



Quelques défis techniques et analytiques autour des boissons désalcoolisées

MASUYER Alice-Marie, ammasuyer@labexcell.com

MOREAU Maxime, mmoreau@labexcell.com

NICOLATO Tommaso, tnicolato@labexcell.com

RENOUF Vincent, vrenouf@labexcell.com

Que l'on le déplore ou le comprenne, force est de constater que les boissons désalcoolisées ont désormais une place très significative au sein de la filière des vins, des spiritueux, des bières et des autres boissons originellement fermentées. Au laboratoire, les sollicitations à leurs sujets sont de plus en plus fréquentes. Ce document a donc été établi avec pour objectif de synthétiser quatre enjeux majeurs de cette pratique.

En préambule, rappelons simplement la chimie toute spécifique de la molécule d'éthanol. L'éthanol est une molécule dite amphiphile. Cela signifie qu'elle présente une partie polaire, la fonction -OH et une partie apolaire, sa petite chaîne aliphatique $\text{CH}_3\text{-CH}_2$. Outre cette bivalence, le ratio de ces deux parties dans la molécule d'éthanol est très singulier. La partie polaire et la partie apolaire représentent à peu près le même volume alors que pour d'autres composés de ce type ce n'est pas le cas. Les stérols, par exemple, ont une partie apolaire beaucoup plus volumineuse que la partie polaire. Cette spécificité peut paraître anodine mais elle revêt, en réalité, d'une importance considérable dans les rôles joués par l'éthanol. Premièrement, l'éthanol est un solvant avec une capacité d'extraction de composés hydrophobes lors de la vinification puis un stabilisant. Il « pont » les composés polaires et les composés apolaires parmi lesquels les composés phénoliques ont un ratio partie polaire/partie apolaire inversé du fait de leurs cycles phénoliques. Deuxièmement le côté amphiphile de l'éthanol explique en immense partie son rôle inhibiteur des microorganismes (et globalement des cellules) car l'éthanol s'immisce dans la bicouche phospholipidique des membranes cellulaires. Ces dernières sont aussi des structures amphiphiles avec un cœur hydrophobe et des surfaces hydrophiles. Cet aspect est la base de la fluidité membranaire indispensable à l'efficacité des systèmes enzymatiques qui s'y trouvent. Lorsque l'éthanol s'intercale entre les phospholipides ou les stérols membranaires, la fluidité membranaire et donc les réactions sont sensiblement modifiées.

La désalcoolisation d'une boisson initialement pourvue en éthanol implique donc : 1) de correctement doser la teneur finale en éthanol dans le produit, 2) d'anticiper la perte de stabilité de certains composés directement impliqués dans la qualité du produit (tannins, composés phénoliques, arômes...), 3) d'évaluer l'instabilité microbienne générée par la soustraction d'un composé contraignant pour tout type de microorganisme et 4) évidemment essayer d'appréhender l'effet sur la qualité du produit. Cet article reprend donc ces 4 aspects.

1. Les différentes techniques de dosage de l'éthanol et comment atteindre les valeurs les plus faibles possibles pour alléger dans certains cas d'un 0.0

Juste après l'eau, l'éthanol est le constituant majoritaire des boissons vitivinicoles. Il s'agit de la seule molécule intrinsèquement liée à la définition du vin, car « son titre alcoométrique acquis ne peut être inférieur à 8,5% vol » (définition de base du VIN 18/73, OIV), ce qui en souligne l'énorme importance dans l'analyse œnologique. L'analyse de l'éthanol a été d'abord un défi d'alchimistes. Les premières traces du processus de distillation avec des objectifs de purification se situent autour du III^{ème} siècle apr. J.C à Alexandrie. L'invention du *tribikos* (un alambic ancestral) et les premiers usages de récipients en verre et en cuivre, ouvrent la porte à la distillation moderne, qui connaîtra un développement très important à partir de l'époque médiévale (avec l'apparition du mot *aqua ardens*).

La distillation, accompagnée par la densimétrie, reste encore aujourd'hui la méthode de référence pour l'analyse de l'éthanol dans les boissons vitivinicoles (OIV-MA-AS312-01A). En analysant la densimétrie d'une solution bicomposante d'eau-éthanol après distillation, il est possible de connaître précisément sa concentration en éthanol. La sensibilité de la méthode ne dépend que de deux facteurs : la sensibilité du densimètre électronique et le rendement de la distillation, ceux-ci en font une méthode très robuste.

