

Dosage en continu des sucres et de l'alcool pendant les fermentations par spectroscopie proche infrarouge

Une opportunité pour l'automatisation des vinifications et les défis œnologiques actuels

Arnaud PERNET¹, Ramón MIRA DE ORDUÑA HEIDINGER¹, Danielle WIDMER¹, Anik RIEDO¹, Muriel MERTENAT¹, Marilyn CLÉROUX¹, Jean-Pascal BOURGEOIS², Olivier VORLET² et Charles FROHMAN³

¹Haute Ecole spécialisée de Suisse occidentale, Changins – Haute Ecole de viticulture et œnologie, 1260 Nyon, Suisse

²Haute Ecole spécialisée de Suisse occidentale, Haute Ecole d'ingénierie et d'architecture Fribourg

³Takasago International Corporation, Rockleigh, New Jersey, Etats-Unis

Renseignements: Ramón Mira de Orduña Heidinger, e-mail: ramon.mira@changins.ch, www.changins.ch



Tout comme la spectroscopie proche infrarouge employée pour le dosage des sucres et de l'alcool dans cette étude, la thermographie utilise le rayonnement infrarouge. En œnologie, elle permet d'obtenir des informations sur la distribution spatiale des températures, par exemple pour identifier les pertes de chaleur ou de froid dans la cave. Photo prise par Claude Willemin, Haute Ecole du paysage, d'ingénierie et d'architecture de Genève, avec une caméra thermique FLIR Systems T440 BX.

Introduction

Une étude présentée dans la *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture* en 2014 a montré qu'une approche novatrice de la fermentation peut générer des opportunités intéressantes (Frohman *et al.* 2014). L'application de stratégies fed-batch qui maintiennent les concentrations en sucre basses et constantes pendant la fermentation augmente la viabilité des levures et réduit de façon significative la production de métabolites associés à leur réponse au stress. La méthode peut donc être utile pour la vinification de vins à haute concentration en sucres, comme ceux élaborés à partir de raisins partiellement ou entièrement passerillés, ou produits en conditions climatiques chaudes. Les fermentations fed-batch ont également fait preuve d'un grand potentiel dans la réduction de l'acide acétique (Frohman *et al.* 2014; Frohman et Mira de Orduña 2013). Pour des moûts à taux élevés d'acide acétique, à l'exemple des cas qui ont été observés en 2014, cette propriété pourrait aussi se relever avantageuse. Cependant, la méthode fed-batch demande de contrôler constamment les taux de sucres pendant la fermentation.

A l'heure actuelle, le contrôle des fermentations alcooliques en œnologie est surtout basé sur le dosage de la densité du moût (le plus souvent manuellement) et se limite à la manutention d'une certaine température. Depuis quelques années, il existe sur le marché des systèmes de suivi de la fermentation par mesure automatique de la densité du moût ou du dégagement de CO₂ (Schmidt 2010). Ces outils apportent un certain confort et permettent de suivre la cinétique de la fermentation alcoolique, et ainsi de mieux (et de façon automatique) gérer la réfrigération et identifier rapidement des fermentations languissantes. Cependant, ces technologies sont imprécises et incapables de fournir des données sur les concentrations en sucres et alcool nécessaires aux techniques de vinification avancées, comme les fermentations fed-batch (Frohman *et al.* 2014). Bien d'autres outils ont été proposés pour le dosage en ligne des sucres, mais qui présentent tous une multitude d'inconvénients, tels que le manque de spécificité, de sensibilité, ou de solidité des sondes, des problèmes de diffusion ou encore l'exigence de prétraiter les échantillons (séparation, filtration, absorption).

