

Étalonnage d'un système de suivi en ligne pour la quantification des composés d'arômes en fermentation alcoolique par chromatographie en phase gazeuse

Magaly Angénieux¹, Marc Perez²

Résumé. Un système de suivi en ligne de composés d'arômes a été mis en place afin d'avoir, en temps réel et à une fréquence de mesure élevée, leur production au cours de la fermentation alcoolique du vin. Une fraction de gaz fermentaire est prélevée dans l'espace de tête de la cuve en fermentation, via des lignes de transfert chauffées. L'échantillon est injecté directement ou concentré sur un piège Tenax® froid, avant désorption et injection sur un chromatographe en phase gazeuse pourvu d'une double détection FID (détecteur à ionisation de flamme) et FPD (détecteur à photométrie de flamme). Afin de calculer les concentrations des composés d'arômes dans le gaz fermentaire, un plan d'étalonnage a été mené avec un diluteur de gaz Sonimix® et un générateur de gaz ATIS® (Adsorbent Tube Injector System). Après les étapes d'optimisation de chaque dispositif, douze composés d'arômes sur seize peuvent être quantifiés. Les deux systèmes s'avèrent complémentaires compte tenu des différences de nature des composés d'intérêts et de leurs gammes de concentrations attendues.

Mots clés : chromatographie phase gazeuse (CPG), composés d'arômes, étalonnage

Introduction

L'unité expérimentale de Pech Rouge (INRA) a pour cœur de métier l'expérimentation et la recherche en viticulture et en œnologie. Elle possède une halle de fermentation différée permettant de réaliser des fermentations à l'échelle pilote toute l'année. La halle est équipée de 16 fermenteurs de 1 hL et 4 fermenteurs de 10 L. Les fermenteurs sont des cuves fermées, instrumentées (température, dégagement de CO₂) et contrôlées de façon automatique. La halle s'est équipée depuis 6 ans d'un système de suivi en ligne des gaz fermentaires. L'objectif est de réaliser l'analyse en continue par chromatographie en phase gazeuse des principaux composés volatils. La fermentation alcoolique consiste en la transformation du sucre du raisin, en éthanol et CO₂ par des levures. Cette réaction produit également des composés d'arômes qui sont des molécules « marqueuses » du métabolisme. Lors de la fermentation, deux phases sont observées dans le fermenteur, la phase liquide qui est le moût (jus de raisin) en cours de fermentation et la phase gazeuse qui est l'espace de tête du fermenteur. La connaissance déjà acquise de la composition de la phase liquide, représente un intérêt d'un point de vue organoleptique. Celle de la phase gaz permet de prendre en compte les pertes de composés en cours de fermentation. Déterminer la composition en composés d'arômes des deux phases permet d'établir des bilans et contribue à la compréhension du métabolisme des levures. Le système de suivi en ligne des composés volatils dans la phase gazeuse est utilisé dans de nombreux projets de recherche en collaboration avec l'UMR Science pour l'œnologie (SPO) ainsi que sur des projets en lien avec des industriels fabricants de levures œnologiques.

Description du matériel

Le suivi en ligne des composés volatils d'arôme est réalisé grâce à un chromatographe en phase gazeuse (CPG). Le gaz présent dans l'espace de tête de la cuve de fermentation est pompé à un débit de 14 mL.min⁻¹ à travers une ligne de transfert chauffée pour éviter la condensation. Le gaz est

1. INRA, UE 0999 Pech Rouge, F-11430 Gruissan, France ; Magaly.angenieux@supagro.inra.fr

2. INRA, UMR 1083 Science pour l'œnologie, 2 place Viala, F-34060 Montpellier cedex1, France

concentré sur un piège froid (Tenax®) pendant 6 min puis désorbé à 160°C pendant 1 min. Le gaz est ensuite analysé à l'aide d'un chromatographe (Perichrom PR2100) équipé d'une colonne ZBWax plus (60 m x 0,32 mm x 0,5 µm, Phenomenex, Le Pecq, France) et d'un détecteur FID (détecteur à ionisation de flamme) pour la détection des composés carbonylés. Une autre partie du gaz de l'espace de tête n'est pas concentrée et est injectée directement dans une colonne RTX1 (60 m x 0,53 mm x 0,70 µm, Restek, Lisses, France) avec détecteur FPD (détecteur à photométrie de flamme) pour l'analyse des composés soufrés (**Figure 1**). Quatre fermenteurs peuvent être suivis en même temps.

