. Les coûts énergétiques restent à étudier pour pouvoir passer à une application industrielle.

Les résultats obtenus lors de ce travail de thèse soulèvent de nouvelles questions et suggèrent ainsi certaines orientations futures de la recherche tant sur le plan scientifique que sur le plan technologique :

Sur le plan scientifique :

(1) Mettre en expérience d'autres propriétés biologiques des extraits de composés phénoliques, comme l'évaluation de leur potentiel en tant qu'agents anticancérigènes, antiviraux et anti-inflammatoires.

(2) Approfondir les connaissances des mécanismes d'action des CEP sur les activités antioxydantes et antimicrobiennes des composés phénoliques extraits durant la vinification en rouge et leurs impacts sur la qualité des produits.

(3) Etudier l'effet de l'application des CEP en amont de la vinification en rouge sur le profil aromatique des vins rouges élaborés.

(4) Etudier et observer à échelle microscopique l'effet du traitement par CEP sur les cellules des raisins tout au long de la fermentation en rouge, dans le but de valider l'effet des CEP sur l'endommagement membranaire au moment de son application et puis l'effet tardive durant la macération.

(5) Etudier l'effet de l'application des CEP sur la formation de complexes phénoliques (anthocyanes-anthocyanes ; anthocyanes-tanins , protéines-tanins, etc.) durant la vinification.

(6) Etudier l'effet de l'application des champs électriques pulsés CEP à différents moments de la macération à froid et la fermentation alcoolique. Cette étude a été déjà effectuée à la fin de ma thèse et je rédige un article là-dessus.

Sur le plan technologique :

(1) Combiner le traitement par CEP avec d'autres types de traitements modérés (traitement enzymatiques, ultrasons, chauffage modéré ...) en amont de la vinification en rouge et étudier l'effet de cette combinaison sur l'extraction des composés phénoliques et de l'intensité colorante durant la vinification rouge.

(2) Étudier la faisabilité d'une fermentation alcoolique assistée par CEP à l'échelle industrielle : développer un générateur de CEP industriel et concevoir une chambre de traitement appropriée (définir la géométrie des électrodes, les matériaux de l'enceinte, etc ...).

(3) Appliquer le traitement par Chauffage ohmique pulsé à échelle pilote dans le but de valoriser le marc du raisin et produire des poudres de composés phénoliques en plus grande quantité pour des applications pharmaceutiques, cosmétiques et/ou en agro-

alimentaire (propriétés moussantes, propriétés gustatives dans les vins, etc...). Les étapes de purification et de séchage (par atomisation par exemple) devront être étudiées et optimisées.

(4) Etudier l'influence de l'application des CEP sur des raisins à différents stades de maturité pour évaluer si l'application des CEP pourra réduire la durée de la vinification en rouge au cas où les raisins sont immatures.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ageron, D., Escudier, J.L., Abbal, P., & Moutounet M., 1995. Pré-traitements des raisins par flash détente sous vide poussé. *Revue Française d'œnologie*, 153, 50-53.

Aguilera, J.M., & Stanley, D.W., 1999. Microstructural Principles of Food Processing and Engineering. 2nd Ed., *Aspen Publishers*, Gaithersburg, 432 pages.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J.D., 1994. Molecular Biology of the Cell. 4th edition, *Garland Publishing*, New York.

Alleweldt, G., Engel, M., & Gebbing, H., 1981. Histological Investigations with Grapevine Berries. *Vitis*, 20, 1-7.

Alvarez, I., Aleixandre, J.L., Garcha, M.J. & Lizama, V., 2006. Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *Analytica Chimica Acta*, 563, 109–115.

Amrani, J.K., 1993. Localisation des anthocyanes et des tanins dans le raisin-Etude de leur extractibilité. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux II, Bordeaux.

Amr, A., & Al-Tamimi, E., 2007. Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants. *Journal of Food Science and Technology*, 42, 985–991.

Amrani, J., Driss, B., Cédric, S., & Yves, G., 2006. Influence de l'éthylène sur les maturités phénolique et cellulaire des raisins au cours de la vinification, Cahiers Agricultures vol. 15, n° 4.

Anderson, M., Singleton, D., Sanders, J., Gundersen, M., & Waterhouse, A., 2009. Effects of Pulsed Energy Field Treatments on White Winegrapes. Abstracts from Presentations at the ASEV 60th Annual Meeting. Napa, California. *Am. J. Enol. Vitic*, 60, 386- 409.

Anneraud, C., & Vinsonneau, E., 2009. Maturité technologique et maturité phénolique des raisins : des références analytiques utiles, des méthodes simples et des matériels pratiques et prometteurs. *Institut Français de la vigne et de vin*. www.matevi-france.com

Awika, J.M., Rooney, L.W., & Waniska, R.D., 2005. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food chemistry*, 90, 293-301.

Balasa, A., Toepfl, S., & Knorr, D., 2006. Extraction of total phenolics from grapes in correlation with the degree of membrane poration. COST meeting 928-300606, Cost, Reykjavik, Island.

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial By-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.

Barbosa-Cánovas, G.V., Pothakamury, U.R., Palou, E., & Swanson, B.G., 1998. Nonthermal preservation of foods. Marcel Dekker, New York.

Barbosa-Cánovas, G.V., Góngora-Nieto, M.M., Pothakamury, U.R., Swanson, B.G., 1999. Preservation of foods with pulsed electric fields. San Diego, Academic Press.

Barskaya, A.V., Kuretz, B.I., & Lobanova, G.L., 2000. Extraction of water soluble matters from vegetative raw material by electrical pulsed discharges. In proc of the 1st International Congress on Radiation, Physics, High Current Electronics, and Modification of Materials, pp. 533-535. Tomsk, Russia.

Bautista-Ortin, A.B., Martinez-Cutillas, A., Ros-Garcia, J.M., Lopez-Roca, J. M., & Gomez-Plaza, E., 2005. Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 867-878.

Baydar, N.G., Özkan, G., & Sagdiç O., 2004. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*, 15, 335-339.

Bazhal, M., & Vorobiev, E., 2000. Electrical treatment of apple cosettes for intensifying juice pressing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1668-1674.

Bazhal, M.I., Lebovka, N.I., & Vorobiev, E., 2001. Pulsed electric field treatment of apple tissue during compression for juice extraction. *Journal of Food Engineering*, 50, 129-139.

Blouin, J., & Peynaud, E., 2001. "Connaissance et travail du vin". Edition Dunod, Paris.

Bohm, H., Boeing, H., & Hempel, J., 1998. Flavonols, flavones and anthocyanins as natural antioxidants in food and their possible role in the prevention of chronic diseases, *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 37, 147- 63.

Boidron, R., Boursiquot, J.M., Doazan, J., Leclair, P., Leguay, M., & Walter, B. 1995. Catalogue des variétés et clones de vigne cultivés en France. ENTAV, ENSAM, NIVINS, INRA. Ministère de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation. CTPS. p 357.

Bonilla, F.M., Mayen, J., Mérida, & Medina, M., 1999. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chem*, 66, 209-215.

Boulet, J.C., & Escudier, J.L., 1988. Œnologie, fondements scientifiques et technologiques. Partie 17.Vinification en rouge, 797-805. Flanzly coord Tech et Doc Lavoisier.

Bourzeix, M., Weiland, D., & Heredia, N., 1986. A study of catechins and procyanidins of grape clusters, the wine and other by-product of the wine. Bulletin de l'O.I.V 669-670, 1173-254.

Boussetta, N., Lanoisellé, J.L., Bedel-Cloutour, C., & Vorobiev, E., 2009a. Extraction of soluble matter from grape pomace by high voltage electrical discharges for polyphenol recovery: Effect of sulphur dioxide and thermal treatments. *Journal of Food Engineering*, 95, 192-198.

Boussetta, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E., 2009b. Electrically assisted extraction of soluble matter from Chardonnay grape skins for polyphenol recovery. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 57, 1491-1497.

Boussetta, N., 2010. Intensification de l'extraction des polyphénols par électrotechnologies pour la valorisation des marcs de champagne. Thèse de Doctorat de l'Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France.

Boussetta, N., Vorobiev, E., Deloison, V., Pochez, F., Falcimaigne-Cordin, A., & Lanoisellé, J.L., 2011. Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: Application of high voltage electrical discharges. *Food Chemistry*, 128, 364-370.

Bouzzara, H., & Vorobiev, E., 2001. Non-thermal pressing and washing of fresh sugarbeet cossettes combined with a pulsed electric field. *Zuckerindustrie*, 126, 433-466.

Bowes, B.G., 1998. Structure des plantes. Atlas en couleur (page: 192).Paris, France: Institut National de la Recherche Agronomique.

Bruneton, J., 2009. Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales; Tec & Doc Lavoisier: Paris, France.

Cabanis, J.C., Cabanis, M.T., Cheynier, V., & Teissedre, P.L., 1998. Caractérisation de la matière première et des produits élaborés. In: C. Flanzky (Ed.) Oenologie: fondements scientifiques et technologiques. Lavoisier, Tec & Doc, pp. 291-336.

Cabaroglu, T., Selli, S., Canbas, A., Lepoutre, J.P., & Günata, Z., 2003. Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 581-587.

Cabredo-Pinillos, S., Cedron-Fernandez, T., Gonzalez-Briongos, M., Puente-Pascual, L., & Saenz-Barrio, C., 2006. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from wine samples : Optimization of the method. *Talanta*, 69, 1123-1129.

Cabrita, L., Fossen, T., & Andersen, O.M., 2000. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 68, 101-107.

Cacace, J.E., & Mazza, G., 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59, 379-389.

Canals, R., Llaudy, M., Valls, J., Canals, J., & Zamora, F., 2005. Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skins and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4019-4025.

Canals, R., Llaudy, M.C., Valls, J., Canals, J.M., & Zamora, F., 2005. Influence of ethanol Concentration on the Extraction of Color and Phenolic Compounds from the Skin and Seeds,of Tempranillo Grapes at Different Stages of Ripening. *Journal Agricultural Food and Chemistry*, 53, 4019-4025.

Canal-Llaubères, R.M., & Barbe, C., 1989. Les enzymes industrielles dans la biotechnologie du vin. *La Revue des Oenologues*, 50, 17-22.

Canal-Llaubères, R.M., 1990. Utilisation des enzymes dans les procédés d'extraction en oenologie. *Revue Française d'Oenologie*, 122, 28-33.

Canal-Llaubères, R.M., 2000. Les enzymes et leur application en oenologie. Produits de traitement et auxiliaires d'élaboration des moûts et des vins (pp. 43-60). Bordeaux.

Carbonneau, A., Deloire, A., & Jaillard, B., 2007. La vigne Physiologie, terroir, culture, Ed 1 Vol 1. Dunod, Paris.

Caridi, D., Trenerry, V.C., Rochfort, S., Laughler, D., & Jones, R., 2007. Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food chemistry*, 105, 691-699.

Carpita, N.C., & Gibeaut, D., 1993. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal*, 3, 1-30.

Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, Ma., Elena, Ma., Páez-Hernández, J.A., Rodríguez Galán-Vidal, J.A., & Galán-Vidal, C.A., 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859–871.

Castro-Vázquez, I., Pérez-Coello, M.S., & Cabezudo, M.D., 2002. Effects of enzyme treatment and skin extraction on varietal volatiles in Spanish wines made from Chardonnay, Muscat, Airén, and Macabeo grapes. *Analytica Chimica Acta*, 458, 39-44.

Cayla, L., Favarel, J., & Davaux, F., 1998. Méthodologie d'estimation des composés phénoliques – Application aux cépages rouges de Midi-Pyrénées, Extrait de la Journée Technique « Cinquantenaire ITV France ».

Cayla, L., Cottureau, P. & Renard, R., 2002. Estimation de la maturité phénolique des raisins rouges par la méthode I.T.V. standard. *Revue Française d'Oenologie*, 193, 10–16.

Chemat, S., Lagha, A., & AitAmar, H., 2004. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonène from caraway seed. *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 188-195.

Chemat, F., Huma, Z., & Khan, M.K., 2010. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813-835.

Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M.K., 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813-835.

Cheyrier, V., Fulcrand, H., Sarni, P., & Moutounet, M., 1997a. Application des techniques analytiques à l'étude des composés phénoliques et de leurs réactions au cours de la vinification. *Analisis*, 25(3), M14-M21.

Chira, K., Suh, J.H., Saucier, C., & Teissède, P.L., 2008. Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6, 75-82.

Cocito, C., Gaetano, G., & Delfini, C., 1995. Rapid extraction of aroma compounds in must and wine by means of ultrasound. *Food Chemistry*, 52, 311-320.

Cogat PO. Brevet N°EP 95900808, 1995. 7 Installation pour le traitement de matières biologiques hydratées.

Conde, C., Paulo Silva, Natacha Fontes, Alberto, C.P., Dias, Rui, M., Tavares, Maria, J., Sousa, Alice Agasse, Serge Delrot & Hernâni Gerós, 2007. Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality, *Global Science Books*.

Coombe, B.G., 1987. Distribution of Solutes within the Developing Grape Berry in Relation to Its Morphology. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 120-127.

Cork, S.J., & Krockenberger, A.K., 1991. Methods and pitfalls of extracting condensed tannins and other phenolics from plants: Insights from investigations on Eucalyptus leaves. *Journal of Chemical Ecology*, 17, 123-134.

Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B., 2008. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 85-91.

Cottureau, P., & Desseigne, J.M., 2007. Chauffage de la vendange et arômes fruités. *Entretiens viti vinicoles Rhône Méditerranée*, 20-22.

Coombe, B.G., 1987. Influence of temperature on composition and quality of grapes. *Acta Horticulturae*, Davis, 206, 23-35. (Symposium on Grapevine Canopy and Vigor Management - 1986).

Crachereau, J.C., 2012. La thermovinification : une technique efficace mais à maîtriser. *Agriculture & territoires, chambre d'agriculture Gironde*, Site vinopole, 1-5.

Crespo, J.G., & Brazinha, C., 2010. Membrane processing: Natural antioxidants from winemaking by-products. *Filtr. Separat.*, 47, 32-35.

D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R., 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, 43, 348-361.

Davaux, F., 2009. La thermo-détente un nouvel outil d'optimisation de la thermovinification. IFV Pôle Sud-Ouest.