La spectroscopie infrarouge est une méthode d'analyse rapide et non destructive déjà utilisée depuis plus d'une dizaine d'années dans les laboratoires d'analyse œnologique pour le dosage de paramètres de pertinence œnologique (Patz *et al.* 2004; Patz et Dietrich 2005; Patz *et al.* 1999, voir Friedel *et al.* 2013 pour une

Résumé La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est fréquemment utilisée pour l'analyse d'échantillons œnologiques en laboratoire. Le but de ce projet était de développer et valider une méthode d'IRTF permettant le dosage automatique des sucres et de l'éthanol en continu, c'est-à-dire directement dans la cuve de fermentation. Pour cela, une sonde de transfectance submersible a été reliée à un spectromètre IRTF proche infrarouge. Des modèles de calibration pour le glucose, le fructose, les sucres totaux (définis comme glucose + fructose) et l'éthanol ont été développés avec des échantillons d'apprentissage issus de plusieurs fermentations en blanc et en rouge. Une fois validés, ces modèles se sont avérés efficaces pour le dosage en continu des sucres totaux et de l'éthanol pendant les fermentations en conditions de turbidité pratiques, rapprochant ainsi le laboratoire de la cave. La méthode de dosage en ligne permet aussi de réaliser des fermentations fed-batch pour réduire le stress des levures et la production de métabolites secondaires tels que l'acide acétique. Son application sera évaluée pour la fermentation de moûts chargés en acide acétique.

synthèse actuelle). Ces outils, basés sur le spectre moyen infrarouge, qui peuvent quantifier plusieurs paramètres rapidement une fois calibrés, ne sont toutefois pas adaptés à l'application directe dans la cave. Grâce à la plus forte intensité de son rayonnement, la région du spectre infrarouge proche se prête mieux à l'analyse de liquides troubles tels qu'ils se présentent pendant la fermentation alcoolique (Burns et Ciurczak 2013).

Dans le cadre d'un projet financé par la Haute Ecole spécialisée de Suisse occidentale, des chercheurs des écoles d'ingénieurs de Fribourg et de Changins ont développé et validé l'utilisation d'un spectromètre proche infrarouge à transformée de Fourier (proche IRTF) pour le dosage en ligne automatique des principaux paramètres œnologiques (sucres, alcool) durant la fermentation de moûts blancs et rouges. Pour cela, un grand nombre de moûts ont été choisis avec des taux de sucres et des turbidités différentes.

Matériel et méthodes

Différents moûts naturels et semi-synthétiques blancs et rouges, pasteurisés ou non, ont été utilisés pour cette étude. Pour assurer une large variation d'échantillons pour la calibration, les moûts ont été chaptalisés et/ou dilués et leur turbidité variée a été obtenue entre 200 et 20000 NTU par ajout d'écorces et nutriments de levure. Ensuite, des fermentations alcooliques en mode batch ou fed-batch ont été encouragées par inoculation de *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. Pendant les fermentations, des spectres d'absorbance ont été acquis à l'aide d'un spectromètre proche-IRTF de la société Bruker (Multi Purpose Analyzer, Bruker Optics, Allemagne), équipé d'un détecteur à haute sensibilité InGaAs avec une plage de détection de 12500–4000 cm^{-1} , un câble de fibre optique en quartz et une sonde de transmittance autoclavable et submersible (IN271F, Bruker Optics) avec une fenêtre en saphir et une longueur optique de 2 mm. Le système d'acquisition a été contrôlé par le logiciel OPUS v7. Pour générer les calibrations, des échantillons ont été pris tout au long des fermentations et analysés par HPLC comme méthode de référence. Pour cela, une séparation isocratique a été employée sur une phase stationnaire de polystyrène/divinylbenzène (BioRad Aminex HPX87) avec quantification par indice de réfraction. Pour réaliser des fermentations fed-batch automatisées selon la méthode décrite préalablement par Frohman *et al.* (2014), le taux de sucres totaux a été quantifié dans le moût en fermentation au spectromètre proche (IRTF). Ensuite, les données sont converties en signal analogue (4–20 mA) et utilisées pour ajuster le débit d'une pompe péristaltique qui ajoute du moût frais pour maintenir la concentration en sucres à 45 g/l pendant la fermentation.