Pour des boissons avec un degré alcoolique (>0.5% v/v), l'approche densimétrique reste donc très pertinente, en restant vigilant aux ajouts de substances volatiles exogènes (arômes, terpènes, huiles essentielles) qui peuvent, dans certaines boissons, interférer avec le résultat obtenu.

En revanche, pour des concentrations d'éthanol inférieures, l'incertitude analytique augmente sensiblement et l'approche devient de moins en moins pertinente, en particulier sur les boissons aromatisées.

Pour des concentrations d'éthanol faibles (<0.5% v/v), d'autres approches analytiques ont dû être développées. Initialement réservées aux produits ne contenant pas d'éthanol (miel, jus de fruits, mouts concentrés), les approches enzymatiques et chromatographiques sont fréquemment utilisées en œnologie car ils permettent de descendre en deçà des limites de quantification, avec l'avantage de rester très spécifiques.

Afin de pouvoir répondre aux nouvelles allégations d'étiquetages des boissons désalcoolisées (0.0% v/v, voire parfois 0.00 % v/v), le Laboratoire EXCELL a développé, en 2022, une méthode en chromatographie gazeuse GC-FID. Cette méthode a été accréditée COFRAC sur les vins désalcoolisés, les boissons à base de vin désalcoolisé et les jus de fruit, et elle est capable d'atteindre une limite de quantification de 0.002%.v/v ce qui en fait une méthode de référence pour les allégations de désalcoolisation d'un produit descendant en deçà de 0,1 % vol.

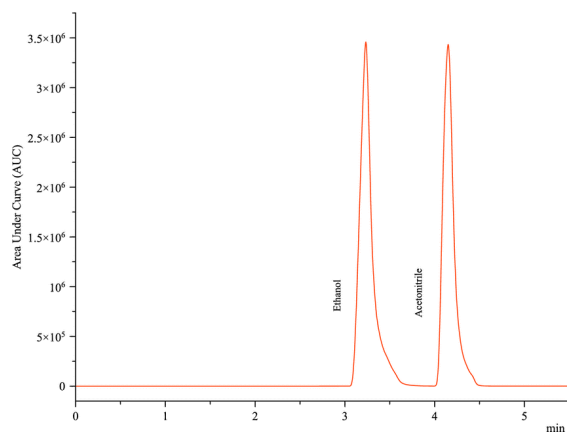


Figure 1.1

Exemple de chromatogramme



Figure 1.2

GC-FID

2. Instabilité colloïdale des produits désalcoolisés

Comme indiqué en introduction, l'absence d'alcool favorise l'apparition d'instabilités. Au laboratoire, il a été recensé l'apparition de différents troubles ou dépôts qui, de nos jours, se font plus rares en œnologie classique. Les protéines et les tanins sont notamment au cœur des observations effectuées (Figure 2). Cet ensemble d'éléments protéiques et polyphénoliques a déjà été identifié comme instable dans des conditions faibles en alcool dans le milieu brassicole (Karl J.Siebert & P.Y. Lynn, 2003). Peu d'études ont été jusqu'alors menées sur une matrice œnologique dépourvue en éthanol. Cependant, les enjeux auxquels fait face le laboratoire tendent à appliquer ces résultats aux vins sans alcools.