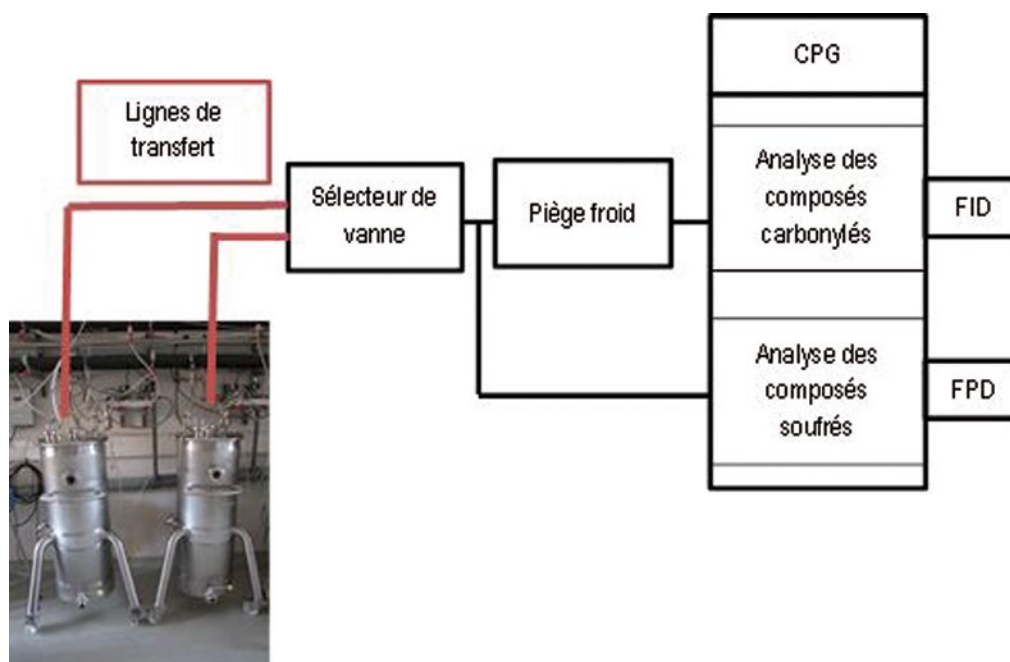


Figure 1. Schéma du système de suivi en ligne des composés d'arômes
(photo : UE Pech Rouge, Halle de fermentations différées).

Après une étape de mise au point des paramètres analytiques, nous avons pu détecter et identifier les molécules d'intérêt que sont les alcools supérieurs (propanol, isobutanol, isoamylalcool...), les esters d'éthyle, les esters d'acétate et l'H₂S avec la fréquence d'une analyse par heure. Ceci est un point fort du système car une fermentation peut durer jusqu'à 200 h. Or, la production de certaines molécules ne se fait que sur quelques heures, d'où l'importance d'avoir une fréquence analytique élevée, contrainte inatteignable en prélèvement manuel.

Afin de pouvoir corréler les données de la phase gazeuse avec celles obtenues dans la phase liquide, il était important de pouvoir quantifier les composés détectés. Mais tous les composés ne peuvent pas être quantifiés par le même analyseur. Pour cela, nous avons acquis deux systèmes : le Sonimix® 6000C1 (LNI Schmidlin SA) et ATIS® (Adsorbent Tube Injector System, Supelco).

Le système Sonimix® est un diluteur de gaz. Il permet de diluer les gaz d'une bouteille étalon sur une certaine plage de concentration.

Le système ATIS® est un générateur de gaz. Il est constitué d'une ampoule en verre de 10 mL montée dans un bloc chauffé. On injecte dans cette ampoule un faible volume d'une solution de composés, préparée dans un solvant adapté et aux concentrations voulues. L'ampoule est balayée par de l'air pour créer un « gaz étalon » qui est injecté dans le système de suivi en ligne par les lignes de transfert.