Davaux, F., & Oubart, C., 2008. La thermo-détente : une nouvelle approche de la thermovinification, *Revue internet de viticulture et œnologie*.

Delsart, C., Ghidossi, R., Poupot, C., Cholet, C., Grimi, N., Vorobiev, E., Milisic, V., & Mietton Peuchot, M., 2012. Enhanced Extraction of Valuable Compounds from Merlot Grapes by Pulsed Electric Field. *American Journal of Enology and Viticulture*, 11088.

Delsart, C., & Mietton Peuchot M., 2011. Effet des champs électriques pulses sur l'extraction des polyphénols du raisin.

De La Hera Orts, M.L., Martínez-Cutillas, A., López Roca, J.M., Pérez-Prieto, L.J., & Gómez-Plaza, E., 2005. Effect d'une irrigation déficitaire sur la teneur en anthocyanes des raisins et des vins issus du cépage Monastrell. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 39, 47-55.

De Quirós, A.R.B., Lage-Yusty, M.A., & López-Hernández, J., 2009. HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. *Food Research International*, 42, 1018-1022.

Dequin, S., 2008. «Comment gérer l'excès d'alcool dans les vins – Un nouveau défi pour les levures ». *Revue des œnologues* 129, n° spécial 47-49.

Desseigne, J.M., & Grenier, P., 1998. Œnologie, fondements scientifiques et technologiques. Partie 25. Diversification et optimisation des traitements thermiques, 1229-1232. Flanzly coord Tech et Doc Lavoisier.

Detrimont & Klein. 2001. <http://www.creaweb.fr/bv/cellule.html>.

Diakou, P., & Carde, J.P., 2001. In situ fixation of grape berries. *Protoplasma*, 218, 225-235.

Domizio, P., Lencioni, L., Ciani, M., Di Blasi, S., Pontremolesi, C., & Sabatelli, M.P., 2007. Spontaneous and inoculated yeast population dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. *International journal of food microbiology*, 115, 281-289.

Donsi, F., Ferrari, G., Fruilo, M., & Pataro, G., 2010. Pulsed Electric Field-Assisted Vinification of Aglianico and Piediroso Grapes. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 11606–11615.

Donsi, F., Ferrari, G., Fruilo, M., & Pataro, G., 2011. Pulsed Electric Fields-assisted vinification. *Procedia Food Science 1*, 780-785.

Dubernet, M., 2002. Analyse instantanée de la qualité des raisins et des moûts par IRTF, Laboratoire d'œnologie Dubernet CURSOS RIOJA, HARO 27 et 28 MAI 2002.

Dubernet, M., De Parzia, E., Dufort, B., & Fontaine, P., 2004. La thermo détente, une nouvelle dimension apportée à la thermovinification. *Revue Française d'œnologie* 214.

Ducasse, M.A., 2009. Impact des enzymes de macération sur la composition en polysaccharides et en polyphénols des vins rouges – étude de l'évolution de ces composés en solution modèle vin. Thèse de doctorat de l'université Montpellier II, Montpellier, France.

Ducasse, M.A., Canal-Llauberes, R.M., De Lumley, M., Williams, P., Souquet, J.M., Fulcrand, H., Doco, T., & Cheynier, V., 2010. Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines, *Food Chemistry*, 118, 369–376.

Ducruet, J., Canal-Llauberes, R.M. & Glories, Y., 1997. Influence des enzymes pectolytiques sélectionnés pour l'œnologie sur la qualité et la composition des vins rouges. *La Revue Française d'Œnologie*, 166, 16-19.

Dupuch V., 1998. Chambre d'Agriculture de la Gironde –Service Vigne, Maturité phénolique et date de récolte : les apports de la méthode « CASV », Extrait de la Journée Technique « Cinquantenaire ITV France ».

El-Belghiti, K., Moubarik, A., Vorobiev, E., 2008. Aqueous extraction of solutes from fennel (*foeniculum vulgare*) assisted by pulsed electric field. *J. Food Process. Eng.*, 31, 548-563.

Elez-Martinez, P., Escola-Hernandez, J., Soliva-Fortuny, R.C., Martín-Belloso, O., 2004. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* suspended in orange juice using high-intensity pulsed electric fields. *J. Food Protect.*, 67.

El Hajj, Y., Louka, N., Nguyen, C., & Maroun, R.G., 2012. Low Cost Process for Phenolic Compounds Extraction from Cabernet Sauvignon Grapes (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon). Optimization by Response Surface Methodology. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 89-103.

Entezari, M.H., Nazary, S.H., & Khodaparast, M.H.H., 2004. The direct effect of ultrasound on the extraction of date syrup and its micro-organisms. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11, 379–384.

Escarpa, A., & Gonzalez, M.C., 2001. An overview of analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31, 57-139.

Escudier, J.L., Moutounet, M. & Cogat, P.O., 1993. Produit alimentaire, obtention et application à la fabrication du jus de fruit et de vin. Brevet 9313287.

Escudier, J.L., Mikolajczak, M., & Moutounet, M., 2002. Pré-traitement des raisins par flash détente sous vide et qualité des vins.

Escudier, J.L., Mikolajczak, M. & Bes M., 2008. Chauffage de la vendange : Les technologies disponibles et les méthodes de vinifications associées. *Revue Française d'œnologie*, 228, 9-18.

Evrendilek, G.A., Zhang, Q.H., Richter, E.R., 2004. Application of Pulsed Electric Fields to skim milk inoculated with *staphylococcus aureus*. *Biosystems Engineering*, 87(2), 137-144.

Fang, F., Li, J.M., Pan, Q.H., & Huang, W.D., 2007. Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food Chemistry*, 101, 428- 433.

FAOSTAT, 2008. FAO Statistical Database Datum. <http://www.faostat.org>

Fischer, U., 1997. Farbe bekennen. *Das Deutsche Weinmagazin*, 13, 24 29.

Flanzy, C., 1998. Œnologie Fondements Scientifiques et technologiques. Collection Sciences et Technologies Agroalimentaires.

Flaumenbaum, B., 1949. Electrical treatment of fruits and vegetables before juice extraction. Trudy OTIKP, 3, 15–20. in Russian.

Fougère-Rifot, M., Cholet, C., & Bouard, J., 1996. Evolution des parois des cellules de l'hypoderme de la baie de raisin lors de leur transformation en cellules de pulpe. *Journal International de la Vigne et du Vin*, 30, 47-51.

Foulonneau, C., 2002. Guide pratique de la vinification. Editions, La Vigne Dunod, Paris.

Fournaud, D., Vicens, A., Sidhoum, L., Souquet, J., Moutounet, M., Cheynier, V., 2006. Accumulation and Extractability of Grape Skin Tannins and Anthocyanins at Different Advanced Physiological Stages. *J. Agric. Food Chem.*, 54.

Frémont, L., 2000. Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, 66 , 663-673.

Gagné, S., Saucier, C., & Gény, L., 2006. Composition and Cellular Localization of Tannins in Cabernet Sauvignon Skins during Growth. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9465–9471.

Geraudie, Vincent, 2009. Système d'aide à la conduite des procédés viticoles et œnologiques, basé sur l'utilisation d'un capteur piéton de suivi de maturité. Thèse Supagro Montpellier.

Gervais, J., Crachereau, J., & Latorre, M., 2005. Les composantes de la maturité Application au millésime, Service Vigne & Vin.

Ghafoor, K., Choi Yong, H., Jeon Ju, Y., & Jo In, H., 2009. Optimization of ultrasound-Assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *J.Agric.Food.Chem.*, 57, 4988-4994.

- Girard, B., Yuksel, D., Cliff, M.A., Delaquis, P., & Reynolds, A.G., 2001.** Vinification effects on the sensory, colour, and GC profiles of Pinot noir wines from British Columbia. *Food Research International*, 34, 483–499.
- Girdhar, N., & Satyanarayana, A., 2000.** Grape waste as a source of tartrates. *Indian Food Packer*, 54, 59-61.
- Giuliano, E., 2005.** Thèse, Contribution de la chimiométrie a la caractérisation des fruits : Application des profils métaboliques du raisin a l'étude des effets du climat , du sol et du cépage, Université BORDEAUX 2..
- Glories, Y., Agustin, M., 1993.** Proceedings Colloque Journée Technique du CIVB, Bordeaux, p. 56.
- Glories., Y., 2001.** Caractérisation du potentiel phénolique: adaptation à la vinification. *Progrès agricole et viticole*, 118, 347-350.
- Gros, C., Lanoisellé, J.L., & Vorobiev, E., 2003.** Towards an alternative extraction process for linseed oil. *Trans IChemE*, 81, 1059-1065.
- Goetz, G., Fkyerat, A., Métais, N., Kunz, M., Tabacchi, R., Pezet, R., & Pont, V., 1999.** Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of Botrytis cinerea stilbene oxidase. *Phytochemistry*, 52, 759-67.
- Göktürk, Baydar, N., Özkan, G., & Yaşar, S., 2007.** Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control*, 18, 1131-1136.
- Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I., 2007.** HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 618 -626.
- Gonzalez-Paramas, A.M., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., Pascual-Teresa, S.D., & Rivas-Gonzalo, J.C., 2004.** Flavonol content and antioxidant activity in winery byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, 234-238.
- González-M, G., Usaquén-Castro, X., Martínez-R, M., & Aya-Baquero, H., 2006.** Ultrasound-assisted Extraction of Polyphenols from Red-grape (*Vitis Vinifera*) Residues. 13th World Congress of Food Science & Technology.

Grimi, N., Lebovka, N.I., Vorobiev, E., & Vaxelaire, J., 2009. Effect of a pulsed electric field treatment on expression behavior and juice quality of Chardonnay grape. *Food Biophysics*, 4, 191-198.

Grimi, N., Mamouni, F., Lebovka, N., Vorobiev, E., & Vaxelaire, J., 2010. Acoustic impulse response in apple tissues treated by pulsed electric field. *Biosystems Eng.*, 105, 266-272.

Guadalupe, Z., Palacios, A., & Ayestaran, B., 2007. Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4854-4862.

Guendez, R., Kallithraka, S., Makris, D. P. & Kefalas, P., 2005. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. *Food Chemistry*, 89, 1-9.

Guérin, L., 2005. Amélioration de la Couleur et de la Structure des Vins Rouges par le suivi des composés phénoliques au cours de la maturité , ITV France.

Gülçin, I., Huyut, Z., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H.Y., 2010. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 43–53.

Guyot C., & Duprazi, P., 2004. Déguster les baies pour suivre la maturité du raisin , Ecole d'ingénieurs de Changins, CH-1260 Nyon 1.

Hang, Y.D., & Woodams, E.E., 1985. Grape pomace: a novel substrate for microbial production of citric acid. *Biotechnology Letters*, 7, 253-254.

Haunold, C., 1991. Extraction de pyréthrinés : analyse du procédé discontinu et de l'influence des ultrasons, modélisation et mise en œuvre d'un procédé continu. Thèse INP Toulouse.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., & Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity Relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.

Heinz, V., Alvarez, I., Angersbach, A., Knorr, D., 2002. Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields - Basic concepts for process design. *Trends in food science and technology*, 12, 3-4.

Heinz, V., Toepfl, S., Knorr, D., 2003. Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, 167-175

Ho, S.Y., Mittal, G.S., 1996. Electroporation of cell membranes: a review. *Crit Rev Biotechnol.*, 16, 349-362.

Hromadkova, Z., Ebringerova, A., & Valachovic, P., 2002. Ultrasound-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian (*Valeriana officinalis* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 9, 37-44.

Humbert-Goffard, A., Basque, E., Vatin, L., & Canal-Llaubères, R.M., 2003. Rôle des préparations enzymatiques à base de β -glucanases sur la mise au propre et la filtration des vins. *Revue Française d'Oenologie*, 201, 28-31.

Ignat, I., Volf, I., & Popa, V.I., 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chemistry*, 126, 1821–1835.

Jackson, R.S., 2008. Winescience, Third Edition. 751 pages.

Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P., & Sakariah, K.K., 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73, 285-290.

Jayaprakasha, G.K., Selvi, T., & Sakariah, K.K., 2003. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, 36, 117-122.

Jeandet, P., Bessis, R., & Gautheron, B., 1991. The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystibene) by grape berries in different developmental stages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 41-46.

Jemai, A.B., & Vorobiev, E., 2001. Effect of moderate electric field pulses on the diffusion coefficient of soluble substances from apple slices. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 73-86.

Jemai, A.B., & Vorobiev, E., 2003. Enhanced leaching from sugar beet cassettes by pulsed electric field. *Journal of Food Engineering*, 59, 405-412.

Jones, G.V., & Davis, R.E., 2000. Climate influences on grapevine phenology, grape composition, and wine production and quality for Bordeaux, France. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 249–261.

Jones, H.M., & Kunhardt, E.E., 1995. Development of pulsed dielectric breakdown in liquids. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 28, 178-188.

Kallithraka, S., Abdel-Azeem Mohdaly, A., Makris, D.P., & Kefalas, P., 2005. Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity, *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 375–386.

Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., & Schieber, A., 2004. Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4360-4367.

Kammerer, D., Claus, A., Schieber, A., & Carle, R., 2005. A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *Journal of Food Science*, 70, 157-163.

Kandler, O., 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 209-224.

Kapasakalidis, P.G., Rastall, R. A., & Gordon, M.H., 2006. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4016–4021.

Karadeniz, F., Durst, R., & Wrolstad, R., 2000. Polyphenolic Composition of Raisins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5343-5350.

Karapinar, M., & Sengun, I.Y., 2007. Antimicrobial effect of koruk (unripe grape-*Vitis vinifera*) juice against *Salmonella typhimurium* on salad vegetables. *Food Control*, 18, 702-706.

Katalinić, V., Smole, Možina, S., Skroza, D., Generalić, I., Abramović, H., Miloš, M., Ljubenković, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinč, P., & Boban, M., 2010. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, 119, 715-723 .