Résultats

Des modèles ont été générés pour la prédiction des concentrations de glucose, fructose, sucres totaux (définis comme glucose + fructose) et éthanol en utilisant des spectres acquis sur environ 240 échantillons d'apprentissage, pris pendant cinq fermentations d'entraînement en mode batch et trois en mode fed-batch. La figure 1A montre l'aspect des spectres acquis. Pour réduire la dispersion des spectres, causée principalement par les différences de turbidité des échantillons, des prétraitements ont été appliqués aux données. La figure 1B montre les spectres après normalisation des vecteurs. Ensuite, les régions en dessous de 5000 cm^{-1} et au-dessus de 11 100 cm^{-1} ainsi que les bandes d'absorbance de l'eau (situées principalement entre 6600–7100 cm^{-1} et

4800–5300 cm^{-1}) ont été exclues pour réduire le bruit du signal et les interférences (fig.1C). Le tableau 1 présente les paramètres choisis pour le prétraitement des données ainsi que les régions spectrales pour les modèles de calibration. Par la suite, le module de quantification du logiciel chimiométrique (Quant, OPUS v7, Bruker Optics, Allemagne) a été utilisé pour optimiser la précision des prédictions des modèles. Pour cela, les

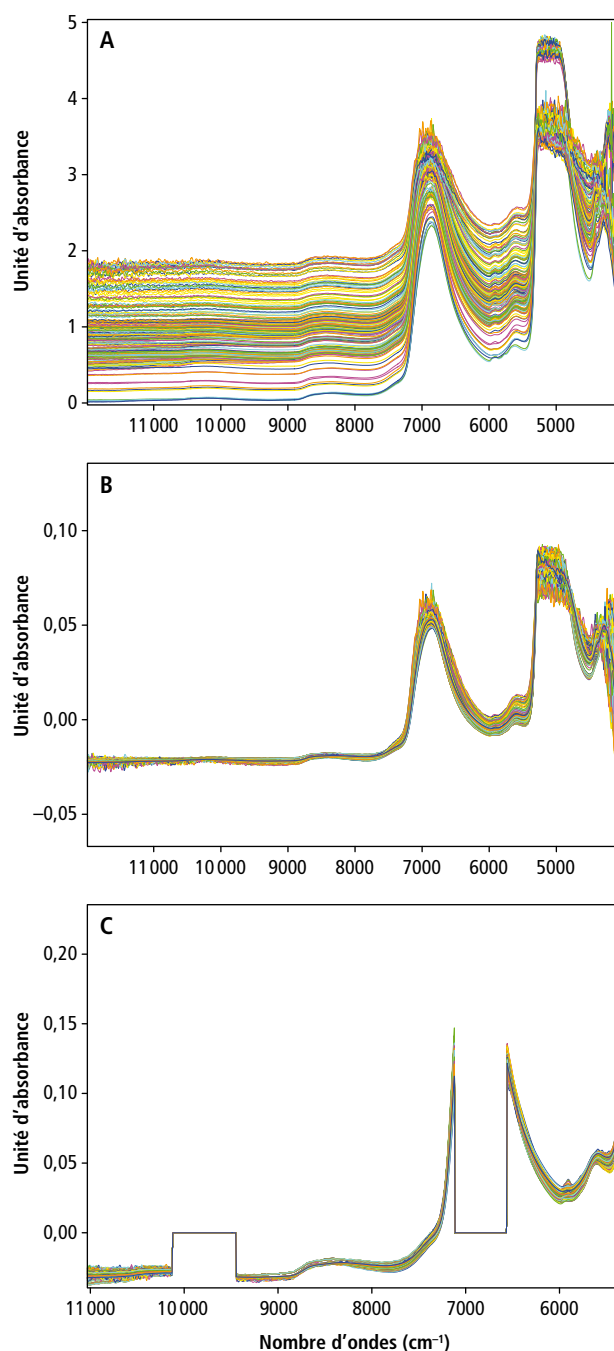


Figure 1 | Spectres d'absorbance en proche infrarouge avant prétraitement (A), après normalisation de vecteurs (B) et après définition des régions spectrales (C) pour la prédiction des teneurs en sucres totaux (glucose + fructose).

modèles ont été améliorés graduellement en incluant de plus en plus d'échantillons d'apprentissage fournis par les fermentations d'entraînement.