Optimisation et étalonnage

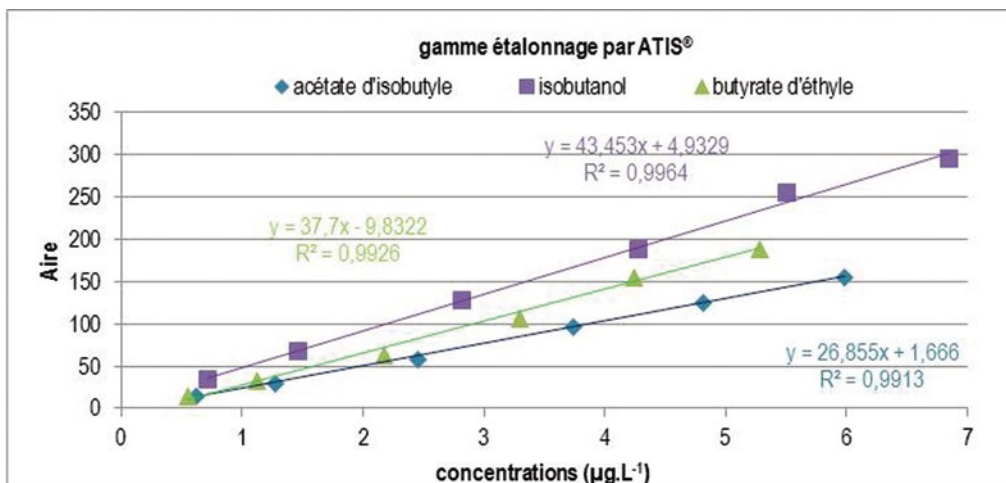


Figure 2. Etalonnage de l'acétate d'isobutyle, de l'isobutanol et du butyrate d'éthyle par le système ATIS®.

Sonimix®

Pour les molécules très volatiles nous avons donc utilisé le système Sonimix® en mode diluteur de gaz. Actuellement, l'acétate d'éthyle, l'acétaldéhyde et l'H₂S sont quantifiés avec ce système.

Le principal travail d'optimisation sur ce système a porté sur le choix du gaz diluteur. Pour les composés passant par le piège (acétate d'éthyle et acétaldéhyde), nous avons appliqué le même raisonnement et obtenu le même résultat qu'avec le système ATIS®. Pour les composés soufrés qui ne sont pas piégés, la question du gaz diluteur s'est posée car du CO₂ est injecté dans la colonne analytique avec les composés. De plus, il est détecté par le détecteur FPD et son temps de rétention est très proche de celui de l'H₂S.

Les tests ont montré que la présence de CO₂ induisait une meilleure réponse de l'H₂S. Le gaz diluteur doit donc être le CO₂ pour la quantification des composés soufrés.

Un point important est à prendre en compte en utilisant ce gaz : le Sonimix® est prévu pour fonctionner avec de l'air. Il réalise la dilution des gaz grâce à des débitmètres et régulateurs massiques (RDM) qui mesurent des débits massiques (masses / temps). En dilution, un débit volumique (volume / temps) est appliqué en sortie d'appareil. Connaissant la concentration en ppm de la bouteille étalon, le Sonimix® donne la concentration voulue du composé en ppm (air en gaz diluteur).

L'utilisation du CO₂ comme gaz diluteur nécessite l'application d'un facteur de correction sur les concentrations données par le Sonimix®.

Le **Tableau 1** et la **Figure 3** présentent les résultats d'étalonnage du Sonimix® pour H₂S.

Suite à ces étapes d'optimisation, le travail de quantification a pu être réalisé.

Ces deux systèmes nous permettent de quantifier douze des seize composés d'intérêts ciblés initialement. Les quatre composés non quantifiés sont des composés ayant des points d'ébullition hauts ce qui demandera une optimisation des paramètres ATIS® spécifiques.

Tableau 1. Etalonnage de l'H₂S par le système Sonimix®

Concentrations (mg.L ⁻¹)	Racine carrée de l'aire moyenne (n = 3)	Ecart type	Coefficient de variation
0,0042	2,21	0,01	0,65%
0,0084	6,29	0,21	3,27%
0,0141	12,21	0,34	2,80%
0,0156	12,83	0,49	3,78%
0,0195	17,75	0,28	1,55%

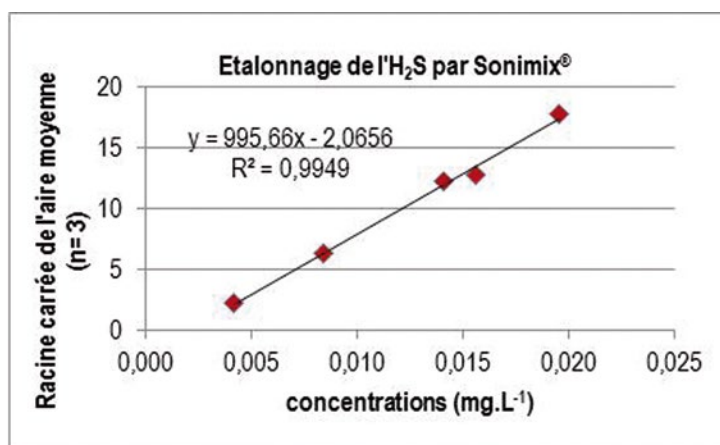


Figure 3. Etalonnage de l'H₂S par le système Sonimix®.