- Kaufmann, B., Christen, P., & Veuthey, J.L., 2001.** “Parameters affecting microwave-assisted extraction of withanolides”. *Phytochemical Analysis*, 12 : 327-331.
- Kelebek, H., Canbas, A., Cabaroglu, T., & Selli, S., 2007.** Improvement of anthocyanin content in the cv. Okuzgozu wines by using pectolytic enzymes. *Food Chemistry*, 105, 334-339.
- Kennedy, J.A., Matthews, M.A., Waterhouse, A.L., 2000.** Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, 55, 77-85.
- Kennedy, J.A., Matthews, M.A., Waterhouse, A.L., 2002.** Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 53, 268–274.
- Knorr, D., Angersbach, A., Eshtiaghi, M.N, Heinz, V., & Lee, D.U, 2001.** Processing concepts based on high intensity electric field pulses. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 129-135.
- Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J.M., Zamora, F., 2010.** Comparison of methods for estimating phenolic maturity in grapes: Correlation between predicted and obtained parameters. *Analytica Chimica Acta*, 660, 127–133.
- Labarbe, B., 2000.** Le potentiel polyphénolique de la grappe de *Vitis vinifera* var. Gamay noir et son devenir en vinification beaujolaise. *Thèse de doctorat*. Montpellier, France: ENSA-M, UMI, UMII.
- Lafka, T.I., Sinanoglou, V., & Lazos, E. S., 2007.** On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 104, 1206-1214.
- Lamandon, F., 1995.** Protocole pour l'évaluation de la richesse poly phénolique de raisins. *Revue des œnologues*, 76, 37-39.
- Lanaridis, P., Bena-Tzourou, I., 1997.** *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 31, 205.
- Lapornik, B., Prošek, M., & Wondra, A.G., 2005.** Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214-222.
- Larwence, A., 1991.** Feed value of grape marc. VI. Extraction, fractionation, and quantification of condensed tannins. *Chemical Abstracts*, 116, 20017.

Le Bourvellec, C., Bouchet, B. & Renard, C.M., 2005. Non-covalent Interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part II: Quantification and impact of cell wall drying. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1725, 1-9

Lebovka, N.I., Bazhal, M.I., & Vorobiev, E., 2002. Estimation of characteristic damage time of food materials in pulsed-electric fields. *Journal of Food Engineering*, 54, 337-346.

Lecas, M., 1994. Composition et structure des polymères constitutifs des parois cellulaires de la pellicule de la baie de raisin. Application d'enzymes fongiques liquéfiant les parois à fin d'extraction des substances colorantes., Thèse de doctorat. Grenoble: Université Joseph Fourier - Grenoble I.

Le Traon-Masson, M.P., & Pellerin, P., 1998. Purification and characterization of two β -D-glucosidases from an *Aspergillus niger* enzyme preparation : affinity and specificity toward glucosylated compounds characteristic of the processing of fruits. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 374-382.

Levadoux, L., 1951. La sélection et l'hybridation chez la vigne, Ann. Ec. Ntl. Agri. Montpellier, pp. 9-195.

Liazid, A., Guerrero, Cantos, E., Palma, M., & Barroso, C.G., 2011. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food chemistry*, 124, 1238-1243.

Liorach, R., Tomas-Barberan, F.A., & Ferreres, F., 2004. Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5109-5116.

Li, S.Q., Zhang, Q.H., Tony, Z.J., Turek, E.J., Lau, M.H., 2005. Elimination of *Lactobacillus plantarum* and achievement of shelf stable model salad dressing by pilot scale pulsed electric fields combined with mild heat. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 125-133.

Loginova, K.V., Shynkaryk, M.V., Lebovka, N.I., Vorobiev, E., 2009. Acceleration of soluble matter extraction from chicory with pulsed electric fields. *J. Food Engine*, 96, 374-379.

López, N., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I. & Raso, I., 2008a. Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9, 477-482.

López, N., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I. & Raso, J., 2008b. Application of Pulsed electric fields for improving the maceration process during the vinification of red wine: influence of grape variety. *European Food Research and Technology*, 227, 1099-1107.

Lopez N., Puertolas E., Hernandez-Orte P., Alvarez, I., & Raso, J., 2009. Effect of a pulsed electric fields treatment on the anthocyanins composition and other quality parameters of Cabernet Sauvignon freshly fermented model wines obtained after different maceration times. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 1225-1231.

Lu, Y., & Yeap Foo, L., 1999. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chemistry*, 65, 1-8.

Macheix, J.J., Fleuriet, A., & Sarni-Manchado, P., 2006. Composés phénoliques dans la plante-Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Eds. Sarni-Manchado et Cheynier V., *Les polyphénols en agroalimentaire*. Lavoisier.

Mafart, P., & Beliard, E., 1992. Génie Industriel Alimentaire, tome II. Lavoisier.

Mane, C., 2007. Phénomènes oxydants et composés phénoliques dans les vins blancs de champagne : développements méthodologiques pour l'analyse des polymères. Thèse de doctorat. Montpellier: Supagro.

Marfak, A., 2003. Thèse : Radiolyse gamma des Flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : Formation de despides, Université de Limoges.

Marteau, G., 1972. L'emploi des enzymes en oenologie. *Annales de Technologie Agricole*, 21, 567-587.

Masuzawa, N., Ohdaira, E., & Ide, M., 2000. Effects of ultrasonic irradiation on phenolic compounds in wine. *Japanese Journal of Applied Physics*, 39, 2978-2979.

Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M. & Velasco, R., 2006. Metabolite Profiling of Grape: Flavonols and Anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7692 - 7702.

Mello, L.D., Taboada, Sotomayor, M.D.P., & Tatsuo, Kubota, L., 2003. HRP-based amperometric biosensor for the polyphenols determination in vegetables extract, *Sensors and Actuators B*, 96, 636-645.

Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B., 2005. Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle. I. Anthocyanins and pyranoanthocyanins. *Eur. Food Res. Tech.*, 220, 607-614.

Monagas, M., Garrido, I., Bartolome, B. & Gomez-Cordoves, C., 2006. Chemical characterization of commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. *Analytica Chimica Acta*, 463, 401-410.

Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T., & Vasconcelos, I., 2005. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *International journal of food microbiology*, 103, 285-294.

Morlat, R., 1989. Le terroir viticole: contribution à l'étude de sa caractérisation et de son influence sur les vins. Application aux vignobles rouges de la moyenne vallée de la Loire. *Thèse de Doctorat d'Etat*, 289 p. + annexes, Université Bordeaux II.

Moutounet, M., & Escudier, J.L., 2000. Pré-traitements des raisins sous-vide, incidence sur la qualite du vin. *Bul OIV*, 827-828.

Moire, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J.M., Sineiro, J., & Dominguez, H., 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food chemistry*, 72, 145-171.

Naugol'nyh, K., & Roï, N., 1971. Décharges électriques dans l'eau, Editions « Nauka », Moscou, 130 pages (en Russe).

Neumann, E., Sprafke, A., Boldt, E., & Wolf, H., 1992. Biophysical considerations of membrane electroporation. *Guide to electroporation and electrofusion*. Academic Press, New York.

Norman, R., 1992. The great domains of Burgundy. London: Kyle Cathie Ltd.

Novak, I., Janeiro, P., Seruga, M., & Oliveira-Brett, A., 2008. Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*, 630, 107-115.

Nurgel, C., & Canbas, A., 1998. Production of tartaric acid from pomace of some Anatolian grape cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 95-99.

OIV, 2011, <http://www.oiv.int/oiv/info/frassemblee2011>

Palomino, O., Gomez-Serranillos, M.P., Slowing, K., Carretero, E., & Villar, A., 2000. Study of polyphenols in grape berries by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 870, 449-451.

Palma, M., & Taylor, L.T., 1999. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *Journal of Chromatography A*, 849, 117-124.

Paniwnyk, L., Beaufoy, E., Lorimer, J.P., & Mason, T.J., 2001. The extraction of rutin from flower buds of *sophora japonica*. *Ultrason Sonochem*, 8, 299-301.

Papadopoulou, C., Soulti, K., & Roussis, I.G., 2005. Potential Antimicrobial Activity of Red and White Wine Phenolic Extracts against Strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technol. Biotechnol.*, 43, 41- 46.

Praporscic, I., Lebovka, N., Vorobiev, E., & Mietton-Peuchot, M., 2007. Pulsed electric field enhanced expression and juice quality of white grapes. *Sep. and Pur. Tech.*, 52, 520–526.

Pardo, F., Salinas, M.R., Alonso, G.L., Navarro, G., & Huerta, M.D., 1999. Effect of diverse enzyme preparations on the extraction and evolution of phenolic compounds in red wines. *Food Chemistry*, 67, 135-142.

Parenti, A., Spugnoli, P., Calamai, L., Ferrari, S., & Gori, C., 2004. Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovese grape. *European Food Research and Technology*, 218, 360-366.

Parley, A., 1997. The effect of pre-fermentation enzyme maceration on extraction and colour stability in pinot noir wine. Thèse de doctorat: Lincoln University.

Peer, W.A., Brown, D.E., Tague, B.W., Muday, G.K., Taiz, L., & Murphy, A. S., 2001. Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 126, 536-548.

Pekic, B., Kovac, V., Alonso, E., & Revilla, E., 1998. Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. *Food Chem.*, 61, 201-206.

Pérez-Magariño, S., & González-San, José, L., 2005. Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade, *Food chemistry*.

Pérez-Serradilla, J.A., & Luque de Castro, M.D., 2011. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chemistry*, 124, 1652–1659.

Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valente, P., Andrade, P.B., Ferreira, I.C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., & Estevinho, L., 2007. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 2287-2295.

Perret, C., 2001. Thèse : Analyse des tanins inhibiteurs de la stilbène, oxydase produite par *Botrytis cinerea*, Université de Neuchâtel, Faculté des sciences.

Peynaud, E., 1983. Procédés de stabilisation des vins. In : Peynaud E. Connaissance et travail du vin. Dunod. Paris, 285-318.

Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., & Nunez, M. J., 2005. Effect of Solvent, Temperature, and Solvent-to-Solid Ratio on the Total Phenolic Content and Antiradical Activity of Extracts from Different Components of Grape Pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2111-2117.

Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A.S., 2006. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Technol.*, 17, 579–590.

Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M., 1994. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36, 781-784.

Puertolas, E., López, N., Condon, S., Raso, J., & Álvarez, I., 2009. Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage of yeasts and bacteria. *Int. J. of Food Microbiology*, 130, 49-55.

Puertolas, E., López, N., Saldaña, G., Álvarez, I., & Raso, J., 2010a. Modelling phenolic extraction during fermentation of red grapes treated by pulsed electric fields at pilot-plant scale. *Journal of Food Engineering*, 98, 120-125.

Puertolas, E., Hernandez-Orte, P., Saldaña, G., Álvarez, I., & Raso, J., 2010 b. Improvement of winemaking processing using pulsed electric fields at pilot scale. Evolution of chromatic parameters and phenolic content of Cabernet Sauvignon red wine. *Food research International*, 43, 761-766.

Puértolas, E., Saldaña, G., Condón, S., Álvarez, I. & Raso, J., 2010c. Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. *Food Chemistry*, 119, 1063-1070.

Puértolas, E., Saldaña, G., Álvarez, I. & Raso, J., 2010 d. Effect of pulsed electric fields processing on red wine chromatic and phenolic characteristics during aging in oak barrels. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 58, 2351-2357.

Puértolas, E., López, N., Condón, S., Álvarez, I. & Raso, J., 2010 e. Potential applications of PEF to improve red wine quality. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 247-255.

Puértolas, E., López, N., Saldaña, G., Álvarez, I., & Raso, J., 2010 f. Evaluation of phenolic extraction during fermentation of red grapes treated by a continuous pulsed electric fields process at pilot-plant scale. *J. Food Eng.*, 98, 120-125.

Raso, J., Alvarez, I., Condon, S., Trepas, F.J.S., 2000. Predicting inactivation of Salmonella senftenberg by pulsed electric fields. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*, 1, 21-29.

Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E., & Bouharmont, J., 2003. Biologie végétale. Traduction de la 6ème édition par Jules Bouharmont avec la collaboration scientifique de Charles-Marie Evrad.

Reid, D.S., 1997. Overview of physical/chemical aspects of freezing. In: M.C. Erickson and C. Y-Hung, Editors, *Quality in frozen food*, Chapman & Hall, New York, 10.28.

Reitler, W., 1990. Conductive heating of foods, Technical University of Munich: Munich, Germany.

Remy, S., 1999. Thèse : Les tannins du vin rouge: caractérisation de structures natives et dérivées, INRA (Montpellier).

Renard, C.M., Voragen, A.G.J., Schols, H.A., Searle-Van Leeuwen, M.J.F., Thibault, J.F., & Pilnik, W., 1989. Apple protopectin: preliminary study of enzymatic extraction. *Food science : basic research for technological progress*, Wageningen Pays Bas.

Retali, E., 2004. Macération préfermentaire à froid : application à une vendange de nielluccio. *Revue Française d'Oenologie* - novembre/décembre - N° 209.

Revilla, I., & Gonzalez-SanJose, M. L., 2002. Multivariate evaluation of changes induced in red wine characteristics by the use of-extracting agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4525-4530.

Revilla, I., & Gonzalez-San, Jose, M. L., 2003. Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 29-36.

Revilla, E., Ryan, J.M., & Martin-Ortega, G., 1998. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4592-4597.

Ribéreau-Gayon, P., 1965. Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de *V. vinifera*. *CR Acad Sci*, pp. 341-343.

Ribéreau-Gayon, P., 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris.

Ribéreau-Gayon, P., 1982. The anthocyanins of grapes and wines. In: P. Markakis, *Anthocyanins as food colors* (pp. 209-244). New York: Academic Press.

Ribéreau-Gayon, J., Dubourdiou, D., Domèche, B., & Lonvaud, A., 2004. « Traité d'œnologie- Tome 1 Microbiologie du vin Vinification », Edition Dunod, Paris.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdiou, D., 1998. Tome 2, Chimie du vin, Stabilisation et traitement. Paris : Dunod

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. & Dubourdiou, D., 1999. Handbook of Enology, Vol 2. The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments. Chichester: John Wiley & Sons.

Ribéreau-Gayon, P., & Milhé, J.C., 1970. Reserches technologiques sur les composés phénoliques des vin rouges I. Influence des différentes parties de la grappe. *Conn. Vigne Vin*, 4, 63-74.

Ribéreau-Gayon, P., & Stonestreet, E., 1965. Dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull.Soc.Chim.*, 9, 2649-2652.

Ribéreau-Gayon, P., 2004. Traité d'œnologie, 5ème édition, Dunod, 2, 179-234.

Robert, D., & Vian, B., 1994. Eléments de biologie cellulaire (pages : 428). Paris France : Doin Editions.