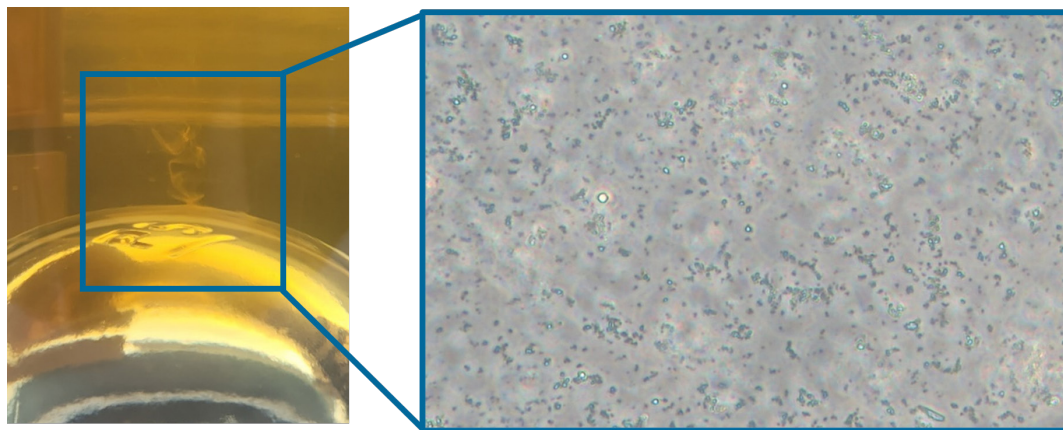


Figure 2

Trouble apparent dans une boisson désalcoolisée à base de raisin. Observation microscopique à contraste de phase (x400). Le trouble est constitué de protéines et de tanins.

Cette problématique est d'autant plus difficile à appréhender étant donné que les vins sans alcools n'ont pas la même réponse aux tests classiques de stabilité protéique. En effet, les classiques tests à la chaleur ne permettent pas de mettre en avant une instabilité sur un vin sans alcool. Avant l'apparition d'un dépôt, l'évaluation du risque de précipitation protéique doit passer par la quantification des protéines présentes dans le produit.

Lorsque le dépôt a déjà eu lieu, son identification peut être réalisée par FTIR (Fourier Transform InfraRed spectroscopy). Cette analyse compare le spectre d'absorbance du dépôt à une base de données comprenant de nombreux composés et molécules (protéines, tanins œnologiques notamment...). Cette méthode est toutefois purement qualitative, elle atteste donc de la présence d'une molécule, sans en connaître sa concentration. Il n'est donc pas possible d'identifier le composant majoritaire du dépôt (Figure 3). Une différenciation entre un dépôt polyphénolique ou un dépôt protéique peut quant à elle être réalisée par quantification d'azote total par combustion (la protéine contient de l'azote tandis que le tanin non). Ces différentes méthodes d'analyse mettent en jeu le savoir-faire du laboratoire. Elles reposent sur la polyvalence des analyses pratiquées au sein de celui-ci.

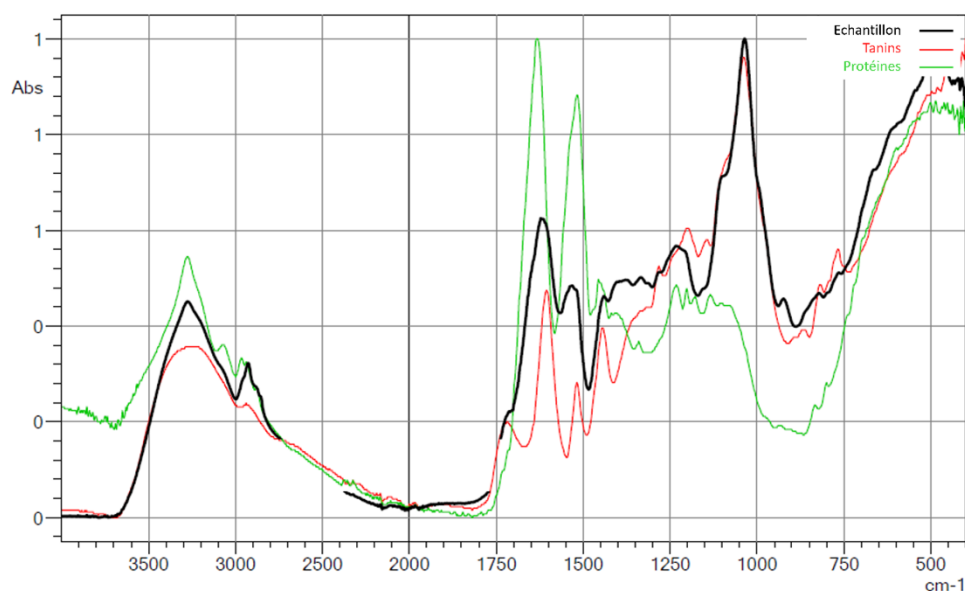


Figure 3

Spectroscopie FTIR du dépôt précédent, composé de protéines et de tanins dans une boisson désalcoolisée. L'absorbance à 3300 et à 1600 cm^{-1} correspond à la présence de protéines tandis que le pic à 1050 cm^{-1} correspond aux tanins.