La figure 2 illustre cette amélioration: l'erreur de prédiction du modèle initial incluant 33 échantillons seulement était supérieure à 25 g/l. L'augmentation du nombre d'échantillons a pu réduire cette erreur à 11,6 g/l dans le modèle final. Pour vérifier la qualité des modèles, chaque calibration a été vérifiée avec des échantillons de test non inclus préalablement dans la calibration. Des représentations graphiques du modèle

final de calibration pour les sucres totaux et de sa validation externe sont montrées dans la figure 3. Les valeurs statistiques du modèle final pour tous les paramètres sont fournies dans le tableau 2. Une analyse détaillée des erreurs de prédiction du modèle pour les sucres totaux (fig. 4) montre d'ailleurs que l'erreur était plus grande vers les extrêmes des plages de calibration (0–30 g/l et 181–230 g/l).

Finalement, les performances du modèle initial (N=30) et final (N=242) pour les sucres totaux ont été comparées avec des fermentations fed-batch automa-

Tableau 1 | Prétraitements et régions de calibration pour la création de modèles de calibration proche IRTF

Modèle	Prétraitement	Régions de calibration (cm ⁻¹)
Glucose	Normalisation de vecteurs	10229,4 – 9388,5 8709,7 – 8115,6 7683,6 – 7120,5 6557,3 – 5323,0
Fructose	Normalisation de vecteurs Dérivatisation	11031,7 – 7120,5 6557,3 – 5647,0
Sucres totaux	Normalisation de vecteurs	11031,7 – 10136,8 9442,5 – 7120,5 6557,3 – 5323,0
Ethanol	Normalisation de vecteurs	9442,5 – 7621,9 6557,3 – 5647,0

Figure 2 | Effet du nombre d'échantillons d'apprentissage (N) sur l'erreur de prédiction (RMSEP) du modèle pour les sucres totaux.

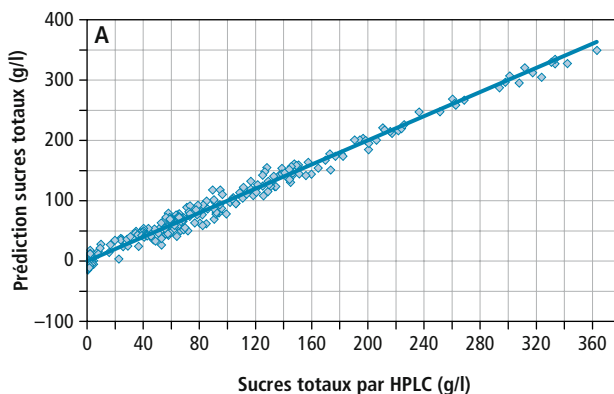
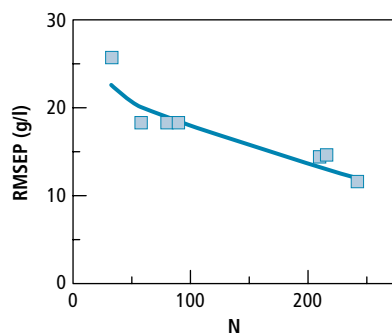


Tableau 2 | Modèles de calibrations proche IRTF finales et leurs paramètres statistiques

Modèle	N	Rang	R ²	RPD	RMSECV	RMSEP
Glucose (g/l)	235	8	93,17	3,83	10,1	12,3
Fructose (g/l)	236	7	93,25	3,86	10,7	10,2
Sucres totaux (g/l)	242	8	97,23	6,01	13	11,6
Ethanol (% v/v)	236	4	98,80	9,14	0,534	0,328