Rodriguez-Delgado, M.A., Malovana, S., Perez, J.P., Borges, T., & Garcia Montelongo, F.J., 2001. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, 912, 249-257.

Rodríguez Vaquero, M.J., Alberto, M.R., & Manca de Nadra, M.C., 2007. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 587-593.

Roediger, A., 2006. Phenolic ripeness in south Africa.

Romdhane, M., & Gourdon, C., 2002. Investigation in solid-liquid extraction : influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal*, 87, 11-19.

Romero-Cascales, I., Fernández-Fernández, J.I., López-Roca, J.M., & Gómez-Plaza, E., 2005. The maceration process during winemaking extraction of anthocyanins from grape skins into wine. *European Food Research and Technology*, 221, 163-167.

Ratoarinoro, C.F., Wilhelm, A.M., Berlan, J., & Delmas, H., 1995. Power measurement in sonochemistry. *Ultrason. Sonochem.*, 2 , 43-47.

Roussillon, J., 2001. La grappe d.Autan, Bulletin d'information de la Station Régionale ITV Midi-Pyrénées, n°34.

Sacchi, K.L., Bisson, L.F., & Adams, D., 2005. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 197-206.

Saint-Cricq, N., Vivas, N., & Glories, Y., 1998. Maturité phénolique: définition et controle. *Revue Française d'Oenologie*, 173, 22-25.

Salinas, M.R., Garijo, J., Pardo, F., Zalacain, A., & Alonso, G.L., 2003. Color, polyphenol, and aroma compounds in rose wines after prefermentative maceration and enzymatic treatments. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 195-202.

Santiago, B., Ferrer, J., de Colmenares, N., & Paez, G., 1993. Possible industrial uses for grape pomace. *Chemical Abstracts*, 122, 159-187.

Santos, H.M., Lodeiro, C., & Capelo-Martinez, J.L., 2009. The Power of Ultrasound. Ultrasound in chemistry : Analytical Applications. Edited by José-Luis Capelo-Martinez, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Sarni-Manchado, P., & Cheynier, V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Londres, Paris, New York: Tec & Doc, Lavoisier.

Saura-Calixto, F., 1998. Antioxydant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4303-4306.

Saucier, C., 1990. Maturité phénolique Méthode Glories, Faculté d' OEnologie de Bordeaux.

Schieber, A., Stintzing, F.C., & Carle, R., 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 401-413.

Schwartzberg, H.G., & Chao, R.Y., 1982. Solute diffusivities in leaching processes. *Food Techno.*, 36, 73-86.

Segade, S., Rolle, L., Gerbi, V., & Orriols, I., 2008. Phenolic ripeness assessment of grape skin by texture analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 599-607.

Serra, A.T., Matias, A. A., Nunes, A.V.M., Leitão, M.C., Brito, D., Bronze, R., Silva, S., Pires, A., Crespo, M.T., San Romão, M.V., & Duarte, C.M., 2008. In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 311-319.

Shechter, E., 1997. Biochimie et biophysique des membranes (pages : 481), Paris : Dunod

Shynkaryk, M.V., Lebovka, N.I., Lanoisellé, J.-L., Nonus, M., Bedel-Clotour, C., Vorobiev, E., 2009. Electrically-assisted extraction of bio-products using high pressure disruption of yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*). *J. Food Eng.*, 92, 189-195.

Sigler, J., Schultheiss, C., Kern, M., 2005. Maischeporation-ein neuer Weg der Weinbereitung. *Schweiz. Z. Obst-Weinbau*, 14-16.

Silva, M.L., Macedo, A.C., & Malcata, F.X., 2000. Steam distilled spirits from fermented grape pomace. *Food Science and Technology International*, 6, 285-300.

Singleton, V.L., & Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.*, 16: 144-158.

Smain, C., Ahcène, L., Hamid, A., Paul, V.B., & Farid, C., 2004. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 188-195.

Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D.M., 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81, 200-208.

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

Somers, T.C., & Evans, M.E., 1976. Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, "Chemical Age". *Journal Sci. Food. Agric*, 28, 279-287.

Somers, T.C., & Ziemelis, G., 1985. Flavonol haze in white wines. *Vitis*, 24, 43-50.

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

Souquet, J.M., Cheynier, V., & Moutounet, M., 1998. Phenolic composition of grape stems. In: XIX^{èmes} journées internationales d'études des polyphénols. Lille, France.

Souquet, J.M., Labarbe, B., Le Guerneve, C., Cheynier, V., & Moutounet, M., 2000. Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1076-1080.

Souquet, J.M., Veran, F., Mané, C., & Cheynier V., 2006. Optimization of extraction conditions for analyzing flavonoids from the different parts of grape cluster. Application to six varieties. In: X. I. C. o. Polyphenols. Winnipeg.

Stredansky, M., & Conti, E., 1999. Xanthan production by solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 34, 581-587

Surgiarto, A.T., & Sato, M., 2001. Pulsed plasma processing of organic compounds in aqueous solution. *Thin Solid Films*, 386, 295-299.

Sun, B.S., Spanger, M.I., Roque-Do-Vale, F., Leandro, M.C., & Belchior, A.P., 2001. Effect of different winemaking technology on phenolic composition in Tinta Miuda red wines. *J. Agri Food Chem.*, 49, 5809-5816

Suslick, K.S., 1998. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4e éd. J. Wiley & Sons: New York, 26, 517-541.

Teissedre, P.L., Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Peleg, H., & German, J.B., 1996. Inhibition of *in vitro* human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70, 55-61.

Tesic, D., Woolley, D.J., Hewett, E.W., & Martin, D.J., 2002. Environmental effect on cv Cabernet Sauvignon (*Vitis Vinifera* L.) grown in Hawkes Bay, New Zealand. 1. Phenology and characterization of viticultural environments. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 8, 15–26.

Tobazéon, R., 1997. Préclaquage et claquage des liquides diélectriques. Techniques de l'Ingénieur, *traité Génie électrique*, D 2450.

Toepfl, S., 2006. Pulsed Electric Fields (PEF) for Permeabilization of Cell Membranes in Food- and Bioprocessing – Applications, Process and Equipment Design and Cost Analysis. Technischen Universität Berlin, Berlin, Germany.

Touya, G., 2005. Contribution à l'étude expérimentale des décharges électriques dans l'eau et des ondes de pression associées. Réalisation d'un prototype industriel 100kJ pour le traitement de déchets par puissances électriques pulsées. Thèse de Doctorat de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, Adour, France.

Turk, M., 2010. Vers une amélioration du procédé industriel d'extraction des fractions solubles de pomme à l'aide de technologies électriques. Thèse de Doctorat de l'Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France.

Vacquié, S., 1995, Arc électrique. Techniques de l'Ingénieur, *traité Génie électrique*, D 2870.

Vallée D., Bagard A., Salva G., Uscidda N., Bourde L., Lavergne C., Serpentine M.J. & Albertini M., 1997. Influence des macérations à chaud (pré et post-fermentaires) sur la qualité des vins rouges de Siccacorellu.C.I.V.A.M. DE LA Région Corse.

Van Leeuwen, C., Friant, Ph., Chone, X., Tregoeat, O., Koundouras, S., & Dubourdieu, D., 2004. The influence of climate, soil and cultivar on terroir. *Am. J. Enol. Vitic.*, 55, 207-217

Villettaz, J.C., Dubourdieu, D., & Lefebvre, A., 1982. L'emploi des β -glucanases en oenologie. In: P. Dupuy, Utilisation des enzymes en technologie alimentaire (pp. 457-462). Paris: Lavoisier.

Villettaz, J.C., 1996. Utilisation des enzymes en oenologie pour l'extraction de la couleur et pour l'extraction et la révélation des arômes. Bulletin de l'OIV, 69, 844-860.

Vinatoru, M., Toma, M., & Mason, T.J., 1999. Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from plants and the constituents. *Advances in Sonochemistry*. 5, 216.

Vinsonneau, E., Escaffre, P., Crachereau, J.C., & Praud, S., 2006. Evaluation du procédé de vinification par "Flash détente" dans le bordelais. ITV France Bordeaux-Blanquefort. Chambre d'Agriculture de la Gironde Service Vigne & vin.

Vishkvaztzev, L.I., Kurtez, B.I., Labanova, G.L., Filatov, G.P., & Barskaya, A.V., 1998. Use of electrical discharges for the treatment of soya beans, *Vestnik Rossiyskoy Akademii Selskohnoyaistvennih Nauk*, 6, 71-72 (en Russe).

Visser, J., & Voragen, A.G., 1995. Complex pectins. Structure elucidation using enzymes. In: Elsevier, Pectins and Pectinases. *Progress in biotechnology*, 14, 13-19. Wageningen.

Vivas, N., St-Cricq de Gaulejac, N., Demptos, T., & Glories, Y., 1998. Maturation phénolique des raisins rouges Relation avec la qualité des vins Comparaison des cépages Merlot et Tempranillo, Faculté d'oenologie de Bordeaux II.

Vivas, N., Vivas De Gaulejac, N., & Nonier, M.F., 2003. Estimation and quantification of wine phenolic compounds. *Bulletin De L'O.I.V.*, 16, 282 - 303.

Vorwerk, S., Somerville, S., & Somerville, C., 2004. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 9, 203-209.

Vorobiev, E., & Lebovka, N.I., 2006. Extraction of intercellular components by pulsed electric fields. In Raso, J., Heinz, V. (Eds.), *Pulsed electric field technology for the food industry: fundamentals and applications*, pp 153-194. Springer Publishing Inc, New York, USA

Vorobiev, E., & Lebovka, N.I., 2008. Pulsed electric fields induced effects in plant tissues: fundamental aspects and perspectives of applications. In: Vorobiev, E., Lebovka, N.I. (Eds.), *Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials*, pp 39-82. Springer Publishing Inc, New York, USA.

Wang, L., & Weller, C.L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Techno.*, 17, 300-312.

Waterhouse, A.L., & Lamuela-Raventos, R.M., 1994. The occurrence of piceid, a stilbene glucoside in grape berries. *Phytochemistry*, 37, 571-573.

Wightman, J.D., Price, S.F., Watson, B.T., & Wrolstad, R.E., 1997. Some effects of processing enzymes on anthocyanins and phenolics in Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 39-48.

Wijngaard, H., Hossain, M.B., Rai, D.K., & Brunton, N., (Article in press, 2011). Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International*.

Wouters, P.C., & Smelt, J.P.P.M., 1997. Inactivation of microorganisms with pulsed electric fields: Potential for food preservation. *Food Biotechnology*, 11, 193-229.

Wu, J., Tung, Y., Wang, S., Shyur, L., Kuo, Y., Chang, H., 2005. Phenolic Antioxidants from the Heartwood of *Acacia confuse*. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 5917 -5921.

Xu, C., Zhang, Y., Cao, L., & Lu, J., 2010. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry*, 119, 1557-1565.

Yang, J., Martinson, T.E., & Liu, R.H., 2009. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, 116, 332- 339.

Yilmaz, Y., & R.T. Toledo, 2006. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 41-44.

Zagorulko, A., 1957. Influence of thermal plasmolysis and selective electroplasmolysis on cell membrane structure and sugarbeet tissue permeability. *Sakhar. Prom.*, 11, 67–70. in Russian.

Zagorulko, A., 1958. Technological parameters of beet desugaring by the selective electroplasmolysis. In: *New Physical Methods of Food Processing*. Izdatelstvo GosINTI, Moscow, 1, 21-27. in Russian.

Zimmermann, U., Pilwat, G., & Riemann, F., 1986. Electrical breakdown, electropermeabilization and electrocution. *Revue on physiology, biochemistry and pharmacology*, 105, 176-250.

Zuckerman, H., Krasik, Y.E., & Felsteiner, J., 2002. Inactivation of microorganisms using pulsed high-current underwater discharges. *Innovative Food Science Emerging technologies*, 3, 329-336.

Liste des publications

Publications dans des revues internationales avec comité de lecture :

- Nada El Darra, Nabil Grimi, Eugène Vorobiev, Nicolas Louka, Richard G.Maroun, 2012. Pulsed ohmic heating assisted polyphenols extraction from red grape pomace. *Food and Bioprocess Technologies*, 10.1007/s11947-012-0869-7
- Nada El Darra, Joanna Tannous, Paulette Bou Mouncef , Eugène Vorobiev, Nicolas Louka, Richard G.Maroun, 2012. A Comparative Study on Antiradical and Antimicrobial Properties of Red Grapes Extracts Obtained from Different *Vitis vinifera* Varieties. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 1420-1432.
- Nada El Darra, Nabil Grimi, Richard G.Maroun, Nicolas Louka, Eugène Vorobiev, 2012. Pulsed electric field, ultrasound and thermal pretreatments for better phenolic extraction during red fermentation". *European Food Research and Technology*, 10.1007/s00217-012-1858-9.
- Nada El Darra, Nabil Grimi, Eugène Vorobiev, Richard G.Maroun, Nicolas Louka. Pulsed Electric Field-Assisted Cold Maceration of Cabernet Franc and Cabernet Sauvignon Grapes, *accepted in "American Journal of Enology and Viticulture"*.
- Nada El Darra, Marie-Agnès Ducasse, Mohammad F.Turk, Nabil Grimi, Richard G.Maroun, Nicolas Louka, Rémi Guérin-Schneider, Eugène Vorobiev. Pulsed electric field, enzymatic and thermovinified pretreatments for enhancing the phenolic extraction during red fermentation, submitted in "*Food chemistry*".
- Nada El Darra, Nabil Grimi, Mohammad F.Turk, Nicolas Louka, Richard G.Maroun, Eugène Vorobiev, Effect of PEF-treating the must prior or during the cold maceration on the phenolic extraction of the red wine elaborated , "article en cours de soumission".

Conférences internationales:

- Nada EL DARRA, Nabil GRIMI, Eugène VOROBIEV, Nicolas LOUKA, Richard MAROUN, 2011. Intensification de l'extraction des composés phénoliques pendant la macération pré-fermentaire à froid des raisins rouges. Congrès National SFGP XIIIème, Lille, FRANCE.
- Nada EL DARRA, Nabil GRIMI, Eugène VOROBIEV, Nicolas LOUKA, Richard MAROUN, 2011. Effect Of Pulsed Ohmic Heating On The Extraction Of Phenolic Compounds From Grape Pomace, 6e Congrès international du CIGR, Nanthes, FRANCE .
- Nada El Darra, Marie-Agnès Ducasse, Mohammad F.Turk, Nabil Grimi, Richard G.Maroun, Nicolas Louka, Rémi Guérin-Schneider, Eugène Vorobiev, 2012. Pulsed electric field, enzymatic and thermovinified pretreatments for enhancing the phenolic extraction during red fermentation, Macrowine, Macrovision of viticulture, wine-making and markets, Bordeaux.