3. Instabilité microbiologique des produits désalcoolisés

Les microorganismes présentent des capacités variables de résistance à l'éthanol. Dans le vin, les plus résistants sont les levures *Brettanomyces* et *Zygosaccharomyces*, les bactéries acétiques du genre *Acetobacter* et les bactéries lactiques et notamment certains Lactobacilles. Cette tolérance à l'alcool est aussi influencée par la température (une température « élevée » contribue à la fluidité des membranes cellulaires évoquée en introduction) et par le potentiel RedOX (les insaturations des chaînes aliphatiques qui créent des coudes dans l'enchevêtrement des queues apolaires des phospholipides qui contrebalancent l'effet fluidifiant de l'éthanol nécessitent une capacité d'oxydation ; tout comme les noyaux phénoliques fondateurs des stérols qui jouent aussi des rôles de protection de la membrane très importants). Le niveau de SO₂ dont l'une des principales voies d'action vis-à-vis des microorganismes se trouve aussi au niveau des structures pariétales de ces derniers est aussi un élément clef. Ces éléments expliquent par exemple l'efficacité d'un traitement thermique de stabilisation (type « flash-pasteurisation ») est d'autant plus efficace sur un vin avec un TAV élevé et un fort niveau de SO₂ et en privation d'apport d'oxygène.

Il s'agit bien de phénomènes de tolérance. Aucun microorganisme n'est intrinsèquement favorisé par la présence d'éthanol contrairement à ce que l'on entend parfois dire sur *Brettanomyces* notamment : « les hauts degrés favorisent *Brettanomyces* ». En réalité, *Brettanomyces* n'est pas directement favorisée en présence d'une quantité importante d'alcool, elle est tout simplement moins affectée que les autres germes.

L'éthanol est donc véritablement bien un élément essentiel dans la stabilité microbiologique des vins (attention tout de même aux vins avec des TAV élevés mais avec encore des teneurs en sucres résiduels significatives). Inversement, la réduction de la teneur en éthanol ouvre la voie aux développements de multiples autres microorganismes, ceux qui ont pu résister aux vinifications mais aussi et surtout ceux présents à la cave qui, alors qu'ils sont sous contraintes permanentes des actions d'hygiène, trouvent dans un vin désalcoolisé un milieu particulièrement favorable. L'hygiène et son contrôle fréquent sont donc des éléments encore plus essentiels pour la production de boissons désalcoolisées.

Les principaux outils de contrôle sont les dispositifs d'écouvillonnage et de boîtes de Petri contact pour l'analyse des surfaces et l'aérocollection pour les analyses d'atmosphère. Les analyses d'ATPmètrie sont inévitables avec des critères d'acceptabilité adaptés. Le Laboratoire Excell a référencé deux dispositifs d'ATPmètres particulièrement efficaces. Nous pouvons vous accompagner dans la mise en place de vos plans de contrôle.

Récemment, le Laboratoire Excell a également financé les travaux de thèse de Paul Le Montagner qui, supervisée par la professeure Isabelle Masneuf de l'ISVV de Bordeaux, a travaillé aux phénomènes d'adhésion de *Brettanomyces*. La photographie de la figure 4 est une observation de cellules de *Brettanomyces* adhérentes aux surfaces. Le zoom de cette photographie est remarquable. Il permet de voir des filaments qui permettent à *Brettanomyces* d'adhérer à cette surface. La photographie initiale mettait aussi clairement en évidence qu'une surface comme l'inox n'est pas réellement lisse au niveau microscopique et que des crevasses existent pouvant être des zones de refuge ou d'ancrage particulièrement propices aux adhésions microbiennes.

