

# Analyse de l'azote assimilable dans les moûts par Interférométrie Infrarouge à Transformée de Fourier

Matthieu DUBERNET<sup>(1)</sup>, Marc DUBERNET<sup>(1)</sup>, Françoise GRASSET<sup>(1)</sup>, A. GARCIA<sup>(1)</sup>.

<sup>(1)</sup>Laboratoire DUBERNET – 11100 Narbonne

Nous avons déjà décrit l'utilisation de l'interférométrie infrarouge à Transformée de Fourier en œnologie dans une précédente publication (*Revue Française d'Œnologie* n°181, mars-avril 2000, p10-13).

Cette méthode présente de grandes possibilités de développements et rend possible en routine certaines analyses traditionnellement coûteuses ou difficiles à mettre en œuvre.

L'appareil IRTF que nous utilisons travaille sur la bande spectrale infrarouge allant de 2000 à 10000 nm. Or les liaisons N-H et les liaisons aminées absorbent certaines longueurs d'onde à l'intérieur de cette gamme, ce qui rend, en théorie, tout à fait possible la mesure quantitative des composés azotés par infrarouge. Cette constatation a déjà donné naissance à plusieurs applications infrarouges pour le dosage de l'azote dans différents secteurs de l'agroalimentaire.

Nous avons développé l'analyse de l'azote assimilable dans les moûts de raisins par cette méthode. Ce dosage est ainsi rendu rapide, précis, et facile à mettre en œuvre. Il permet en outre une approche fine de l'azote assimilable puisque sont analysées ses deux composantes que sont l'azote ammoniacal et l'azote  $\alpha$ -aminé.

## 1 Matériel et méthode

L'appareil IRTF utilisé est le Winescan FT120 commercialisé par la société Foss.

Une calibration de cet appareil a été effectuée pour les paramètres azote ammoniacal, et azote  $\alpha$ -aminé. Afin d'établir les comparaisons nécessaires, les méthodes de références employées sont une méthode enzymatique pour le dosage de l'azote ammoniacal, et une méthode colorimétrique utilisant l'O-Phtaldialdéhyde pour celui de l'azote  $\alpha$ -aminé. Ces deux méthodes sont très précises et ont l'avantage d'être très spécifiques.

Les calibrations ont été effectuées grâce à 100 échantillons de moûts de raisins frais de différents cépages provenant de divers terroirs du Languedoc-Roussillon. Ces moûts sont d'abord analysés par la méthode de référence, puis sont présentés à l'appareil IRTF afin de faire l'acquisition de leur spectre infrarouge en vue du traitement statistique.

La banque de spectres infrarouges ainsi collectée est confrontée aux valeurs d'azote obtenues par analyse de référence, afin de faire une sélection des bandes passantes du spectre les mieux corrélées avec les valeurs d'azote. En d'autres termes, il s'agit de sélectionner les zones spectrales contenant le plus "d'information" sur l'azote du moût.

Les corrélations obtenues se sont révélées de très bonne qualité, avec des niveaux "d'explication" qui s'avèrent rapidement passer les 95 % après seulement quelques bandes passantes sélectionnées. Ce type de profil constitue un excellent cas de figure en IRTF.

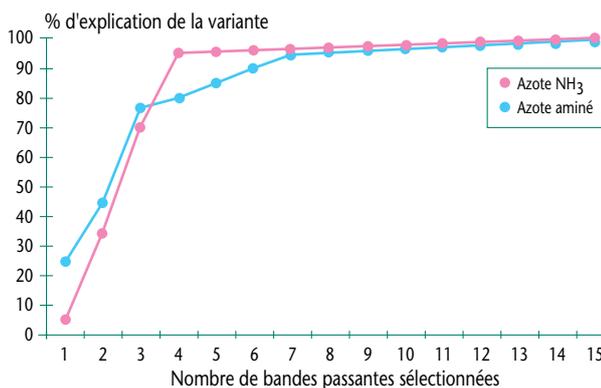


Figure 1- "Explication" cumulée des paramètres en fonction du nombre de bandes passantes.

Un modèle statistique prédictif est alors constitué par P.L.S. (Partial Least Square), technique très courante en IRTF. Ce modèle relie directement la valeur prédictive du paramètre aux valeurs d'absorbance des bandes passantes sélectionnées.