- Nada El Darra, Nabil Grimi, Richard G.Maroun, Nicolas Louka, Eugène Vorobiev, 2012. Comparison of the ultrasound, pulsed electric field and thermal pretreatments prior to red fermentation, BFE, International Conference Bio & Food Electrotechnologies, Italy.
- Nada El Darra, Nabil Grimi, Nicolas Louka, Richard G.Maroun, Eugène Vorobiev, 2012. Effects of Pulsed Electric Field on prefermentative cold maceration of Cabernet Franc Grapes, BFE, International Conference Bio & Food Electrotechnologies, Italy.
- C.Delsart, N.Darra, N.Grimi, M;A Silva, R.Ghidossi, E.Vorobiev, P;L;Teissedre, and M,Mietton-Peuchot, 2011. Effect of pulsed electric fields on the grape as an extraction process in red winemaking, Congrès “Fruit and Veg Processing” , Avignon, FRANCE.

Annexes

Annexe 1 : Les méthodes Glories et ITV

i) La méthode Glories (Saint-Cricq, 1998 ; Glories, 1993):

Cette méthode a été développée par Glories à Bordeaux en 1990, et est maintenant acceptée comme étant la méthode la plus utilisée mondialement pour évaluer le contenu phénolique des raisins. De plus, elle permet de déterminer la qualité des composés phénoliques et leur disponibilité en vinification. Elle consiste à estimer les différentes fractions de composés phénoliques du raisin (anthocyanes des pellicules totales et extractibles, tanins des pellicules et des pépins). Le principe de la méthode repose sur la différence d'extraction des composés phénoliques des raisins à deux pH différents après broyage des baies :

- D'une part à pH3.2, pH proche de celui des raisins prélevés, ce qui permet d'accéder aux composés phénoliques facilement extractibles
- D'autre part, à pH1, pH acide qui entrave la dégradation des cellules de la pellicule et favorise ainsi l'extraction des anthocyanes (Gervais *et al.*, 2005).

Cette méthode fournit les résultats suivants :

ApH1 : le "potentiel total en anthocyanes" qui permet de positionner le potentiel qualitatif de la vendange. Il correspond à la concentration en anthocyanes de la solution à pH1, soit la totalité des anthocyanes présents dans les raisins, dosée par décoloration au bisulfite exprimé en mg/l de jus de raisin. C'est le premier indice de maturité phénolique, issue des « Indices de Glories », qui a été mis au point pour caractériser les raisins rouges. Plus cette valeur est élevée, plus le raisin est susceptible de céder d'anthocyanes et donc plus le vin sera coloré. En fait, c'est l'indicateur le plus important pour fixer la date de vendange : la maturité phénolique est optimale 8 à 10 jours après le maximum d'anthocyanes totales. L'accumulation des anthocyanes dans la peau commence à véraison et à un maximum autour de la récolte (Fournand *et al.*, 2006). Les anthocyanes sont progressivement accumulés dans la peau tout au long de la maturité des baies de raisin. L'extraction des anthocyanes de la peau de raisin dans le vin ne dépend pas seulement de la concentration en anthocyanes du raisin, mais aussi de la tendance de la peau à les relarguer, comme une conséquence de la dégradation de la paroi cellulaire par des enzymes pectolytiques. Par conséquent, la concentration des anthocyanes dans le raisin et leur facilité d'extraction sont les principaux facteurs qui influencent leurs concentrations finales dans le vin (Segade *et al.*, 2008).

La concentration en anthocyanes est évaluée par décoloration au bisulfite. Le dosage des anthocyanes des filtrats du jus de raisin et du vin s'effectue en utilisant deux propriétés dues à leurs structures :

- La modification de leurs couleurs en fonction du pH
- La transformation en dérivés incolores sous l'action de certains réactifs comme les ions bisulfite. Le chercheur Jur (1967) a montré que ce phénomène était dû à l'existence d'une réaction entre le cation flavylum et l'hydrogénosulfite HSO_3 . Cette réaction est équilibrée et conduit à la formation d'un produit d'addition incolore et plus ou moins stable selon le pigment. Cette méthode suppose que les autres composés phénoliques n'interfèrent pas sur le dosage. Ainsi, la variation de l'absorbance lue à 520 nm après addition d'ions bisulfite en excès, est proportionnelle à la teneur en anthocyanes (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1965).
- **A_{pH3.2}** : le "potentiel en anthocyanes facilement extractibles". C'est le contenu en anthocyanes à pH3.2 de 50g de baies broyées, dosé par décoloration au bisulfite exprimé en mg/l de jus de raisin.
- **La richesse phénolique** représente la somme de la contribution des anthocyanes et des tanins des pellicules et des pépins.
- **EA** : "l'extractibilité cellulaire", qui représente l'aptitude du raisin à libérer les anthocyanes. Elle indique quelle fraction de ce potentiel pourra se rencontrer dans les vins en vinification « classique ».
 - Plus E est faible, les anthocyanes sont facilement extractibles du raisin.
 - Plus E est élevé, moins les anthocyanes sont susceptibles de passer dans le vin, lors de la vinification.
- **PAE%** : représente le pourcentage d'Anthocyanes Extractibles.
- **Les tanins des pépins**, reflètent la maturité phénolique des pépins. Ils diminuent au cours de la maturation. Cette valeur permet de préciser le rôle joué par les pépins dans le contenu tannique du vin qui représente une indication très utile pour l'orientation de la vinification du raisin.
- **Les tanins des pellicules**, reflètent la maturité phénolique des pellicules.
- **Mp** : "la maturité phénolique des pépins ", qui peut être considérée comme le pourcentage de la contribution des pépins à la d280 de la solution à pH3.2. C'est le deuxième indice de maturité phénolique, issue des « Indices de Glories », qui a été

mis au point pour caractériser les raisins rouges. C'est l'indicateur le plus pertinent pour déterminer les conditions de la cuvaison. La diminution des tanins a été notée à partir de la fin de véraison à la maturité. Au cours de maturation, les parois cellulaires se dégradent par l'activation de l'hydrolyse des polysaccharides structuraux. La teneur en tanin a diminué en raison du catabolisme des tanins (Gagné *et al.*, 2006). Plus Mp est élevé, plus les tanins sont immatures. En effet, les tanins des pépins sont moins qualitatifs que ceux des pellicules ; en conséquence, plus Mp est faible, plus la proportion de tanins provenant des pellicules est forte et plus on peut pousser l'extraction au cours de la macération (Guérin *et al.*, 2005).

- **Estimation globale des composés phénoliques (d280) :** La mesure de l'absorption à 280 nm constitue une estimation globale des composés phénoliques des raisins. Le suivi de la richesse polyphénolique total, directement mesuré à 280 nm peut être divisé en trois parties: la première période a été caractérisée par une diminution des composés phénoliques totaux, suivie par une augmentation à la fin de véraison, et ensuite, la stabilisation a eu lieu à la maturité (Gagné *et al.*, 2006).

ii) La méthode ITV (Institut Technique de la Vigne – France): (Lamadon, 1995 ; Cayla, 2002)

Le but de cette méthode est de déterminer la quantité de composés phénoliques susceptible d'être extraite au cours de la vinification. Cette technique permet également de suivre la maturation de la vendange. En fait, la méthode ITV est utilisée pour suivre l'évolution des anthocyanes libres du raisin au cours de la maturation. Cette méthode est basée sur une micro-macération, en milieu hydroalcoolique acide, à température ambiante. Cette dernière « modélise » les phénomènes intervenant lors d'une vinification « standard ». Aussi, en quelques heures, la quantité totale des composés phénoliques est estimée, mais également leur capacité à être extraits des pellicules, ainsi que l'évolution de la maturité. Un suivi régulier de cette maturité phénolique, à raison d'un prélèvement par semaine, puis deux à l'approche de la récolte, permet de déterminer la phase optimale de maturité. Théoriquement, elle correspond au moment où les concentrations en anthocyanes dans les raisins chutent significativement après être passées par une valeur maximale (Roussillon *et al.*, 2001).

La détermination de la date de récolte appropriée à l'aide de la méthode ITV repose sur l'observation de l'évolution des teneurs en anthocyanes dans les raisins au cours de la

maturation. On considère que la maturité phénolique est atteinte au début de la phase de surmaturation des raisins, correspondant à une chute notable des concentrations en anthocyanes, après que celles-ci aient atteint un maximum. La construction d'une courbe représentant l'évolution des anthocyanes dans les raisins, en fonction du temps, facilite la visualisation de cette phase.

Il existe une bonne relation entre la concentration en anthocyanes des baies estimée par la méthode ITV, et celle que l'on retrouve dans le vin pour les dates de récolte précoce. Par contre, si l'on compare les dates de récolte correspondant d'une part au maximum d'accumulation en anthocyanes, et d'autre part à la phase de surmaturation, la corrélation entre raisins et vins n'est plus vérifiée. Ainsi, les vins élaborés avec les raisins récoltés en légère surmaturation, présentent des teneurs en anthocyanes supérieures à celles mesurées sur les vins issus de vendanges plus précoces, présentant un potentiel en anthocyanes le plus élevé. La dégustation des vins laisse apparaître l'intérêt que portent les dégustateurs aux vins issus des raisins récoltés à maturité phénolique optimale. Ces vins sont jugés comme présentant de jolis et intenses arômes de fruits, une bouche dense et bien équilibrée, et une couleur soutenue.

Enfin, la méthode ITV est complémentaire. Elle ne se substitue pas aux critères classiques de détermination de la maturité, elle se propose d'apporter une information complémentaire utile.

Annexe 2 : Les facteurs influençant la maturité phénolique

1- Influence de la température sur les teneurs en anthocyanes :

Le développement et l'accumulation des anthocyanes sont influencés par la température du vignoble. La formation des anthocyanes nécessite des températures faibles et il a été clairement

démonstré que les teneurs en anthocyanes peuvent être jusqu'à cinq fois plus élevées dans les raisins qui ont été cultivés à 20°C par rapport à ceux cultivés à 30°C. De plus, certaines publications ont cité qu'au-dessus de 35°C, il n'y a aucune augmentation des anthocyanes (Roediger, 2006). Lorrain *et al.*, 2011, ont prouvé qu'un climat plus chaud durant la maturation des raisins aboutira à un endommagement des peaux des raisins, améliorant l'extractibilité anthocyanique et phénolique. Carbonneau *et al.*, 1992 ont montré que l'accumulation des anthocyanes dans les pellicules est favorisée par des températures diurnes relativement élevées mais sans excès. En effet, le régime thermique en période de maturation du raisin est l'une des variables déterminantes de la coloration du raisin et de la richesse en arômes, anthocyanes et composés phénoliques des vins (Coombe, 1987; Jackson & Lombard, 1993). Au moment de la maturité, il y a besoin d'une température voisine de 30 degrés. Ces températures sont nécessaires pour diminuer l'acidité naturelle du raisin.

2- Les autres conditions climatiques :

L'eau semble être le facteur le plus influençant la quantité d'anthocyanes dans les raisins. Il a également été démontré que l'éclaircissage et la couverture ont un effet dramatique sur la maturité phénolique.

Certaines conditions géographiques ou climatiques gênent de même la maturité. La vitesse de maturation est en grande partie déterminée par le régime hydrique de la vigne (Van Leeuwen et Seguin, 1994). Une contrainte hydrique augmente la synthèse des composés phénoliques (Van Leeuwen et Seguin, 1994 ; Trégoat *et al.*, 2002). Des pluies abondantes diluent les constituants du grain; un mauvais ensoleillement associé à des températures insuffisantes ralentit la migration des sucres. Dans les deux cas, la vendange souffre alors d'une carence en sucre. Elle peut par ailleurs comporter un excès d'acidité si la chaleur a été insuffisante et n'a pas permis le processus naturel de destruction partielle des acides du fruit.

3- Effet du terroir et effet parcelle :

En viticulture, le climat, le sol et la conduite du vignoble (pratiques culturales) caractérisent un mot utilisé en France depuis plusieurs siècles : le terroir. L'utilisation du terme terroir est

acceptée pour considérer un site, un environnement et une origine géographique qui permettent l'obtention d'un produit de qualité organoleptique reconnue et inimitable. Le terroir est très variable d'une région géographique à l'autre, séparées de quelques kilomètres, ce qui permet d'avoir des produits très différents en termes de couleur, de saveur, d'arômes, et de consistance.

De plus le terroir joue un rôle indéniable sur la qualité du vin. Il réside dans la capacité avérée d'un espace géographique, d'un territoire, à « produire », grâce au savoir faire humain, un vin possédant un goût typique, apprécié d'un marché qui en reconnaît durablement la singularité et la valeur. La manifestation du terroir est donc le goût du vin lui-même, difficile sinon impossible à reproduire ailleurs (Cadot *et al.*, 2008).

Un des exemples de valorisation du terroir par l'œnologie est la détermination de la maturité phénolique des vendanges qui permet de préciser la date optimum de récolte des raisins rouges. L'effet parcelle est principalement souligné à travers les descripteurs des maturités phénoliques et « texturales ».

La richesse en anthocyanes totales et extractibles des baies est directement liée : au terroir, aux conditions climatiques du millésime et à l'état sanitaire. Leur synthèse varie en fonction des conditions climatiques. Elle peut être rapide en début de véraison ou au contraire, une forte concentration peut se produire à mi-maturité (Guerin *et al.*, 2005).

Annexe 3 : Les unités monomériques et les tanins condensés

➤ Les unités monomériques

Les formes monomériques des flavanols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C-2 et C-3, la présence de substituants galloylés, ainsi que par le niveau d'hydroxylation du noyau B (Figure I. Annexe 3, Tableau I. Annexe 3). On distingue ainsi les formes dihydroxylées (famille des catéchines) des formes trihydroxylées (famille des gallocatéchines). Ces dernières n'ont pas été identifiées dans le raisin sous leurs formes monomériques, mais leur présence dans les formes polymériques, notamment dans les pellicules et la pulpe de *Vitis vinifera*, suggère leur existence en tant que monomères (Souquet *et al.*, 1996, Mané *et al.*, 2007).