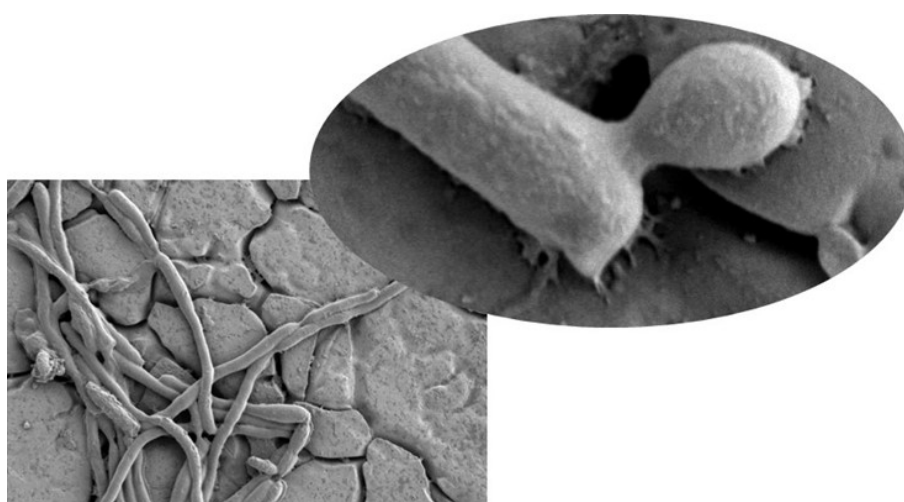


Figure 4

Observation en microscopie électronique à balayage de cellules de *Brettanomyces* ayant adhéré à l'inox. L'ovale en haut à droite est un zoom de la photographie initiale. Ces photographies sont issues de la thèse de doctorat de Paul Le Montagner que le Laboratoire Excell finance à l'ISVV (encadrement assuré par la professeure Isabelle Masneuf).

Ces constats soulignent l'importance des contrôles des surfaces. Ils ont également amené le Laboratoire Excell à se rapprocher de spécialistes en la matière et une collaboration a été mise en place avec la société DEVEA qui produit et commercialise des dispositions de décontamination par voies aériennes, les dispositifs PHILEAS. Nous avons testé ces dispositifs et nous recommandons fortement leur utilisation dans le cadre de la production de boissons désalcoolisées et tout particulièrement dans l'optique de sécurisation de certaines opérations clefs (transferts, mises en bouteilles/conditionnement...).



Figure 5

Le laboratoire EXCELL distribue les dispositifs PHILEAS de la société DEVEA experte en décontamination par voies aériennes des zones sensibles. Dans le cadre de l'élaboration de vins désalcoolisés ces dispositifs semblent particulièrement adaptés.

Rappelons également que notre dispositif Quick Trap® utilisé pour le contrôle de contaminations chimiques des atmosphères permet également de suivre certains marqueurs d'activité biologique. La détection de ces marqueurs doit être une alerte vis-à-vis d'un risque de développements microbiens problématiques avec les conditions de quasi-stérilité qu'impose la production de boissons désalcoolisées.

Indiquons enfin que dans une proportion notable de problématiques d'instabilité microbienne de boissons désalcoolisées que nous avons eu à gérer au laboratoire, ce n'est pas la boisson elle-même qui pouvait défaillir en termes de microbiologie mais les ingrédients et notamment les préparations aromatiques qui pouvaient y être ajoutées en fin d'itinéraire. Ces derniers nécessitent également des contrôles microbiologiques stricts. A cette fin nous avons mis en place un test d'activité microbienne par mesure d'ATPmètrie sur liquide qui est particulièrement adapté (avec un critère d'acceptabilité très strict).

4. Un test de désalcoolisation disponible au laboratoire pour des premiers essais et la dégustation

Le changement climatique impacte l'ensemble de la filière vin avec des maturations plus précoces et des degrés alcooliques parfois difficiles à contrôler en fin de campagne. La chaleur est subie par les vignes mais aussi par les consommateurs qui sont de plus en plus en quête de fraîcheur lors de la consommation d'un verre de vin. Parmi les solutions technologiques possibles pour modérer les degrés alcooliques, l'évaporation sous vide du vin (classique ou à cônes rotatifs) se démocratise. Elle permet de désalcooliser partiellement ou complètement le produit, en réduisant au minimum les pertes de volume. Les techniques membranaires sont efficaces et économiques pour des désalcoolisations limitées (1-4% maximum), car ensuite elles engendrent des pertes de volume plus importantes.

Afin de permettre à nos clients d'explorer l'impact de la désalcoolisation sur leur produits, un protocole d'essai pilote pouvant descendre jusqu'à 2 litres de vin à désalcooliser a été mis en place au laboratoire. La technologie utilisée est l'évaporation sous vide rotative. Cela permet de bien apprécier le résultat et de pouvoir le déguster à la manière dont l'on déguste un essai de collage par exemple. L'essai de désalcoolisation est donc une nouvelle prestation du Laboratoire Excell.

Pour plus d'informations, n'hésitez pas à contacter le secrétariat : secretariat@labexcell.com.