Les critères statistiques qui permettent de juger de la qualité de cette P.L.S. se sont avérés particulièrement bons.

Les calibrations ainsi obtenues ont été ensuite validées, d'une part par le protocole O.I.V. de validation d'une méthode usuelle par rapport à une méthode de référence, et d'autre part par une approche comparative directe mettant en œuvre le dosage d'un nombre important d'échantillons à la fois sur la méthode de référence et à la fois sur l'IRTF.

## 2 Résultats et performances de l'analyse

Les performances de la méthode ont été mesurées pour chacun des deux paramètres, azote ammoniacal et azote  $\alpha$ -aminé, grâce au protocole O.I.V. de validation des méthodes usuelles.

### 2.1- Répétabilité

La répétabilité est l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'analyse indépendants entre eux obtenus avec la méthode considérée sur un même vin, dans le même laboratoire, avec le même opérateur utilisant le même matériel, dans un court intervalle de temps. Les répétabilités des méthodes obtenues pour la mesure de l'azote ammoniacal et l'azote  $\alpha$ -aminé ont été les suivantes (tableau 1).

Tableau 1- Répétabilité des méthodes.

	Azote ammoniacal (mg/l éq. azote)	
	Méthode de référence	Méthode IRTF
Écart type de répétabilité Sr	6,9	5,1
Répétabilité r	19,4	14,3
	Azote $\alpha$ -aminé (mg/l éq. azote)	
	Méthode de référence	Méthode IRTF
Écart type de répétabilité Sr	3,2	3
Répétabilité r	9,1	8,5

La répétabilité de la méthode IRTF s'avère meilleure que celle de la méthode de référence pour le dosage de l'azote ammoniacal dans les moûts. Cette donnée est confirmée par un test statistique de Fisher.

La répétabilité de la méthode IRTF s'avère meilleure que celle de la méthode de référence pour le dosage de l'azote  $\alpha$ -aminé dans les moûts. Cette donnée est confirmée par un test statistique de Fisher.

Les performances de répétabilité obtenues en IRTF s'avèrent donc d'un très bon niveau et sensiblement supérieures à celles des méthodes chimiques de référence, qui sont pourtant des méthodes très performantes.

Ce type de résultat reste cependant assez courant en IRTF. En effet, cette méthode étant basée sur une mesure physique, elle se révèle d'une répétabilité souvent meilleure aux méthodes chimiques, dans la mesure où l'instrument présente une bonne stabilité.

## 2.2- Justesse

La justesse sera définie comme l'écart de l'accord entre les valeurs obtenues par la méthode de référence, et celles obtenues par la méthode usuelle, indépendamment des erreurs de fidélité des deux méthodes.

La comparaison des méthodes qui a été effectuée donne les résultats suivants (figures 2 et 3).

### 2.2.1- Azote ammoniacal

Un test de Student (test sur l'égalité des moyennes de deux populations) est mis en œuvre afin de tester si d'une part le biais moyen calculé est significativement différent de 0, et si la pente calculée de la droite de régression est significativement différente de 1.

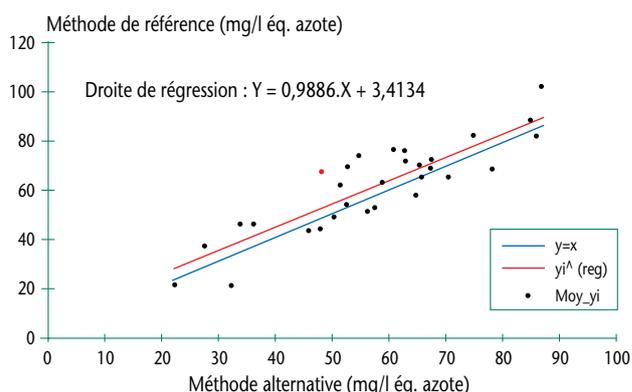


Figure 2- Comparaison des méthodes alternative (I.R.T.F.) et de référence (enzymatique) pour la mesure de l'azote ammoniacal.