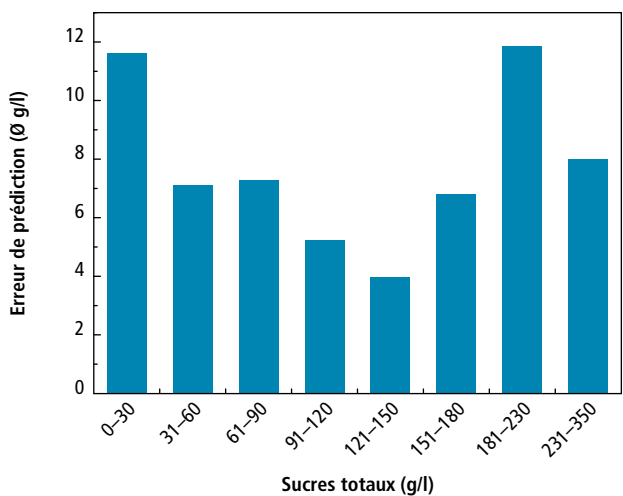


Figure 4 | Moyenne d'erreurs de prédiction pour les sucres totaux à travers différentes plages de concentration pour le modèle final.

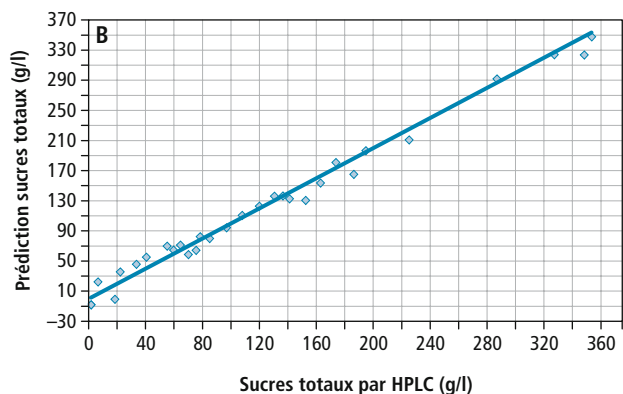


Figure 3 | Calibration du modèle avec des échantillons d'apprentissage (A) et validation externe avec des échantillons de test (B) pour les sucres totaux.

tisées (fig. 5). A cause du nombre réduit d'échantillons d'apprentissage et de l'erreur de prédiction élevée (25,7 g/l), le contrôle de la fermentation par le modèle initial (fig. 5A) était médiocre. Les valeurs de sucres totaux mesurées avec la méthode HPLC de référence ont dépassé la valeur de consigne de 45 g/l de 25 g/l pendant la fermentation. Une forte erreur systématique a pu être constatée. En revanche, le modèle final (fig. 5B) a permis de maintenir les sucres totaux à ± 5 g/l de la valeur de consigne, avec une erreur moyenne de prédiction de 0,45 g/l seulement.

Discussion

Nous avons développé et validé une méthode de spectroscopie proche infrarouge à transformée de Fourier (proche IRTF) pour le dosage automatique des principaux paramètres œnologiques (sucres, alcool) pendant la fermentation de moûts blancs et rouges. Comme les appareils de laboratoire basés sur le moyen infrarouge, l'application de la spectroscopie proche IRTF en cave exige de développer des modèles de calibration afin de permettre le dosage de composés d'intérêt. Pour ce projet, nous avons utilisé un grand nombre d'échantillons issus de fermentations en blanc et rouge et la chromatographie en phase liquide comme méthode de référence pour calibrer la méthode de dosage par proche IRTF. En utilisant le logiciel chimiométrique fourni avec le spectromètre, des modèles de calibration passables ont pu être développés pour le glucose et le fructose, et des calibrations bonnes et même excellentes pour les concentrations en sucres totaux et en éthanol, respectivement. La précision de la méthode est suffisante pour évaluer la condition actuelle d'une fermentation et déterminer sa fin. Cependant, la précision du modèle n'est pas encore adéquate en dessous de 30 g/l de sucres totaux. Le modèle devrait donc

être amélioré pour permettre l'interruption automatique d'une fermentation par exemple, afin de laisser une certaine quantité de sucres résiduels.