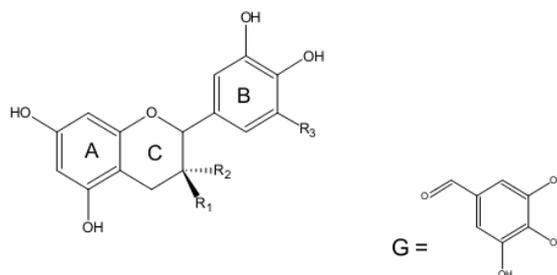


Figure I. Annexe 3 - Structure des unités monomériques constitutives des tanins condensés

Monomères	R ₁	R ₂	R ₃
<i>Catéchine</i>	H	OH	H
<i>Epicatéchine</i>	OH	H	H
<i>Epigallocatéchine</i>	OH	H	OH
<i>Epicatéchine gallate</i>	OG	H	H

Tableau I. Annexe 3- Nomenclature des principales unités constitutives des flavanols présents dans le raisin

➤ Les tanins condensés

Les tanins condensés du raisin sont des oligomères ou polymères de flavanols (Figure II. Annexe 3) qui ont la propriété de libérer des anthocyanidines en milieu acide, à chaud, par rupture de la liaison intermonomérique à partir des unités « du haut », c'est-à-dire substituées en C4 dans le polymère initial (Bate-Smith, 1954). Dans le raisin, on distingue deux types de proanthocyanidines suivant la nature de l'anthocyanidine libérée. D'une part, les procyanidines (polymères de catéchine et d'épicatéchine), qui libèrent de la

cyanidine, et d'autre part, les prodelphinidines (polymères de gallocatéchine et d'épigallocatéchine), qui libèrent de la delphinidine. Dans les tanins de pépins, seules les unités procyanidines sont présentes (Prieur *et al.*, 1994), alors que les tanins de pellicules et les rafles contiennent des unités procyanidines et prodelphinidines (Souquet *et al.*, 1996 ; Souquet *et al.*, 2000).

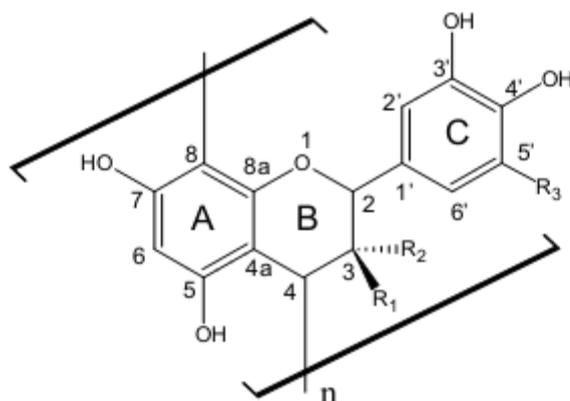
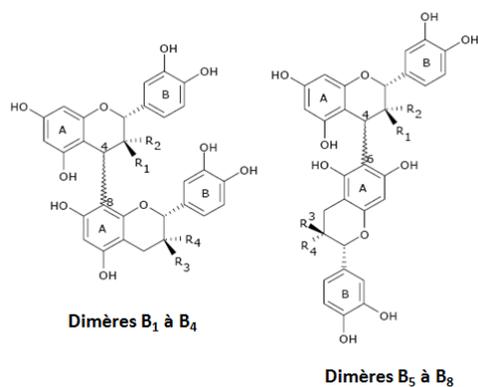


Figure II. Annexe 3 - Structure des tanins condensés

Outre la nature des unités constitutives, les tanins se différencient par le nombre d'unités, appelé degré de polymérisation, qui les constituent ainsi que par le type et la position des liaisons intermonomériques. Les proanthocyanidines de type B (Figure III. Annexe 3) se caractérisent par une liaison intermonomérique entre le carbone 4 (C4) de l'unité supérieure et le carbone 6 (C6) ou le carbone 8 (C8) de l'unité inférieure, de configuration trans par rapport à l'hydroxyle en position C3. Les proanthocyanidines de type A contiennent une liaison éther supplémentaire entre le carbone C2 et les hydroxyles 5 ou 7 du noyau A inférieur. Ces structures de type A ont déjà été identifiées dans le litchi par exemple (Boukharta *et al.*, 1988). Il est à noter que l'existence de proanthocyanidines de type A n'est pas confirmée dans le raisin mais seulement supposée à partir de caractéristiques chromatographiques (Glories *et al.* 1996).



Dimères	Noms	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
B ₁	Epicatechine-(4β→8)-catéchine	H	OH	OH	H
B ₂	Epicatechine-(4β→8)-épicatéchine	H	OH	H	OH
B ₃	Catéchine-(4α→8)-catéchine	OH	H	OH	H
B ₄	Catéchine-(4α→8)-épicatéchine	OH	H	H	OH
B ₅	Epicatechine-(4β→6)-épicatéchine	H	OH	H	OH
B ₆	Catéchine-(4α→6)-catéchine	OH	H	OH	H
B ₇	Epicatechine-(4β→6)-catéchine	H	OH	OH	H
B ₈	Catéchine-(4α→6)-épicatéchine	OH	H	H	OH

Figure III. Annexe 3 - Structure et nomenclatures des Proanthocyanidines dimères du type B (Ribéreau-Gayon P. *et al.*, 1998)

Annexe 4 : Lutte contre l'oxydation et Inhibition de microorganismes

Lutte contre l'oxydation :

L'oxydation est un phénomène irréversible. Il est généré par des radicaux libres, espèces chimiques neutres ou chargées instables qui ne cherchent qu'à récupérer un électron dans leur environnement pour retrouver un état plus stable. La capacité des composés phénoliques à être facilement oxydés conditionne leur stabilité et leur évolution dans les produits alimentaires. En effet, l'oxydation des composés phénoliques peut être responsable du brunissement des tissus. Ce phénomène apparaît souvent chez les fruits après les avoir découpés. C'est un phénomène qui s'autoalimente : une fois que la réaction est initiée, les réactions en chaîne se poursuivent, et ne s'arrêtent qu'une fois toute la matrice oxydée (Rolland, 2004).

Les réactions d'oxydation sont très importantes dans le métabolisme des organismes vivants. Cependant, un excès de ces réactions entraîne la formation des dérivés toxiques dont les fameux radicaux libres qui sont des espèces réactives vis-à-vis des constituants organiques et des structures cellulaires, ils s'attaquent aux molécules biologiques : les lipides, les protéines et même les acides nucléiques (Min *et al.*, 2008). Les principaux agents oxydants sont les espèces réactives de l'oxygène (O_2^- , $HO\cdot$, $NO\cdot$, H_2O_2), des enzymes (lipoxygénase, peroxydase), des ions métalliques (Cu, Fe) et les peroxydes lipidiques, qui concourent tous à la formation en chaîne de radicaux libres (Sarni & cheynier *et al.*, 2006). Les réactions d'oxydations peuvent être très dommageables car elles sont à l'origine de plusieurs types de cancer et de nombreuses autres pathologies (Kondrashov *et al.*, 2009).

Les phénomènes d'oxydation sont également redoutés en industrie agro-alimentaire. En effet, au niveau des lipides, les dégradations oxydantes conduisent à une perte en vitamines, une diminution de la valeur nutritionnelle (acides gras essentiels), une détérioration du goût (composés volatils à flaveur caractéristique, rancissement) et même parfois à l'apparition de substances toxiques (Gülçin *et al.*, 2010).

Seule l'intervention d'agents de terminaison comme des antioxydants peuvent avoir une influence et constituent un moyen de défense et de lutte contre le stress oxydant. La recherche incessante de nouveaux agents pharmaceutiques préconisés pour leur action antioxydante et antiradicalaire a mis la lumière sur les composés phénoliques qui sont parmi les meilleurs antioxydants exogènes et qui ont la propriété de contrecarrer les stress oxydatifs (Kallithraka *et al.*, 2005). En effet grâce à la mobilité de l'hydrogène phénolique, les composés phénoliques sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (cigarette,

polluants, infections, exposition au soleil, etc) qui sont à l'origine du vieillissement cellulaire et de la sénescence (Rolland, 2004). La perte d'un hydrogène engendre la formation d'un radical fortement stabilisé par mésomérie. C'est cette réactivité chimique qui confère aux composés phénoliques leur caractère antioxydant (Figure I. Annexe 4).

Le mécanisme global de cette réaction est schématisé dans la figure suivante :

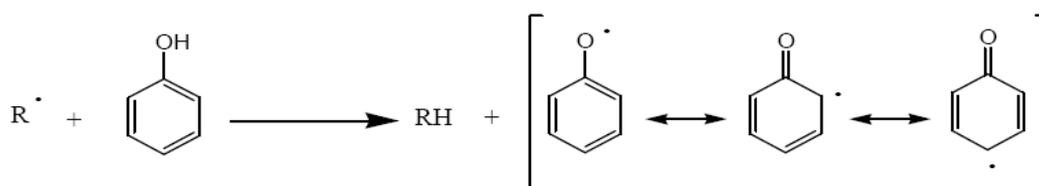


Figure I. Annexe 4 - Stabilisation du radical phénolique par mésomérie (Sarni & Cheynier *et al.*, 2006)

Les composés phénoliques peuvent aussi inhiber les oxydations de façon indirecte, en désactivant l'oxygène singulet, oxydant très puissant des acides gras insaturés, ou en chélatant les métaux de transition qui accélèrent fortement l'autoxydation des lipides. Certains enfin sont des inhibiteurs des enzymes d'oxydation (Sarni & Cheynier *et al.*, 2006). Les évidences s'accroissent en faveur des rôles antiradicalaires et antioxydants des composés phénoliques. Il a été signalé dans certaines références que cette activité dépend de la structure de chaque composé phénolique, en particulier du nombre et de la position des groupes hydroxyles et la nature des substitutions sur les cycles aromatiques (Balasundram *et al.*, 2006).

Dans l'industrie alimentaire, les composés phénoliques sont utilisés pour leur activité antioxydante, à faible concentration afin de prévenir contre la détérioration des aliments. A ce propos, en littérature plusieurs études ont souligné que beaucoup d'entre eux, grâce à leurs propriétés antioxydantes participeraient à la prévention de diverses maladies chroniques dans lesquelles un stress oxydant est potentiellement impliqué (Gülçin *et al.*, 2010).

Inhibition de microorganismes :

La qualité microbiologique des aliments constitue la base essentielle de leur aptitude à satisfaire aussi bien la sécurité des consommateurs que la conservation des aliments. Un

aliment, exposé à la détérioration par les bactéries, moisissures et levures peut voir diminuer ses caractéristiques sensorielles, nutritives et sanitaires.

Les maladies d'origine alimentaire se posent de plus en plus d'une manière sérieuse et avec acuité au vu d'un nombre considérable d'agents pathogènes présents dans les aliments (Karapinar *et al.*, 2007). C'est un fléau qui n'a pas été mis sous contrôle d'une façon adéquate malgré les diverses techniques de préservation valables (Rodríguez Vaquero *et al.*, 2007). L'émergence des agents pathogènes résistants isolés chez les humains et les animaux face aux additifs antimicrobiens alimentaires synthétiques conventionnels, combinée avec la prise de conscience croissante des consommateurs sur les substances chimiques utilisés comme conservateurs alimentaires, a nécessité des recherches pour trouver de nouvelles classes d'antimicrobiens naturels efficaces avec moins d'effets secondaires sur la santé humaine (Papadopoulou *et al.*, 2005).

L'utilisation de composés antimicrobiens naturels, extraits de plantes, dans la conservation des denrées alimentaires est aujourd'hui largement observé, ceci est notamment le cas des composés phénoliques végétaux, depuis que ces derniers interviennent largement dans les interactions entre plantes et microorganismes saprophytes à la suite de l'attaque de plantes par les agents pathogènes (Sarni & Cheynier *et al.*, 2006).

Les composés phénoliques attirent depuis peu l'attention de beaucoup d'industriels vu qu'il existe actuellement de nombreuses études qui ont prouvé que ces molécules présentes dans les extraits des végétaux peuvent affecter la croissance et le métabolisme de plusieurs microorganismes, il a été démontré qu'ils sont extrêmement actifs sur les souches bactériennes à noter: *Listeria monocytogenes* (Rodríguez Vaquero *et al.*, 2007), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (Papadopoulou *et al.*, 2005), *Salmonella poona*, *Bacillus cereus*, etc., ainsi que sur divers souches de levures comme *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*.