Tableau 2- Justesse des méthodes

Justesse		
Biais moyen Md	-2,7	
Écart type biais moyen Sd	7,8	
Test de Student	Test à 5 %	Conclusion
Test sur le biais Md	-5,67 < 0 < 0,16 (vérifié)	Md non significativement différent de 0
Test sur la pente	0,81 < 1 < 1,17 (vérifié)	Pente non significativement différente de 1

La relation entre les deux méthodes est assez étroite puisque le biais moyen n'est pas significativement différent de 0, et que l'écart type de l'écart moyen est relativement faible, n'étant que de 7,8 mg/l. Cela signifie que 95 % des écarts des résultats des deux méthodes se situent dans une fourchette de +/- 7,8 mg/l.

Nous pouvons donc considérer à la vue de ces résultats que les réponses des deux méthodes sont très bien reliées.

### 2.2.2- Azote $\alpha$ -aminé

Un test de Student (test sur l'égalité des moyennes de deux populations) est mis en œuvre afin de tester si d'une part le biais moyen calculé est significativement différent de 0, et si la pente calculée de la droite de régression est significativement différente de 1 (figure 3 et tableau 3).

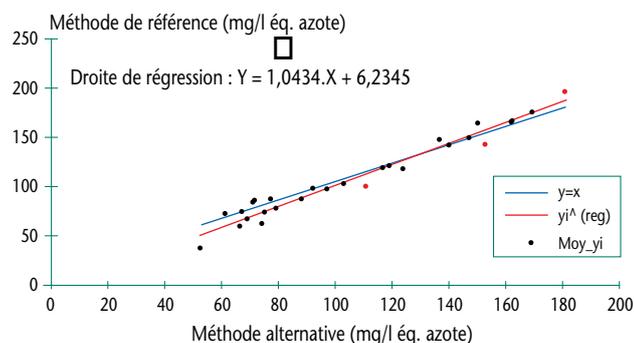


Figure 3- Comparaison des méthodes alternative (I.R.T.F.) et de référence (enzymatique) pour la mesure de l'azote  $\alpha$ -aminé.

Tableau 3- Justesse des méthodes.

Justesse		
Biais moyen Md	1,7	
Écart type biais moyen Sd	4,9	
Test de Student	Test à 5 %	Conclusion
Test sur le biais Md	-0,11 < 0 < 3,55 (vérifié)	Md non significativement différent de 0
Test sur la pente	1,00 < 1 < 1,09 (vérifié)	Pente non significativement différente de 1

La relation entre les deux méthodes est assez étroite puisque le biais moyen n'est pas significativement différent de 0, et que l'écart type de l'écart moyen est relativement faible n'étant que de 4,9 mg/l. Cela signifie que 95 % des écarts des résultats des deux méthodes se situent dans une fourchette de +/- 4,9 mg/l.

Nous pouvons donc considérer à la vue de ces résultats que les réponses des deux méthodes sont très bien reliées.

## 2.3- Conclusion

La validation de la méthode semble donc tout à fait correcte, par une très bonne relation avec la méthode de référence, et par d'excellents niveaux de répétabilité. La mesure de l'azote assimilable dans les moûts par IRTF se révèle donc d'un très bon niveau de précision, largement comparable avec les méthodes de référence mises en œuvre.

Il convient de remarquer ici que c'est une des premières fois en IRTF que nous obtenons une calibration très fine à de si faibles niveaux de concentration (de l'ordre du mg/l). Plus couramment l'analyse IRTF s'applique surtout aux "macrocomposés" des moûts et des vins qui se trouvent à des niveaux de concentration de l'ordre du g/l.

Nous voyons deux raisons particulières expliquant les bonnes performances de ces calibrations :

- Les zones spectrales infrarouges qui sont traitées contiennent une information très riche et complète sur les composés azotés du moût.
- Les méthodes de référence employées sont de très bonne qualité et offrent des valeurs de référence très fines, qui permettent d'optimiser les modèles statistiques prédictifs.

## 3 Application de l'analyse aux moûts des vendanges 2000

Tout en ayant les propriétés de l'analyse par IRTF, rapidité, faible coût et grande facilité de mise en œuvre, l'analyse de l'azote des moûts s'est donc avérée précise et juste. Ces développements ont été utilisés en routine dès la vendange 2000 sur la totalité des moûts analysés dans notre laboratoire.