Par contre, cette étude a déjà pu démontrer que la méthode de dosage de sucres totaux par proche IRTF permet de réaliser des fermentations fed-batch automatiques telles que les proposent Frohman *et al.* (2014). Puisque les fermentations fed-batch permettent d'augmenter la viabilité des levures et de réduire significativement les taux d'acide acétique (Frohman et Mira de Orduña 2013), leur automatisation constitue un pas supplémentaire vers une application industrielle potentielle. Dans ce but, des études vont être menées pour améliorer encore les calibrations et pour réduire le coût de la technologie, qui reste très élevé. L'intérêt des fermentations fed-batch automatisées pour la vinification de moûts chargés en acidité volatile sera aussi évalué.

Conclusions

- Un spectromètre en proche infrarouge à transformée de Fourier a pu être calibré pour doser le glucose, le fructose, les sucres totaux et l'alcool dans des moûts et vins blancs et rouges.
- Les calibrations sont efficaces en conditions de production. Elles permettent le dosage direct et en continu pendant les fermentations, notamment en conditions de turbidité extrême.
- Actuellement, la précision ne permet pas encore d'assurer l'arrêt automatique des fermentations pour obtenir des vins pourvus d'un certain taux de sucres résiduels.
- Cependant, la méthode de dosage permet de réaliser des fermentations fed-batch qui réduisent le stress des levures et la production de métabolites secondaires tels que l'acide acétique.
- Le laboratoire de chimie du vin à CHANGINS étudiera l'application de cette méthode notamment sur des moûts chargés en acide acétique. ■

Remerciements

Les auteurs expriment leur gratitude pour le soutien financier obtenu dans le cadre du programme thématique HealthFood de la Haute Ecole spécialisée de Suisse occidentale pour réaliser cette étude (A-line, projet #39155).

Bibliographie

- Burns D. A. & Ciurczak E. W., 2013. Handbook of Near-Infrared Analysis. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Friedel M., Patz C.D. & Dietrich H., 2013. Comparison of different measurement techniques and variable selection methods for FT-MIR in wine analysis. *Food Chemistry* **141**, 4200–4207.
- Frohman C., Widmer D. & Mira de Orduña R., 2014. Amélioration de la performance des levures œnologiques avec la méthode fed-batch. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* **46**, 182–186.

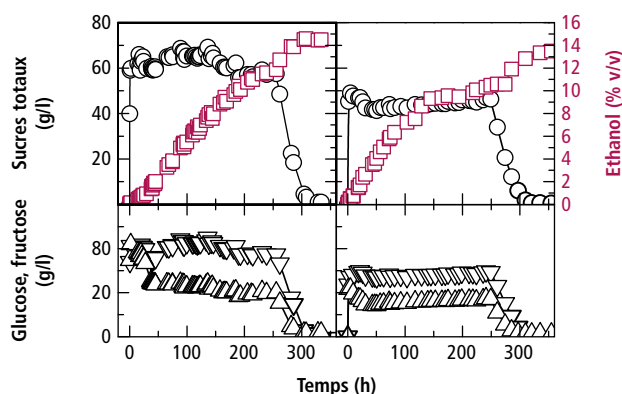


Figure 5 | Concentrations en sucres totaux, éthanol, glucose et fructose (mesuré par HPLC) pendant des fermentations fed-batch avant (gauche) et après (droite) optimisation des modèles de prédiction. Valeur de consigne: 45 g/l.

Summary

Continuous quantification of sugars and alcohol during fermentations by near infrared spectroscopy. Opportunities for automation of vinifications and current enological challenges

The application of Fourier Transformation infrared spectroscopy (FTIR) is well established for the laboratory analysis of enological samples. The aim of the current project was to develop and validate a FTIR method for the automated in-line quantification of sugars and ethanol, i.e. directly in the tank. A submersible trans-reflectance probe attached to a near infrared FTIR-spectrometer was used. Calibration models for glucose, fructose, total sugars (defined as glucose + fructose) and ethanol were developed with training samples taken from several red and white vinifications. The calibration models were then validated and proved efficient for the continuous quantification of total sugars and ethanol under practical turbidity conditions thus bringing the laboratory closer to the wine cellar. The in-line detection method also allows carrying out fed-batch fermentation to reduce yeast stress and the production of secondary metabolites such as acetic acid. Its application for the fermentation of grape musts with increased acetic acid levels will be considered.