Annexe 5 : Protocole des méthodes effectuées à l'IFV

1-Quantification des polyphénols par Chromatographie liquide à haute performance

(CLHP)

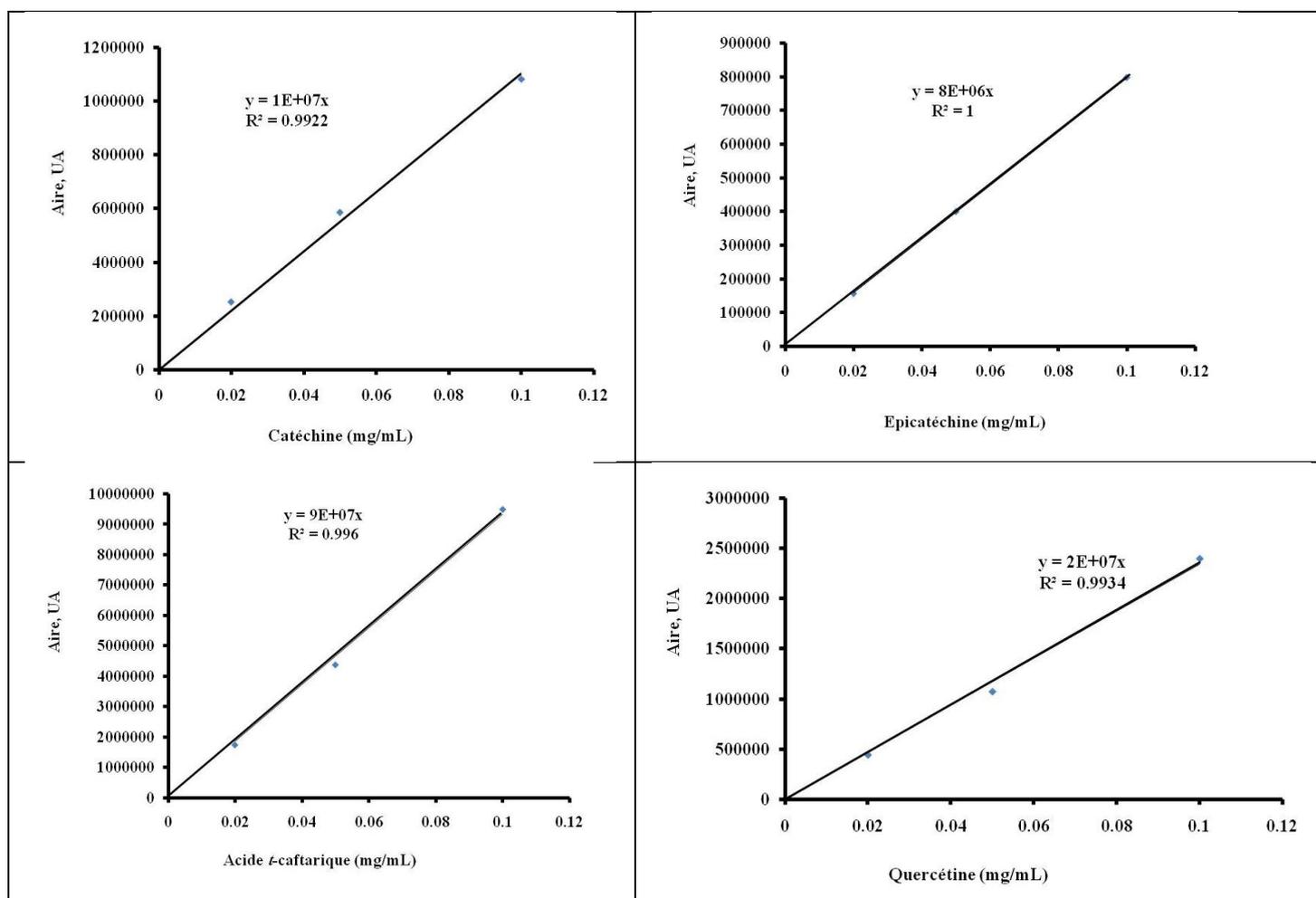
L'analyse des polyphénols a été réalisée par injection directe des vins sur un système de chromatographie liquide haute pression (CLHP) couplé à un détecteur à barrette de diode (DAD, Waters 996). Cette analyse CLHP a été effectuée au sein du laboratoire de l'IFV à Gruissansous l'encadrement de Dr. Ducasse. La chaîne CLHP est une chaîne Waters Alliance équipée d'un système de pompe 2690, d'un injecteur automatique et d'un four pour colonne. Le pilotage de la chaîne est géré par le logiciel Empower chromatography manager software (Waters, Milford, MA). La séparation des composés a été réalisée sur une colonne phase inverse Atlantis T3 (250 mm x 4.6 mm, particules de 5 µm) protégée par une pré-colonne (20 mm x 2,1 mm, particules de 5 µm) et d'un pré-filtre constitué d'une cartouche Securityguard™ C18 (Phenomenex, 4 mm x 2 mm). Le volume injecté est de 10 µL et le four est thermostaté à 30°C. Les solvants d'élution sont : le solvant A constitué d'eau/acide formique (95/5, v/v) et le solvant B constitué d'acétonitrile/eau/acide formique (80/15/5, v/v/v). Le gradient d'élution utilisé, avec un débit de 0,250 mL/min, est décrit dans le Tableau 1. Annexe 5. Il a été suivi d'un lavage et d'une rééquilibration aux conditions initiales de la colonne.

Temps (min)	Solvants	
	A (%)	B (%)
5	100	0
25	90	10
40	80	20
55	65	45
70	40	60
75	20	80

Tableau 1. Annexe 5. Gradient d'élution utilisé pour la séparation des composés phénoliques

La quantification des composés phénoliques se fait par intégration de l'aire sous les pics grâce aux courbes d'étalonnage des différents étalons. Les coefficients de réponse ont été déterminés suivant des composés de référence (Figure 1. Annexe 5):

- à 280 nm, la catéchine et l'épicatéchine sont exprimés en équivalent catéchine en mg/L
- à 320 nm, les acides phénols sont exprimés en équivalent acide *t*-caftarique (purifié au laboratoire) en mg/L.
- à 360 nm, les flavonols sont exprimés en équivalent quercétine (purifié au laboratoire) en mg/L
- à 520 nm, les anthocyanes sont exprimés en équivalent malvidine-3-Oglucoside (Extrasynthèse) (Genay, France) en mg/L.



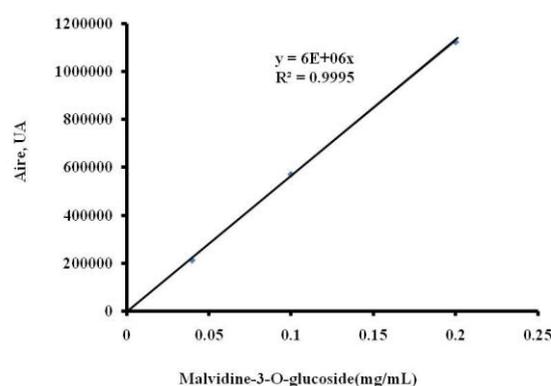


Figure 1. Annexe 5. Courbes d'étalonnage de la catéchine, de l'épicatéchine, de l'acide *t*-caftarique, la quercétine et la malvidine-3-O-glucoside pour la quantification par CLHP

2-Evaluation spectrophotométrique des composantes de la couleur des vins rouges

L'analyse de la couleur des moûts et des vins par spectrophotométrie UV-visible a été réalisée selon le protocole adapté de Labarbe (Labarbe, 2000) et (Atanasova et al., 2002). Les mesures d'absorbance ont été effectuées avec un spectrophotomètre SAFAS® UV (Monaco). Cette analyse de couleur a été effectuée au sein du laboratoire de l'IFV à Gruissan sous l'encadrement de Dr. Ducasse.

Le principe de la méthode consiste à centrifuger le vin (10 min à 13 000 g) avant les mesures. Puis à mesurer ce vin par spectrophotométrie dans différentes conditions, pur, après ajout de métabisulfite, d'acétaldéhyde, dilué avec HCL 1M ou dilué avec une solution hydroalcoolique. Les indices de couleur ont été calculés tels que décrit précédemment (Atanasova, Glories, 1984; Somers *et al.*, 1977) à partir des absorbances mesurées exprimées pour une dilution unitaire et un trajet optique de 10 mm. Le calcul de ces indices à partir de ces absorbances et les différentes conditions sont présentés dans le Tableau 2. Annexe 5.

Conditions de mesure	Indices	Abbréviations	Calcul
Condition 1 : 10 mL de Vin pur, trajet optique de 1 mm	Intensité colorante	IC	IC = (A₄₂₀ + A₅₂₀ + A₆₂₀) *10
	Teinte	T	T = A₄₂₀ / A₅₂₀
Condition 2 : 10 mL vin + 150 µL de solution de SO₂, trajet optique de 1mm, 30 min de repos, puis prendre le spectre de 310–800nm du vin ainsi traité, sous un trajet optique de 1mm . L'ajout de SO₂ permet de décolorer les anthocyanes natives et certains	Pigments résistants à la décoloration au SO₂	PD	PD = A₅₂₀*10

pigments dérivés			
Condition 3 : Diluer 10 fois le vin (1 mL) dans de la solution hydroalcoolique (10 mL), laisser 30min dans un flacon fermé, et prendre le spectre de 310–700nm de la solution ainsi diluée, sous un trajet optique de 10mm.	Couleur due à la copigmentation	CC	CC = A₅₂₀ (condition 1)*10 – A₅₂₀*10 (condition 3)
Condition 4 : Vin (100 µL) dilué 100 fois par la solution d'HCl 1M (10 mL), laisser 30min dans un flacon fermé puis faire le blanc avec la solution HCl 1M et prendre le spectre de 250–700nm du vin ainsi dilué, sous un trajet optique de 10mm ; La dilution par 100 permet de mesurer l'absorbance à 280 nm et le milieu acide permet de mesurer l'absorbance à 520 nm après la conversion complète des anthocyanes sous la forme flavylium.	Indice des polyphénols totaux	IPT	IPT = A₂₈₀*100
	Pigments totaux à pH < 1	PT	PT= A₅₂₀*10
Tableau 2. Annexe 5. Calcul des indices de couleur en fonction des absorbances A_λ (exprimées pour une dilution de 1 et un trajet optique de 1 cm).			

La série d'analyses spectrophotométriques a été effectuée à l'aide d'un diluteur-passeur d'échantillons couplés au spectrophotomètre Evolution 300 et du logiciel Ascanis (Figure 2. Annexe 5)

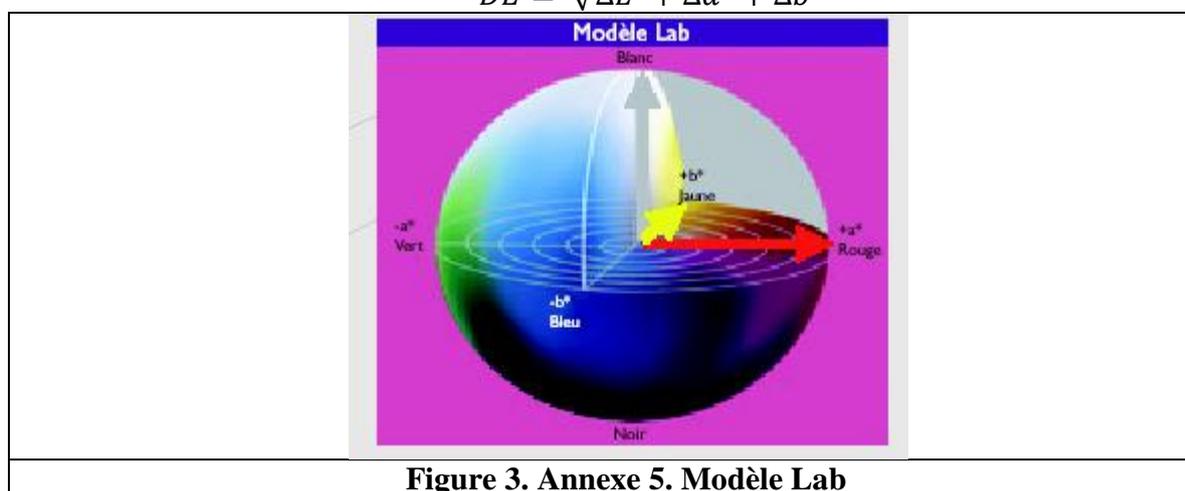


Figure 2. Annexe 5. Diluteur-passeur d'échantillons couplés au spectrophotomètre Evolution 300 et du logiciel Ascanis

3-Mesure de la couleur du jus :

La couleur des moûts est mesurée en identifiant les coordonnées L*a*b* (Commission Internationale de l'Eclairage, 1976). Les valeurs de L*, a* et b* sont mesurées avec le spectrophotomètre Evolution 300 et du logiciel Ascanis. CIE L*a*b* est un modèle de représentation des couleurs. La composante L* est la luminance, qui va de 0 (noir) à 100% (blanc). La composante a* représente la gamme de l'axe rouge (127) au vert (-128) en passant par le blanc (0) si la luminance vaut 100%. La composante b* représente la gamme de l'axe jaune (127) au bleu (-128) en passant par le blanc (0) si la luminance vaut 100%. Les surnageants obtenus des moûts et vins centrifugés ont été utilisés pour effectuer la mesure dans un spectrophotomètre CM-3600D. L'eau pure est utilisée comme témoin. La différence de couleur entre deux modalités différentes est déterminée selon l'équation :

$$DE = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$



4-Analyse par CLHP-DAD des tanins après phloroglucinolyse des moûts et des vins

Les tanins ont été analysés par CLHP-DAD après clivage en milieu acide en présence de phloroglucinol comme décrit précédemment (Koupai-Abyazani *et al.* 1993, Kennedy & Jones, 2001). Le mode opératoire a été optimisé au laboratoire pour l'analyse des vins rouges. Le principe de la méthode est une dépolymérisation acido-catalysée par chauffage en milieu méthanolique en présence d'acide et d'un agent nucléophile. Les unités supérieures sont converties en unités monomériques sous forme de dérivés phloroglucinol et les unités terminales telles quelles. Le vin est évaporé à sec puis repris dans de l'eau acidifiée pour ensuite être élué sur une cartouche Sep-pak. L'échantillon est de nouveau évaporé à sec. La dépolymérisation est effectuée sur l'échantillon à sec puis ce dernier est analysé par CLHP.

La phloroglucinolyse des vins consiste à évaporer à sec sous vide (EZ-2, Genevac®) 3 ml de vin. Le résidu sec a ensuite été dissous dans 3 mL d'eau/acide acétique (98/2, v/v) puis homogénéisé par passage au vortex et aux ultrasons. 1 mL a été déposé sur une cartouche d'extraction C18 phase solide (Cartouche Phenomenex SDBL 3CC) grâce à un robot automatisé (Zymark RapidTrace®SPE workstation) (Figure 4. Annexe 5). Par la suite, le protocole indiqué dans le tableau (3. Annexe 5) doit être suivi. Les sucres et les acides organiques ont été éliminés avec 5 mL d'eau/acide acétique (98/2, v/v) et les composés phénoliques ont été récupérés par 8mL de méthanol. 100 µL d'une solution à 2g/L de méthylparabène ont été ajoutés comme étalon interne. Les 8 mL de solution méthanolique ont ensuite été mis à sec par évaporation sous vide au Genevac® puis dissous dans 200 µL de MeOH contenant 0,2 N d'HCl, 50g/L de phloroglucinol et 10 g/l d'acide ascorbique. La phloroglucinolyse a été réalisée à 50°C pendant 20 min puis stoppée par l'ajout de 200 µL d'acétate de sodium 200mM.