Approche d'une validation de méthode du système de suivi en ligne

La validation de méthode doit permettre de garantir les résultats en fonction des besoins des demandeurs d'analyse.

Nous avons cherché à déterminer si notre processus de mesure était reproductible (résultats de l'analyse des gaz fermentaires proches dans un intervalle de temps précis et sur plusieurs fermenteurs) et juste (biais par rapport à une valeur dite vraie).

Pour estimer la reproductibilité du système de suivi en ligne, nous avons comparé la réponse en aire sur trois fermenteurs pour l'acétate d'isobutyle (**Figure 4**).

|||||

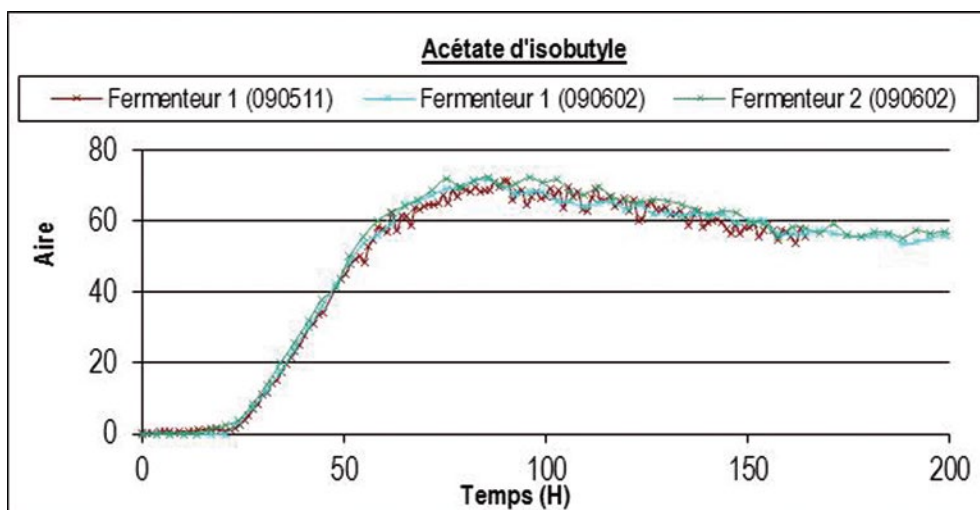


Figure 4. Exemple de la cinétique de l'acétate d'isobutyle pour une même modalité conduite sur trois fermenteurs.

A partir des deux systèmes d'étalonnage décrits plus haut, une gamme d'étalonnage a été réalisée pour chaque composé d'intérêt (douze composés au total). En s'appuyant sur les gammes d'étalonnage, la justesse de la méthode a pu être estimée. Pour cela il nous a fallu préparer des matériaux de référence non disponibles hormis les bouteilles de gaz pour certains composés fabriquées par des gaziers et contrôlées. Pour estimer la dérive du système, nous avons mis en place des points de contrôle (solutions de concentrations connues pour les composés analysés par ATIS® et un point de dilution des bouteilles de gaz pour Sonimix®) et leur carte de contrôle associées.

Conclusions et perspectives

Actuellement, nous sommes capables de détecter seize composés d'arômes et d'en quantifier douze tout au long de la fermentation alcoolique, avec une fréquence analytique élevée. Néanmoins, la quantification des composés les moins volatils pose encore problème et nécessitera une optimisation spécifique des systèmes d'étalonnage.

De plus le système de suivi en ligne évolue pour répondre aux besoins de nouveaux projets et sujets de recherche. La détection, et donc la quantification de nouvelles molécules est prévue, comme celle du diacétyle dans des vins de champagne.

Références bibliographiques

- Marze S, Cholmet M (2012) In vitro digestion of emulsions : mechanistic and experimental models. *Soft Matter* **8** : 10982-10993. DOI: 10.1039/c2sm26336j dernière consultation le 05-01-2015.
- Morakul S, Athes V, Mouret JR, Sablayrolles JM (2010) Comprehensive study of the evolution of gas-liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation. *J Agric Food Chem* **58** : 10219-10225.