Key words: wine, near infrared spectroscopy, fermentation, yeast, automation.

Zusammenfassung

Kontinuierliche Messung von Zuckern und Alkohol während der Gärung durch Anwendung der Nahinfrarotspektroskopie. Chancen für die Automatisierung von Vinifikationen und aktuelle önologische Herausforderungen

Die Anwendung der Fourier-Transformation Infrarotspektroskopie (FTIR) zur Laboranalyse önologischer Proben ist verbreitet. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Validierung einer FTIR Methode zur automatischen in-line Analyse von Zuckern und Ethanol, d.h. direkt am Gärungsgebäude. Hierzu wurde eine Transflek-tions-sonde, welche an ein Nahinfrarot FTIR-Gerät angeschlossen war, verwendet. Kalibrationsmodelle für Glukose, Fruktose, Gesamt-zucker (definiert als Glukose + Fruktose) und Ethanol wurden mit Trainingsproben erstellt, welche während mehrerer Rot- und Weissweinfermentation genom-men wurden. Die Kalibrationsmodelle wurden anschliessend validiert und erwiesen sich als geeignet für die Bestimmung der Gesamtzucker- und Ethanolwerte in Gärungen unter praktischen Trübungsbedingungen. Die in-line Messmethode ermöglicht auch die Durchführung von fed-batch Gärungen mit dem Ziel den Stress der Hefen und die Produktion von Sekundärmetaboliten wie der Essigsäure zu verringern. Ihre Anwendung zur Vergärung von Traubenmosten mit hohen Anfangsessigsäurekonzentrationen wird evaluiert werden.

Riassunto

Dosaggio continuo di zuccheri e dell'alcol durante le fermentazioni mediante spettroscopia nel vicino infrarosso. Un'opportunità per l'automatizzazione delle vinificazioni e le attuali sfide enologiche

L'applicazione della spettroscopia infrarossa a trasformazione di Fourier (IRTF) è diffusa per l'analisi di campioni enologici in laboratorio. Lo scopo di questo progetto era di sviluppare e validare un metodo d'IRTF che permetta il dosaggio automatico in linea degli zuccheri e dell'etanolo, vale a dire, direttamente nella botte di fermentazione. Per questo motivo è stata utilizzata una sonda di trasflettanza sommer-gibile collegata a uno spettrometro IRTF nel vicino infrarosso. Dei modelli di calibrazione per il glucosio, il fruttosio, gli zuccheri totali (definiti come glucosio + fruttosio) e l'etanolo sono stati sviluppati utilizzando campioni di saggio prelevati nel corso di diverse fermentazioni in bianco e in rosso. Questi modelli sono stati, in seguito, validati e si sono dimostrati efficaci per il dosaggio continuo degli zuccheri totali e dell'etanolo durante le fermentazioni in condizioni di torbidità normalmente osservata nella pratica, ravvicinando così il laboratorio alla cantina. Il metodo di dosaggio in linea permette anche di realizzare delle fermentazioni fed-batch per ridurre lo stress dei lieviti e la produzione di metaboliti secondari quali l'acido acetico. La sua applicazione per la fermentazione di mosti ricchi in acido acetico sarà valutata.

- Frohman C. A. & Mira de Orduña R., 2013. Cellular viability and kinetics of osmotic stress associated metabolites of during traditional batch and fed-batch alcoholic fermentations at constant sugar concentrations. *Food Research International* 53, 551–555.
- Patz C. D., Blicke A., Ristow R. & Dietrich H., 2004. Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Analytica Chimica Acta* 513, 81–89.

- Patz C. D. & Dietrich H., 2005. Automatic determination of grape quality. *Der Deutsche Weinbau*, Neustadt 14, 16–22.
- Patz C. D., David A., Thente K., Kürbel P. & Dietrich H., 1999. Wine Analysis with FTIR spectrometry. *Wein Wissenschaft* 54, 80–87.
- Schmidt O., 2010. Moderne Gärungssteuerungen: Gärung goes online [Modern fermentation control systems: fermentation goes online]. *Das Deutsche Weinmagazin* 13, 22–27.