Les moûts analysés sont originaires du grand Languedoc-Roussillon, et issus de l'importante diversité de cépages que comporte la région.

Une base de donnée de 3892 analyses de moûts sur l'azote ammoniacal et  $\alpha$ -aminé a ainsi été constituée. Sont également recueillies d'autres informations sur les moûts, et notamment le cépage (plus de 24 différents) et le terroir d'origine.

## 4 Résultats et analyse

### 4.1- Azote et cépages

De grandes différences sont observées entre les moyennes des cépages. Nous observons par ailleurs des valeurs d'écart type relativement faibles autour de chaque moyenne. Pour chaque cépage, la population des résultats reste donc très serrée autour de la moyenne (figure 4).

Un test statistique permet d'évaluer globalement si les différences entre les moyennes observées entre les cépages sont significatives : le test de variance évalue l'hypothèse suivante, "il y a égalité entre les moyennes des différents cépages".

Ce test a été mené à la fois pour l'azote ammoniacal et l'azote  $\alpha$ -aminé. Dans tous les cas, l'hypothèse a été rejetée avec de très faibles probabilités d'erreur.

Cette base de données nous permet ainsi de confirmer statistiquement un élément au demeurant assez connu, qui est l'influence significative du cépage sur les teneurs en azote des moûts.

Au-delà de cette observation, l'analyse de variance apporte également une donnée extrêmement intéressante qui est la part d'explication donnée par le cépage dans la variabilité des paramètres d'azote assimilable. Les valeurs obtenues sont les suivantes (tableau 4).

Tableau 4- Influence du cépage.

Cépage	Azote ammoniacal	Azote $\alpha$ -aminé
% explication de la variation	9,3 %	26,7 %

La part d'explication du cépage pour l'azote  $\alpha$ -aminé est bien plus importante que celui de l'azote ammoniacal qui s'avère assez modeste. L'azote  $\alpha$ -aminé est directement lié au métabolisme azoté de la plante, et il apparaît donc clairement ici que ce métabolisme est une fonction forte du cépage. Les variations des teneurs en azote assimilable d'un cépage à l'autre sont donc beaucoup plus liées aux variations de l'azote  $\alpha$ -aminé que de l'azote ammoniacal.