Conditionnement	5	H ₂ O acidifiée	Poubelle
Conditionnement	5	MeOH	Poubelle
Conditionnement	5	H ₂ O acidifiée	Poubelle
Dépôt de l'échantillon	1	Echantillon	Poubelle
Rinçage	5	H ₂ O acidifiée	Poubelle
Elution tanins	5	MeOH	Récupération
Elution tanins	3	MeOH	Récupération
Tableau 3. Annexe 5. Protocole d'extraction sur cartouche C18 phase solide			

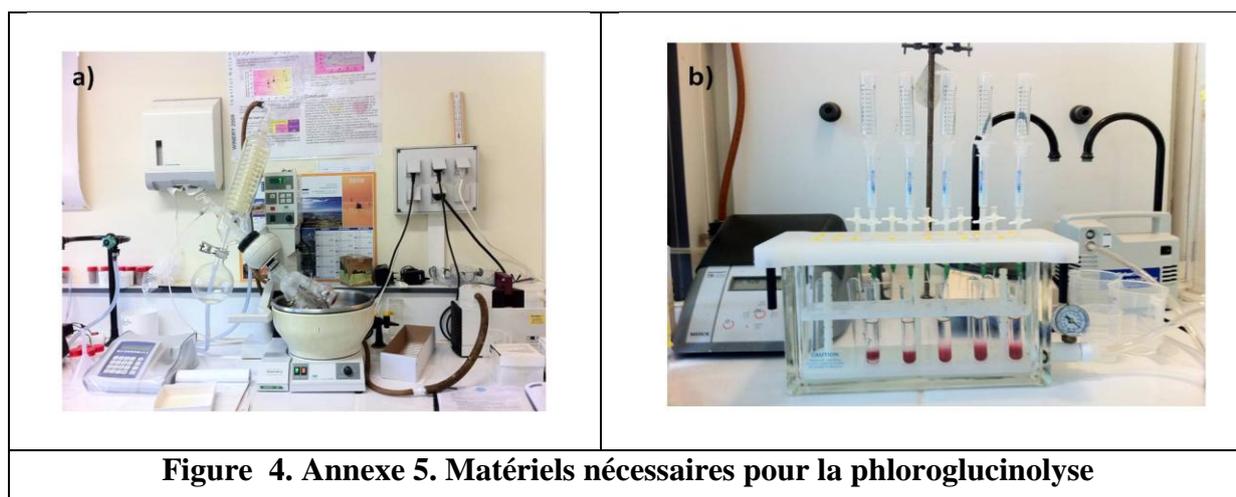


Figure 4. Annexe 5. Matériels nécessaires pour la phloroglucinolyse

5-Réaction de dépolymérisation

- Reprendre le ballon avec 250µL (micropipette de 1000µL) de solution dépolymérisante et mettre l'échantillon dans un tube à vis étanche. -Passer le tube quelques secondes au vortex

pour homogénéiser la solution. Puis, mettre 200 μL dans le tube puis l'ensemble dans un bain thermostaté à 50°C pendant 20 minutes. Pipeter 200 μL d'acétate de sodium (micropipette de 1000 μL) et l'ajouter au contenu du tube. Cette opération a pour effet d'arrêter la dépolymérisation. Mettre un réducteur (100 μL) dans le vial (1mL) et le remplir en vue de l'injection dans la chaîne. Puis, injecter 10 μL pour analyse CLHP.

6-Analyse des proanthocyanidines par CLHP-DAD

L'analyse des proanthocyanidines a été réalisée par CLHP après dépolymérisation en présence de phloroglucinol (Souquet *et al.*, 2004). Les unités libérées après phloroglucinolyse (sous-unités terminales et d'extension) ont été analysées par chromatographie liquide haute pression couplée à un détecteur à barrette de diode (CLHP-DAD). Le système CLHP est une chaîne CLHP Waters® équipée d'un système de pompe W600 controller, d'un injecteur W717 plus autosampler et d'une colonne Waters Atlantis® T3 5 μm 6*250mm, d'un détecteur W2996 PDA et un four pour colonne 30°. Le pilotage de la chaîne est géré par le logiciel Empower Millenium (Waters, Milford, Etats-Unis). La séparation des unités a été réalisée sur une colonne phase inverse Atlantis dC18 (250 mm x 4,6 mm, particules de 5 μm) protégée par une pré-colonne (20 mm x 4,6 mm, particules de 5 μm) et par un pré-filtre constitué d'une cartouche Securityguard™ C18 (Phenomenex, 4,0 mm x 3,0 mm). Le volume injecté est de 10 μL et le four est thermostaté à 30°C. Les solvants d'élution sont : le solvant A constitué d'eau/acide formique (98/2, v/v) et le solvant B constitué d'acétonitrile/eau/acide formique (80/18/2, v/v/v). Le gradient d'élution utilisé dont le débit est de 1 mL/min est décrit dans le Tableau 4. Annexe 5. L'étude CLHP des différents produits de dégradation formés permet d'obtenir des informations sur la structure des polymères comme le degré de polymérisation moyen et la concentration des différents éléments monomériques qui le constituent comme la catéchine, l'épicatéchine, l'épicatéchine gallate et l'épigallocatechine en position supérieure et terminale.

Temps (min)	Solvants	
	A (%)	B (%)
5	100	0
25	90	10
40	88	12
70	70	30
75	0	100
80	100	0

Tableau 4. Annexe 5. Gradient d'élution utilisé pour la séparation des sous-unités de tanins

Le degré de polymérisation moyen (DPM) des tanins (ou proanthocyanidines) a été effectué par le laboratoire de Sciences pour l'Oenologie de l'INRA (UMR 1083, Montpellier). Les unités constitutives des tanins obtenues après phloroglucinolyse ont été quantifiées à partir de l'aire des pics détectés à 280 nm calibrés à partir de standards externes : soit commerciaux pour les unités terminales (catéchine, épicatechine, épigallocatechine (%egc), épicatechine-3-O-gallate (%gal)), soit purifiés au laboratoire pour les unités d'extension (dérivés phloroglucinol de ces mêmes unités). L'ordre d'élution des composés est présenté dans le tableau 5. Annexe 5.

Composé	Lambda max (nm)	Temps de rétention (min)
Egc-ph	270.5	9.5-10.0
Epi-ph	277.5	21.5-23.6
Cat-ph	277.5	2.6-26.2
Cat	279.9	33.0-36.9
E30-ph	277.5	36.8-43.4
Epi	279.9	41.9-49.6
E30	279.9	58.5-61.8
ei	256.3	70.9-77.2

Tableau 5. Annexe 5. Ordre d'élution des différents composés

La concentration en tanins a été calculée comme étant la somme des concentrations des différentes unités constitutives (terminales et dérivés phloroglucinol).

La concentration est calculée par la formule suivante :

$$C_i = (\text{Aire du pic})_i \times K_i$$

Les coefficients K permettent de calculer la concentration du composé en fonction de l'aire du pic qui lui correspond (Tableau 6. Annexe 5).

Composé	Ei	Cat	Epi	Egc	E3O
K (g/L)	6.114E-08	1.113E-07	1.052E-07	6.498E-07	3.550E-08

Tableau 6. Annexe 5. Les coefficients K correspondants aux différents composés

Ei : étalon interne

Cat : catéchine

Epi : épicatechine

Egc : épigallocatechine

E3O : épicatechine-3-O-gallate

La concentration total en tanins est définie par :

$$C_{\text{totale}} = \sum_i C_i$$

Et le pourcentage en chaque unité est défini par :

$$\%_i = C_i / (\sum_i C_i)$$

Le DPM est estimé par le rapport entre le nombre d'unités terminales et le nombre total d'unités. Le degré de polymérisation moyen (DPM) a été calculé à partir des proportions des différentes unités par le ratio :

$$DPM = [\sum (\% \text{term} + \% \text{sup})] / [\sum \% \text{term}]$$

Références Bibliographiques Annexes:

Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M., 2002. Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine making. *Analytica Chimica Acta*, 458, 15-27.

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial By-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.

Bate-Smith, E.C., 1954. Astringency in foods. *Food*, 23, 124-135.

Boukharta, M., Girardin, M., & Metche, M., 1988. Procyanidines galloylées du sarment de vigne (*Vitis vinifera*) separation et identification par chromatographie liquide haute performance et chromatographie en phase gazeuse. *Journal of Chromatography*, 455, 406-409.

Carbonneau, A., Riou, C., Guyon, D., Riom, J., Schneider, C., 1992. Agrométéorologie de la vigne en France. Luxembourg, Office des Publications Officielles des Communautés Européennes, 169p.

Cadot, Y., 2008. Le potentiel phénolique du Cabernet Franc. 2008. Rapport de synthèse de 8 années d'expérimentations.

Cayla, L., Cottureau, P. & Renard, R., 2002. Estimation de la maturité phénolique des raisins rouges par la méthode I.T.V. standard. *Revue Française d'Oenologie*, 193, 10–16.

Coombe, B.G., 1987. Distribution of Solutes within the Developing Grape Berry in Relation to Its Morphology. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 120-127.

Fournand, D., Vicens, A., Sidhoum, L., Souquet, J., Moutounet, M., Cheynier, V., 2006. Accumulation and Extractability of Grape Skin Tannins and Anthocyanins at Different Advanced Physiological Stages. *J. Agric. Food Chem.*, 54.

Gagné, S., Saucier, C., & Gény, L., 2006. Composition and Cellular Localization of Tannins in Cabernet Sauvignon Skins during Growth. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9465–9471.

Gervais, J., Crachereau, J., & Latorre, M., 2005. Les composantes de la maturité Application au millésime, Service Vigne & Vin.

Glories, Y., 1984. La couleur des vins rouges. 2eme partie. origine et interprétation. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 18, 253-271.

Glories, Y., Agustin, M., 1993. Proceedings Colloque Journée Technique du CIVB, Bordeaux, p. 56.

Glories, Y., Crico, N.S., Vivas, N., & Augustin, M., 1996. Identification et dosage de la procyanidine A2 dans les raisin et les vins de *Vitis vinifera* L. C. V. merlot noir, cabernet sauvignon et cabernet franc. In: Polyphenols Communications 96, vol. 1 (pp. 153-154). Bordeaux.

Guérin, L., 2005. Amélioration de la Couleur et de la Structure des Vins Rouges par le suivi des composés phénoliques au cours de la maturité, ITV France.

Gülçin, I., Huyut, Z., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H.Y., 2010. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 43–53.

Jackson, D.I., Lombard, P.B., 1993. Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality : a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 409-430.

Kallithraka, S., Abdel-Azeem Mohdaly, A., Makris, D.P., & Kefalas, P., 2005. Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity, *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 375–386.

Karapinar, M., & Sengun, I.Y., 2007. Antimicrobial effect of koruk (unripe grape-*Vitis vinifera*) juice against *Salmonella typhimurium* on salad vegetables. *Food Control*, 18, 702-706.

Kennedy, J., & Jones, G.P., 2001. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1740-1746.

Kondrashov, A., Ševčík, R., Benáková, H., Koštířová, M. & Štípek, S., 2009. The key role of grape variety for antioxidant capacity of red wines, e-SPEN. *The European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, 4, 41–46.

Koupai-Abyazani, M. R., Muir, A. D., Bohm, B. A., Towers, G. H. N., & Gruber, M. Y., 1993. The proanthocyanidin polymers in some species of *Onobrychis*. *Phytochemistry*, 34, 113-117.

Labarbe, B., 2000. Le potentiel polyphénolique de la grappe de *Vitis vinifera* var. Gamay noir et son devenir en vinification beaujolaise. *Thèse de doctorat*. Montpellier, France: ENSA-M, UMI, UMII.

Lamadon, F., 1995. Protocole pour l'évaluation de la richesse poly phénolique de raisins. *Revue des œnologues*, 76, 37-39.

Lorrain, B., Chira, K., & Teissedre, P.L., 2011. Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chem.*, 126, 1991-1999.

Mané, C., Souquet, J.M., Ollé, D., Verries, C., Veran, S.F., Mazerolles, G., Cheynier, V., & Fulcrand, H., 2007. Optimization of Simultaneous Flavanol, Phenolic Acid, and Anthocyanin Extraction from Grapes Using an Experimental Design: Application to the Characterization of Champagne Grape Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7224-7233.

Min, K., & Ebele, S.E., 2008. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 96-104.

Papadopoulou, C., Soulti, K., & Roussis, I.G., 2005. Potential Antimicrobial Activity of Red and White Wine Phenolic Extracts against Strains of Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans. *Food Technol. Biotechnol.*, 43, 41- 46.

Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M., 1994. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36, 781-784.

Ribéreau-Gayon, P., 1965. Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de *V. vinifera*. *CR Acad Sci*, pp. 341-343.

Rodríguez Vaquero, M.J., Alberto, M.R., & Manca de Nadra, M.C., 2007. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 587-593.

Roediger, A., 2006. Phenolic ripeness in south Africa.

Rolland, Y., 2004. Antioxydants naturels végétaux. *OCL*, 11, 419- 424.

Roussillon, J., 2001. La grappe d.Autan, Bulletin d'information de la Station Régionale ITV Midi-Pyrénées, n°34.

Saint-Cricq, N., Vivas, N., & Glories, Y., 1998. Maturité phénolique: définition et contrôle. *Revue Française d'Oenologie*, 173, 22-25.

Sarni-Manchado, P., & Cheynier, V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Londres, Paris, New York: Tec & Doc, Lavoisier.

Segade, S., Rolle, L., Gerbi, V., & Orriols, I., 2008. Phenolic ripeness assessment of grape skin by texture analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 599-607.

Somers, T.C., & Evans, M.E., 1977. Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28, 279-287.

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

Souquet, J.M., Labarbe, B., Le Guerneve, C., Cheynier, V., & Moutounet, M., 2000. Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1076-1080.

Souquet, J.M., Mazauric, J.P., Meudec, E., Preys, S., Morel Salmi, C., & Cheynier, V., 2004. Comparison on different methods of depolymerisation to the characterization and quantification of proanthocyanidins in grape seed, grape skin and wine. *XXIInd International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finlande*, 693-694.

Trégoat, O., Van Leeuwen, C., Choné, X., Gaudillère, J.P., 2002. Etude du régime hydrique et de la nutrition azotée de la vigne par des indicateurs physiologiques. Influence sur le comportement de la vigne et la maturation du raisin. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 36, 133-142.

Van Leeuwen, C., Seguin, G., 1994. Incidences de l'alimentation en eau de la vigne, appréciée par l'état hydrique du feuillage, sur le développement de l'appareil végétatif et la maturation du raisin (*Vitis vinifera* variété Cabernet franc, Saint-Emilion, 1990). *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 2, 81-110.