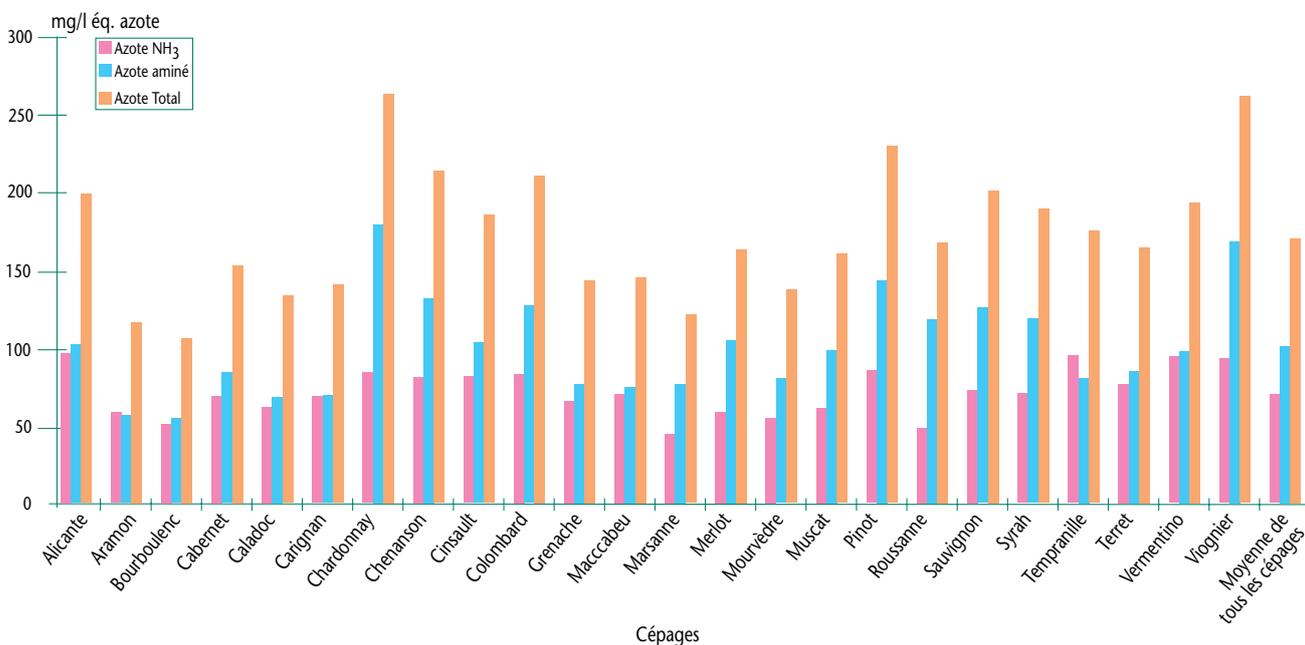


Figure 4- Teneurs en azote des moûts en fonction des cépages

La cartographie des différents cépages en fonction de leur teneur en azote sur un plan azote ammoniacal, azote aminé permet de visualiser clairement les différents types de profils (figure 5).

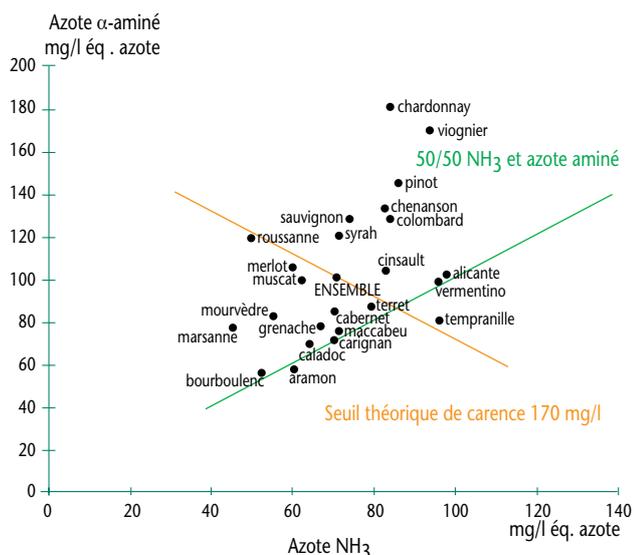


Figure 5- Répartition de l'azote dans les moûts en fonction des cépages.

Un groupe important sous le seuil théorique de carence en azote assimilable total, il constitue plus de la moitié des cépages analysés.

D'autre part, il est intéressant d'observer l'éloignement des différents cépages de la répartition 50/50 entre azote ammoniacal et azote  $\alpha$ -aminé.

### 4.2- Azote et terroirs

La même étude a été menée afin d'observer si nous trouvons des différences significatives de teneurs en azote dans les moûts en fonction des terroirs. Les terroirs en question sont des terroirs méditerranéens des zones d'appellation Corbières, Minervois, Saint-Chinian, Faugères, Coteaux du Languedoc, et des plaines de l'Aude et de l'Hérault (figure 6).

Des différences de teneurs se trouvent entre les terroirs, mais nous observons globalement des écarts types plus amples que ceux observés pour les teneurs des différents cépages.

De même que pour les cépages, une analyse de variance a été menée et a rejeté l'hypothèse globale "il n'y a pas de différences entre les moyennes de chaque terroir" pour les teneurs en azote ammoniacal et  $\alpha$ -aminé. L'effet terroir est donc statistiquement significatif sur les teneurs en azote des moûts.

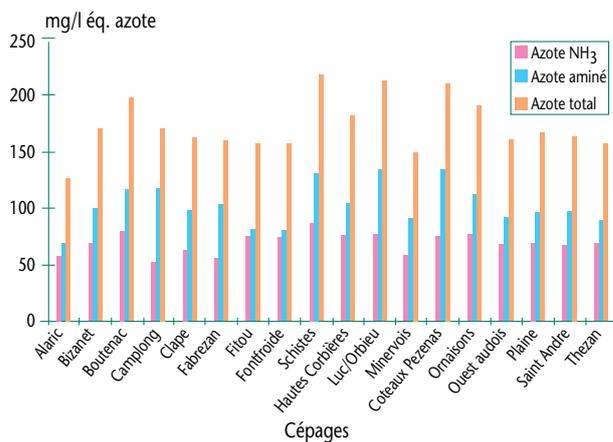


Figure 6- Teneurs en azote des moûts en fonction des terroirs.

Ce test permet donc également d'apporter un éclairage sur l'explication qu'apporte le terroir sur la variabilité des teneurs en azote des moûts.

Tableau 5- Influence du terroir

Terroir	Azote ammoniacal	Azote $\alpha$ -aminé
% explication de la variation	6 %	8,2 %

Ces niveaux d'explication s'avèrent donc plus faibles que ceux apportés par l'effet cépage. Cependant il est à noter que ces valeurs sont fonctions des terroirs présents dans la base de données ; il s'agit en l'occurrence de terroirs méditerranéens, certes différents par de nombreux caractères, mais qui se situent dans une zone géographique restreinte. Il est certainement à attendre que le même type d'étude, mené sur des terroirs pris à une échelle plus large (de l'ordre des régions viticoles françaises par exemple), donnerait un poids plus important à l'effet terroir.

La cartographie des différents terroirs en fonction de leur teneur en azote sur un plan azote ammoniacal, azote aminé permet de visualiser clairement les différents types de profils (figure 7).

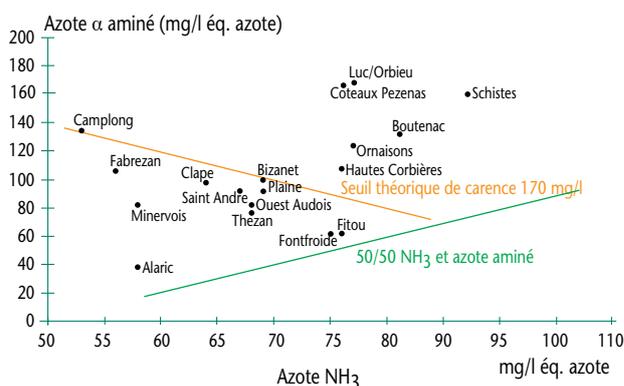


Figure 7- Répartition des teneurs en azote en fonction des terroirs Vendanges 2000.

Il apparaît ainsi clairement que certains terroirs se distinguent significativement :

- Le terroir des schistes par exemple contient des doses importantes d'azote dans ses moûts, sous les deux formes assimilables ;
- Les terroirs de Camplong et Fabrezan présentent de faibles teneurs en azote ammoniacal, mais des teneurs plus soutenues en azote  $\alpha$ -aminé ;
- Le terroir de l'Alaric se distingue bien par des niveaux de carence assez marqués.

Lorsque cette cartographie est réalisée pour chacun des cépages séparément, la distribution générale garde le même profil : on retrouve notamment les terroirs qui se distinguent le plus du groupe central (schistes, Alaric, Camplong, Fabrezan...).

### 4.3- Interaction terroir/cépage

L'étude statistique aurait été incomplète sans prendre en compte l'effet de l'interaction terroir/cépage qui est susceptible d'apporter une explication supplémentaire dans la variabilité des teneurs en azote des moûts.

La mesure de l'effet de l'interaction cépage/terroir sur les teneurs en azote est également permise par une analyse de variance à deux facteurs.

Cette dernière reprend les résultats que nous avons obtenus pour les cépages et les terroirs pris séparément. Elle applique ensuite le test de Fischer pour tester l'hypothèse de variance sur le facteur interaction "cépage/terroir" : ce test démontre que l'effet de ce facteur est significatif, mais la valeur du test indique que nous sommes à la limite du seuil du test : cet effet d'interaction, bien qu'existant semble donc rester assez discret.

Ce test de variance multifactoriel donne également la donnée d'explication globale qu'apportent les facteurs étudiés sur les teneurs en azote des moûts. Cette donnée englobe donc la part d'explication du cépage, la part d'explication du terroir, et la part d'explication de l'interaction cépage/terroir.

Artificiellement, nous pouvons alors déduire la part d'explication revenant à l'effet d'interaction cépage/terroir, car nous connaissons les parts d'explication spécifiques des effets cépage et terroir ; ceci confirme le faible niveau d'explication des variations de l'effet d'interaction cépage/terroir.

Le tableau 6 reconstitue la part d'explication de chaque facteur.

Tableau 6- Pourcentage d'explication des variations.

	Azote ammoniacal	Azote $\alpha$ -aminé
Effet cépage	9,3 %	26,7 %
Effet terroir	6 %	8,2 %
Effet d'interaction	4,7 %	3,3 %
Effet global	20 %	38,2 %

Les facteurs étudiés, cépages et terroirs apportent donc des niveaux d'explication significatifs des teneurs en azote des moûts. Ces facteurs revêtent des parts plus importantes pour l'explication de l'azote  $\alpha$ -aminé que de l'azote ammoniacal, ceci notamment en raison de l'importance du facteur cépage sur ce paramètre.

De nombreux autres facteurs qui n'ont pas pu être abordés ici apportent donc les 80 % et 61,8 % d'explication manquants pour l'explication de ces paramètres. Il s'agit notamment du mode de culture de la vigne, de la fertilisation azotée, du choix du porte-greffe et d'un large nombre de paramètres qui, mis bout à bout, influent sur les teneurs en azote des moûts.

### 4.4- Azote et maturation

Dans le suivi de maturation des raisins, ont pu être inclus les valeurs des teneurs en azote. Leur suivi au cours de la maturation a donné les résultats suivants (figure 8).

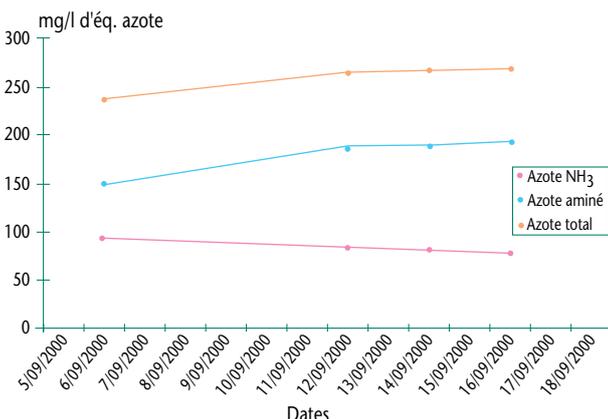


Figure 8- Evolution des teneurs en azote des raisins au cours de la maturation (Roussane Corbières).

L'évolution donnée dans la figure 8 correspond à une Roussanne des Corbières. La période tracée ici correspond à la fin de maturation des raisins.

Ce type d'évolution s'est retrouvé dans tous les cas lors de suivi de maturation.

Les évolutions des teneurs en azote se font de façon progressive dans des proportions relativement limitées. Au cours de la maturation, la teneur en azote ammoniacal diminue et l'azote  $\alpha$ -aminé augmente. De fait, l'azote assimilable total ne connaît pas d'évolution fondamentale.

Il est à noter ici que nous sommes dans la période de fin de maturation, et que des mesures effectuées depuis la véraison jusqu'à la maturation donneraient certainement des évolutions, notamment pour ce dernier paramètre.

On peut facilement supposer que la diminution de l'azote ammoniacal au profit de l'azote  $\alpha$ -aminé correspond à la prise en charge de l'azote ammoniacal par le métabolisme azoté de la baie de raisin, ce phénomène se poursuit jusqu'à la fin de la maturation.

Nous avons ainsi constaté que des raisins très mûrs ne vont pas forcément présenter des teneurs en azote assimilable total basses, mais plutôt des teneurs en azote ammoniacal relativement faibles, alors que l'azote  $\alpha$ -aminé peut se maintenir à des niveaux tout à fait soutenus. La connaissance de teneurs en azote ammoniacal excessivement basses permet ainsi de procéder à des amendements azotés directement sur le moût avant départ en fermentation, afin d'apporter aux levures le minimum d'azote ammoniacal dont elles ont besoin pour leur phase de croissance.

#### 4.5- Évolution des teneurs en azote assimilable au cours de la fermentation

L'approche de l'azote assimilable par ses deux composantes doit permettre d'affiner le raisonnement des apports azotés, et optimiser ainsi les cinétiques de fermentation. Ces deux formes d'azote ne sont pas assimilées de la même façon. L'azote ammoniacal constitue la forme préférentielle de source azotée pour la levure, l'azote  $\alpha$ -aminé, reste plus difficilement assimilable car les levures ont besoin de mettre en œuvre des transporteurs transmembranaires pour l'assimiler.

La consommation rapide de l'azote ammoniacal s'est traduite par les observations suivantes :

- Très rapidement après le départ en fermentation, l'azote ammoniacal des moûts chute à des valeurs proches de 0, même quand des apports significatifs de sulfate d'ammonium ont été réalisés sur le moût.
- Des apports de 200 mg/l de sulfate d'ammonium ont été opérés en laboratoire sur des moûts en fermentation. Moins de 3 heures plus tard, les analyses d'azote ammoniacal révèlent des teneurs proches de 0.

Ces observations ont été étayées par les dosages des teneurs en azote de cuves en fermentation (figure 9).

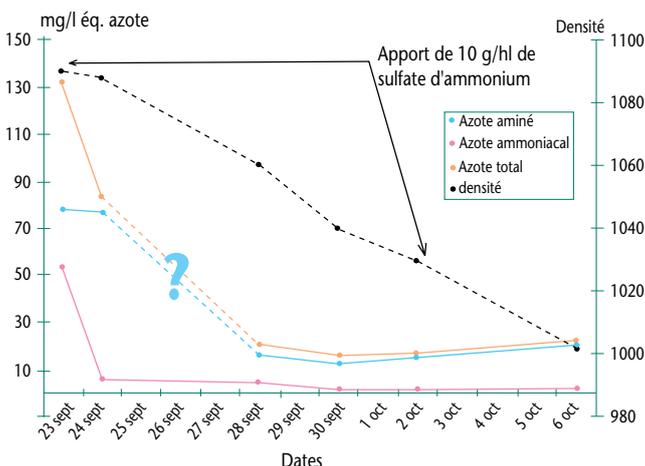


Figure 9- Evolution du type de la teneur en azote au cours de la fermentation (vin rosé).

Dès le début de la fermentation, l'azote ammoniacal chute à une teneur proche de 0, et reste à ce niveau, même après un ajout de sulfate d'ammonium à la densité de 1020. Aucun vin nouveau n'a présenté de teneur significativement différente de 0 sur les mesures réalisées, même lorsque des ajouts de sels d'ammonium ont été réalisés assez tardivement.

L'azote  $\alpha$ -aminé n'est consommé que dans une seconde phase. Nous n'avons pas pu collecter des données permettant de dire à quel moment sa teneur commence à chuter, mais il s'avère que sa teneur reste un moment stable alors que l'azote ammoniacal est déjà entièrement consommé. À la densité de 1060, sa teneur est faible et atteint un minimum qu'à une densité de 1040.

Sur la fin de fermentation, nous observons une légère remontée de l'azote  $\alpha$ -aminé, probablement liée à la lyse des levures. Ce phénomène commence dès que la densité arrive à un niveau de 1030 environ.

Les vins nouveaux que nous avons mesurés ont eu des teneurs allant de 20 à 60 mg/l d'azote  $\alpha$ -aminé. Nous n'avons pas pu mesurer l'effet de la fermentation malolactique sur cette teneur, mais les fourchettes des teneurs en azote  $\alpha$ -aminé des vins ayant achevé leur fermentation malolactique restent dans les mêmes ordres de grandeur.

## CONCLUSION

**L'IRTF permet l'analyse de l'azote assimilable automatique, rapide, fiable, et peu onéreuse. Cette analyse devient de cette façon un paramètre de routine pour les laboratoires équipés d'un instrument d'analyse IRTF.**

**Parmi les informations analytiques du moût, ce paramètre tient toute sa place puisqu'il apporte des éléments précieux qui vont permettre un raisonnement fin des amendements azotés sur les moûts et les moûts en fermentation ; il est alors possible de pouvoir anticiper d'éventuels problèmes de carence, et d'ajuster les doses en fonction des niveaux d'azote mesurés.**

**En cours de fermentation, cette mesure perd, par contre, beaucoup de son intérêt dans la mesure où les teneurs en azote ammoniacal sont quasiment nulles, et qu'elles n'évoluent pas en fonction des amendements éventuellement réalisés.**

**Le suivi des cinétiques de fermentation, couplé à la dégustation reste donc un outil fondamental et incontournable pour mesurer le bon déroulement des fermentations alcooliques.**